

Pregled i razvoj spregnutih metoda plinske kromatografije u kontroli kakvoće farmaceutskih tvari i proizvoda

Dusper, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

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:163:299297>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Dusper

**PREGLED I RAZVOJ SPREGNUTIH METODA
PLINSKE KROMATOGRAFIJE U KONTROLI KAKVOĆE
FARMACEUTSKIH TVARI I PROIZVODA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

Rad je predan na ocjenu Vijeću za specijalističke studije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja akademskog stupnja sveučilišnog magistra iz područja Razvoja lijekova.

Mentor rada: prof. dr. sc. Renata Jurišić Grubešić

Specijalistički rad obranjen je dana 16.11.2018. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Biljana Nigović
Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. prof.dr.sc. Renata Jurišić Grubešić
Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. dr. sc. Mila Lovrić, viša znanstv. sur.
KBC Zagreb

Rad ima 100 listova.

Rad je izrađen u okviru poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Veliko hvala prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić na nesebičnoj pomoći, usmjeravanju, savjetima i vremenu koje mi je pružila tijekom pripreme ovog rada.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji na podršci i pomoći za vrijeme mog školovanja.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj je rada kroz pregled recentne znanstvene i stručne literature predstaviti plinsku kromatografiju kao analitičku tehniku i prikazati njezin razvoj kroz godine, njezinu ulogu i područja u kojima se primjenjuje u farmaceutskoj analizi te kritički raspraviti o vrijednosti primjene takvog analitičkog pristupa na odabranim literaturnim primjerima. Cilj je također istražiti smjer razvoja plinske kromatografije u kontroli kakvoće farmaceutskih tvari i proizvoda, s naglaskom na njezinoj primjeni u sprezi s različitim analitičkim tehnikama u svrhu poboljšanja izvedbenih značajki.

Materijali i metode

Istraživanja u okviru ovoga rada teorijskog su karaktera i obuhvaćaju detaljan pregled dostupne stručne i znanstvene literature čija je tematika vezana za područje analitike i kontrole kakvoće primjenom plinske kromatografije i spregnutih tehnika. Pretraživane su bibliografske baze podataka, kao što su Medline/PubMed, ScienceDirect, Scopus, EBSCO i druge, uz primjenu ključnih riječi poput: *gas chromatography*, *pharmaceutical analysis*, *hyphenated techniques*, *pharmacokinetic studies*, *residual solvents*, *chromatographic fingerprinting* i sl. Prikupljeni su članci kritički proučeni s obzirom na temu rada, s naglaskom na smjeru razvoja plinske kromatografije i njezinim sprežanjem s različitim analitičkim tehnikama, kako bi se postigla još veća osjetljivost i učinkovitost analitičkih postupaka za određenu analitičku svrhu i primjenu. Kako bi se dobio uvid u značaj i zastupljenost plinske kromatografije na području analitike lijekova, proučene su važeće verzije Europske farmakopeje i Američke farmakopeje kao i smjernice Europske agencije za lijekove.

Rezultati

Rezultati su prikazani kroz pregled zastupljenosti plinske kromatografije u istraživačkom kao i u regulatornom području. Detaljan prikaz područja primjene plinske kromatografije te ulaganja u njezin razvoj daju uvid u značaj navedene tehnike. Prednosti i nedostaci, u usporedbi s ostalim analitičkim tehnikama, ukazuju na njezin položaj u farmaceutskoj analizi te na spremnost za daljnja ulaganja u razvoj plinske kromatografije kao analitičke tehnike. Iz predstavljene se materije također dobiva uvid u izazove koji se općenito postavljaju farmaceutskoj analizi danas i, sukladno tome, uvid u smjer kojim se ide pri razvoju i unaprjeđivanju analitičkih tehnika.

Zaključak

Plinska kromatografija (GC) analitička je tehnika s dugogodišnjom zastupljenošću u farmaceutskoj analizi. No, razvojem drugih analitičkih tehnika i metoda, posebice tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), čije su značajke pogodnije za analizu farmaceutika, važnost GC u farmaceutskoj analizi znatno opada. Posljedično tome, pregledom relevantne literature vezane uz spregnute analitičke tehnike, moguće je vidjeti da se primjena GC većinom svodi na uparivanje s masenim detektorom (MSD), dok se HPLC spreže s nizom različitih detektora. Nadalje, primjena kompleksnih spregnutih tehnika uglavnom se provodi u istraživačke svrhe, dok su analize u kontroli kvalitete (QC) rutinske i podrazumijevaju znatno jednostavnije analize koje obuhvaćaju određivanje unaprijed poznatih i očekivanih tvari. Unatoč svemu navedenom, zahvaljujući velikoj pozornosti koja se u posljednje vrijeme pridaje prisutnosti onečišćenja u farmaceuticima, posebice ostatnim otapalima za čiju je analizu GC uvjerljivo najpogodnija tehnika, plinska kromatografija će i dalje očuvati svoj značaj i mjesto u analizi farmaceutskih tvari i proizvoda.

SUMMARY

Objectives

The aim of this research is to present gas chromatography (GC) as an analytical technique and to show its development throughout the years, its role and the areas in which it is applied in the pharmaceutical analysis. A critical discussion on the value of applying such an analytical approach was also carried out through selected literature examples. The aim was also to investigate the direction of GC development in quality control (QC) of pharmaceuticals, with emphasis on its application in the form of hyphenated technique, which combine chromatographic and spectral characteristics to exploit the advantages of both and improve the analysis.

Materials and methods

This research is of a theoretical nature and includes a detailed overview of the available professional and scientific literature related to the field of analytics and quality control of Pharmaceuticals by application of gas chromatography (GC) and coupled techniques. Bibliographic databases such as Medline / PubMed, ScienceDirect, Scopus, EBSCO and others have been searched, using keywords such as gas chromatography, pharmaceutical analysis, hyphenated techniques, pharmacokinetic studies, residual solvents, chromatographic fingerprinting, etc. The selected articles have been critically studied with respect to the topic of the work, with an emphasis on the development of GC and its hyphenated techniques for a particular analytical purpose and application. In order to gain insight into the importance and application of GC in the field of pharmaceutical analysis, the European and American Pharmacopoeias have been studied, as well as the guidelines of the European Medicines Agency.

Results

The results are presented through a review of the application of gas chromatography (GC) both in research and in the regulatory field. This study presents a detailed description of the field of GC applications and gives an insight into the significance of this technique in the pharmaceutical analysis. The advantages and disadvantages of GC, compared to other related analytical techniques, indicate its position in the pharmaceutical analysis and the readiness to further investments in its development. The presented matter also provides an insight into the challenges that are generally posed to the modern pharmaceutical analysis and, accordingly, provides an overview of the development and improvement of analytical techniques.

Conclusion

Gas chromatography (GC) has long-term use in pharmaceutical analysis. However, the development of other analytical techniques and methods, particularly high performance liquid chromatography (HPLC), which is more suitable for pharmaceutical analysis, the importance of GC decreases significantly. Consequently, from a review of the relevant literature related to hyphenated analytical techniques, it is apparent that GC is mainly used in combination with a mass detector (GC-MS), whereas HPLC can be combined with a variety of detectors. Furthermore, complex hyphenated techniques are mainly used for research purposes, whereas quality control (QC) generally involves routine and significantly simpler analyzes which mainly include the determination of known and expected substances. Nevertheless, thanks to the great attention recently given to the impurities in pharmaceuticals, especially residual solvents most often determined by GC, this technique will continue to retain its significance and place in the analysis of pharmaceutical substances and products.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	4
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	6
3.1. Kromatografija	8
3.2. Načelo i izvedbene značajke plinske kromatografije	10
3.3. Spregnute metode plinske kromatografije	17
3.4. Prednosti i nedostaci plinske kromatografije	19
3.5. Primjena plinske kromatografije	33
4. RASPRAVA	25
4.1. Razvoj plinske kromatografije kroz odabrane studije	26
4.2. Odabrani primjeri primjene plinske kromatografije u analizi hlapljivih onečišćenja	28
4.3. Odabrani primjeri sprežanja plinske kromatografije s različitim detektorima	52
4.3.1. Plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom	53
4.3.2. Ostale spregnute tehnike plinske kromatografije	62
4.4. Odabrani primjeri primjene plinske kromatografije u analizi biljnih uzoraka	70
5. ZAKLJUČAK	90
6. LITERATURA	93
7. ŽIVOTOPIS	101

POPIS SKRAĆENICA

AED	Atomic Emission Detector	Atomski emisijski detektor
AES	Atomic Emission Spectroscopy	Atomska emisijska spektroskopija
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Djelatna tvar
BHC	Benzene Hexachloride	Benzen heksaklorid
[BMIM][NTf2]	1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	1-butil-3-metilimidazol bis[(trifluorometil)sulfonil]imid
CE	Capillary Electrophoresis	Kapilarna elektroforeza
CFR	Code Of Federal Regulations	Kodeks saveznih propisa, SAD
CI	Chemical Ionization	Kemijska ionizacija
COC	Cool On-Column Injection	Vrsta injektiranja kojom se tekući uzorak unosi izravno na kolonu (<i>inlet</i> i pećnica pri injektiranju moraju biti ohlađeni na ili ispod vrelišta otapala); omogućuje točne i precizne analize.
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane	Diklordifeniltrikloroetan
DMA	Dimethylacetamide	Dimetilacetamid
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Dimetilsulfoksid
ECD	Electron Capture Detector	Detektor apsorpcije elektrona
EI	Electron Ionization	Elektronska ionizacija
EMA	European Medicines Agency	Europska agencija za lijekove
EMS	Ethyl Methansulfonate	Etil metansulfonat
ESI	Electrospray Ionization	Elektrosprej ionizacija
FID	Flame Ionization Detector	Plameno-ionizacijski detektor
FPD	Flame Photometric Detector	Plamen fotometrijski detektor
FTIR	Fourier-transform Infrared Spectroscopy	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
GC	Gas Chromatography	Plinska kromatografija
GC-MS	Gas Chromatography-Mass spectrometry	Plinska kromatografija-masena spektrometrija
GLC	Gas-Liquid Chromatography	Plinsko-tekućinska kromatografija
GMP	Good Manufacturing Practise	Dobra proizvođačka praksa
GSC	Gas-Solid Chromatography	Plinsko-adsorpcijska kromatografija
HDPE bočice	High Density Polyethylene bottles	Bočice od polietilena visoke gustoće
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HS	Headspace	Analiza para iznad otopine plinskom kromatografijom
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove koji se primjenjuju kod ljudi
IR	Infrared	Infracrveni

IT	IL (Ionic Liquids)	Ionske tekućine
LC	Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija
LLE	Liquid Liquid Extraction	Ekstrakcija tekuće – tekuće
LOD	Limit Of Detection	Prag dokazivanja
LOQ	Limit of Quantification	Prag određivanja
LPME	Liquid Phase Microextraction	Mikroekstrakcija tekućom fazom
LVI	Large Volume Injection	Injektiranje velikih volumena
MDGC	Multidimensional Gas Chromatography	Višedimenzionalna plinska kromatografija
MHE	Multiple headspace extraction	Višestruka <i>headspace</i> ekstrakcija
MMS	Methyl Metansulfonate	Metil-metansulfonat
NMP	N-methyl-2-pirrolidone	N-metil-2-pirolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Nuklearna magnetska rezonancija
NPD	Nitrogen-Phosphorus Detector	Dušik-fosfori detektor
[P ₆₆₆₁₄][NTf ₂]	Trihexyltetradecylphosphonium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	Triheksildecilsulfonij bis[(trifluorometil)sulfonil]imid
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	Policiklički aromatski ugljikovodici
PC	Paper Chromatography	Papirna kromatografija
PDA	Photodiode Array detector	Fotodiodni detektor
PE spremnik	Polyethylene container	Polietilenski spremnik
POP	Persistent Organic Pollutants	Trajna organska onečišćenja
PT	Purge and Trap Sample Preparation System	„Pročisti-ulovi“ sustav pripreme uzorka
PTV	Programmed Thermal Vaporizing	Isparavanje pomoću programiranog grijača
RH	Relative Humidity	Relativna vlaga
RSD	Relative Standard Deviation	Relativno standardno odstupanje
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction	Ekstrakcija mješaćem – ekstrakcijska tehnika za obogaćivanje hlapljivih i poluhlapljivih organskih spojeva iz vodenog ili plinovitog medija
SFC	Supercritical Fluid Chromatography	Kromatografija superkritičnom tekućinom
SPE	Solid Phase Extraction	Ekstrakcija čvrstom fazom
SDME	Single Drop Microextraction	Mikroekstrakcija na kapi
SPME	Solid Phase Microextraction	Mikroekstrakcija čvrstom fazom
TCD	Thermal Conductivity detector	Detektor termičke vodljivosti
TLC	Thin-layer Chromatography	Tankoslojna kromatografija
TMSH	Trimethylsulfonium Hydroxide	Trimetilsulfonij hidroksid
TOF	Time-of-flight analyzer	Analizator vremena leta
t _R	Retention time	Retencijsko vrijeme/Vrijeme zadržavanja
UV	Ultra Violet	Ultra ljubičasto
WHO	World Health Organization	Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Kroz drugu polovicu 20. st., razvoj lijekova i farmaceutske industrije doživio je velik napredak i sukladno tome uzrokovao revoluciju na području ljudskog zdravlja. Analitičke tehnike imaju značajnu ulogu u raznim fazama kroz koje lijek prolazi u svom životnom ciklusu. S obzirom na činjenicu da lijek može doći u promet samo ako ima odgovarajuću djelotvornost, sigurnost primjene i kakvoću, sukladno važećim regulatornim zahtjevima, valja istaknuti iznimnu važnost farmaceutske analize. Analitičke tehnike se koriste kod procjenjivanja stabilnosti molekule, kvantifikacije i identifikacije onečišćenja, određivanja sadržaja ljekovite tvari u konačnom proizvodu te općenito imaju ulogu u razumijevanju kemijske i fizičke stabilnosti lijeka kao i kod odabira i dizajna dozirnog oblika. Obuhvaćaju analizu polaznih tvari, sintetičkih intermedijera, proizvoda farmaceutskih istraživanja (potencijalnih farmakona), formulacija lijeka, razgradnih tvari, bioloških uzoraka koji sadrže ljekovitu tvar i njihovih metabolita. Sve se to provodi s ciljem prikupljanja podataka koji će pridonijeti najvećoj učinkovitosti i sigurnosti terapije te maksimalnoj ekonomičnosti proizvodnje lijeka. Iz navedenog je vidljivo da farmaceutska analiza ima ključnu ulogu u osiguravanju kvalitete farmaceutske proizvoda [1-4].

Razvojem znanosti i tehnologije, zajedno sa sve oštrijim regulatornim zahtjevima koji se postavljaju farmaceutskoj industriji, farmaceutska je analitika postala daleko kompleksnija negoli je to bila ne tako davno prije.

Jedna od primarnih analitičkih tehnika u identifikaciji i kvantifikaciji tvari jest kromatografija. U usporedbi s tekućinskom kromatografijom (LC), plinska kromatografija (GC) rjeđe je zastupljena u farmaceutskoj industriji. Glavni razlog tome leži u činjenici da je većina farmaceutskih tvari polarne prirode i termolabilna te često ionizirana što ih čini nepogodnima za analizu primjenom GC. Unatoč tome, GC tu još uvijek čvrsto drži svoje mjesto, uglavnom u kontroli onečišćenja i razgradnih produkata [5].

Osim toga, GC u separacijskoj moći nadilazi LC pa još uvijek ima znatnu primjenu u farmaceutskoj analizi, razvija se usporedo s ostalim analitičkim tehnikama i proširuje područja svoje primjene.

Zbog već spomenutih, sve strožih regulatornih zahtjeva u području farmaceutskih proizvoda, mnogo se pozornosti posvećuje karakterizaciji onečišćenja i njihovoj analizi kada se pojavljuju čak i u tragovima. Sukladno tome, velik je napredak učinjen u povećanju osjetljivosti i brzine analitičkih metoda, a jedan od njih je analiza primjenom suvremenih i sofisticiranih spregnutih tehnika koja je već široko zastupljena u istraživanju i industriji [4].

Detaljan prikaz područja primjene plinske kromatografije u farmaceutskoj analizi daje uvid u značaj spomenute analitičke tehnike, a kroz smjer njezina razvoja predstavljaju se novi trendovi vezani kako za plinsku kromatografiju, tako i za instrumentalnu analitičku kemiju općenito. Ova pregledna studija također daje uvid u nove zahtjeve i izazove koji se postavljaju farmaceutskoj analizi te, sveukupno, u značajan rad i sredstva koja se ulažu u područje farmaceutske analitike kako bi se osigurala kvaliteta gotovog proizvoda.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovoga specijalističkog rada predstaviti plinsku kromatografiju kao analitičku tehniku, prikazati njezin razvoj kroz povijest te dati uvid u njezinu primjenu i položaj u analitici farmaceutskih tvari i proizvoda, kao i u kontroli kakvoće prirodnih ljekovitih tvari. Nadalje, pregledom raspoložive relevantne stručne i znanstvene literature, cilj je ukazati na prednosti i ograničenja plinske kromatografije te prikazati smjer njezina razvoja u farmaceutskoj analitici, s naglaskom na njezinoj uporabi u sprezi s različitim analitičkim tehnikama, sa svrhom poboljšanja izvedbenih značajki i dobivanja što većeg broja relevantnih i kvalitetnih analitičkih informacija.

