Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom

Sertić, Miranda

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:106148

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Miranda Sertić

ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U LIJEKOVIMA KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 18. srpnja 2016. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Renata Jurišić Grubešić

   Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. Prof. dr. sc. Biljana Nigović

   Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, znan. savj.

   PLIVA Hrvatska d.o.o. Zagreb

Rad ima 84 lista.

PREDGOVOR

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Na odabir teme završnog specijalističkog rada utjecala je prvenstveno izrada mog doktorskog rada na temu razvoja novih analitičkih metoda za analizu statina u aktivnim farmaceutskim supstancijama, gotovim farmaceutskim oblicima te dodacima prehrani. Tijekom izrade doktorskog rada susrela sam se s izazovima i problemima tehnike kapilarne elektroforeze koja u analizi onečišćenja lijekova mora osigurati dovoljnu osjetljivost. Stoga sam željela proširiti svoje znanje upravo na ovom području i vidjeti koje se danas mogućnosti nude u poboljšanju osjetljivosti, ali isto tako u osiguranju razdvajanja te kvalitativne i kvantitativne analize onečišćenja u lijekovima primjenom tehnike kapilarne elektroforeze.

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Biljani Nigović, na svesrdnoj podršci i svim stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada. Također joj se zahvaljujem na znanju koje mi je nesebično prenosila sve ove godine, kao i na potporu koju mi pruža, kako u radu, tako i u životu.

Zahvaljujem svojim roditeljima na podršci, ljubavi i pomoći koju mi pružaju od prvog dana!

Zahvaljujem svome suprugu i svojoj djeci na potpori koju su mi pružili, na strpljenju i odricanju na koje su bili spremni, i na ljubavi koju dijelimo! Bez vas ovo sve ne bi imalo smisla!

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je dobiti uvid u regulatorne zahtjeve za kontrolu onečišćenja u lijekovima kao i mogućnostima njihovog ispitivanja u lijekovima primjenom tehnike kapilarne elektroforeze. Naglasak bi bio stavljen na najveći izazov u određivanju onečišćenja u lijekovima tehnikom kapilarne elektroforeze, problem osjetljivosti.

MATERIJALI I METODE

U ovom teorijskom specijalističkom radu korištena je relevantna znanstvena i stručna literatura koja obrađuje problematiku ispitivanja onečišćenja u lijekovima. Korišteni su udžbenici, mrežne stranice te znanstvena i stručna literatura koja obrađuje tehniku kapilarne elektroforeze s posebnim naglaskom na određivanje onečišćenja u lijekovima i različitim načinima poboljšanja osjetljivosti metode.

RASPRAVA

Onečišćenje je svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar ili svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u samom proizvodu. ICH smjernice propisuju dopuštene granice za onečišćenja u farmaceutskim proizvodima.

Za ispitivanje onečišćenja u lijekovima koristi se i kapilarna elektroforeza kao nova separacijska tehnika s nizom prednosti pred uobičajenim analitičkim tehnikama, poput *on-line* separacije, identifikacije i kvantifikacije analita, visoke učinkovitosti, niskih troškova održavanja, ekološke prihvatljivosti. Tehnika ima i neke nedostatke, posebice slabiju osjetljivost, što predstavlja izazov u analizi onečišćenja. Najčešće se problem osjetljivosti

riješava primjenom odgovarajućih kapilara, odabirom primjerenog detektora te *on-line* tehnikama ukoncentriravanja analita.

ZAKLJUČAK

Uz takve pristupe koji poboljšavaju osjetljivost metode kao najvećeg izazova u analizi onečišćenja, kapilarna elektroforeza svakako može biti tehnika izbora, komplementarna tehnici tekućinske kromatografije za ispitivanje onečišćenja u lijekovima.

SUMMARY

OBJECTIVES

Objective of this research is to get an overview of regulatory demands on control of impurities in medicines, as well as possibilities on determination of impurities in pharmaceuticals by capillary electrophoresis. The emphasis would be on the biggest challenge in impurities determination by capillary electrophoresis, the issue of sensitivity.

MATERIALS AND METHODS

In this theoretical specialist thesis, relevant scientific and professional literature that deals with issues of impurities in pharmaceuticals was used. Textbooks, web pages, scientific and professional papers on capillary electrophoresis were also used, with special emphasis on impurities determination and different approaches on improvement of method sensitivity.

DISCUSSION

Impurity is any component of the new drug substance that is not the chemical entity defined as the new drug substance and any component of the new drug product that is not the drug substance or an excipient in the drug product. ICH guidelines prescribe limits for impurities in pharmaceutical products.

For determination of impurities in pharmaceuticals, capillary electrophoreis is used as a new separation technique with numerous advantages over usual analytical techniques, such as on-line separation, identification and quantification of analytes, high efficiency, and low maintenance cost, ecological friendliness. Technique does have sensitivity challenges, which are addresses by the use of the appropriate capillary and detector, and different on-line preconcentration techniques.

CONCLUSION

With such approaches thath enchance method sensitivity as the biggest challenge in determination of impurities, capillary electrophoresis can be the technique of choice, complementary to liquid chromatography technique for determination of impurities in pharmaceuticals.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 3
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI 4
3. 1. Onečišćenja u lijekovima 4
3.1.1. Podrijetlo i vrste onečišćenja 5
3.1.2. Granice izvještavanja identifikacije i kvalifikacije onečišćenja 10
3.1.3. Analitičke tehnike u ispitivanju čistoće lijeka 14
3.2. Kapilarna elektroforeza 16
3.2.1. Načela tehnike kapilarne elektroforeze 18
3.2.2. Elektroosmotski tok 20
3.2.3. Vrste kapilarne elektroforeze 28
4. RASPRAVA 34
4.1. Kapilare 34
4.1.1. Povećanje osjetljivosti izborom tipa kapilare 37
4.2. Mogućnosti detekcije 42
4.3. *On-line* ukoncentriravanje 46
4.4. Odabrani primjeri određivanja onečićenja u lijekovima primjenom kapilarne elektroforeze 53
4.4.1. Određivanje ciklosporina A i glavnih razgradnih produkata 53
4.4.2. Određivanje imatinib mesilata i njegovih onečišćenja 56
4.4.3. Određivanje tobramicina i srodnih tvari 60
4.4.4. Analiza heparina i njegovih onečišćenja 62
5. ZAKLJUČAK 67
6. LITERATURA 69
7. POPIS KRATICA 73
8. ŽIVOTOPIS 75

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Onečišćenje je svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar ili svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u samom proizvodu. Kako je za lijek, pored njegove učinkovitosti, najvažnija sigurnost same primjene i kvaliteta proizvoda, danas se u farmaceutskoj industriji velika pozornost pridodaje upravo ispitivanju profila čistoće lijeka, odnosno detekciji, identifikaciji, određivanju strukture i kvantitativnom određivanju onečišćenja u lijekovima. Onečišćenja u lijekovima nisu poželjna, i njihova se prisutnost nastoji isključiti u potpunosti, ili ograničiti na najmanju moguću količinu. Naime, onečišćenja mogu imati neželjene farmakološke učinke, uzrokovati nuspojave, biti toksična, mijenjati aktivnost ili stabilnost ljekovite tvari, mogu utjecati na bioraspoloživost ili učinkovitost samog lijeka, a također mogu utjecati na rezultate analitičkih postupaka. Osiguranje kakvoće lijeka odgovornost je proizvođača, no i regulatorna tijela moraju također kontrolirati kakvoću lijeka, kako bi se osigurala zaštita pacijenta, odnosno na tržište stavio djelotvoran, siguran i kvalitetan lijek. Stoga se danas u skladu sa sve većim zahtjevima u kontroli kakvoće i određivanju onečišćenja, razvijaju nove analitičke metode kako bi zadovoljile potrebe regulatornih tijela i industrije, a pacijenti opskrbili kvalitetnim, sigurnim i djelotvornim lijekovima.

Istraživanje u okviru ovog rada uključuje pregled literature iz područja razvoja novih analitičkih metoda za ispitivanje onečišćenja u različitim lijekovima, i to primjenom tehnike kapilarne elektroforeze, kao nove separacijske tehnike, koja nudi niz prednosti pred uobičajenim analitičkim tehnikama, poput *on-line* separacije i identifikacije te kvantifikacije analita, kratkog vremena analize, visoke učinkovitosti, različitih mehanizama razdvajanja, mogućnosti analize svih vrsta analita, potrebnih vrlo malih količina uzoraka i otapala, niskih troškova održavanja, automatiziranosti tehnike i ekološke prihvatljivosti. Kako tehnika ima i neke nedostatke, posebice slabiju osjetljivost, što svakako predstavlja izazov u analizi

onečišćenja u lijekovima, budući da se oni očekuju u vrlo malim količinama, u radu će također biti navedeni načini povećanja osjetljivosti metode. Također će biti detaljno opisani odabrani primjeri određivanja onečišćenja u lijekovima primjenom tehnike kapilarne elektroforeze.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u ovom teorijskom specijalističkom radu je dobiti uvid u regulatorne zahtjeve za kontrolu onečišćenja u lijekovima kao i u mogućnosti njihovog ispitivanja u lijekovima primjenom tehnike kapilarne elektroforeze. Naglasak bi bio stavljen na najveći izazov u određivanju onečišćenja u lijekovima tehnikom kapilarne elektroforeze, problem osjetljivosti. Bit će navedene mogućnosti poboljšanja osjetljivosti kapilarnoelektroforetskih metoda, kao i odabrani primjeri određivanja onečišćenja u lijekovima primjenom tehnike kapilarne elektroforeze.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3. 1. Onečišćenja u lijekovima

Onečišćenje u lijekovima je, prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), definirano kao svaki sastojak nove ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao nova ljekovita tvar (1) ili svaki sastojak novog farmaceutskog proizvoda (gotovog lijeka) koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u samom proizvodu (gotovom lijeku) (2).

Riječ je o spojevima čija se prisutnost želi isključiti ili ograničiti na najmanju moguću količinu zbog mogućeg utjecaja na djelotvornost i sigurnost primjene lijeka. Naime, onečišćenja mogu imati neželjene farmakološke učinke, uzrokovati nuspojave, biti toksični, mijenjati aktivnost ili stabilnost ljekovite tvari, mogu utjecati na bioraspoloživost ili učinkovitost samog lijeka, a također mogu utjecati na rezultate analitičkih postupaka (3,4,5).

Nažalost, farmaceutska onečišćenja su neizbježna jer niti jedna kemijska reakcija nije potpuno selektivna, niti je bilo koji kemijski spoj u svim uvjetima potpuno stabilan. Stoga se prisutnost onečišćenja u određenim granicama koncentracije smatraju prihvatljivima (6,7). Zahtjevi kvalitete lijeka definiraju prihvatljive granice za onečišćenja koja se dozvoljavaju u roku trajanja farmaceutskog proizvoda (8,9). Ipak, ispitivanje i kontrola onečišćenja, odnosno identifikacija onečišćenja, nije samo sebi svrha. Identifikacija, kvantifikacija, kvalifikacija i kontrola onečišćenja su ključan korak u razvoju lijeka. Identifikacijom potencijalnih onečišćenja, stvara se preduvjet za otkrivanjem njihovog podrijetla, a onda se može pokušati smanjiti ili, samo ponekad, u potpunosti ukloniti njihova prisustnost.

Zakonska regulativa postavlja vrlo stroge zahtjeve u osiguranju kakvoće lijeka, a ono, između ostalog, uključuje i ispitivanje čistoće lijeka, odnosno određivanje eventualno

prisutnih onečišćenja. Upravo traženje i kontrola onečišćenja osigurava kvalitetu i sigurnost lijeka, pa su i vezane analitičke aktivnosti ključne u farmaceutskoj kontroli kakvoće.

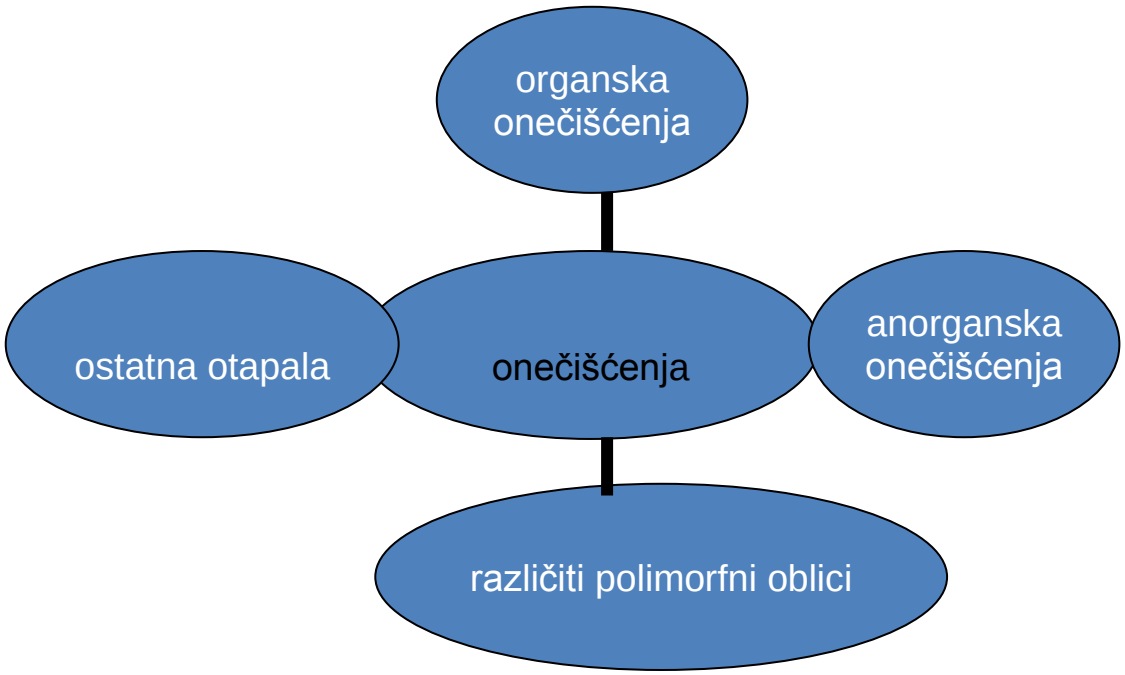
3.1.1. Podrijetlo i vrste onečišćenja

Onečišćenja u lijekovima mogu potjecati iz vrlo različitih izvora. Općenito se može reći da postoje dva osnovna tipa onečišćenja u lijekovima, ona povezana s aktivnom djelatnom tvari i onečišćenja povezana s gotovim ljekovitim oblikom, bilo da nastaju tijekom formulacije ili pak starenjem.

Onečišćenje se u ljekovitu tvar može unijeti kroz polazne sirovine, ili mogu nastati kao međuprodukti i nusprodukti tijekom proizvodnog postupka. Onečišćenja mogu nastati i kao produkti razgradnje lijeka tijekom izrade ili tijekom čuvanja i skladištenja gotovog oblika pod utjecajem svjetla, temperature, vode ili prilikom promjene pH vrijednosti. U gotovim ljekovitim onečišćenja mogu nastati i kao produkti interakcije djelatnih tvari u višekomponentnim dozirnim oblicima, kao produkti reakcija između ljekovite tvari i primarnog spremnika ili između djelatnih i pomoćnih tvari. Onečišćenjima se također smatraju i katalizatori te ostatna otapala. Ukoliko je tijekom izrade lijeka korišten prirodni produkt, onda onečišćenja mogu biti i usput ekstrahirane tvari (10).

Prema ICH smjernicama, onečišćenja se mogu podijeliti u organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala te metalna onečišćenja, s novouvedenim smjernicama (Slika 1) (11). Važeće ICH smjernice koja se odnose na onečišćenja u lijekovima i aktivnim farmaceutskim tvarima obrađuju zahtjeve za organska onečišćenja i ostatna otapala, a opisana su trima dokumentima ICH Q3A, Q3B i Q3C. Kontrola anorganskih onečišćenja temeljila se na farmakopejskim zahtjevima, najčešće ispitivanju graničnih vrijednosti za teške metale., dakle temeljila se na tehnikama vlažne kemije s upitnom osjetljivošću i mogućnošću detektiranja, i svakako bez primjene modernih

analitičkih uređaja. Takav pristup već dulje vrijeme u farmaceutskoj struci apsolutno se smatrao zastarjelim i nedostatnim. Stoga je predloženo stvaranje nove ICH Q3D smjernice koja bi osigurala harmonizirani pristup za kontrolu metala klasificiranih kao anorganska onečišćenja (7,12). Imajući na umu sigurnosti pacijenata, dugo se radilo na zahtjevima i harmonizaciji smjernica za kontrolu metalnih onečišćenja. ICH Q3D smjernice imaju tri dijela, prvi se odnosi na procjenu toksičnosti potencijalnog metalnog onečišćenja, zatim određivanje dozvoljene dnevne izloženosti (engl. *Permitted Daily Exposure*, PDE), i na kraju na primjenu procjene rizika za kontrolu metalnih onečišćenja u gotovom ljekovitom obliku. Ovaj pristup koristio bi modernu analitičku instrumentalnu tehniku ICP-MS za dobivanje kvantitativnih i specifičnih informacija o sadržaju metala u lijekovima i sirovinama.

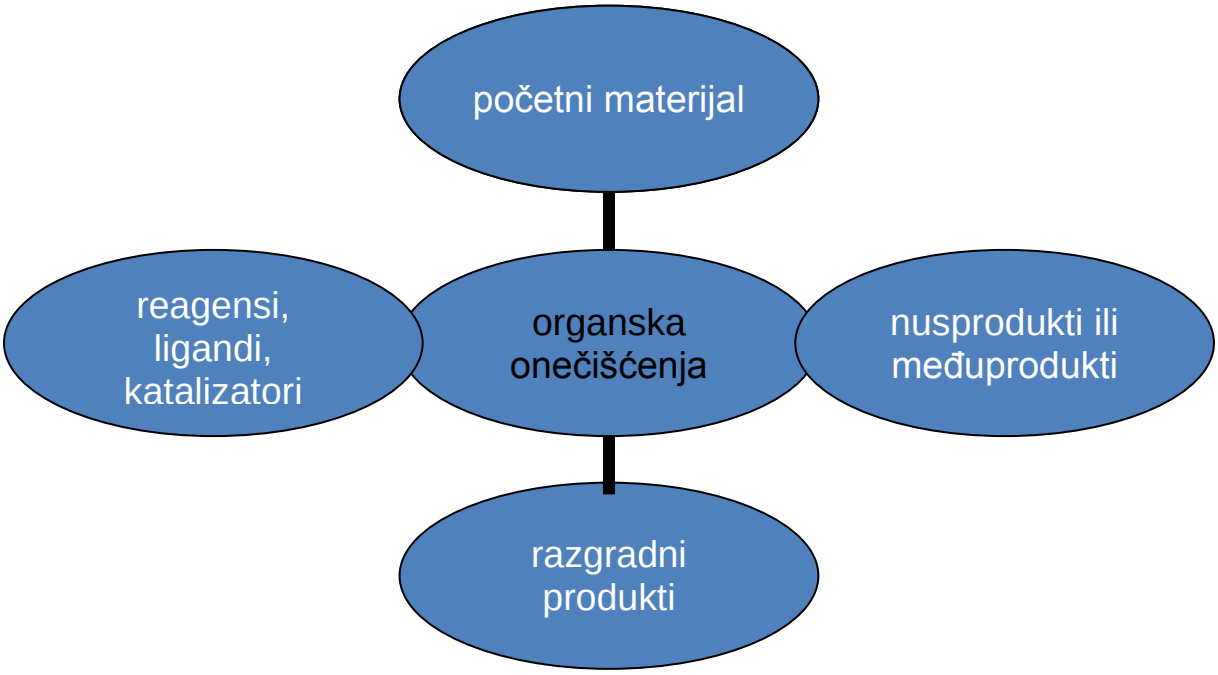


Slika 1. Klasifikacija onečišćenja.

Smjernice koje su opisane u ICH Q3B dokumentu odnose se na onečišćenja koja nastaju kao razgradni produkti ili kao nusprodukti djelatne tvari s pomoćnom tvari ili primarnim spremnikom (2). Onečišćenja koja su prisutna u novoj ljekovitoj tvari se ne moraju

pratiti ili identificirati ukoliko nije riječ o razgradnim produktima (13). Ovaj dokument ne obuhvaća onečišćenja koja potječu od ekscipijensa prisutnih u gotovom lijeku ili ekstrahiranih ili ispranih iz primarnog ili sekundarnog spremnika (14).

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa i/ili prilikom skladištenja ljekovite tvari ili farmaceutskog proizvoda. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva, a uključuju početne sirovine, nusprodukte, međuprodukte, razgradne produkte. Iako rijetko, kao onečišćenja u lijeku se mogu naći i reagensi, ligandi i katalizatori te uzrokovati brojne probleme, pa proizvođači moraju poduzeti odgovarajuće mjere opreza (Slika 2).



