

# Optimizacija predobrade uzoraka ekstrakcijom čvrstom fazom za određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline

---

Rebrina, Anica

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:597038>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Anica Rebrina**

**Optimizacija predobrade uzoraka  
ekstrakcijom čvrstom fazom za određivanje  
azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pruženoj prilici, stručnom vođenju, izdvojenom vremenu, strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala i prof. dr. sc. Biljani Nigović na stručnom vođenju kroz kolegij Analitika lijekova i na ukazanom povjerenju i prilici.*

*Također, hvala i dr. sc. Danieli Amidžić Klarić za svu potporu u izradi diplomskog rada.*

*Hvala i ostalim djelatnicima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta koji su bili spremni pomoći.*

*Zahvaljujem se i Hrvatskoj zakladi za znanost koja je sufinancirala ovaj rad projektom UIP-2017-05-3949, IBDAnalytics.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci tijekom samog studiranja, ali i uvijek u životu.*

# SADRŽAJ

|           |                                                    |           |
|-----------|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>UVOD</b>                                        | <b>1</b>  |
| 1.1       | Bioanalitika                                       | 1         |
| 1.2       | Ekstrakcija čvrstom fazom                          | 2         |
| 1.3       | Upalne bolesti crijeva                             | 3         |
| 1.3.1     | Azatioprin i 6-tiogvanin                           | 4         |
| 1.3.2     | Deficit folata u osoba s upalnim bolestima crijeva | 6         |
| <b>2.</b> | <b>OBRAZLOŽENJE TEME</b>                           | <b>8</b>  |
| <b>3.</b> | <b>MATERIJALI I METODE</b>                         | <b>9</b>  |
| 3.1       | Materijali                                         | 9         |
| 3.1.1     | Kemikalije                                         | 9         |
| 3.1.2     | Radni instrumenti                                  | 9         |
| 3.1.3     | Pribor                                             | 9         |
| 3.1.4     | Programski paketi                                  | 10        |
| 3.2       | Metode                                             | 10        |
| 3.2.1     | Priprema pokretne faze                             | 10        |
| 3.2.2     | Priprema standardnih otopina                       | 11        |
| 3.2.3     | Priprema ispitivanih uzorka                        | 11        |
| 3.2.4     | Kromatografska analiza                             | 11        |
| 3.2.5     | Masena spektrometrija                              | 12        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI I RASPRAVA</b>                        | <b>13</b> |
| 4.1       | Osnovna načela ekstrakcije čvrstom fazom           | 13        |
| 4.1.1     | Silikagel i modificirani silikagel                 | 17        |
| 4.1.2     | Polimerni sorbensi                                 | 19        |
| 4.1.3     | Kolona za uklanjanje fosfolipida iz uzorka         | 21        |
| <b>5.</b> | <b>ZAKLJUČCI</b>                                   | <b>25</b> |

|                                                                    |                                |           |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------|
| <b>6.</b>                                                          | <b>LITERATURA.....</b>         | <b>27</b> |
| <b>7.</b>                                                          | <b>SAŽETAK / SUMMARY .....</b> | <b>30</b> |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b> |                                |           |

# POPIS KRATICA I SIMBOLA

|               |                                                                                                            |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6-TG</b>   | 6-tiogvanin (engl. <i>6-thioguanine</i> )                                                                  |
| <b>DAD</b>    | Detektor s nizom dioda (engl. <i>Diode Array Detector</i> )                                                |
| <b>DNK</b>    | Deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )                                        |
| <b>GC</b>     | Plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i> )                                                  |
| <b>HGPRT</b>  | Hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza (engl. <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> ) |
| <b>HLB</b>    | Hidrofilno – lipofilni balans (engl. <i>Hydrophile-Lipophile Balance</i> )                                 |
| <b>HPLC</b>   | Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )     |
| <b>IBD</b>    | Upalne bolesti crijeva (engl. <i>Inflammatory Bowel Diseases</i> )                                         |
| <b>LC</b>     | Tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid Chromatography</i> )                                            |
| <b>LLE</b>    | Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. <i>Liquid-Liquid Extraction</i> )                                         |
| <b>MS</b>     | Masena spektrometrija (engl. <i>Mass Spectrometry</i> )                                                    |
| <b>MSD</b>    | Detektor maseni spektrometar (engl. <i>Mass Spectrometry Detector</i> )                                    |
| <b>PS-DVB</b> | Stiren-divinilbenzen kopolimer (engl. <i>Polystyrene Divinylbenzene</i> )                                  |
| <b>SPE</b>    | Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. <i>Solid Phase Extraction</i> )                                           |

# 1. UVOD

## 1.1 BIOANALITIKA

Bioanalitika obuhvaća kvalitativnu i kvantitativnu analizu lijekova, metabolita te biomarkera u biološkim uzorcima poput pune krvi, seruma, plazme, urina, tkiva, sline i sl. (Mornar i sur, 2013). Postupak bioanalize uključuje sakupljanje uzoraka, skladištenje uzoraka, pripremanje uzoraka, separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju analita te izvješće o rezultatima. Prije razdvajanja sastavnica uzorka nanošenjem na kromatografsku kolonu, uzorak treba pripremiti tako što se analit otapa u odgovarajućem otapalu, uklanja se što je moguće više interferencija te se analit ukoncentrirava (Evans, 2004).

Biološki uzorci su složeni te često uz analit sadrže niz drugih sastavnica poput stanica, proteina, lipida, lipoproteina, ugljikohidrata, soli, kiselina i baza, stoga mogu umanjiti selektivnost i osjetljivost bioanalize te uzrokovati oštećenje analitičkog instrumenta (Mornar, 2016). Kromatogram složenog uzorka prikazuje brojne pikove koji nisu od interesa. Cilj razvoja ili unaprijeđenja postojećih analitičkih tehnika je brže, točnije, preciznije ali i jeftinije provođenje bioanaliza. Među ovim tehnikama najvažnije mjesto zauzima vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Međutim, složeni biološki uzorci mogu smanjiti selektivnost i osjetljivost i ovoj vrhunskoj analitičkoj tehnici (Mornar i sur., 2013). Stoga je priprema biološkog uzorka za analizu često najkritičniji i najteži dio, u smislu potrebnog vremena i poteškoća pri ekstrakciji željenog analita iz matriksa (Vaghela i sur., 2016).

Priprema uzorka služi za pročišćavanje i/ili ukoncentriravanje uzorka prije same analize da bi se poboljšala detekcija, a s obzirom na svojstva biološkog uzorka i ciljeve analize pristupa se različitoj pripremi uzorka.

Prvi koraci analize, uzimanje i priprema uzorka, presudni su koraci koji omogućavaju odgovarajuću biološku interpretaciju ([www.americanpharmaceuticalreview.com](http://www.americanpharmaceuticalreview.com)).

Iako je tijekom posljednjih godina razvijen niz tehnika pripreme uzoraka koje omogućavaju uklanjanje interferencija poput proteina, lipida i soli, ali i selektivnu ekstrakciju analita, još uvijek učinkovita priprema uzorka oduzima i do 80% vremena bioanalitičaru te je ujedno i najčešći izvor pogrešaka cjelokupnog bioanalitičkog postupka (Buszewski i Szultka, 2012; Mornar, 2016). Pogreške nastale u ovom koraku ne mogu naknadno biti ispravljene, bez

obzira na korištenje i najnovijih kromatografskih tehnika i detektora. Stoga je odabir odgovarajuće metode pripreme uzorka veoma važan u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju željene sastavnice. Ovaj korak nužan je iz više razloga: da bi se eliminirale moguće interferencije ostalih sastavnica, da bi se koncentrirao i stabilizirao željeni analit u uzorku, te da bi se uzorak doveo do optimalnih uvjeta za daljnu kromatografsku analizu (Buszewski i Szultka, 2012).

Najčešće tehnike pripreme bioloških uzoraka su:

1. Taloženje proteina je starija tehnika pripreme bioloških uzoraka koja uključuje denaturaciju proteina pod utjecajem kiseline, baze, zagrijavanjem ili dodatkom organskog otapala;

2. Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) jedna je od najstarijih i dosad najkorištenijih tehnika pripreme bioloških uzoraka. Brojni su nedostaci ove metode kao što su slaba selektivnost, neprimjenjivost za hidrofilne, vodotopljive analite, niska i slabo ponovljiva ekstrakcijska učinkovitost te potrošnja velike količine organskih otapala koje treba zbrinuti nakon provođenja analize. Zbog navedenih nedostataka ova metoda sve više ustupa prednost drugim tehnikama;

3. Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) je metoda koja se sve češće koristi u bioanalitici zbog potrebe za sve manjom uporabom organskih otapala i što većom osjetljivošću bioanalitičkih metoda (Mornar i sur., 2013).

## **1.2 EKSTRAKCIJA ČVRSTOM FAZOM**

Ekstrakcija čvrstom fazom je oblik pripreme uzorka koji omogućuje izolaciju željenog analita uklanjajući interferirajuće sastavnice uzorka. To omogućuje dobivanje čistih ekstrakta i koncentriranih uzoraka te duži životni vijek kolone i bolje kromatografske rezultate ([www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)). Ukoliko se prikladno optimiziraju uvjeti ekstrakcije, ovom tehnikom moguće je postići uspješno uklanjanje soli, proteina i lipida iz bioloških uzoraka te ukoncentriravanje jednog ili više analita. Danas je ekstrakcija čvrstom fazom našla primjenu u analitici lijekova, dodataka prehrani, hrane, pića te u bioanalitici (Mornar, 2016). Tome su pridonijele mnoge prednosti ove metode kao što su reproducibilnost podataka, preciznost,

relativno niski troškovi, jednostavnost rukovanja kao i mogućnost automatizacije i direktnog povezivanja s drugim metodama (Buszewski i Szultka, 2012). Ekstrakcija čvrstom fazom je veoma korisna ekstrakcijska metoda s obzirom na mogućnost *off-line* i *on-line* izvedbe selektivne separacije. *Off-line* ekstrakcijski uzorci pripremaju se prije kromatografskog mjerenja, dok je *on-line* ekstrakcija čvrstom fazom direktno povezana s kromatografskim sustavom što donosi prednost u smislu manje kontaminacije uzorka, automatizacije i veće osjetljivosti (Buszewski i Szultka, 2012).