3. MATERIJALI I METODE –

Sustavni pregled saznanja o temi

Istraživanja u okviru ovoga rada teorijskog su karaktera i obuhvaćaju detaljan pregled dostupne stručne i znanstvene literature čija je tematika vezana za područje analitike i kontrole kakvoće primjenom plinske kromatografije (GC) i s njom spregnutih tehnika. Pretraživane su bibliografske baze podataka, kao što su Medline/PubMed, ScienceDirect, Scopus, EBSCO i druge, uz primjenu ključnih riječi poput: *gas chromatography, pharmaceutical analysis, hyphenated techniques, pharmacokinetic studies, residual solvents, chromatographic fingerprinting* i sl.

Prikupljeni su članci kritički proučeni s obzirom na temu rada, s naglaskom na literaturi koja se bavi smjerom razvoja plinske kromatografije i njezinim sprežanjem s različitim analitičkim tehnikama, kako bi se postigla još veća osjetljivost i učinkovitost analitičkih postupaka za određenu analitičku svrhu i primjenu. Ova studija predstavlja ogled o značaju GC kroz povijest, uz prikaz odabranih primjera njezine primjene.

Kako bi se dobio uvid u značaj i zastupljenost plinske kromatografije na području analitike lijekova, također su proučene važeće verzije Europske farmakopeje (Ph. Eur.) i Američke farmakopeje (USP), kao i smjernice Europske agencije za lijekove (EMA). Naime, farmakopejske monografije predstavljaju službene zahtjeve kakvoće farmaceutskih tvari, a vezane smjernice (npr. ICH) imaju za krajnji cilj razvoj globalnih standarda za farmaceutske proizvode, što u konačnici rezultira reduciranjem globalnih troškova njihova istraživanja, razvoja, proizvodnje i registracije, kao i vremena potrebnog da djelotvorni, sigurni i kvalitetni farmaceutski proizvodi postanu dostupni krajnjem korisniku.

3.1. Kromatografija

Pregledom stručne i znanstvene literature, vezano za tehnike koje se koriste u analitici farmaceutskih proizvoda, može se uočiti da se velik dio interesa koncentrira na tehnike odjeljivanja, posebice na primjenu kromatografije.

Kromatografske separacijske tehnike predstavljaju višefazne tehnike odjeljivanja u kojima se komponente uzorka raspodjeljuju između nepokretne/stacionarne i pokretne/mobilne faze. Pri tome stacionarna faza može biti krutina ili tekućina vezana za krutinu/gel, dok je mobilna faza u tekućem ili plinovitom obliku. Kromatografije se temelje na pojavama adsorpcije, razdjeljenja, ionske izmjene ili isključenja koje omogućuju odjeljivanje sastojaka u smjesi. Uzorak otopljen u mobilnoj fazi koja je tekućina, plin ili superkritična tekućina kreće se preko stacionarne faze koja može biti u koloni ili na plohi. Dakle, kromatografski postupci odjeljivanja temelje se na razdiobi između stacionarne faze velike površine i mobilne faze koja prelazi preko stacionarne. Ravnoteže koje određuju fenomene razdiobe ovise o svojstvima obje faze i distribuiranih tvari [6, 7].

Europska farmakopeja navodi sljedeće vrste kromatografija:

- papirna kromatografija (*paper chromatography*, PC);
- tankoslojna kromatografija (*thin-layer chromatography*, TLC);
- plinska kromatografija (*gas chromatography*, GC);
- tekućinska kromatografija (*liquid chromatography*, LC);
- kromatografija isključenjem po veličini (*size-exclusion chromatography*, SEC);
- kromatografija superkritičnom tekućinom (*supercritical fluid chromatography*, SFC) [7].

Zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata zove se kromatogram. S obzirom na tip razvijanja kromatograma, razlikujemo plošne i diferencijalne kromatograme. Kod plošnih tehnika, PC i TLC, stacionarna faza je ploha ili se nalazi na plohi, a mobilna se faza kreće silama kapilariteta ili pod utjecajem gravitacije preko stacionarne faze. Tako nastaju plošni kromatogrami kod kojih razne sastavnice uzorka prelaze različite udaljenosti u istom vremenu pa se po završetku odjeljivanja detektiraju na stacionarnoj fazi. Diferencijalni kromatogrami dobivaju se kolonskim tehnikama, npr. HPLC, GC, SFC. Ovdje svi sastojci prelaze isti put, ali zbog specifičnih interakcija sa stacionarnom fazom, na izlazu iz kolone pojavljuju se u različitom vremenu pa ih se detektira izvan stacionarne faze. Idealni kromatogrami predstavljaju niz Gaussovih krivulja na baznoj liniji [6, 7].

3.2. Načelo i izvedbene značajke plinske kromatografije

Plinska kromatografija (GC) je analitička tehnika s dugogodišnjom primjenom koju su prvi predstavili Martin i Jacobs u svom radu 1952. godine, temeljem ideje iznesene jedanaest godina ranije od strane Martina i njegovog suradnika Syngea da bi se separacija hlapljivih komponenata mogla postići korištenjem plina umjesto tekućine kao mobilne faze. Brzo je postalo jasno da je plinska kromatografija jednostavna, brza i primjenjiva za odjeljivanje mnogih hlapljivih tvari, posebice u petrokemijskoj industriji [8].

GC je kromatografska separacijska tehnika koja se zasniva na razlici u raspodjeli tvari između dviju faza koje se međusobno ne miješaju. Pri tome se mobilna (pokretna) faza u plinovitom obliku kreće preko ili kroz stacionarnu (nepokretnu) fazu sadržanu u koloni. Plinska kromatografija primjenjiva je za tvari koje su hlapljive na njezinim radnim temperaturama, a uglavnom se temelji na mehanizmima adsorpcije, masene distribucije ili isključivanja po veličini [7].

Pod plinskom kromatografijom uobičajeno se podrazumijeva plinsko-tekućinska kromatografija (GLC) čiji je temelj funkcioniranja razdjeljenje tvari između pokretne plinovite i nepokretne tekuće faze. Ona se provodi tako da se analizirani spojevi prevedeni u plinoviti oblik eluiraju pomoću plina kao pokretne faze uzduž kolone. Pokretna faza je sam plin nosač pa nema interakcija s analitom. Kod GSC (plinsko-adsorpcijska kromatografija) odjeljivanje se temelji na adsorpcijsko-desorpcijskom procesu između plinovite i čvrste faze. Tipične nepokretne faze čine anorganski adsorbensi, kao npr. molekularna sita (Al-silikat), silikagel, dijatomejske zemlje (silicijevi skeleti micelularnih algi koje sadrže 90% amorfne silicijeve kiseline), ali i porozni polimeri, kao stiren-DVB kopolimerizati, aktivni ugljen ili teflon. Prednosti GSC pred razdjelnom GLC su široki radni temperaturni interval, stabilnost bazne linije te

brzo uravnoteženje. Nedostatci su asimetrični pikovi koji nastaju zbog uskog linearnog područja adsorpcijske izoterme, duga vremena zadržavanja zbog velikih adsorpcijskih entalpija, heterogene površine i katalitičke aktivnosti mnogih adsorbenasa te ograničeni broj adsorpcijskih medija koje je teško standardizirati. GSC je važna za odjeljivanja plinova niskog vrelišta kao što su vodik, dušik, kisik, metan, CO₂, CO ili inertni plinovi, kao i lagani ugljikovodici, te u analizi plinova u zraku.

Plinsko-kromatografski sustavi razlikuju se po tipu plina nosača, sustavu injektiranja, kolonama i detektorima. Kao plinovi nosači mogu poslužiti He, Ar, N₂, CO₂, H₂. Protok plina nosača kao pokretne faze mora biti konstantan za reproducibilna mjerenja. Spojevi koji se kromatografiraju, otopina ili plin, injektiraju se preko injektora u struju plina nosača. Tu po potrebi može doći do isparavanja tvari koja onda nošena plinom nosačem ulazi u kolonu. Temperatura sustava za evaporaciju obično je 50 °C iznad vrelišta najteže isparljive sastavnice smjese [6].

GC kolone se razlikuju po duljini i promjeru, a mogu biti kapilarne ili punjene. Kod punjenih kolona, tipičnih dimenzija od 1,5 m × 4 mm, nepokretna tekuća faza imobilizirana je na granuliranoj podlozi. Najčešći čvrsti nosač su dijatomejske zemlje. Kod kapilarnih kolona, unutarnja stijenka kapilare prevučena je izravno ili preko tankog sloja poroznog čvrstog nosača tankim filmom tekuće nepokretne faze. Kapilarne kolone su dulje te su najčešćih dimenzija 30 m × 0,32 mm × 0,1 mm, no moguće su duljine i do 100 m, unutarnjeg promjera 0,15-1 mm. Radi se o silikonskim cijevima kojima je unutrašnja stijenka presvučena imobiliziranom stacionarnom fazom u tekućem obliku. Stacionarne faze su različitih vrsta, ovisno o prirodi analiziranog uzorka i potrebama analize. Osim spomenutih, također postoje kolone kojima je stacionarna faza krutina [6, 7].

Detektori moraju omogućiti selektivno i/ili osjetljivo dokazivanje. Najčešći su plameno-ionizacijski detektor (FID), detektor termičke vodljivosti (TCD) i detektor apsorpcije elektrona (ECD). U obzir dolaze i termionski detektor, te spektroskopski detektori. Za pouzdanu identifikaciju odijeljenih spojeva sve se više koristi GC-MS sustav, dakle spektrometar masa kao detektor (MSD) [6, 7].

Tekućine koje se koriste kao nepokretne faze trebaju biti termički i kemijski stabilne, niske isparljivosti, s temperaturom vrelišta ~ 100 °C iznad tražene temperature kolone. Tipične polarne nepokretne faze nose funkcionalne skupine kao što su -CN, >C=O , -OH, trifluoro- ili poliesterske skupine. One pokazuju značajnu selektivnost za alkohole, organske kiseline ili amine. Nepolarne nepokretne faze su ugljikovodici ili siloksani pogodni za odjeljivanje zasićenih ili halogeniranih ugljikovodika. Analiti osrednje polarnosti (eteri, ketoni, aldehidi) odjeljuju se na modificiranim fazama. Mogućnosti odjeljivanja na nekim nepokretnim fazama prikazuje Tablica 1 [6].

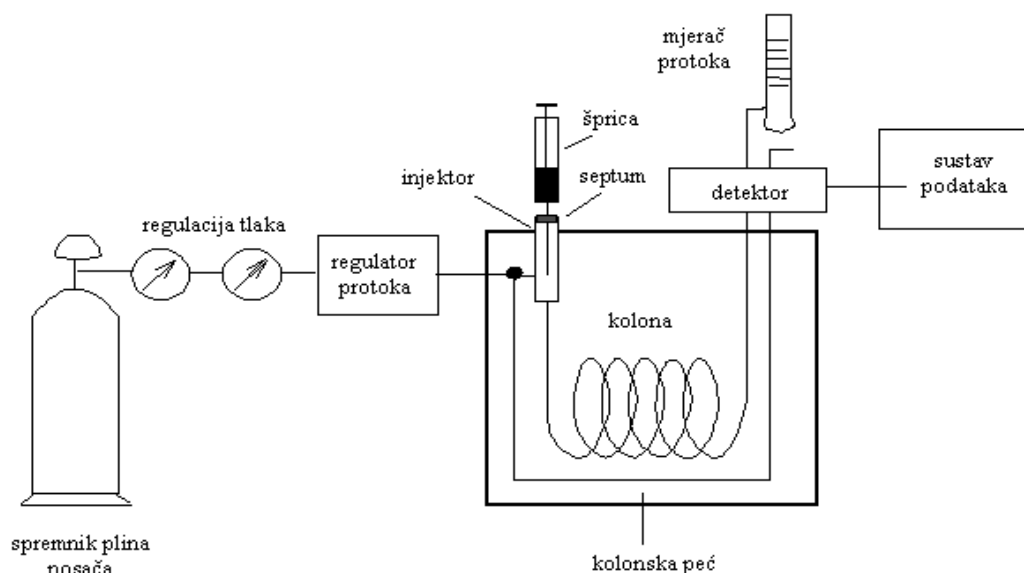
Tablica 1. Neke tekuće nepokretne faze u GC; preuzeto iz [6].

Analit	Nepokretna faza*	Temperatura (°C)	Polarnost
Ugljikovodici	Apolan-87	50-300	Nepolarna
Poliglikoli	Polietilenglikol (CARBOWAX)	50-225	Polarna
Esteri	Etilen glikol sukcinat Diizodecil adipat	100-200 20-125	Jako polarna Srednje polarna
Spojevi s dušikom	1,2,3-Tris-(2-cijanoetoksi)-propan (CYANO B)	110-200	Polarna
Silikoni	Metil siloksani (OV-1, SE-30) Fenil siloksani (OV-22) Nitrilo siloksani (OE-4178)	20-300	Nepolarne Srednje polarne Jako polarne
* U zagradi su naznačeni komercijalni nazivi.			

Selektivnost tekuće nepokretne faze moguće je mijenjati uvođenjem pogodnih supstituenata. Kiralne faze koriste se za odjeljivanja optičkih izomera (enantiomera). Njih se može dobiti npr. iz optički aktivnih aminokiselina.

Kod izotermne GC, temperatura kolone je konstantna te je ovakvo odjeljivanje zadovoljavajuće ako treba odijeliti spojeve ograničenog područja vrelišta. Ako je područje vrelišta sastavnica smjese široko, provodi se temperaturno programirana GC te se temperatura tijekom analize povećava stupnjevito ili kontinuirano, a da se pri tome ne naruše niti granice dokazivanja, niti preciznost mjerenja pika. Temperaturno programiranje u GC analizi analogno je gradijentnom ispiranju kod LC i programiranju tlaka kod kromatografije superkritičnom tekućinom (SFC) [6].

Većina modernih, komercijalnih sustava za plinsku kromatografiju radi na niže opisani način, shematski prikazan Slikom 1.



Slika 1. Shematski prikaz plinskog kromatografa; preuzeto iz [6].

Dakle, sustav za plinsku kromatografiju sastoji se od 6 glavnih komponenata, a čine ga: sustav za dopremu plinova, injektor, detektor, pećnica, kolona i sustav za obradu podataka. U većini slučajeva, injektor, detektor i pećnica su integralni dijelovi plinskog kromatografa, a kolona, plinski sustav i sustav za prikupljanje i obradu podataka djeluju zasebno [9].

Tijekom analize, potrebni plinovi se iz plinskih spremnika preko sustava cijevi kontinuirano dovode do plinskog kromatografa. Osim na injektorski blok, dopremaju se i koriste i na detektoru instrumenta [8].

Primjenjuju se sljedeći plinovi:

plin nositelj: H_2 , He, N_2 – dovodi se na injektor preko kojega struji kroz kolonu cijelom njezinom duljinom i izlazi kroz detektor;

make-up plin: H_2 , He, N_2 ;

detektorski plin: H_2 i zrak, Ar ili Ar i CH_4 , N_2 , ovisno o tipu detektora.

Prije ulaska na sam instrument, plinovima se regulira tlak, a uobičajeno je i da se filtriraju kako bi se osigurala visoka čistoća [8].

Regulatori tlaka na spremnicima ili generatorima plina kontroliraju količinu plina koja će biti dostavljena do plinskog kromatografa, a tlačni regulatori na samom uređaju kontroliraju protok plina nakon što on uđe u instrument [9].

Kod uvođenja uzorka u instrument, on se injektira na injektorski blok koji je grijan i pri tome uzorak ispari [8]. Injektor se grije na temperaturu 100-300 °C, pri kojoj sve hlapljive komponente uzorka prelaze u paru. Plin nositelj se miješa s tim uparenim komponentama i nosi ih dalje na kolonu na kojoj će se provoditi odjeljivanje [9].

Nadalje, postoji više različitih tipova injektora/inleta, kao npr.:

Split/splitless – *split* injektori razdvajaju ukupni volumen uzorka na dva nejednaka dijela, od kojih samo manji odlazi na kolonu i na taj način se sprječava prekapacitiranje kolone; *splitless* injektori cijeli volumen prenose na kolonu zbog čega su pogodni za analize u tragovima.

