Razvoj analitičke metode za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina (osnove i smjernice u razvoju metode za peptidne lijekove)

Pikutić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:504803

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Marija Pikutić
783/PI

RAZVOJ ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE ENANTIOMERNOG SASTAVA LEUCIN ENKEFALINA (osnove i smjernice u razvoju metode za peptidne lijekove)

Rad je izrađen u Laboratoriju za plinsku kromatografiju i masenu spektrometriju na odjelu Analitike, Istraživanja i razvoja, Pliva d.o.o., Zagreb, pod stručnim vodstvom Ivana Černave, dipl. ing. i uz mentorstvo izv. prof. dr.sc. Ivone Jakaša u Laboratoriju za analitičku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivone Jakaša koja mi je svojim znanstvenim i stručnim savjetima pomogla u izradi ovog diplomskog rada.
Zahvaljujem se gospodinu Ivanu Černavi na prenesenom znanju i pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.
Veliko hvala na ljubavi, strpljenju i podršci mojim najmilijima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

RAZVOJ ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE ENANTIOMERNOG SASTAVA LEUCIN ENKEFALINA (osnove i smjernice u razvoju metode za peptidne lijekove)

Marija Pikutić, 783/PI

Sažetak: Analiza optičke čistoće peptida važan je korak u karakterizaciji aktivnih farmaceutskih supstancija peptidnih lijekova. Cilj ovog rada bio je razviti pouzdanu i selektivnu analitičku metodu za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina te definirati smjernice za primjenu razvijene metode kod određivanja optičke čistoće ostalih API-a peptidnih lijekova. U tu svrhu razvijena je i validirana analitička metoda koja se temelji na hidrolizi peptida leucin enkefalina, derivatizaciji oslobođenih aminokiselina te njihovoj separaciji na kiralnoj stacionarnoj fazi primjenom plinske kromatografije u sprezi s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID). U usporedbi sa standardnom metodom hidrolize, brzi alternativni postupci koji uključuju upotrebu smjese klorovodične i trifluoroctene kiseline pokazali su jednaku i čak bolju učinkovitost. Za razliku od derivata aminokiselina dobivenih postupkom dvostupanjske derivatizacije, derivati aminokiselina dobiveni postupkom jednostupanjske derivatizacije uz dodatak trifluoroctene kiseline u otapalo bili su stabilni kroz 24 sata. Od pet ispitanih kiralnih stacionarnih faza baziranih na β-ciklodekstrinima, prihvatljiva separacija enantiomernih derivata aminokiselina postignuta je na kiralnoj stacionarnoj fazi MEGA-DEX DMT beta. Sadržaj leucin enkefalina u standardu koji sadrži leucin enkefalin acetat hidrat bio je veći od 75 % što je u skladu s deklariranom vrijednošću.

Ključne riječi: *optička čistoća peptida, leucin enkefalin, GC-FID, hidroliza peptida, derivatizacija aminokiselina*
Rad sadrži: 59 stranica, 27 slika, 13 tablica, 44 literaturnih navoda, 1 prilog
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *izv. prof. dr. sc. Ivone Jakaša*
Pomoć pri izradi: *Ivan Černava, dipl. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv.prof.dr.sc. *Damir Iveković*
2. Izv.prof.dr.sc *Ivone Jakaša*
3. Izv.prof.dr.sc. *Lidija Barišić*
4. Doc.dr.sc. *Antonela Ninčević Grassino* (zamjena)

Datum obrane: 27. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF THE ENANTIOMERIC COMPOSITION OF LEUCINE ENKEPHALIN (basics and guidelines in developing a method for peptide drugs)

Marija Pikutić, 783/PI

Abstract: Determination of the optical purity of peptides is an important step in the characterization of active pharmaceutical ingredients of peptide drugs. The aim of this study was to develop a reliable and selective analytical method for determination of the enantiomeric composition of leucine enkephalin and define the guidelines for application of the developed method when determining the optical purity of other peptide APIs. For this purpose analytical method based on hydrolysis of peptide leucine enkephalin, derivatization of free amino acids and their separation on a chiral stationary phase by application of gas chromatography and flame-ionisation detector (GC-FID) was developed and validated. In comparison to standard hydrolysis method, fast alternative methods involving the use of a mixture of hydrochloric and trifluoroacetic acid have shown to be more effective. In contrast to two-step derivatization procedure, one-step derivatization procedure with addition of trifluoroacetic acid to solvent resulted in 24 h stability of all derivatives. Of the five investigated chiral stationary phases based on *β*-cyclodextrins, accetable separation of the enantiomeric amino acid derivatives was achieved on the chiral stationary phase of the MEGA-DEX DMT beta. Content of leucine enkephalin in the standard containing leucine enkephalin acetate salt hydrate showed to be within the declared range (> 75 %).

Keywords: *optical peptide purity, leucine enkephalin, GC-FID, peptide hydrolysis, amino acid derivatization*
Thesis contains: 59 pages, 27 figures, 13 tables, 44 references, 1 supplement
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: *PhD. Ivone Jakaša, Associate professor*
Technical support and assistance: *Ivan Černava, dipl. ing.*

Reviewers:
1. PhD. *Damir Iveković*, Associate professor
2. PhD. *Ivone Jakaša,* Associate professor
3. PhD. *Lidija Barišić,* Associate professor
4. PhD. *Antonela Ninčević Grassino,* Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 27 September 2017

Sadržaj:

1 UVOD 1
2 TEORIJSKI DIO 2
2.1 PEPTIDNI LIJEKOVI 2
2.1.1 Važnost analize enantiomernog sastava 4
2.2 ANALIZA ENANTIOMERNOG SASTAVA PEPTIDNIH LIJEKOVA 6
2.2.1 Hidroliza peptida 6
2.2.2 Derivatizacija aminokiselina 7
2.2.2.1 Sililiranje 8
2.2.2.2 Alkiliranje i aciliranje 9
2.2.3 Plinska kromatografija – kiralna separacija 10
2.3 VALIDACIJA ANALITIČKE METODE 12
3 EKSPERIMENTALNI DIO 13
3.1 MATERIJALI 13
3.1.1 Uzorak – leucin enkefalin 13
3.1.2 Kemikalije 13
3.1.3 Pribor i potrošni materijal 14
3.1.4 Aparatura 15
3.2 METODE RADA 16
3.2.1 Priprema standardnih otopina aminokiselina 16
3.2.2 Derivatizacija aminokiselina 16
3.2.3 Optimiranje uvjeta derivatizacije aminokiselina 17
3.2.4 Odabir kromatografske kolone i definiranje kromatografskih uvjeta 18
3.2.5 Uvjeti hidrolize peptida 19
3.2.6 Određivanje validacijskih parametara razvijene analitičke metode 20
3.2.7 Obrada podataka 22
4 REZULTATI I RASPRAVA 23
4.1 Optimiranje derivatizacijskog postupka aminokiselina 24
4.2 Usporedba različitih kolona za kiralnu separaciju 29
4.3 Ispitivanje uvjeta hidrolize peptida 39
4.4 Validacija novorazvijene metode 42
4.5 Enantiomerni sastav API-a peptidnih lijekova 48
5 ZAKLJUČCI 52
6 LITERATURA 53
7 PRILOZI 58

1 UVOD

Zbog sudjelovanja u brojnim biološkim procesima u organizmu, peptidi su prepoznati kao potencijalni terapeutici u liječenju različitih oboljenja kao što su alergije i astma, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, gastrointestinalne disfunkcije i neurodegenerativni poremećaji. Modifikacijom strukture peptida mijenjaju se fizikalno-kemijska svojstva koja ograničavaju njihovu primjenu. Više od 75 % peptidnih lijekova proizvode se u obliku injekcija koje su namijenjene za subkutani put primjene. Peroralna primjena, kao najprihvatljivija za oboljelog, za sada je još uvijek otežana jer kisela okolina i enzimi probavnog sustava razgrađuju peptid.

Aktivna farmaceutska supstancija (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) peptidnog lijeka, tj. peptid proizvodi se u obliku liofiliziranog praha koji se pri proizvodnji lijeka ili neposredno prije upotrebe rekonstituira u sterilnoj vodenoj otopini koja može sadržavati pomoćne tvari za stabilizaciju poput octene kiseline, natrijevog hidroksida, natrijevog klorida ili propilen glikola. Radi provjere uspješnosti sinteze i osiguravanja povoljnog farmakološkog učinka, prije proizvodnje lijeka peptid se podvrgava različitim kemijskim analizama među kojima veliku važnost ima provjera optičke čistoće peptida. Naime, prisutnost nepoželjnog enantiomernog oblika aminokiseline u peptidu može izazvati neželjene učinke.

Cilj je ovog rada razviti pouzdanu i selektivnu analitičku metodu za određivanje enantiomernog sastava jednostavnog modelnog pentapeptida, leucin enkefalina, te definirati smjernice za primjenu razvijene analitičke metode kod određivanja optičke čistoće ostalih API-a peptidnih lijekova. Određivanje sastava modelnog peptida temeljit će se na njegovoj hidrolizi do slobodnih aminokiselina, kemijskoj modifikaciji (tzv. derivatizaciji) oslobođenih aminokiselina te njihovoj separaciji na kiralnoj stacionarnoj fazi primjenom plinske kromatografije u sprezi s plameno-ionizacijskim detektorom. U tu svrhu ispitat će se alternativni postupci hidrolize peptida u odnosu na standardnu metodu koja je dugotrajna i može dovesti do gubitka analita. S obzirom na to da se aminokiseline primjenom plinske kromatografije ne mogu određivati izravno, nego se moraju kemijski modificirati u hlapljive derivate, također će se ispitati i optimirati derivatizacijski postupci. U svrhu separacije enantiomernih parova aminokiselina ispitat će se prikladnost pet stacionarnih faza i optimirati kromatografski uvjeti, a njihova koncentracija odredit će se primjenom vanjske standardizacije.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 PEPTIDNI LIJEKOVI

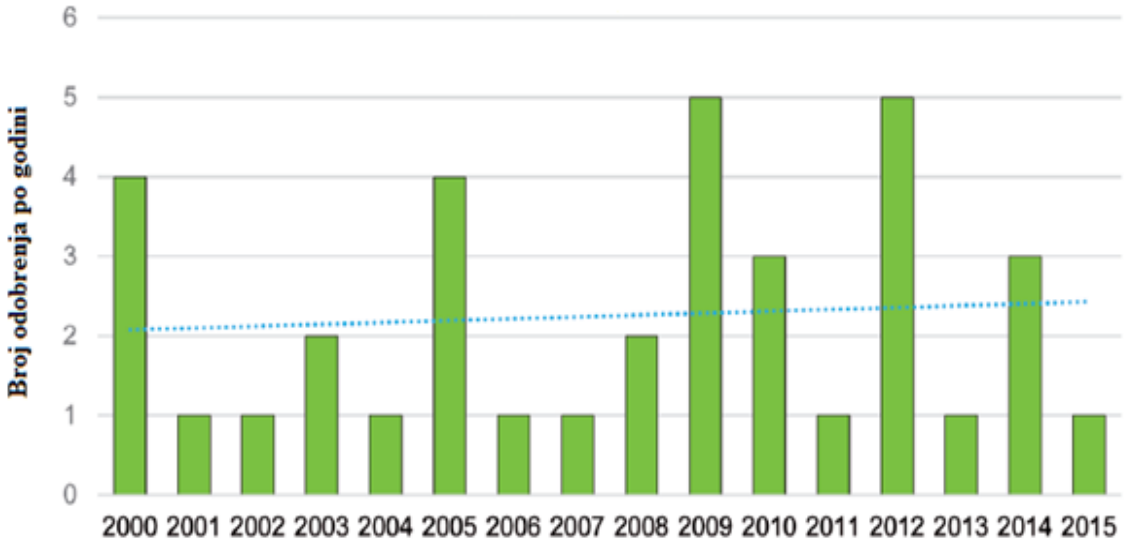
Peptidi su skupina spojeva koji se sastoje od dvije ili više aminokiselina međusobno povezanih amidnom vezom u strukturu lanca. Od velike su važnosti za čitav niz imunoloških i neuroloških procesa. U organizmu djeluju kao neurotransmiteri, hormoni, antigeni i antibiotici, a poremećaji u njihovoj funkciji mogu dovesti do razvoja kroničnih ili infektivnih oboljenja. Primjerice, razvoj Alzheimerove bolesti povezan je s formiranjem netopljivih fibrilnih nakupina β-amiloidnog peptida, koji je kod zdravih osoba prisutan u topljivom obliku (Jerić, 2004). Smanjena aktivnost ili nedostatak pojedinih prirodno prisutnih peptida pokušava se nadoknaditi unosom peptidnih lijekova koji će oponašati njihovu funkciju u organizmu. Razvoj peptidnih lijekova predstavlja veliki izazov u farmaceutskoj industriji. Naime, primjena peptida u izvornom obliku kao lijeka ograničena je zbog činjenice da zbog polarnog karaktera ne mogu prijeći staničnu membranu te se brzo uklanjaju iz organizma. Stoga se peptidni lijekovi razvijaju kao njihovi modificirani analozi, npr., modificira se slijed aminokiselina ili funkcijska skupina na pobočnim ograncima pri čemu se ne narušava primarna funkcija proteina i osiguravaju se povoljna farmaceutska svojstva (Wu i sur., 2016). Ugradnjom nepeptidnih molekula moguće je sintetizirati peptid u ″zarobljenoj″ biološki aktivnoj konformaciji koja rezultira većom aktivnošću i selektivnošću za određeni tip receptora u organizmu. S obzirom da se sintetski peptid u strukturi razlikuje od ljudskog kojeg nadomješćuje u organizmu postoji rizik od neželjenog imunološkog odgovora (Wu i sur., 2016).

Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) peptide svrstava u standardne lijekove fokusirajući se više na ispitivanje sastava i strukture spoja nego na načine proizvodnje. Prema FDA, gornja dozvoljena granica broja aminokiselina u kemijski sintetiziranim peptidima iznosi 100 aminokiselinskih ostataka uz izuzetak nekih peptidnih cjepiva (FDA, 2015). Europska medicinska agencija (engl. *European Medicines Agency*, EMA) ne radi razliku na temelju veličine, nego peptide razmatra kao biološke entitete bilo da su ekstrahirani iz njihovih prirodnih izvora ili rekombinantno proizvedeni (Uhlig i sur., 2014). Klasifikacija različitih tipova peptida i derivata koji su trenutno dostupni ili su predmet istraživanja kao terapeutskih lijekova prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija lijekova koji ulaze u interakciju sa specifičnim peptidnim receptorima (prema Vergote i sur., 2009).

#	Vrsta proizvoda	Opis
1.	Prirodni peptidi	Endogeni peptidi, ekstrahirani iz prirodnih izvora, pripremljeni kemijskom sintezom ili rekombinantno proizvedeni
2.	Kemijski modificirani peptidi	Peptidi koji se podudaraju (povezuju) s prirodnim peptidnim ligandom
2.1.	Modifikacija slijeda	Sintetska inkorporacija analoga i izostera aminokiselina, pr. zamjena s D-stereoizomerom
2.2.	Modifikacija funkcijske skupine	Kemijska transformacija na krajevima lanca ili bočnim ograncima
2.3.	Izmjena okosnice - pseudopeptidi	Zamjena jedne ili više amidnih veza
3.	Peptidomimetici	Ugradnja nepeptidnih molekula

Na tržištu je trenutno dostupno više od 70 odobrenih peptidnih lijekova (Lax, 2016). Njihov broj iz godine u godinu uglavnom raste (Slika 1.) budući da se oko 140 peptidnih terapeutika nalazi u fazi kliničkih istraživanja te više od 500 njih je u fazi pretkliničkih istraživanja (Fosgerau i Hoffmann, 2015). Predviđen je rast vrijednosti globalnog tržišta peptidnih lijekova s 14,1 milijarde američkih dolara u 2011. godini na oko 25,4 milijarde američkih dolara u 2018. godini (Fosgerau i Hoffmann, 2015). Ekspanzija tržišta te dostupnost sve većeg broja peptidnih lijekova naglašava potrebu za konstantnim razvojem modernih analitičkih pristupa za njihovu kontrolu i karakterizaciju.



Slika 1. Odobreni peptidni terapeutici u razdoblju 2000 - 2015 (Lax, 2016.).

2.1.1 Važnost analize enantiomernog sastava

Osnovni je sastojak svakog lijeka aktivna farmaceutska supstancija (API) koja određuje farmakološku aktivnost. U peptidnim lijekovima to su sintetizirani nizovi aminokiselina različite duljine i složenosti. Sve aminokiseline osim glicina optički su aktivne (kiralne) molekule, a optička je aktivnost u farmaceutskoj industriji jedan od ključnih faktora djelotvornosti lijeka. Naime, enantiomerni parovi molekula zbog svog različitog prostornog rasporeda mogu iskazivati različitu biološku aktivnost. Dok jedan enantiomerni oblik djeluje prema željenim terapeutskim učincima, drugi enantiomerni oblik može biti inaktivan ili djelovati nepoželjno uzrokujući negativni učinak (Nguyen i sur., 2006). Jedan od najpoznatijih primjera različitog mehanizma djelovanja enantiomera je talidomid, derivat glutaminske kiseline, koji se 1950-ih godina prepisivao trudnicama za ublažavanje jutarnjih mučnina i kao sredstvo za spavanje. Primjena talidomida kao recemične smjese prouzročila je malformacije ekstremiteta tzv. fokomeliju kod novorođene djece. Kasnijim ispitivanjem ustanovilo se kako L-enantiomerni oblik talidomida djeluje teratogeno na fetus u razvoju (Gehrke, 2005). Stoga je analiza enantiomernog sastava aminokiselina od kojih je peptid sastavljen neizostavan korak u karakterizaciji aktivnih farmaceutskih supstancija peptidnih lijekova. Postoji nekoliko izvora neželjenog enantiomernog para aminokiseline u API-u. Standardi aminokiselina koji se koriste za sintezu peptida mogu biti optički onečišćeni što može dovesti do inkorporacije nepoželjnog enantiomernog oblika aminokiseline u peptidnu

sekvencu. Također, tijekom same sinteze u uvjetima visoke temperature i povišene pH vrijednosti postoji mogućnost pretvorbe jednog enantiomera u drugi (Wu i sur., 2016). Karakterizacija rezultata analize nečistoća u API-u kao i u samom konačnom proizvodu, odnosno peptidnom lijeku predstavlja veliki izazov. Naime, peptidi su isključeni iz trenutnih zahtjeva Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonisation*, ICH) i za sada nema jasnih smjernica o dopuštenim količinama neorganskih i organskih onečišćenja u peptidnim API-jima (ICH, 2006a; ICH, 2006b). Iako su 1994. godine objavljene Upute za priopćenje kemijskih, proizvodnih i kontrolnih informacija za sintetske peptidne tvari (engl. *Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing and Controls Information for Synthetic Peptides Substances*), povučene su 2006. godine (Verlander, 2007). Za sada se kontrola organskih onečišćenja u peptidnim API-ima temelji na zahtjevima sadržanim u Europskoj farmakopeji (*Ph. Eur.*) prema kojima su definirane gornje granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju organskih onečišćenja u peptidima (Tablica 2.) (Kolaj-Robin, 2017).

Tablica 2. Gornja granica za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju organskih onečišćenja u peptidima (prema Kolaj-Robin, 2017).

Granica za izvještavanje	**Granica za identifikaciju**	**Granica za kvalifikaciju**
> 0,1 %	> 0,5 %	> 1,0 %

Iako se analiza enantiomernog sastava peptida provodi nakon sinteze API-a, pojedine farmaceutske kompanije, među kojima je i Pliva, nakon kupnje API-a od dobavljača razvijaju vlastite analitičke metode analize za provjeru enantiomerne čistoće ulazne sirovine te određivanje sastava peptida koji se kasnije koriste za proizvodnju generičkih peptidnih lijekova. Generički peptidni lijekovi proizvode se prema strogim pravilima dobre proizvođačke prakse (engl. *good manufacturing practice*, GMP) i dobre kliničke prakse (engl. *good clinical practice*, GCP). Riječ je o farmaceutskom proizvodu koji je identičan ili bioekvivalentan originalnom lijeku u dozi, po neškodljivosti, putu i načinu primjene, kvaliteti i obliku (Anonymous 1, 2004). Generički peptidni lijekovi primjenjuju se kod liječenja različitih patoloških oboljenja poput alergije i astme, artritisa, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, pretilosti, gastrointestinalne disfunkcije i neurodegenerativnih poremećaja (Vlieghe i sur., 2010).