Slika 2. Podjela organskih onečišćenja.

Anorganska onečišćenja, tj. metalna onečišćenja, mogu potjecati iz različitih izvora i faza, a najčešće iz proizvodnog postupka farmaceutskog proizvoda. Najčešće su poznata i identificirana, a obuhvaćaju ponovno reagense, ligande i katalizatore, anorganske soli i ostale

materijale poput drvenog ugljena i tvari koje se koriste za filtraciju, poput dijatomejske zemlje, silikagela, celuloze, te teške metale i druge zaostale metale (Slika 3).

Slika 3. Podjela anorganskih onečišćenja.

Ostatna otapala su zaostale, hlapljive organske kemikalije koje se koriste u postupku proizvodnje ili nastaju u samom procesu proizvodnje. Budući da su ova onečišćenja često prisutna, otapala za koja je dokazano da su toksična trebaju se izbjegavati u proizvodnji lijeka. Ovisno o potencijalnom riziku za ljudsko zdravlje, ostatna otapala su podijeljena u 3 skupine. Prva klasa ostatnih otapala obuhvaća otapala koja se moraju izbjegavati zbog dokazane karcinogenosti ili snažne sumnje na karcinogenost kod ljudi, te otapala opasna za okoliš. Druga klasa su otapala čija upotreba treba biti ograničena uslijed moguće neurotoksičnosti, teratogenosti i drugih tipova toksičnosti. Treća klasa ostatnih otapala su

otapala niske toksičnosti i malog rizika za zdravlje ljudi. Ova otapala, prisutna u uobičajenim koncentracijama u lijekovima, ne predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. No, ne postoje studije koje su ispitale toksičnost i karcinogenost uslijed dugotrajne izloženosti ovim otapalima. Za njih je dokazano da nisu genotoksični te je uslijed akutne i kratkotrajne izloženosti toksičnost slaba ili nikakva. Za ovu skupinu otapala prihvatljiva je količina do 50 mg dnevno, odnosno 5000 ppm bez potrebe za opravdanjem. Za veće količine od ovih, potrebno je pružiti dokaz o opravdanosti i neizbježnosti u proizvodnom postupku, u skladu s Dobrom proizvođačkom praksom (*Good Manufacturing Practise*, GMP). Za treću klasu ostatnih otapala se dopuštene koncentracije određuju u skladu s Dobrom proizvođačkom praksom i drugim zahtjevima za očuvanje kvalitete.

Tijekom proizvodnje lijeka i gotovog proizvoda, posebna pozornost se posvećuje eventualnom nastanku kristalizacijskih onečišćenja. Budući da svojstva lijeka ovise o njegovom kristalnom obliku, farmaceutska industrija danas provodi strogu kontrolu polimorfnih oblika. Polimorfizam je pojava iste čvrste tvari u više različitih kristalnih oblika, pa polimorfi imaju isti kemijski sastav, ali različitu molekulsku konformaciju i različit raspored unutar kristala. Stoga polimorfi imaju različita fizikalna svojstva, primjerice topljivost, tvrdoću, higroskopnost, indeks loma, entalpiju, točku taljenja, stabilnost, brzinu oslobađanja djelatne tvari i bioraspoloživost. Pseudopolimorfe karakterizira različita kristalna struktura zbog inkluzije jedne ili više molekula otapala ili vode.

Stereokemijska onečišćenja u lijekovima također se kontroliraju. Ljudski organizam je kiralna sredina, i u takvim uvjetima enantiomeri i/ili stereoizomeri mogu i imaju različitu selektivnost za receptore, enzime i proteine u procesima prijenosa i metabolizma, pa samim time i različite kemijske i farmakološke učinke te potencijalnu toksičnost (15). Iako postoje slučajevi gdje je farmakokinetika S- i R-izomera jednaka pa ne postoji prednost primjene

određenog enantiomernog oblika, sve je veća težnja za proizvodnjom enantiomerno čistog spoja koji se smatra boljim kemijskim entitetom (8).

3.1.2. Granice izvještavanja identifikacije i kvalifikacije onečišćenja

Ispitivanje profila čistoće lijeka (engl. *Impurity profiling*) je naziv za analitičke postupke kojima je cilj detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje organskih i anorganskih onečišćenja kao i ostatnih otapala u aktivnoj ljekovitoj tvari i gotovom ljekovitom obliku. Ovim postupkom se precizno određuje kvaliteta i stabilnost lijeka i gotovog ljekovitog oblika pa se ispitivanje profila čistoće smatra ključnim dijelom analize lijeka. U skladu sa sve većim zahtjevima u kontroli kakvoće i određivanju onečišćenja, razvijaju se nove analitičke metode kako bi zadovoljile potrebe regulatornih tijela i industrije, a pacijente opskrbili kvalitetnim, sigurnim i djelotvornim lijekovima (8).

Sve farmaceutske sirovine koje se koriste u proizvodnji gotovog lijeka na području Europske unije moraju odgovarati zahtjevima navedenima u monografiji Europske farmakopeje (10). Onečišćenja i razgradni produkti koji nisu opisani u monografiji, a zaostanu tijekom pripreme farmaceutske tvari uslijed primjene novog ili promijenjenog proizvodnog postupka, moraju se definirati, njihove dozvoljene granice propisati, a dobiveni rezultati dokumentirati u svrhu davanja odobrenja za stavljanje gotovog ljekovitog oblika u promet.

Zahtjevi kakvoće lijeka definiraju prihvatljive granice za dozvoljena onečišćenja u roku trajanja farmaceutskog proizvoda (16). Kako raste svjesnost o mogućim neželjenim učincima onečišćenja te njihovim potencijalnim aktivnostima, nastaju sve složeniji zahtjevi zakonske regulative koji nalažu primjenu naprednih analitičkih tehnika. Najnoviji primjer je upravo ICH Q3D dokument koji uvodi potpuno nove analitičke tehnike i postupke te dopuštene koncentracije za teške metale u gotovim ljekovitim oblicima.

ICH smjernice postavljaju pragove (engl. *Threshold limits*) ispod kojih nije potrebno izvještavanje o prisutnim onečišćenjima (prag izvještavanja), strukturna karakterizacija onečišćenja (prag identifikacije) ili procjena biološke sigurnosti onečišćenja (prag kvalifikacije). Propisani pragovi za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja ovise o maksimalnoj dnevnoj dozi lijeka. Pragovi izvještavanja odnose se na razinu iznad koje je potrebno priložiti izjavu o onečišćenjima, koja uključuje njihov točan postotak i metodu analize kojom su određeni. Za onečišćenja koja prelaze prag identifikacije, potrebna je strukturna karakterizacija tih onečišćenja, a za onečišćenja koja prelaze prag kvalifikacije, zahtijeva se procjena njihove biološke sigurnosti. Propisani pragovi prikazane su u Tablici 1. Maksimalna dnevna doza je količina ljekovite tvari koja se unese u organizam u jednom danu. Ako onečišćenje ima farmakološki učinak ili je toksično, moguće je postaviti niže pragove izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije, dok je za viši prag izvještavanja potrebno priložiti odgovarajući znanstveni dokaz koji to opravdava. Ukoliko je dnevna doza aktivne tvari veća od 2 g, potrebna je karakterizacija kemijske strukture za onečišćenje prisutno u količini većoj od 0,05 %.

Propisani pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije za razgradne produkte u novom ljekovitom proizvodu prikazane su u Tablici 2. Pragovi za razgradne produkte izraženi su ili kao postotak ljekovite tvari ili kao ukupni dnevni unos (engl. T*otal Daily Intake*, TDI) razgradnog produkta. Za iznimno toksične razgradne produkte pragovi su niži, dok primjena viših pragova mora biti znanstveno opravdana.

Tablica 1. Propisani pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije za onečišćenja

Maksimalna dnevna doza	*Prag izvještavanja*	*Prag identifikacije*	*Prag kvalifikacije*
≤ 2 g	0,05%	0,10% ili 1,0 mg/dan unosa *	0,15% ili 1,0 mg/dan unosa *
› 2 g	0,03%	0,05%	0,05%

*ovisno koja je vrijednost niža

Tablica 2. Pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije za degradacijske produkte

maksimalna dnevna doza	prag izvještavanja	prag identifikacije	prag kvalifikacije
‹1 mg	0,1%	1,0% ili 5 µg TDI *	1,0% ili 50 µg TDI
1-10 mg	0,1%	0,5% ili 20 µg TDI	1,0% ili 50 µg TDI **
10-100 mg	0,1%	0,2% ili 2 mg TDI	0,5% ili 200µg TDI
100 mg - 1g	0,1%	0,2% ili 2 mg TDI	0,2% ili 3 mg TDI
1-2 g	0,05%	0,2% ili 2 mg TDI	0,2% ili 3 mg TDI
›2 g	0,05%	0,10%	0,15%

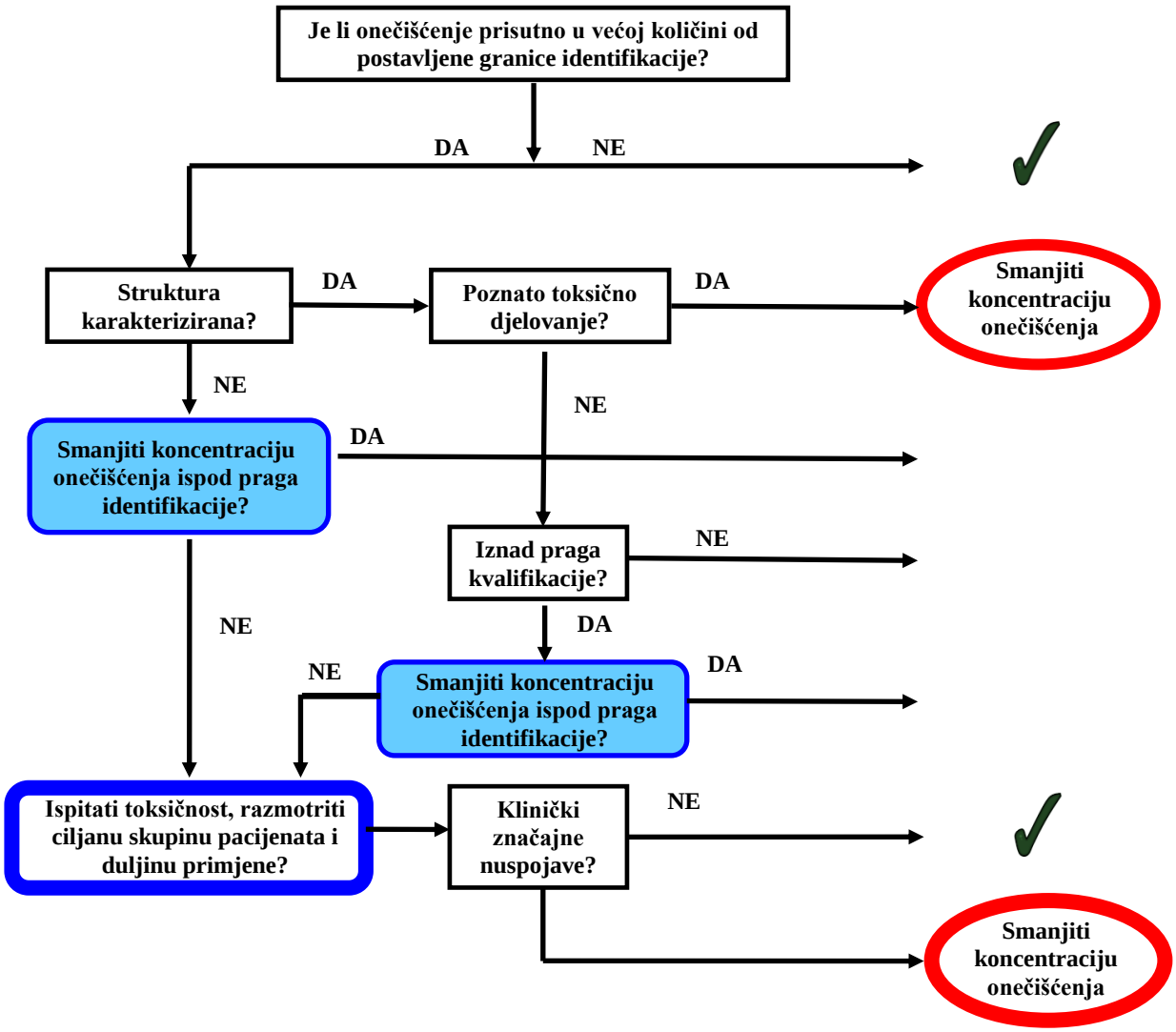
* TDI – ukupni dnevni unos

** prag kvalifikacije za maksimalnu dnevnu dozu od 10 mg iznosi 0,5% ili 200 µg TDI

Kvalifikacija onečišćenja je proces prikupljanja i procjene podataka koji utvrđuju biološku sigurnost pojedinog onečišćenja. ICH smjernice daju "stablo odluke" (engl. *Dicision Tree*) o identifikaciji i kvalifikaciji onečišćenja prisutnih u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji

koje razmatra postupke ukoliko su prijeđene vrijednosti pragova identifikacije i kvalifikacije (Slika 4).

Kontrola onečišćenja prema ICH smjernicama mora obuhvatiti te navesti u specifikacijama svako nepoznato i poznato organsko onečišćenje, svako nepoznato organsko onečišćenje pronađeno u količini iznad postavljenog praga identifikacije strukturno karakterizirati, navesti ukupna organska onečišćenja, kojih ne smije neidentificiranih zajedno biti više od 0,5 % te anorganska onečišćenja i ostatna otapala.



Slika 4. „Stablo odluke“ za identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja.

3.1.3. Analitičke tehnike u ispitivanju čistoće lijeka

Razvoj novog lijeka nužno zahtijeva pouzdane i konkretne analitičke podatke svih koraka razvoja i proizvodnje lijeka. Ispitivanje sigurnosti lijeka zahtijeva ispunjavanje postavljenih standarda čistoće samog kemijskog spoja, ali i toksikoloških studija na životinjama. Osim toga, stabilnost lijeka mora biti postojana sve do propisanog roka primjene. Svi ovi zahtjevi nužno trebaju analitičku metodologiju koja je dovoljno osjetljiva da mjeri niske koncentracije onečišćenja. Stoga je razvoj analitičkih metoda išao prema granicama identifikacije i određivanja i nižima od mikrogramskih vrijednosti. Osnovni preduvjet analitičke metode za praćenje onečišćenja je mogućnost da razlikuje pojedine analite od interesa. Za identifikaciju onečišćenja mogu se koristiti referentne standardne metode, spektroskopske metode, separacijske metode, izolacijske metode i metode karakterizacije (3, 11). Pri tome ključnu ulogu imaju spektroskopske i separacijske tehnike, ili njihova kombinacija.

Od spektroskopskih tehnika moguće je primijeniti ultraljubičastu i vidljivu spektrofotometriju, infracrvenu spektrofotometriju, nuklearnu magnetsku rezonantnu spektrometriju i masenu spektrometriju.

Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija, pogotova ona pri samo jednoj valnoj duljini, osigurava minimalnu selektivnost analize. Danas dostupni detektori, poput detektora niza dioda, daju i cijeli UV-vis spektar analita, što omogućuje veću selektivnost analize.

Infracrvena spektrofotometrija daje specifične informacije o nekim funkcionalnim skupinama analita. Selektivnost metode je iznimna, pogotovo u području otiska prsta (engl. *fingerprint*) koje ima veliku osjetljivost položaja maksimuma vrpce na vrlo male promjene u strukturi. Kvantitativno određivanje je moguće ovom tehnikom, ali vrlo rijetko se primjenjuje te je moguće detektirati samo veliku količinu onečišćenja u uzorku (10).

Nuklearna magentska rezonantna spektroskopija pruža detaljne strukturne informacije o molekuli, pa je vrlo korisna tehnika izbora za karakterizaciju onečišćenja. Uz rendgensku strukturnu analizu, smatra se najmoćnijom tehnikom za pouzdano određivanje molekulske strukture. S druge strane, glavno ograničenje primjene ove metode je visoka cijena, sofisticiranost, ali i činjenica da je tehnika slabo osjetljiva, odnosno da traži veću količinu uzorka, što kod onečišćenja predstavlja izazov.

Masena spektrometrija pruža izvrsnu strukturnu informaciju, i svakako je tehnika izbora, u kombinaciji s kromatografskim tehnikama, za identifikaciju tragova onečišćenja, kao i njihovu karakterizaciju, u ljekovitim i pomoćnim tvarima. U rutinskoj kontroli kakvoće se još uvijek ne koristi, ponajprije zbog visoke cijene i zahtjevnosti same tehnike.

Osim spektroskopskih metoda, u analitici lijekova, a posebno u ispitivanju onečišćenja, koriste se separacijske tehnike. Danas postoji nekoliko separacijskih tehnika: tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC), plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC), kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Eelectrophoresis*, CE) i superkritična fluidna kromatografija (engl. Supercritical Fluid Chromatography, SFC). Sve su navedene tehnike, kromatografske tehnike, osim kapilarne elektroforeze, budući da glavni princip tehnike nije razdvajanje između dvije faze (što je preduvjet kromatografskog sustava). CE je elektroforetska separacijska tehnika, ali se u pravilu uvijek svrstava u ovu skupinu zbog mnogih zajedničkih obilježja.

Tehnika izbora u ispitivanju onečišćenja lijekova je svakako tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. U pravilu, u farmakopejskim metodama, ova tehnika dolazi uz primjenu DAD detektora. No potrebno je istaknuti da su upravo spregnute tehnike (LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS) najmoćnije za identifikaciju, strukturnu karakterizaciju i kvantitativno određivanje onečišćenja.

3.2. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (CE) je farmakopejska tehnika. Prvi put se javlja u četvrtom izdanju Europske farmakopeje (Ph. Eur. 4. izdanje). U farmaceutskoj industriji se, za razliku od tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), ne koristi u rutinskim svakodnevnim analizama, no njezina primjena u farmaciji je ipak vrlo široka. Upravo zahvaljujući već navedenim različitim vrstama tehnike, odnosno mehanizmima razdvajanja, moguće je analizirati sve vrste analita, od malih organskih molekula, iona i neutralnih molekula do velikih biomakromolekula, poput DNA i proteina, a rezultati su prikazani elektroferogramom.

Kapilarna elektroforeza se koristi za analizu različitih ljekovitih oblika, tableta, kapsula, krema, injekcijskih otopina, ali i složenih uzoraka poput bioloških tekućina i tkiva, otpadnih voda, stočne hrane i biljnih materijala (17). Upravo je primjena mogućnosti različitih kapilarnoelektroforetskih metoda na ovakvim složenim uzorcima bez prethodne znatnije predobrade uzorka još jedna prednost kapilarne elektroforeze.

U analitici lijekova kapilarna elektroforeza koristi se prvenstveno kao brza i jednostavna metoda za točno i precizno određivanje sadržaja aktivnih farmaceutskih supstancija u svim vrstama ljekovitih oblika. Zbog visoke moći razlučivanja koristi se za određivanje profila čistoće lijekova. Uspješno se primjenjuje u analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (urin, plazma, serum, likvor) i tkivima. Najveću prednost kapilarna elektroforeza iskazuje u analizi peptidnih lijekova i proteina. Zahvaljujući jednostavnoj primjeni kiralnih selektora, selektivna je i djelotvorna tehnika u odjeljivanju enantiomera i određivanju enantiomerne čistoće. Primjenom afinitetne kapilarne elektroforeze, moguće je proučavati biomolekularne interakcije i odrediti stupanj vezanja lijeka za proteine plazme, što je važno u farmakokinetici i bioraspoloživosti lijeka.

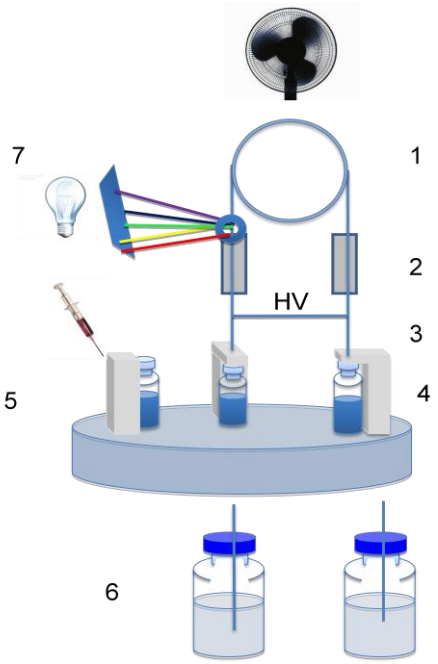
Najzastupljenije su kapilarna zonska elektroforeza (CZE) i micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC). Kapilarna zonska elektroforeza koristi se za određivanje djelatne tvari u ljekovitom obliku, za provjeru čistoće, određivanje onečišćenja, farmakokinetičke studije, identifikaciju i određivanje metabolita lijekova u biološkim uzorcima itd. Micelarna elektrokinetička kromatografija se koristi za analizu nabijenih i nenabijenih analita i za širok raspon tvari s hidrofilnim ili hidrofobnim karakteristikama (aminokiseline, nukleotidi, vitamini, velik broj lijekova, aromatski ugljikovodici, eksplozivne tvari...). U farmaciji se MEKC uspješno koristi za određivanje aktivnih tvari i onečišćenja u tabletama (18), kremama i injekcijskim formulacijama (19). Primjenjuje se za određivanje lijeka (vrlo često hidrofobnog) i njegovih polarnih metabolita u biološkim uzorcima (20) te za stabilitetne studije (21).