Programmed Thermal Vaporizing (PTV) – injektor kod kojega se temperatura postupno diže i pri tome se komponente koje isparavaju pri nižim temperaturama preko ventila ispuštaju van i ne odlaze na kolonu.

Cool-on-column (COC) – uzorak se u tekućem stanju uvodi na kolonu, što je pogodno za termalno nestabilnije uzorke i uzorke koji imaju veliku razliku u vrelištima komponenata [8].

Osim toga, postoje i različite tehnike injektiranja uzorka na instrument pa se tako u nekim slučajevima koriste tehnike injektiranja bez brizgalice, kao što su: *purge and trap* ili *headspace* tehnika [9].

Nakon ulaska na kolonu, komponente uzorka nošene inertnim plinom stupaju u interakciju sa stacionarnom fazom i razdvajaju se između stacionarne faze (krutina, ili imobilizirana polimerna tekućina) i mobilne faze (plin) [9]. Stupanj tog razdvajanja ovisi o kemijskom afinitetu analita za stacionarnu fazu i tlaku pare analita koji ovisi o temperaturi kolone. Komponente koje imaju slabiji afinitet prema stacionarnoj fazi bit će slabije zadržane stacionarnom fazom i prema tome će se brže kretati kroz kolonu te prve stići do detektora. Temperatura kolone, koja utječe na tlak pare analita, kontrolira se temperaturom pećnice u kojoj se kolona nalazi. Kao što je već spomenuto, ona može tijekom analize biti konstantna ili rasti prema zadanom temperaturnom programu [8].

Mjera u kojoj će se pojedina komponenta zadržavati ovisi o duljini i promjeru kolone, kemijskoj strukturi i debljini sloja stacionarne faze, kao i o temperaturi kolone. Ako su svi ovi čimbenici ispravno izabrani, različite komponente kretat će se različitom brzinom kroz kolonu i u različitom vremenu dolaziti na detektor [9].

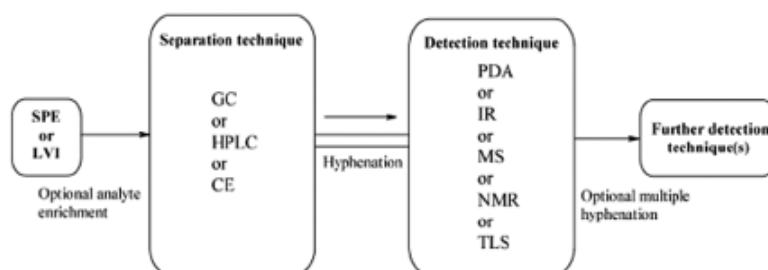
Po izlasku iz kolone, analiti nošeni plinom nositeljem ulaze u detektor. On reagira na određeno fizikalno-kemijsko svojstvo analita, umnožava odgovor i generira elektronički signal proporcionalan njegovoj količini [8]. Neki detektori reagiraju na svaku komponentu neovisno o njezinim tipu, dok drugi reagiraju samo s određenim vrstama spojeva/tvari. Signal s detektora tada se šalje sustavu za snimanje i obradu podataka. Uređaj za snimanje signala prikazuje intenzitet odgovora detektora u ovisnosti o vremenu koje je prošlo od injektiranja uzorka na instrument. Taj prikaz izgleda kao serija pikova, a naziva se kromatogram. Uređaji za snimanje signala vežu se na elektronička računala, a na njima se uglavnom nalazi i sustav za upravljanje instrumentom [9].

3.3. Spregnute metode plinske kromatografije

Zbog rapidno rastućih zahtjeva koji se odnose na broj i kvalitetu analitičkih mjerenja, veliki se naponi ulažu u razvoj novih tehnika i primjenu najnovijih dostignuća na području analitičke kemije [4].

Jedan od smjerova razvoja analitičkih tehnika i metoda rješavanja kompleksnih analitičkih problema jest primjena sprežavanja koja podrazumijeva kombiniranje različitih analitičkih tehnika uz pomoć odgovarajućeg sučelja. Ono podrazumijeva uparivanje tehnike odjeljivanja, kao što je kromatografija, sa spektralnim tehnikama. Pojam sprežavanja („hyphenation“) prvi je upotrijebio Hirschfield još 1980. godine kako bi opisao moguću kombinaciju dviju ili više instrumentalnih analitičkih metoda u pojedinačnoj analizi [5]. Prva spregnuta analitička tehnika bila je upravo plinska kromatografija u kombinaciji s masenim spektrofotometrom (GC-MS), koji se razvio brzo nakon nastanka same plinske kromatografije [10].

Spregnute tehnike najčešće kombiniraju kromatografske i spektralne metode kako bi iskoristile prednosti obje tehnike prilikom analize, shematski prikazano Slikom 2. Pri tome kromatografija proizvodi čiste ili gotovo čiste frakcije kemijskih komponenata koje se pojavljuju u smjesi, a spektroskopija te komponente identificira korištenjem standarda ili baze podataka [10].



Slika 2. Shematski prikaz sprežavanja analitičkih tehnika; preuzeto iz [10].

Za rješavanje većine analitičkih problema primjenom spregnutih tehnika, najčešće se pristupa korištenju tekućinske ili plinske kromatografije spregnute s MS detektorom. Kao i uvijek, u mnogim je slučajevima potrebna i dodatna informacija koja se onda može dobiti primjenom npr. atomske emisijske spektroskopije (AES), FTIR spektroskopije, NMR spektroskopije, itd. [11].

Dakle, spregnuta plinska kromatografija može podrazumijevati uparivanje separacije visoke učinkovitosti koju posjeduje plinska kromatografija sa 1) sofisticiranim detektorima visoke podatkovne moći koji mogu funkcionirati i kao samostalni instrumenti i 2) automatiziranim sustavima za pripremu uzoraka [12].

Prednosti sprezanja analitičkih tehnika su sljedeće:

1. Pružaju brzu i preciznu analizu;
2. Posjeduju visok stupanj automatizacije;
3. Postiže se brži protok uzoraka;
4. Postiže se bolja reproducibilnost;
5. Reducirana je mogućnost kontaminacije zbog zatvorenosti sustava;
6. Istovremeno se odvija separacija i kvantifikacija [13].

Sprezanje ne treba nužno biti između dviju tehnika, nego se sprežati može i više tehnika, bilo separacijskih, bilo detekcijskih, kao npr. LC-PDA-MS, LC-MS-MS, LC-NMR-MS, LC-PDA-NMR-MS i slično. Također, kada je bitna analiza u tragovima i potrebno je obogatiti, odnosno koncentrirati analit, moguće je ukomponirati i ekstrakciju čvrstom fazom (*solid phase extraction*, SPE), mikroekstrakciju čvrstom fazom (*solid phase microextraction*, SPME) ili injektiranje velikih volumena (*large volume injection*, LVI), kako bih se dobio još moćniji analitički sustav, primjerice SPE-LC-MS ili LVI-GC-MS [10].

3.4. Prednosti i nedostatci plinske kromatografije

Neke od prednosti plinske kromatografije u odnosu na ostale kromatografske tehnike niže su navedene.

- Kada se razmatra brzina analize, GC je možda i najbrža kromatografska tehnika, zahvaljujući visokoj učinkovitosti separacije. Kapilarna plinska kromatografija sposobna je provesti bolju separaciju nego HPLC [8]. Kao primjer snage razdvajanja plinske kromatografije može se navesti rad T. A. Bergera [14] prema kojemu je postignuto razdvajanje 907 različitih komponenata. Doduše, radilo se o 450 m dugačkoj kapilarnoj koloni koja, unatoč duljini, nije izgubila na kvaliteti separacije pa je tako i dalje dobivena visoka vrijednost teorijskih tavana, jedan od parametara koji određuju kvalitetu separacije. Najčešće korištene kolone u plinskoj kromatografiji dugačke su 30-60 m.
- Kombiniranjem kemijskog sastava stacionarne faze i temperaturnog programa kojemu se izlaže kolona, postižu se vrlo kompleksne separacije, uključujući i razdvajanje kiralnih i drugih pozicijskih izomera. Temperaturno programiranje koristi se kako bi se ubrzalo eluiranje pikova kojima bi u protivnom trebalo dugo vremena da napuste kolonu [8].
- S detektorima širokog spektra osjetljivosti i linearnosti, GC je izvrsna za kvantitativne analize određenih tvari.
- Primjenom GC, postiže se visoka preciznost analize s RSD vrijednostima < 1%.
- GC zahtijeva male volumene uzoraka (< 1 mL) [8].
- Mobilna faza nije varijabilna i ne zahtijeva zbrinjavanje te je jeftinija u usporedbi s onima koje koristi HPLC, čak i u slučaju primjene helija kao najskupljeg plina [15].

No, zbog ograničenja GC na hlapljive i termostabilne komponente, HPLC je daleko najprimjenjivija tehnika u farmaceutskoj analizi [15]. Primjenu HPLC ne ograničava hlapljivost komponenata. Doduše, tvar mora biti topljiva u mobilnoj fazi, ali na temelju toga se i izabire sastav mobilne faze. Također je moguće analizirati molekule širokog raspona polarnosti, ionizirane uzorke i nema gornje granice kada se radi o molekulskoj masi analiziranih spojeva, dok je kod GC gornja granica uglavnom oko 1000 Da ($1,66 \times 10^{-21}$ g) [16].

Da bi tvar bilo moguće analizirati plinskom kromatografijom, ona mora posjedovati dobru hlapljivost na temperaturama ispod 350-400 °C. Drugim riječima, sve ili dobar dio molekula pri navedenoj temperaturi trebaju biti u plinovitom ili parnom stanju [9]. Moguće je provesti derivatizaciju kako bi se povećala hlapljivost, ali ona istovremeno čini pripremu uzorka kompleksnijom i može uzrokovati kvantifikacijske pogreške.

Sljedeća potrebna značajka za GC jest da tvar mora biti termostabilna i da ju je moguće brzo prevesti u paru bez razgradnje ili reakcije s drugim tvarima (kao npr. sa sastojcima stacionarne faze kolone za plinsku kromatografiju) [9].

Zaključke o primjenjivosti plinske kromatografije na određenim tvarima moguće je donijeti temeljem njihove građe i molekulske mase. Dakle, slabo hlapljive tvari nisu pogodne za plinsku kromatografiju jer ih nije moguće brzo prevesti u parno stanje. Kod procjene hlapljivosti neke tvari, vrelište nije uvijek dobar indikator. Postoje mnoge tvari s visokom točkom vrenja koje se analiziraju plinskom kromatografijom. Uglavnom vrijedi postavka da što je veća molekulska masa ili polarnost tvari, manja je njezina hlapljivost, pri čemu treba razmotriti oba čimbenika, budući da velika, nepolarna tvar može imati veću hlapljivost od male, polarne. Također, jedna polarna grupa na velikoj

molekuli ima manje utjecaja nego jedna polarna grupa na maloj molekuli. Prisutnost polarnih grupa, kao hidroksilne i amino skupine, može znatno sniziti hlapljivost tvari. Pravilo je i da anorganske tvari nisu pogodne za GC analize jer metali i soli ne posjeduju potrebnu hlapljivost. Većina je organskih spojeva pogodna za GC analizu, ali i tu postoje iznimke. Mnoge su biomolekule i farmaceutici termički nestabilni i razgrađuju se na temperaturama pri kojima se provode GC analize. Također, neke tvari reagiraju s materijalima koji se koriste u kolonama za plinsku kromatografiju [9].

3.5. Primjena plinske kromatografije

Plinska se kromatografija može koristiti za izravno razdvajanje i analizu plinovitih uzoraka, tekućina i hlapljivih krutina. Primjenu nalazi u farmaceutskoj industriji, studijama okoliša, petrokemijskoj industriji, kliničkoj kemiji, prehrambenoj industriji i drugdje [17].

GC se u farmaceutskoj analizi najčešće koristi za određivanje hlapljivih onečišćenja u ljekovitim tvarima i pripravcima. To su uglavnom ostatna otapala koja potječu iz proizvodnog procesa. Također je metoda odabira prilikom određivanja sastava eteričnih ulja i masnih kiselina u uljima. Eterična ulja se dodaju kao pomoćne sirovine u farmaceutske proizvode zbog njihova mirisa i okusa, a sadrže složenu smjesu lako hlapljivih sastojaka. Biljne masti i ulja koriste se kao pomoćne tvari u izradi farmaceutskih oblika za dermalnu primjenu, krema i masti [3].

U usporedbi s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC), GC se rjeđe primjenjuje u farmaceutskoj industriji pri određivanju sadržaja te ispitivanju čistoće farmaceutskih tvari i proizvoda. Razlog tome je činjenica da je većina farmaceutika polarna, termolabilna te često ionske prirode. Primjena GC u osiguranju i kontroli kvalitete sintetičkih farmaceutskih proizvoda svodi se zbog toga uglavnom na određivanje organskih hlapljivih intermedijera u konačnom proizvodu ili na određivanje organskih hlapljivih onečišćenja polaznih materijala. Pri tome se koriste jednostavni detektorski sustavi, od kojih je najprimjenjiviji plameno-ionizacijski detektor (FID) [5].

Na području analitike biljnih proizvoda, GC se primjenjuje zajedno s HPLC za identifikaciju i kvantifikaciju sastojaka biljnih ekstrakata, kromatografsko *fingerprintiranje* i pri analizama *in vivo* metabolizma biljnih sastojaka kod farmakokinetičkih studija [18]. Nadalje, GC se primjenjuje u određivanju onečišćenja:

pesticida, herbicida i ostalih otapala te u karakterizaciji biološki aktivnih tvari: alkaloida, flavonoida, trjeslovina, terpena, eteričnih ulja, a često se koristi u kombinaciji s masenim detektorom, koji je ujedno i najčešće sprežana tehnika s GC [19]. Kombiniranje kromatografske separacije sa spektroskopskim detektorima u svrhu analize kompleksnih biljnih uzoraka postalo je najvažniji pristup karakterizaciji ciljanih i nepoznatih kemijskih sastojaka. Stoga, za većinu problema u području analitike biljnih tvari, kromatografija u *on-line* kombinaciji sa spektroskopskim detektorima postaje preferirani pristup analizi [20].

Kvantitativna GC može biti metoda izbora za određene tvari kojima nedostaje kromofor, npr. za analizu mnogih aminokiselina, masnih kiselina i šećera.

GC se također koristi za određivanje ljekovitih tvari i njihovih metabolita u biološkim materijalima. Može razdvojiti tvari s velikom razlikom u hlapljivosti zbog čega je pogodna tehnika za pregled (*screening*) bioloških materijala kao što su krv i urin. Pri tome se koristi za određivanje nepoznatih sastojaka u svrhu toksikoloških i doping analiza kojima se identificiraju poznate i nepoznate tvari unesene u organizam. Za takve analize preferira se spregnuta kombinacija GC-MS [15].

Pregledom monografija Europske farmakopeje, uočava se primjena GC u analizi ostalih otapala, određivanju udjela etanola u tekućim farmaceutskim pripravcima, određivanju sastava masnih kiselina, sterola u masnim kiselinama te sadržaja medicinskih plinova (kombinacija s TCD detektorom). Kada se radi o ispitivanju srodnih tvari ili određivanju sadržaja, češće se pojavljuje kao tehnika za analizu pomoćnih farmaceutskih tvari nego aktivnih komponenata [7].

U općim poglavljima Američke farmakopeje [USP <467>, <228>, <469>, <401>], GC se primjenjuje za sljedeće:

- za određivanje ostatnog etilen oksida i dioksana u proizvodima koji se pripremaju iz etilen oksida, a provodi se primjenom GC-FID;
- za određivanje etilen glikola, dietilen glikola i trietilen glikola u etoksiliranim proizvodima koji ih mogu sadržavati kao posljedicu proizvodnog procesa; takvi su npr. polietilenglikoli i polisorbati koji se koriste kao pomoćne tvari u farmaceutskoj industriji, a također se određuju primjenom GC-FID;
- za određivanje sastava masnih kiselina u općem poglavlju o mastima i masnim uljima;
- najveću zastupljenost ima u monografiji o ostatnim otapalima [21].

4. RASPRAVA

4.1. Razvoj plinske kromatografije kroz odabrane studije

Kao što je već uvodno spomenuto, najvažnijom analitičkom tehnikom na području farmaceutske analize smatra se kromatografija. Nakon što ju je na početku 20. stoljeća otkrio Tswett, pa sve do 1950-ih godina, kromatografija je postala zrela, dobro utemeljena disciplina s velikom i brzo rastućom važnošću u mnogim granama znanosti i tehnologije. U tom su se desetljeću odigrala još dva velika događaja vezana za tu tehniku, a to je bilo dodjeljivanje Nobelove nagrade A. J. P. Martinu i R. L. M. Syngeu za otkriće „razdjelne kromatografije“ (*partition chromatography*) 1952. god. i utemeljenje prvog časopisa posvećenog kromatografiji (*Journal of Chromatography*), godine 1958. [22].