2.2 ANALIZA ENANTIOMERNOG SASTAVA PEPTIDNIH LIJEKOVA

Enantiomerni sastav peptida moguće je odrediti primjenom reverzno - fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) i plinske kromatografije (engl. *gas chromatography*, GC) u sprezi s različitim detektorima te u novije vrijeme i pomoću kapilarne elektroforeze. Separacija enantiomera upotrebom plinske kromatografije omogućena je otkrićem kiralnih stacionarnih faza 1966. godine od strane Gil-av-a i njegovih suradnika (Schurig, 2000). Do danas su razvijene brojne kiralne stacionarne faze s ciljem povećanja učinkovitosti separacije zbog čega je plinska kromatografija često korištena metoda za analizu optičke čistoće peptida. Kemijska analiza uzoraka koji sadrže opisane peptide primjenom plinske kromatografije uključuje hidrolizu peptida kojom se oslobađaju pojedinačne aminokiseline te derivatizaciju nastalih aminokiselina u svrhu nastajanja hlapljivih derivata prikladnih za plinsko-kromatografsku analizu.

2.2.1 Hidroliza peptida

Reagensi koji se koriste za hidrolizu peptida moraju biti sposobni pocijepati sve peptidne veze. Međutim, veliki pobočni lanci alifatskih aminokiselina zbog steričkih smetnji mogu spriječiti dostupnost reagensa u pojedine regije peptida (Gehrke, 2005). Hidrolizu peptida moguće je postići primjenom enzima ili upotrebom kiselih ili bazičnih kemijskih reagenasa (Fountoulakis i Lahm, 1998). Pripravci peptida za plinsko-kromatografsku analizu pripremaju se hidrolizom u kiselom mediju. Međutim, jedan od nedostataka postupka kisele hidrolize je mogućnost djelomične ili potpune razgradnje pojedinih aminokiselina što ovisi o koncentraciji kiseline, njezinoj čistoći, vremenu i temperaturi provođenja hidrolize (Gehrke, 2005).

Standardna metoda hidrolize peptida uključuje tretman peptidnog uzorka s vodenom otopinom klorovodične kiseline (c(HCl) = 6 mol L^{-1}) kod 110 °C u trajanju od 24 sata (Moore i Stein, 1963) kojom se u slučaju većine aminokiselina postiže 95 %-tni učinak (Gehrke, 2005). Prednost korištenja klorovodične kiseline je što se uparavanjem lako uklanja iz smjese nakon završetka hidrolize. Opisanim postupkom hidrolizira se većina aminokiselina, osim u slučaju triptofana, cisteina, treonina i serina. U slučaju triptofana i cisteina može doći do potpune degradacije, dok je gubitak treonina i serina između 5 % i 15 %. U kiselom mediju dolazi do deaminacije asparagina i glutamina u asparaginsku, odnosno glutaminsku kiselinu. Hidrolizu peptida potrebno je provoditi u uvjetima bez prisustva kisika jer u protivnom dolazi

do oksidacije metionina kod čega nastaju metionin-sulfoksid [2-amino-4-(metilsulfinil) butanska kiselina] i metionin-sulfon [2-amino-4-(metilsulfonil) butanska kiselina] (Rutherfurd i Gilani, 2009). U slučaju valina, izoleucina i leucina, među kojima su uspostavljene stabilne peptidne veze, 24 sata nije dovoljno za hidrolizu prihvatljive učinkovitosti.

Uočeno je kako prisutnost organske kiseline poboljšava učinkovitost hidrolize hidrofobnih regija peptida (Tsugita i Scheffler, 1982). Predložena je metoda za brzi postupak hidrolize koji uključuje upotrebu smjese klorovodične i trifluoroctene kiseline u volumnom omjeru 2:1. Trifluoroctena kiselina se zbog niskog vrelišta također lako uklanja iz smjese uparavanjem. Prednost ove metode koja se provodi na višoj temperaturi nego kod standardne metode (166 °C) je to što se daleko skraćuje vrijeme potrebno za hidrolizu, 25 do 50 min u odnosu na 24 sata. Pokazano je da hidrolizom istog peptida u smjesi klorovodične i trifluoroctene kiseline nastaje količina valina, leucina i izoleucina jednaka njihovoj količini nakon produljene standardne hidrolize na 72 sata (Tsugita i sur., 1987). Stoga, ova brza i jednostavna metoda predstavlja prikladni alternativni postupak.

2.2.2 Derivatizacija aminokiselina

Slobodne aminokiseline nastale hidrolizom peptidnog uzorka nemaju povoljna fizikalna i kemijska svojstva da bi se mogle izravno analizirati plinskom kromatografijom. Naime, funkcijske skupine aminokiselina (-SH, -OH, -NH, -COOH) teže uspostavi intermolekulskih vodikovih veza koje utječu na njihovu hlapljivost i toplinsku stabilnost. U slučaju plinsko-kromatografske analize, aminokiseline bi se zbog nedovoljne hlapljivosti mogle zadržati u injektoru ili kromatografskoj koloni pri čemu bi zbog polarnih svojstava mogle izazvati bržu degradaciju stacionarne faze. Zato se aminokiseline kemijski modificiraju, tj. derivatiziraju u svrhu nastajanja dovoljno hlapljivih derivata prikladnih za plinsko-kromatografsku analizu.

Prilikom odabira prikladnog derivatizacijskog reagensa potrebno je uzeti u obzir sljedeće kriterije :

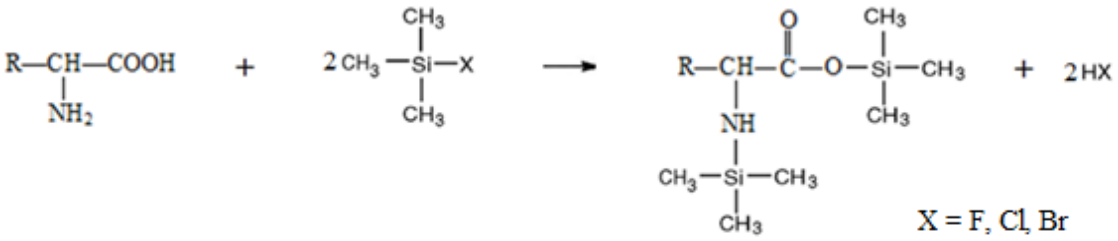
- reakcijom reagensa i analita treba nastati više od 95 % kompletnih derivata
- reagens ne smije prouzročiti strukturne promjene spojeva tijekom stvaranja derivata
- reagens ne smije pridonijeti gubitku uzorka tijekom reakcije

- reakcijom trebaju nastati derivati koji neće stupiti u kemijsku reakciju sa stacionarnom fazom
- nastali derivati trebaju biti vremenski stabilni.

Za derivatizaciju aminokiselina nastalih hidrolizom peptida koriste se brojni reagensi koji se, ovisno o mehanizmu reakcije, svrstavaju u tri glavne kategorije: sililirajući, alkilirajući i acilirajući reagensi (Orata, 2012).

2.2.2.1 Sililiranje

Sililiranje je reakcija zamjene kiselog vodikovog atoma s trimetilsililnom skupinom (TMS) (Slika 2.). Mehanizam reakcije uključuje nukleofilnu supstituciju (S_N2) na atomu silicija pri čemu se veća efikasnost postiže uz bolju izlaznost (slabiju bazičnost) skupine X (Orata, 2012).

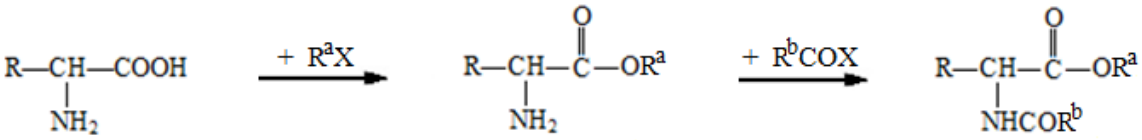


Slika 2. Reakcija sililiranja aminokiselina.

Za derivatizaciju aminokiselina ovim mehanizmom od sililirajućih reagenasa najviše se koristi *N*,*O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA) i *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (MSTFA). Iako se radi o derivatizaciji u jednom koraku, veliki problem stvara prisutnost vode u uzorku ili otapalu (Orata, 2012.). Sililirajući reagensi su osjetljivi na vlagu, a voda može reagirati i s nastalim sililiranim derivatom aminokiselina. Bezvodni uvjeti pokušavaju se postići upotrebom piridina, dimetilformamida ili trietilamina koje imaju dvostruku ulogu; kao baza akceptiraju proton i pomiču ravnotežu reakcije u smjeru nastanka produkata (Moldoveanu i David, 2002), a ujedno služe i kao katalizatori reakcije.

2.2.2.2 Alkiliranje i aciliranje

Alkiliranje je reakcija zamjene kiselog vodikovog atoma s alkilnom ili arilnom skupinom. Predstavlja prvi korak derivatizacijskog procesa kod nastajanja derivata aminokiselina prikladnih za plinsko-kromatografsku analizu pri čemu se alkilira karboksilna skupina. Sljedeći korak uključuje aciliranje amino skupine ($–NH_2$) te ostalih polarnih grupa pobočnih ogranaka aminokiselina s anhidridima, acil-kloridima ili drugim acilirajućim reagensima (Slika 3.).



Slika 3. Dvostupanjska derivatizacija aminokiselina (Moldoveanu i David, 2002).

Dvostupanjska derivatizacija aminokiselina najčešće je opisivana metoda derivatizacije u literaturi. Jedan od češćih primjera dvostupanjske derivatizacije opisan je u radu Darbre i sur. U prvom stupnju karboksilna skupina esterificirana je s metanolom uz prisustvo otopine klorovodične kiseline te je nakon uparavanja acilirana amino skupina dodatkom anhidrida trifluoroctene kiseline (TFAA). S obzirom na činjenicu da su nastali derivati lako hlapljivi, gubitci tijekom pripreme uzoraka za kromatografsku analizu vjerojatno nisu zanemarivi, posebno ako je potrebno ukoncentriravanje uparavanjem u svrhu povećanja osjetljivosti određivanja. U radu Gehrke i sur. ispitivani su najprikladniji uvjeti derivatizacije u kojem su kao reagensi korišteni smjesa klorovodične kiseline i *n*-butanola za esterifikaciju karboksilne skupine, odnosno smjesa metilen klorida i anhidrida trifluoroctene kiseline za aciliranje amino skupine. Nastali derivati manje su hlapljivi u usporedbi s derivatima aminokiselina dobivenih prethodno opisanim derivatizacijskim postupkom Darbre i sur. Nedostatak ove metode u kojima nastaju viši esteri aminokiselina očituje se u činjenici da provođenje reakcije kod više temperature te duljeg vremena potrebnog za derivatizaciju može uzrokovati djelomičnu ili potpunu degradaciju arginina i triptofana (Drozd, 1981).

U novije vrijeme, razvijaju se derivatizacijski postupci koji ujedinjuju alkiliranje i aciliranje aminokiselina u jedan korak. Time se postiže manje zahtjevan derivatizacijski postupak (u smislu vremena potrebnog za analizu i pojednostavljenja samog postupka) te se uspješnije izbjegava moguća pojava racemizacije. P. Hušek i K. Macek 1975. godine razvili su metodu

koja se temelji na derivatizacijskoj reakciji smjese alkil-kloroformata, alkohola i piridina s aminokiselinama pri čemu nastaju *N*(*O*,*S*)-alkil-alkoksi-karbonil-esteri aminokiselina. Spomenuta metoda danas se koristi za kvantitativnu i reproducibilnu derivatizaciju aminokiselina u različitim matricama (Zampolli i sur., 2007). Njezine prednosti su što se odvija pri sobnoj temperaturi, traje manje od 5 min i korišteni reagensi nisu skupi te su lako dostupni. Jedini nedostaci su nemogućnost određivanja arginina zbog neučinkovite derivatizacije uzrokovane niskom reaktivnošću guanidino grupe i glutamina kod kojega tijekom derivatizacije dolazi do deaminacije u glutaminsku kiselinu (Pietrogrande i Basaglia, 2010).

Druge metode jednostupanjske derivatizacije aminokiselina uključuju upotrebu smjese perfluoriranih anhidrida i perfluoroalkohola. Koristi se anhidrid trifluoroctene kiseline (TFAA) ili anhidrid heptafluoromaslačne kiseline (HFBA) u kombinaciji s 2,2,2-trifluoroetanolom (TFE) ili 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutanolom (HFB). Metode jednostupanjske derivatizacije s navedenom kombinacijom reagenasa prvi su za određivanje svih prirodnih aminokiselina primijenili Zampolli i sur. Za razliku od jednostupanjske derivatizacije koja se temelji na upotrebi kloroformata, ove metode odvijaju se na višim temperaturama (≈ 100 °C) te je potrebno dulje vrijeme za odvijanje reakcije (1 h). Zbog povišenih temperatura postoji mogućnost pojave racemizacije što zahtjeva daljnje proučavanje optimalnih reakcijskih uvjeta (Zampolli i sur., 2006).

2.2.3 Plinska kromatografija – kiralna separacija

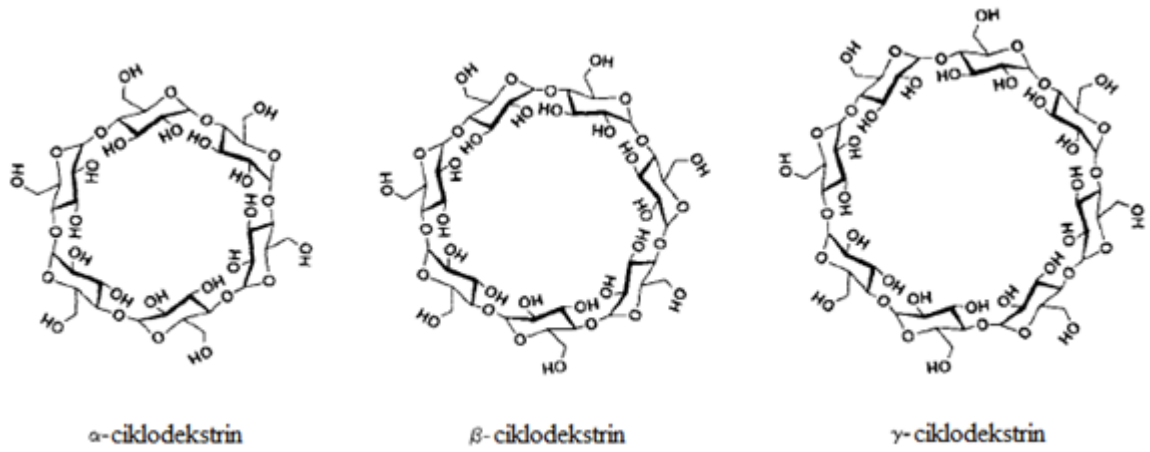
Separacija enantiomera aminokiselina pomoću plinske kromatografije može se izvršiti na indirektan ili direktan način ovisno o stacionarnoj fazi koja se koristi za određivanje.

Indirektan način koji uključuje pretvorbu enantiomera aminokiselina u dijastereomerni oblik koristi se u slučaju akiralnih stacionarnih faza. Aminokiseline se prvo esterificiraju s optički aktivnim alkoholom kao što je 2-metilbutanol nakon čega slijedi aciliranje upotrebom akiralnog acilirajućeg reagensa. Druga mogućnost je korištenje akiralnog reagensa za esterifikaciju i kiralnog acilirajućeg reagensa poput 2-L-α-kloroizovaleril klorida. Budući da dijastereomeri posjeduju različita fizikalna i kemijska svojstva, mogu se razdvojiti na akiralnim stacionarnim fazama. Prednost indirektnog načina je prisutnost brojnih, relativno jeftinih te lako dostupnih akiralnih kolona na tržištu. Nedostatak predstavljaju kiralni

derivatizirajući reagensi koji trebaju ostati stabilni tijekom skladištenja i biti visoke optičke čistoće, a često imaju visoku cijenu (Pätzold i Brückner, 2005).

S obzirom na dostupnost različitih kiralnih faza, u današnje vrijeme u većini slučajeva koristi se direktan pristup za analizu aminokiselina primjenom plinske kromatografije. Prednosti direktnog načina očituju se u neovisnosti o enantiomernoj čistoći kiralnih stacionarnih faza i mogućnost istovremene analize enantiomernog sastava različitih sastojaka. Direktan pristup uključuje brze i reverzibilne interakcije između kiralne stacionarne faze i optički aktivnog analita (Schurig, 2000).

Kiralne stacionarne faze sastavljene od *α*-, *β*-, *γ*-ciklodekstrina ili njihovih derivata vezanih na polisiloksane pokazale su se najprikladnijima kod razdvajanja enantiomernih parova aminokiselina. Ciklodekstrini (Slika 4.) su ciklički oligosaharidi sastavljeni od šest ili više (*α*)-D-glukopiranoznih jedinica međusobno povezanih *α*-1,4-glikozidnom vezom i smještenih tako da stvaraju tubularni prostor. Glavni oblik interakcije između analita i kiralne stacionarne faze uključuje inkluziju analita u tubularni prostor, a uključuje još i dipol-dipol interakcije, hidrofobne interakcije te stvaranje vodikovih veza (Schurig, 2002). Dobra separacijska svojstva ovih kiralnih stacionarnih faza proizlaze iz mnoštva kiralnih centara prisutnih u molekuli ciklodekstrina; npr., *β*-ciklodekstrin ih ima 35.



Slika 4. Struktura *α*-ciklodekstrina, *β*-ciklodekstrina i *γ*-ciklodekstrina (prema Schurig i Nowotny, 1990).

Budući da derivatizacijom aminokiselina nastaju derivati različite hlapljivosti i veličine separacija aminokiselina provodi se uz programirano termostatiranje kolone. Za detekciju

kiralnih aminokiselinskih derivata najčešće se koriste plameno-ionizacijski detektor (engl. *flame ionization detector*, FID) i spektrometri masa (engl. *mass spectrometry*, MS). FID je destruktivni detektor, relativno velike osjetljivosti (≈ 10^{-13} g s^{-1}), velikog koncentracijskog (≈ 10^7) raspona te granice detekcije od 1 pg s^{-1} (Skoog i sur., 2007). Kada je analit (pa tako i aminokiseline) prisutan u dovoljno velikoj koncentraciji u uzorku, FID je detektor izbora kod provođenja plinsko-kromatografskih analiza, a posebno u standardnoj kontroli kvalitete tijekom proizvodnje pa je stoga korišten i u ovom radu. Kromatogram kiralnih aminokiselinskih derivata omogućuje njihovu identifikaciju prema položaju pika pojedinog derivata na vremenskoj osi (retencijsko vrijeme) te kvantifikaciju iz površine, odnosno visine pika. Enantiomerni parovi eluiraju jedan iza drugoga, a redoslijed eluiranja D- i L- oblika ovisi o tipu upotrebljene stacionarne faze.