Tehnika se također koristi i za razdvajanje anorganskih iona i organskih kiselina, za što se tradicionalno koristila ionska kromatografija. U tom je slučaju potrebna indirektna UV-detekcija zbog nedostatka kromofora kod takvih analita. Indirektna UV-detekcija se izvodi na način da se u radni pufer dodaju tvari koje jako apsorbiraju u UV-području, kao što su kromati ili imidazoli, pa im se prati apsorbancija pri valnoj duljini njihova apsorpcijskog maksimuma. Ioni analita izguraju ione kromata pa dolazi do pada apsorbancije kromata kada zone analita stignu do detektora.

Osim u famaciji, kapilarna se elektroforeza koristi u molekularnoj biologiji, genetici, biokemiji, mikrobiologiji, virologiji i forenzici. U biotehnologiji je zamijenila tradicionalnu elektroforezu u gelu za analizu DNA, RNA, proteina i ugljikohidrata. U analizi biomakromolekula koristi se najčešće kapilarna gel elektroforeza. Primjenjuje se za određivanje slijeda nukleotida, utvrđivanje mutacija, u proizvodnji antisense oligonukleotida i analizi dijagnostičkih i terapijskih DNA molekula.

3.2.1. Načela tehnike kapilarne elektroforeze

Osnovno načelo tehnike kapilarne elektroforeze je migracija električki nabijenih čestica u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (10-30 kV). Kapilara je ispunjena elektrolitnom otopinom pufera, otopinom pufera koja sadrži polimere koji povećavaju viskoznost otopine ili gelom. Iz samog naziva tehnike očito je da upravo kapilara ima temeljnu ulogu. O kapilari ovisi učinkovitost razdvajanja, razlučivanje i obilježja signala te odaziva detektora. Kapilare mogu biti duljine od 10 do 110 cm, unutarnjeg promjera od 50 do 300 μm. Najčešće se koriste kvarcne kapilare tankih stijenki, ali mogu se izrađivati i od fluorirane ugljikovodične smole. Krajevi kapilare su uronjeni u otopinu elektrolita, a preko elektroda iz električnog izvora se uspostavlja električni napon koji uzrokuje električno polje kroz kapilaru (9, 10, 22, 23). Shema instrumenta kapilarne elektroforeze prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu: termostatirana kapilara (1), dvije elektrode (2), visokonaponski izvor istosmjerne struje (3), ulazni/izlazni spremnik za pufere (4), sustav za unošenje uzorka (5), sustav za izmjenu pufera (6), detektor (7).

Razdvajanje analita u kapilarnoj elektroforezi temelji se na različitim brzinama kojima čestice putuju kroz kapilaru, a opisano je izrazom:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E$$

gdje je v_{ep} brzina putovanja iona, μ_{ep} je elektroforetska pokretljivost čestice, a E je jakost primijenjenoga električnog polja.

Elektroforetska pokretljivost čestice (μ_{ep}) definirana je izrazom:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

gdje je q naboj čestice, r polumjer čestice (Stokesov polumjer), a η viskoznost otopine elektrolita, dok jakost primijenjenoga električnog polja (E) ovisi o primijenjenom naponu i duljini kapilare:

$$E = \frac{V}{L}$$

gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L duljina kapilare u cm.

Povezivanjem svih jednadžbi, dobije se izraz za brzinu putovanja analita:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \frac{q}{6\pi\eta r} \cdot \frac{V}{L}$$

Iz navedenih jednadžbi vidljivo je da će analiti unutar kapilare putovati različitom brzinom, koja ovisi o njihovim svojstvima, kao i o duljini kapilare i primijenjenom naponu. Što je naboj čestice veći, a ionski radijus manji, brzina analita je veća. Brzina je nadalje proporcionalna jačini primijenjenog električnog polja, odnosno primijenjenog napona, a obrnuto proporcionalna duljini kapilare.

Važno je također naglasiti da, za razliku od kromatografije gdje se koristi pojam vrijeme zadržavanja, u kapilarnoj elektroforezi se u kapilari ništa ne zadržava (osim u kapilarnoj elektrokromatografiji), pa se govori o pojmu *vrijeme migracije*. To je vrijeme potrebno da otopljeni analit od početka kapilare dođe do mjesta detektora u kapilari. Detekcija u kapilarnoj elektroforezi se u pravilu odvija u samoj kapilari (engl. *on-line detection*), ali

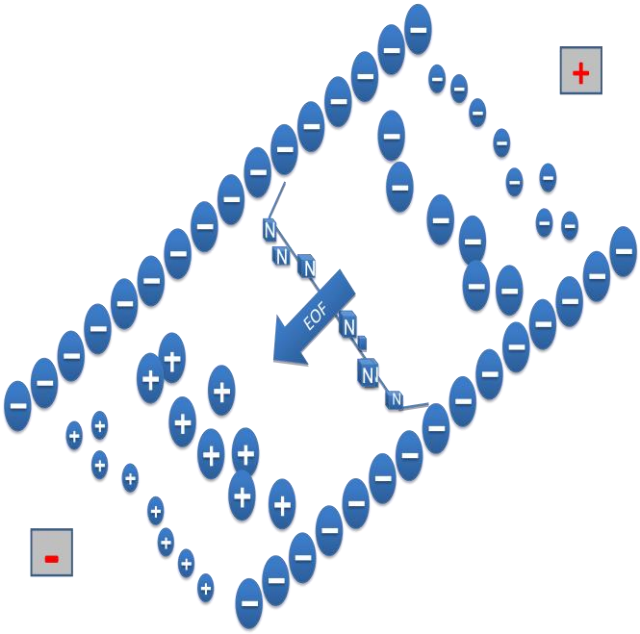
moguće su izvedbe s primjenom detektora nakon što analit prođe kroz cijelu kapilaru i izađe iz nje (primjerice maseni detektor). Stoga se kod kapilarne elektroforeze uvijek u opisu analitičke metode navodi i ukupna duljina kapilare, i efektivna duljina kapilare, odnosno duljina od početka kapilare do mjesta gdje se nalazi prozor za detektor. Dio kapilare koji se nalazi nakon detektora je ključan kako bi se ostvario električni kontakt s drugom otopinom elektrolita i elektrodom (24).

3.2.2. Elektroosmotski tok

Prema do sada spomenutim izrazima, na prvi pogled izgleda da se kapilarnom elektroforezom mogu analizirati isključivo nabijeni spojevi koji će se kretati nakon što se primijeni električno polje prema katodi ili anodi, ovisno o svom naboju. No, kapilarnom elektroforezom moguće je analizirati i neutralne spojeve. Naime, neutralni analiti će se također kretati unutar kapilare nošeni tzv. elektroosmotskim (elektroendoosmotskim) tokom (engl. *electroosmostic flow*, EOF). EOF predstavlja tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja koji se stvara na unutrašnjoj stijenci kapilare te se kaže da je to pokretačka sila u kapilarnoj elektroforezi. Unutrašnja površina stijenke (najčešće od izvučenog kvarca) sadrži brojne silanolne grupe koj,e ovisno o pH-vrijednosti elektrolita, mogu biti više ili manje ionizirane. Iako je pI silanolnih skupina kvarcne kapilare teško odrediti, zna se da EOF postaje značajan u pH vrijednostima većima od 4. Koliko je pojava elektroosmotskog toka složena, potvrđuje i činjenica da čak i kod kapilara izrađenih od neionskog materijala, poput teflona, također dolazi do stvaranja elektroosmotskog toka, ne uslijed ionizacije površinskih skupina, već zbog adsorpcije aniona na unutrašnju površinu kapilare.

Kad je kapilara ispunjena otopinom elektrolita, uz negativno nabijene silanolne skupine, elektrostatskim silama privučeni su pozitivno nabijeni ioni iz elektrolitske otopine,

čime se stvara električni dvosloj. U ovom električnom dvosloju kationi elektrolita raspoređeni su u tzv. čvrstom ili nepomičnom sloju, nakon čega slijedi difuzijski dio sloja, u kojem se javljaju i kationi i anioni. Ovakav raspored iona stvara potencijal koji ima linearan pad u čvrstom sloju i eksponencijalni pad u difuznom sloju električnog dvosloja. Upravo je ovaj eksponencijalni pad potencijala odgovoran za nastanak elektroosmoze i naziva se zeta potenacijal (ζ). Kada se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi u difuznom dijelu dvostrukog sloja bivaju privučeni prema katodi. Budući da su otopljeni, oni svojim kretanjem povlače za sobom i okolnu tekućinu, uzrokujući protok cijele otopine prema katodi, što nazivamo elektroosmotskim tokom (Slika 6). Zajedno s elektroosmotskim tokom bit će nošene i sve neutralne čestice uzorka te će koeluirati iz kapilare.



Slika 6. Elektroosmotski tok.

Kao i kod brzine kretanja nabijenih čestica, i brzina elektroosmotskog toga definirana je izrazom

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E$$

gdje je v_{EOF} brzina elektroosmotskog toka, μ_{ep} je elektroosmotska pokretljivost, a E je jakost primijenjenoga električnog polja koja ovisi o o primijenjenom naponu i duljini kapilare:

$$E = \frac{V}{L}$$

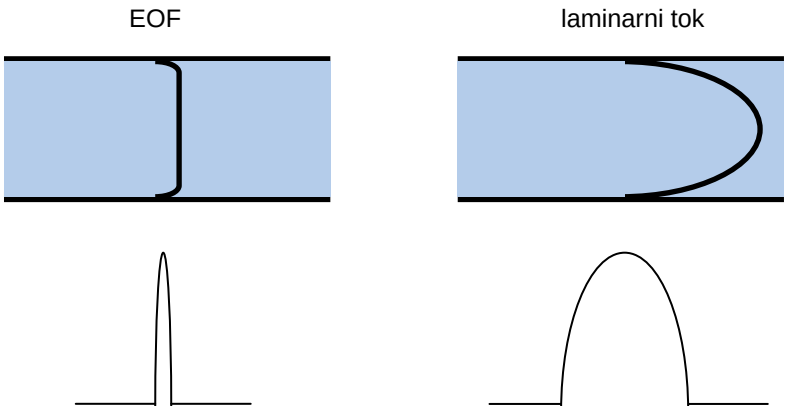
gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L duljina kapilare u cm.

Elektroosmotska pokretljivost (μ_{EOF}) definirana je izrazom:

$$v_{EOF} = \varepsilon \zeta / \eta$$

gdje je ε dielektrična konstanta, ζ zeta potencijal, a η viskoznost otopine elektrolita.

Zahvaljujući činjenici da je sila koja pokreće tok jednoliko raspoređena uzduž kapilare, odnosno uz njene stijenke, nema pada tlaka unutar kapilare, pa je tok gotovo uniforman cijelom dužinom kapilare. Stoga EOF ima jedinstvenu odliku, a to je ravan profil toka kroz kapilaru, što za posljedicu ima značajno manju disperziju zona analita, odnosno uske i oštre pikove, a time i bolje razlučivanje, odnosno veću učinkovitost same tehnike. To je jedna od prednosti kapilarne elektroforeze pred tekućinskom kromatografijom gdje se stvara laminarni ili parabolni tok do kojeg dolazi zbog primjene vanjske pumpe koja pokreće mobilnu fazu kroz sustav i kolonu, čime dolazi do trenja stijenke. Stoga kod kromatografskih pikova dolazi do širenja zona zbog različitih brzina kretanja iona iste vrste u ovisnosti o udaljenosti od unutrašnje stijenke kapilare (Slika 7).



Slika 7. Ravan profil elektroosmotskog toka u kapilarnoj elektroforezi i uži pikovi, te laminarni profil toka u kromatografiji i posljedično širi kromatografski pikovi.

Još jedna prednost elektroosmotskog toka je da uzrokuje kretanje svih analita u istom smjeru, neovisno o naboju. Pod normalnim uvjetima, odnosno uz uvjet da se radi o negativno nabijenoj površini kapilare i da se negativno nabijena elektroda, katoda, nalazi na detektorskom dijelu kapilare, a pozitivno nabijena elektroda, anoda, na injektorskom kraju, elektroosmotski tok je usmjeren od anode prema katodi. Anioni, iako bi zbog svog negativnog naboja trebali putovati prema pozitivno nabijenoj anodi na injektorskom kraju kapilare, također će putovati prema katodi, jer je veličina elektroosmotskog toka za više od jednog reda veličine veća od njihove elektroforetske pokretljivosti. Zahvaljujući tome, kationi, neutralne molekule i anioni mogu se analizirati istovremeno jer se svi kreću u istom smjeru. Kationi putuju najbrže jer su njihovo elektroforetsko privlačenje i EOF usmjereni u istom smjeru, tj. prema katodi. Neutralne molekule nošene su brzinom elektroosmotskog toka, ali se ne razdvajaju jedne od drugih. Anioni putuju najsporije jer su privučeni prema anodi, ali svejedno putuju prema katodi nošeni elektroosmotskim tokom. Utjecaj elektroosmotskog toka na vrijeme zadržavanja čestice u kapilari, ovisno o tome da li se njegova elektroosmotska pokretljivost pridodaje ili oduzima elektroforetskoj pokretljivosti čestice, može se opisati izrazom:

$$t = \frac{L}{v_{ep} \pm v_{eo}} = \frac{L^2}{(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})V}$$

gdje je t vrijeme putovanja čestice cijelom dužinom kapilare, L duljina kapilare, ν_{ep} brzina putovanja analita, ν_{EOF} brzina elektroosmotskog toka, μ_{ep} elektroforetska pokretljivost analita, μ_{ep} elektroosmotska pokretljivost, a V primijenjeni napon.

No, elektroosmotski tok, iako glavna pokretačka sila u kapilarnoj elektroforezi i bez obzira na gore iznesene prednosti, ima i svoje nedostatke. Naime, elektroosmotski tok se tijekom uzastopnih analiza mijenja uslijed adsorpcije ispitivanih tvari na unutrašnju stijenku kapilare. Zbog toga je vrlo često tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode potrebno, između ostalog, optimizirati i ispiranja kapilare između dva mjerenja, kako bi se na

taj način osigurala reproducibilnost metode i spriječilo čak i moguće začepljivanje te pucanje kapilare.

Elektroosmotski tok ovisi o dielektričnoj konstanti pufera, zeta potencijalu, viskoznosti pufera te primijenjenom električnom polju. Potrebno je pri tome istaknuti da elektroosmotska pokretljivost ne ovisi o jakosti primijenjenog električnog polja. Postoji nekoliko načina na koji se EOF može kontrolirati, odnosno mijenjati, pri čemu treba voditi računa i o tome utječe li se i na svojstva, odnosno elektroforetsko ponašanje i samog analita.

Kako je već rečeno, stupanj ionizacije silanolnih skupina, odnosno površinski naboj kapilare, snažno ovisi o pH vrijednostima, stoga je to vrlo često prvi parametar koji se odabire i optimizira tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode. Većina metoda koristi pufere visoke vrijednosti pH (9-9,5) pri čemu su silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci kapilare u velikoj mjeri ionizirane, stvara se vrlo snažan zeta potencijal i gusti električni dvosloj. Sve to rezultira vrlo velikim elektroosmotskim tokom, odnosno kraćom analitičkom metodom. Iako je poželjno da svaka analitička metoda traje što kraće, ne može se uvijek koristiti najsnažniji, odnosno najbrži EOF zbog toga što možda nije osigurano razdvajanje svih analita. Osim toga, odabir pH utječe i na stupanj ionizacije samog analita te na njegovu elektroforetsku pokretljivost. S druge strane, pri niskim vrijednostima pH može doći do adsorpcije kationa na unutrašnju stijenku kapilare uslijed Coulombovih elektrostatskih interakcija (25).

EOF se također može mijenjati promjenom vrste, odnosno koncentracije i ionske jakosti pufera.

Već spomenuti zeta potencijal može se opisati izrazom

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon}$$

gdje je δ debljina električnog dvosloja ili Debye ionski radijus, e je ukupni višak

naboja u otopini po jedicni površine, a ε je dielektrična konstanta pufera.

Debljina električnog dvosloja proporcionalna je broju valentnih elektrona i korijenu vrijednosti koncentracije pufera. Povećanjem ionske jakosti pufera, zeta potencijal i EOF se smanjuju. To je potvrđeno i eksperimentalno za različite tipove pufera, pri čemu je pokazano da EOF linearno ovisi o kvadratu prirodnog logaritma koncentracije pufera.

Tijekom provođenja analize, preniske koncentracije pufera moraju se izbjegavati kako ne bi došlo do adsoprcije analita na unutrašnju stijenku kapilare uslijed elektrostatskih interakcija. No, previsoke koncentracije pufera za posljedicu imaju veću provodnost pufera, odnosno veću jakost struje uz konstantant napon, pa se oslobađa više topline, odnosno dolazi do zagrijavanja unutar kapilare i produžuje se vrijeme analize. Iako je pri većoj ionskoj jakosti pufera brzina kretanja analita manja, eksperimentalno je pokazano da su pri takvim uvjetima bolje definirane i razdvojene zone između pojedinih analita, što pridonosi većoj učinkovitosti metode.

Unutrašnju stijenku kapilare moguće je modificirati dinamičkim (dodatkom aditiva u pozadinski pufer) ili kovalentnim vezanjem ili adsorpcijom različitih polimera. Na ovaj način EOF se može ubrzati, usporiti, promijeniti mu smjer (dodatkom kovalentnih grupa na unutrašnju stijenku kapilare), ili potpuno eliminirati (primjerice, pomoću poliakrilamida ili polietilenglikola). Ovakve kovalentne modifikacije su trajne, ali nisu stabilne. Pretpostavka je da će se s vremenom na tržištu pojaviti različite kapilare prevučene određenim slojevima, kao što danas na tržištu već postoje LC i GC kolone.

Najjednostavniji način na koji se može smanjiti EOF je promjena električnog polja, odnosno primijenjenog napona na krajevima kapilare. No, ovo je parametar koji se mijenja među zadnjima tijekom razvoja nove metode, nakon što je osigurano razdvajanje svih analita. Kako je ovisnost elektroosmotskog toka o električnom polju proporcionalna, smanjenjem primijenjenog napona, usporit će se EOF. To će sigurno dovesti do duljeg trajanja analize, ali

može dovesti i do gubitka učinkovitosti i razlučivanja među analitima. S druge stane, primjenom najvećeg mogućeg napona (kod novijih instrumenata 30 kV), ovisno o vrsti i koncentraciji pufera te eventualnom dodatku ostalih modifikatora u pozadinski pufer, može doći do Jouleovog zagrijavanja unutar kapilare. Jouleovo zagrijavanje je toplina koja se razvija u kapilari protjecanjem električne struje. Definirana je dimenzijama (duljinom i promjerom) kapilare, provodljivosti elektrolita, odnosno pozadinskog pufera te primijenjenim naponom. Jouleovo zagrijavanje potrebno je izbjegavati zbog dva razloga. Prvi je moguća degradacija analita uslijed njegove termolabilnosti. No, veći problem predstavlja nastajanje radijalnog temperaturnog gradijenta unutar kapilare. Kako formiranje ovog gradijenta ovisi o samim materijalima, problem će biti objašnjen na primjeru kvarca, od koje su kapilare najčešće izrađene, i vode kao osnove pozadinskog pufera. Kvarc ima manju toplinsku otpornost od vode, što znači da lakše rasipa odnosno odvodi toplinu koja nastaje uslijed protoka struje kroz kapilaru. Stoga je uz stijenke kapilare temperatura niža nego u njezinom središtu, čime se formira radijalni gradijent viskoznosti pozadinskog pufera. Uslijed tako formiranog gradijenta, zone odijeljenih analita se neće kretati istom brzinom u središtu kapilare, gdje pozadinski pufer ima manju viskoznost, i uz njezine stijenke, gdje pufer ima veću viskoznost. Zbog toga dolazi da širenja zona te na kraju do gubitka učinkovitosti i razlučivanja (25). Današnji instrumenti nude mogućnost hlađenja zrakom tijekom analize i održavanja temperature kapilare konstantnom. Kako bi se spriječilo stvaranje previsokih struja unutar kapilare, moguće je i programsko ograničenje vrijednosti koja se može u kapilari razviti, pri čemu će doći do smanjenja napona kako bi se održala gornja postavljena granica struje u kapilari. Osim ovih opisanih načina, na EOF je moguće utjecati, primjerice, i promjenom temperature ili dodatkom organskog otapala. Utjecaj organskog otapala je vrlo složen i učinci se u pravilu određuju eksperimentalno. Organsko otapalo mijenja viskoznost pufera i zeta potencijal. Linearni alkoholi, poput metanola, etanola i izopropanola najčešće

smanjuju EOF jer povećavaju viskoznost elektrolita. Acetonitril dodan u otopinu radnog pufera nema značajnog utjecaja na EOF. Organska otapala se u kapilarnoj elektroforezi najčešće koriste iz dva razloga, jedan je što mogu značajno poboljšati topljivost uzorka, a drugi je što mogu promijeniti selektivnost metode, posebice u CZE i MEKC tehnikama. Kod analiza u kojima se koristi organsko otapalo dodano u radni pufer, potrebno je kontrolirati isparavanje otapala, kako ne bi dolazilo do promjene selektivnosti metode tijekom uzastopnih analiza. Načini kontrole elektroosmotskog toka, te dodatne opaske navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Načini kontrole elektroosmotskog toka.