Ova tehnika pripreme uzorka iznimno se razvija posljednjih godina u smislu pojave novih inovativnih vrsta reaktivnih sorbensa kao i modifikacija tehnike u smislu automatizacije te poboljšanja ekološke prihvatljivosti (Mornar, 2016). Iz navedenih razloga jasno je zašto ekstrakcija čvrstom fazom ima jednu od vodećih uloga među metodama pripreme uzorka u bioanalitici.

### 1.3 UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) su kronična upalna stanja gastrointestinalnog trakta koja obuhvaćaju dva glavna klinička entiteta različite patofiziologije: Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. Uzrok nastanka upalnih bolesti crijeva nije sasvim jasan, ali zna se da je u podlozi poremećaj imunosnog sustava čovjeka. Smatra se da se takva upala može dogoditi samo kod osoba koje nose određene promjene na svojim genima, i to na poticaj faktora iz okoliša te uz utjecaj kvalitativno i kvantitativno promjenjene mikrobiote čovjeka (de Souza i Fiocchi, 2016).

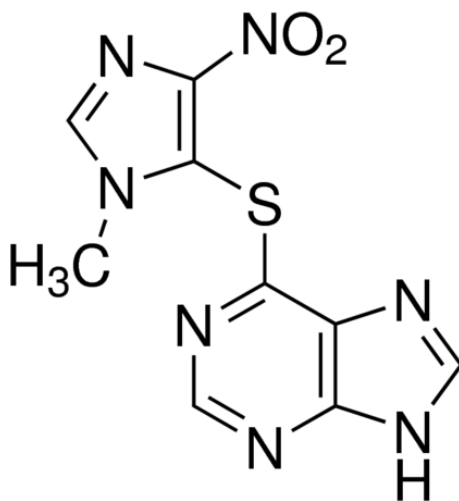
Upalne promjene u Crohnovoj bolesti zahvaćaju sve slojeve stijenke probavne cijevi i mogu se pojaviti u bilo kojem dijelu probavne cijevi dok ulcerozni kolitis označava upalu isključivo sluznice debelog crijeva. Najčešći simptomi su gastrointestinalni kao što su proljev, bol u trbuhu, krvarenja iz GIT-a, malnutricija, gubitak na težini te izvan-intestinalni kao tromboza dubokih vena, reumatološki simptomi i drugi. Bolest se može stišati i dovesti u fazu mirovanja (remisija), ali je za sada neizlječiva.

Lijekovi koji se najčešće upotrebljavaju u liječenju upalnih bolesti crijeva su aminosalicilati (sulfasalazin, mesalazin), kortikosteroidi (prednizolon, metilprednizolon, budesonid), imunosupresivi (azatioprin, metotreksat, 6-merkaptopurin, ciklosporin), biološki lijekovi (infliximab, adalimumab) i antibiotici (ciprofloksacin, metronidazol) ([www.hucuk.hr](http://www.hucuk.hr)).

Brojne studije povezuju patofiziologiju IBD-a s disreguliranim, pretjeranim imunološkim odgovorom na nepoznate antigene u intestinalnoj mukози što rezultira povećanjem uloge imunosupresivnih lijekova u terapiji (de Mattos i sur., 2015).

### 1.3.1 Azatioprin i 6-tiogvanin

Azatioprin, 6-[(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)tio]-1*H*-purin, je imunosupresivni antimetabolit u obliku prolijeka (Slika 1). Imidazolni je derivat 6-merkaptopurina (6-MP) u kojeg se metabolizira. 6-MP je neaktivan, ali ponaša se kao antagonist purina. Da bi imao imunosupresivno djelovanje, 6-MP mora ući u stanicu, gdje se unutarstaničnim anabolizmom pretvara u svoje glavne metabolite i aktivne oblike lijeka, nukleotide tiogvanina (TGN). Mehanizam djelovanja azatioprina je kompetitivna inhibicija biosinteze nukleotida, zbog strukturne sličnosti purinskoj bazi gvaninu, koji izgrađuje deoksiribonukleinsku i ribonukleinsku kiselinu te ugradnja u strukturu nukleinske kiseline i terminacija replikacije iste (Aberra i Lichtenstein, 2005). Time sprječava proliferacijsku sposobnost stanica koje određuju i pojačavaju imuni odgovor, što pridonosi imunosupresivnim učincima lijeka.

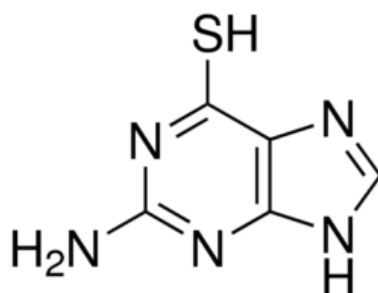


Slika 1. Strukturna formula azatioprina

Imunosupresivi su lijekovi koji potiskuju djelovanje imunološkog sustava i na taj način omogućavaju kontrolu nad nepoželjnom i nekontroliranom upalnom aktivnošću koja se javlja u kroničnim bolestima kao što su upalne bolesti crijeva. Azatioprin se primjenjuje kao

imunosupresivni antimetabolit ili u monoterapiji ili, što je češće, u kombinaciji s drugim lijekovima (obično kortikosteroidima) i postupcima koji utječu na imunosni odgovor organizma. Učinak liječenja može uključivati smanjivanje potrebe za kortikosteroidima, što rezultira manjom toksičnošću povezanom s uporabom visokih doza i dugotrajnom primjenom kortikosteroida. Indiciran je za liječenje umjerene do teške upalne bolesti crijeva u bolesnika kojima je potrebna terapija kortikosteroidima, bolesnika koji ne podnose terapiju kortikosteroidima ili bolesnika čija je bolest otporna na druge standardne terapije prve linije ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Stoga, azatioprin služi u liječenju upalnih bolesti crijeva kao lijek koji omogućava smanjivanje i ukidanje steroida ("steroid sparing agents") te održavanje stabilne remisije bolesti. Najčešći razlozi intolerancije azatioprina su simptomi slični gripi ("flu-like symptoms") kao što su slabost, vrtoglavica, povraćanje, glavobolja, povišena temperatura, grčevi, bolovi u mišićima i proljev. Navedeni simptomi javljaju se nakon 2-3 tjedna terapije i nestaju postupno nakon ukidanja terapije. Rijetko se javljaju teška leukopenija, pankreatitis i hepatotoksičnost. Registrirano je da se u 28% bolesnika razvija neka od nuspojava pa je potrebno pratiti bolesnike, klinički i laboratorijski (krvna slika, jetreni enzimi, amilaze). Zbog prevencije štetnog djelovanja lijeka, tj. supresije koštane srži ovisne o dozi, koncentracija lijeka u plazmi redovito se provjerava (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006). Bolesnike treba upozoriti da se odmah jave liječniku ukoliko se pojave znakovi infekcije, neočekivano krvarenje i/ili hematomi, odnosno drugi znakovi supresije koštane srži (Francetić i sur., 2015).

6-tiogvanin (6-TG) je antineoplastični antimetabolitni lijek indiciran za liječenje nekoliko oblika leukemije uključujući akutnu nelimfocitnu leukemiju ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)) (Slika 2). Također, pokazao je dobru kliničku učinkovitost kao alternativni imunomodulator u liječenju IBD-a. Međutim, trombocitopenija i povezana hepatotoksičnost ograničavaju njegovu uporabu (Qashim i sur., 2007; Ward i sur., 2017). Na listi lijekova nalazi se kao generički lijek i nije registriran u Hrvatskoj.



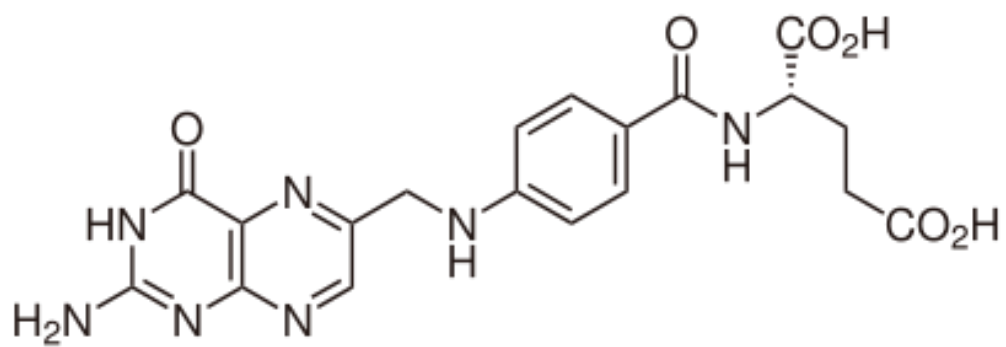
Slika 2. Strukturna formula 6-tiogvanina

### 1.3.2 Deficit folata u osoba s upalnim bolestima crijeva

Folna kiselina pripadnik je skupine B vitamina (vitamin B9) (Slika 3). U organizmu se reducira u tetrahidrofolat koji je koenzim u različitim metaboličkim procesima uključujući sintezu purina, pirimidina i metionina, a prema tome i sintezu DNA i RNA te je neophodan za osiguranje zdrave stanične diobe. Deficit folata pogađa sve stanične funkcije, a najvažnije je da reducira sposobnost organizma da obnovi oštećena tkiva i omogući rast novih stanica. Studije upućuju da folna kiselina ima protektivno djelovanje te smanjuje rizik razvoja kolorektalnog karcinoma, naročito u muškaraca. Deficit folne kiseline u organizmu može dovesti do megaloblastične anemije, a nedostatan unos u trudnica do defekta u razvoju neuralne cijevi djeteta. Do deficita folne kiseline u organizmu može doći zbog nedostatnog unosa (malnutricija, malapsorpcija), povećane potrebe (trudnoća, hemolitička anemija), gubitka (hemodijaliza) ili primjene antagonista folata ili drugih lijekova koji interferiraju s metabolizmom folata ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Brojne studije pokazuju da je razina folata u serumu IBD pacijenata znatno niža od razine kod zdravih ispitanika. Stoga bi se trebalo provoditi redovito praćenje serumske koncentracije folata i suplementacija, ukoliko je potrebna, da bi se poboljšao nutritivni status bolesnika i da bi se spriječio nastanak drugih bolesti (Pan i sur., 2017).