Danas postoji znatan broj tematski srodnih časopisa, u citiranom radu S. Göröga [22] navedeno je njih 18, a o važnosti kromatografije i srodnih tehnika govori činjenica da se unatoč tom broju, većina radova vezanih za kromatografiju još uvijek objavljuje izvan spomenutog kruga, tj. u časopisima specijaliziranim za različita područja primjene (kao što je farmaceutska i prehrambena industrija, zaštita okoliša i dr.), gdje kromatografija opet ima najveći značaj i uporabu.

Ako želimo popratiti razvoj kromatografije na temelju zastupljenosti u farmakopejama, možemo primijetiti da u verziji američke farmakopeje, USP 16, izdane 1960. god., kromatografske metode nisu imale značajnu ulogu, sa zastupljenošću od oko 3% u oko 900 monografija. U USP 34 iz 2011. god., koja sadrži oko 3900 monografija ljekovitih tvari, ljekovitog bilja, pomoćnih tvari i formulacija lijekova, 77% njih sadrži jednu ili više kromatografskih metoda. Uglavnom se radi o HPLC i TLC metodama, a u nešto je manjoj mjeri zastupljen GC, s primjenom u identifikaciji, ispitivanju čistoće te u određivanju sadržaja pojedinih tvari [22].

Slično vrijedi i za odgovarajuću verziju Europske farmakopeje (Ph. Eur. 7.2. također iz 2011. god.); Ph. Eur. ne sadrži monografije formulacija lijekova pa je ukupan broj monografija bio nešto niži (ukupno 1620), od čega 82% njih primjenjuje jednu ili dvije (u nekim slučajevima i po tri) kromatografske metode [22].

Rani rad Tswetta, jednog od začetnika kromatografije, na području LC nije uključivao kvantitativnu analizu, nego je kromatografija korištena kao preparativna tehnika, dok se kvantifikacija provodila zasebno, korištenjem drugih analitičkih metoda. Određivanje sadržaja primjenom kromatografije započelo je upravo s plinskom kromatografijom, tijekom rada Jamesa i Martina 1952. god., pri analizi smjese masnih kiselina. Potreba određivanja sastava smjese masnih kiselina iz biljnih tkiva, kako bi se objasnila njihova sinteza, bila je ono što je pokrenulo razvoj GC [23]. Tijekom svog rada s LC, James i Martin su pretpostavili da mobilna faza ne treba nužno biti tekućina, nego može biti i para; naime, fina separacija hlapljivih tvari na koloni u kojoj preko gela impregniranog nehlapljivim otapalom kontinuirano struji plin bila bi puno brža i na taj bi način kolone bile mnogo učinkovitije, a vrijeme potrebno za separaciju puno kraće [8].

Naime, koncept plinske kromatografije vizualiziran je već u ranim 1940-im, ali tada je malo pozornosti posvećeno toj ideji. Martin i njegov suradnik A. T. James ideju su realizirali nešto kasnije, 1951. god., kada su objavili rad u kojemu je opisan prvi plinski kromatograf. Demonstrirali su tehniku razdvajanja i kvantitativnog određivanja 12 sastojaka iz smjese masnih kiselina. Njezin značaj odmah su uočili petrokemijski laboratoriji koji su prepoznali tehniku kojom bi se mogli suočiti s izazovom analiziranja kompleksnih smjesa ugljikovodika [8].

Od otkrića GC tehnike 1951. godine i pojave prvog komercijalnog sustava 1954., plinska se kromatografija kontinuirano razvijala i napredovala.

4.2. Odabrani primjeri primjene plinske kromatografije u analizi hlapljivih onečišćenja

U farmaceutskoj analizi, plinska kromatografija ima uvjerljivo najčešću primjenu u određivanju ostatnih otapala.

Ostatna otapala, poznata i kao organska hlapljiva onečišćenja, predstavljaju tvari koje se koriste ili su proizvedene tijekom sinteze djelatne tvari, sirovina ili lijeka. U sintezi djelatne i pomoćnih tvari, koriste se prilikom separacije i purifikacije, a kod proizvodnje gotovog farmaceutskog proizvoda, pri npr. granulaciji i oblaganju. Istovremeno moraju biti i uklonjena jer mnoga od njih imaju toksična ili za okoliš opasna svojstva, a osim toga mogu inducirati faznu transformaciju i ugroziti fizikalno-kemijsku stabilnost djelatne tvari. No, ta se procesna otapala ne mogu u potpunosti ukloniti proizvodnim postupcima, kao što su liofilizacija i sušenje na visokim temperaturama pod vakuumom, zbog čega neka od njih zaostaju u sirovinama za proizvodnju lijeka. Moguće ih je analizirati nizom tehnika, ali je najpopularnija i specifična za tu svrhu upravo plinska kromatografija. Korištenjem kapilarnih kolona, GC je u stanju razdvojiti velik broj hlapljivih komponenata, omogućujući njihovu identifikaciju pomoću retencijskih vremena analita i detekciju na ppm-skim razinama primjenom različitih detektora [24].

Analiza ostatnih otapala čini osnovni dio kontrole kvalitete djelatne tvari primijenjene u kliničkim i pretkliničkim ispitivanjima, kao i kod komercijalnih lijekova, a provodi se iz niza razloga, primjerice:

- visoka koncentracija ostatnih organskih otapala predstavlja rizik za ljudsko zdravlje zbog njihove toksičnosti;

- ostatna otapala mogu utjecati na fizikalno-kemijska svojstva ljekovite tvari – na njezinu kristalnu strukturu, a razlike u kristalnom obliku opet mogu dovesti do promjena u topljivosti i problema pri formulaciji krajnjeg proizvoda;
- mogu uzrokovati probleme s mirisom i bojom konačnog proizvoda;
- u intermedijerima se određuju u slučaju da postoji kritična količina zaostalog otapala koja može utjecati na sljedeći korak procesa sinteze;
- poznavanje sadržaja otapala u polaznim materijalima može pomoći razvojnom kemičaru u predviđanju potencijalnih procesno vezanih onečišćenja te predviđanje mogućih reakcija koje mogu rezultirati stvaranjem novih onečišćenja [24].

Godine 1997., ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) je klasificirao ostatna otapala u 4 klase, ovisno o njihovoj štetnosti za ljude i okoliš [25]. Europska farmakopeja [7] kategorizira otapala u 3 klase. Otapala klase 1 dokazano su kancerogena za ljude ili su to spojevi sa snažnom sumnjom na to. Zbog njihovog negativnog utjecaja potrebno ih je izbjegavati pri procesima proizvodnje djelatnih i pomoćnih farmaceutskih tvari ili gotovog proizvoda. Njihove gornje granice kreću se već od 2 ppm, kao što je slučaj s benzenom. Otapala klase 2 manje su toksična te ih je potrebno ograničiti kako bi se krajnjeg korisnika farmaceutskog proizvoda zaštitilo od potencijalno štetnog djelovanja. U tu skupinu pripadaju npr. kloroform, čija gornja granica iznosi 60 ppm, ali i metilizobutylketon s granicom od 4500 ppm. Treću skupinu čine otapala sa slabim toksičnim djelovanjem na čovjeka za koja je koncentracija od 5000 ppm prihvatljiva, a takva su, primjerice, aceton, etanol, dimetilsulfoksid (DMSO) itd. [26].

Zbog kemijskih karakteristika ostatnih otapala i zahvaljujući velikoj osjetljivosti GC, upravo je ona, spregnuta s *headspace* tehnikom injektiranja, analitička metoda izbora

kojom je moguće zadovoljiti stroge zahtjeve određivanja ostatnih otapala, koji podrazumijevaju određivanje na razini od nekoliko desetaka ppm-a ili, u slučaju genotoksičnih onečišćenja, na razini od samo nekoliko ppm-a [4].

Europska farmakopeja (Ph. Eur.) i Američka farmakopeja (USP) propisuju univerzalnu metodu za identifikaciju otapala klase 1 i 2, te identifikaciju i kvantifikaciju otapala klase 3, primjenom plinske kromatografije. Metoda daje mogućnost korištenja 3 različita otapala prilikom analize, ovisno o tome u kojem od njih je analizirani uzorak topljiv. Koristi se *headspace* tehnika injektiranja u kombinaciji s FID detektorom. Metoda obuhvaća 2 postupka: postupak A i postupak B, od kojih je postupak A uobičajeni postupak u redovitoj primjeni, a postupak B prilikom potvrde identiteta otapala i pri rješavanju problema s koeluiranjem. Postupci se razlikuju u korištenim kolonama (iste duljine i širine, ali različit tip i debljina stacionarnih faza: postupak A – stacionarna faza G43; 1,8 μm te postupak B – stacionarna faza G16; 0,25 μm). Razlika također postoji u temperaturnom programu pa se tako postupak B odvija na nešto nižim temperaturama (do 165 °C, dok je za postupak A najviša primijenjena temperatura 240 °C) [7, 21].

Mnogo je alternativa plinskoj kromatografiji korišteno pri određivanju razine ostatnih otapala u farmaceutskim proizvodima, no većina njih ili nije bila dovoljno specifična, ili su imale visok prag dokazivanja pa stoga nisu bile prikladne za detaljnu karakterizaciju proizvoda koja se traži prilikom predaje zahtjeva regulatornim tijelima za registracijom lijeka [24].

U svrhu praćenja razvoja plinske kromatografije za spomenutu svrhu, pregledane su publikacije koje opisuju primjenu GC u određivanju ostanih otapala, objavljene od 1985. god. do danas te opisani odabrani primjeri.

Toksičnost ostatnih otapala prepoznata je od strane regulatornih tijela 1990-ih godina. Američka je farmakopeja prva koja je u svoj sadržaj uvrstila ispitivanje ostatnih otapala 1990. god., a nakon nje slijedile su Britanska, Europska i Kineska farmakopeja. U to je vrijeme svaka farmakopeja primjenjivala različite smjernice u kontroli ostatnih otapala u farmaceutskim proizvodima, s različitim kategorijama i prihvatljivim granicama, a pratilo se 6-8 otapala, što je daleko manje od broja otapala koji se stvarno koristio u farmaceutskoj industriji [27].

U ranom radu koji su objavili J. E. Haky i T. M. Stickney iz 1985. god. [28], opisana je metoda za određivanje većeg broja ostatnih otapala i ostalih hlapljivih onečišćenja u predstavnicima lijekova iz različitih terapijskih skupina, kojom je bilo moguće precizno odrediti koncentracije ostatnih otapala u uzorcima do najmanje 0,02%. Njezina prednost pred do tada predstavljanim općim metodama bila je u tome da nije koristila *headspace* tehniku injektiranja koja je, kako je u radu navedeno, u to vrijeme predstavljala dodatnu specijaliziranu opremu, ne tako lako prilagodljivu komercijalnim autoinjektorskim jedinicama.

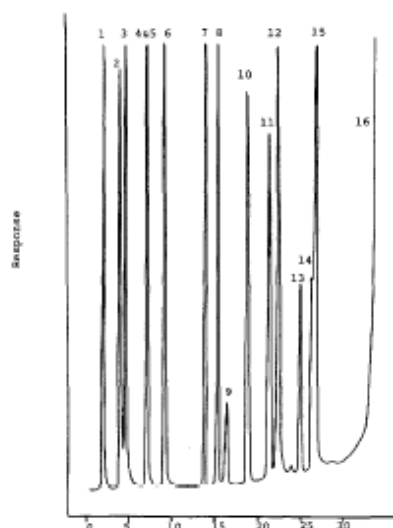
Analiza je provedena na punjenoj, staklenoj koloni na koju je injektirano po 7 μ L otopina za analizu. Uzorci za analizu otopljeni su u benzilnom alkoholu, u koncentracijama koje su odgovarale koncentraciji očekivanog ostatnog otapala u uzorcima, u rasponu od 0,002 mg/mL do 0,100 mg/mL, što znači da je za uzorak kojemu je očekivana koncentracija ostatnog otapala 1%, za analizu pripremljena njegova otopina koncentracije 10 mg/mL. Pripremljene su otopine svakog pojedinog traženog otapala u benzilnom alkoholu u koncentracijskom rasponu 0,002–0,1 mg/mL te je na temelju njihovih odziva izrađena kalibracijska krivulja. Mjerene su visine pikova koji odgovaraju svakom pojedinom otapalu i preko kalibracijskog pravca izračunate su njihove koncentracije u uzorcima. Benzilni alkohol odabran je kao otapalo zbog činjenice da u

potpunosti otapa većinu farmaceutskih tvari, kao i sama ostatna otapala, u koncentracijama korištenim u predstavljenoj metodi. Također, zahvaljujući svom visokom vrelištu, benzilni alkohol eluira s dovoljnim vremenskim razmakom od određivanih ostatnih otapala, što osigurava da ne interferira s određivanim analitima.

Određivanje ostatnih otapala provedeno je primjenom temperaturnog programa u 4 koraka opisanog u Tablici 2 (Program 1). Naknadno je utvrđeno da vrlo slične rezultate daje i jednostavniji temperaturni program od 3 koraka (Program 2, Tablica 2, Slika 3).

Tablica 2. Temperaturni programi metode za određivanje ostatnih otapala J. E. Hakya i T. M. Stickneya iz 1985. god.; preuzeto iz [28].

Program	Step	Initial temperature (°C)	Final temperature (°C)	Rate (°C/min)	Hold time (min)
1	1	40	40	0	4
	2	40	90	2.5	0
	3	90	130	10	10
	4	130	220	30	26
2	1	40	40	0	4
	2	40	150	5	10
	3	150	220	35	23



Slika 3. Kromatogram dobiven analizom uz temperaturni program br. 2.

1-metanol; 2-acetonitril; 3-etanol; 4-diklormetan; 5-aceton; 6-izopropanol; 7-dietil eter; 8-tetrahidrofuran; 9-kloroform; 10-etil acetat; 11-dioksan; 12-n-butanol; 13-trikloretilen; 14-N,N-dimetilformamid; 15-heksan; 16-benzilni alkohol (otapalo) metode J. E. Hakya i T. M. Stickneya iz 1985. god. (y-os – odgovor detektora; x-os – vrijeme); preuzeto iz [28].

Preciznost analitičkog sustava određena je kroz 6 injektiranja otopina svakog ostatnog otapala (Tablica 3). Dobivene su RSD vrijednosti u rasponu od 0,8% (n-butanol) do 5,2% (etanol). Koncentracija analita u standardnoj otopini iznosila je 0,008 mg/mL, osim kloroforma koji je bio prisutan u koncentraciji 0,032 mg/mL.

Tablica 3. Preciznost analitičke metode za određivanje ostatnih otapala J. E. Haky i T. M. Stickneya iz 1985. god.; preuzeto iz [28].

<i>Solvent</i>	<i>R.S.D.</i>	<i>Solvent</i>	<i>R.S.D.</i>
Methanol	1.0	Chloroform*	0.90
Acetonitrile	4.0	Ethyl acetate	1.8
Ethanol	5.2	Dioxane	2.5
Acetone	2.8	n-Butanol	0.76
Isopropanol	4.0	Trichloroethylene	0.79
Diethyl ether	1.3	N,N-Dimethylformamide*	1.9
Tetrahydrofuran	1.2	Hexane	2.5

U svrhu provjere točnosti metode, provedeno je i određivanje ostatnih otapala u uzorcima metodom standardnog dodatka. Poznata koncentracija svakog ostatnog otapala dodana je u otopinu uzorka u koncentracijskom rasponu od 0,0024 mg/mL do 1 mg/mL. Kvantitativna analiza ostatnih otapala provedena je kroz 6 mjerenja svakog pojedinog ostatnog otapala, u 7 analiziranih uzoraka (lijekovi iz različitih terapijskih skupina) te su dobiveni sljedeći rezultati (Tablica 4):

Tablica 4. Rezultati analize za metodu J. E. Haky i T. M. Stickneya iz 1985. god.; preuzeto iz [28].

<i>Drug number</i>	<i>Drug type</i>	<i>Residual solvent</i>	<i>External standard (normal) method</i>			<i>Standard addition method</i>			<i>SR</i>
			<i>%</i>	<i>σ</i>	<i>CI</i>	<i>%</i>	<i>σ</i>	<i>CI</i>	
1	H	EtOH	0.23	0.01	± 0.02	0.19	0.007	± 0.01	0.91
2	T	DMF	0.17	0.01	± 0.02	0.23	0.01	± 0.02	0.86
3	P	HEX	0.64	0.06	± 0.12	0.46	0.13	± 0.21	0.98
4	B	EtOH	4.5	0.3	± 0.6	3.9	0.9	± 1.5	0.76
5	P	THF	0.020	0.001	± 0.002	0.020	0.006	± 0.01	0.97
6	P	ACN	0	0	0	0	0.015	± 0.03	1.06
7	C	MeOH	0.031	0.004	± 0.008	0.04	0.02	± 0.04	1.03

% = Percentage of residual solvent found in sample; σ = standard deviation of determination; CI = 99% confidence interval for determination; SR = ratio of slope of standard addition curve to external standard curve; H = hypolipidemic; T = antitumor; P = antihypertensive; B = antibiotic; C = anticonvulsive; EtOH = ethanol; DMF = N,N-dimethylformamide; HEX = hexane; THF = tetrahydrofuran; ACN = acetonitrile; MeOH = methanol.