Parametar	***Utjecaj***	***Komentar***
Električno polje	proporcionalno	smanjenjem el. polja može doći do smanjenja učinkovitosti i razlučivanja; povećanjem el. polja može doći do Joule-ovog zagrijavanja unutar kapilare
pH pufera	pri većem pH, povećanje EOF-a	najučinkovitiji način promjene EOF-a; utječe i na naboj i strukturu analita
ionska jakost ili koncentracija pufera	povećanjem se smanjuje zeta potencijal i EOF	visoka ionska jakost uzrokuje visoku struju unutar kapilare i moguće Jouleovo zagrijavanje; niska ionska jakost može dovesti do adsorpcije uzorka
temperatura	mijenja viskoznost pozadinskog pufera (2-3% za svaki °C)	jednostavno se kontrolira programski
organsko otapalo	mijenja zeta potencijal ili viskoznost (najčešće smanjuje EOF)	utjecaj je složen i učinci se najčešće određuju eksperimentalno; mogu promijeniti selektivnost metode
surfaktant	adsorpcija na stijenku kapilare hidrofobnim ili ionskim interakcijama	anionski povećavaju EOF; kationski mogu promijeniti smjer EOF-a
neutralni hidrofilni polimeri	adsorpcija na stijenku kapilare hidrofobnim interakcijama	smanjuje EOF promjenom površinskog naboja ili povećanjem viskoznosti
kovalentne modifikacije	kemijsko vezanje na stijenku kapilare	trajne su; stabilnost upitna

3.2.3. Vrste kapilarne elektroforeze

Kapilarna elektroforeza podrazumijeva različite mehanizme razdvajanja, različite modifikacije kapilare ili radnog pufera te različite načine detekcije, što tehnici nudi čitav niz mogućnosti primjene i brojne prednosti. Postoji nekoliko vrsta kapilarnoelektroforetskih tehnika, koje se razlikuju prema mehanizmu razdvajanja različitih analita (Sertić, 2013).

Kapilarna zonska elektroforeza (engl. *Capillary Zone Electrophoresis*, CZE), pravim imenom „kapilarna elektroforeza slobodne otopine“, najjednostavniji je i najvažniji tip kapilarne elektroforeze. Separacije se u CZE odvijaju u homogenom elektrolitu, a isti elektrolit ispunja kapilaru i nalazi se u spremnicima u koje su uronjene elektrode. Kapilara je ispunjena samo puferom. Četiri su preduvjeta za razdvajanje analita kapilarnom zonskom elektroforezom. Prvi je da se barem malo razlikuju njihove elektroforetske pokretljivosti u puferu. Analiti s različitom elektroforetskom pokretljivosšću se razdvajaju u zone, a u odijeljenim zonama putuju kroz kapilaru različitom brzinom. Brzina kretanja pojedine zone ovisi o električnoj pokretljivosti pojedinog analita i o brzini elektroosmotskog toka otopine pufera. Drugi preduvjet za CZE je da radni pufer bude homogen i da jakost polja bude jednoliko distribuirana kroz cijelu kapilaru. Zatim, analiti i matriks se ne smiju vezati ili stupati u interakcije s unutrašnjom stijenkom kapilare. I posljedni preduvjet je da vodljivost radnog pufera bude veća od ukupne vodljivosti analita u uzorku, osim u slučajevima kada se injektiraju jako mali uzorci (24).

Kapilarnom zonskom elektroforezom moguće je odijeliti i anionske i kationske otopljene tvari, zahvaljujući elektroosmotskom toku jer zbog njega i anioni putuju prema katodi na detektorskom kraju kapilare. Neutralne otopljene tvari se ne mogu međusobno razdvojiti ovom metodom, već one koeluiraju s elektroosmotskim tokom (9, 17, 23).

Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MEKC) je drugi najvažniji tip kapilarne elektroforeze kojim je, za razliku

od kapilarne zonske elektroforeze, moguće analizirati i neutralne analite. Često se kaže da ovaj tip predstavlja kombinaciju elektroforeze i kromatografije, što sugerira već i sam naziv tehnike. U otopinu radnog pufera dodaju se površinski aktivne tvari, surfaktanti. Pri koncentracijama surfaktanta iznad kritične micelarne koncentracije formiraju se nakupine molekula surfaktanta, koje nazivamo micele. Micele imaju sferičan oblik, njihovi hidrofobni repovi okrenuti su prema središtu da bi izbjegli kontakt s hidrofilnim puferom, a polarne glave su na površini u kontaktu s puferom. Neutralni spojevi stupaju u različite interakcije s micelama te zahvaljujući naboju na micelama putuju kroz kapilaru. Micele najčešće imaju određen naboj jer su molekule surfaktanta koje ih tvore, u najvećem broju slučajeva, nabijene. Stoga micele putuju u istom ili suprotnom smjeru u odnosu na EOF, ovisno o njihovom naboju. Iako postoji iznimno veliki broj kationskih, anionskih, *zwitterionskih*, pa čak i neionskih surfaktanata, u većini do sada objavljenih MEKC metoda korištene su micele anionskih surfaktanata, najčešće natrijeva dodecilsulfata (eng. *Sodium dodecyl sulfate*, SDS). Anionske micele imaju negativan naboj pa stoga putuju prema anodi. No budući da je elektroosmotski tok pri neutralnom ili bazičnom pH brži od brzine putovanja micela, ukupno kretanje će biti usmjereno u smjeru katode na detektorskom kraju kapilare. Stoga brzina kretanja neutralnih analita ovisi samo o konstanti raspodjele između micele i vodene otopine. Nabijeni analiti također stupaju u različite hidrofobne i elektrostatske interakcije te brzina njihova putovanja ovisi o konstanti raspodjele između micela i otopine pufera te o elektroforetskoj pokretljivosti samog analita Za vrijeme migracije, micele mogu ulaziti u interakcije s analitima putem hidrofobnih i elektrostatskih interakcija, a to je načelo s kojim se susrećemo u kromatografiji, pa kažemo da one tvore pseudostacionarnu fazu. Što analit u većoj mjeri ulazi u interakcije s micelom, dulje je njegovo vrijeme zadržavanja, s obzirom da ga micela vuče u smjeru suprotnom od EOF-a. Analit koji ne ulazi u interakciju s micelom

nošen je elektroosmotskim tokom. Što su analiti hidrofobniji, to ulaze u jače interakcije s micelom, pa se i dulje zadržavaju u kapilari (9, 17, 23, 26).

Kapilarna gel elektroforeza (engl. *Capillary Gel Electrophoresis*, CGE) vrsta je kapilarne elektroforeze koja se po svom načelu i mehanizmu odjeljivanja može usporediti s tradicionalnom gel elektroforezom na ploči, s time da se gel nalazi unutar kapilare. Prednosti pred tradicionalnom gel elektroforezom na ploči jesu 10 do 100 puta veće jakosti primijenjenog električnog polja, ali bez štetnih učinaka Jouleovog zagrijavanja. Nadalje, tu je mogućnost *on-line* detekcije, kvantifikacije i potpuna automatizacija analize. Analiti se razdvajaju na temelju njihove veličine, pri čemu otopina polimera koji stvara gel djeluje kao molekularno sito. Najčešće korišteni gelovi su linearno povezani (poliakrilamid ili metilceluloza), kovalentno unakrsno povezani (bis-poliakrilamid) ili gelovi vezani vodikovim vezama (agaroza). Primjeri polimernih gelova prikazani su u Tablici 5. Tehnika se prvenstveno koristi za analizu DNA i RNA te peptida i proteina. Iznimno je važna za karakterizaciju rekombinantnih proteina prilikom njihove proizvodnje te u stabilitetnim studijama (25).

Tablica 5. Primjeri polimera u kapilarnoj gel elektroforezi.

Polimer	***Koncentracija***	***Primjena***
Umreženi polimeri		
Poliakrilamid/bis-akrilamid	2-6% T, 3-6% Co	Oligonukleotidi, DNA sekvencioniranje, nativni i SDS-vezani proteini
Linearni polimeri		
Poliakrilamid	< 0,1 – 6%	Restrikcijski fragmenti
Hidroksialkilceluloza, polivinilalkohol	6 – 15%	Oligonukleotidi, DNA sekvencioniranje, proteini
agaroza	0,05 – 1,2%	Restrikcijski fragmenti, proteini

Kapilarno izoelektrično fokusiranje (engl. *Capillary Isoelectric Focusing*, CIEF) je gel elektroforetska tehnika visokog razlučivanja koja se koristi za razdvajanje proteina i peptida na temelju razlike u izoelektričnim točkama. U odnosu na tradicionalno gel izoelektrično fokusiranje, CIEF je brži, automatiziran i jednostavniji za primjenu. Primjenom amfolita (*zwitteriona*) unutar kapilare postiže se pH-gradijent. Amfoliti su molekule koje sadrže i kisele i bazične dijelove (*zwitterioni*) i nakon što se kapilara napuni mješavinom analita i amfolita, formira se pH gradijent. Kisela otopina (pH 3) nalazi se na anodi, a bazična otopina (pH 9) na katodi. Pod djelovanjem električnog polja nabijene molekule putuju kroz medij do područja u kojem gube naboj (pH-vrijednost jednaka njihovoj izoelektričnoj točki) i na tom mjestu se zaustavljaju. Završetak tog procesa može se prepoznati po tome što struja više ne teče kada je postignuto stabilno stanje Tako odijeljene uske vrpce analita pokreću se prema detektoru primjenom tlaka ili dodatkom soli. Ovom tehnikom mogu se razdvojiti proteini koji se u izoelektričnoj točki razlikuju za svega 0,005 pI jedinica. Zbog visoke moći razlučivanja u kapilari duljine 65 cm moguće je razdvojiti i do 1000 analita (25).

Kapilarna izotahoforeza (engl. *Capillary Isotachophoresis*, CITP) je elektroforetska tehnika pokretne granice (engl. *moving boundary*). CITP koristi diskontinuirano električno polje za stvaranje oštrih granica između sastavnica uzorka primjenom dviju elektrolitskih tekućina različitih pokretljivosti. Vodeća elektrolitska tekućina ima veću, a zadnja elektrolitska tekućina manju pokretljivost nego ioni analita. Primjenom električnog polja nastaju odijeljene zone analita između vodećeg i terminalnog elektrolita. Jednom odijeljeni analiti, uz zadržavanje vrlo oštrih granica između zona, čime se postiže znatno koncentriranje uzorka, u odijeljenim, ali spojenim zonama, putuju istom brzinom koja je definirana brzinom vodećeg elektrolita. Kako bi se održala ravnotežna brzina, unutar svake zone mijenja se električno polje. Električno polje je stoga najslabije u zoni s najvećom elektroforetskom pokretljivošću. Upravo ovaj fenomen odgovaran je za održavanje vrlo oštrih granica među

zonama. Kapilarna izotahoforeza je standardna metoda u analizi seruma, plazme, urina i cerebrospinalne tekućine, a kombinira se i s drugim tehnikama za ukoncentriravanje uzorka (27).

Kiralna kapilarna elektroforeza (engl. *Chiral Capillary Electrophoresis*, CCE) vrsta je kapilarne elektroforeze za analizu kiralnih molekula, odnosno njihovo što uspješnije razdvajanje. Izvodi se tako da se u otopinu radnog pufera doda kiralni selektor. Kao kiralni selektori koriste se ciklodekstrini, krunski eteri, žučne soli, kompleksi bakar(II)-aspartata, itd. Selektivnost se postiže uporabom odgovarajuće vrste i koncentracije kiralnog selektora te dodatkom modifikatora poput alkohola, površinski aktivnih tvari i metalnih iona. Tehnika je puno jeftinija od uobičajeno korištene tekućinske ili plinske kromatografije, čije analize mogu biti složene i zahtjevne glede optimizacije, a u pravilu koriste i kiralne stacionarne faze koje su uglavnom skupe. U usporedbi s kiralnom kromatografijom, koja koristi čitav niz kiralnih faza za mijenjanje selektivnosti, kod kapilarne elektroforeze visoka učinkovitost postiže se korištenjem relativno malog broja kiralnih selektora. Kiralna kapilarna elektroforeza uspješno se koristi za razdvajanje i analizu aminokiselina, kao i kiralnih lijekova (23,27).

Kapilarna elektrokromatografija (engl. *Capillary Electrochromatography*, CEC) nova je i vrlo popularna vrsta kapilarne elektroforeze. Predstavlja kombinaciju kapilarne elektroforeze i kromatografije u tradicionalnom smislu, a odlikuje se vrlo visokom učinkovitošću. CEC kapilara ispunjena je kromatografskom stacionarnom fazom, a razdvajanje se odvija na temelju različite elektroforetske pokretljivosti (svojstvo kapilarne elektroforeze) i na temelju razlike u konstanti raspodjele između mobilne i stacionarne faze (načelo kromatografskog razdvajanja). Kapilara se puni *in situ* polimerizacijom ili silanizacijom, a postoje i komercijalno dostupne punjene kapilare (23).

Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (engl. *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, MEEKC) je kapilarnoelektroforetska tehnika u kojoj se

analiti razdvajaju između dviju faza – vodene i uljne. Mikroemulzija se može sastojati od kapljica vode raspršenih u uljnoj fazi ili kapljica ulja u vodenoj fazi. Kao organsko otapalo najčešće se koriste heptan ili oktan, a u otopinu se dodaje surfaktant (najčešće SDS) i kosurfaktant poradi stabilizacije emulzije. Odabirom otapala i mijenjanjem koncentracije surfaktanta i organskih otapala postiže se odgovarajuća selektivnost i razlučivanje između analita. MEEKC se prvenstveno koristi u analizi lijekova teško topljivih ili netopljivih u vodi (28, 29).

Nevodena kapilarna elektroforeza (engl. *Nonaqueous Capillary Electrophoresis*, NACE) je kapilarnoelektroforetska tehnika koja koristi samo organska otapala. Proizašla je iz potrebe da se analiti netopljivi u vodi također analiziraju tehnikom kapilarne elektroforeze. Također, primjena samo organskih otapala pruža dodatnu selektivnost prilikom razvoja metode, pa može biti tehnika izbora čak i kod analita koji jesu topljivi u vodi. Naime viskoznost i dielektrična konstanta otapala utječu izravno na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita pa se odabirom odgovarajućih organskih otapala u određenim udjelima postiže razdvajanje (30).

4. RASPRAVA

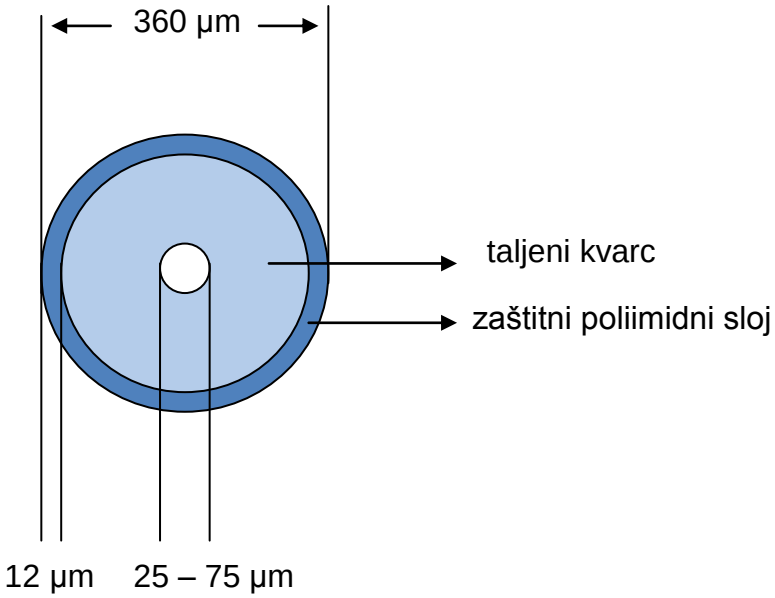
4.1. Kapilare

Kao što je vidljivo iz samog naziva tehnike, kapilara je ključni dio u kojem se odvija razdvajanje svih sastavnica smjese tijekom kapilarnoelektroforetske analize. Kao što je spomenuto u uvodu, uvođenjem uske kapilare riješeni su mnogi problemi koji su se javljali kod elektroforeze na gelu. Osim što je izbjegnuta priprava gela koja je vrlo često bila nereproducibilna i zahtijevala primjenu znatno nižeg električnog polja, a time i dulje analize, uvođenjem kapilare dobio se medij u kojem se odvijalo razdvajanje analita i nakon čega je uslijedila izravna detekcija te kvalitativna i kvantitavna analiza. O vrsti i dimenzijama kapilare ovisi učinkovitost razdvajanja, razlučivanje i obilježja signala te odaziv detektora.

Materijal od kojeg kapilare trebaju biti izrađene mora svakako biti kemijski i električki inertan, kako ne bi dovodio do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata, ili pak uzrokovao promjenu analita tijekom same analize. Kako je primjena UV-Vis detektora uvriježena u analitici, poželjno je da je materijal od kojeg je kapilara izrađena propustan za elektromagnetsko zračenje u UV-Vis području. Obzirom na tehničku izvedbu instrumenta i plastično kućište (Slika 8) u koje se kapilare savijaju i stavljaju, materijal mora biti fleksibilan i robustan. Naravno, poželjno je da materijal bude lako dostupan, odnosno prihvatljiv cijenom.

Slika 8. Plastično kućište u kojem se nalaze kapilare tijekom analize.

Takva svojstva za sada najbolje ispunjava taljeni kvarc, s površinskim –SiOH skupinama. Ova vrsta stakla sastoji se od kvarca u amorfnoj formi, u koji, za razliku od običnog stakla, nisu dodavani nikakvi drugi sastojci u svrhu snižavanja temperature točke taljenja. Ovakav kvarc ima visoke radne temperature i temperature tališta. Optička i termalna svojstva taljenog kvarca su značajno bolja od običnog stakla upravo zbog njegove čistoće te se vrlo često koristi u izradi visokosofisticirane laboratorijske opreme. Zbog svojstva da znatno bolje propušta UV elektromagnetno zračenje od ostalih vrsta stakla, taljeni kvarc koristi se za izradu optičkih leća i druge opreme. U analitici se taljeni kvarc, prije izrade elektroforetskih kapilara, koristio za izradu optičkih ćelija i GC kolona. Kako bi se osigurala čvrstoća kapilara i omogućilo njihovo savijanje, kapilare se izvana oblažu slojem poliimida (Slika 9).



Slika 9. Presjek kapilare od taljenog kvarca.

Budući da poliimidni sloj nije UV propustan, prije analize potrebno je ukloniti dio ovog sloja na mjestu detektora, kako bi se omogućila izravna *on-line* detekcija analita. To je moguće provesti mehaničkim uklanjanjem filma pomoću oštrice ili žileta, ili puno češće spaljivanjem filma pomoću električnog luka ili užarene žice (Slika 10). Nakon što je film uklonjen, kapilara je na tom dijelu jako osjetljiva i lako lomljiva, pa je potrebno s njom oprezno rukovati. Zaštitni film se također uklanja na oba kraja kapilare kako bi se osigurala minimalna adsorpcija uzorka i osigurali uski i oštri pikovi. Najveći nedostatak kapilara od taljenog kvarca je promjena unutrašnje površine usred interakcija analita i unutrašnje stijenke kapilare. Ovo dovodi do nereproducibilnih rezultata, kao i mogućeg začepljenja kapilare i posljedičnog pucanja. Kako bi se to izbjeglo, najčešće se tijekom razvoja metode optimizira i postupak ispiranja kapilare koji može uključivati ispiranje otopinom radnog pufera, vode, organskog otapala ili čak otopinom 0,1 M NaOH kako bi se uklonili svi adsorbirani analiti, odnosno postigla ioniziranost silanolnih skupina unutrašnje stijenke kapilare.

Slika 10. Aparat za uklanjanje zaštitnom poliimidnog filma na mjestu detektora pomoću užarene žice.