Kod osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva postoji rizik od deficita folata iz više razloga, uključujući smanjen unos hrane, malapsorpciju i interakciju lijekova. Sulfasalazin i metotreksat interferiraju s metabolizmom folata te mogu smanjiti njegovu koncentraciju (Heyman i sur, 2009). Kod osoba s Crohnovom bolesti u tankom crijevu postoji rizik od malapsorpcije brojnih vitamina i minerala - uključujući folate koji se apsorbiraju u srednjem i zadnjem dijelu tankog crijeva- jejunumu i ileumu ([www.verywell.com](http://www.verywell.com)). Nutricija mora biti integralna komponenta liječenja svih bolesnika s Crohnovom bolesti jer je malnutricija u ovih bolesnika česta i multifaktorska (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).



Slika 3. Strukturna formula folne kiseline

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je ispitati učinkovitost ekstrakcije čvrstom fazom kao metode pripreme biološkog uzorka za simultano određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u plazmi. Terapijsko praćenje lijekova nužan je preduvjet za uspješno liječenje bolesnika koje osigurava maksimalnu učinkovitost primjene, dok se pojava toksičnih učinaka svodi na najmanju moguću mjeru. Osnovni cilj individualizacije terapije jest optimizirati medicinsku skrb i ishode za svakog pacijenta. Praćenje koncentracije lijeka tijekom terapije je postupak određivanja koncentracije lijeka u krvi ispitanika na temelju koje se pristupa individualnom doziranju (doza, učestalost primjene, formulacija lijeka, način primjene). Imunosupresivi su jedna od skupina lijekova koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva, među njima i azatioprin i 6-tiogvanin. Terapija azatioprinom zahtjeva redovito praćenje krvne slike zbog razvoja potencijalno teških nuspojava. S obzirom na rizik od deficita folne kiseline kod oboljelih, korisno je, uz praćenje lijekova, istovremeno pratiti i razinu folata u plazmi oboljelih. To praćenje pružilo bi nam dodatnu informaciju o potrebi za suplementacijom folata u slučaju deficita. Nutritivna potpora je nezaobilazna kao dodatak terapiji za pothranjene bolesnike ili one koji imaju teškoća s održavanjem normalnog nutritivnog statusa.

S obzirom na to da je priprema bioloških uzoraka jedan od presudnih koraka u analizi, u ovom radu ispitati smo učinkovitost različitih vrsta sorbensa za ekstrakciju čvrstom fazom kao metodu pripreme uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline iz plazme.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1 MATERIJALI

#### 3.1.1 Kemikalije

- Azatioprin, čistoće za kromatografiju (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 6-tiogvanin, čistoće za kromatografiju (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Amonijak, otopina min. 25 %, Čistoća: p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Mravlja kiselina 98-100% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Umjetna plazma PreciControl ClinChem Multi 2 (Roche, Basel, Švicarska)
- Folacin, 5mg (Jadran Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Hrvatska)

#### 3.1.2 Radni instrumenti

- Aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)
- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Centrifuga (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Ujedinjeno kraljevstvo)
- Helij, čistoće za kromatografiju (Messer, Gumpoldskirchen, Austrija)
- Mini-Vortex (Ika-Werke GmbH & Co KG, Stanfen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)

#### 3.1.3 Pribor

- Kolona za ekstrakciju čvrstom fazom Discovery DSC-18, 500 mg, 3 ml (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)
- Kolona za ekstrakciju čvrstom fazom Agilent Bond Elut C-18, 500 mg, 6 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

- Kolona za ekstrakciju čvrstom fazom Agilent Bond Elut C-8, 500 mg, 6 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Kolona za ekstrakciju čvrstom fazom Oasis HLB, 60 mg, 3 ml (Waters, Milford, MA, SAD)
- Kolona za ekstrakciju čvrstom fazom Phree Phospholipid removal, 1 ml (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD)
- Injekcijski filtri Acrodisc GHP, veličina pora 0,20 µm, promjer 26 mm (Gelman, Ann Arbor, SAD)
- Celulozni nitratni filteri za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji, veličina pora 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Kromatografska kolona Symmetry C18, dimenzije: 150mm x 4,6 mm; veličina čestica: 3,5 µm (Waters, Milford, MA, SAD)
- Stakleni sustav za filtriranje (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Tamne bočice za uzorkovanje, 2 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

#### **3.1.4 Programski paketi**

- ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

### **3.2 METODE**

#### **3.2.1 Priprema pokretne faze**

0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu korištena je kao pokretna faza A, a 0,1% otopina mravlje kiseline u ultračistoj vodi kao pokretna faza B.

Pokretna faza profiltrirana je pomoću sustava za filtriranje mobilnih faza te celuloznog nitratnog filtera (veličine pore 0,45 µm).

### 3.2.2 Priprema standardnih otopina

Standardne otopine azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline pripremljene su otapanjem 50 mg supstancije u 25 ml otapala koje se dobije dodatkom 1 ml otopine amonijaka u 24 ml metanola.

### 3.2.3 Priprema ispitivanih uzorka

- **Priprema uzorka tehnikom taloženja proteina**

Uzorak plazme priprema se tehnikom taloženja proteina umjetne plazme s organskim otapalom, 50% metanolom (omjer plazme i organskog otapala iznosio je 1:3).

U tako pripremljen uzorak dodano je po 50 µL svake od standardnih otopina.

- **Priprema uzorka SPE tehnikom koristeći modificirani silikagel i polimerni sorbens**

Za pročišćavanje uzoraka korišteni su sljedeći sorbensi: modificirani silikagel C8 i C18 (Agilent C8 i C18 te Discovery DSC-18) i polimerni sorbens (Oasis HLB).

Najprije su kolone pripremljene s 5 ml metanola, a zatim s 5 ml 0,1% mravlje kiseline u ultračistoj vodi. Slijedilo je nanošenje 1 ml uzorka na kolonu nakon čega su interferencije isprane s 2 ml ultračiste vode. Naposljetku su analiti isprani sa 2 ml metanola.

- **Priprema uzorka SPE tehnikom koristeći Phree Phospholipid Removal sorbens**

Na kolonu se najprije nanese 100 µl uzorka, a zatim se doda 400 µl 1% mravlje kiseline u metanolu. Kolone se protresu koristeći Vortex uređaj, a zatim se primjenom vakuum pumpe eluiraju i prikupljaju analiti.

### 3.2.4 Kromatografska analiza

Eluat sa SPE kolone prenese se u tamne bočice za uzorkovanje te se analizira primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Analiza je provedena na uređaju Agilent

1100 s obrnuto faznom kolonom Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm te veličine čestica 3,5 µm. Za identifikaciju azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline korištena je binarna gradijentna metoda čija se pokretna faza sastoji od 0,1% otopine mravlje kiseline u metanolu (otapalo A) i 0,1% otopine mravlje kiseline u ultračistoj vodi. Gradijentni program prikazan je u tablici 1. Protok pokretne faze iznosio je 1 ml/min, a temperatura kolone je bila 25 °C. Volumen injektiranja uzorka je 5 µl. Tijekom analize uzorci su čuvani u autoinjektoru čija je temperatura iznosila 4 °C. Valne duljine na kojima su se snimali kromatogrami su 254 i 270 nm.