Visine pikova u ovisnosti o dodanoj koncentraciji ostatnog otapala prenesene su na graf i koncentracija ostatnog otapala u uzorku dobivena je ekstrapolacijom linije na apscisu. Primjenom navedene metode moguće je minimizirati pogreške uzrokovane eventualnim učinkom matriksa, iako je usporedbom rezultata dobivenih metodom vanjskog standarda i metodom standardnog dodatka utvrđeno da je učinak matriksa kod analiziranih uzoraka u ovom slučaju zanemariv.

Kao prednosti predstavljene metode navedeno je sljedeće:

- prisutnost jednog otapala u ljekovitoj tvari ne interferira s određivanjem drugog otapala;
- iz jednog injektiranja otopine uzorka moguće je određivanje većeg broja ostatnih otapala;
- nije potrebno mijenjati instrumentalne uvjete za određivanje različitih otapala;
- kromatografski uvjeti su visoko selektivni, što reducira vjerojatnost interferencije mjerenja sa samom djelatnom tvari ili njezinim razgradnim produktima; takvu je selektivnost moguće postići korištenjem kapilarnih kolona, ali i korištenjem tzv. „on-column“ sustava za injektiranje kojega je u to vrijeme bilo teško spojiti s opremom za automatsko injektiranje [28].

Osim navedene metode, kod koje je primijenjeno izravno injektiranje, proučena je i metoda s *headspace* injektiranjem iz istog razdoblja. Radi se o studiji J. P. Guimbarda, M. Persona i J. P. Vergnauda iz 1987. god. u kojoj je opisana metoda primjenom vanjskog standarda [29]. Metoda omogućava identifikaciju i određivanje sadržaja svih uobičajenih ostatnih otapala, a posjeduje osjetljivost dovoljnu za određivanje analita u tragovima.

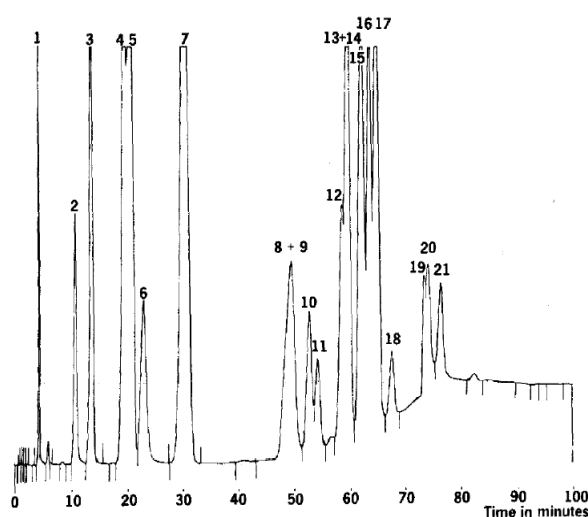
Nakon optimizacije, dobivene su sljedeće vrijednosti parametara gore spomenute instrumentalne metode (Slika 4):

CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS FOR DETERMINATION OF SOLVENTS

Stationary phase	Porapak Q (100–120 mesh)
Column dimensions	10 ft. × 2 mm I.D. × 1/8 in. O.D.
Carrier gas (helium or nitrogen) flow-rate	35 ml/min
Injector temperature	250°C
Detector temperature	250°C
Hydrogen flow-rate	30 ml/min
Air flow-rate	300 ml/min
Oven temperature	
Initial	120°C (35 min)
Gradient	2°C/min
Final temperature	200°C (20 min)
HS6 parameters	
Heating temperature	100°C
Heating time	15 min
Pressurization time	4 min
Analysis time	95 min

Slika 4. Parametri razvijene instrumentalne metode J. P. Guimbarda, M. Persona i J. P. Vergnauda iz 1987. god. ; preuzeto iz [29].

Iz navedenih uvjeta, kao i iz priloženog kromatograma (Slika 5), vidljivo je da predstavljena analitička metoda ima vrijeme trajanja od 90 min, što je u usporedbi s današnjim analizama izrazito dugo.



Peak number	Solvent	Retention time (min)
1	Methanol	4.0
2	Ethanol	10.4
3	Acetonitrile	13.4
4	Acetone	19.3
5	Methylene chloride	20.4
6	Isopropanol	22.7
7	Diethyl ether	30.1
8	Tetrahydrofuran	49.0
9	Chloroform	49.3
10	Ethyl acetate	52.6
11	Ethylene chloride	54.1
12	Hexane	58.5
13	Benzene	59.2
14	Carbon tetrachloride	59.4
15	Cyclohexane	61.9
16	Diisopropyl ether	63.3
17	Dioxan	64.6
18	Pyridine	67.4
19	Heptane	73.5
20	Dimethylformamide	73.9
21	Toluene	76.2

Slika 5. Razvijeni kromatogrami primjenom metode s *headspace* injektiranjem J. P. Guimbarda, M. Persona i J. P. Vergnauda iz 1987. god.; preuzeto iz [29].

Ispitana je ponovljivost metode injektiranjem pripremljene otopine standarda 10 puta te se metoda pokazala ponovljivom, s koeficijentom varijacije u rasponu 1,6-3,4%. Osim toga, ispitana je linearnost injektiranjem otopine standarda u koncentracijskom rasponu 0,03-7 mg/mL te reproducibilnost injektiranjem 10 otopina uzorka. Oba parametra dala su zadovoljavajuće rezultate te se metoda pokazala ponovljivom, lineranom i reproducibilnom. Za prag dokazivanja dobivena je vrijednost 2-20 ppm ako se analizira otopina uzorka dobivena otapanjem 100 mg uzorka u 1 mL otapala [29].

Godine 1989., od strane Pawliszyna i njegovih suradnika, predstavljena je SPME tehnika pripreme uzoraka (mikroekstrakcija čvrstom fazom) [30]. Priprema uzorka jedan je od ključnih koraka koji znatno utječe na pouzdanost i točnost analize te njezino trajanje i trošak. SPME koristi vlakno modificiranog silikagela koje je s vanjske strane obloženo odgovarajućom stacionarnom fazom i na koje se analiti iz uzorka izravno ekstrahiraju [31].

Pri određivanju ostatnih otapala, kako bi se postigla zadovoljavajuća detekcija, potrebno je injektirati velike količine uzorka, što uglavnom uzrokuje začepljenje injektora i zahtijeva učestale izmjene njegovih komponenata.

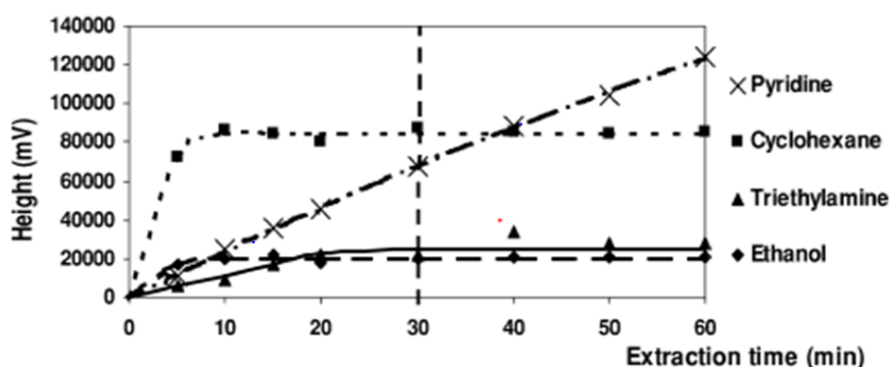
Kao alternativa injektiranju velikih volumena, u radu S. Legranda i suradnika iz 2003. g. korištena je SPME tehnika spregnuta s plinskom kromatografijom. U predstavljenom radu određivana su ostatna otapala u ljekovitoj tvari, a primjenom SPME kod pripreme uzorka provedena je ekstrakcija organskih tvari iz vode bez upotrebe otapala [32].

Osim što je izbjegnuto injektiranje velikih volumena na injektor, postignute su još neke prednosti primjenom SPME. U usporedbi s do tada korištenom ekstrakcijom uparenom s plinskom kromatografijom (LLE, ekstrakcija tekuće-tekuće), primjenom SPME svi su koraci pripreme uzorka (ekstrakcija, koncentracija i prijenos uzorka do kromatografa) integrirani u jedan korak i jedan uređaj, što znatno pojednostavljuje postupak pripreme uzorka. Osim toga, nema dodatnih troškova i brige oko zbrinjavanja otapala korištenih pri ekstrakciji. SPE (ekstrakcija čvrstom fazom) nadilazi neka ograničenja LLE tehnike i zahtijeva manje količine otapala, ali iziskuje vrijeme, sastoji se od nekoliko koraka te često obuhvaća koncentriranje koje može rezultirati gubitkom hlapljivih komponenata [31].

U radu Legranda i suradnika, SPME tehnika je korištena za određivanje 4 ostatna otapala: etanola, cikloheksana, trietilamina i piridina metodom standardnog dodatka, pri čemu su ispitana tri načina provođenja SPME: (1) izravni, gdje je vlakno uronjeno u vodenu otopinu koja je sadržavala otoplenu djelatnu tvar (API); (2) *headspace-over-the-liquid* način, gdje je vlakno smješteno u *headspace* iznad vodene otopine s API-em i (3) *headspace-over-the-powder* način, gdje je vlakno postavljeno u *headspace* iznad praškastog materijala (API). Ujedno je ispitano i 4 različite vrste vlakana, s ciljem pronalažanja najpogodnijeg za ekstrakciju navedenih otapala.

U radu Legranda i sur. korišten je praškasti farmaceutski proizvod, dobro topljiv u vodi, koji je nakon otapanja dao blago kiselu otopinu, a sva 4 analizirana otapala primijenjena su u različitim koracima njegova proizvodnog procesa. Masa uzorka pri analizi iznosila je 100 mg te je bila otopljena u 9 mL vode. Ostali parametri u pripremi uzorka bili su: vrijeme ekstrakcije 20 min, temperatura ekstrakcije 60 °C, vrijeme desorpcije 5 min i temperatura desorpcije 300 °C. Primijenjen je FID detektor.

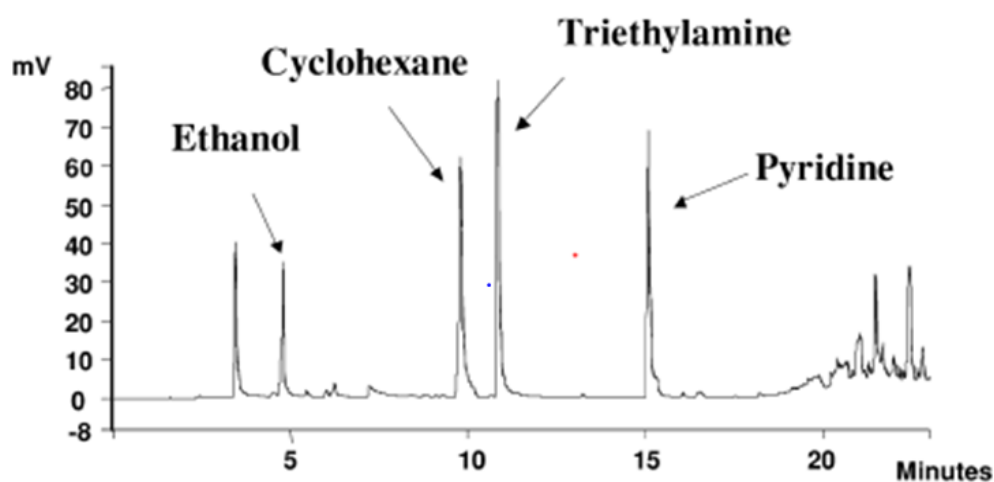
Prilikom optimizacije, uveden je korak podešavanja pH vrijednosti otopine uzorka na 9,6 dodavanjem 0,02 mol/L otopine Na₂HPO₄ i koncentriranog NaOH, kako bi se poboljšala ekstrakcija trietilamina koji prvotno zbog svojih bazičnih svojstava nije bio ekstrahiran. Kod definiranja najpogodnijeg ekstrakcijskog vremena, pokus je proveden primjenom CAR-PDMS (*carboxen-polydimethylsiloxane*) vlakna i *headspace-over-the-liquid* tehnike te su dobivene ekstrakcijske izoterme na temelju kojih je izabrano vrijeme ekstrakcije od 30 min. Za sva otapala postignuta je ekstrakcijska ravnoteža nakon 20 min. Iznimka je piridin, kod kojega niti nakon 60 min nije postignuta ekstrakcijska ravnoteža, zbog čega je bilo potrebno izričito se držati zadanog ekstrakcijskog vremena i tako izbjeći varijacije u količini ekstrahiranog piridina.



Slika 6. Ekstrakcijska izoterma 4 različita otapala primjenom *headspace-over-the-liquid* načina (pH 9,6) i CAR-PDMS vlakna; preuzeto iz [32].

Ostali optimizirani parametri bili su temperatura bočica prilikom ekstrakcije, učinak isoljavanja kontroliran koncentracijom NaCl dodanog u vodenu otopinu i volumen vode dodan u bočicu u kojoj se nalazilo 100 mg analiziranog uzorka. Utvrđeno je da optimalni parametri podrazumijevaju temperaturu bočica od 40 °C, koncentraciju NaCl od 1,77 mol/L i volumen vode od 7,2 mL.

Za određivanje analita u uzorku izabrana je metoda standardnog dodatka zbog izbjegavanja utjecaja matriksa, a koja je evaluirana primjenom osnovnih validacijskih zahtjeva. Kako je vidljivo iz priloženog kromatograma, pikovi sva 4 ispitana otapala u potpunosti su razdvojeni i nisu zamijećeni interferirajući pikovi.



Slika 7. Kromatogram dobiven pri optimalnim uvjetima metode Legranda i sur.;
preuzeto iz [32].

Ostali parametri mjereni prilikom validacije prikazani su Tablicom 5.

Tablica 5. Ostali validacijski parametri metode Legrand i sur. korištenjem SPME tehnike spregnute s plinskom kromatografijom; preuzeto iz [32].

	Precision (RSD, %)	Recovery (%)	LOD (pg)	LOQ (pg)
Ethanol	16.5	94	50	170
Cyclohexane	14.6	114	1	4
Triethylamine	18.7	103	10	40
Pyridine	10.9	98	1	4

RSD odgovara zahtjevima za preciznost koji se postavljaju pri analizi ostalih otapala. Sve vrijednosti LOD bile su ispod ppb-jevskih razina, što potvrđuje da je navedenom metodom moguće provesti simultanu ekstrakciju sva 4 ispitana otapala. Osim toga, provedena je usporedba tako dobivenih rezultata s onima koji se dobiju „uobičajenom“ analizom, dakle, primjenom izravnog injektiranja velikih volumena uzorka i FID detekcije.

Tablica 6. Usporedba rezultata kvantitativne analize [ppm] metode Legrand i sur. s GC-FID metodom; preuzeto iz [32].

	Standard additions	Multiple extractions	“Usual” value (usual GC–FID method)
Ethanol	341 [291–397]	na	300
Cyclohexane	10.8 [9.5–12.5]	2.3 [2.0–2.7]	Non-detected (<2)
Triethylamine	192 [163–228]	na	80
Pyridine	18.3 [16.4–20.2]	na	20

na, non-applicable, value in brackets corresponds to $\pm$ SD deduced from the confidence curves of the standard addition line.

Za etanol i piridin su se dobivene vrijednosti nalazile vrlo blizu. Za cikloheksan je dobivena veća vrijednost korištenjem SPME tehnike, ali i dalje niska u usporedbi s ostalim otapalima, dok je za trietilamin primjenom SPME tehnike dobivena dvostruko veća vrijednost. Navedeno govori da „uobičajena“ analiza podcjenjuje količinu

trietilamina, što se pripisuje uobičajenoj pojavi začepljenja prilikom injektiranja, gdje se pretpostavlja da dolazi do gubitka trietilamina [32].