2.3 VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

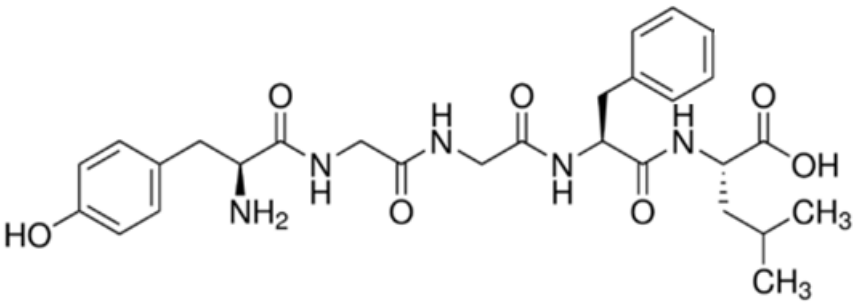
Kako bi se osigurali točni i vjerodostojni rezultati analize, potrebno je provesti validaciju analitičke metode. Ispituje se da li metoda ispunjava zahtjeve za određenu namjeravanu uporabu. Opseg validacije ovisi o primjeni, prirodi promjena i uvjetima u kojima će metoda biti korištena. Neophodno je provesti validaciju nestandardiziranih metoda, novorazvijenih metoda u vlastitom laboratoriju, standardiziranih metoda koje se koriste izvan namijenjenog okvira te prilikom modifikacije već postojećih metoda (Eurachem, 2014). Validacijski parametri definirani su i opisani u ICH smjernicama (ICH Q2 (R1), 2005). Osnovni validacijski parametri koji se provode tijekom validacije analitičke metode su: selektivnost, linearni i koncentracijski raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije, točnost, preciznost, otpornost na manje promjene uvjeta analize. Za novorazvijenu metodu u ovom radu definirani su sljedeći parametri: selektivnost, linearni raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije, ponovljivost i točnost.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Uzorak – leucin enkefalin

Leucin enkefalin endogeni je peptid koji se sastoji od pet aminokiselina (Slika 5.), 2 molekule glicina (Gly) te po jedne molekule leucina (Leu), fenilalanina (Phe) i tirozina (Tyr). Zbog jednostavnog sastava, u ovom se radu koristi kao modelni peptid za razvoj analitičke metode za određivanje enantiomera aminokiselina koja uključuje hidrolizu peptida, derivatizaciju slobodnih aminokiselina, njihovu separaciju na kiralnoj stacionarnoj fazi primjenom plinske kromatografije u sprezi s plameno-ionizacijskim detektorom.



Molekulska formula: $C_{28}H_{37}N_5O_7$

Molarna masa: 555,628 g mol^{-1}

Redoslijed aminokiselina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

Slika 5. Struktura molekule leucin enkefalina (prema Sigma-Aldrich, 2017).

3.1.2 Kemikalije

- 2,2,2-trifluoroetanol, TFE (CF_3CH_2OH, ≥ 99,0 %), Sigma-Aldrich, SAD
- Anhidrid trifluoroctene kiseline, TFAA ($(CF_3CO)_2O$, ≥ 99,0 %), Sigma-Aldrich, SAD
- Otopina klorovodične kiseline u etanolu, konc. HCl = 1,25 mol L^{-1} (HCl • CH_3CH_2OH, ≥ 99,0 %), Sigma-Aldrich, SAD
- Etil-trifluoroacetat ($C_4H_5F_3O_2$, ≥ 98,5 %), Sigma-Aldrich, SAD
- Klorovodična kiselina (HCl, 37 %), Merck, Njemačka
- Trifluoroctena kiselina, TFA ($C_2HF_3O_2$, ≥ 99,0 %), Sigma-Aldrich, SAD
- Demineralizirana voda

- Acetonitril (CH_3CN, 99,9 %), Merck, SAD
- Leucin enkefalin acetat hidrat ($C_{28}H_{37}N_5O_7 \cdot xC_2H_4O_2 \cdot yH_2O$, ≥ 95 %), Sigma-Aldrich, SAD
- Standardi aminokiselina prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Aminokiseline (analitički standardi).

Sustavni naziv prema IUPAC - ovoj nomenklaturi	Trivijalni naziv	Kratica	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
2-aminooctena kiselina	Glicin	Gly	$C_2H_5NO_2$	≥ 99 %	Sigma - Aldrich
(S)-2-amino-4-metilpentanska kiselina	L-leucin	L-Leu	$C_6H_{13}NO_2$	≥ 98 %	
(R)-2-amino-4-metilpentanska kiselina	D-leucin	D-Leu		99 %	
(S)-2-amino-3-fenilpropanska kiselina	L-fenilalanin	L-Phe	$C_9H_{11}NO_2$	≥ 98 %	
(R)-2-amino-3-fenilpropanska kiselina	D-fenilalanin	D-Phe		≥ 98 %	
(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanska kiselina	L-tirozin	L-Tyr	$C_9H_{11}NO_3$	≥ 98 %	
(R)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanska kiselina	D-tirozin	D-Tyr		99 %	

3.1.3 Pribor i potrošni materijal

- Staklene pipete od 5 mL, 10 mL
- Propipeta
- Automatske pipete eppendorf Research pro, 20 – 300 μL, 50 – 1000 μL
- Plastični nastavci za automatske pipete
- Odmjerne tikvice od 5 mL, 10 mL
- Staklena menzura, 50 mL
- Erlenmayerove tikvice s brušenim grlom, 250 mL
- Plastične kapalice
- Mikrovalne reakcijske bočice
- Čepovi za reakcijske bočice
- Metalna podloga za reakcijske bočice
- Željezni stativ
- Viali za ispiranje, čepovi i kapice
- Latex rukavice
- Metalna špatula

- Metalni držač za bočice
- Parafilm
- Tamne staklene viale
- Čepovi za viale
- Ručni zatvarač za viale
- Inserti za viale
- Gumica za kapalice
- Staklene kapalice
- Ručni otvarač za viale
- 5190 – 3165 Ultra Inert Liner Univ., Low PSI drop, Wool 5 pk, LOT: N19009, SAD
- Septumi
- Kromatografske kolone proizvođača: MEGA, Italija:
  - MEGA-DEX DMT beta, 0,25 μm, 0,25 mm, 25 m
  - MEGA-DEX DMP beta, 0,25 μm, 0,25 mm, 25 m
  - MEGA-DEX DAC beta, 0,25 μm, 0,25 mm, 25 m
  - MEGA-DEX DET beta, 0,25 μm, 0,25 mm, 25 m
  - MEGA-DEX TMT beta 1701, 0,25 μm, 0,25 mm, 25 m

3.1.4 Aparatura

- Agilent 7890B GC System (FA5022263), Agilent Technologies Inc., SAD
- Autosampler 7693A, Agilent Technologies Inc., SAD
- Concentrator plus/Vacufuge® plus eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka
- 22971 SUPELCO Mini-Vap Evaporator / Concentrator, Sigma-Aldrich, SAD
- Grijači blok Dri – Block® DB200/2 TECHNE, max temp. 200 °C, Sigma-Aldrich, SAD
- Grijača ploča IKA® RCT basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Njemačka
- Analitička vaga METTLER TOLEDO, XPE205 DeltaRange® (min 20 mg/10 g, max 81 g/220 g), Mettler Toledo International Inc., SAD
- Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN, Njemačka

3.2 METODE RADA

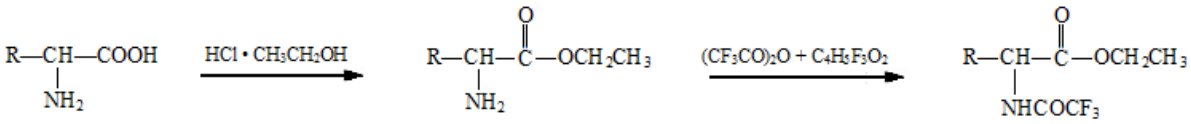
3.2.1 Priprema standardnih otopina aminokiselina

Ishodne otopine pojedinačnih aminokiselina pripremljene su otapanjem prikladne odvage aminokiseline u demineraliziranoj vodi na sljedećim koncentracijskim razinama: γ(Gly) = 6,74 g L^{-1}, γ(L-Leu) = 6,74 g L^{-1}, γ(D-Leu) = 6,15 g L^{-1}, γ(L-Phe) = 6,12 g L^{-1} i γ(D-Phe) = 6,74 g L^{-1}. Zbog ograničene topljivosti Tyr u vodi ishodne otopine pripremljene su na nižoj koncentracijskoj razini: γ(L-Tyr) = 0,43 g L^{-1}, γ(D-Tyr) = 0,40 g L^{-1}. Iz ishodnih otopina pripremljena je radna otopina smjese aminokiselina Gly, L-Leu, L-Phe i L-Tyr koja je korištena za optimiranje uvjeta derivatizacije, u kojoj je masena koncentracija svake pojedine aminokiseline iznosila 0,25 g L^{-1}. Za optimiranje kromatografskih uvjeta pripremljena je radna otopina smjese aminokiselina Gly, L-Leu i D-Leu, L-Phe i D-Phe, L-Tyr i D-Tyr u kojoj je masena koncentracija svake pojedine aminokiseline iznosila 0,23 g L^{-1}, osim L-Tyr čija je koncetracija iznosila 0,11 g L^{-1}.

3.2.2 Derivatizacija aminokiselina

Dvostupanjska derivatizacija

Dvostupanjska derivatizacija, kao standardna metoda, provedena je prema metodi Franka i sur. (*J. Chromatogr.* 167, 1978). U prvom stupnju esterificira se karboksilna skupina dodatkom klorovodične kiseline u etanolu, a u drugom stupnju acilira se amino skupina dodatkom anhidrida trifluoroctene kiseline i etil-trifluoroacetata prema reakciji opisanoj na Slici 6.



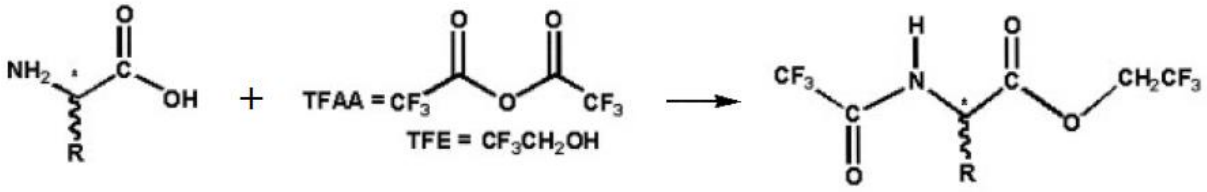
Slika 6. Dvostupanjska derivatizacija aminokiselina.

U reakcijsku bočicu otpipetirano je 200 µL prethodno pripremljene radne otopine za derivatizaciju i upareno pod dušikom do suhoga kod 50 °C. Zatim je dodano 800 µL otopine klorovodične kiseline u etanolu, c(HCl) = 1,25 mol L^{-1}. Esterifikacija aminokiselina provedena je kod 110 °C u trajanju od 10 min. Nakon hlađenja na +4 °C, sadržaj je uparen

pod dušikom do suhoga kod 50 °C. Na talog esterificiranih aminokiselina dodano je 250 µL smjese anhidrida trifluoroctene kiseline i etil-trifluoroacetata u volumnom omjeru 1:2. Aciliranje amino skupine provedeno je kod 130 °C u trajanju od 10 min. Reakcijska smjesa ohlađena je na +4 °C te je sadržaj uparen pod dušikom do suhoga kod 50 °C. Prije kromatografske analize derivati aminokiselina otopljeni su u 300 µL acetonitrila.

Jednostupanjska derivatizacija

Jednostupanjska derivatizacija provedena je prema metodi Zampollija i sur. prema kojoj dolazi do reakcije karboksilne i amino skupine s anhidridom trifluoroctene kiseline uz prisustvo 2,2,2-trifluoroetanola pri čemu nastaju N(O,S)-trifluoroalkil-trifluoroacil esteri aminokiselina prema reakcijskoj shemi prikazanoj na Slici 7.



Slika 7. Jednostupanjska derivatizacija aminokiselina (prema Zampolli i sur., 2006).

U reakcijsku bočicu otpipetirano je 200 µL prethodno pripremljene radne otopine za derivatizaciju i upareno do suhoga kod 50 °C. Zatim je dodano 50 µL 2,2,2-trifluoroetanola (TFE) i 100 µL anhidrida trifluoroctene kiseline (TFAA). Derivatizacija aminokiselina provedena je kod 100 °C u trajanju od 1 sat. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, sadržaj je uparen pod dušikom do suhoga kod 50 °C. Prije kromatografske analize derivati aminokiseline otopljeni su u 300 µL acetonitrila.

3.2.3 Optimiranje uvjeta derivatizacije aminokiselina

Ispitani su različiti uvjeti jednostupanjske derivatizacije s obzirom na omjer derivatizacijskih reagensa, TFAA i TFE, temperaturu i minimalno vrijeme potrebno za derivatizaciju kao što je prikazano u Tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti provođenja jednostupanjske derivatizacije.

	100 °C			**120 °C**	
TFE : TFAA	VRIJEME (min)				
1:2	15	30	60	15	30
1:4		60		15	30

Smjese derivata aminokiselina ohlađene su kod sobne temperature, a suvišak derivatizacijskih reagensa uparen je pod dušikom kod 50 °C. Prije kromatografske analize, derivati aminokiselina otopljeni su u 300 μL otopine acetonitrila koji dodatno sadrži 0,1 % TFAA radi postizanja stabilnosti derivata.

3.2.4 Odabir kromatografske kolone i definiranje kromatografskih uvjeta

Kod razvoja analitičke metode, u svrhu odabira najboljih uvjeta separacije derivata aminokiselina, ispitani su različiti uvjeti kromatografske analize s obzirom na vrstu kiralne stacionarne faze i temperaturu separacije pri čemu su ostali uvjeti držani istima, što je prikazano u Tablici 5.:

Tablica 5. Stalni uvjeti plinsko-kromatografske analize derivata aminokiselina.

Temperatura injektora	190 °C
Split omjer	1:50
Volumen injektiranja	1 μL
Protok plina nosioca (He)	1.5 mL min^{-1}
Protok pomoćnog plina (N_2)	35 mL min^{-1}
Protok zraka	450 mL min^{-1}
Protok vodika	45 mL min^{-1}
Temperatura detektora (FID)	250 °C

Separacija derivata aminokiselina provedena je na 5 kiralnih stacionarnih faza koje se razlikuju s obzirom na vrstu kemijskog spoja vezanog na ciklički prsten *β*-ciklodekstrina (Tablica 6.) kod tri različita temperaturna programa:

- Temperaturni program 1: sve stacionarne faze

$$4\ ^{\circ}\mathrm{C}(0\,\mathrm{min}) \xrightarrow{4\ ^{\circ}\mathrm{C/min}} 140\ ^{\circ}\mathrm{C}(20\,\mathrm{min})$$

- Temperaturni program 2: MEGA-DEX DMP beta

$$60\ ^{\circ}\mathrm{C}(0\,\mathrm{min}) \xrightarrow{4\ ^{\circ}\mathrm{C/min}} 140\ ^{\circ}\mathrm{C}(20\,\mathrm{min})$$

- Temperaturni program 3: MEGA-DEX DMT beta; MEGA-DEX DAC beta; MEGA-DEX TMT beta 1701

$$100\ ^{\circ}\mathrm{C}(0\,\mathrm{min}) \xrightarrow{4\ ^{\circ}\mathrm{C/min}} 190\ ^{\circ}\mathrm{C}(5\,\mathrm{min})$$

Tablica 6. Tip kiralnih stacionarnih faza (s obzirom na modifikaciju *β*-ciklodekstrina) korištenih za separaciju derivata aminokiselina.

KROMATOGRAFSKA KOLONA	**kemijski spoj korišten kao modifikator**
MEGA-DEX TMT beta 1701	2,4,6-trimerkapto-1,3,5-triazin
MEGA-DEX DET beta	dietil-terc-butil-silil
MEGA-DEX DAC beta	diacetil-terc-butil-silil
MEGA-DEX DMP beta	dimetil-pentil
MEGA-DEX DMT beta	dimetil-terc-butil-silil

Učinkovitost separacije enantiomera na pojedinoj koloni procijenjena je računanjem razlučivanja kolone (R_S) prema numeričkom izrazu:

[1] $$R_S = \frac{2\,(t_{RB} - t_{RA})}{W_A + W_B}$$

3.2.5 Uvjeti hidrolize peptida

Standardna metoda hidrolize peptida

0,5 mg leucin enkefalina kvantitativno je prebačeno u reakcijsku bočicu u koju je dodan 1 mL svježe pripremljene vodene otopine klorovodične kiseline (c(HCl) = 6 mol L^{-1}). Sadržaj reakcijske bočice dobro je promiješan i inkubiran kod 110 °C u trajanju od 24 sata. Nakon hlađenja kod sobne temperature, sadržaj je uparen do suha pod sniženim tlakom kod 60 °C.

Derivatizacija aminokiselina provedena je postupkom jednostupanjske derivatizacije opisane u poglavlju 3.2.3 (120 °C, 30 min, volumni omjer TFE:TFAA = 1:4).

Brza metoda hidrolize peptida

0,5 mg leucin enkefalina kvantitativno je prebačeno u reakcijsku bočicu u koju je dodano 750 μL smjese HCl/TFA. Smjesa klorovodične i trifluoroctene kiseline pripremljena je u volumnom omjeru 2:1 te je do upotrebe čuvana u hladnjaku na +4 °C. Uzorak se inkubirao kod 166 °C u trajanju od 30 i 50 min. Nakon hlađenja kod sobne temperature, hidrolizirani uzorak je uparen do suha pod sniženim tlakom kod 60 °C. Derivatizacija aminokiselina provedena je postupkom jednostupanjske derivatizacije opisane u poglavlju 3.2.3 (120 °C, 30 min, volumni omjer TFE:TFAA = 1:4).

3.2.6 Određivanje validacijskih parametara razvijene analitičke metode

U svrhu validacije novorazvijene analitičke metode za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina određeni su selektivnost, linearni raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije, ponovljivost i točnost. Analitička metoda izbora bila je hidroliza peptida leucin enkefalina s otopinom smjese klorovodične i trifluoroctene kiseline u volumnom omjeru 2:1 kod 166 °C u trajanju od 50 min te derivatizacija oslobođenih aminokiselina s TFE i TFAA u volumnom omjeru 1:4 kod 120 °C u trajanju od 30 min. Parametri validacije određeni su na kiralnoj stacionarnoj fazi MEGA-DEX DMT beta kromatografske kolone i kod temperaturnog programa 1:

$$80\ ^{\circ}\mathrm{C}(0\,\mathrm{min}) \xrightarrow{4\ ^{\circ}\mathrm{C/min}} 140\ ^{\circ}\mathrm{C}(20\,\mathrm{min})$$

Selektivnost

Za ispitivanje selektivnosti pripremljena je vodena otopina leucin enkefalina i standardna vodena otopina smjese aminokiselina u kojoj je koncentracija svake aminokiseline slična koncentraciji iste u pripremljenoj otopini leucin enkefalina. Selektivnost je ispitana usporedbom dobivenih kromatograma otapala, smjese aminokiselina i leucin enkefalina.

Linearni raspon

Linearni raspon određen je za svaku aminokiselinu na 9 koncentracijskih razina u rasponu od 0,001 g L^{-1} do 0,410 g L^{-1}. Baždarni dijagram konstruiran je kao ovisnost površine ispod

kromatografskog pika pojedine aminokiseline o poznatoj koncentraciji iste primjenom linearne regresije.

Granica detekcije i granica kvantifikacije

Za određivanje granice detekcije (engl. *limit of detection, LoD*) i granice kvantifikacije (engl. *limit of quantitation, LoQ*) konstruirana je kalibracijska krivulja ovisnosti površine ispod kromatografskog pika svake aminokiseline o poznatoj koncentraciji iste u niskom koncentracijskom rasponu u blizini očekivane granice detekcije, odnosno očekivane granice kvantifikacije. Granica detekcije i granica kvantifikacije izračunate su na temelju podataka za rezidualnu standardnu devijaciju odgovora detektora (SD_{res}) i nagiba kalibracijske krivulje iz sljedećih izraza:

[2] $$LoD = 3 \cdot \frac{SD_{\text{res}}}{(nagib\ pravca)}$$

[3] $$LoQ = 10 \cdot \frac{SD_{\text{res}}}{(nagib\ pravca)}$$

Ponovljivost i točnost

Ponovljivost analitičke metode u jednom danu određena je analizom 6 individualno pripremljenih replikata vodene otopine leucin enkefalina na jednoj koncentracijskoj razini (γ = 1,26 g L^{-1}) i analizom 6 pripremljenih replikata standardne vodene otopine aminokiselina na tri koncentracijske razine (Tablica 7.). Ponovljivost je izražena kao relativna standardna devijacija (*RSD*) u postocima,

[4] $$RSD\,(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

Tablica 7. Pripremljene koncentracije aminokiselina na tri koncentracijske razine.