Tablica 1. Gradijentni program za analizu azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline

| Vrijeme (min)<br>Udio otapala | 0  | 15 | 20 |
|-------------------------------|----|----|----|
| %A                            | 5  | 80 | 5  |
| %B                            | 95 | 20 | 95 |

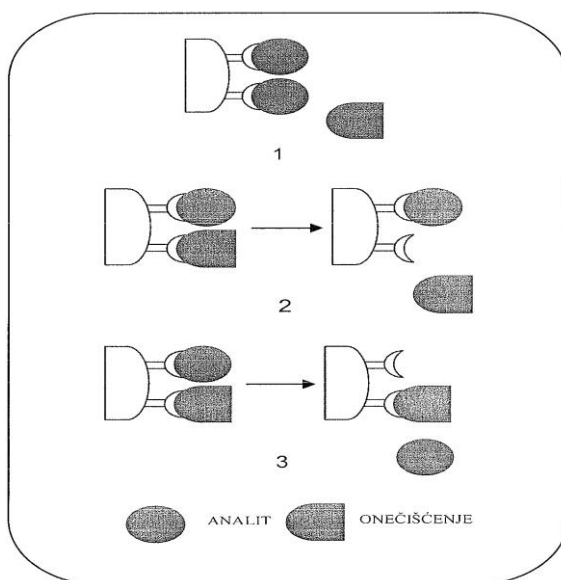
### 3.2.5 Masena spektrometrija

Instrument Agilent 6300 Series Ion Trap korišten je za detekciju analita. Provedena je pozitivna ionizacija elektroraspršenjem. Broj iona zadržanih u stupici iona iznosio 30 000, a vrijeme zadržavanja iona u stupici iznosilo je 200 ms. Za raspršivanje je primjenjen dušik protoka 10 l/min, uz primjenu tlaka od 15,0 psi. Temperatura ionizatora iznosila je 350 °C. Za fragmentaciju iona primjenjen je plin helij čiji je tlak bio  $6 \times 10^{-6}$  mbar. Spektar snimanja masa iona bio je postavljen u rasponu od m/z 50-500.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 OSNOVNA NAČELA EKSTRAKCIJE ČVRSTOM FAZOM

Ekstrakcija čvrstom fazom temelji se na propuštanju velike količine složenog uzorka kroz reaktivni sorbens, odnosno čvrstu fazu smještenu u ulošcima, kolonama ili diskovima različitih veličina u svrhu uklanjanja interferencija prisutnih u uzorku i/ili ukoncentriravanja samog analita ili skupine strukturno sličnih analita. Tri osnovna mehanizma kojima se analit razdvaja od ostalih sastavnica uzorka su: selektivna ekstrakcija, selektivno ispiranje i selektivna elucija (Slika 4).

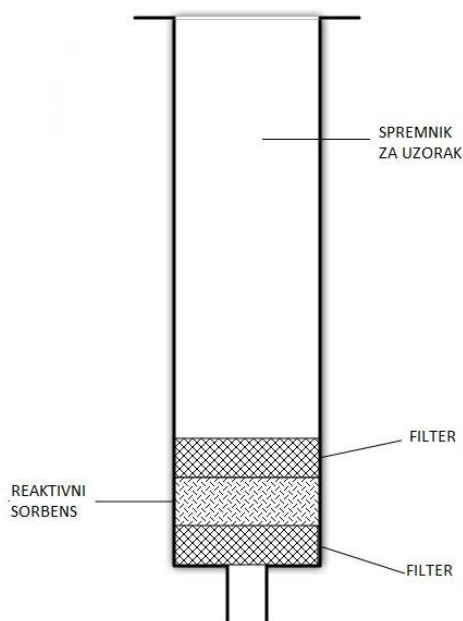


Slika 4. Shematski prikaz tri osnovna mehanizma ekstrakcije na čvrstim nosačima: selektivna ekstrakcija (1), selektivno ispiranje (2) i selektivna elucija (3)

(preuzeto iz Praktikuma kolegija Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda)

Svaki ekstrakcijski postupak zasniva se na temelju interakcije sustava koji se sastoji od analita, reaktivnog sorbensa i otapala, bez obzira na odabrani mehanizam ekstrakcije čvrstom fazom. Izbor čvrste faze i otapala za ekstrakcijski postupak ovise o svojstvima analita, o uzorku u kojem se analit nalazi i o analitičkoj tehnici koja će biti primjenjena nakon samog postupka ekstrakcije (Mornar, 2016). U ekstrakciji čvrstom fazom reaktivni sorbens je najčešće smješten u ulošku. Različiti tipovi i količine reaktivnog sorbensa nalaze se u

staklenoj ili plastičnoj otvorenoj koloni između dva filtera od polietilena, nehrđajućeg čelika ili teflona (Slika 5) (Buszewski i Szutka, 2012). Ulošci su napravljeni od materijala iznimne čistoće jer i tragovi onečišćenja kao što su plastifikatori ili stabilizatori mogu utjecati na rezultate analize. Svaku ekstrakciju čvrstom fazom karakterizira vrsta sorbensa, ali i njegova količina i veličina čestica. U uloške je najčešće smješteno od 35 mg do 2 g reaktivnog sorbensa. Neki od nedostataka ovog formata ekstrakcije čvrstom fazom su ograničenost s obzirom na dopušteni volumen uzorka i brzina kojom se uzorak pročišćava. Da bi se spriječilo začepeljivanje kolone i neupotrebljivost sorbensa, biološkim uzorcima se moraju ukloniti makromolekule (Mornar, 2016).

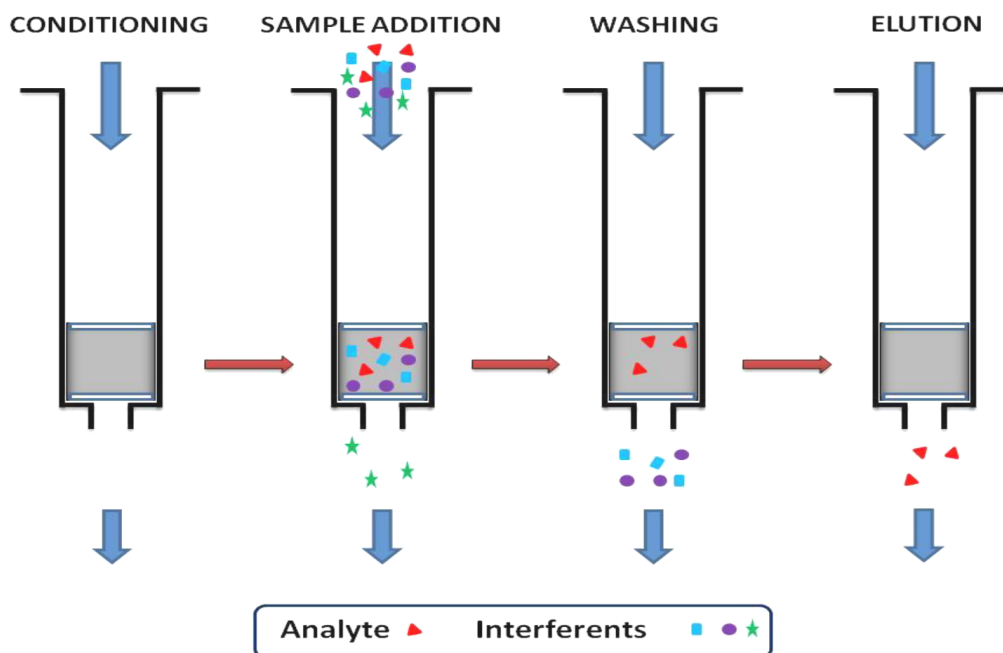


Slika 5. Prikaz kolone za ekstrakciju čvrstom fazom

(preuzeto sa [www.justchromatography.com](http://www.justchromatography.com))

Postupak ekstrakcije čvrstom fazom najčešće se sastoji od četiri koraka (Slika 6). Prvi korak je priprema kolone u kojoj se čvrsta faza kondicionira, odnosno aktivni sorbens se solvatizira, kako bi se pripremila za nanošenje uzorka. U sljedećem koraku se analit vezuje na čvrstu fazu, a zatim se ispiru interferencije. Na kraju slijedi eluiranje i sakupljanje samog analita. Organska otapala poput metanola i acetonitrila se najčešće koriste u pripremi reaktivnog sorbensa za ekstrakciju. Tako se uklanjaju potencijalne interferencije koje mogu biti prisutne u sorbensu. U ovom koraku provodi se i solvatacija reaktivnog sorbensa koja je osobito važna

za pojedine vrste sorbensa poput modificiranog silikagela. Tijekom nanošenja uzorka na sorbens analit mora biti otopljen u otapalu koje omogućava njegovo zadržavanje na reaktivnom sorbensu.



Slika 6. Shematski prikaz ekstrakcije čvrstom fazom (preuzeto sa [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com))

Količina nanesenog uzorka i koncentracija analita u uzorku moraju odgovarati količini sorbensa kojim se vrši ekstrakcija. Tijekom ispiranja interferencija sa sorbensa potrebno je koristiti što je moguće manje otapala koje neće ukloniti i ciljani analit. Otapalo koje se koristi za eluciju analita sa sorbensa mora biti dovoljno jako da se sav analit oslobodi sa sorbensa.

Ukoliko otapalo kroz sorbens prolazi samo pod utjecajem gravitacije, postupak ekstrakcije je iznimno dugačak. Danas se sve rjeđe koristi centrifugiranje kao tehnika ubrzavanja otapala, dok je primjena vakuma sve učestalija. U tu svrhu koriste se stakleni, kemijski otporni razdjelivači s više ventilskih ograna. Bez obzira na način prolaska otapala kroz reaktivni sorbens, brzina njihova prolaska ne smije biti prevelika kako bi se omogućilo dovoljno vremena analitu i sorbensu za interakciju. Preporučena brzina protoka otapala kroz sorbens je manja od 10 mL/min (Mornar, 2016; Mornar i sur. 2013).

Ekstrakcija čvrstom fazom kao selektivna metoda nudi čitav niz različitih sorbensa, a odabir odgovarajućeg sorbensa temelji se na razumjevanju interakcija između sorbensa i željenog

analita. Najčešći mehanizmi zadržavanja temelje se na van der Waalsovima vezama (nepolarne interakcije), vodikovim vezama, dipol-dipol vezama (polarne interakcije) i kation-anion interakcije (ionske interakcije) (Vaghela i sur., 2016). S obzirom na mehanizam ekstrakcije, ekstrakcija čvrstom fazom dijeli se na ekstrakciju normalnih faza, obrnutih faza, ionsko izmjenjivačku ekstrakciju te ekstrakciju kombiniranim mehanizmima.

Većina nepokretnih faza koje se koriste u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti koriste se i kao sorbensi u ekstrakciji čvrstom fazom. Najčešće korišteni sorbensi su silikagel, modificirani silikagel, polimeri te inovativni selektivni sorbensi koji uključuju polimere s molekulskim otiskom, materijale ograničenog pristupa, nanomaterijale i imunosorbense (Buszewski i Szutka, 2012; Mornar, 2016).