No, i prethodno predstavljena SPME tehnika ima nedostataka u obliku *carry-overa* i visoke cijene. Tako je u 2010. god. predstavljen rad Y. Yua i suradnika [33] u kojemu je primijenjena SDME tehnika (*single drop mikroextraction*). Naime, LPME (*liquid phase microextraction*) je tehnika koja minimizira upotrebu otapala, a radi se o ekstrakciji tekuće-tekuće koja je brza, jednostavna i jeftina. Koristi samo mali volumen otapala za koncentriranje analita iz uzorka otopljenog u vodi. Kada je medij za ekstrakciju u obliku samo jedne kapi, LPME se naziva SDME. Dakle, tehnika koristi samo jednu kap otapala za ekstrakciju koja visi s vrha mikroigle. HS SDME, u kojoj kap otapala za ekstrakciju visi iznad uzorka, naprikladnija je za razmatranje hlapljivih ili poluhlapljivih analita. Osim toga, u navedenom je radu provedena i višestruka *headspace* ekstrakcija (MHE, *multiple headspace extraction*). Ta je tehnika prezentirana još 1977. god., a zasniva se na iscrpnoj ekstrakciji komponenata kroz 3-4 uzastopna ekstrakcijska ciklusa iz istog uzorka. MHE-SDME je tehnika praktički bez primjene otapala, jeftina i osjetljiva, koja eliminira potencijalni memorijski učinak s obzirom na činjenicu da se za svaku ekstrakciju koristi svježa kap otapala. U radu Y. Yua i suradnika razvijena je metoda koja uspješno kombinira SDME i MHE, praćenu kapilarnom GC i primjenom FID detektora, a primijenjena je za određivanje hlapljivih ostatnih otapala u krutim ljekovitim oblicima [33].

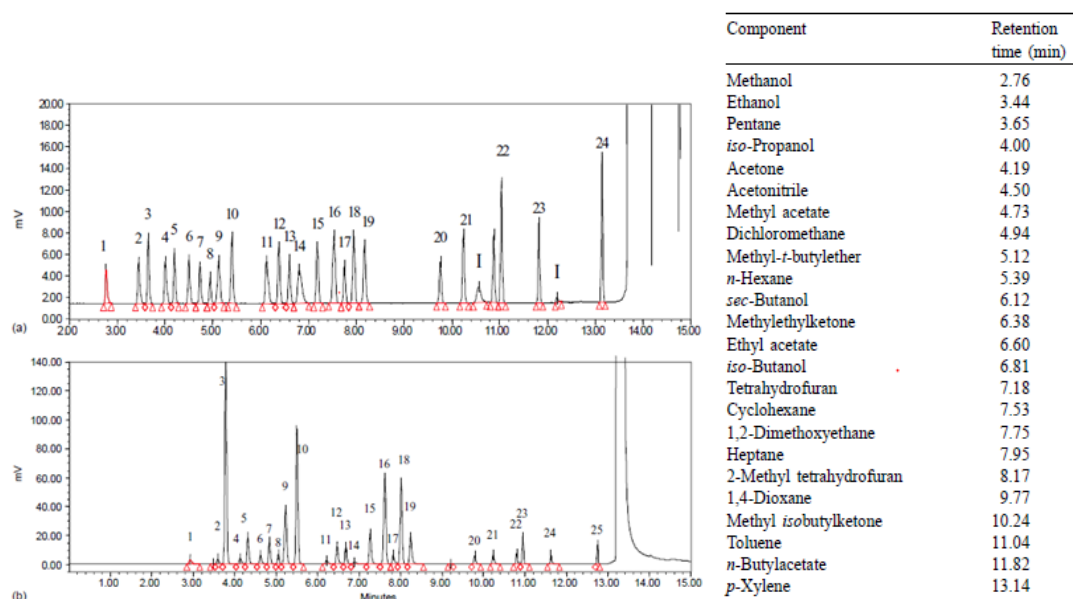
Još jedan od radova objavljenih iz razdoblja oko 2000. god. je rad koji potpisuju autori M.-J. Rocheleau, M. Tittley i J. Bolduc [34], a usmjeren je na ubrzavanje analitičkog postupka skraćivanjem vremena trajanja analize. Do tada je objavljeno nekoliko metoda za praćenje ostatnih otapala u farmaceutskim uzorcima, neke od njih s dugim vremenom analize i specifičnih samo za određeni broj ostanih otapala i tipova uzoraka. Također su

objavljene i GC metode s kratkim vremenom analize, pogodne za brzu obradu uzoraka, međutim neprikladne za analizu završnog proizvoda zbog pojave koeluiranja, odnosno nedovoljne preciznosti metode [35]. U radu M.-J. Rocheleau, M. Tittley i J. Bolduc [34] ispitano je nekoliko parametara u svrhu povećanja učinkovitosti, odnosno ubrzavanja analize: korištenje kraćih kapilarnih kolona s užim presjekom i brži temperaturni program. Metoda je bila u mogućnosti provesti analizu više od 20 ostatnih organskih otapala koja se uobičajeno koriste u proizvodnim procesima i to u vremenu kraćem od 15 min. Provedene su analize primjenom izravnog i HS injektiranja s FID detektorima, a također je MS detektor primijenjen na metodu s izravnim injektiranjem. Kao otapalo je korišten dimetilacetamid (DMA), s obzirom na to da otapa većinu ljekovitih tvari, a zbog visokog vrelišta ne interferira s hlapljivijim otapalima koja se ispituju primjenom GC. Za određivanje analita s visokim vrelištem, kao otapalo je korišten metanol koji eluira prvi te opet ne interferira s određivanim otapalima.

Osim navedenoga, u istom je radu [34] ispitana i Flash GC tehnologija koja koristi otporno grijanje kapilarne kolone kako bi se postigla brza separacija analita sa širokim rasponom vrijednosti temperatura vrelišta. Prvi je put objavljena početkom 1990-ih godina, a temelji se na načelu da temperatura metala raste kada se kroz njega propušta električna struja i otpor metala posljedično raste na predvidljiv način. Temperatura metala može biti određena mjerenjem otpora i podešena kontroliranjem primijenjenog napona. Instalacija koja se pri tome koristi sastoji se od kapilarne kolone umetnute u metalni plašt koji se koristi kao grijač kolone. Grijanje i hlađenje takvog sustava je kratko, za razliku od klasičnog grijanja kolone koje zahtijeva zagrijavanje cijele pećnice instrumenta. Stoga je trajanje cijelog temperaturnog programa pri analizi otapala s niskom točkom vrelišta iznosilo 4 min, a obuhvaćalo je porast temp od 38 °C to 240 °C. Trajanje temperaturnog programa za analizu otapala s visokom točkom vrelišta iznosilo

je 3 min, dok se temperatura kretala od 100 °C do 230 °C. Tehnika je primijenjena na izravno injektiranje, s obzirom na to da joj je svrha bila reducirati trajanje analize, što nije toliko kompatibilno s HS tehnikom injektiranja kod koje je potrebna prethodna inkubacija uzorka.

Obje GC-FID metode (izravno i HS injektiranje) uspješno su validirane s obzirom na provjeru linearnosti, preciznosti i osjetljivosti.



Slika 8. GC kromatogrami uobičajenih procesnih otapala koncentracije 0,004% (V/V)

a) GC metoda primjenom izravnog injektiranja. Otapalo (N, N-dimetilacetamid) eluira posljednje, u 13,5 min. Onečišćenja iz otapala označena su slovom „I“ na kromatogramu. *Iso*-butilacetat ($t_R=10,85$ min) nije na listi otapala zbog interferiranja s onečišćenjima iz otapala.

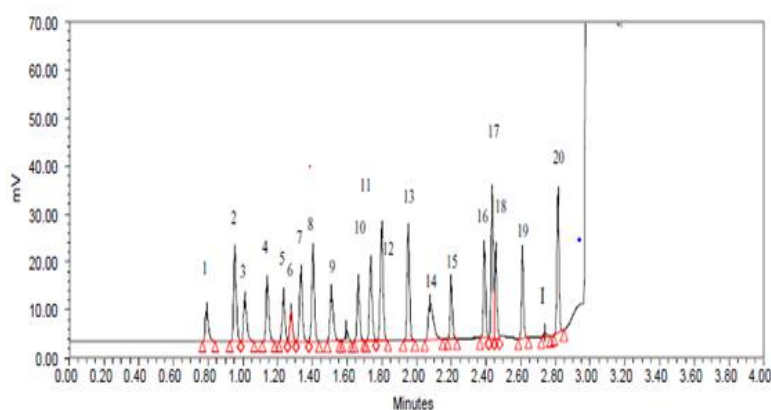
b) GC metoda primjenom HS tehnike injektiranja. Otapalo eluira posljednje, nakon 13. min; preuzeto iz [34].

Linearnost je ispitana za svako otapalo u koncentracijskom području od 0,0004% do 0,04% (V/V). Korelacijski koeficijent pravca dobivenog za svako pojedino otapalo iznosio je $\geq 0,999$. RSD vrijednost 6 uzastopnih injektiranja otopine radnog standarda za koncentraciju od 0,0004% (V/V) i 0,004% (V/V) bila je ispod 10%. Metode su uspješno

primijenjene za analizu nekoliko djelatnih tvari. Reproducibilnost rezultata dobivenih na različitim instrumentima u različite dane pokazala se dobrom i unutar očekivane varijabilnosti od 10%. LOQ je iznosio oko 25 ppm, osim za izobutanol, čija je vrijednost bila nešto viša i iznosila 76 ppm. Kako se radi o otapalu klase III, s dozvoljenom koncentracijom od 5000 ppm, metoda se pokazala prikladnom za praćenje otapala i u skladu s ICH smjernicama [34].

Niže je prikazan kromatogram dobiven analizom otapala s niskim vrelištem primjenom Flash GC tehnologije (Slika 9). Pikovi toluena i izobutil acetata (17 i 18) nisu u potpunosti razdvojeni te je kod nekoliko otapala zapažena pojava koeluiranja na kratkoj Rtx-624 koloni. Takvi su npr. acetonitril i diklormetan, pa je u popis analita koji se prate ovom metodom naveden samo diklormetan. Ukoliko se oba otapala koriste u proizvodnom procesu, potrebno je primijeniti konvencionalnu GC metodu koja je u mogućnosti razdvojiti oba navedena otapala.

Component	Retention time (min)
Methanol	0.79
Pentane	0.95
Ethanol	1.01
Acetone	1.14
Methylacetate	1.23
Dichloromethane	1.27
Methyl- <i>t</i> -butylether	1.33
Hexane	1.40
1-Propanol	1.51
Ethylacetate	1.66
Tetrahydrofuran	1.73
Cyclohexane	1.79
Heptane	1.95
1-Butanol	2.07
1,4-Dioxane	2.19
Methyl <i>isobutyl</i> ketone	2.39
Toluene	2.43
<i>iso</i> -Butylacetate	2.45
<i>n</i> -Butylacetate	2.61
<i>p</i> -Xylene	2.81



Slika 9. Kromatogram 20 različitih otapala dobiven primjenom GC Flash tehnike. Koncentracija radnog standarda iznosi 0,01% (V/V). Korišteno otapalo, N,N-dimetilacetamid, eluira zadnje, nakon 3. min. Onečišćenja iz korištenog otapala označena su na kromatogramu slovom „I“; preuzeto iz [34].

Evaluirani su linearnost, preciznost i osjetljivost Flash GC metode te su dobiveni sljedeći rezultati: linearnost je ispitana za svako pojedino otapalo u koncentracijskom rasponu od 0,001% do 0,1%. Korelacijski koeficijent pravca svakog otapala iznosio je $\geq 0,999$. RSD vrijednosti 6 uzastopnih injektiranja radnog standarda koncentracije 0,005% (V/V) i 0,01% (V/V) bile su ispod 10%. Također je evaluirano odstupanje retencijskih vremena pikova i utvrđeno je da variraju od 0,1 s do 0,15 s unutar pojedinačne kromatografske analize (*run-a*), što je dovoljno dobra reproducibilnost za pouzdanu identifikaciju pikova analita s *peak-to-peak* rezolucijom od 2-3 s ili boljom.

Utvrđeni LOQ iznosio je 350 ppm ili niže za koncentraciju uzorka od 0,1 g/mL te zadovoljava limite propisane za sva otapala ICH klase 2 koja prema tome mogu biti analizirana opisanom metodom. Iako nešto manje osjetljivosti, predstavljena metoda može biti korištena za procesnu analizu uzoraka gdje je neophodna brza analiza [34].

Općenito, nekoliko je trendova zamijećeno pri određivanju ostatnih otapala:

- određivanje širokog spektra ostatnih otapala u pojedinačnom *run-u*;
- pojednostavljenje i automatizacija analitičkih tehnika primjenom tehnika pripreme uzorka bez otapala ili s minimalnom količinom otapala (SPME, SDME);
- primjena novih tehnika za brzu analizu uzoraka, kao što su HS-MS ili *flow-modulation* GC;
- primjena naprednih tehnika, kao što je brza plinska kromatografija ili dvodimenzijaska plinska kromatografija (GC×GC);
- primjena otapala neštetnih za okoliš (npr. ionske tekućine, binarna otapala, voda) [25].

Glavne prednosti navedenih tehnika su kraće vrijeme analize, minimiziranje korištenja štetnih otapala i visok stupanj zasićivanja/obogaćivanja (*enrichment factor*). Zbog povećane osjetljivosti, također je moguće minimizirati količinu uzorka potrebnu za analizu [25].

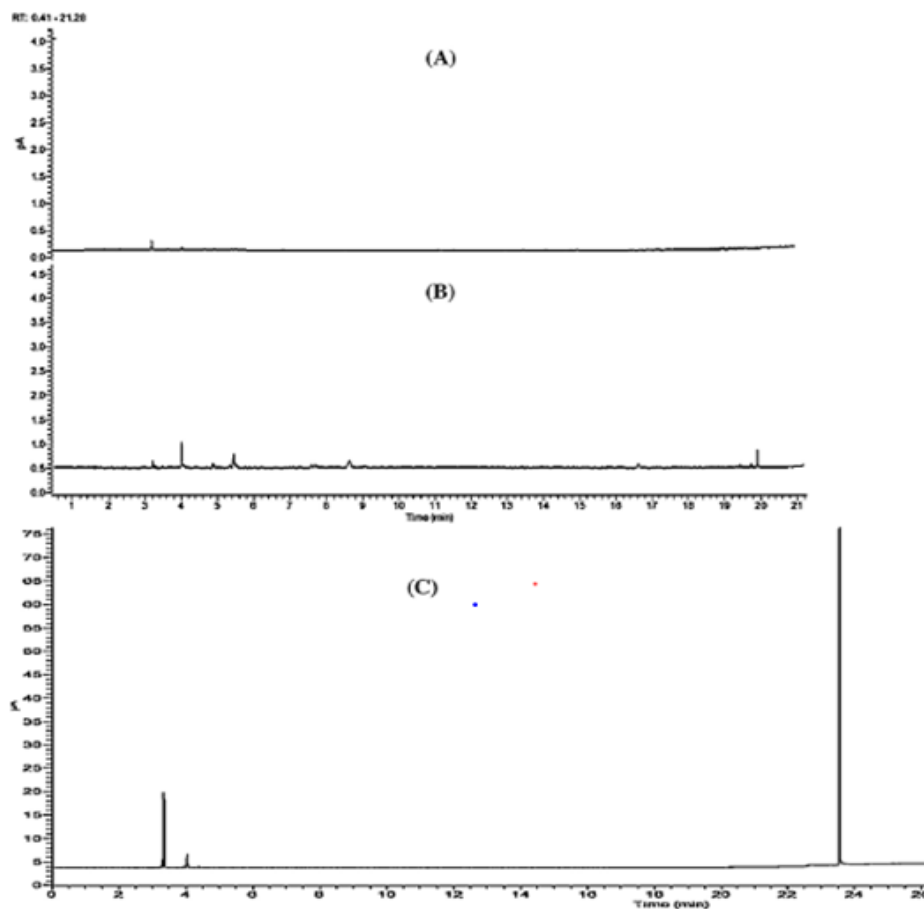
Vezano za primjenu ionskih tekućina (IT) kao otapala, proučeno je nekoliko studija objavljenih u periodu 2009.–2017. god. [36-38] te je u svima zamijećena povećana osjetljivost metode u usporedbi s onima koje primjenjuju konvencionalna organska otapala, potom mogućnost smanjenja vremena trajanja kromatografske analize zbog prisutnosti pika otapala, a dobiveni su i vrlo dobri rezultati validacije metode. Naime, IT su soli čije se talište nalazi na ili ispod 100 °C, a čine ih organski kationi povezani s različitim anionima. Posjeduju niz povoljnih fizikalno-kemijskih karakteristika, kao što su prilagodljiva viskoznost, zanemariv tlak pare, posebna solvacijska svojstva i visoka termalna stabilnost [38].