	Niska koncentracijska razina ($g\ L^{-1}$)	**Srednja koncentracijska razina ($g\ L^{-1}$)**	**Visoka koncentracijska razina ($g\ L^{-1}$)**
Gly	0,0128	0,1993	0,3030
D-Leu	0,0008	0,0130	0,0197
L-Leu	0,0103	0,1612	0,2450
D-Phe	0,0019	0,0294	0,0447
L-Phe	0,0122	0,1899	0,2886
D-Tyr	0,0023	0,0354	0,0538
L-Tyr	0,0131	0,2052	0,3119

Točnost je određena usporedbom masene koncentracije pojedinih aminokiselina na svakom koncentracijskom nivou (izračunate iz jednadžbe kalibracijskog pravca) sa stvarnim masenim koncentracijama aminokiselina.

3.2.7 Obrada podataka

Za obradu podataka korišten je Empower 2 Chromatography Data Software (Waters Corporation, Milford, SAD) i računalni program Microsoft Excel 2010.

4 REZULTATI I RASPRAVA

Neizostavan korak u karakterizaciji API-a peptidnih lijekova je analiza enantiomernog sastava aminokiselina od kojih je peptid sastavljen. Naime, prisutnost nepoželjnog enantiomernog oblika aminokiseline u peptidnoj sekvenci može izazvati neželjene učinke u organizmu pacijenata prilikom primjene peptidnog lijeka.

Cilj ovog rada bio je razviti pouzdanu i selektivnu analitičku metodu za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina te definirati smjernice za primjenu razvijene analitičke metode kod određivanja optičke čistoće ostalih API-a peptidnih lijekova. Leucin enkefalin izabran je kao modelni peptid zbog jednostavnog sastava (sastoji se od četiri različite aminokiseline). U organizmu djeluje kao agonist na opioidnim receptorima te ima važnu ulogu u mnogim fiziološkim funkcijama, uključujući percepciju boli, odgovor na stres i gastrointestinalnu funkciju. Trenutno se ne koristi u kliničke svrhe jer se djelovanjem peptidaza vrlo brzo metabolizira u organizmu (Murrin, 2007). Međutim, primjenom nanotehnologije, u pretkliničkim istraživanjima, potvrđena je uspješna oralna i intravenozna primjena leucin enkefalina kao lipidnog derivata kapsuliranog unutar hitozan nanočestice (Lalatsa i sur., 2012; Lalatsa i Barbu, 2016).

Za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina izabrana je metoda plinske kromatografije u sprezi s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID). U tu svrhu ispitani su alternativni postupci hidrolize peptida u odnosu na standardnu metodu (poglavlje 4.3) te je odabran i optimiran prikladan derivatizacijski postupak kojim se oslobođene aminokiseline prevode u stabilne i hlapljive derivate pogodne za plinsko-kromatografsku analizu (poglavlje 4.1). Radi separacije enantiomernih parova aminokiselina ispitana je prikladnost pet kiralnih stacionarnih faza i optimirani su kromatografski uvjeti (poglavlje 4.2). Novorazvijena metoda je validirana te je koncentracija enantiomernih derivata aminokiselina oslobođenih hidrolizom leucin enkefalina određena primjenom vanjske standardizacije (poglavlje 4.4). U poglavlju 4.5 definirane su smjernice za prijenos novorazvijene metode u okvire određivanja optičke čistoće ostalih API-a peptidnih lijekova.

4.1 Optimiranje derivatizacijskog postupka aminokiselina

Prvi korak u razvoju analitičke metode bio je odabrati prikladnu metodu derivatizacije funkcijskih skupina kojom nastaju hlapljivi, a ujedno i dovoljno stabilni derivati aminokiselina. Uobičajeno se derivatizacija provodi u dva stupnja, kod čega se u jednom stupnju esterificira karboksilna skupina, a u drugom stupnju acilira amino skupina s prikladnim derivatizacijskim reagensima. Glavni nedostatak dvostupanjske derivatizacije očituje se u dugom vremenu potrebnom za postupak derivatizacije i mogućem gubitku najhlapljivijih aminokiselina zbog višekratnih postupaka uparavanja te nestabilnosti nastalih derivata u određenom vremenskom periodu potrebnom za kromatografsku analizu. Derivatizacija funkcijskih skupina u jednom stupnju može poslužiti kao potencijalno bolja zamjena za standardnu, dvostupanjsku derivatizacijsku metodu s obzirom na jednostavnost izvedbe, izbjegavanje gubitka analita, kraće vrijeme potrebno za derivatizaciju funkcijskih skupina, a nije zanemariva niti ušteda zbog smanjene upotrebe kemikalija. U ovom radu ispitana je efikasnost modificiranog jednostupanjskog derivatizacijskog postupka (Zampolli i sur.) s obzirom na količine reagensa te temperaturu i vrijeme potrebno za derivatizaciju (opisano u poglavlju 3.2.3, Tablica 4.). Kao standardna, referentna metoda korištena je dvostupanjska derivatizacija funkcijskih skupina opisana u radu Franka i sur. (*J. Chromatogr*. 167, 1978). Metoda je primijenjena za određivanje aminokiselinskog sastava jednostavnog modelnog peptida leucin enkefalina koji je sastavljen od četiri aminokiseline, glicina te optički aktivnih tirozina, fenilalanina i leucina.

Rezultati različitih uvjeta derivatizacijskog postupka, prikazani u Tablici 8., uspoređivani su s referentnim uvjetima (100 °C, 60 min, volumni omjer TFE/TFAA = 1:2) opisanima u radu Zampollija i sur. (2006). Usporediv odziv detektora, a time i usporediv stupanj derivatizacije, postignut je reakcijom derivatizacije kod 120 °C s derivatizacijskim reagensima TFE i TFAA u volumnom omjeru 1:4 u trajanju od 15 i 30 min. Za daljnje određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina izabrani su uvjeti provođenja derivatizacije kod 120 °C u trajanju od 30 min s volumnim omjerom TFE i TFAA 1:4.

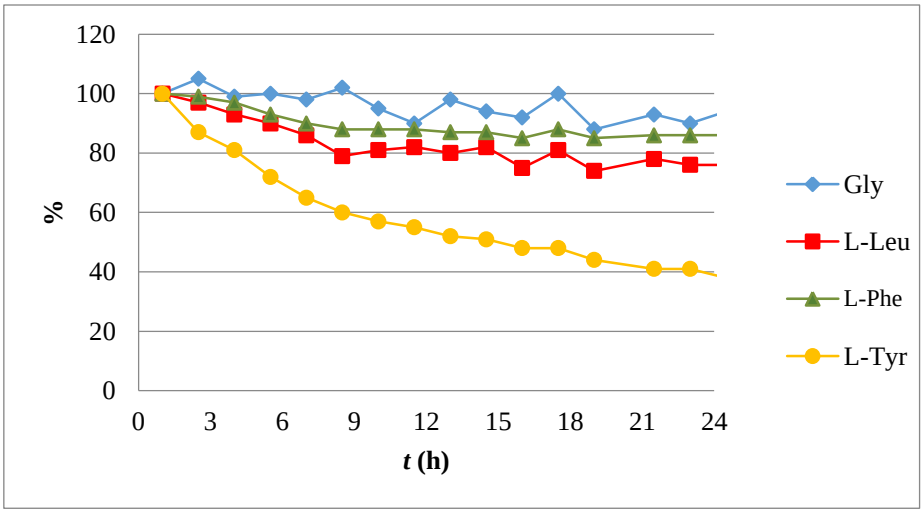
Tablica 8. Rezultati ispitanih uvjeta provođenja jednostupanjske derivatizacije.

Temperatura:	**120 °C**				**100 °C**			
Vrijeme:	15 min		30 min		15 min	30 min	60 min	
	n = 2	*n* = 12	*n* = 2	*n* = 9	*n* = 2	*n* = 2	*n* = 6	*n* = 6
TFE:TFAA	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:2	1:2	1:4
	Površina ispod kromatografskog pika (pA*sec) ± *SD*							
Gly	7,4 ± 0,1	12,2 ± 4,0	10,3 ± 1,0	13,7 ± 1,7	9,4 ± 0,8	7,2 ± 1,1	12,1 ± 1,7	10,4 ± 1,6
Leu	15,3 ± 0,3	21,7 ± 4,5	18,7 ± 0,5	22,7 ± 2,3	18,8 ± 0,9	15,5 ± 1,9	21,3 ± 2,4	19,7 ± 2,4
Phe	42,4 ± 0,4	42,3 ± 1,6	42,7 ± 0,2	42,4 ± 0,8	43,1 ± 0,1	44 ± 1,1	42,9 ± 2,3	39,1 ± 0,6
Tyr	35,2 ± 0,4	33,2 ± 1,1	35,1 ± 0,4	33,5 ± 0,9	26,0 ± 0,4	30,5 ± 2,9	31,3 ± 2,5	30,9 ± 1,0

Dobiveni rezultati u Tablici 8. podudaraju se s rezultatima drugih autora koji su u svojim istraživanjima pokazali kako je učinkovita derivatizacija aminokiselina primjenom odgovarajuće količine reagenasa i temperature ostvarena nakon gotovo 30 min (Karamani i sur., 2013). Karamani i sur. za optimiranje uvjeta derivatizacije mijenjali su količinu reagensa TFE od 50 μL do 200 μL te količinu reagensa TFAA od 100 μL do 300 μL, vrijeme od 5 min do 45 min i temperaturu od 60 °C do 130 °C. Konačni odabrani uvjeti derivatizacije bili su: 150 μL TFE, 300 μL TFAA, 45 min, 90 °C. Odabrana metoda derivatizacije u ovom radu zahtjeva manju količinu reagenasa (50 μL prema 150 μL u slučaju TFE te 200 μL prema 300 μL u slučaju TFAA), manje vremena (30 min prema 45 min) i odvija se na temperaturi višoj za 30 °C.

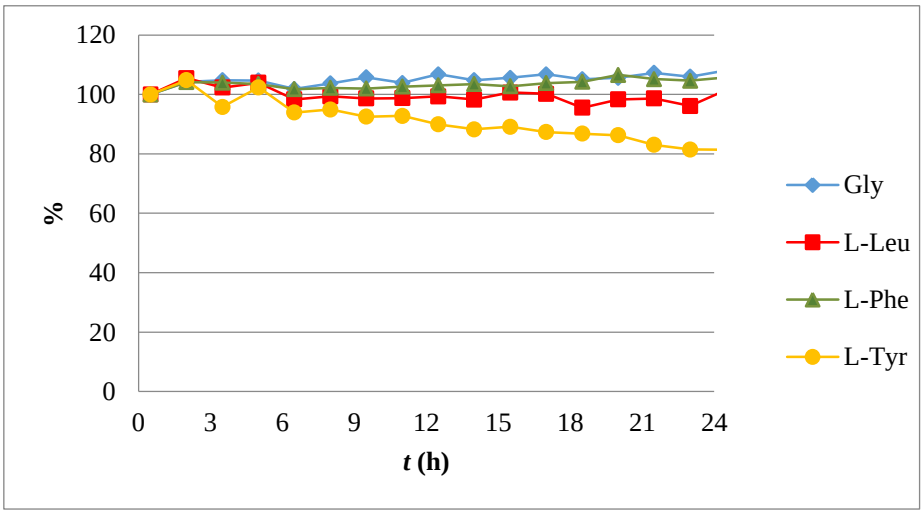
Na Slikama 8., 9. i 10. prikazana je stabilnost derivata aminokiselina praćena tijekom 24 sata kao omjer površina kromatografskih pikova derivata aminokiseline od drugog injektiranja na dalje i prvog injektiranja izraženo u postocima.

Kod derivatizacije koja je provedena u dva stupnja (Slika 8.) može se vidjeti da tijekom 24 sata dolazi do degradacije derivata s vremenom, ali različitom dinamikom. Slika ukazuje na činjenicu da je degradacija derivata glicina najmanja, nakon 24 sata došlo je do 5 % degradacije derivata glicina. Nešto veća degradacija može se uočiti u slučaju leucina i fenilalanina, 25 % leucina i 15 % fenilalanina nakon 24 sata. Nasuprot tome, degradacija tirozina je najveća i dostiže čak 60 % nakon 24 sata, odvija se kontinuirano dok je kod glicina, leucina i fenilalanina kontinuirana do 12 sati nakon čega se više ne uočava zamjetna degradacija derivata. Iako je stupanj degradacije prihvatljiv u slučaju glicina i fenilalanina, ova metoda derivatizacije ne rezultira prihvatljivom stabilnošću derivata leucina i tirozina.



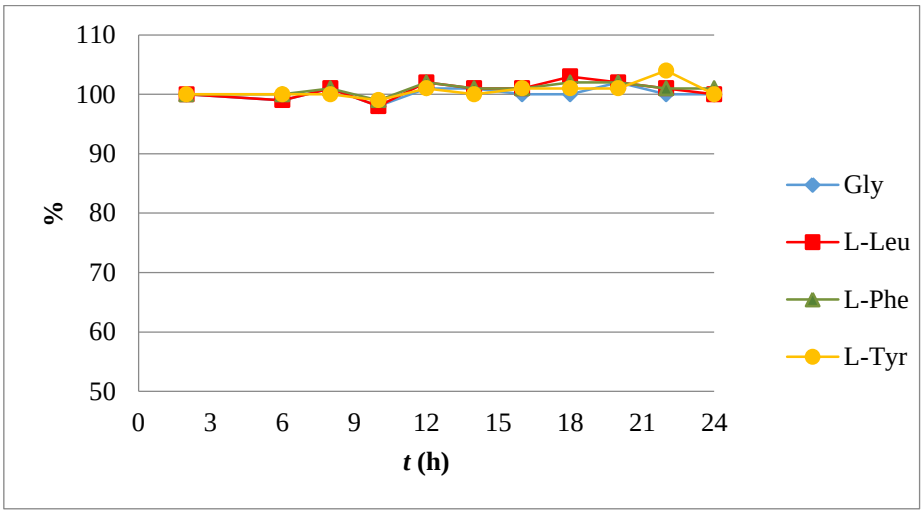
Slika 8. Stabilnost derivata L-aminokiselina dobivenih primjenom opisanog dvostupanjskog derivatizacijskog postupka prema Franku i sur. tijekom 24 sata.

Za razliku od rezultata dvostupanjske derivatizacije iz rezultata ispitivanja stabilnosti derivata aminokiselina tijekom 24 sata dobivenih metodom jednostupanjske derivatizacije prema Zampolliju i sur. koji su prikazani na Slici 9. primjećuje se puno sporija degradacija derivata tirozina nakon 24 sata (20 % prema 60 %) dok se stabilnost derivata glicina, leucina i fenilalanina ne mijenja.



Slika 9. Stabilnost derivata L-aminokiselina dobivenih postupkom jednostupanjske derivatizacije prema Zampolliju i sur. tijekom 24 sata.

S obzirom da je trend kontinuirane degradacije derivata tirozina, iako manjom dinamikom, prisutan i nakon jednostupanjske derivatizacije, u svrhu smanjenja degradacije derivata tirozina, suhi talog derivatiziranih aminokiselina otopljen je u acetonitrilu koji sadrži 0,1 % TFAA. Rezultati stabilnosti derivata aminokiselina prikazani su na Slici 10. iz koje se jasno uočava da je dodatak TFAA u otapalo rezultirao zaustavljanjem degradacije derivata tirozina kao i derivata ostalih aminokiselina.



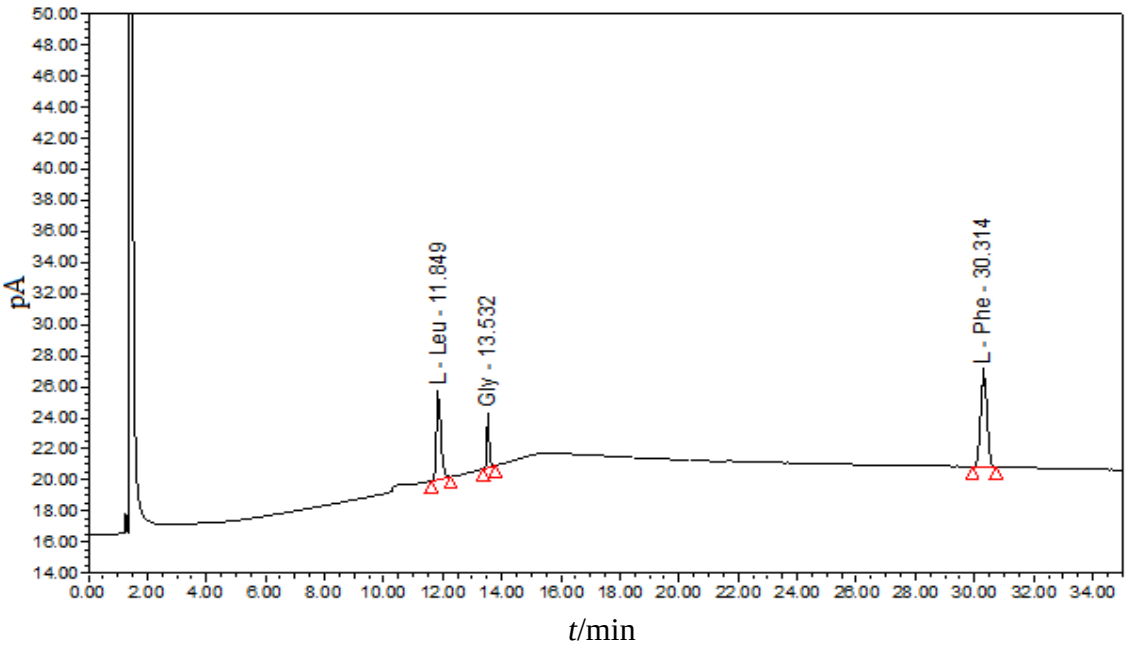
Slika 10. Stabilnost derivata L-aminokiselina dobivenih jednostupanjskom derivatizacijom i otopljenih u acetonitrilu koja sadrži 0,1 % TFAA tijekom 24 sata.

Ideja za primjenu jednog od derivatizacijskih reagenasa u završnom otapalu potječe od Yi i sur. koji su u svom radu kao reagense koristili TFE i TFAA (kod 70 °C u trajanju od 30 min), a derivatizirani talog tirozina i 3-nitrotirozina otapali u toluenu koji sadrži 0,1 % TFAA (Yi i sur., 2000). U ovom radu, dodatak TFAA doveo je do stabilizacije derivata tirozina (100 ± 4 %), a vjerojatni je razlog pomicanje ravnoteže reakcije derivatizacije u smjeru nastajanja produkta.