Analitički prinos ekstrakcijske metode tj. ekstrakcijska učinkovitost izračunava se kao omjer količine željenog analita prikupljenog u eluatu nakon ekstrakcije čvrstom fazom i stvarne količine analita nanosene na kolonu za SPE ([www.waters.com](http://www.waters.com)) .

$$\text{ekstrakcijska učinkovitost (\%)} = 100 \times \frac{\text{količina analita u eluatu nakon SPE}}{\text{količina analita nanosena na SPE kolonu}}$$

Ekstrakcija čvrstom fazom primjenom različitih tipova sorbensa već je korištena kao metoda pripreme uzoraka u brojnim radovima.

Da bi se postigao dobar ekstrakcijski prinos pri razvoju i validaciji LC-MS/MS metode za simultano određivanje metotreksata, 6-merkaptopurina i 6-tiogvanina u plazmi djece oboljele od akutne limfoblastične leukemije, korišten je kationsko izmjenjivački sorbens za ekstrakciju čvrstom fazom (Al-Ghobashy, 2016).

Određivanje 5-CH<sub>3</sub>-tetrahidrofolata u punoj krvi UPLC-MS/MS metodom također primjenjuje ekstrakciju čvrstom fazom kao metodu pripreme uzorka. U ovoj metodi korišten je kationsko izmjenjivački sorbens za SPE nakon hemolize i dekonjugacije pune krvi. Za različite oblike folata ekstrakcijska učinkovitost iskazana kao analitički prinos iznosila je između 97,1% i 102,7% (Kirsch i sur., 2012).

Pri razvoju LC-MS/MS metode pogodne za biomonitoring populacije mjerenjem pet serumskih metabolita folne kiseline i jednog oksidacijskog produkta korištena je SPE primjenom fenilnog sorbensa u izvedbenom obliku 96-ekstrakcijskih pločica. Ova metoda omogućuje procesiranje 96 uzoraka u otprilike 2 sata, a svi važni oblici folata mogu se mjeriti koristeći mali volumen seruma (Fazili i sur., 2013).

Tijekom ovog istraživanja ispitivani su različiti tipovi sorbensa za ekstrakciju čvrstom fazom i njihova učinkovitosti u pripremi bioloških uzoraka za daljnju analizu. Ispitivani su sljedeći sorbensi: modificirani silikagel, polimerni sorbens i inovativni sorbens: Phree Phospholipid Removal.

#### **4.1.1 Silikagel i modificirani silikagel**

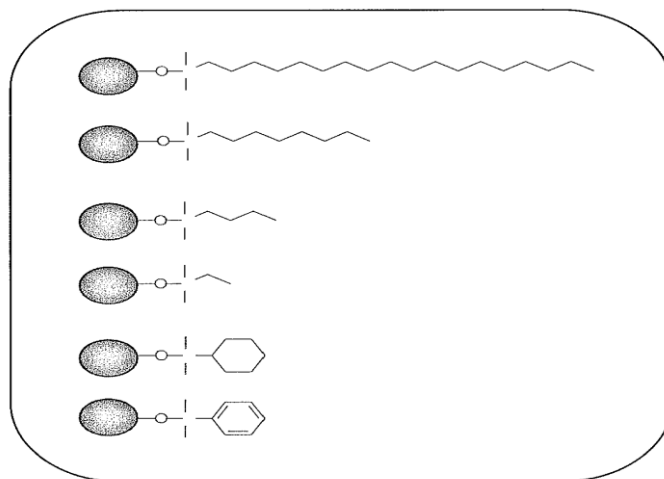
Mehanička svojstva silikagela i njegova otpornost na temperaturne promjene omogućuju uspješno korištenje silikagela kao adsorbirajućeg agensa. Površina čestica silikagela je heterogena te sadrži različite vrste silanolnih grupa. Danas se kao sorbens u ekstrakciji čvrstom fazom češće koristi modificirani silikagel koji se dobiva vezivanjem različitih funkcionalnih skupina za slobodne silanolne skupine prisutne na površini čestica silikagela.

Korištenjem reaktivnih sorbensa temeljenih na silikagelu i modificiranom silikagelu mogu se provoditi ekstrakcije čvrstom fazom obrnutih faza, normalnih faza i ionsko izmjenjivačka ekstrakcija.

- Ekstrakcija čvrstom fazom obrnutih faza

Ekstrakcija čvrstom fazom obrnutih faza odnosi se na sustave u kojima je reaktivni sorbens manje polaran od uzorka. Ova vrsta ekstrakcije primjenjuje se za odjeljivanje slabo polarnih ili nepolarnih analita iz polarnog uzorka. Za vezanje analita na čvrstu fazu odgovorne su van der Waalove sile, a za eluiranje analita sa sorbensa potrebno je upotrijebiti nepolaro otapalo. Reaktivni sorbens, modificirana površina silikagela dobiva se reakcijom silanolnih skupina na površini čestice silikagela i organosilana koji sadrži hidrofobne alkilne ili arilne funkcionalne skupine (C1, C2, C4, C8, C18, fenil...). Nedostatak ove vrste ekstrakcije je zaostajanje slobodnih silanolnih skupina na površini sorbensa nakon reakcije s

organosilanom. Prisutnost ovih kiselih funkcionalnih skupina ima negativan utjecaj na ekstrakciju polarnih, posebice bazičnih spojeva. Da bi se prekrile zaostale slobodne silanolne skupine, u pripremi obrnutih čvrstih faza kao reagens se koristi klorotrimetilsilan ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl) (Buszewski i Szultka, 2012).



Slika 7. SPE obrnutih faza

(preuzeto iz Praktikuma kolegija Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda)

Učinkovitost kolone Discovery DSC-18 u pripremi uzorka već je pokazana u razvoju metode za simultano određivanje mitotana i njegovih glavnih metabolita u krvi i urinu SPE-HPLC metodom (Mornar i sur., 2011).

Van Os i suradnici su još 1996. godine koristili ekstrakciju čvrstom fazom pomoću C18 kolone za simultano određivanje azatioprina i 6-merkaptopurina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Van Os i sur., 1996).

U ovom radu, kao obrnuto fazni sorbensi ispitivani su Bond Elut C8 i C18, te Discovery DSC-18. Ipak, primjenom ovih obrnuto faznih sorbenasa postignuta je vrlo niska ekstrakcijska učinkovitost (manja od 29,2%). Rezultati istraživanja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Ekstrakcijska učinkovitost (%) primjenom obrnuto faznih sorbenasa

| Sorbens             | Ekstrakcijska učinkovitost (%)<br>6 - tiogvanina | Ekstrakcijska učinkovitost (%) folne<br>kiseline | Ekstrakcijska učinkovitost (%)<br>azatioprina |
|---------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Bond Elut<br>C8     | 6,7                                              | 1,0                                              | 1,1                                           |
| Bond Elut<br>C18    | 6,3                                              | 1,1                                              | 1,3                                           |
| Discovery<br>DSC-18 | 14,7                                             | 5,3                                              | 29,2                                          |

Sva tri analita, azatioprin, 6-tiogvanin i folna kiselina, nedovoljno su lipofilni te se slabo zadržavaju na kolonama. Stoga se većina analita gubi tijekom samog nanošenja uzorka na kolone za ekstrakciju čvrstom fazom i tijekom ispiranja interferencijom ultračistom vodom. Stoga ovi sorbensi nisu prikladni za pripremu biološkog uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u plazmi SPE-HPLC/DAD metodom.

#### 4.1.2 Polimerni sorbensi

U ekstrakciji čvrstom fazom kao sorbensi se koriste i porozni polimeri. Za razliku od reaktivnih sorbensa koji se temelje na silikagelu, polimerni sorbensi ne sadrže zaostale slobodne silanolne skupine. Uz to, kao prednost je potrebno istaknuti i stabilnost polimera u pH području od 1 do 14 te kapacitet za veće volumene uzorka. Najčešće korišteni polimer je hidrofozna smola stiren-divinilbenzen kopolimer (engl. *Polystyrene Divinylbenzene*, PS-DVB) koja ima veliki afinitet za polarne analite. Ova smola ulazi u  $\pi$ - $\pi$  interakcije s nezasićenim analitima preko aktivnih aromatskih mjesta na svojoj površini. Noviji polimerni sorbensi su hidrofilini-lipofilni (engl. *Hydrophilic-Lipophilic balanced*, HLB) kopolimeri izgrađeni od specifičnih omjera dvaju monomera, N-vinilpirolidona i divinilbenzena. Dok

hidrofilni N-vinilpirolidon omogućava zadržavanje vlažnosti polimera te ekstrakciju polarnih analita, lipofilni divinilbenzen omogućava zadržavanje nepolarnih analita. Prikladnost primjene ovog sorbensa i za polarne i za nepolarne analite je jedna od njegovih glavnih prednosti. Isto tako treba istaknuti i kako navedeni polimer zadržava ekstrakcijsku učinkovitost čak i ako se čvrsta faza isuši. Ova svojstvo čini ju prikladnom i za automatiziranu pripremu uzoraka (Buszewski i Szultka, 2012).

Tijekom razvoja metode za određivanje deset antitumorskih lijekova, među kojima i azatioprina, u otpadnim vodama uspoređivana je učinkovitost klasičnih HLB polimernih sorbensa (Oasis HLB) i ionsko izmjenjivačkih polimernih sorbensa (Oasis MCX i MAX) u pripremi uzoraka. Univerzalni HLB polimerni sorbens donio je veći analitički prinos od ionsko izmjenjivačkih polimernih sorbensa (Ferrando-Climent i sur., 2013).