Nešto rjeđe za izradu kapilara koristi se teflon. Budući da je teflon UV propustan, a ne zahtijeva upotrebu dodatnog zaštitnog poliimidnog filma, nije potrebno praviti mjesto za optički prozor. Glavni nedostaci teflona kao materijala za izradu CE kapilara je nemogućnost postizanja homogenog unutarnjeg promjera, adsorpcija analita (slično kao i kod kapilara od kvarca) i slabija svojstva prijenosa topline (25).

4.1.1. Povećanje osjetljivosti izborom tipa kapilare

Dimenzije kapilara ovise o potrebama analize i tehničkim izvedbama instrumenta. Najčešće se koriste kapilare duljine 10-130 cm, s unutrašnjim promjerima 10-200 μm. Vanjski promjeri također mogu varirati i razlike je potrebno popratiti odgovarajućom tehničkom izvedbom. Duljina kapilare izravno je proporcionalna trajanju analize. Kako je cilj svake analitičke metode da bude što kraća, poželjnije su kraće kapilare. No, ponekad je u slučaju složenih matriksa ili zahtjevnih analiza, uspješno razdvajanje nemoguće postići bez dugačkih kapilara. U praksi, pogotovo u farmaciji, danas se najčešće koriste kapilare duljine 30-50 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm. Također je potrebno naglasiti da postoji razlika između stvarne i efektivne duljine kapilare, gdje efektivna duljina kapilare označava

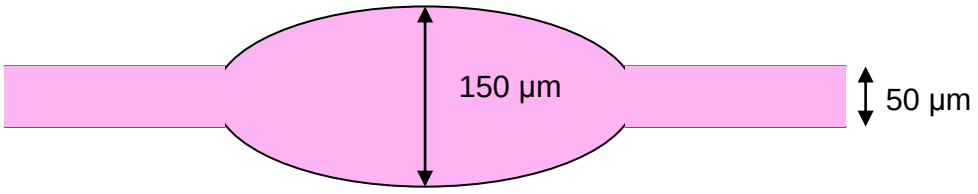
udaljenost od injektorskog dijela kapilare do mjesta detektora, dok je stvarna duljina kapilare nekih 5-10 cm dulja (ovisno o tipu i proizvođaču instrumenta), i omogućuje da kapilara prođe detektor i elektrodu te bude uronjena u otopinu pozadinskog pufera.

Kao što je već rečeno, jedan od najvećih izazova kapilarne elektroforeze je, uz reproducibilnost, njezina osjetljivost. S druge strane, vrlo niska granica detekcije i široko linearno područje je preduvjet za analitičku metodu kojom se želi određivati onečišćenja u lijekovima. S jedne strane, onečišćenja se moraju moći detektirati i kvantitativno odrediti u vrlo niskoj koncentraciji, dok istovremeno koncentracija lijeka u aktivnoj farmaceutskoj tvari ili gotovom ljekovitom obliku mora biti 100 puta veća. Osjetljivost i linearno područje mogu se poboljšati povećanjem unutarnjeg promjera kapilare. No, ovaj pristup ima svoja ograničenja. Naime, povećanjem unutrašnjeg promjera kapilare, dolazi do povećanja struje, a time i do većeg zagrijavanja unutar kapilare. Povećanje unutrašnjeg promjera dva puta (primjerice s 50 μm na 100 μm), rezultira dvostruko većom apsorbancijom, ali čak četiri puta većom strujom unutar kapilare. Stoga su se razvili posebni tipovi kapilara kojima se nastoji povećati optički put, ali samo proširenjem malog dijela kapilare u kojem se vrši detekcija, odnosno da se ne povećava cjelokupni unutrašnji promjer kapilare.

Obične kapilare, bez ikakvog proširiravanja, imaju unutrašnji promjer 50-100 μm. Ukupna duljina kapilara je najčešće 30-110 cm. Ove kapilare na unutrašnjoj površini imaju samo silanolne skupine kvarca, dok su izvana prevučene zaštinim slojem poliimida. Osim obične kvarcne kapilare unutrašnjeg promjera od 50-100 μm, postoje tri osnovna tipa ćelija s proširenim optičkim putom: *bubble cell* kapilara, Z-kapilara i ćelija visoke osjetljivosti i (25).

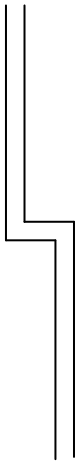
Bubble cell kapilara nudi jedinstvenu mogućnost za povećanjem optičkog puta, a da se pri tome skoro uopće ne gubi na separacijskoj učinkovitosti i razlučivanju. Dobiva se tako da se napravi prošireni dio kapilare, mjehurić, u samoj kapilari. Mjehurić je postavljen točno na mjestu detekcije, pa ne dolazi do povećanja struje unutar kapilare (Slika 11). To zapravo znači

da na mjestu gdje se nalazi optički prozor kapilara ima proširenje (engl. *bubble*), odnosno mjehurić koji produljuje optički put detektora 2,7-5 puta. Ove kapilare najčešće dolaze u promjerima 25 μm, 50 μm i 75 μm, dok im je optički put duljine 125 μm (5 puta dulji optički put), 150 μm (3 puta optički put) i 200 μm (2,7 puta optički put). Proširenjem kapilare samo na mjestu detektora osiguralo se da je struja koja se javlja u kapilari jednako niska kao kod običnih, neproširenih, kapilara pa ne dolazi do Jouleovog zagrijavanja zbog većeg promjera kapilare. To je posebno važno kod pufera visoke električne vodljivosti. Nadalje, na mjestu mjehurića, električni otpor se smanjuje, a to smanjuje električno polje. Istodobno se razmjerno smanjuje brzina protoka zbog povećanog volumena na mjestu proširenja. Ovo sve dovodi do ukoncentriravanja zone analita. Naime, kada zona analita dođe do mjesta proširenja, njezina se brzina smanji i zona se ukoncentrira. Kako se zona analita širi radijalno kroz kapilaru da ispuni cijeli povećani volumen, longitudinalno se zona smanjuje duž kapilare. Na taj način se koncentracija uzorka ne mijenja, iako se poveća optički put. Budući da ne dolazi do proširenja zona uslijed proširenja optičkog puta, nema gubitka razlučivanja, odnosno učinkovitosti razdvajanja. Najčešće je promjer mjehurića tri puta veći od unutrašnjeg promjera kapilare (150 μm naspram 50 μm) što rezultira tri puta većim signalom. Povećanjem apsorpcije svjetla kroz veći optički put, na ovaj se način povećava osjetljivost, odnosno postižu niži pragovi identifkacije i određivanja, te proširuje linearno područje metode, dva ključna kriterija za primjenu kapilarne elektroforeze u analizi lijekova i njihovih onečišćenja.



Slika 11. Kapilara s produljenim optičkim putom (*bubble cell* kapilara).

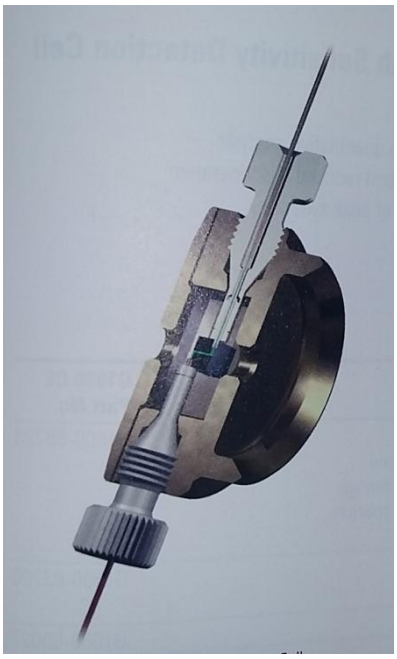
Z-kapilara je tehnološki još napredniji oblik kapilare koji nude neki proizvođači CE kapilara na tržištu (Slika 12). Umjesto mjehurića, odnosno proširenja, kapilara je svinuta u oblik slova Z. Poprečni dio kapilare služi kao optički put. Fokusiranje svjetlosti u ovoj ćeliji se dobiva primjenom safirne leće (engl. *sapphire ball lens*). Dio svjetlosti prođe ili se zadrži u izvučenom kvarcu, a dio svjetlosti prolazi kroz otopinu u šupljini kapilare višestruko se reflektirajući na površini kvarc/zrak. Kapilare su poravnate i učvršćene u nosač kapilare, koji može biti prilagođen svakom instrumentu ponaosob. Ukupna duljina poprečnog dijela Z-kapilare iznosi 3 mm, što je zapravo jako dugačko u odnosu na zonu analita. No, efektivni optički put će biti nešto kraći od 3 mm. Naime, prolazak svjetlosti kroz ovaj tip ćelije temelji se na refrakciji i refleksiji. Pri tome je cijeli postupak dosta osjetljiv jer indeks refrakcije otopine jako utječe na optička svojstva osno-osvijetljenih kapilara, a dio svjetla putuje kroz stijenku kapilare, a ne otopinu.



Slika 12. Z-kapilara.

Gore navedeni nedostaci Z-kapilare su uklonjeni primjenom **ćelije visoke osjetljivosti** (Slika 13). Ova je ćelija tako dizajnirana da ima tijelo od izvučenog kvarca koje je okruženo tankim bočnim prozorima i ćeliju od crnog izvučenog kvarca koja reducira zraku svjetlosti, odnosno sprječavaju disperziju svjetlosti. Reflektivna unutrašnjost ćelije

osigurava gotovo 100%-tnu transmisiju svjetlosti koja ulazi u ćeliju. Dodatno, bočni prozori ćelije poboljšavaju spektralnu analizu. Sa suprotnih strana ćelije umeću se dvije kapilare i spajaju. Optički put je 1,2 mm i time je dobivena ćelija detektora s volumenom od 12 nL. Prednost ćelije visoke osjetljivosti, osim naravno poboljšanje osjetljivosti, odnosno niže granice dokazivanja, je značajno širi linearni raspon i čak 10 puta bolji omjer signal/šum u odnosu na obične kapilare.



Slika 13. Ćelija visoke osjetljivosti.

Osim različitih izvedbi kapilara kojima se nastojalo povećati optički put, na tržištu se mogu naći kapilare na čiju je unutrašnju površinu trajno nanesen sloj koji mijenja njezina kemijska svojstva. Primjer su kapilare prevučene trajnim slojem adsorbiranog polivinil alkohola (PVA). Ovaj sloj smanjujem hidrofobne i elektrostatke interakcije između otapala i unutrašnje stijenke kapilare pa se time eliminira elektroosmotski tok. PVA sloj je stabilan u širokom pH rasponu, od 2,5 do 9,5 pa se mogu primjenjivati svi najčešće korišteni

kapilarnoelektroforetski puferi. Budući da su silanolne skupine zaštićene, proteini i amini se mogu analizirati bez zavlačenja pika. Osim toga, budući da je EOF u potpunosti eliminiran, zahtijevna ispiranja u svrhu regeneracije stijenke kapilare postaju nepotrebna i reproducibilnost migracijskog vremena se može značajno poboljšati.

Takozvane CEP prevučene kapilare sadrže sloj trajno vezanog polimera koji zaštićuje silanolne skupine stijenke kapilare i sprječava adsorpciju uzorka. Osim toga, EOF je gotovo potpuno eliminiran, pa je ovaj tip kapilare prvi izbor za razdvajanje i analizu DNA molekula. Eliminacija EOF također olakšava analizu aniona i organskih kiselina direktnom UV detekcijom. U protivnom, bez smanjenja EOF, ioni visoke pokretljivosti - poput nitrata - migriraju u suprotnom smjeru od dugolančanih kiselina niske pokretljivosti. CEP kapilare stabilne su u pH rasponu od 2 do 8.

Danas postoje i novi tipovi prevučenih kapilara za kapilarnu elektroforezu koje se proizvode unakrsnim vezanjem i vezanjem fluorougljičnog polimera, tzv. μSIL-FC i μSIL-DNA kapilare. Ovo su kapilare izbora za izoelektrično fokusiranje, razdvajanje proteina, peptida i ugljikohidrata, oligonukleotida, DNA fragmenata i produkata PCR-a. μSIL-WAX kapilare imaju daljnju modifikaciju hidrofilnim slojem polietilen oksida. Budući da je EOF ponovno gotovo nepostojeći, kapilare su izbora za CE-MS analizu, te razdvajanja proteina i peptida u užem pH rasponu, od pH 2 do 5.

4.2. Mogućnosti detekcije

Detekcija analita se u kapilarnoj elektroforezi može odvijati izravno u kapilari (*on-line* detekcija) ili izvan nje, primjerice kod detektora spektrometrije masa, amperometrijskog ili konduktometrijskog detektora. Općeniti izazov u primjeni ove tehnike je osjetljivost. Budući da su dimenzije kapilare tako male (najčešći unutarnji promjer kapilare je 50 μm) te su još i zaobljene, pa samo dio svjetlosti (kod apsorpcijskih detektora) prolazi izravno kroz središte

kapilare, optički je put zapravo još manji od unutarnjeg promjera kapilare. To je glavni razlog zašto je osjetljivost tehnike znatno slabija (za 2-3 reda veličine), od primjerice, HPLC tehnike, a i linearno područje je puno uže. Druga velika razlika između kromatografskih tehnika i kapilarne elektroforeze jest što kod većine tipova CE tehnike analiti, ovisno o svojoj elektroforetskoj pokretljivosti, putuju različitim brzinama dok prolaze kroz optički prozor detektora. Analiti koji putuju sporije, dulje će se zadržavati u optičkom prozoru, pa će njihova površina ispod krivulje biti veća. Stoga neki autori predlažu da se kod kvantitativnih analiza površina pika podijeli vremenom migracije analita kako bi se spomenuti tip pogreške anulirao (31). Danas postoji čitav niz načina detekcije u kapilarnoj elektroforezi, prikazanih u Tablici 4 (32).

Detektori koji mjere apsorbanciju su najčešće korišteni detektori u kapilarnoj elektroforezi. Princip djelovanja je mjerenje apsorbancije svjetla analita koja stvori sjenu između izvora svjetlosti i detektora prilikom prolaska analita. Intenzitet ove sjene je proporcionalan količini analita u uzorku. Stariji ili jednostavniji instrumenti koriste **monokromatski detektor**, koji prati apsorbanciju na samo jednoj valnoj duljini. Iako su relativno jeftini i robustni, ne pružaju mnogo informacije. Danas se u pravilu koriste **detektori s nizom dioda** (engl. *Diode Array Detector*, DAD). UV-Vis apsorpcija je najčešća metoda detekcije zbog svoje univerzalne detekcije prirode. U kapilarnoj elektroforezi, kod kapilara od izvučenog kvarca, detekcija se može provoditi pri valnim duljinama nižim od 200 nm pa skroz do vidljivog dijela spektra (otprilike 600 nm). Budući da je optički prozor napravljen na samoj kapilari, nema širenja zone uslijed miješanja komponenata i otapala ili zbog mrtvog volumena, kao kod HPLC tehnike. Dapače, i tijekom samog prolaska kroz detektor, razdvajanje analita se i dalje odvija. Budući da je riječ o optičkom detektoru, kako bi razlučivanje bilo što bolje, optički put treba biti što kraći u odnosu na širinu zone analita (25).

Tablica 4. Vrste detekcije u kapilarnoj elektroforezi.

Način detekcije	LOD (mol/L)	Primjena	Napomena
UV apsorpcija	$10^{-7} – 10^{-4}$	analiti aromatske strukture, proteini, nukleinske kiselina...	najčešća i standardna tehnika detekcija ugrađena u komercijalno dostupne CE instrumente
Indirektna UV apsorpcija	$10^{-8} – 10^{-4}$	metalni ioni, amini, organski i anorganski ioni, šećeri	moguće uz komercijalno dostupne CE instrumente
Fluorescencija	$10^{-9} – 10^{-4}$	derivatizirane aminokiseline	nedostatak: potrebna derivatizacija za većinu uzoraka
Laserska fluorescencija	$10^{-13} – 10^{-7}$	DNA fragmenti, derivatizirane aminokiseline	nedostatak: laseri su skupi; primjenjivo u VIS i bliskom UV području
Indirektna fluorescencija	$10^{-7} – 10^{-5}$	alkoholi, amini, anioni, kationi, šećeri	svega nekoliko poznatih primjena
Amperometrija	$10^{-8} – 10^{-6}$	analiti podložni oksidaciji ili redukciji (npr. neurotransmitori)	prikladno za vrlo uske kapilare (2 μm i.d.)
Vodljivost	$10^{-7} – 10^{-5}$	ionski uzorci, kapilare za amine, karboksilne kiseline	nedostatak: teškoće pri zamjeni
Potenciometrija	10^{-8}	alkalijski i zemnoalkalijski metalni ioni, selektivna detekcija s ion-selektivnim mikroelektrodama	nedostatak: teškoće u rukovanju i pripremi mikroelektroda
Spektrometrija masa	10^{-8}	proteini, peptidi, komercijalni lijekovi	nedostatak: teškoće u povezivanju; potrebna vanjska pumpa
On-line mjerenje radioaktivnosti	$10^{-10} – 10^{-8}$	P^{32} i C^{14} u biokemijski relevantnim komponentama	dobra osjetljivost kroz *stop-flow* sustave
Plameni fotometrijski detektor	$10^{-5} – 10^{-3}$	ionske organske tvari	manja osjetljivost u usporedbi s GC tehnikom

Fluorescencijski detektor koristi vanjski izvor energije da pobudi molekule analita u više energetsko stanje, pa kada se molekule vraćaju u normalno stanje, emitiraju razliku energije koja se onda može detektirati i zabilježiti. U kapilarnoj elektroforezi fluorescencijski detektori najčešće koriste laser kao izvor ekscitacijske energije. Laseri imaju prednost jer proizvode svjetlost velikog intenziteta na jednoj valnoj duljini, a intenzitet je važan za visoku ekscitacijsku učinkovitost. Prednost ovog detektora je njegova velika selektivnost, zbog činjenice da svi analiti ne fluoresciraju, niti se mogu nekom prethodnom kemijskom reakcijom prevesti u produkt koji će fluorescirati. No, za one analite koji fluoresciraju, osjetljivost ovog detektora je 10 do čak 1000 puta veća od UV detektora (31).

Instrumenti koji koriste **amperometrijski i konduktometrijski detektor** nisu komercijalno dostupni, već najčešće budu *in-house* izvedba, odnosno unaprjeđenje CE tehnike. Oba tipa detektora trebaju elektrode za očitanje koje moraju biti dimenzionirane za kapilaru. Još jedan nedostatak ovih detektora je ograničenje u korištenju radnih pufera tijekom analize. Kod amperometrijskog detektora, analiti podliježu elektrokemijskoj reakciji unutar detektorske ćelije. Budući da struja i naponi unutar kapilare za vrijeme razdvajanja i oni unutar detektorske ćelije nisu istog reda veličine, dva strujna kruga moraju biti odvojena. Najčešće se poveže kraj kapilare gdje se nalazi detektorska ćelija na elektrodu visokog napona. Konduktometrijski detektor ima dvije izvedbe. U oba slučaja, dvije elektrode moraju biti smještene unutar kapilare. No, kod prvog tipa, elektrode se nalaze jedna nakon druge, a kod drugog tipa jedna nasuprot druge. Kod prvog slučaja postoji gradijent napona duž kapilare pa će prolazak analita promijeniti napon koji će onda elektrode detektirati. U drugom slučaju nema gradijenta napona između dviju elektroda, pa će prolaskom analita doći do promjene u struji (31).

Sprezanje tehnike kapilarne elektroforeze sa **spektrometrijom masa** je moguće, uz neke dodatne tehničke izvedbe. U pravilu se kod ove spregnute tehnike koristi eletkrosprej

ionizacija. Potrebno je imati vanjsku pumpu koja će gurati cijeli protok prema masenom spektrometru. Također je potrebno posebno kućište za kapilaru koje izlazi iz CE instrumenta i puno dulja kapilara od postojeće kako bi se spojilo s masenim spektrometrom. Različiti proizvođači nude različite tehničke izvedbe. Naravno, vrijeme analize je produljeno, ali se dobiva veća osjetljivost u odnosu na DAD detektor, bolja selektivnost, moguća je kvantitativna analiza dviju supstancija koje nisu u potpunosti razdvojene na kapilari, a također je moguća strukturna karakterizacija analita.

Beskontaktni detektor vodljivosti (engl. *Contactless Conductivity Detection*, CCD ili u nekoj literaturi C^4D) je relativno nov detektor, koji zauzima sve značajnije mjesto u analitici. Dostupan je u relativno jednostavnoj mehaničko-tehničkoj izvedbi i nije preskup. Dvije cilindrične elektrode, aktuator i *pick-up* elektrode smještene su oko kapilare, pri čemu nije nužno uklanjati poliimidni omotač. Kapilara također ne mora nužno biti od izvučenog kvarca, ali mora biti od nevodljivog materijala. Detektor mjeri razliku u vidljivosti između otopine radnog pufera i zone analita. Za postizanje optimalne osjetljivosti, razlika između vodljivosti pufera i analita bi trebala biti što veća. Stoga se preporučuje primjena *zwitterionskih* pufera niske vodljivosti [primjerice, 2-(N-morfolino)etansulfonske kiseline monohidrata (MES) i L-histidin]. Detektor je moguće koristiti paralelno s UV, fluorescencijskim ili masenim detektorom.