Naime, kod HS-GC analiza, uzorak se uglavnom otapa u otapalima koja imaju visoko vrelište, kao što su dimetilsulfoksid (DMSO) ili N-metilpirolidon (NMP). Prilikom pripreme uzorka za analizu, otopina uzorka se termostatira određeno vrijeme na temperaturi koja se nalazi ispod točke vrenja korištenog otapala, kako bi se hlapljivi analiti iz otopljenog uzorka preveli u *headspace* područje u bočici. Kao rezultat toga, HS jedinica uzorkuje samo hlapljive komponente, što minimizira potencijalnu kontaminaciju instrumenta nehlapljivim sastojcima iz matriksa uzorka. Utvrđeno je da povećanje vremena inkubacije utječe na porast osjetljivosti metode zbog veće količine analita koja s vremenom prelazi u parnu fazu. Korištenjem standardnih organskih otapala, može doći do onečišćenja instrumenta zbog pojačanog uzorkovanja korištenog otapala, kao i uvođenja u sustav slabije hlapljivih komponenata matriksa koje nisu od koristi za analizu. Nadalje, povećanjem temperature inkubacije može doći do razvijanja

visokog tlaka pare otapala zbog čega može doći do pucanja HS bočica. Spomenute nedostatke moguće je nadvladati korištenjem ionskih tekućina [38].

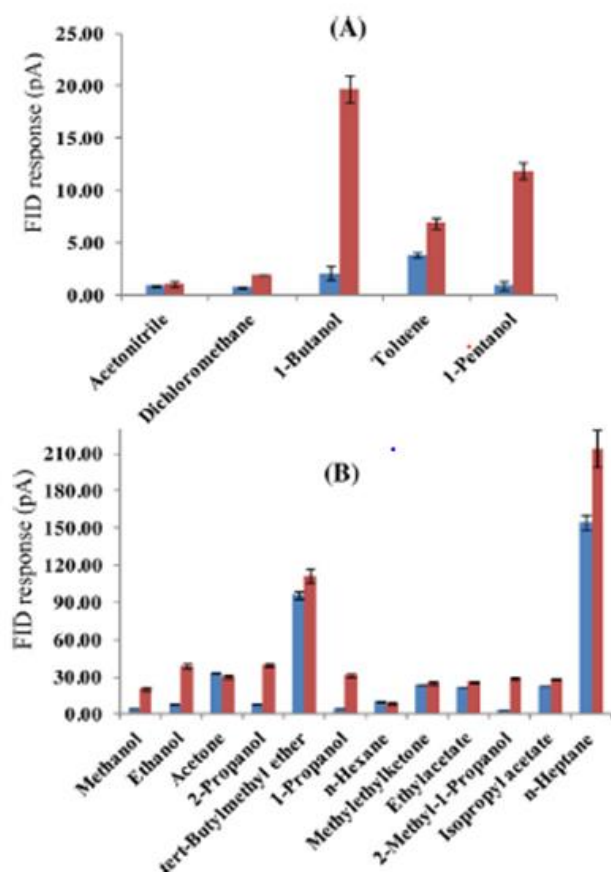
U radu O. Nachama i sur. [38] korišteno je otapalo [BMIM][NTf₂] (1-butil-3-metilimidazol bis[(trifluorometil)sulfonil]imid) i uspoređeno s konvencionalnim otapalom, NMP-om (N-metilpirolidon). Analize su provedene na HS-GC instrumentu s FID detektorom. Pripremljene su standardne otopine u ionskoj tekućini kao i u NMP-u. Korištena je kolona DB-5 dimenzija 30 m × 0,32 mm × 1,8 μm koja je bila spojena s DB-624 kolonom dimenzija 30 m × 0,32 mm × 1 μm. Prilikom korištenja NMP-a, HS bočice s analiziranim otopinama inkubirane su na temperaturi od 80 °C, dok su kod otapanja u IT termostatirane u temperaturnom rasponu 80-140 °C.

Kod HS tehnike, izbor otapala pridonosi stupnju osjetljivosti metode. Pri visokim temperaturama inkubacije, onečišćenja prisutna u otapalu često koeluiraju s analitima i predstavljaju problem pri kvantifikaciji. Konvencionalna otapala, kao NMP i DMSO, često uzrokuju pojavu pozadinskih pikova. U usporedbi s NMP-om, IT [BMIM][NTf₂] osigurava slab pozadinski šum na kromatogramu, bez prisutnosti pika otapala. Ova svojstva IT-a omogućavaju rad pri višim HS temperaturama u usporedbi s tradicionalnim otapalima. Na Slici 10 uspoređeni su kromatogrami otapala [BMIM][NTf₂] od 2 različita proizvođača (A i B) te kromatogram NMP-a (C). IT se nakon proizvodnje pročišćavaju od onečišćenja zaostalih iz proizvodnog procesa, bilo termostatiranjem na visokoj temperaturi ili korištenjem kromatografske kolone. Iz kromatograma je očito da otapalo (B) zahtijeva dodatno pročišćavanje prije korištenja.



Slika 10. Procjena doprinosa različitih otapala nakon provedenog kondicioniranja pozadinskim pikovima na kromatogramu: (A) - IOLITEC – baziran na [BMIM][NTf₂], (B) – IOLITEC – baziran na [P₆₆₆₁₄][NTf₂] i (C) – NMP. Volumen otapala: 1 mL, temperatura HS inkubiranja: 140 °C u trajanju od 45 min; preuzeto iz [38].

Zbog fizikalno-kemijskih svojstava IT, razdjeljivanje ostanih otapala prilikom termostatiranja HS bočice je nešto drugačije od onog kada se ona nalaze u konvencionalnim otapalima. Posljedica toga je uglavnom da je signal veći, što je moguće vidjeti iz niže prikazanih grafova (Slika 11) [38].



Slika 11. Usporedba FID odgovora za ostatna otapala u NMP-u (■) i [BMIM][NTf₂] (■). Sva mjerenja provedena su u triplicatu (n=3). Koncentracija ostatnih otapala: 60% od ICH limita (relativno prema koncentraciji API-a), temperatura inkubiranja = 80 °C, vrijeme inkubiranja = 45 min, volumen uzorka = 1 mL; preuzeto iz [38].

Porast jačine signala može biti posljedica zanemarivog tlaka pare [BMIM][NTf₂] i solvacijskih svojstava koja potiču razdjeljivanje analita između dviju faza u HS bočici. Suprotno tome, NMP ima relativno visok tlak pare, što posljedično reducira tlak pare analita i dovodi do slabijeg signala.

Utjecaj temperature inkubacije ispitan je na otopinama dobivenim naciepljivanjem 1 mL [BMIM][NTf₂] s ostatnim otapalima u količini od 30% od dozvoljene granice propisane od strane ICH. Temperatura je varirana od 80 °C do 140 °C u trajanju od 10 min i pokazalo se da porastom temperature inkubacije raste i površina pikova većine analita.

Kod nekih otapala nije došlo do porasta signala što ukazuje na to da su već na nižim temperaturama dosegli svoju koncentracijsku ravnotežu. Slični rezultati dobiveni su i pri testiranju vremena trajanja inkubacije. Za većinu otapala vrijednost površina pikova porasla je s produljenjem vremena inkubacije od 5 min na 15 min. Nakon 15. min nije uočen znatan pomak te je zaključeno da su analiti u tom periodu dosegli koncentracijsku ravnotežu između tekuće i plinske faze u HS bočici.

Prilikom validacije spomenute metode, linearnost je ispitana na koncentracijskom području 1,2-120% od ICH limita propisanog za pojedino otapalo te za diklormetan, n-heksan, acetonitril, tetrahidrofuran i toluen na području 6-120% od ICH limita. Korelacijski koeficijent kalibracijskog pravca iznosio je ne manje od 0,996, osim za n-heptan i tert-butil metil eter gdje je dobivena vrijednost od 0,991. Kod ispitivanja ponovljivosti, analize su provedene na otopinama koje su sadržavale ispitivana ostatna otapala u koncentraciji 6% i 30% od njihova ICH limita te dobivene vrijednosti RSD nisu prelazile 8%. Također su LOD vrijednosti bile znatno niže nego kod primjene NMP-a pa je tako za npr. metanol dobivena LOD vrijednost 25 puta manja od one dobivene korištenjem NMP-a kao otapala.

Mana IT je njihova cijena. Iako se mogu pripremiti *in-house* za pojedinu analizu, zbog zadovoljavanja GMP zahtjeva poželjno je koristiti komercijalno dostupna otapala. Njihova cijena se za potrebe predstavljenog rada pokazala oko 15 puta veća od cijene NMP-a zbog čega se, unatoč svim pozitivnim doprinosima, ne koriste kod rutinskih analiza [38].

Pregledom predstavljenih radova, vidljivo je da se razvoj plinske kromatografije usmjerio na nekoliko ciljeva: povećanje osjetljivosti analize, smanjenje vremena trajanja analize, pojednostavljenje postupka pripreme uzorka, automatizacija i smanjenje sveukupnog troška analize. Kada se govori o rutinskim analizama u laboratorijima za provođenje kontrole kvalitete, tehnike kao SPME i korištenje ionskih tekućina, unatoč svojim prednostima, nemaju široku primjenu, čemu je vjerojatno razlog njihova cijena. Pojavom kapilarnih kolona s različitim stacionarnim fazama koje imaju velike separacijske moći, kao i povećanjem osjetljivosti detektora, postignut je optimum između izvedbe analize i njezine cijene. Osim toga, zahvaljujući osjetljivim detektorima, više nisu potrebna injektiranja velikih volumena uzorka. Danas je *headspace* sustav injektiranja lako dostupan te, unatoč vremenu potrebnom za inkubaciju uzorka, zahvaljujući učinkovitim kolonama, njime je moguće provesti analize kratkog vremena trajanja, zbog čega se određivanja ostanih otapala uglavnom svode na primjenu *headspace* sustava u kombinaciji s FID detektorom.

4.3. Odabrani primjeri sprezanja plinske kromatografije s različitim detektorima

Spregnuta plinska kromatografija ne podrazumijeva samo spajanje GC s različitim detektorima, nego i s automatiziranim tehnikama pripreme uzorka. Različiti detektori koji se primjenjuju uključuju najčešće maseni spektrometar (MS), a u ponekim slučajevima i infracrveni spektrometar (IR), NMR te atomski spektrometar.

U automatizirane tehnike pripreme uzorka ubraja se ekstrakcija čvrstom fazom (SPME), injektiranje velikih volumena (LVI), *purge and trap* (PT, tzv. „pročisti-ulovi sustav“) i *headspace* (HS). Još jedan pristup je multidimenzionalna plinska kromatografija (MDGC), koja podrazumijeva spajanje dviju i/ili više kolona različitih osjetljivosti.

Spajanje naprednih tehnika pripreme uzorka s detektorima koji daju dodatne informacije, uz primjenu kapilarnih kolona, pruža analitički osjetljiv sustav za analizu hlapljivih i poluhlapljivih sastojaka. Sprezanje MDGC s IR-om i MS-om može osigurati i kvalitativne, i kvantitativne podatke o ciljanim komponentama, kao što i povezivanje LVI-a s MDGC-om i MS-om može sniziti LOD s razine ppb-a do ppt-a [39].

4.3.1. Plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom

Primjenom GC, moguće je razdvojiti hlapljive i poluhlapljive komponente, ali ih nije moguće identificirati ukoliko se ne koriste odgovarajući standardi. Za razliku od toga, primjenom masenog spektrometra (MS) moguće je identificirati pojedine komponente uzorka dobivanjem njihovih strukturnih podataka na molekulskoj razini, ali ih nije moguće razdvojiti. Zbog navedenog, brzo nakon razvoja GC, pojavila se kombinacija spomenuta dva instrumenta [13].

LC-MS i GC-MS su najpoznatije spregnute tehnike. GC-MS je bila prva takva tehnika koja se pokazala korisnom u istraživačke i razvojne svrhe.

Komponente koje su hlapljive, malih molekulskih masa i stabilne na visokim temperaturama moguće je jednostavno analizirati primjenom GC-MS metoda. Pri analizi polarnih komponenata, pogotovo onih koje posjeduju više hidroksilnih skupina, ponekad je potrebno provesti derivatizaciju kako bi ih bilo moguće analizirati primjenom GC-MS [40].

Funkcionalne grupe kao što su -SH, -OH, -NH i -COOH sklone su formiranju intermolekulskih vodikovih veza koje onda utječu na hlapljivost komponenata, sklonost reakciji s komponentama iz kolone i termalnu stabilnost. Najčešće primijenjivana derivatizacija je prevođenje analita u trimetilsilil derivat. Pri tome se aktivni atom vodika iz nabrojanih funkcionalnih skupina zamjenjuje sililnom grupom čime se reducira polarnost molekule i sklonost stvaranju vodikovih veza [12].

Dok HPLC dolazi spregnuta s nizom detektora (LC-MS, LC-NMR, LC-FTIR), GC se uglavnom pojavljuje u kombinaciji s MS detektorom. Njegova važnost čak opada razvojem LC-MS pa tako ne dolazi do snažne ekspanzije u različitim izvedbama GC-MS instrumentacije kakva je zabilježena za LC-MS i CE-MS [40].

Kod izbora GC-MS međufaze, odnosno prijelazne komponente između instrumenata, potrebno je obratiti pozornost na sljedeće:

1. Međufaza mora učinkovito prevesti uzorak od GC-a do MS-a;
2. Analit ne smije kondenzirati prilikom prolaska kroz međufaze;
3. Analit se ne smije razgraditi prije ulaska u izvor iona MS-a;
4. Količina plina koja se uvodi u izvor iona mora biti unutar kapaciteta pumpanja MS-a [13].

Najčešće korištene međufaze za GC-MS su EI (elektronska ionizacija) i CI (kemijska ionizacija). Kod suvremenih GC-MS metoda moguće je koristiti različite druge sustave koji omogućavaju identifikaciju molekulskih iona. Npr. ortogonalna TOF masena spektrometrija spregnuta s GC-om koristi se za identifikaciju te ispitivanja čistoće određivanjem točne molekulske mase i elementarnog sastava komponenata uzorka.

GC i MS su kompatibilne tehnike po tome što je u obje uzorak u parnoj fazi. No, postoji i nekompatibilnost među njima po tome što GC radi pri visokom tlaku (101 325 Pa) i uz to je prisutan plin nositelj, dok MS radi pri vakuumu ($133,3 \times 10^{-4}$ – $133,3 \times 10^{-3}$ Pa).

Nakon razdvajanja na GC koloni, komponente kroz međufazu ulaze u MS. Pri tome dolazi do ionizacije, masene analize i detekcije omjera masa/naboja iona generiranih od pojedinih analita pomoću MS-a. Naime, tijekom procesa ionizacije, ne dolazi samo do ionizacije molekula, nego i do njihovog razbijanja u fragmente pomoću elektronske ili kemijske ionizacije te detekcije dobivenih fragmenata. Molekulski ion analita stvara *fingerprint* spektar specifičan za svaki pojedini analit.

Danas je GC-MS povezan *on-line* s različitim MS bazama podataka [13].

Kada se radi o farmaceutskoj industriji, GC-MS nalazi primjenu kod određivanja djelatne tvari u urinu i drugim biološkim uzorcima za farmakološku i forenzičku upotrebu, potom za identifikaciju onečišćenja i razgradnih produkata u ranim fazama razvoja lijeka te u području biljnih tvari pri izradi kromatografskih *fingerprinta* u svrhu identifikacije i kontrole kakvoće biljnog materijala (karakterizacija pesticida, herbicida i dr.) [13].

Kao što je već spomenuto, jedna od primjena spregnutih tehnika na području farmaceutske analize jest karakterizacija onečišćenja i razgradnih produkata u ranim fazama razvoja lijeka zbog sve strožih zahtjeva kakvoće.

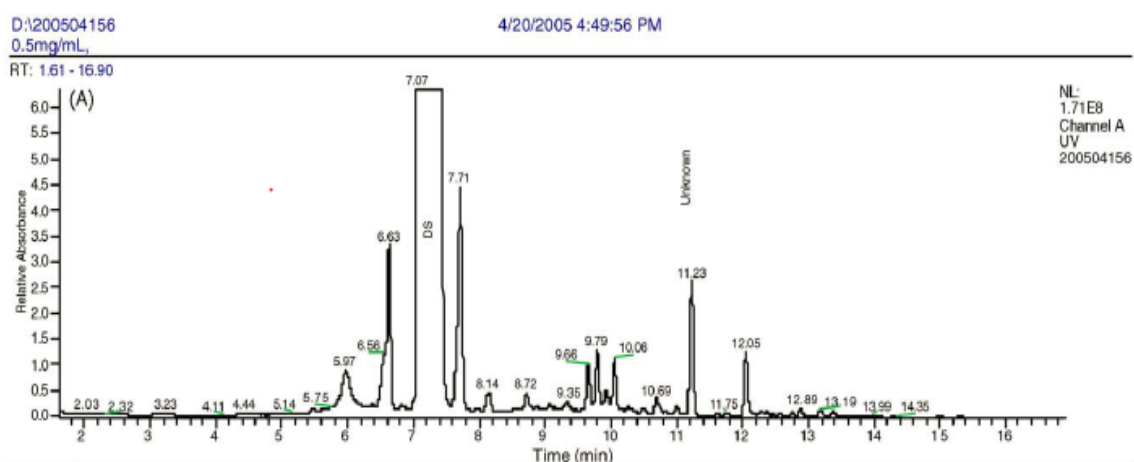
Jasno je da fokus na onečišćenjima i razgradnim produktima proizlazi iz sigurnosnih razloga. Puno je primjera nuspojava lijekova izazvanih onečišćenjima i razgradnim produktima. Npr. razgradni produkti tetraciklina (isteknuti rok trajanja lijeka), epitetraciklin i anhidrotetraciklin, mogu uzrokovati Fanconijev sindrom koji dovodi do zatajenja bubrega. Također, polimerni razgradni produkt kod aminopenicilina povezan je s pojavom alergenosti. Osim toga, neka onečišćenja i razgradni produkti su i potencijalni genotoksici [40].