Selektivno odjeljivanje i određivanje azatioprina u biološkim i farmaceutskim uzorcima provedeno je i koristeći polimer s molekulskim otiskom kao sorbens za ekstrakciju čvrstom fazom. Analitički prinos iznosio je više od 95% te je metoda uspješno primjenjivana za određivanje azatioprina u biološkim i farmaceutskim uzorcima (Davarani i sur., 2017.)

U ovom radu ispitivana je kolona komercijalnog naziva Oasis HLB.

Tablica 3. Ekstrakcijska učinkovitost primjenom polimernog sorbensa

| <b>Sorbens</b> | <b>Ekstrakcijska učinkovitost (%)</b><br><b>6 - tiogvanina</b> | <b>Ekstrakcijska učinkovitost (%)</b><br><b>folne kiseline</b> | <b>Ekstrakcijska učinkovitost (%)</b><br><b>azatioprina</b> |
|----------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Oasis HLB      | 6,1                                                            | 3,4                                                            | 51,6                                                        |

Kao i kod C8 i C18 sorbensa, azatioprin, 6-tiogvanin i folna kiselina su nedovoljno lipofilni te se slabo vezuju za HLB kolonu pa se gubi veliki dio analita tijekom samog nanošenja uzorka na kolone za ekstrakciju čvrstom fazom. Stoga ni ova kolona nije prikladna za pripremu

biološkog uzorka za simultano određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u plazmi SPE-HPLC/DAD metodom.

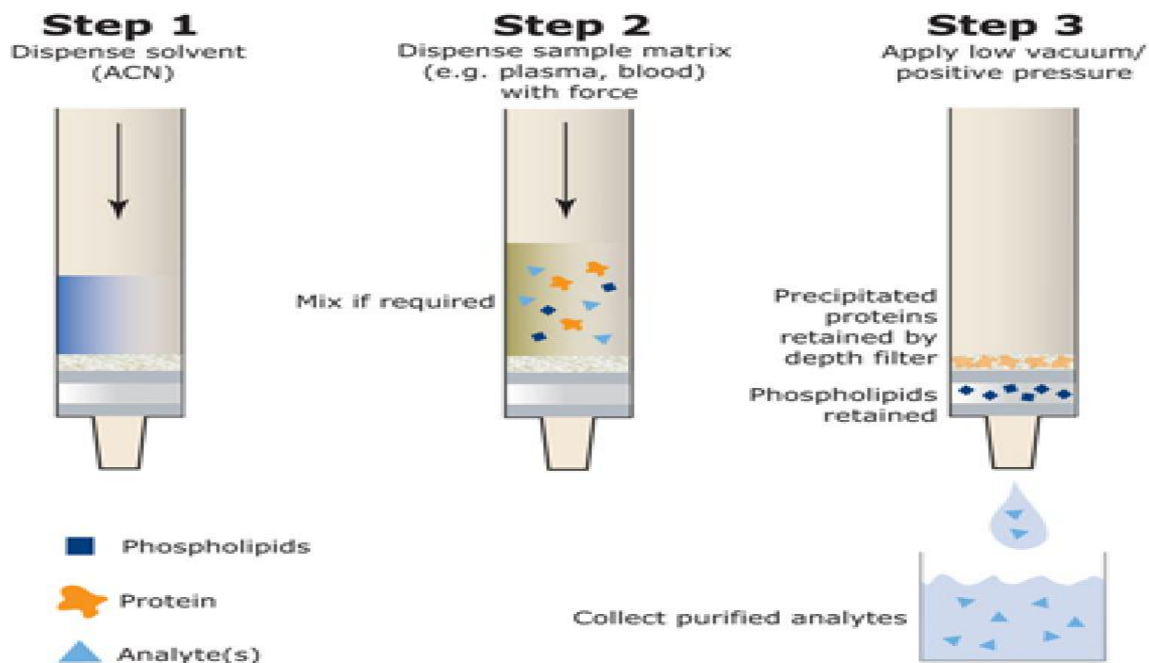
#### **4.1.3 Kolona za uklanjanje fosfolipida iz uzorka**

Phree Phospholipid Removal je sorbens koji istovremeno uklanja proteine koji mogu začepiti kromatografske kolone i fosfolipide koji uzrokuju ionsku supresiju i smanjuju životni vijek kolone. Jedna metoda vrijedi i za kiseline i za baze i za neutralne analite ([www.phenomenex.com/Phree](http://www.phenomenex.com/Phree)).

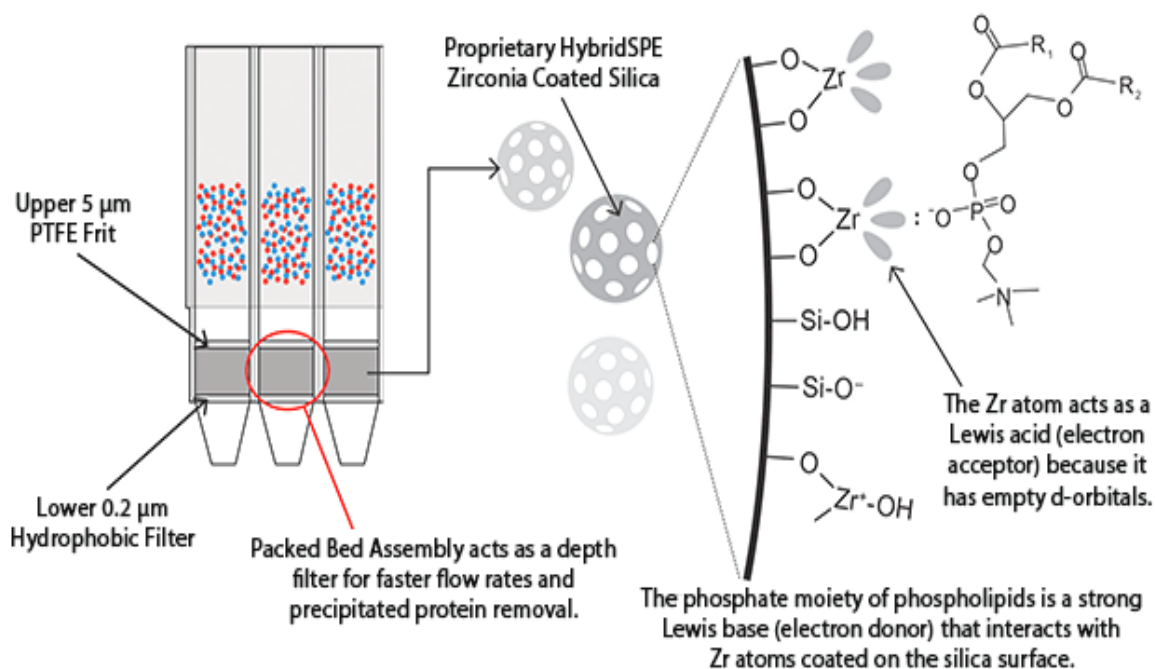
Biološki uzorci sadrže komponente koje mogu dovesti do smanjenja ili povećanja odaziva analita na MS detektoru, tzv. ion-supression i ion-enhancement (Mornar, 2016).

Endogeni fosfolipidi su primarni uzrok ionske supresije u masenom spektrometru tijekom bioanalitičkih metoda. Ionska supresija uzrokovana prisustvom fosfolipida može dovesti do slabe ponovljivosti i osjetljivosti metode. Dok klasična metoda precipitacije proteina ne uklanja fosfolipide, ova metoda omogućuje precipitaciju proteina u samoj koloni za ekstrakciju i uklanjanje fosfolipida.

Za razliku od obrnuto faznih i polimernih sorbenasa kod kojih se zadržava analit, ispiru se onečišćenja, a analit se potom eluira s organskim otapalom, mehanizam djelovanja novog inovativnog Phree Ph. Removal sorbensa je drukčiji. U ovom slučaju analit prolazi kroz kolonu za ekstrakciju čvrstom fazom, dok se onečišćenja (sastavnice plazme, fosfolipidi i proteini) zadržavaju iznad (proteini) i unutar (fosfolipidi) samog sorbensa (Slike 8 i 9).



Slika 8. Shematski prikaz postupka ekstrakcije čvrstom fazom pomoću kolone koja uklanja proteine i fosfolipide (preuzeto sa [www.biotage.com](http://www.biotage.com))