4.3. *On-line* ukoncentriravanje

Osnovni nedostatak kapilarne elektroforeze je slabija osjetljivost u odnosu na komplementarnu HPLC tehniku. Kako većina instrumenata koristi *on-line* UV detekciju, dakle unutar same kapilare, problem predstavljaju mala količina uzorka (nL) i uski optički put definiran unutrašnjim promjerom kapilare (najčešće 50 μm). Ovo predstavlja veliki

problem u primjeni kapilarne elektroforeze za određivanje analita u tragovima u različitim uzorcima.

Kako bi se na neki način poboljšala osjetljivost kapilarnoelektroforetske metode, odnosno smanjile vrijednosti granica dokazivanja i određivanja, do danas je razvijeno nekoliko mehanizama *on-line* ukoncentriravanja uzorka. Kod svih tehnika se prije samog razdvajanja i detekcije odvija ukocentriravanje, injektiranjem većeg volumena uzorka ili fokusiranjem analita u uske zone unutar kapilare.

Danas postoji *stacking* uzorka (engl. *sample stacking*), prolazna izotahoforeza (engl. *transient isotachophoresis*), *stacking* posredovan pH vrijednošću medija (engl. *pH-mediated stacking*), *sweeping*, dinamičko pH spajanje (engl. *dynamic pH junction*), samo-fokusiranje s fotopolimeriziranim poroznim monolitima (engl. *self-focusing with photopolymerized porous monoliths*) i učinci gradijenta otapala (engl. *solvent gradient effects*). Navedene se tehnike mogu izvoditi individualno ili se mogu međusobno kombinirati (33).

Većina navedenih tehnika temelji se na posebnim tehnikama fokusiranja zona uzorka i zona radnog pufera. Samo-fokusiranje s fotopolimeriziranim poroznim monolitima i učinci gradijenta otapala se temelje na kromatografskim ili kompleksacijskim učincima. Različiti autori daju različite podjele načina *on-line* ukoncentriravanja, no principi su uvijek isti.

Stacking, prema engleskoj riječi koja označava slaganje, sugerira kompresiju otopljenih tvari u zone. Kao tehniku ukoncentriravanja uveli su je 1979. godine Mikkers i suradnici primijenivši je na metodi kapilarne zonske elektroforeze. Postoji nekoliko načina izvedbe *stackinga*: *stacking* posredovan različitom ionskom jakošću (engl. i*onic-strength-mediated stacking*), *stacking* posredovan pH-om medija, *stacking* posredovan smjesom acetonitril-sol, *stacking* neutralnih analita, *stacking* i injektiranje cijelog volumena kapilare, *stacking* s elektrokinetičkim injektiranjem, prolazna izotahoforeza.

Stacking posredovan ionskom jakošću radnog pufera temelji se na razlici u vodljivosti između otopine analita u injektiranoj zoni i one radnog pufera. Ta razlika djeluje na jakost polja koje se distribuira preko svake zone. Na temelju Ohmovog zakona, kako je elektroforetska brzina analita proporcionalna jakosti polja, unutar svake zone razvit će se brzine. *Stacking* u ovom slučaju osigurava jako polje unutar zone injektiranja, a praktično se ostvari injektiranjem otopine niske provodljivosti.

Ovisno o tome koristi li se otopina radnog pufera niske ili visoke pH vrijednosti, sam mehanizam *stackinga* je nešto drugačiji. U puferu niske pH vrijednosti, injektiranjem otopine niske provodljivosti, jakost polja je unutar te zone značajno veća nego unutar ostatka kapilare. Kada pozitivno nabijeni analiti migriraju izvan zone injektiranja i dođu do otopine radnog pufera, jakost polja iznenada padne i elektroforetska brzina analita se smanji. Istovremeno, analiti u središtu i na kraju zone injektiranja, koji su i dalje izloženi jakom polju, putuju veliko brzinom prema naprijed, dok ne dođu do otopine radnog pufera, gdje im ponovno pada brzina. Na taj način dolazi do skupljanja analita u uskoj zoni. Negativno nabijeni protuioni (engl. *counterion*) se također nakupljaju, na stražnjem dijelu zone injektiranja. U puferu visoke pH vrijednosti je mehanizam nešto složeniji, budući da unutar kapilare postoji snažan elektroosmotski tok koji gura sve analite u smjeru katode. Negativno nabijeni analiti migriraju prema anodi i prelaze granicu između zone injektiranja i otopine radnog pufera na stražnjem dijelu zone injektiranja (24).

Stacking posredovan pH-om medija je tehnika izbora za *zwitterionske* analite, primjerice proteine. Najčešće se proteini u otopini amonijevog hidroksida (dakle u visokom pH) injektiraju u kapilaru ispunjenu puferom niske pH vrijednosti. Primjenom napona, negativno nabijeni peptidi migriraju prema anodi. Peptidi koji se nalaze na stražnjem dijelu zone ulaze u kiseli medij pufera te mijenjaju svoj naboj, a stoga i smjer migracije. Istovremeno, peptidi koji se nalaze na početku zone i dalje migriraju prema anodi. Zbog

toga se zona uruši u samu sebe. Sav materijal iz uske zone sada postaje pozitivno nabijen i migrira prema katodi.

Stacking posredovan smjesom acetonitril-sol je tehnika ukoncentriravanja čiji mehanizam nije poznat. Preduvjet je da se u uzorku nalazi smjesa acetonitrila i soli visoke koncentracije. Ovaj način ukoncentriravanja je dobar izbor kod bioloških uzoraka, seruma ili plazme, jer acetonitril odmah djeluje na proteine, taložeći ih iz uzorka. Načelo je moguće primjeniti i na uzorke urina.

Stacking neutralnih analita je posebna tehnika zbog činjenice da neutralni analiti u elektroforezi nemaju naboj, pa se stoga niti ne kreću u električnom polju, već koeluiraju zajedno s elektroosmotskim tokom. Za takve analite tehnika izbora je nužno micelarna elektrokinetička kromatografija. Kako bi se osiguralo ukoncentriravanje neutralnih analita, nužno je koristiti nabijene reagense. Ako je analit otopljen u razrijeđenoj otopini radnog pufera, onda je jakost polja na mjestu injektiranja visoka. Nabijene se micele unutar zone injektiranja brzo kreću, sve dok ne dođu do otopine radnog pufera. Analit koji je u interakciji s micelom se na taj način ukoncentrirava. Analiti koji više vremena provedu unutar micele, u odnosu na one koji su u vodi, bez afiniteta za micelu, ovim se načinom više ukoncetriravaju. Drugi način ukoncentriravanja neutralnih analita je primjena pH radnog pufera u niskim vrijednostima (pH 2,5) jer je pri njima brzina migracije micela SDS-a veća od elektroosmotskog toka. U tim uvjetima molekule surfaktanta migriraju prema pozitivno nabijenoj elektrodi pa je nužno koristiti i obrnuti polaritet tijekom analize. Nakon što se primijeni električno polje, negativno nabijene micele migriraju u zonu injektiranja u kojoj vlada snažno polje. Tu se micele ukoncentriraju i na taj se način ukoncentriraju i neutralni analiti. Povećanjem koncentracije surfaktanta, jakost polja se smanjuje sve dok se ne izjednači s poljem unutar radnog pufera. Tada prestaje ukoncentriravanje, i započinje

razdvajanje analita. Ovim se načinom hidrofobni analiti koji snažno stupaju u interakciju s micelama mogu ukoncentrirati i do 50 puta, a hidrofilni analiti do 3 puta (24).

Ukoncentriravanje primjenom *stackinga* i injektiranja cijele kapilare omogućuje injektiranje vrlo velikih volumena uzorka. Najčešće se izvodi tako da se negativno nabijeni analiti otopljeni u vodu injektiraju i napune cijelu ili najveći dio kapilare. Primjenom negativnog napona, anioni migriraju prema pozitivno nabijenoj elektrodi i ukoncentriravaju se na granici između zone injektiranja i radnog pufera. EOF prema svojoj prirodi nosi sve analite prema negativno nabijenoj elektrodi. Istovremeno, voda elektroosmotski izlazi iz kapilare kod negativno nabijene elektrode. Kako voda izlazi, na suprotnom kraju u kapilaru ulazi otopina radnog pufera. Kada analit dođe u doticaj s radnim puferom, započinje migracija, budući da doslovno nema električnog polja iznad radnog pufera visoke ionske jakosti jer iznad vode napon potpuno pada. Kada sva voda izađe iz kapilare, promijeni se polaritet i tada se analiti brzo razdvajaju i eluiraju. Važno je napomenuti kako izgleda dobiveni elektroferogram u ovoj situaciji. Na samom početku je bazna linija podignuta budući da je cijela kapilara već ispunjena otopinom analita. Kako dolazi do ukoncentriravanja na kraju zone, vidljiv je pik koji označava ukoncentrirane, ali nerazdvojene anione kada prolaze kroz kapilaru na mjestu detektora nošeni elektroosmotskim tokom. Nakon što se zamijeni polaritet tijekom analize, dolazi do razdvajanja analita u preostalom dijelu kapilare nakon mjesta prolaska detektora i ponovno analiti, ali ovaj put razdvojeni, prolaze kroz detektor. Isti se postupak može primijeniti i za analizu kationa, ali je tada nužno u otopinu dodati surfaktant koji će izmijeniti smjer elektroosmotskog toka.

Sweeping su kao *on-line* tehniku ukoncentriravanja uveli Quirino i Terabe 1998. godine. Mehanizam se temelji na interakciji analita i aditiva (primjerice pseudostacionarne faze u elektrokinetičkoj kromatografiji, ili kompleksirajućeg agensa u kapilarnoj zonskoj

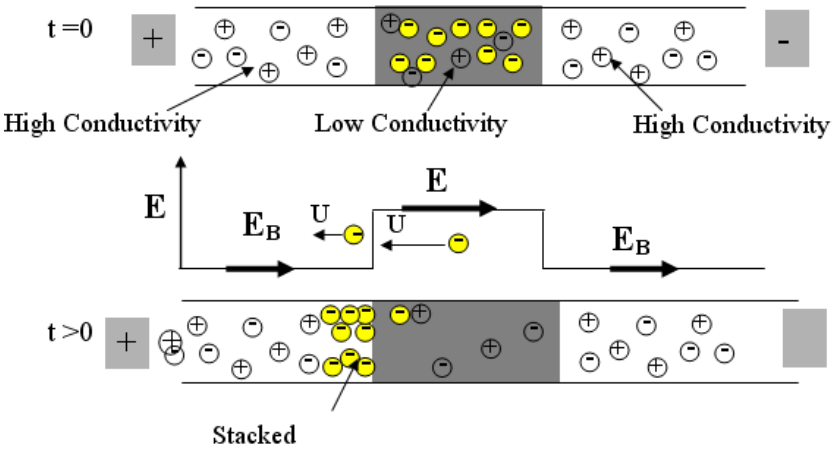
elektroforezi) i elektroforezi koja uzrokuje interakciju. Akumulacija i fokusiranje analita se odvija zahvaljujući kromatografskom odjeljivanju, kompleksaciji ili bilo kojoj drugoj interkaciji između analita i aditiva djelovanjem elektroforeze. Na ovaj se način mogu ukoncentrirati i neutralni i nabijeni analiti. Quirino i Terabe su u svom radu izvijestili da su postigli 5000 puta veću koncentraciju analita primjenom ove tehnike, što je iznimno poboljšanje osjetljivosti metode (34). Isti autori su samu tehniku razvijali i dalje, pa su primjerice kombinirali *stacking* i *sweeping* tehniku ukoncentriravanja primjenom mirkoemulzije i ciklodekstrina kao pseudostacionarne faze u MEKC metodi.

Prijelazna izotahoforeza je tehnika koja omogućuje ukoncentriravanje (do 1000 puta) analita prisutnih u tragovima u uzorku, dok glavne komponente pri tome ostaju nepromijenjene. Sama izotahoforeza označava elektroforezu pri istim, ujednačenim brzinama. U ovoj tehnici svi analiti putuju kapilarom istom brzinom, bez obzira na vlastite pokretljivosti. Prije same analize, oba spremnika za pufer napunjena su vodećim elektrolitom koji mora imati veću pokretljivost od analita od interesa. Kapilara se zatim ispuni vodećim elektrolitom. Potom se izvede injektiranje velikog volumena uzorka (do nekih 50% volumena kapilare), a nakon toga se spremnik na *inlet* dijelu promijeni u završni elektrolit (engl. *terminating electrolyte*), koji ima pokretljivost manju od svih analita prisutnih u uzorku, i zatim se primijeni napon na krajevima kapilare. Budući da su otopina pufera i uzorka heterogeni, jakost polja će biti obrnuto proporcionalna vodljivosti svake pojedine zone. Vodljivost ovisi o pokretljivosti i koncentraciji svakog analita. Za razliku od kapilarne zonske elektroforeze, izotahoforeza ima zone koje su uvijek u međusobnom kontaktu sa susjednom zonom. Budući da se ne koristi elektrolit u daljnoj analizi, ovo je nužno kako bi se osigurao električni kontinuitet kroz cijeli sustav.

Danas se izotahoforeza koristi neposredno nakon injektiranja u svrhu ukoncentriravanja, nakon čega uslijedi separacija kapilarnom zonskom elektroforezom. Prema

tome heterogeni pufer (vodeći, pa zatim završni) je u sustavu samo djelomično, odnosno prolazno, nakon čega slijedi primjena homogenog pufera i CZE razdvajanja.

Ukoncetriravanje uzorka primjenom pojačanog električnog polja (engl. *Field Amplified Sample Stacking*, FASS) je iznimno često korištena metoda ukoncentriravanja u kapilari. Jednostavna je i ne zahtijeva dodatne izvedbe na samom instrumentu. FASS koristi gradijent provodljivosti elektrolita, što rezultira nejednolikim elektromigracijskim protocima, a dovodi do povećanja koncentracije iona analita. FASS se najčešće koristi kao prekoncentracijski korak koji se odvija prije samog elektroforetskog razdvajanja analita. U prvoj fazi, ioni analita se prekoncentriraju primjenom heterogenih otopina elektrolita. Ioni analita su otopljeni u elektrolitu niže provodljivosti koji ima veliki električni otpor. To rezultira jačim električnim poljem na mjestu uzorka, a time i većom lokalnom elektroforetskom pokretljivošću. Ioni analita se kreću od mjesta jačeg polja i zone veće elektroforetske brzine, u područje nižeg polja i manje elektroforetske brzine. U drugoj fazi slijedi elektroforetsko razdvajanje ukoncentriranih analita primjenom homogene otopine elektrolita (Slika 14) (35).



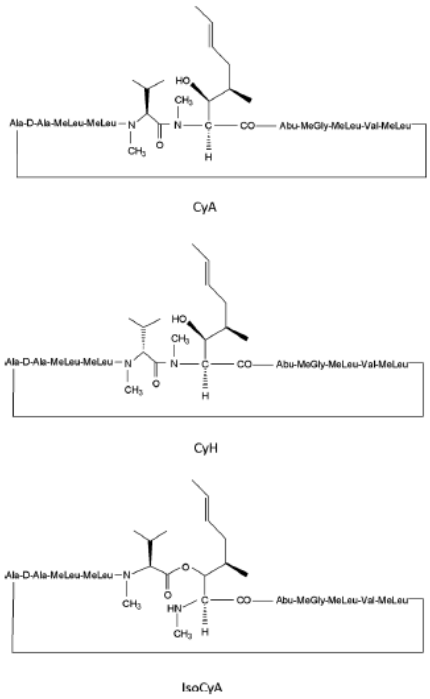
Slika 14. Shematski prikaz ukoncetriravanja uzorka primjenom pojačanog električnog polja. Ioni uzorka (označeni žuto) se ukoncentriravaju na izlasku iz zone niske vodljivosti, a na ulasku u zonu visoke vodljivosti (35).

4.4. Odabrani primjeri određivanja onečićenja u lijekovima primjenom kapilarne elektroforeze

4.4.1. Određivanje ciklosporina A i glavnih razgradnih produkata

Ciklosporin A (CyA) je ciklički polipeptid, sastoji se od 11 aminokiselina. Koristi se u terapiji prevencije odbacivanja organa nakon transplantacije, primjerice bubrega, jetre ili koštane srži. Ciklosporin pomaže zaustaviti odgovor odbacivanja blokirajući razvoj posebnih stanica koje bi napale presađeno tkivo. Također se koristi za liječenje teške psorijaze ili atopijskog dermatitisa, kao i kod teškog reumatoidnog artritisa ili nefrotskog sindroma.

Ciklička struktura ciklosporina smatra se stabilnom, no pod stres uvjetima dolazi do razgradnje u različite razgradne produkte. Racemizacijom N-metilvalina nastaje ciklosporin H (CyH). U kiselim uvjetima dolazi do N,O-acil migracije i formacije izociklosporina A (IsoCyA) kao glavnog razgradnog produkta (Slika 15).



Slika 15. Struktura ciklosporina A (CyA), ciklosporina H (CyH) i izociklosporina A (IsoCyA).

U svom radu Gotti i suradnici (36) predložili su kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu ciklosporina A i glavnih razgradnih produkata primjenom MEKC metode uz dodatak ciklodekstrina. Službena farmakopejska metoda primjenjuje HPLC tehniku za analizu ciklosporina A i njegova dva razgradna produkta. Uspješno razdvajanje navedenih analita moguće je jedino primjenom Hypersil ODS kolone i zakiseljene mobilne faze uz dodatak SDS-a. Kod drugih objavljenih HPLC metoda u pravilu je korištena jako visoka temperatura (70-80 ºC) kako bi se izbjeglo širenje kromatografskih pikova zbog različitih konformera ciklosporina. Autori su naveli da su do sada objavljene i neke kapilarno elektroforetske metode za analizu ciklosporina, ali su iznimno duge (96 min), i nisu uzimale u obzir određivanje razgradnih produkata.

Razdvajanje ciklosporina A i njegovih razgradnih produkata CyH i IsoCyA je zahtjevno zbog njihove strukturne sličnosti i velike hidrofobnosti, kao i nedostatka kromofora nužnih za analizu UV detektorom. CyA i CyH su neutralni spojevi, pa je primjena MEKC metode, odnosno dodatka ionskog surfaktanta, nužna za njihovu analizu. Autori su odabrali primjenu lužnatih uvjeta analize kako bi osigurali što snažniji EOF. Ispitali su dvije vrste pufera, natrijev fosfat i natrijev tetraborat. Boratni pufer pH 9,2 je pružao stabilniju baznu liniju od fostatnog pufera, pa je odabran za daljnju analizu. Korištena je kapilara s produljenim optičkim putom, kako bi se postigla bolja osjetljivost neophodna u analizi onečišćenja, duljine 64,5 cm, odnosno 56 cm do detektora. Napon analize bio je 22 kV, a temperatura kapilare 30 ºC.

Nakon toga je ispitan utjecaj različitih ionskih surfaktanata. Žučne soli (natrijev kolat, natrijev deoksikolat) i *zwitterionski* surfaktant CHAPS nisu bili prikladni zbog vlastite apsorpcije u niskom UV području (200-210 nm), što je bila ujedno jedina valna duljina pri kojoj se mogla vršiti analiza samog ciklosporina i njegovih razgradnih produkata. Najboljim ionskim surfaktantom pokazao se SDS. Budući da su analiti jako hidrofobni, njihovo vezanje

za micele SDS-a je bilo izraženo pa je vrijeme analize bilo jako dugo. Pri koncentraciji 50 mM SDS-a postignuto je tek djelomično razdvajanje CyA i IsoCyA u 60 minuta. Kako bi se riješio problem velike interakcije hidrofobnih analita i micela, autori su ispitali utjecaj dodatka organskog otapala u otopinu radnog pufera. Organsko otapalo u MEKC analizi može smanjiti afinitet i vezanje hidrofobnog analita i SDS micela. Ispitan je utjecaj acetonitrila, metanola, etanola, 1-propanola i 2-propanola. Nije bilo poboljšanja u razdvajanju analita. Dodatak 10% (*v/v*) 1-butanola omogućio je potpuno razdvajanje IsoCyA i CyA, i to u nekih 20 minuta, no CyA je još uvijek ko-eluirao s CyH. Daljnji dodatak 1-butanola, a s ciljem razdvajanja analita, nije bio moguć jer je dolazilo do zamućenja otopine. Stoga su Gotti i suradnici ispitali utjecaj dodatka ciklodesktrina (CD) u otopinu radnog pufera. Ovo se pokazalo ključnim korakom jer je sada na razdvajanje analita utjecalo i vezanje analita na micele, kao i interakcija analita s hidrofobnom unutrašnjošću ciklodekstrina. Nastajanje inkluzijskog kompleksa s kiralnom unutrašnjošću ciklodekstrina je u izravnom nadmetanju s raspodjelom analita između vodene otopine radnog pufera i SDS micele. Na ovaj se način značajno poboljšala selektivnost metode te omogućilo enantioselektivno razdvajanje ciklosporina. Autori su ispitali utjecaj αCD, βCD, γCD te derivatizirane HP-βCD, DM-βCD i TM-βCD u koncentraciji od 15 mM, dodanoj u otopinu 50 mM boratnog pufera i 50 mM SDS-a. Dodatak nativnih ciklodekstrina i HP-βCD nije značajno unaprijedio razdvajanje niti vrijeme analize. Metilirani ciklodekstrini su značajno smanjili vrijeme analize ciklosporina te poboljšali njihovo razdvajanje. TM-βCD se pokazao optimalnim i korišten je u daljnjim analizama. Nakon toga je ispitan utjecaj koncentracije ciklodekstrina (10-20 mM) i najbolje razdvajanje uz najkraće vrijeme analize dobiveno je primjenom 15 mM TM-βCD. U ovom je slučaju zapravo uspostavljena ravnoteža između analita u dvije različite pseudostacionarne faze, SDS micela koje imaju negativni naboj i putuju prema anodi, i neutralnih TM-βCD koji nošeni elektroosmotskim tokom putuju prema katodi i detektoru.