4.2 Usporedba različitih kolona za kiralnu separaciju

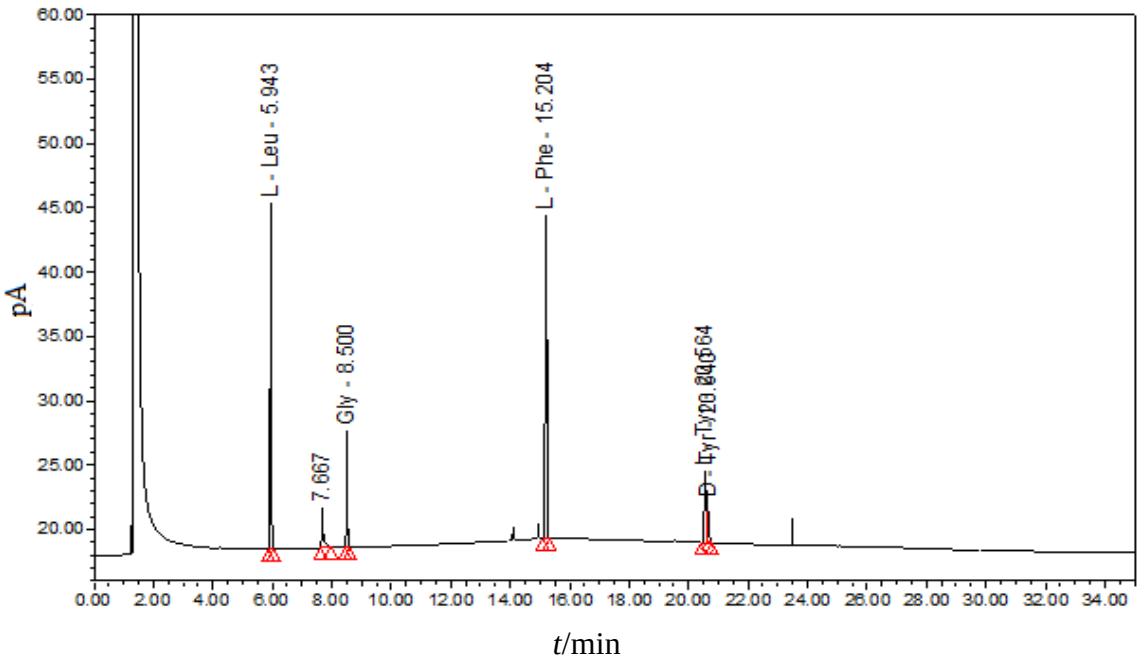
Tijekom razvoja metode za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina u svrhu optimiranja kromatografskih uvjeta ispitana je separacija derivata D- i L-aminokiselina na 5 različitih kiralnih stacionarnih faza. Sve stacionarne faze bazirane su na β-ciklodekstrinu, a razlika se očituje u vrsti kemijskih spojeva vezanih na ciklički prsten β-ciklodekstrina (Tablica 6.) koji utječu na separaciju enantiomera. Duljina kolone, unutarnji promjer i debljina filma stacionarne faze bili su isti kod svih kolona. Za razdvajanje enantiomernih parova derivata aminokiselina na svakoj kromatografskoj koloni primijenjeno je nekoliko različitih temperaturnih programa dok se ostali uvjeti provođenja plinsko-kromatografske analize nisu mijenjali (poglavlje 3.2.4).

Na prvoj ispitanoj kromatografskoj koloni MEGA-DEX TMT beta 1701 za separaciju enantiomera derivata aminokiselina primijenjen je temperaturni program 1 (Slika 11.) i 3. Ni kod jednog od izabranih kromatografskih uvjeta nije došlo do razdvajanja enantiomernih parova derivata aminokiselina. Na prikazanom kromatogramu (Slika 11.) nedostaju kromatografski pikovi derivata tirozina što upućuje na zaključak da su ostali zadržani u koloni.

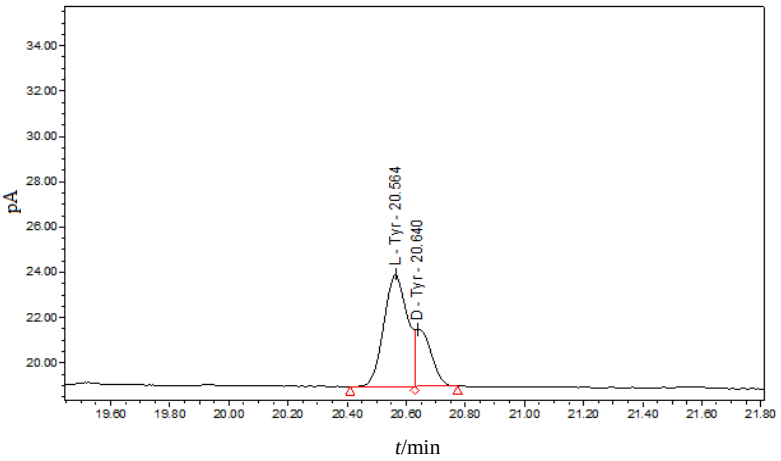


Slika 11. Kromatogram derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX TMT beta 1701 kromatografskoj koloni, temperaturni program 1: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).

S obzirom na neučinkovitost separacije enantiomera derivata na kromatografskoj koloni MEGA-DEX TMT beta 1701, ispitana je prikladnost kromatografske kolone MEGA-DEX DET beta koja na prstenu *β*-ciklodekstrina ima vezanu dietil-terc-butil-silil skupinu. Kromatogram u uvjetima temperaturnog programa 1 prikazan je na Slici 12. Druga vrsta vezanog kemijskog spoja na prsten *β*-ciklodekstrina rezultirala je kraćim vremenima zadržavanja derivata aminokiselina. Derivati leucina i glicina eluirani su pri nižim temperaturama, nego na prethodno ispitanoj koloni pri istim kromatografskim uvjetima. Međutim, nije došlo do razdvajanja enantiomera derivata aminokiselina. Samo se kod derivata tirozina nazire separacija (Slika 13.).

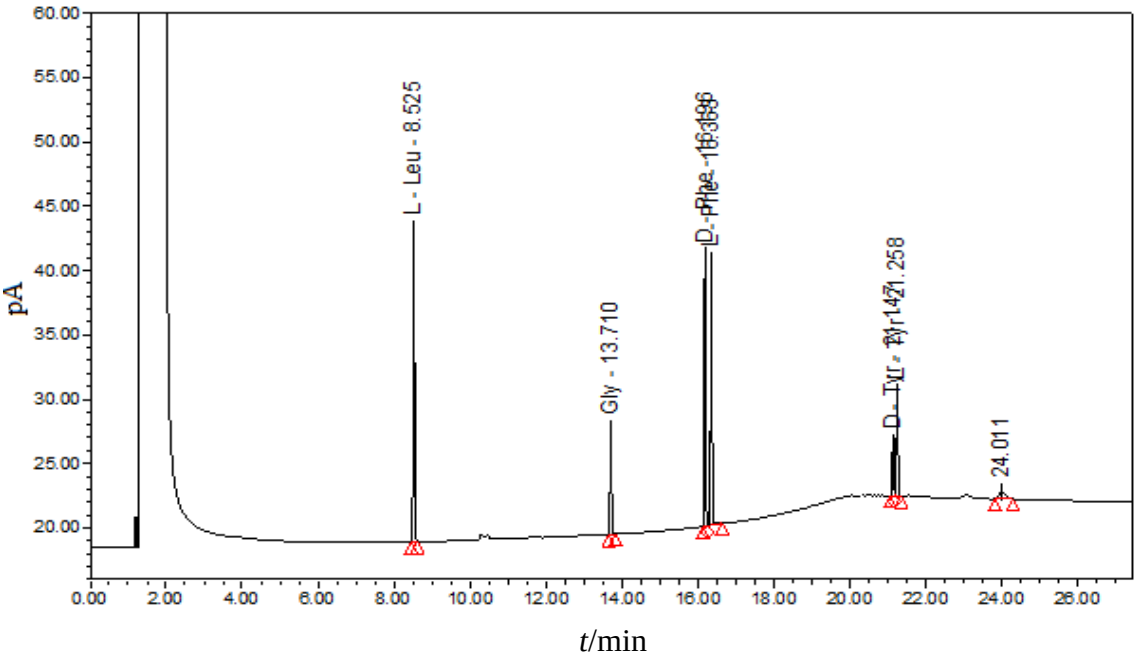


Slika 12. Kromatogram derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX DET beta kromatografskoj koloni, temperaturni program 1: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).



Slika 13. Uvećani prikaz djelomično razdvojenih derivata D- i L-tirozina na MEGA-DEX DET beta kromatografskoj koloni, R_S = 0,38.

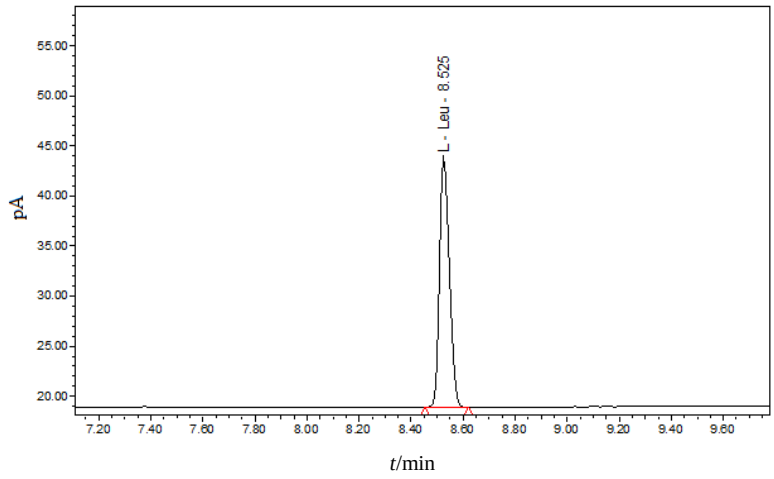
S ciljem separacije enantiomernih parova derivata aminokiselina ispitana je prikladnost i MEGA-DEX DAC beta kiralne kolone kod dva temperaturna programa (1 i 3). Kolona MEGA-DEX DAC beta na prsten *β*-ciklodekstrina ima vezanu diacetil-terc-butil-silil skupinu. Samo je kod temperaturnog programa 3 došlo do razdvajanja enantiomera derivata aromatskih aminokiselina, tirozina i fenilalanina (Slika 14.).



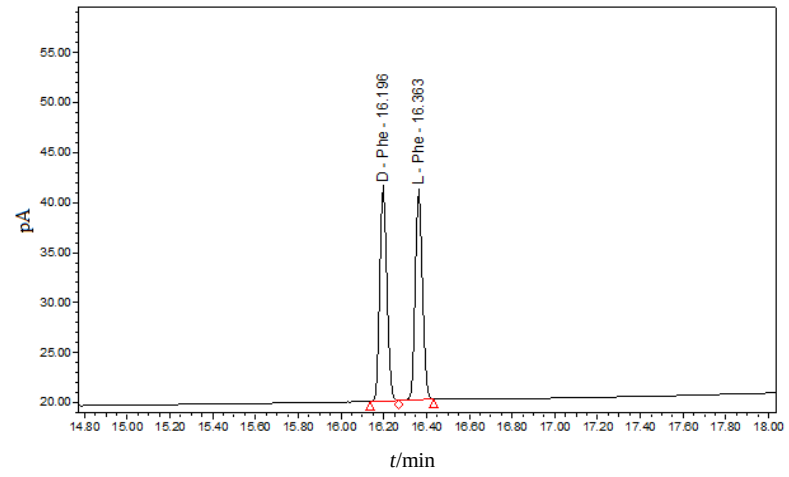
Slika 14. Kromatogram derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX DAC beta kromatografskoj koloni, temperaturni program 3: 100 °C (2 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 190 °C (5 min).

Postignuto je prihvatljivo razlučivanje (R_S > 1) kromatografskih pikova derivata D-Phe i L-Phe (Slika 15., b)) te D-Tyr i L-Tyr (Slika 15., c)). U slučaju leucina nije došlo do razdvajanja enantiomera derivata (Slika 15., a)). Derivati D-aminokiselina ulaze u slabije interakcije s kiralnom stacionarnom fazom pa se eluiraju iz kolone prije derivata L-aminokiselina. Na prethodno ispitanoj koloni, iz rasporeda eluiranja enantiomernih parova derivata tirozina, može se vidjeti suprotan redoslijed eluiranja enantiomera derivata aminokiselina (Slika 13.).

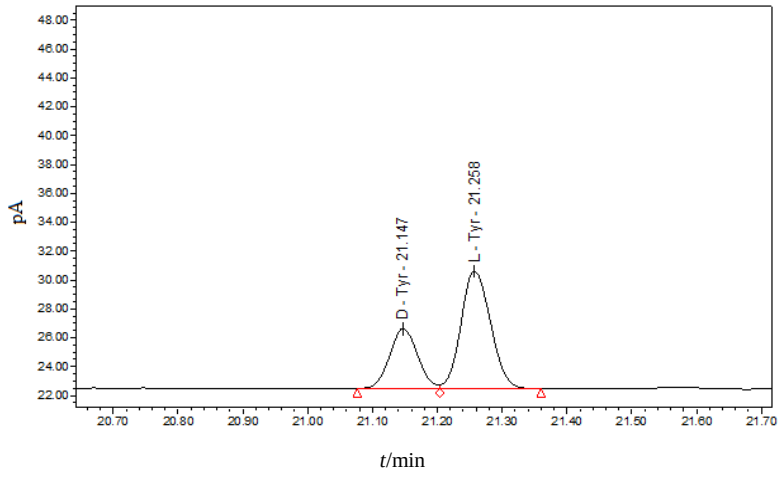
a)



b)

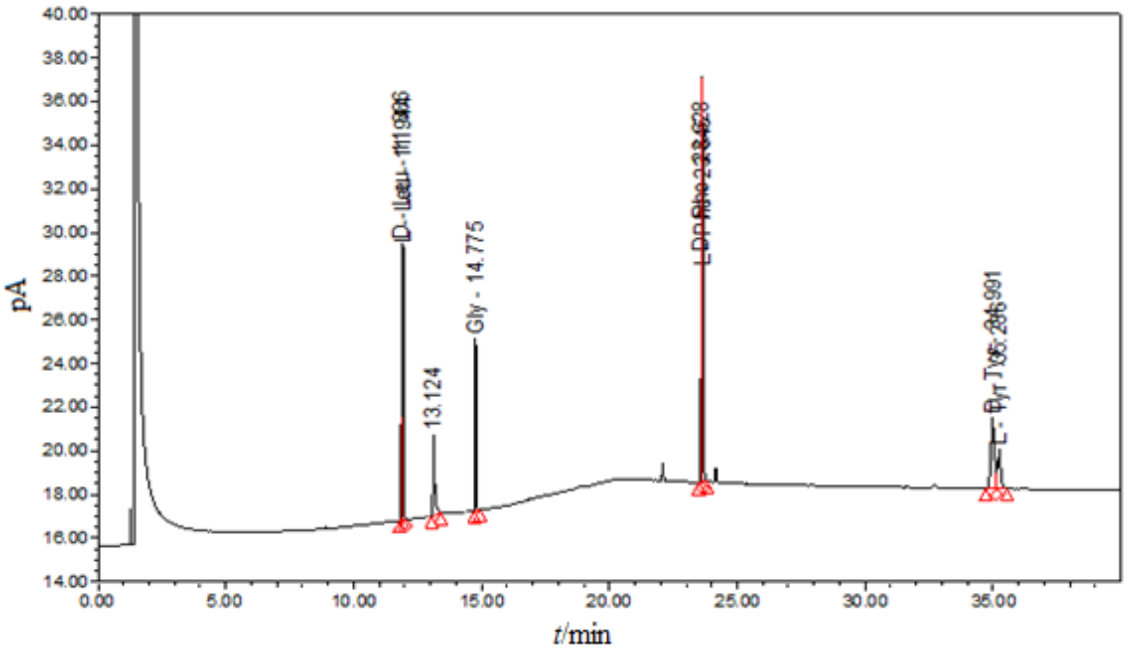


c)



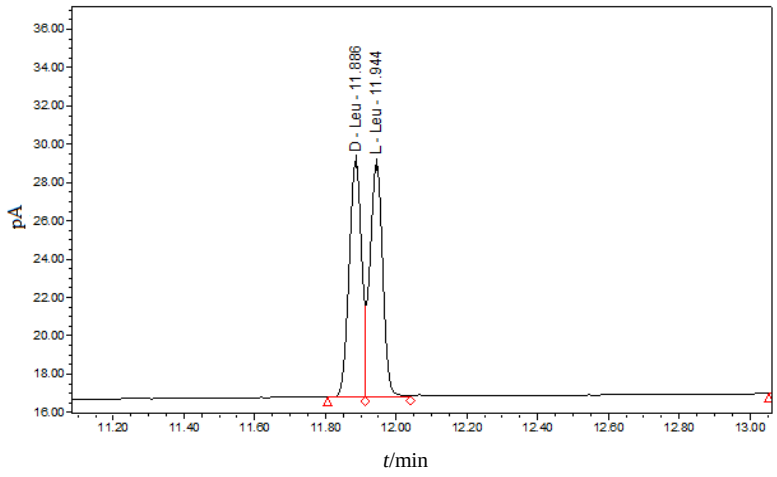
Slika 15. Uvećani prikaz derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX DAC beta kromatografskoj koloni; a) L-Leu, D-Leu (R_S = 0) b) D-Phe, L-Phe (R_S = 2,3), c) D-Tyr, L-Tyr (R_S = 1,3).

Sljedeća ispitana kromatografska kolona bila je MEGA-DEX DMP beta. Na Slici 16. prikazan je kromatogram enantiomera derivata aminokiselina prema uvjetima temperaturnog programa 2. Može se uočiti da je došlo do separacije derivata enantiomernih parova aminokiselina, ali razlučivanje za sve enantiomerne parove bilo je manje od 0,8 (Slika 17.). Raspored eluiranja enantiomernih parova jednak je kao i u slučaju MEGA-DEX DAC beta kolone. S obzirom na postignuta vremena zadržavanja, kromatografski uvjeti na MEGA-DEX DMP beta koloni nisu dalje optimirani jer bi daljnja promjena temperaturnog programa rezultirala vremenski dugotrajnom plinsko-kromatografskom analizom. Kromatografska analiza derivata enantiomera aminokiselina kod temperaturnog programa 1 nije rezultirala razvajanjem niti jednog enantimernog para.

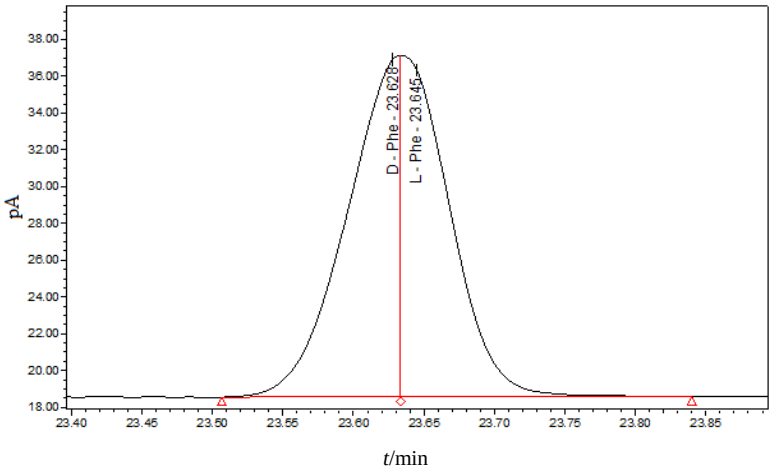


Slika 16. Kromatogram derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX DMP beta kromatografskoj koloni; temperaturni program 2: 60 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).