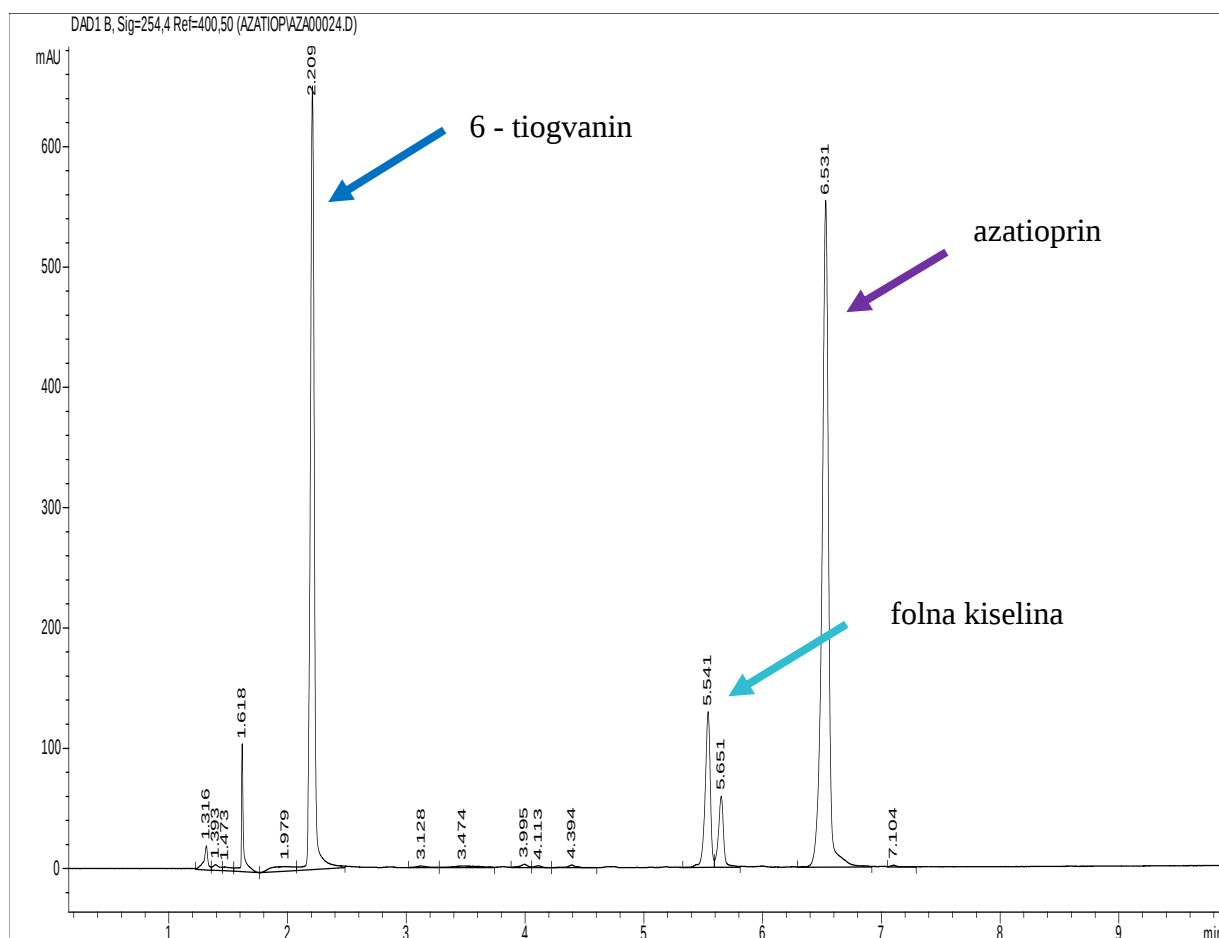
Slika 9. Shema mehanizma uklanjanja fosfolipida - interakcija cirkonijevih iona na čvrstom nosaču i fosfatnog dijela fosfolipida (preuzeto sa [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

Pretraživanjem baze podataka, nisu pronađeni dosadašnji radovi koji uključuju ekstrakciju čvrstom fazom primjenom Phree Phospholipid sorbensa za analizu azatioprina, 6-tiogvanina ili folne kiseline.

Tablica 4. Ekstrakcijska učinkovitost (%) primjenom novog inovativnog sorbensa

| <b>Sorbens</b>    | <b>Ekstrakcijska učinkovitost (%) 6 - tiogvanina</b> | <b>Ekstrakcijska učinkovitost (%) folne kiseline</b> | <b>Ekstrakcijska učinkovitost (%) azatioprina</b> |
|-------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Phree Ph. Removal | 99,2                                                 | 94,7                                                 | 97,6                                              |

Ekstrakcijom čvrstom fazom s Phree Phospholipid sorbensom postignuta je izvrsna ekstrakcijska učinkovitost za sva tri analita (veća od 94,5%) što izdvaja ovaj sorbens kao najbolji za pripremu biološkog uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u plazmi SPE-HPLC/DAD metodom.



Slika 10. Kromatogram ispitivanih lijekova i folne kiseline u uzorku ljudske plazme nakon pripreme uzorka s Phree Ph. Removal sorbensom

Iz Slike 10 vidljivo je da je postignuto izvrsno razdvajanje sva tri strukturno različita analita unutar 7 minuta. Nadalje, iz kromatograma je moguće uočiti kako su uklonjeni fosfolipidi plazme te je postignuta zadovoljavajuća selektivnost metode.

## 5. ZAKLJUČCI

- Priprema biološkog uzorka za analizu često je najkritičniji i najteži dio koji oduzima i do 80% vremena bioanalitičaru te je ujedno i najčešći izvor pogrešaka cjelokupnog bioanalitičkog postupka
- Ekstrakcija čvrstom fazom kao selektivna metoda nudi čitav niz različitih sorbensa, a odabir odgovarajućeg sorbensa temelji se na razumjevanju interakcija između sorbensa i željenog analita
- U ovom radu ispitana je učinkovitost različitih vrsta sorbensa za ekstrakciju čvrstom fazom u svrhu pripreme uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u uzorku plazme
- Sva tri analita: azatioprin, 6-tiogvanin i folna kiselina, nedovoljno su lipofilni te se slabo vezuju za C8 i C18 i polimerni HLB sorbens, stoga se najveći dio analita gubi tijekom samog nanošenja uzorka na kolone za ekstrakciju čvrstom fazom i tijekom ispiranja interferencijom ultračistom vodom. Ovi sorbensi nisu prikladni za pripremu biološkog uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u plazmi SPE-HPLC/DAD metodom
- Ispitivani imunosupresivi (azatioprin i 6-tiogvanin) imali su bolju ekstrakcijsku učinkovitost na svim sorbensima u odnosu na folnu kiselinu
- Phree Phospholipid Removal je sorbens koji istovremeno uklanja proteine koji mogu začepiti kromatografske kolone i fosfolipide koji uzrokuju ionsku supresiju i smanjuju vrijeme trajanja kolone
- Ekstrakcija čvrstom fazom s Phree Phospholipid sorbensom pokazala se kao prikladna tehnika pripreme uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u plazmi SPE-HPLC metodom s analitičkim prinosima od gotovo 100%
- Postignuta je zadovoljavajuća selektivnost metode i razdvajanje analita unutar 7 minuta
- Pripremom uzoraka sa Phree sorbensom, uklanjaju se i proteini i fosfolipidi iz uzorka u istom vremenskom periodu kao i kod klasičnog taloženja samih proteina, što rezultira značajnim poboljšanjem kromatografskog postupka uz jednako trajanje cjelokupnog analitičkog postupka

- S obzirom na dobivene rezultate, novi inovativni Phree Ph. Removal sorbens bi mogao imati primjenu u bioanalitičkim metodama
- Uz to što nema optimizacije metode i što je sam postupak brz, njegova prednost je i mogućnost primjene za strukturno različite analite, što je izrazito bitno za određivanje lijekova i njihovih često brojnih, polarnijih i strukturno različitih metabolita
- Doprinos razvoja ove SPE-HPLC/DAD metode je istovremeno određivanje IBD lijekova (azatioprin i 6-tiogvanin) i folne kiseline u uzorku plazme
- Razvoj jedinstvene metode za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u uzorku plazme utjecao bi na veću suradljivost i adherenciju pacijenata te bi omogućio jednostavnije terapijsko praćenje koncentracije lijekova i individualizaciju terapije
- Daljnja istraživanja koja nadilaze okvire ovog diplomskog rada bit će usmjerena na validaciju i kliničku primjenu predložene metode kao i mogućnosti primjene opisane tehnike i sorbensa za metabolite odabrane skupine lijekova i vitamina

## 6. LITERATURA

1. Aberra FN, Lichtenstein GR. Monitoring of immunomodulators in inflammatory bowel disease: review article. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 21, 307-319.
2. Buszewski B, Szultka M. Past, present, and future of solid phase extraction: a review. *Crit Rev Anal Chem*, 2012, 42, 198-213.
3. Charde M, Welankiwar A, Kumar J, Chakole R. Bioanalytical method development and validation. *IJAPA*, 2013, 3, 90-94.
4. Chronova bolest, 2015., <http://www.hucuk.hr>, pristupljeno 20.07.2017.
5. Davarani SS, Rezayati Z, Taheri AR, Rahmatian N. Highly selective solid phase extraction and preconcentration of Azathioprine with nano-sized imprinted polymer based on multivariate optimization and its trace determination in biological and pharmaceutical samples-abstract. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71, 572-583.
6. De Mattos BRR, Garcia MPG, Nogueira JB, Paiatto LN, Albuquerque CG, Souza CL, Fernandes LGR, Tamashiro WMdSC, Simioni PC. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments, *Mediators Inflamm.*, 2015, 1-11.
7. De Souza H, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art-a review. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13, 13-27.
8. Evans G. A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism. CRC Press, 2004.
9. Fazili Z, Whitehead R, Paladugula N, Pfeiffer C. A high-throughput LC-MS/MS method suitable for population biomonitoring measures five serum folate vitamers and one oxidation product. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405, 4549-4560.
10. Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D. Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) in sewage samples. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405, 5937-5952.
11. Folate deficiency in people with IBD, 2016., <http://www.verywell.com>, pristupljeno 15.06.2017.
12. Francetić I. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 561.