Utjecaj koncentracije ciklodekstrina je ograničen činjenicom da CD ulazi u snažne interakcije s SDS monomerima i sprječava njihovu agregaciju, odnosno formiranje micela. Dapačen CD utječe na kritičnu micelarnu koncentraciju (cmc) SDS-a, pa su autori u svom radu ujedno ispitali ovu vrijednost primjenom mjerenja električne struje.

Cmc vrijednost SDS-a u vodi je iznosila 7,9 mM, dok je u prisutnosti βCD i HP-βCD iznosila 8,2, odnosno 8,4 mM. Dodatkom 2 mM TM-βCD, cmc vrijednost je narasla na visokih 12,2 mM.

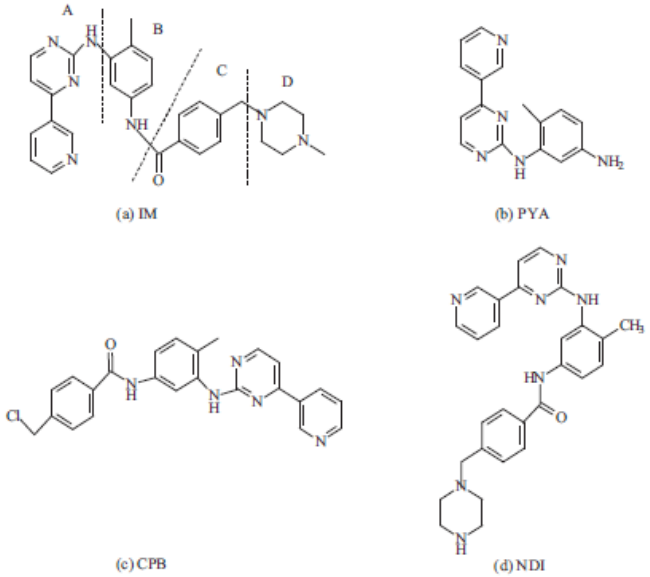
No, upravo je kombinacija SDS-a i TM-βCD bila ključna za formiranje SDS agregata, koje karakterizira smanjena raspodjela analita, što je omogućilo razdvajanje i analizu strukturno vrlo sličnih hidrofobnih spojeva, i to bez primjene iznimno visoke temperature tijekom analize.

Metoda je uspješno validirana i primijenjena za analizu farmaceutskih oblika. LOD vrijednosti iznosile su 2,5 µg/mL, a LOQ vrijednosti 0,25 mg/mL za CyA te 5,0 µg/mL za dva razgradna produkta. Iako to nije vrlo niska vrijednost, potrebno je napomenuti da je u analizi korištena koncentracija lijeka od 2,0 mg/mL.

4.4.2. Određivanje imatinib mesilata i njegovih onečišćenja

Imatinib mesilat je inhibitor tirozin kinaze, odobren od Američke agencije za lijekove i hranu (*American Food and Drug Administration*, FDA) za terapiju tumora gastrointestinalne strome 2002. godine te za terapiju kronične mijeloične leukemije 2011. godine. Kao i svaki lijek, imatinib ima svoja potencijalna, očekivana onečišćenja. U ovom su radu Li i suradnici (37) pratili tri potencijalna onečišćenja. N-(5-amino-2-metilfenil)-4(3-piridil)-2-pirimidinamin (PYA), poznat pod nazivom ima amin, koji može nastati u kiselim ili bazičnim uvjetima hidrolizom imatiniba. Drugo potencijalno onečišćenje je međuprodukt 4-klorometil-N-(4-metil-3-((4-piridin-3-il) pirimidin-2-il) amino) fenil benzamid (CPB). N-desmetil imatinib

(NDI) je N-[4-metil-3-(4-(piridin-3-il) pirimidin-2-ilamino]fenil)-4((piperazin-1-il)metil)benzamid, i može biti jedno od onečišćenja imatiniba ili čak glavni metabolit (Slika 16).



Slika 16. Struktura imatiniba i potencijalnih onečišćenja N-(5-amino-2-metilfenil)-4(3-piridil)-2-pirimidinamin (PYA), 4-klorometil-N-(4-metil-3-((4-piridin-3-il) pirimidin-2-il) amino) fenil benzamid (CPB) i N-desmetil imatinib (NDI).

Autori su koristili instrument s UV detektorom. Korištena je uobičajena kapilara promjera 50 µm, duljine 60 cm (efektivne duljine 52 cm) ispirana uobičajenom procedurom. Analiti su bazični i stoga dobro topljivi u kiselim uvjetima. U preliminarnim pokusima autori su ispitali utjecaj fosfatnog i Tris vodenog pufera pri niskim pH vrijednostima. No, razdvajanje svih analita nije bilo moguće. Stoga su autori ispitali utjecaj dodatka tri različita aditiva u otopinu radnog pufera, natrij- karboksimetil celulozu (Na-CMC), natrijev duodecil sulfat (SDS) i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin (HP-β-CD). Dodatak svih aditiva je značajno poboljšao razdvajanje, no najbolje razdvajanje među analitima je postignuto dodatkom HP-β-CD, pa je u daljnjim pokusima u otopinu radnog pufera dodavan ovaj ciklodekstrin. Osim vrste aditiva, važnu ulogu u selektivnosti metode, odnosno razdvajanju analita, ima njegova koncentracija. Autori su ispitali utjecaj HP-β-CD u koncentraciji 0-30 mM. Kritični parametar bilo je razdvajanje NDI i imatiniba zbog njihovih vrlo sličnih struktura.

Povećanjem koncentracije HP-β-CD, produljuju se vremena migracije analita, a rezolucija raste. Optimalnom se pokazala koncentracija od 5 mM HP-β-CD. Kako su svi analiti nabijeni, pH pufera ima dvojak utjecaj na vrijeme migracije i razlučivanje među analitima. Povećanje pH radnog pufera rezultira više ioniziranim silanolnim skupinama na unutrašnjoj stijenki kapilare, ali će i utjecati na stupanj ionizacije odabranih analita. Imatinib i onečišćenja su u kiselim uvjetima dobro topljivi i protonirani. Povećanje pH pufera od 1,4 do 4,0 je produljilo vrijeme analize. Pri višim pH vrijednostima, iako je EOF jači, pa bi i analiza trebala biti brža, utjecaj pH medija na deprotonaciju analita je imao veći učinak jer je značajno smanjio elektroforetsku pokretljivost analita. Dakle, utjecaj pH je na EOF i naboj analita imao suprotan učinak. Nakon optimizacije uvjeta i uspješnog razdvajanja analita, budući da je riječ o očekivanim onečišćenjima u gotovom ljekovitom obliku, autori su pristupili rješavanju problema osjetljivosti metode, budući da su koristili instrument s UV detekcijom, koja zbog kratkog optičkog puta ima nisku osjetljivost. Kako bi osigurali niže granice dokazivanja i određivanja, Li i suradnici su odabrali pristup ukoncentriravanja u samoj kapilari, kombinirajući FASS s tehnikom injektiranja velikog volumena uzorka.

Hidrodinamičko injektiranje je postignuto primjenom gravitacije. Visinska razlika između inleta i outleta je postavljena na 12 cm, a utjecaj vremena injektiranja je ispitan u rasponu od 10 do 120 s. Iako je, očekivano, intenzitet pika bio proporcionalan vremenu injektiranja, no pri još duljim vremenima je bazna linija bila nestabilna, pa je 120 s odabrano kao optimalno.

FASS se temelji na razlici u električnom polju između radnog pufera i otopine uzorka. Kada se primjenjuje elektrokinetičko injektiranje, onda osobine otopine uzorka igraju važnu ulogu u postizanju ukoncentriravanja analita. Stoga je ključni korak u optimizaciji metode bio ispitati utjecaj različitih tipova i pH otapala u kojem je uzorak otopljen. Odabir vrste otapala rezultirat će različitom viskoznošću, ionskom jakošću i silama između čestica koje

utječu na elektroforetski okoliš. Autori su u ovom radu ispitali utjecaj metanola, acetonitrila, acetona i vode te koncetracije natrijevog dihidrogen fosfatnog radnog pufera. Od ispitanih otapala, najintenzivniji signal dao je metanol, zatim smjesa acetonitril-voda, aceton-voda, čista voda i na kraju fosfatni pufer. Ovakav rezultat vjerojatno je posljedica činjenice da je najveća razlika u vodljivosti upravo između metanola i radnog pufera. Također je primijećeno da je intenzitet signala opadao kako je rasla koncentracija fosfatnog pufera, što također odgovara teorijskog pretpostavci, da što je razlika između vodljivosti otapala i otopine radnog pufera manja, i ukoncentriravanje će biti slabije.

Nakon što je metanol odabran kao otapalo za analit, proučen je utjecaj kiselosti metanola. Naime, ispitivani su analiti bazični pa u kiselom mediju dolazi do njihove protonacije. Primjenom elektrokinetičkog injektiranja, protonirani analiti su pogodni za ulazak u kapilaru. Primjena metanola kao otapala umanjuje ionizaciju analita, što rezultira značajno slabijim *stackingom*, odnosno slabijim intenzitetom signala. Stoga je ispitan utjecaj dodatka HCl u metanol. No, oprez je bio nužan jer dodatak HCl zapravo povećava vodljivosti zone uzorka, što ponovno djeluje nepovoljno na ukoncentriravanje. Ispitan je dodatak HCl u koncentraciji 0-20 mM. Kako nije intenzitet signala svih ispitivanih analita pokazivao najveći intenzitet pri istoj koncentraciji HCl-a, kao optimalnom je odabran 0,5 mM HCl.

Nakon što je odabrano otapalo, ispitan je utjecaj napona i vremena injektiranja. Iako je volumen injektiranja proporcionalan naponu i vremenu injektiranja, pri previsokim vrijednostima napona injektiranja, električna struja je bila nestabilna i dovodila je do slabe ponovljivosti. Ispitan je utjecaj napona injektiranja, pri vremenu injektiranja od 10 s, u rasponu od 2 kV do 15 kV. Povećanjem napona, intenzitet signala je rastao. Istovremeno se povećavala struja tijekom injektiranja. Kako ne bi došlo do pada struje pri visokim naponima injektiranja zbog niske vodljivosti uzorka, napon od 15 kV je odabran kao

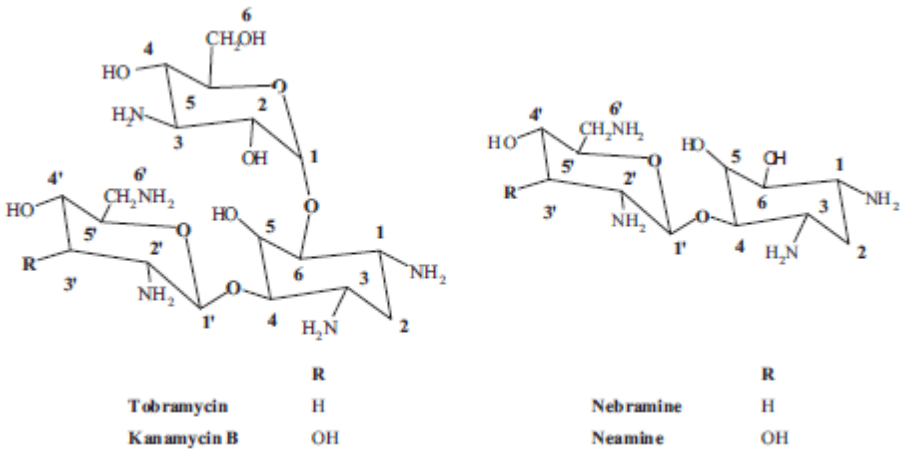
optimalan. Tada je ispitano vrijeme injektiranja, u rasponu 10 – 90 s. Ponovno je intenzitet pika, očekivano, rastao s vremenom injektiranja. No, pri vrijednostima većima od 60 s, pikovi su postajali iskrivljeni. Stoga je za daljnju analizu odabrano vrijeme injektiranja od 60 s.

Kada su optimizirani svi uvjeti, ponovno je ispitana razlika između elektrokinetičkog i hidrodinamičkog (gravitacijskog) injektiranja. Iako je razlika u vodljivosti bila ista, zona uzorka je bila značajno kraća pri elektrokinetičkom injektiranu, pa je ono korišteno u daljnjim analizama.

Metoda je uspješno validirana i primijenjena za praćenje procesa sinteze imatiniba. Postignute granice dokazivanja su bile iznimno niske i iznosile su redom za PYA, NDI i CPB 1,5 mg/mL, 2,7 ng/mL i 5,6 ng/mL, dakle gotovo tri reda veličine niže nego uobičajenom kapilarnoelektroforetskom metodom bez *on-line* ukoncentriravanja.

4.4.3. Određivanje tobramicina i srodnih tvari

Idući je primjer određivanje tobramicina i srodnih tvari primjenom kapilarne elektroforeze i beskontaktnog detektora vodljivosti (C^4D) (38). Tobramicin je aminoglikozidni antibiotik deriviran iz nebramicina, antibiotskog kompleksa koji se dobiva fermentacijom aktinomicete *Streptomyces tenebrarius* (Slika 17). Izazov u analitici tobramicina je da nema kromofor niti fluorofor u svojoj strukturi, što znači da ga se ne može analizirati primjenom UV ili fluorescencijskog detektora.



Slika 17. Kemijska struktura tobramicina i glavnih onečišćenja.

U ovom su radu autori predložili metodu kapilarne elektroforeze uz primjenu C^4D kao načina izravne metode detekcije tobramicina i njegovih onečišćenja. C^4D je elektrokemijski detektor, pri čemu se dvije elektrode nalaze izvan kapilare. Signal visoke frekvencije se primijeni na prvu elektrodu. Signal koji prolazi kroz otopinu unutar kapilare dolazi do druge elektrode i tamo se očitava na elektroničkom sklopu. Struja koja prolazi kroz detektorsku ćeliju je proporcionalna vodljivosti otopine unutar kapilare. C^4D je detektor koji postaje sve popularniji za primjenu u kapilarnoj elektroforezi. Može se koristiti za sve vrste analita, anorganske anione i katione, organske ione, aminokiseline, peptide i proteine, DNA fragmente, antibiotike i druge molekule. Uglavnom nisu potrebne nikakve modifikacije analita, a ograničenja detektora su usporediva s onima UV detektora.

Prednost u odnosu na postojeće objavljenje metode je činjenica da nije potrebna derivatizacija prije ili nakon kolone kao kod metoda tekućinske kromatografije. Osim detektora, autori su koristili uobičajenu kapilaru od neizvučenog kvarca, promjera 75 µm, duljine 65 cm i duljine do detektora 43 cm. Uzorci su injektirani hidrodinamički pri 3,45 kPa tijekom 5 s uz primijenjen napon od – 30 kV (katoda na injektorskom dijelu kapilare) i temperaturu od 25 ºC. Korišten je eDAQ C^4D detektor, uz amplitudu između pikova od 80 V i frekvenciju 600 kHz.

Tijekom razvoja metode korišten je eksperimentalni dizajn, pri čemu su četiri parametra: koncentracija radnog pufera, pH, koncentracija CTAB i temperatura kapilare, istovremeno mijenjana iznad i ispod središnje vrijednosti koja je odabrana na temelju preliminarnih ispitivanja. U otopinu radnog pufera dodana je smjesa 2-(N-morfolino)etansulfonske kiseline monohidrata (MES) i L-histidina, kako bi se vodljivost ranog pufera održala što nižom te kako bi se osigurao potrebni puferski sustav. Kao modifikator elektroosmotskog toka korišten je N-cetiltrimetil amonijev bromid (CTAB), ispod kritične micelarne koncentracije. Isprobane su različite smjese odnosno sastavi, a kao kriterij je promatrana dobra selektivnost, praćena kao razlučivanje između kanamicina B i neamina, te između neamina i tobramicina. Drugi je kriterij bila osjetljivost, praćena visinom pikova tobramicina i njegovih onečišćenja. Optimalnim se pokazao pufer sastava 25 mM MES, 0,3 mM CTAB i pH 6,4, podešen dodatkom L-histidina.

Prednost predložene metode u odnosu na postojeće je da nije potrebna derivatizacija, metoda je brza (vrijeme analize je 7 min) i uspješno je primijenjena za određivanje sadržaja u komercijalno dostupnim tabletama. Postignute granice dokazivanja i određivanja izražene su kao udio onečišćenja u uzorku koji sadrži 1,0 g/L tobramicina. Postignuta je dobra osjetljivost s LOD vrijednosti 0,4 mg/mL (0,04% m/m) i LOQ vrijednosi 1,3 mg/mL (0,1% m/m), što odgovara vrijednosti od 9 pg, odnosno 31 pg.

4.4.4. Analiza heparina i njegovih onečišćenja

Heparin je prirodni antikoagulant. To je heterogena smjesa sulfatnih mukopolisaharida koji se vežu za površinu endotelnih stanica i plazmatskih proteina. Koristi se u terapiji liječenja duboke venske tromboze, plućne embolije, nestabilne angine pektoris, akutne periferne arterijske okluzije te prevenciji zgrušavanja krvi pri vantjelesnoj cirkulaciji (tijekom postupka hemodijalize).

Tijekom 2008. godine dogodila se velika kriza heparinske kontaminacije, koja je još jednom uputila na zaključak o važnosti kontrole kakvoće lijekova i analize potencijalnih onečišćenja. FDA je tada počela zaprimati izvještaje o različitim nuspojavama izazvanima primjenom heparina, poput rekacija preosjetljivosti, niskog krvnog tlaka, angioedema, nedostatka daha, mučnine, povraćanja, proljeva i bolova u trbuhu. Nažalost, prijavljeni su i smrtni ishodi. U veljači 2008. godine je Baxter Healthcare Corporation povukao s tržišta niz proizvoda s heparinom. FDA je provela istragu i otkrila do tada nepoznato onečišćenje u heparinu. Ovaj kontaminirati heparin je također korišten u nekim medicinskim proizvodima, poput katetera, koji su također povučeni. Svi su proizvodi koristili djelatnu tvar (engl. Active Pharmaceutical Ingredient, API) od američke tvrtke SPL smještene u Kini. Daljnje su istrage otkrile da se onečišćenja nisu kontrolirala i uklonila odgovarajućim postupcima. Otkriveno je da je onečišćenje prisutno u svim uzorcima upitne kvalitete bio presulfatirani kondroitin sulfat (OSCS). To je polusintetski polimer koji se dobiva reakcijom sulfonacije kondroitin sulfata, glikozamina koji se koristi u terapiji osteoartritisa.

Posljedica ovog nesretnog događaja je da su se za karakterizaciju heparina počela promatrati njegova molekulska svojstva, a ne samo antikoagulacijska aktivnost. Danas se obavezno koriste ortogonalne analitičke metode kako bi se osigurala kvaliteta heparina. Nakon toga su uslijedile korekcije monografija i u Američkoj, i u Europskoj farmakopeji. Uglavnom se metode sada temelje na primjeni i spektroskopskih tehnika, i separacijskih metoda.

Wilegos i suradnici su određivali onečišćenja u heparinu kapilarnom elektroforezom (39). U prethodnom su istraživanju pokazali su da je optimalan izbor radnog pufera 600 mM litijev fosfat, pH 2,8. Njime su autori uspješno odvojili heparin, presulfatirani kondroitin sulfat (OSCS), dermatan sulfat (DS) i heparan sulfat (HS). Primjena pufera ovako visoke koncentracije, a niske pH vrijednosti, gotovo je u potpunosti smanjila elektroosmotski tok što

je osiguralo dobru ponovljivost vremena migracije. Kako bi se vrijednost struje tijekom analize održala što nižom, korištena je kapilara unutrašnjeg promjera 25 μm.