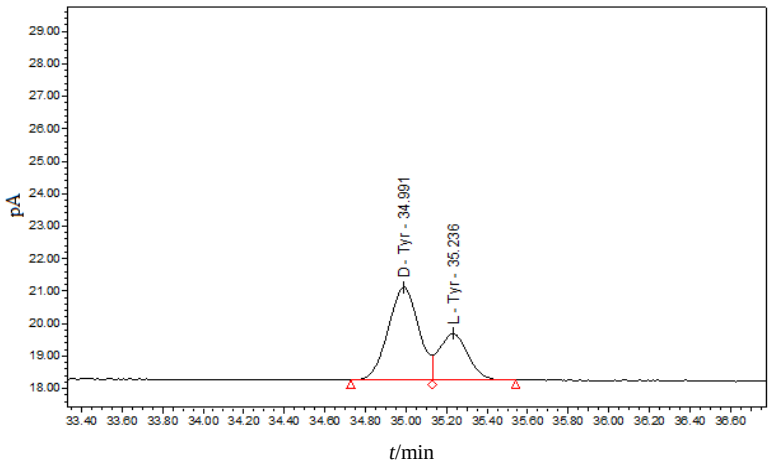
a)



b)

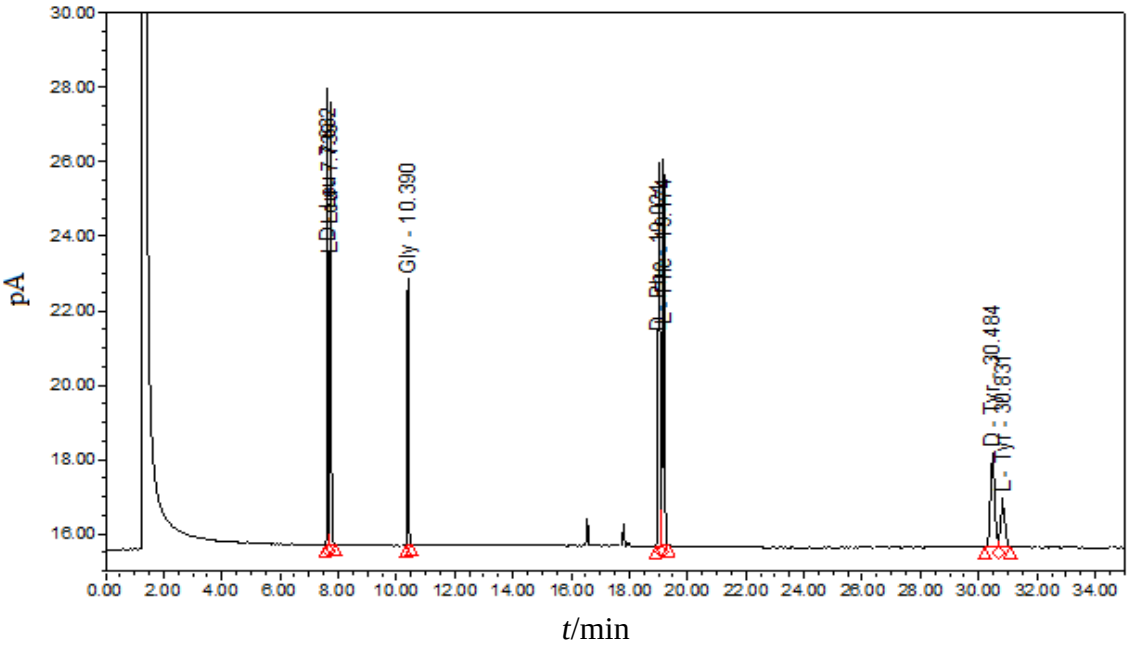


c)



Slika 17. Uvećani prikaz djelomično razdvojenih derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX DMP beta kromatografskoj koloni; a) D-Leu, L-Leu (R_S = 0,8), b) D-Phe, L-Phe (R_S = 0), c) D-Tyr, L-Tyr (R_S = 0,8).

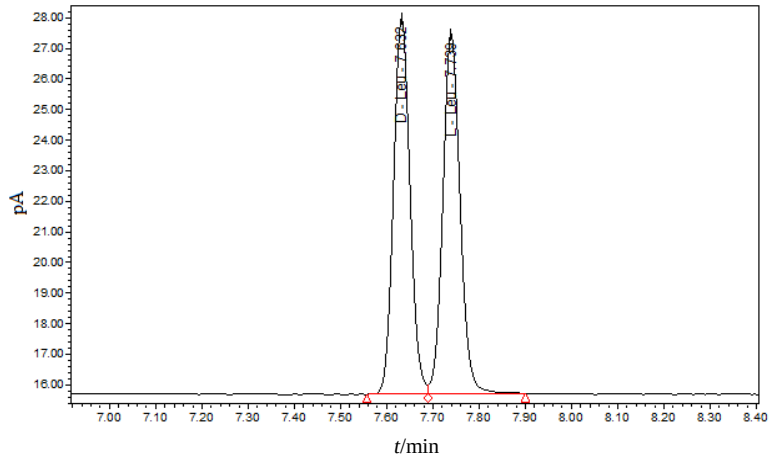
S obzirom na činjenicu da separacija enantiomera na niti jednoj od do sada navedenih kiralnih kolona nije rezultirala zadovoljavajućim razdvajanjem svih enantiomera (R_S > 1) ispitana je i prikladnost MEGA-DEX DMT beta kolone koja na prsten *β*-ciklodekstrina ima vezanu dimetil-terc-butil-silil skupinu. Za separaciju derivata aminokiselina primijenjeni su temperaturni programi 1 i 3. Kromatografska analiza kod temperaturnog programa 3 nije rezultirala razdvajanjem enantiomera. Kromatogram kod uvjeta definiranih temperaturnim programom 1 prikazan je na Slici 18. Derivati L-aminokiselina ulaze u jače interakcije s kiralnom stacionarnom fazom u odnosu na derivate D-aminokiselina, pa se eluiraju kasnije iz kolone.



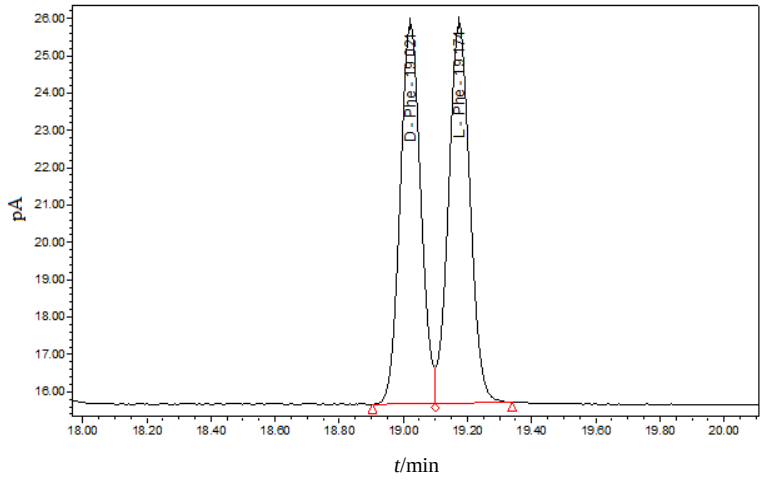
Slika 18. Kromatogram derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni; temperaturni program 1: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).

Dobiveni kromatografski pikovi enantiomernih parova dobro su razdvojeni, odnosno kriterij prihvatljivosti za separaciju enantiomera zadovoljen je kao što se vidi iz uvećanog prikaza (Slika 19.) u kojima se može primijetiti i simetričnost svakog pojedinog kromatografskog pika. Razlučivanje kolone za derivate D-Leu i L-Leu iznosi 1,6, za derivate D-Phe i L-Phe 1,3 i za derivate D-Tyr i L-Tyr 1,2.

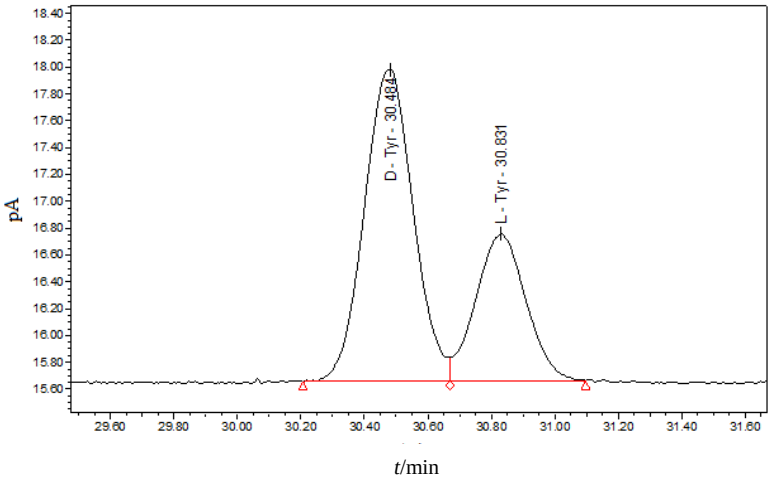
a)



b)



c)



Slika 19. Uvećani prikaz razdvojenih derivata D- i L-aminokiselina na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni; a) D-Leu, L-Leu (R_S = 1,6), b) D-Phe, L-Phe (R_S = 1,3), c) D-Tyr, L-Tyr (R_S = 1,2).

Kromatografska kolona MEGA-DEX DMT beta jedina se pokazala prikladnom za analizu derivata D- i L- enantiomernog oblika aminokiselina, što se očituje u prihvatljivom razlučivanju ($R_S > 1$) za sve aminokiseline te vremenu potrebnom za kromatografsku analizu (manje od 35 min). U ovom radu je pokazano kako vrsta modifikacije *β*-ciklodekstrina i temperaturni program, očekivano, utječu na separaciju enantiomera. Svojstva kemijskih spojeva vezanih na ciklički prsten *β*-ciklodekstrina uzrokuju različiti stupanj interakcija između analita i kiralne stacionarne faze (dipol-dipol interakcije, hidrofobne interakcije, vodikove veze), a njihova veličina utječe na inkluziju analita mijenjajući efektivni promjer šupljina u prstenu *β*-ciklodekstrina. Kod modifikacije *β*-ciklodekstrina s diacetil-terc-butil-silil skupinom došlo je do razdvajanja enantiomera derivata fenilalanina i tirozina, ali ne i leucina, dok je kod modifikacije s dimetil-terc-butil-silil skupinom došlo do razdvajanja svih enantiomera derivata aminokiselina.

4.3 Ispitivanje uvjeta hidrolize peptida

Nakon odabira i optimizacije prikladnog postupka derivatizacije te izbora odgovarajuće kromatografske kolone za separaciju kiralnih derivata aminokiselina, sljedeći korak u razvoju analitičke metode bio je ispitati uvjete hidrolize na modelnom peptidu leucin enkefalinu. Uz standardnu metodu hidrolize koja se temelji na tretmanu peptidnog uzorka s vodenom otopinom klorovodične kiseline (c(HCl) = 6 mol L^{-1}) kod 110 °C u trajanju od 24 sata, ispitani su i alternativni postupci koji zahtijevaju daleko manje vremena. Modelni peptid hidroliziran je otopinom smjese klorovodične i trifluoroctene kiseline u volumnom omjeru 2:1 kod 166 °C u trajanju od 30 i 50 min. Nakon hidrolize peptida standardnom metodom odnosno alternativnim postupcima, oslobođene aminokiseline derivatizirane su razvijenom metodom jednostupanjske derivatizacije (120 °C, 30 min, volumni omjer TFE i TFAA = 1:4) i nastali derivati aminokiselina separirani su na kiralnoj stacionarnoj fazi MEGA-DEX DMT beta kolone. Rezultati ispitanih uvjeta provođenja hidrolize peptida leucin enkefalina izraženi su preko faktora odgovora. Faktor odgovora (engl. *response factor*, R_f) parametar je u kromatografiji koji je definiran kao omjer između mase (m), odnosno masene koncentracije (γ) analiziranog analita i odgovora detektora za taj analit (A, u ovom slučaju kao odgovor detektora korištena je površina ispod kromatografskog pika):

[5] $$R_f = \frac{m}{A} \quad \text{ili} \quad R_f = \frac{\gamma}{A}$$

R_f vrijednost korištena je za prikaz rezultata ispitanih uvjeta provođenja hidrolize peptida (Tablica 9.) iz razloga što je odvaga za svaki uzorak leucin enkefalina (m) bila različita pa je zato ovim parametrom omogućena usporedba dobivenih rezultata.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 9. vidljivo je kako su prosječne R_f vrijednosti enantiomera derivata svih aminokiselina koje su dobivene brzim postupkom hidrolize leucin enkefalina koji traje 30 min gotovo jednake prosječnim R_f vrijednostima enantiomera derivata aminokiselina dobivenih standardnim postupkom hidrolize peptida. Produljenje vremena brzog postupka hidrolize na 50 min umjesto 30 min rezultiralo je većim faktorima odgovora za derivate aminokiselina u odnosu na obje prethodno spomenute metode (od 6 % za Gly do 45 % za D-Leu).

Tablica 9. Rezultati ispitanih uvjeta provođenja hidrolize peptida izraženi kao prosječne R_f vrijednosti i pripadajući parametri varijabilnosti.

Uvjeti hidrolize	***c*(HCl) = 6 mol L^{-1} 110 °C 24 h**		***φ*(HCl/TFA) = 2:1 166 °C 30 min**		***φ*(HCl/TFA) = 2:1 166 °C 50 min**	
	(*n* = 4)		**(*n* = 5)**		**(*n* = 4)**	
	<R_f> ± *SD*	***RSD* (%)**	**<R_f> ± *SD***	***RSD* (%)**	**<R_f> ± *SD***	***RSD* (%)**
Gly	72,5 ± 2,9	3,9	72,9 ± 9,8	13,5	77,1 ± 9,9	12,9
D-Leu	8,0 ± 0,3	3,2	9,5 ± 1,8	19,0	11,6 ± 0,8	7,3
L-Leu	122,8 ± 4,8	3,9	123,3 ± 22,1	17,9	144,9 ± 11,6	8,0
D-Phe	26,7 ± 1,0	3,7	25,5 ± 4,8	19,0	33,1 ± 2,7	8,1
L-Phe	186,2 ± 7,9	4,2	189,3 ± 24,6	13,0	218,0 ± 17,9	8,2
D-Tyr	23,7 ± 1,4	5,8	26,5 ± 2,0	7,5	27,4 ± 3,0	10,8
L-Tyr	144,8 ± 7,1	4,9	151,1 ± 13,6	9,0	165,4 ± 16,6	10,1

Iz rezultata u Tablici 9. može se uočiti da je varijabilnost rezultata, izražena kao relativna standardna devijacija otprilike 1,5 do 5 puta manja kod standardne metode hidrolize (od 3,2 % za L-Leu do 5,8 % za D-Tyr) u odnosu na alternativne metode (30 min: od 7,5 % za L-Tyr do 19 % za D-Leu i 50 min: od 7,3 % za D-Leu do 12,9 % za Gly).

Usporedba učinkovitosti metoda hidrolize na temelju omjera dobivenih i teorijskih masa aminokiselina, od kojih se sastoji analizirani peptid, izraženog u postocima, tj. analitičkog prinosa (engl. *recovery*) bila je onemogućena zbog ograničenih informacija o čistoći dostupnog standarda leucin enkefalina. Naime, modelni peptid se sintetizira u obliku hidratiziranih acetatnih soli ($C_{28}H_{37}N_5O_7 \cdot xC_2H_4O_2 \cdot yH_2O$), a u specifikaciji nije naveden točan sadržaj čistog peptida u standardu nego samo naznaka da je sadržaj veći od 75 % kod čega je navedeno da udio octene kiseline može iznositi između 1 % i 16 %, a udio vode je manji ili jednak 7,5 % (Sigma-Aldrich, 2017). Iako se radi o izazovu čije rješenje zahtjeva prethodne dodatne analize standarda, u ovom slučaju nije problem jer je svrha istraživanja odrediti metodološku razliku između standardne metode hidrolize i alternativnih postupaka. S tom namjerom, prosječne R_f vrijednosti enantiomera derivata aminokiselina dobivenih alternativnim postupcima hidrolize peptida stavljene su u odnos s prosječnim R_f vrijednostima enantiomera derivata svih aminokiselina koje su dobivene standardnom metodom i dobiveni

rezultati prikazani su u Tablici 10. Kako je već uočeno prethodnim rezultatima (Tablica 9.) količine slobodnih aminokiselina oslobođenih iz peptida nastale primjenom kraćeg alternativnog postupka hidrolize (30 min) jednake su ili veće količini aminokiselina dobivenih standardnim postupkom. Najveća promjena uočena je u slučaju D-Leu (18 %) i D-Tyr (12 %). U slučaju produljenog alternativnog postupka (50 min) razlike u odnosu na standardnu metodu su izraženije i kreću se u rasponu od 6 % za glicin, do čak 45 % za D-Leu. Rezultati u ovom radu u skladu su s rezultatima u prijašnjim radovima u kojima je pokazano da prisutnost trifluoroctene kiseline u reakcijskoj smjesi uzrokuje uspješniju hidrolizu peptidnih veza u hidrofobnim regijama proteina (Tsugita i Scheffler, 1982; Tsugita i sur., 1987). Stoga je hidroliza Phe-Leu amidne veze u peptidnom lancu leucin enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) rezultirala oslobađanjem veće količine leucina i fenilalanina.

Tablica 10. Učinkovitost brzih postupaka hidrolize peptida u odnosu na standardnu metodu hidrolize.

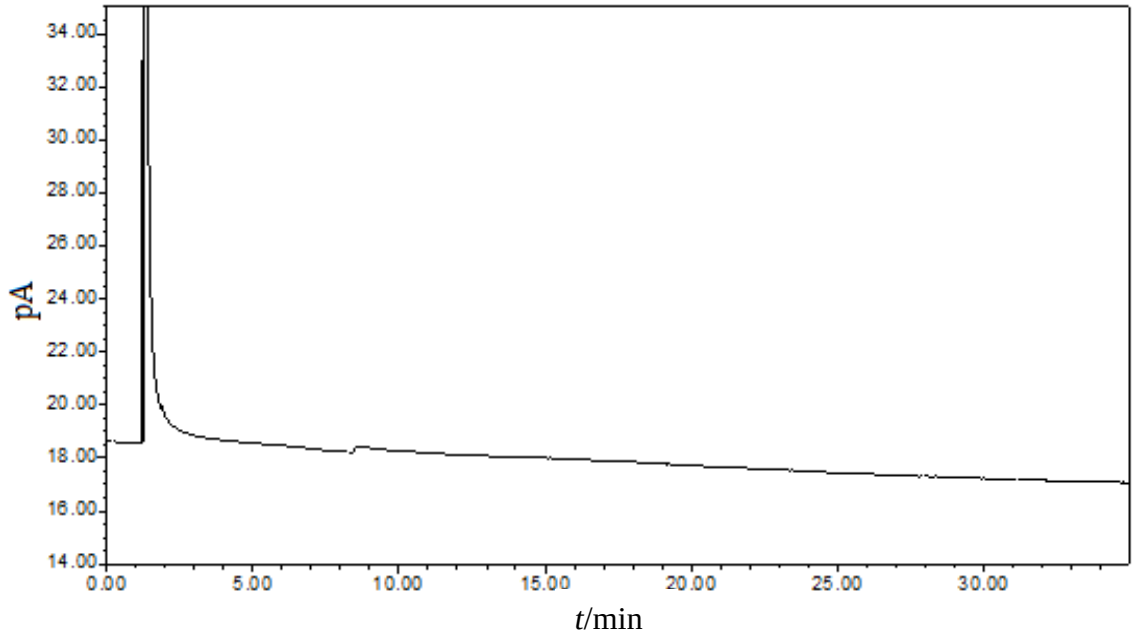
Uvjeti hidrolize	***c*(HCl) = 6 mol L^{-1} 110°C 24 h**	***φ*(HCl/TFA) = 2:1 166°C**	
		30 min	**50 min**
Gly	100	100	106
D-Leu	100	118	145
L-Leu	100	100	118
D-Phe	100	95	124
L-Phe	100	102	117
D-Tyr	100	112	116
L-Tyr	100	104	114

S obzirom na bolju učinkovitost i daleko manje vrijeme hidrolize (50 minuta u odnosu na 24 sata), alternativna metoda koja uključuje tretman peptidnog uzorka s otopinom smjese klorovodične i trifluorooctene kiseline u volumnom omjeru 2:1 kod 166 °C u trajanju od 50 min uzeta je u daljnjim postupcima kao zamjena za standardnu metodu hidrolize.