13. Heyman MB, Garnett EA, Shaikh N, Huen K, Jose FA, Harmatz P, Winter HS, Baldassano RN, Cohen SA, Gold BD, Kirschner BS, Ferry GD, Stege E, Holland N. Folate concentrations in pediatric patients with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89, 545-550.
14. Introduction to SPE, 2012., <http://www.waters.com>, pristupljeno 28.04.2018.
15. Kirsch S, Herrmann W, Geisel J, Obeid R. Assay of whole blood (6S)-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404, 895-902.
16. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum i predavanja. Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2013.
17. Mornar A, Sertić M, Turk N, Nigović B, Koršić M. Simultaneous analysis of mitotan and its main metabolites in human blood and urine samples by SPE-HPLC technique. *BiomedChromatogr.*, 2012, 26, 1308-1314.
18. Mornar Turk A. Primjena ekstrakcije čvrstom fazom u bioanalitici, 2016, 1-25
19. Mozdiak E, O'Malley J, Arasaradnam R. Inflammatory bowel disease. *BMJ*, 2015, 351, 1-3.
20. New trends in sample preparation for bioanalysis, 2016., <http://www.americanpharmaceuticalreview.com>, pristupljeno 15.06.2017.
21. Phospholipid removal solutions, 2013., <http://www.phenomenex.com>, pristupljeno 15.06.2017.
22. Qasim A, McDonald S, Sebastian S, McLoughlin R, Buckley M, O'Connor H, O'Morain C. Efficacy and safety of 6-thioguanine in the management of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 2007, 42, 194-199.
23. Sažetak opisa svojstava lijeka Folacin 5 mg, 2014., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 23.07.2017.
24. Sažetak opisa svojstava lijeka Imuran 50 mg, 2017., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 23.07.2017.
25. The complete guide to solid phase extraction, 2017., <http://www.phenomenex.com>, pristupljeno 15.06.2017.
26. Tioguanine, 2005., <http://www.drugbank.ca>, pristupljeno 20.09.2017.
27. Ulcerozni kolitis, 2015., <http://www.hucuk.hr>, pristupljeno 20.07.2017.
28. Vaghela A, Patel A, Patel A, Vyas A, Patel N. Sample preparation in bioanalysis: A Review, *IJSTR*, 2016, 5, 6-10.

29. Van Os E, McKinney JA, Zins BJ, Mays DC, Schriver ZH, Sandborn WJ, Lipsky JJ. Simultaneous determination of azathioprine and 6- mercaptopurine by high-performance liquid chromatograph-abstract. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 679, 147-154.
30. Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. Zagreb, Medicus, 2006, 15, 53-62.
31. Ward MG, Patel KV, Kariyawasam VC, Goel R, Warner B, Elliott TR, Blaker PA, Irving PM, Marinaki AM, Sanderson JD. Thioguanine in inflammatory bowel disease: Long-term efficacy and safety. *United European Gastroenterol J*, 2017, 5, 563-570.
32. Watson DG, Pharmaceutical analysis: A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, Elsevier; 2012.
33. Yakut M, Ustun Y, Kabacam G, Soykan I. Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel diseases. *Eur J Intern Med*, 2010, 21, 320-323.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

### SAŽETAK

Priprema uzoraka jedan je od glavnih koraka analize koji omogućuje odgovarajuću biološku interpretaciju. U biološkom uzorku su uz analit prisutne i brojne druge sastavnice koje mogu narušiti osjetljivost i selektivnost bioanalize, ali i oštetiti analitički instrument. Ekstrakcija čvrstom fazom jedna je od glavnih metoda pripreme uzoraka koja omogućuje uklanjanje interferencija u uzorku i ukoncentriravanje analita.

Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost različitih tipova sorbensa za ekstrakciju čvrstom fazom kao metodu pripreme uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u uzorku plazme. Azatioprin i 6-tiogvanin spadaju u skupinu imunosupresiva, jednu od glavnih skupina lijekova koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva. Kod ovih pacijenata postoji rizik od deficita folata, stoga je korisno uz lijekove istovremeno pratiti i razinu folata koja će omogućiti procjenu o potrebi za njihovom suplementacijom.

Ispitivani modificirani silikagel (C8 i C18) i polimerni sorbens (HLB) nisu uspješno razdvojili interferencije od željenih analita stoga nisu pogodni za pripremu navedenog uzorka za daljnu analizu.

Inovativni selektivni sorbens Phree Phospholipid Removal omogućuje istovremeno uklanjanje proteina i fosfolipida iz biološkog uzorka. Pripremom uzorka s ovim sorbensom uklanjaju se negativni učinci interferencija kao što su ionska supresija, nezadovoljavajuća osjetljivost i smanjen vijek trajanja kolone. Ovaj sorbens najprimjereniji je za pripremu navedenog uzorka za analizu. Analitički prinos za sve željene analite iznosio je približno 100%.

## SUMMARY

Sample preparation is one of the most important step in bioanalysis and it is crucial to ensure appropriate biological interpretation. In biological samples there are present, with the analyte, numerous other components which can reduce the sensitivity and selectivity of bioanalysis, as well as damage the analytical instrument. Solid phase extraction is one of the major sample preparation methods that allows removal of interferences and concentrating the target analytes.

The aim of this study was to examine the efficiency of various types of sorbents for solid phase extraction as a sample preparation method for determination of azathioprine, 6-thioguanine and folic acid in plasma samples. Azathioprine and 6-thioguanine are immunosuppressants, one of the major group of medicines used in the treatment of inflammatory bowel disease. Patients with IBD are at risk for folate deficiency, therefore it is useful to monitor not only drugs but also the level of folate which shows the need for their supplementation.

The following sorbents were tested: modified silica gel (C8 and C18), polymer sorbent (HLB) and innovative sorbent: Phree Phospholipid Removal.

Examined modified silica gel and polymer sorbent have not successfully separated the interferences from the selected analytes. Therefore all of them are not suitable for the preparation of plasma samples.

Innovative selective sorbent Phree Phospholipid Removal allows simultaneous removal of protein and phospholipids from a biological sample. The preparation of the sample with this sorbent removes the negative chromatographic effects of interferences such as ion suppression, reduced analyte sensitivity and decreased column life - time. This sorbent is most suitable for the preparation of plasma sample for analysis. Analytical recovery was near 100%.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
(A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska)

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA PREDOBRADE UZORAKA EKSTRAKCIJOM ČVRSTOM FAZOM ZA ODREĐIVANJE AZATIOPRINA, 6-TIOGVANINA I FOLNE KISELINE

Anica Rebrina

#### SAŽETAK

Priprema uzoraka jedan je od glavnih koraka analize koji omogućuje odgovarajuću biološku interpretaciju. U biološkom uzorku su uz analit prisutne i brojne druge sastavnice koje mogu narušiti osjetljivost i selektivnost bioanalize, ali i oštetiti analitički instrument. Ekstrakcija čvrstom fazom jedna je od glavnih metoda pripreme uzoraka koja omogućuje uklanjanje interferencija u uzorku i ukoncentriravanje analita. Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost različitih tipova sorbensa za ekstrakciju čvrstom fazom kao metodu pripreme uzorka za istovremeno određivanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u uzorku plazme. Azatioprin i 6-tiogvanin spadaju u skupinu imunosupresiva, jednu od glavnih skupina lijekova koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva. Kod ovih pacijenata postoji rizik od deficita folata, stoga je korisno uz lijekove istovremeno pratiti i razinu folata koja će omogućiti procjenu o potrebi za njihovom suplementacijom. Ispitivani modificirani silikagel (C8 i C18) i polimerni sorbens (HLB) nisu uspješno razdvojili interferencije od željenih analita stoga nisu pogodni za pripremu navedenog uzorka za daljnu analizu. Inovativni selektivni sorbens Phree Phospholipid Removal omogućuje istovremeno uklanjanje proteina i fosfolipida iz biološkog uzorka. Pripremom uzorka s ovim sorbensom uklanjaju se negativni učinci interferencija kao što su ionska supresija, nezadovoljavajuća osjetljivost i smanjen vijek trajanja kolone. Ovaj sorbens najprimjereniji je za pripremu navedenog uzorka za analizu. Analitički prinos za sve željene analite iznosio je približno 100%.

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

Rad sadrži: 31 stranicu, 10 grafičkih prikaza, 4 tablice i 33 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ekstrakcija čvrstom fazom, bioanaliza, azatioprin, 6-tiogvanin, folna kiselina

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Biljana Nigović**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Svibanj 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### OPTIMIZATION OF SOLID PHASE EXTRACTION AS SAMPLE PREPARATION TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF AZATHIOPRINE, 6-THIOGUANINE AND FOLIC ACID

**Anica Rebrina**

#### SUMMARY

Sample preparation is one of the most important step in bioanalysis and it is crucial to ensure appropriate biological interpretation. In biological samples there are present, with the analyte, numerous other components which can reduce the sensitivity and selectivity of bioanalysis, as well as damage the analytical instrument. Solid phase extraction is one of the major sample preparation methods that allows removal of interferences and concentrating the target analytes. The aim of this study was to examine the efficiency of various types of sorbents for solid phase extraction as a sample preparation method for determination of azathioprine, 6-thioguanine and folic acid in plasma samples. Azathioprine and 6-thioguanine are immunosuppressants, one of the major group of medicines used in the treatment of inflammatory bowel disease. Patients with IBD are at risk for folate deficiency, therefore it is useful to monitor not only drugs but also the level of folate which shows the need for their supplementation.

The following sorbents were tested: modified silica gel (C8 and C18), polymer sorbent (HLB) and innovative sorbent: Phree Phospholipid Removal. Examined modified silica gel and polymer sorbent have not successfully separated the interferences from the selected analytes. Therefore all of them are not suitable for the preparation of plasma samples. Innovative selective sorbent Phree Phospholipid Removal allows simultaneous removal of protein and phospholipids from a biological sample. The preparation of the sample with this sorbent removes the negative chromatographic effects of interferences such as ion suppression, reduced analyte sensitivity and decreased column life - time. This sorbent is most suitable for the preparation of plasma sample for analysis. Analytical recovery was near 100%.

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

Thesis includes: 31 pages, 10 figures, 4 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Solid phase extraction, bioanalysis, azathioprine, 6-thioguanine, folic acid

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Biljana Nigović, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: May 2018.