Autori ističu da se u kapilarnoj elektroforezi vrlo često razmatra izbor pufera, no da se ponekad manje vodi računa o protuionu. No, postoje brojna istraživanja koja su ukazala na to da se, primjerice, dobivaju puno brže analize i bolje razlučivanje primjenom natrijevog fosfata nego kalijevog fosfata. U MEKC metodi litij daje puno bolju učinkovitost i razlučivanje od natrija i kalija. Primjena trietilamina smanjuje elektroosmotski tok.

Na temelju svojih preliminarnih ispitivanja i prethodno objavljenih istraživanja, autori su zaključili da je za dobru separaciju heparina i njegovih onečišćenja nužan odabir fosfatnog pufera visoke koncentracije i niske pokretljivosti protuiona. Tijekom optimizacije metode autori su promatrali utjecaj pH pufera, odabira protuiona, koncentracije pufera, volumena injektiranja, duljine kapilare, napona, temperature, procedure ispiranja kapilare i koncentracije uzorka na brzinu analize, razlučivanje, robustnost i preciznost.

Wielgos i suradnici nadalje ističu da je primjena što dulje kapilare u svrhu postizanja što boljeg razlučivanja zapravo pogrešan pristup. Naime, spomenuti autori kažu da dvostruko dulje vrijeme analize rezultira svega 41% boljim razlučivanjem zbog difuzije, da je puno bolji pristup koristiti što kraću kapilaru, a optimizaciju razlučivanja ispitati odabirom odgovarajućeg pufera. U svom su radu autori injektirali heparin hidrodinamički, uz primjenu napona – 14 kV na katodnom dijelu kapilare, pa je duljina iznosila svega 8,5 cm.

Tijekom razvoja i optimizacije metode, autori su najprije odabrali odgovarajući pufer. Autori su tako ispitali utjecaj natrija, etanolamina, amonija, TRIS-a, BIS-TRIS-a i litijevog fosfata, pri čemu su koncentraciju protuiona držali stalnom na 600 mM. Autori su na temelju dobivenih elektroferograma mogli zaključiti da se najoštriji pik dobio primjenom BIS-TRIS fosfatnog pufera, ali da razlučivanje između heparina i OSCS-a nije bilo dobro. Najbolje razlučivanje dobiveno je primjenom litijevog fosfata.

Utjecaj pH na ionizaciju heparina i njegovih onečišćenja nije značajan budući da su pri cijelom pH rasponu koji se koristi u CE sulfatne skupine ionizirane. No, ipak se, ovisno o odabiru protuina, primjerica natrija ili litija, utjecaj pH razlikovao. Kod litijevog fosfatnog pufera, utjecaj pH je bio najmanji, a za daljnju je analizu odabrana pH vrijednost 2,5.

Nadalje je ispitan utjecaj duljine kapilare. Primjenom istih uvjeta analize (pufer, temperatura, jakost polja, uzorak, ispitan je utjecaj injektiranja na dugom (24,5 cm) i kratkom (8,5 cm) dijelu kapilare. Očekivano, injektiranjem na dugom kraju kapilare, uz primjenu 600 mM litijevog fosfata pH 2,5 razlučivanje je bilo postignuto. Na kraćem je kraju kapilare bila potrebna dodatna optimizacija uvjeta analize kako bi se osiguralo razdvajanje analita. Autori su stoga još povećali koncentraciju radnog pufera do vrijednosti 1,0 M, pri čemu je struja unutar kapilare iznosila svega 75 μA. Ovakav je pristup, gdje je duljina kapilare skraćena za otprilike dvije trećine, samo neznatno smanjila razlučivanje između OSCS-a i heparina, ali je značajano poboljšala osjetljivost i razlučivanje između pikova heparina i DS-a, vjerojatno uslijed manjeg širenja pikova.

Wielgos i suradnici su također ispitali utjecaj volumena injektiranja, vodeći pri tome računa o potrebi postizanja niskih vrijednosti granica dokazivanja i određivanja te o problemu širenja pikova kod većih injektiranih volumena uzorka. Već primjenom 1 M pufera dolazi do *stackinga* analita. No, izazov je predstavljala činjenica da heparin ima veliki broj sulfatnih skupina pa stoga ima visoku gustoću naboja. Osim toga, primijenjena koncentracija heparina (50 mg/mL) je vrlo visoka za kapilarnu elektroforezu, gdje je uobičajena koncentracija analita tijekom analize za tri reda veličine manja (50 μg/mL). Povećanje tlaka i vremena injektiranja od 250 do 1000 mbs, očekivano je dovelo do širenja pika OSCS-a. Za pikove heparina i DS-a nije bilo značajnog utjecaja vremena injektiranja jer su pikovi u startu već bili vrlo široki.

Kako je uvjet prema ICH smjernicama da LOD za onečišćenja bude manji od 0,1% koncentracije heparina, ispitana je najveća moguća koncentracija lijeka koja se može

injektirati, a da ne dolazi do pretjeranog širenja pika. Pri koncentraciji 48 mg/mL, širenje pika OSCS-a je bilo umjereno, dok je pri koncentraciji 100 mg/mL bilo značajno.

Utjecaj temperature kapilare nije bio značajan. Povećanje temperature s 20 ºC na 30 ºC je smanjilo vrijeme migracije OSCS-a za nekih 12 sekundi, no razlučivanje je bilo najbolje pri temperaturi 20 ºC, stoga je ona korištena u daljnoj analizi.

Nakon optimizacije kapilarnoelektroforetske metode, analiza je provedena primjenom CE i NMR tehnike, kao farmakopejskih tehnika za određivanje onečišćenja, posebice OSCS-a u uzorcima heparina. NMR tehnikom je udio OSCS-a i DS-a izračunat prema normaliziranoj površini pika heparina. CE tehnikom je kvantifikacija onečišćenja rađena primjenom kalibracijskih krivulja uz upotrebu vanjskog standarda.

Iznimno brza (5 min) CE metoda uspješno je primijenjena za analizu 29 uzoraka heparina te su je autori poslali na verifikaciju u različite laboratorije diljem svijeta.

5. ZAKLJUČAK

Ispitivanje i kontrola onečišćenja u lijekovima ključno je pitanje u farmaceutskoj kontroli kakvoće zbog njihovog potencijalnost učinka na sigurnost i učinkovitost lijeka. Farmakopejske monografije u pravilu koriste tehniku tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za analizu onečišćenja, a ICH smjernice određuju granice za onečišćenja prisutna u aktivnim supstancijama u gotovim farmaceutskim proizvodima.

Kapilarna elektroforeza je farmakopejska tehnika koja se najčešće koristi kao komplementarna tehnika tekućinskoj kromatografiji. Ima čitav niz prednosti, poput kratkog vremena analize, mogućnosti analize gotovo svih vrsta analita, zahvaljujući velikom broju mehanizama koji omogućuju razdvajanje analita, također su potrebni vrlo mali volumeni otapala i uzorka, što ju čini i financijski, i ekološki vrlo prihvatljivom.

Dva najveća nedostatka tehnike su slabija robusnost i osjetljivost u odnosu na tekućinsku kromatografiju. Problem slabije ponovljivosti najčešće se uspješno svlada primjenom unutrašnjeg standarda. Postizanje bolje osjetljivosti metode moguće je primjenom kapilara s proširenim optičkim putem (*bubble cell* kapilara, Z-kapilara ili ćelije visoke osjetljivosti). Primjena detektora koji ima bolju osjetljivost od uobičajeno korištenog UV detektora (primjerice maseni ili fluorescencijski detektor) također će osigurati niže granice dozivanja i određivanja, ali laboratorij mora takvu tehnologiju imati na raspolaganju. Treći način postizanja bolje osjetljivosti metode je *on-line* ukoncentriravanje: *stacking* uzorka, prolazna izotahoforeza, *stacking* posredovan pH vrijednošću medija, *sweeping*, dinamičko pH spajanje, samo-fokusiranje s fotopolimeriziranim poroznim monolitima i učinci gradijenta otapala. Navedene se tehnike mogu izvoditi individualno ili se mogu međusobno kombinirati, a svima im je zajedničko da prije samog razdvajanja analita, najprije dolazi do njegovog ukoncentriravanja. Primjenom nekih od ovih tehnika, bez dodatnih tehnoloških izvedbi na samom instrumentu, mogu se osigurati i do tri reda veličine niže granice dokazivanja i

određivanja. Na taj način kapilarna elektroforeza može odgovoriti zahtjevima postavljenima u ICH smjernicama te se njenom primjenom uspješno mogu određivati onečišćenja u lijekovima.

6. LITERATURA

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3A (R2) (2006)
2. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Products Q3B (R2) (2006)
3. Ahuja S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. Adv Drug Deliver Rev 2007; 59: 3–11.
4. Prabu SL, Suriyaprakash TNK. Impurities and its importance in pharmacy. Int J Pharm Sci Rev Res 2010;3: 66–71.
5. Singh S, Handa T, Narayanam M, Sahu A, Junwal M, Shah RP. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. J Pharm Biomed Anal, 2012;69: 148–173.
6. Qiu F, Norwood DL. Identification of Pharmaceutical Impurities. J Liq Chrom Relat Tech 2007;30: 877–935.
7. Nigović B, Smolčić I. Metalna onečišćenja u kontroli kakvoće lijekova. Farm Glas 2016;72: 215–227.
8. Nigović B, Sertić M. Onečišćenja u lijekovima. Farm Glas 2012;68: 77–88.
9. Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina. Doktorski rad, 2013.
10. Nigović B. Analitika lijekova - interna skripta. *Available at: http://www.pharma.unizg.hr/ Accessed April 17, 2016.*
11. Shah S R, Patel MA, Naik MV, Pradhan P, Upadhyay U. (2012). Recent approaches of „impurity profiling“ in pharmaceutical analysis: a review. Int J Pharm Sci Res 2012;3: 3603–3617.
12. ICH Harmonised Guideline, Guideline for Elemental Impurities Q3D (2014)

13. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances Q6A (1999)
14. Guidance for Industry ANDAs: Impurities in Drug Products *Available at: http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072861.pdf Accessed April 22, 2016.*
15. Sertić M, Nigović B, Jug M. Analiza kiralnih lijekova kapilarnom elektroforezom. Farm Glas 2010;66: 467–476.
16. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - praktikum. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2014
17. Damić M, Nigović B. (2010). Kapilarna elektroforeza u farmaciji. Farm Glas 2010;66: 195–207.
18. Nigović B, Damić M, Injac R, Kočevar Glavač N, Štrukelj B. Analysis of Atorvastatin and Related Substances by MEKC. Chromatographia 2009; 69: 1299–1305.
19. Kühn KD, Weber C, Kreis S, Holzgrabe U. Evaluation of the stability of gentamicin in different antibiotic carriers using a validated MEKC method. J Pharm Biomed Anal 2008;48: 612–618.
20. Rodríguez Flores J, Salcedo AMC, Llerena MJV, Fernández LM. Micellar electrokinetic chromatographic method for the determination of letrozole, citalopram and their metabolites in human urine. J Chromatogr A 2008;1185: 281–290.
21. Sedo K, Demarest C, Liu M, Wright PB. Systematic development and validation of stability indicating micellar electrokinetic chromatography methods for early stage drug candidates. J Chromatogr A 2003;988: 297–307.
22. Piljac I. Elektroforeza. Media Print; 2006.

23. Watson DG. Ur. Pharmaceutical Analysis. Churchile Livingstone, Elsevier Limited; 2005, str. 376-397.
24. Weinberger R. Practical Capillary Electrophoresis. Academic Press; 2000.
25. Lauer HH, Rozing GP. High Performance Capillary Electrophoresis. A primer. Agilent Technologies; 2009.
26. El Deeb S, Watzig H, El-Hady DA, Albishri HM, van de Griend CS, Scriba GKE. Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis. Electrophoresis 2014;35: 170–189.
27. Shintani H, Polonsky J. Handbook of Capillary Electrophoresis Applications. Blackie Academic & Professional; 1997.
28. Broderick M, Donegan S, Power J, Altria K. Optimisation and use of water-in-oil MEEKC in pharmaceutical analysis. J Pharm Biomed Anal 2005;37: 877–84.
29. Huie CW. Recent applications of microemulsion electrokinetic chromatography. Electrophoresis 2006;27: 60–75.
30. Kenndler E. A critical overview of non-aqueous capillary electrophoresis. Part I: mobility and separation selectivity. J Chromatogr A 2014;1335: 16–30.
31. Whatley H, Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. U: Petersen J, and Mohhamad AA ur. Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis. Springer Science+Business Media; 2001, str. 21-58.
32. Engelhardt H, Beck W, Schmitt T. Capillary Electrophoresis Methods and Potentials. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellccgaft mbH; 1996.
33. Aranas AT, Guidote AM, Quirino JP. Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. Anal Bioanal Chem 2009;394: 175–85.
34. Kruaysawat J, Marriott PJ, Hughes J, Trenerry C. Large-volume stacking with polarity

switching and sweeping for chlorophenols and chlorophenoxy acids in capillary electrophoresis. Electrophoresis 2003;24: 2180–2187.

35. Optimization of On-Chip Field Amplified Sample Stacking. *Available at: http://microfluidics.stanford.edu/Projects/Archive/stack.htm Accessed April 30. 2016*.
36. Gotti R, Furlanetto S, Santagati NA. Analysis of Cyclosporin A and Main Degradation Impurities by Cyclodextrin–Modified Micellar Electrokinetic Chromatography. Anal Lett 2012;45: 665–676.
37. Li J, Huang Y, Huang L, Ye L, Zhou Z, Xiang G, Xu L. (2012). Determination of imatinib mesylate and related compounds by field amplified sample stacking with large volume sample injection capillary electrophoresis. J Pharm Biomed Anal 2012;70: 26–31.
38. El-Attug MN, Hoogmartens J, Adams E, Van Schepdael A. Optimization of capillary electrophoresis method with contactless conductivity detection for the analysis of tobramycin and its related substances. J Pharm Biomed Anal 2012;58: 49–57.
39. Wielgos T, Havel K, Ivanova N, Weinberger R. Determination of impurities in heparin by capillary electrophoresis using high molarity phosphate buffers. J Pharm Biomed Anal 2009;49: 319–326.

7. POPIS KRATICA

API (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*) – aktivna ljekovita supstancija

CCE (engl. *Chiral Capillary Electrophoresis*) – kiralna kapilarna elektroforeza

CE (engl. *Capillary Electrophoresis*) – kapilarna elektroforeza

CEC (engl. *Capillary Electrochromatography*) – kapilarna elektrokromatografija

CE-MS – vezani sustav kapilarne elektroforeze i masene spektrometrije

CGE (engl. *Capillary Gel Electrophoresis*) – kapilarna gel elektroforeza

CIEF (engl. *Capillary Isoelectric Focusing*) – kapilarno izoelektrično fokusiranje

CITP (engl. *Capillary Isotachophoresis*) – kapilarna izotahoforeza

CZE (engl. *Capillary Zone Electrophoresis*) – kapilarna zonska elektroforeza

DAD (engl. *Diode Array Detector*) – detektor s nizom fotosenzitivnih dioda

EOF (engl. *Electroosmostic Flow*) – elektroosmotski tok

ESI (engl. *Electrospray Ionization*) – ionizacija elektrorasprsenjem

FDA (engl. *Food and Drug Administration*) – Američka agencija za hranu i lijekove

GC (engl. *Gas Chromatography*) – plinska kromatografija

GC-MS – vezani sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije

HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPTLC (engl. *High Performance Thin-Layer Chromatography*) – tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti

ICH (engl. *International Conference on Harmonization*) – Međunarodna konferencija o harmonizaciji

LC-MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije

LOD (engl. *Limit of Detection*) – granica dokazivanja

LOQ (engl. *Limit of Quantification*) – granica određivanja

MEEKC (engl. *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*) – mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija

MEKC (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*) – micelarna elektrokinetička kromatografija

MS (engl. *Mass Spectrometry*) – masena spektrometrija

MS/MS – tandemska masena spektrometrija

NACE (engl. *Nonaqueous Capillary Electrophoresis*) – nevodena kapilarna elektroforeza

NMR (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) – nuklearna magnetska rezonancija

Ph. Eur. (engl. *European Pharmacopoeia*) – Europska farmakopeja

SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate*) – natrijev dodecilsulfat

SPE (engl. *Solid-Phase Extraction*) – ekstrakcija na čvrstoj fazi

TLC (engl. *Thin-Layer Chromatography*) – tankoslojna kromatografija

UPLC (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

8. ŽIVOTOPIS

Doc. dr. sc. Miranda Sertić zaposlena je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija diplomskog studija Analitika lijekova i Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda. Također sudjeluje u izvođenju nastave na kolegijima poslijediplomskog specijalističkog studija Kontrola kakvoće lijekova i Analitički postupci u identifikaciji krivotvorenih farmaceutskih proizvoda. Područje njezina znanstveno-istraživačkog interesa je razvoj novih analitičkih metoda za analizu lijekova i kontrolu kvalitete dodataka prehrani, s naglaskom na analitičke tehnike: kapilarnu elektroforezu, tekućinsku i plinsku kromatografiju te masenu spektrometriju.

Obrazovanje:
2013. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Poslijediplomski doktorski studij, akademski stupanj: doktor znanosti u području biomedicine i zdravstva
2006. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Diplomski studij farmacije, akademski stupanj: magistar farmacije

Radno iskustvo:
2016.-danas: docentica na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2013.-danas: viša asistentica-znanstvena novakinja na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2007.-2013.: asistentica-znanstvena novakinja na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2006.-2007.: magistra farmacije-stažistica u ZU Ljekarne Dvoržak, Zagreb

Boravci na stranim institucijama:
rujan-prosinac 2009. Institut za kemijsku metodologiju Talijanskog istraživačkog vijeća, Rim, Italija
ožujak-lipanj 2008. Farmaceutski fakultet Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija

Projekti:
1. COST Action BM1403 Native Mass Spectrometry and Related Methods for Structural Biology (2015-2018), nacionalni zamjenik, voditelj Prof. Dr. Frank Sobott

2. Istraživanje novih metoda u analitici ljekovitih i bioaktivnih tvari (006-0061117-1240), Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH (2007-2013), voditelj prof. dr. sc. Biljana Nigović

3. Nove elektroanalitičke, kapilarnoelektroforetske i kromatografske metode za kontrolu kvalitete lijekova i dodataka prehrani, Sveučilište u Zagrebu, voditelj prof. dr. sc. Biljana Nigović (2013)

4. Razvoj nanosenzora i naprednih analitičkih metoda za određivanje lijekova, Sveučilište u Zagrebu, voditelj prof. dr. sc. Biljana Nigović (2014)

5. Razvoj i primjena novih metoda analize lijekova i bioaktivnih molekula u kompleksnim uzorcima, Sveučilište u Zagrebu, voditelj prof. dr. sc. Biljana Nigović (2015)

6. Razvoj novih analitičkih metoda kao preduvjet proizvodnje visokokvalitetnog i ekološki dobivenog maslinovog ulja, Zaklada Adris, voditelj prof. dr. sc. Ana Mornar Turk (2015-2016)

7. Adverse effects of single and combined mycotoxins produced by Aspergilli, Hrvatska zaklada za znanost, voditelj prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić (2016-2020)

Nagrade i priznanja:
Dobitnik diplome Hrvatskog farmaceutskog društva za višegodišnji predan i uspješan rad u okviru HFD-a (2013).
Dobitnik stipendije za mladog znanstvenika CROTOX2012 (4. hrvatski toksikološki kongres, 2.-5. listopada 2012., Primošten, Hrvatska).
Stipendija Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske tijekom studija kao jedan od najboljih studenata na godini (2004-2006).

Članstva u profesionalnim udrugama/društvima:
Član Hrvatskog farmaceutskog društva (2006.-danas; Član izvršnog odbora Sekcije farmaceuta juniora Hrvatskog farmaceutskog društva 2008.-danas)
Član Hrvatske ljekarničke komore (2007.-danas)
Društvo prijatelja Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu AMA-FBF (2008.-danas)
Član Svjetske farmaceutske federacije FIP (2016-danas)

Ostalo:
Predsjednica izvršnog odbora Sekcije farmaceuta juniora i član upravnog odbora Hrvatskog farmaceutskog društva (2014.-danas)
Organizacija javnozdravstvenih projekata Sekcije farmaceuta juniora Hrvatskog farmaceutskog društva (Dan dijabetesa 2014 i 2015; Europski dan svjesnosti o antibioticima 2014 i 2015; Dan ljekarni 2015; Svjetski dan KOPB-a 2015; Svjetski dan astme 2016)
Organizacijski i znanstveni odbor Simpozija studenata farmacije i medicinske biokemije FARMBES (2012, 2013, 2014, 2015, 2016)
Popularizacija znanosti (Festival znanosti 2010, 2012, 2013, 2015, 2016)