4.4 Validacija novorazvijene metode

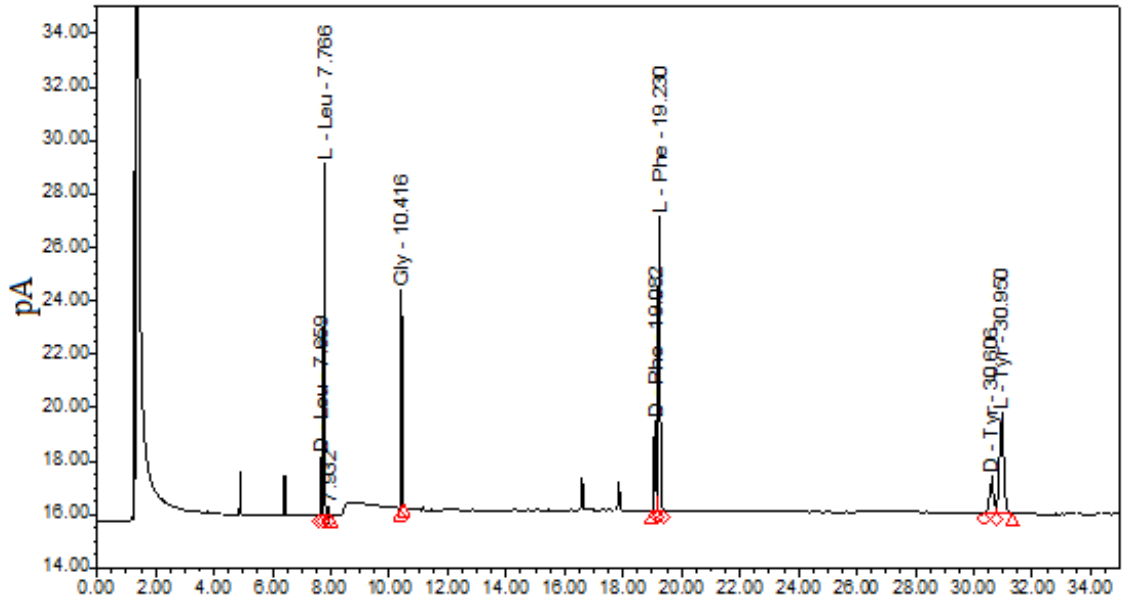
Razvijena analitička metoda za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina validirana je određivanjem sljedećih parametara: selektivnost, linearni raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije, ponovljivost i točnost.

Selektivnost je svojstvo analitičke metode da točno i specifično odredi analit od interesa u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. U svrhu zadovoljenja ovog kriterija zasebno je provedena analiza otapala (slijepa proba) (Slika 20.), standardne vodene otopine smjese aminokiselina (Slika 21., Slika 22.) i analiza vodene otopine uzorka leucin enkefalina (Slika 23.). Usporedbom dobivenih kromatograma, na mjestu eluiranja enantiomera derivata aminokiselina nije uočena pojava kromatografskih pikova u kromatogramu otapala (Slika 20.). U ostalim dobivenim kromatogramima primijećena je pojava nekoliko nepoznatih kromatografskih pikova, no oni ne utječu na selektivnost metode jer su razdvojeni zadovoljavajućim razlučivanjem od pikova enantiomera derivata aminokiselina.

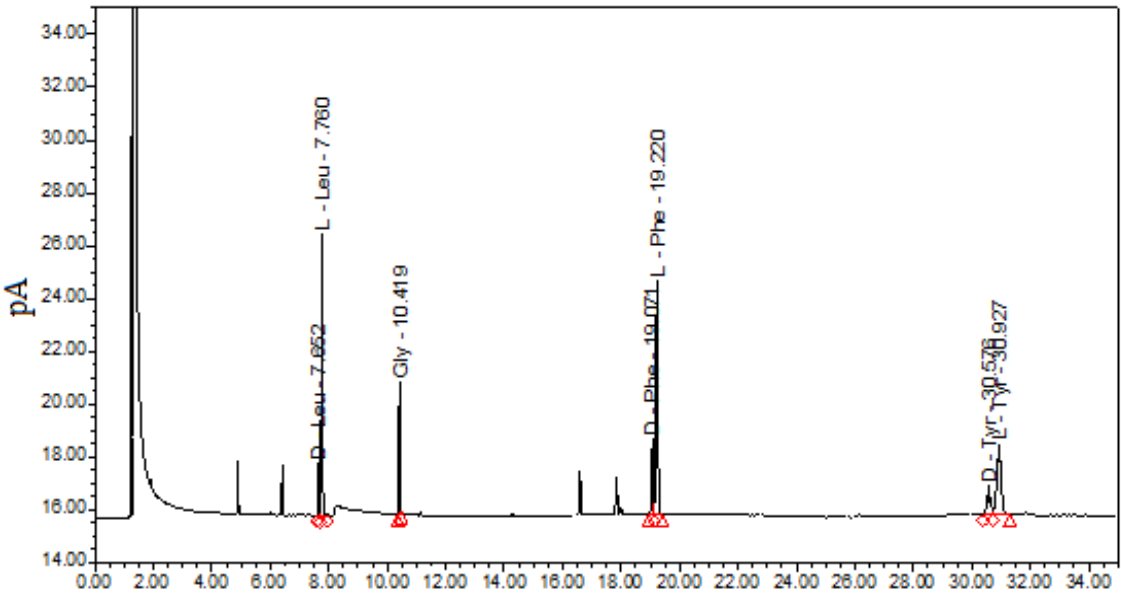


Slika 20. Kromatogram otapala dobiven primjenom novorazvijene analitičke metode na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni, temperaturni program: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).

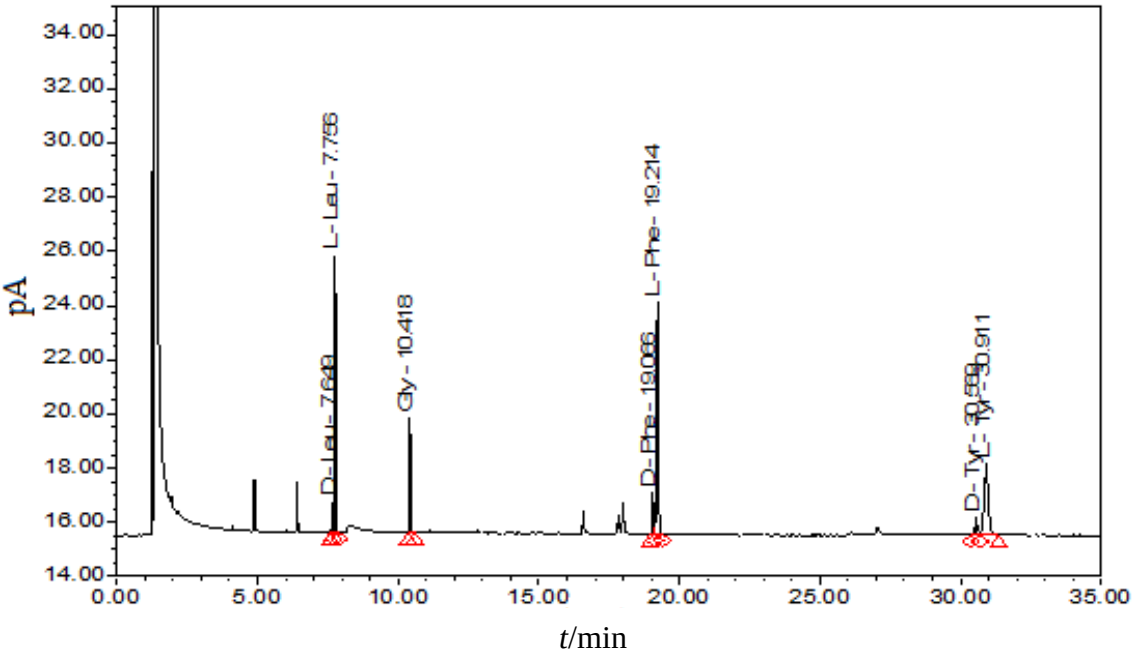
Kako bi se utvrdilo u kojem koraku provođenja analitičke metode nastaju nepoznati kemijski spojevi eluirani prije enantiomernih derivata leucina (t_R = 5,043; t_R = 6,491) odnosno derivata fenilalanina (t_R = 16,596; t_R = 17,852) standardna vodena otopina smjese aminokiselina podvrgnuta je djelomičnom postupku kemijske analize bez hidrolize (Slika 21.) i cjelokupnom postupku koji uključuje hidrolizu (Slika 22.). Usporedbom dobivenih kromatograma može se zaključiti kako nepoznati kromatografski pikovi pripadaju nusproduktima derivatizacije.



Slika 21. Kromatogram derivata standardne smjese aminokiselina na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni, temperaturni program: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min) koje nisu podvrgnute postupku hidrolize.



Slika 22. Kromatogram derivata standardne smjese aminokiselina na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni; temperaturni program: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min) koje su podvrgnute postupku hidrolize.



Slika 23. Kromatogram uzorka leucin enkefalina na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni; temperaturni program: 80°C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).

Validacijski parametri prikazani su u Tablici 11. Za određivanje linearnog raspona razvijene analitičke metode određen je odnos između površine ispod kromatografskog pika svake aminokiseline o poznatoj koncentraciji iste na 9 koncentracijskih razina. Pokazano je da je njihov odnos linearan u primijenjenom koncentracijskom rasponu za pojedinu aminokiselinu pri čemu je koeficijent korelacije (R^2) kod svih aminokiselina veći od 0,998. Granica detekcije enantiomera derivata aminokiselina bila je između 0,001 g L^{-1} za D-Leu i D-Phe do 0,013 g L^{-1} za Gly.

Tablica 11. Analitički parametri razvijene metode za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina.

	t_R (min)	Linearni raspon (g L^{-1})	Koeficijent korelacije, R^2	*LoD* (g L^{-1})	*LoQ* (g L^{-1})
Gly	10,418	0,004 - 0,399	0,9990	0,013	0,043
D-Leu	7,649	0,001 - 0,026	0,9995	0,001	0,002
L-Leu	7,756	0,003 - 0,322	0,9997	0,005	0,016
D-Phe	19,066	0,001 - 0,059	0,9991	0,001	0,004
L-Phe	19,214	0,004 - 0,380	0,9996	0,007	0,022
D-Tyr	30,563	0,001 - 0,071	0,9987	0,002	0,007
L-Tyr	30,907	0,004 - 0,410	0,9988	0,011	0,036

U Tablici 12. prikazani su rezultati točnosti i ponovljivosti analitičke metode u jednom danu koji su dobiveni analizom standardne vodene otopine aminokiselina na tri koncentracijske razine. Ponovljivost u jednom danu, izražena kao relativna standardna devijacija (%), na niskoj koncentracijskoj razini bila je ispod 6,9 % za sve enantiomerne derivate aminokiselina, na srednjoj koncentracijskoj razini bila je ispod 8,9 %, a na visokoj koncentracijskoj razini iznosila je manje od 5,3 % za sve enantiomerne derivate aminokiselina osim glicina (8,4 %). Na niskoj koncentracijskoj razini točnost analitičke metode bila je u rasponu od 103 % do 112 %, na srednjoj koncentracijskoj razini iznosila je između 95 % i 100 %, a na visokoj koncentracijskoj razini iznosila je približno 95 % za sve enantiomerne derivate aminokiselina osim za derivat Gly. Točnost od 79 % za derivat Gly na visokoj koncentracijskoj razini mogla bi se objasniti mogućim djelomičnim zaostajanjem derivata glicina na čepu reakcijske bočice nakon derivatizacije i hlađenja reakcijske smjese jer se nastali derivati glicina pri uvjetima derivatizacije nalaze u plinovitom stanju za razliku od ostalih derivata aminokiselina.

Tablica 12. Točnost i ponovljivost razvijene analitičke metode dobiveni analizom enantiomera derivata standardne smjese aminokiselina na tri koncentracijske razine.

	n	**Gly**	**D-Leu**	**L-Leu**	**D-Phe**	**L-Phe**	**D-Tyr**	**L-Tyr**
Koncentracija (g L^{-1})		0,0128	0,0008	0,0103	0,0019	0,0122	0,0023	0,0131
Točnost (% ± *SD*)	6	111 ± 5,3	112,4 ± 5,4	111,6 ± 3,9	103,2 ± 6,4	112,2 ± 2,1	109,3 ± 7,6	106,6 ± 5,8
Ponovljivost unutar dana (*RSD*, %)		4,8	4,8	3,5	6,2	1,8	6,9	5,4
Koncentracija (g L^{-1})		0,1993	0,0130	0,1612	0,0294	0,1899	0,0354	0,2052
Točnost (% ± *SD*)	6	95,4 ± 8,5	98,0 ± 3,2	94,6 ± 3,3	100,9 ± 4,7	97,2 ± 3,8	100,3 ± 8,3	95,2 ± 5,7
Ponovljivost unutar dana (*RSD*, %)		8,9	3,3	3,5	4,6	3,9	8,3	6,0
Koncentracija (g L^{-1})		0,3030	0,0197	0,2450	0,0447	0,2886	0,0538	0,3119
Točnost (% ± *SD*)	6	78,9 ± 6,6	96,6 ± 2,2	94,2 ± 2,1	94,9 ± 3,9	93,6 ± 2,9	94,5 ± 5,0	93,1 ± 4,9
Ponovljivost unutar dana (*RSD*, %)		8,4	2,3	2,2	4,1	3,1	5,3	5,2

Što je veća koncentracija derivata glicina to je veća mogućnost gubitka kako i rezultati točnosti prikazuju. No, u definiranom linearnom rasponu validacijski parametri su prihvatljivi.

Ponovljivost analitičke metode unutar jednog dana ispitana je i analizom 5 individualno pripremljenih replikata vodene otopine uzorka leucin enkefalina (Tablica 13.). Ponovljivost je bila u rasponu od 4 % za derivat L-Leu do 13,3 % za derivat Gly.

Tablica 13. Ponovljivost analitičke metode u jednom danu određena analizom vodene otopine leucin enkefalina.

	***RSD*, %** **(*n* = 5)**
Gly	13,3
D-Leu	5,8
L-Leu	4,0
D-Phe	8,7
L-Phe	5,4
D-Tyr	12,5
L-Tyr	7,0

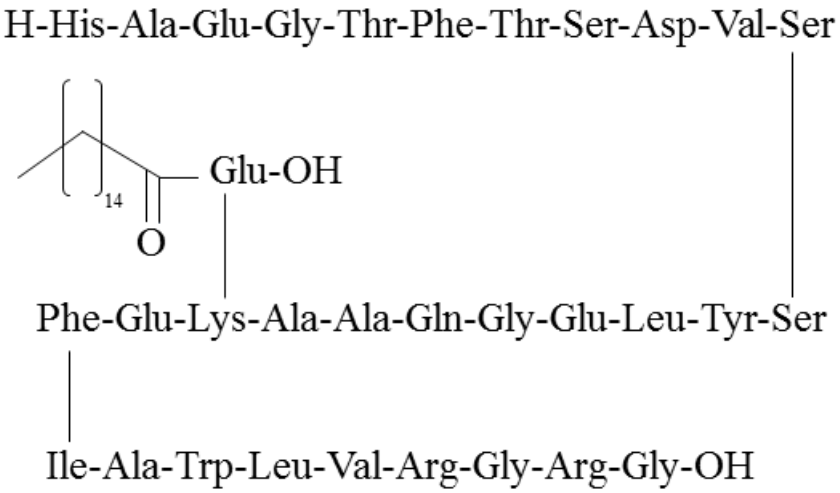
Analizirani peptid, s obzirom na ukupnu masu D- i L-enantiomernog oblika pojedine aminokiseline, sadrži 4 % D-Leu, 7 % D-Phe i 8 % D-Tyr. Prema specifikaciji, količina čistog peptida u izvaganom uzorku treba biti veća od 75 %. Određeni maseni udio leucin enkefalina u standardu iznosi 85 ± 6 % (srednja vrijednost ± *SD*) .

4.5 Enantiomerni sastav API-a peptidnih lijekova

Krajnji cilj cjelokupnog istraživanja je razviti analitičku metodu za određivanje optičke čistoće API-a peptidnih lijekova. U tu svrhu, ovim radom definirani su i optimirani uvjeti kemijske analize na pentapeptidu leucin enkefalinu koji je odabran kao modelni peptid radi lakšeg razvoja metode. Aktivne farmaceutske supstancije većine ostalih peptidnih lijekova složenijeg su sastava te osim 20 prirodno prisutnih aminokiselina mogu sadržavati brojne sintetske aminokiseline.

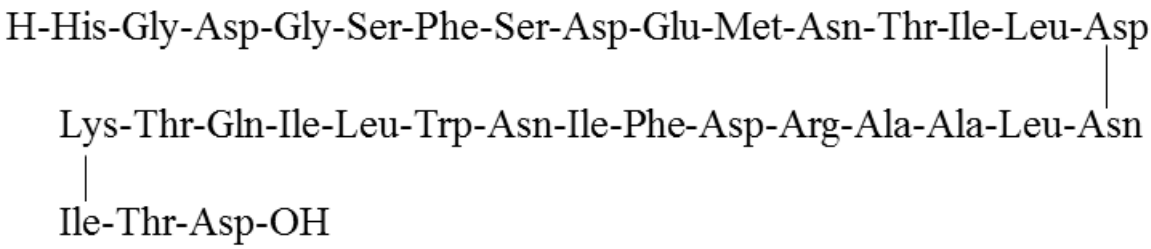
Da bi se razvijena metoda za određivanje enantiomernog sastava leucin enkefalina mogla koristiti za određivanje optičke čistoće složenijih peptida potrebno je dodatno istražiti utjecaj uvjeta hidrolize i derivatizacije. Nepoznato je kako će definirani uvjeti kemijske analize utjecati na ostale oslobođene aminokiseline koje nisu obuhvaćene istraživanjem u ovom radu, a potrebno je uzeti u obzir i moguću pojavu racemizacije. Vjerojatna je pojava poteškoća vezanih za nekoliko prirodno prisutnih aminokiselina. Asparagin i glutamin u uvjetima standardne metode kisele hidrolize reakcijom deaminacije prelaze u asparaginsku i glutaminsku kiselinu (Moldoveanu i David, 2002). Potrebno je ispitati da li u dalekom kraćem vremenu (50 min naprama 24 sata) hidrolize peptida smjesom klorovodične i trifluoroctene kiseline dolazi do njihove deaminacije i ako da u kojoj mjeri. Tijekom kisele hidrolize vjerojatna je degradacija triptofana koju je moguće spriječiti dodatkom tioglikolne kiseline u reakcijsku smjesu (Yokote i sur., 1986). Tioglikolna kiselina ili dodatak nekog drugog antioksidansa poput dibutilhidroksitoluena (BHT) umanjuje i potencijalnu oksidaciju metionina te cisteina (Moldoveanu i David, 2002; Pätzold i Brückner, 2005). Izazov predstavljaju pobočni lanci histidina i arginina. Potrebno je utvrditi da li su definirani uvjeti derivatizacije (120 °C, 30 min, volumni omjer TFE:TFAA = 1:4) dovoljni za potpunu derivatizaciju imidazolne skupine histidina odnosno gvanidinske skupine arginina.

S namjerom utvrđivanja daljnjih smjernica, razvijena analitička metoda određivanja enantiomernog sastava leucin enkefalina, kao prvi korak u razvoju sveobuhvatne analitičke metode, primijenjena je na dvije aktivne farmaceutske supstancije, liraglutidu i teduglutidu. Liraglutid (Slika 24.) je analog glukagon sličnog peptida-1 (engl. *Glucagon like peptide-1*, GLP-1) s podudarnošću redoslijeda od 97 % s humanim GLP-1 koji se veže na GLP-1 receptor i aktivira ga. Aktivna je farmaceutska supstancija peptidnog lijeka komercijalnog naziva Victoza® koji se koristi za liječenje šećerne bolesti tipa 2 (Dharmalingam i sur., 2011).



Slika 24. Strukturna formula liraglutida (prema Dharmalingam i sur., 2011).

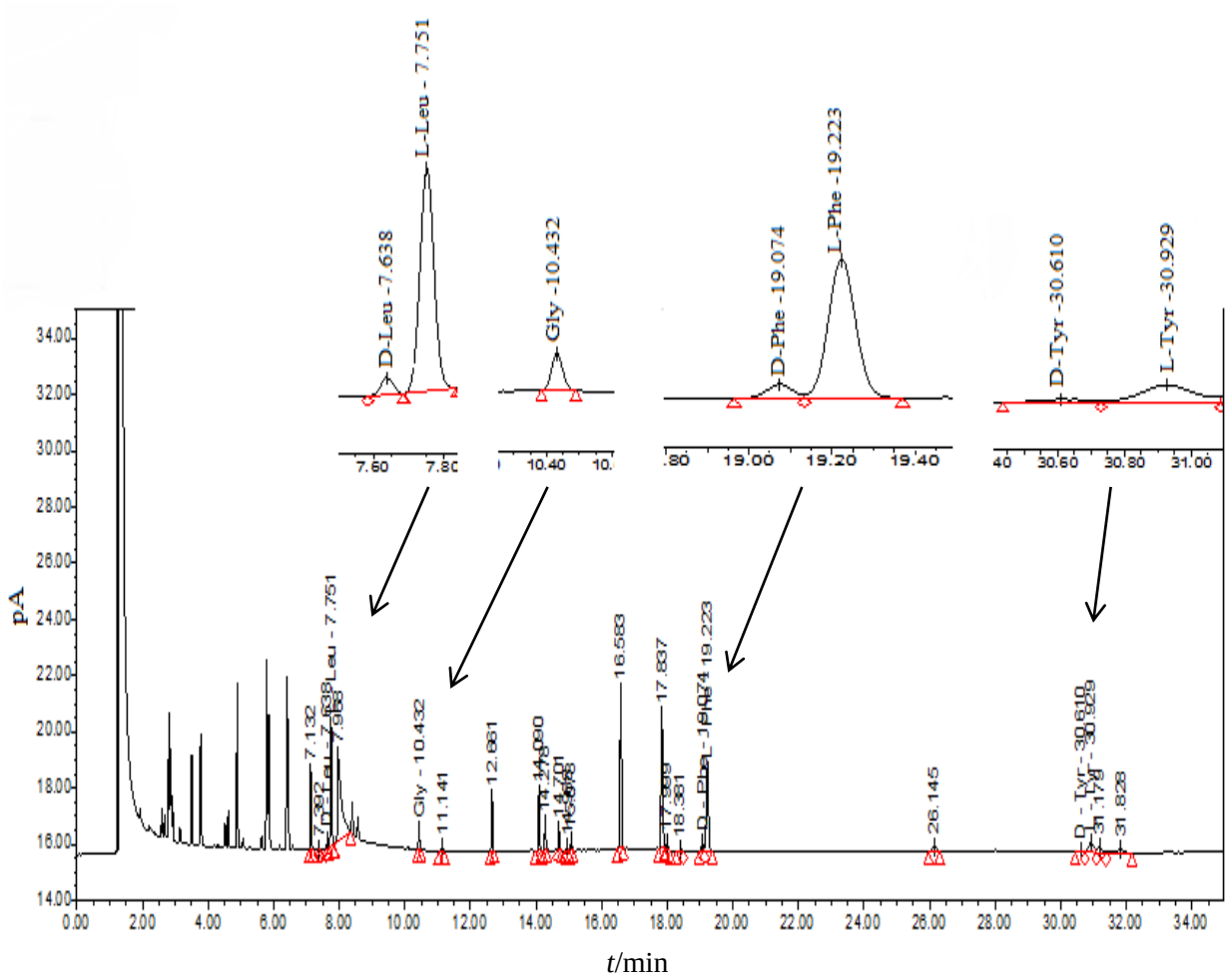
Drugi peptid, teduglutid (Slika 25.) aktivna je farmaceutska supstancija lijeka Gattex® koji se koristi za liječenje sindroma kratkog crijeva, Crohnove bolesti i drugih gastrointestinalnih poremećaja. Teduglutid je sintetski analog humanog glukagon sličnog peptida-2 (GLP-2) i sastoji se od 33 aminokiseline (Marier i sur., 2008).



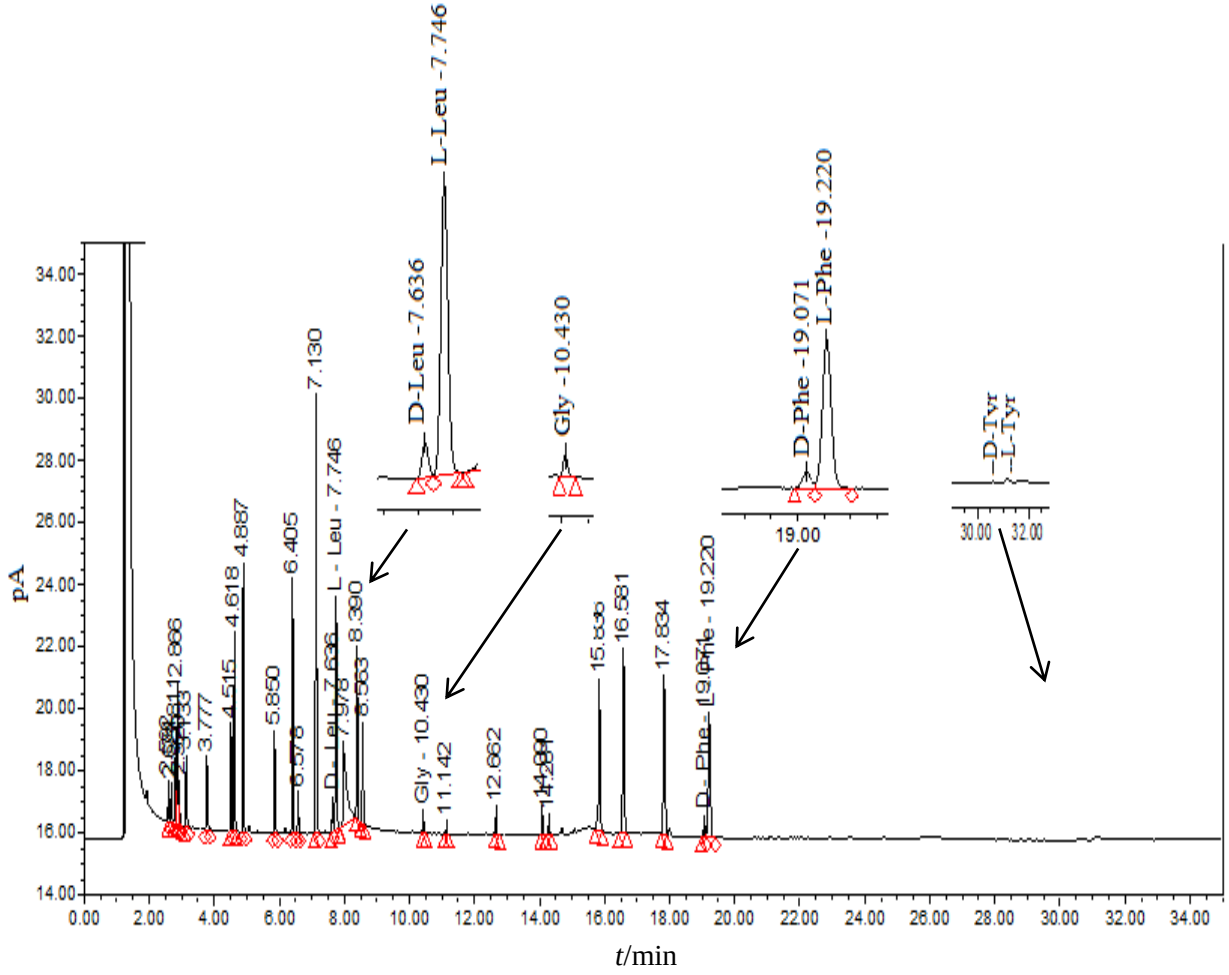
Slika 25. Strukturna formula teduglutida (prema Anonymous 2, 2017).

Navedena dva API-ja podvrgnuti su istim uvjetima hidrolize, derivatizacije i kromatografske analize koja je razvijena za leucin enkefalin. Iz kromatograma derivata aminokiselina koje su oslobođene hidrolizom iz liraglutida (Slika 26.) može se identificirati prisutnost svih aminokiselina proučavanih u ovom radu osim D-Tyr. Na kromatogramu derivata aminokiselina koje su oslobođene hidrolizom iz teduglutida (Slika 27.) detektirani su glicin te enantiomerni parovi leucina i fenilalanina. Tirozin nije detektiran u dobivenom kromatogramu budući da ga teduglutid ne sadrži. Kako bi se mogle identificirati i ostale aminokiseline od

kojih se peptidi sastoje, potrebno je analizirati njihove D- i L- standarde i odrediti vrijeme eluiranja iz kolone.



Slika 26. Kromatogram derivata aminokiselina oslobođenih hidrolizom iz liraglutida na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni, temperaturni program: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).



Slika 27. Kromatogram derivata aminokiselina oslobođenih hidrolizom teduglutida na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni, temperaturni program: 80 °C (0 min), povišenje temperature dinamikom od 4 °C/min do 140 °C (20 min).

5 ZAKLJUČCI

1. Razvijena je pouzdana i selektivna analitička metoda za određivanje enantiomernog sastava pentapeptida leucin enkefalina koja se temelji na hidrolizi peptida do slobodnih aminokiselina, derivatizaciji oslobođenih aminokiselina te njihovoj separaciji na kiralnoj stacionarnoj fazi primjenom plinske kromatografije u sprezi s plameno-ionizacijskim detektorom.

2. Hidrolizom peptida leucin enkefalina alternativnim postupkom postiže se bolja učinkovitost te je potrebno daleko manje vrijeme za hidrolizu u odnosu na standardnu metodu.

3. Modificiranom metodom jednostupanjske derivatizacije uz dodatak TFAA dobiveni su hlapljivi i stabilni derivati svih aminokiselina.

4. Zadovoljavajuća separacija enantiomernih derivata aminokiselina (R_s > 1) postignuta je na MEGA-DEX DMT beta kromatografskoj koloni.

5. U ispitanom koncentracijskom rasponu odziv detektora bio je linearan za svaku aminokiselinu pri čemu je koeficijent korelacije (R^2) bio veći od 0,998 kod svih aminokiselina.

6. Razvijena metoda potencijalno je primjenjiva za određivanje enantiomernog sastava ostalih API-a peptidnih lijekova.

6 LITERATURA

Anonymous 1 (2004) Generički lijek, < http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/4276/Genericki-lijek.html >. Pristupljeno 19. travnja 2017.

Anonymous 2, (2017) Teduglutide, < https://www.clearsynth.com/en/CSO11216.html >. Pristupljeno 7. kolovoza 2017.

Dharmalingam, M., Sriram, U., Baruah, M. P. (2011) Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus. *Indian J. Endocr. Metab.* **15**, 9 – 17.

Drozd, J. (1981) Chemical derivatization in gas chromatography. Elsevier scientific publishing company, Amsterdam, Oxford, New York, str. 126 – 148.

Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2. izd., 2014). Magnusson, B., Örnemark, U. (ured.) ISBN 978-91-87461-59-0. < https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv > . Pristupljeno 10. lipnja 2017.

FDA (2015) Biosimilars: Questions and Answers Regarding Implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009, FDA - Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland, SAD.

Fountoulakis, M., Lahm, H. W. (1998) Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. J. Chromatogr. A **826**, 109 – 134.

Fosgerau, K., Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today* **20**, 122 – 128.

Frank, H., Nicholson, G. J., Bayer, E. (1978) Enantiomer labelling, a method for the Quantitative Analysis of Amino Acids. *J. Chromatogr.* **167**, 187 – 196.

Gehrke, C. W. (2005) Quantitation of Amino Acids by Gas – Liquid Chromatography. U: *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography* (Molnár – Perl, I., ured.), Elsevier B. V., Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 39 – 81.

ICH (2006a) Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Products Q3B. International Conference on Harmonisation, Geneva, Switzerland.

ICH (2006b) Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3A. International Conference on Harmonisation, Geneva, Switzerland.

ICH (2005) Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation, Geneva, Switzerland.

Jerić, I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem. Ind.* **53**, 495 – 504.

Karamani, A. A., Fiamegos, Y. C., Vartholomatos, G., Stalikas, C. D. (2013) Fluoroacetylation/fluoroethylesterification as a derivatization approach for gas chromatography-mass spectrometry in metabolomics: Preliminary study of lymphohyperplastic diseases *J. Chromatogr. A*, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.080

Kolaj – Robin, O. (2017) A guide through monograph sections with emphasis on synthetic peptides, < https://www.edqm.eu/sites/default/files/synthetic_peptides_by_olga_kolaj-robin-bio-training-feb2017.pdf > . Pristupljeno 22. kolovoza 2017.

Lalatsa, A., Lee, V., Malkinson, J. P., Zloh, M., Schätzlein, A. G., Uchegbu, I. F. (2012) A Prodrug Nanoparticle Approach for the Oral Delivery of a Hydrophilic Peptide, Leucine^5-enkephalin, to the Brain. *Mol. Pharmaceutics* **9**, 1665 – 1680.

Lalatsa, A., Barbu, E. (2016) Carbohydrate Nanoparticles for Brain Delivery. U: *Nanotechnology and the Brain*, [online] (Al-jamal K. T., ured.), Elsevier Inc., London, United Kingdom, str. 115 – 153, <https://books.google.hr/books?id=dAbpCgAAQBAJ&pg=PA115&lpg=PA115&dq=Carbohydrate+Nanoparticles+for+Brain+Delivery&source=bl&ots=OuocB8LUrQ&sig=j9ZxvH0-s0FXIBsxaxAV3Y8hzfQ&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwiXhN7R0vnVAhUBbBoKHaaEBUk

Q6AEIRTAD#v=onepage&q=Carbohydrate%20Nanoparticles%20for%20Brain%20Delivery&f=false>. Pristupljeno 25. kolovoza 2017.

Lax, E. R. (2016) Redefining the peptide therapeutics manufacturing industry in the 21st century (Part 1). *Pharma Horizon* **1**, 64 – 72.

Marier, J. F., Beliveau, M., Mouksassi, M. S., Shaw, P., Cyran, J., Kesavan, J., Wallens, J., Zahir, H., Wells, D., Caminis, J. (2008) Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Teduglutide, a Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2) Analog, Following Multiple Ascending Subcutaneous Administrations in Healthy Subjects *J. Clin. Pharmacol.* **48,** 1289 – 1299.

Moldoveanu, S. C., David, V. (2002) *Sample preparation in chromatography*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, str. 798 – 814.

Morre, S., Stein, W. H. (1963) Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Meth. Enzymol.* **6**, 819 - 831

Murrin, L. C. (2007) [Leu]enkephalin. U: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (Down, J. F., Murrin, L. C., Ralevic, V., Scholar, E. M., Summers, R. J., Tew, K. D., Wecker, L., ured.), Elsevier Ltd., Amsterdam, Boston. str. 1 – 6.

Nguyen, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2006) Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. of Biomed. Sci.* **2**, 85 – 100.

Orata, F. (2012) Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. U: *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, [online] (Mohd, M. A., ured.), Intech, str. 83 – 108, < https://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-and-reagents-for-gas-chromatography-analysis >. Pristupljeno 10. svibnja 2017.

Pätzold, R., Brückner, H. (2005) Chiral Separation of Amino Acids by Gas Chromatography. U: *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography* (Molnár – Perl, I., ured.), Elsevier B. V., Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 99 – 116.

Pietrogrande, M. C., Basaglia, G. (2010) Enantiomeric resolution of biomarkers in space analysis: Chemical derivatization and signal processing for gas chromatography–mass spectrometry analysis of chiral amino acids. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 1126 – 1133.

Rutherfurd, S. M., Gilani, G. S. (2009) Amino Acid Analysis. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **58**, 1 – 37.

Schurig, V. (2002) Chiral separations using gas chromatography. *Trends in analytical chemistry* **21**, 647 – 661.

Schurig, V. (2000) Gas Chromatography: Chiral Separations. U: *Handbook of methods and instrumentation in separation science Volume 1* (Wilson, I. D., Poole, C.F., ured.), Elsevier Ltd., Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 159 – 167.

Schurig, V., Nowotny, H. P. (1990) Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Cyclodextrin Derivatives. *Angew. Chem. Ed. Engl.* **29**, 939 – 1076.

Sigma-Aldrich, (2017) Product Specification: Leucine Enkephalin acetate salt hydrate, < http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COfAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/L9/L9133/L9133-BULK_____SIGMA____.pdf >. Pristupljeno 3. kolovoza 2017.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2007) Principles of Instrumental Analysis, 9. izd., Thomson Brooks/Cole, Canada.

Tsugita, A., Scheffler, J. J. (1982) A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid. *Eur. J. Biochem.* **124**, 585 – 588.

Tsugita, A., Ushida, T., Mewes, H. W., Ataka, T. (1987) A Rapid Vapor-Phase Acid (Hydrochloric Acid and Trifluoroacetic Acid) Hydrolysis of Peptide and Protein. *J. Biochem.* **102**, 1593 – 1597.

Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F. G., Oppici, C. A., Heiligers, D., Hills, D., Calvo, X. R., Verhaert, P. (2014) The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPa Open Proteomics* **4**, 58 – 69.

Verlander, M. (2007) Quality Considerations for Peptide APIs, < http://peptidereview.com/PDF/Polypeptidequalityconsiderations.pdf >. Pristupljeno 1. kolovoza 2017.

Vergote,V., Burvenich, C., Van deWielec, C., Spiegeleera, B. (2009) Quality specifications for peptide drugs: a regulatory-pharmaceutical approach. *J. Pept. Sci.* **15**, 697–710.

Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., Khrestchatisky, M. (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* **15**, 40 - 56.

Wu, L., Chen, F., Lee, S. L., Raw, A., Yu, L. X. (2016) Building parity between brand and generic peptide products: Regulatory and scientific considerations for quality of synthetic peptides. *Int. J. Pharm.* (objavljeno online 22. prosinca 2016.), doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.051

Yi, D., Ingelse, B. A., Duncan, M. W., Smythe, G. A. (2000) Quantification of 3-Nitrotyrosine in Biological Tissues and Fluids: Generating Valid Results by Eliminating Artifactual Formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 578 - 586.

Yokote, Y., Arai, K. M., Akahane, K. (1986) Recovery of Tryptophan from 25 Minute Acid Hydrolysates of Protein. *Analytical Biochemistry* **152**, 245 – 249.

Zampolli, M., Meunier, D., Sternberg, R., Raulin, F., Szopa, C., Pietrogrande, M. C., Dondi, F. (2006) GC-MS Analysis of Amino Acid Enantiomers as Their N(O,S)-Perfluoroacyl Perfluoroalkyl Esters: Application to Space Analysis. *Chirality* **18**, 279 – 295.

Zampolli, M. G., Basaglia, G., Dondi, F., Sternberg, R., Szopa, C., Pietrogrande, M. C. (2007) Gas chromatography–mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis. *J. Chromatogr. A*, **1150**, 162 – 172.

7 PRILOZI

Prilog 1. Popis oznakâ, kraticâ i simbolâ

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Aktivna farmaceutska supstancija
BSTFA	*N*,*O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	*N*,*O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid
D-Leu	D-Leucine	D-leucin
D-Phe	D-Phenylalanine	D-fenilalanin
D-Tyr	D-Tyrosine	D-tirozin
EMA	European Medicines Agency	Europska medicinska agencija
FDA	Food and Drug Administration	Američka agencija za hranu i lijekove
FID	Flame ionization detector	Plameno-ionizacijski detektor
GC	Gas chromatography	Plinska kromatografija
GCP	Good Clinical Practice	Dobra klinička praksa
GLP-1	Glucagon like peptide-1	Glukagon slični peptid-1
GLP-2	Glucagon like peptide-2	Glukagon slični peptid-2
Gly	Glycine	Glicin
GMP	Good Manufacturing Practice	Dobra proizvođačka praksa
HFB	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutanol	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutanol
HFBA	Heptafluorobutyric anhydride	Anhidrid heptafluoromaslačne kiseline
HPLC	High performance liquid chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
ICH	International Conference on Harmonisation	Međunarodna konferencija o harmonizaciji
L-Leu	L-Leucine	L-leucin
L-Phe	L-Phenylalanine	L-fenilalanin
L-Tyr	L-Tyrosine	L-tirozin
LoD	Limit of detection	Granica detekcije
LoQ	Limit of quantitation	Granica kvantifikacije
MS	Mass spectrometry	Spektrometar masa
MSTFA	*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	*N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamid

Ph. Eur.	European Pharmacopoeia	Europska farmakopeja
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluorooctena kiselina
TFAA	Trifluoroacetic anhydride	Anhidrid trifluorooctene kiseline
TFE	2,2,2-trifluoroethanol	2,2,2-trifluoroetanol
TMS	Trimethylsilyl group	Trimetilsililna skupina