Jedan od takvih primjera primjene spregnutih tehnika je rad C. Pana i sur. [41] u kojemu je, korištenjem niza spregnutih tehnika, određen razgradni produkt u tableti s aktivnom tvari TCH346 (dibenzo[b,f]oksepin-10-ilmetil-metil-prop-2-inil-amin hidrogen maleat), koja je istraživana u svrhu tretiranja neurodegenerativnih poremećaja, poput Parkinsonove bolesti i amiotrofične lateralne skleroze (ALS). Tijekom skladištenja na uvjetima 25 °C / 60% relativne vlage (RH), uočen je nepoznati razgradni produkt čija je koncentracija rasla tijekom vremena, a čija je identifikacija bila izazovna zbog slabih ionizacijskih svojstava i teške separacije od ostalih onečišćenja korištenjem HPLC

metode. Navedeni je rad ujedno i primjer primjene spregnute metode GC-MS pri identifikaciji onečišćenja u fazi razvoja lijeka. U ovom je radu proveden niz iscrpnih studija u svrhu karakterizacije nepoznatog onečišćenja, a pri tome se koristilo više spregnutih tehnika, kao što je LC-MS s ESI (*electrospray ionization*) i APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*), izolacija pika s LC frakcijskim kolektorom i obogaćivanje primjenom SPE te GC-MS s kemijskom ionizacijom. Na kraju je molekulska struktura potvrđena metodom LC-NMR.

U prvom koraku istraživanja nepoznatog onečišćenja korišten je LC-MS s ESI i APCI izvorom. U svrhu ionizacije tražene molekule, primijenjena je pozitivna i negativna elektrosprej ionizacija, kao i kemijska ionizacija pod atmosferskim tlakom (APCI).

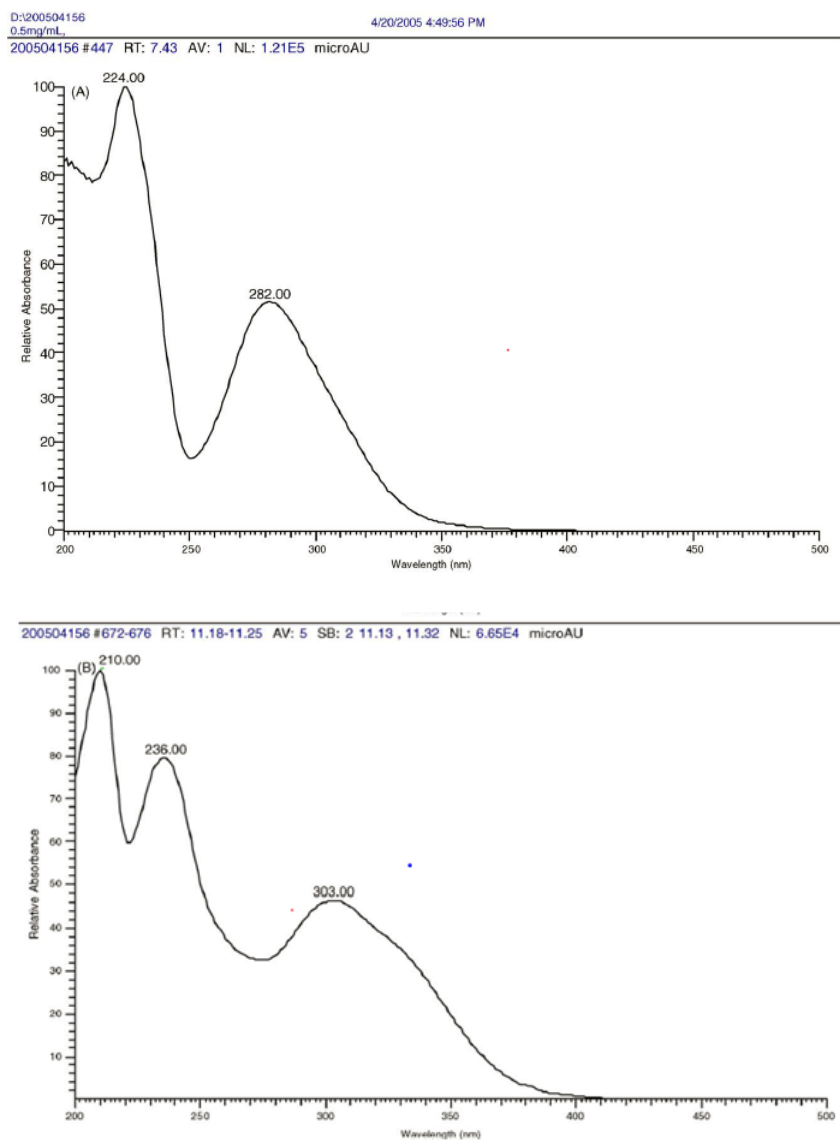
Za potrebe tekućinske kromatografije, pripremljene su 4 mobilne faze različitih pH vrijednosti kako bi se nakon toga ispitivana komponenta ionizirala bilo pozitivnim, ili negativnim ionizacijskim načinom. Provedenom analizom, korištenjem kisele mobilne faze A (0,1%-tna trifluoroctena kiselina), dobiven je HPLC kromatogram (Slika 12), a nepoznato je onečišćenje imalo vrijeme zadržavanja na koloni (t_R) od 11,23 min.



Slika 12. HPLC kromatogram dobiven analizom otopine TCH346 tablete, uz primjenu kisele mobilne faze A (0,1%-tna trifluoroctena kiselina); preuzeto iz [41].

No, nije uočen protonirani molekulski ion, niti korištenjem pozitivne elektrosprej ionizacije, niti pozitivne kemijske ionizacije pod atmosferskim tlakom. Tada je provedena negativna ESI s uzorcima dobivenim nakon korištenja neutralne i bazične mobilne faze, ali opet nije dobiven molekulski ion. Navedeno govori da ispitivana molekula ne posjeduje ionizirajuće skupine. Pregledom kromatograma dobivenih sa sve 4 različite mobilne faze, također je uočeno da nepoznato onečišćenje ne mijenja svoje t_R , unatoč promijeni pH vrijednosti mobilne faze, iz čega proizlazi da molekula nije promijenila naboj u rasponu pH 2,5–8,7. Za razliku od toga, t_R TCH346 pokazuje izrazitu ovisnost o pH mobilne faze. TCH346 ima bazična svojstva pa stoga kada je mobilna faza izmijenjena iz kisele u lužnatu, molekula je promijenjena iz protonirane u neutralnu i posljedično se zadržala dulje vrijeme na kromatografskoj koloni.

Usporedbom UV-spektra TCH346 (Slika 13, A) i nepoznatog onečišćenja (Slika 13, B), vidljivo je da je valna duljina koja odgovara maksimumima apsorpcije pomaknuta prema području većih valnih duljina, što govori u prilog činjenici da je molekula nepoznatog onečišćenja više konjugirana od ljekovite tvari.

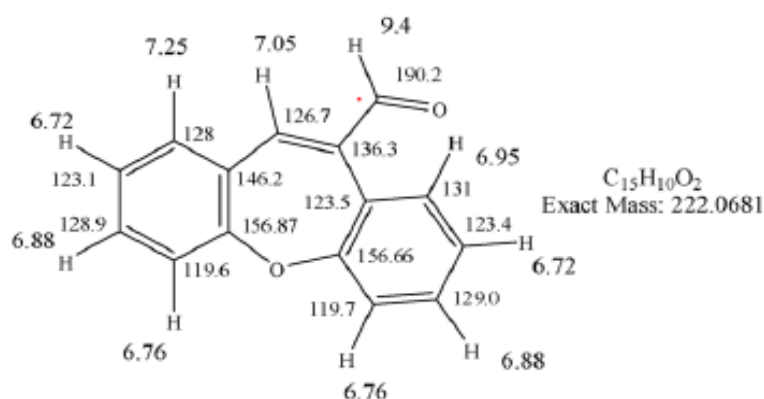


Slika 13. UV-Vis spektar ljekovite tvari TCH346 (A) i nepoznatog onečišćenja (B); preuzeto iz [41].

Kako bi se odredila struktura nepoznatog onečišćenja, ono je izolirano korištenjem frakcijskog kolektora nakon primjene LC. Skupljene su frakcije od preko 300 injektiranja. Injektrani volumen iznosio je 200 μ L. Tada je upotrebom vakuum uparivača uklonjen acetonitril, uzorak ukoncentriran primjenom ekstrakcije čvrstom fazom (SPE, korišten je PE spremnik) i dobivena je ispitivana tvar čistoće preko 80% (utvrđeno primjenom HPLC).

Budući da tvar nije bilo moguće ionizirati tehnikama ESI i APCI, izolirana tvar je analizirana primjenom kemijske ionizacije koja je mnogo manje selektivna. Kako je lijekovita tvar poluhlapljiva i moguće ju je analizirati primjenom GC-MS, pretpostavljeno je da bi istraživano onečišćenje također moglo imati slična svojstva jer se radi o njegovom razgradnom produktu. Provedenom analizom dobiven je molekulski ion m/z vrijednosti 223, tako da je utvrđena molekulska masa ispitivane tvari od 222 Da.

Zadnji korak je bila analiza korištenjem LC/SPE/NMR metode, nakon čega je potvrđena niže prikazana struktura nepoznatog onečišćenja (Slika 14) [41].



Slika 14. Utvrđena struktura nepoznate tvari istraživane u radu C. Pana i suradnika; preuzeto iz [41].

Primjer metode koja koristi GC-MS, a može se primijeniti i u redovitim analizama laboratorija za kontrolu kakvoće jest određivanje genotoksičnih onečišćenja, metil-metansulfonata (MMS) i etil-metansulfonata (EMS) u imatinib mesilatu, predstavljena u radu C. Zhanga i suradnika [42]. Pri proizvodnji imatinib mesilata uobičajeno se koristi metansulfonska kiselina i/ili metilsulfonil klorid, a MMS i EMS nastaju kao nusproizvodi kada su u istoj reakcijskoj smjesi prisutni metanol i etanol. Dnevni limit genotoksina prema smjernicama FDA i EMA iznosi 1,5 $\mu\text{g}/\text{dan}$ zbog čega je potrebno razviti osjetljivu

analitičku metodu za kvantifikaciju tih onečišćenja [42]. Prethodno je objavljena GC-FID metoda za njihovu kvantifikaciju, međutim, njezin je LOQ iznosio 5 µg/g, a LOD 1 µg/g, što su visoke vrijednosti kada se radi o genotoksičnim onečišćenjima [43].

Metoda koju su uveli C. Zhang i sur. [42] posjeduje LOD od 0,001 µg/mL [0,001 ppm], odnosno LOQ od 0,005 µg/mL [0,005 ppm] te je prilikom validacije pokazala linearnost u koncentracijskom području 0,01-1 µg/mL, RSD vrijednosti u rasponu 1,06-1,96% u koncentracijskom području od 0,05 µg/mL do 1,0 µg/mL te iskorištenje u rasponu 97,2-99,8% za 3 koncentracijske razine u rasponu 0,01-1,0 µg/mL. Predstavljena metoda je stoga pogodna za kvantifikaciju navedenih genotoksičnih onečišćenja u izrazito niskim koncentracijama.

Također je zanimljiv primjer primjene GC-MS metode naveden u radu A. E. Gudata i R. L. Firora [44], gdje je spregnuti sustav korišten za procjenu primarnih pakirnih materijala za farmaceutske proizvode. Kvaliteta spremnika koji se koriste za farmaceutske proizvode regulirana je od strane različitih vladinih i nevladinih regulatornih tijela. Procjena pakirnih materijala na potencijalne ekstraktibilne i otpuštajuće tvari kritični je čimbenik pri osiguravanju integriteta lijeka te osigurava usklađenost sa službenim zahtjevima (CFR, 21, dio 211.65), koji navodi da oprema treba biti izvedena tako da površina koja je u kontaktu s komponentama uzorka, procesnim materijalima ili djelatnom tvari ne smije biti reaktivna, aditivna ili apsorbirajuća, kako ne bi utjecala na sigurnost, identitet, učinkovitost, kvalitetu ili čistoću lijeka [44].

Kemikalije koje spremnik može otpuštati u gotovi proizvod uključuju i ekstraktibilne i otpuštajuće tvari. Ekstraktibilne tvari su kemijske tvari koje se otpuštaju nakon izlaganja spremnika otapalima pod ekstremnim uvjetima inkubacije koji se odnose na temperaturne uvjete i vremensko trajanje izloženosti. Otpuštajuće tvari se od njih

razlikuju po tome što se u normalnim uvjetima otpuštaju iz spremnika u proizvod. U spomenutom radu [44], analizirani su uzorci HDPE bočice i oblagajućeg polimera iz poklopca. Korištena je višestruka *headspace* ekstrakcijska tehnika kako bi se osiguralo da analit prijeđe iz krute faze uzorka u plinovitu. Uspješno je identificirano 15 spojeva koji su se nalazili u bazi opasnih kemikalija (*Agilent Hazardous Chemical Database Library*), među kojima su bili fenol, di-n-butil ftalat i bis-2-etilheksil ftalat.

4.3.2. Ostale spregnute tehnike plinske kromatografije

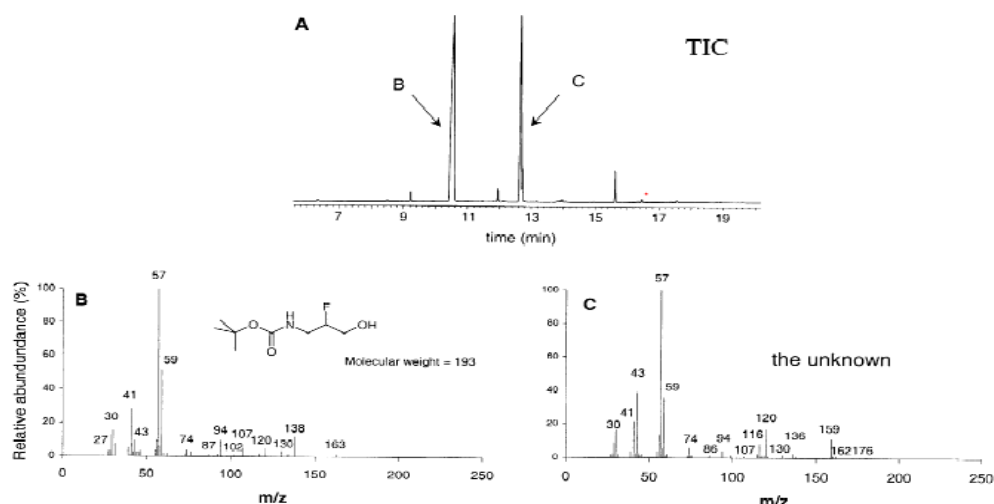
Važan korak prilikom razvoja farmaceutskog proizvoda je strukturna identifikacija onečišćenja. Prema ICH smjernicama, onečišćenje u farmaceutskom proizvodu je svaka komponenta lijeka koja nije identificirana kao djelatna niti pomoćna tvar u lijeku. Sigurnost lijeka ne ovisi samo o toksikološkim svojstvima ljekovite tvari, nego i prisutnih onečišćenja. Njih čine reakcijski nusprodukti koji se generiraju tijekom sinteze ljekovite tvari i razgradni produkti koji nastaju tijekom procesa formulacije i/ili tijekom skladištenja gotovog proizvoda. Identitet farmaceutskih onečišćenja, uključujući i razgradne produkte u gotovom ljekovitom proizvodu, sastavni je dio podataka koji se dostavljaju regulatornim tijelima prilikom registracije ljekovitih proizvoda. Udio djelatne tvari u dozirnom obliku može biti jako nizak, čak niži od npr. 1 mg po tableti ili kapsuli, zbog čega se veća pozornost pridaje onečišćenjima na jako niskim koncentracijskim razinama, za što su dobar primjer upravo genotoksična onečišćenja [45].

Kada se radi o spregnutoj plinskoj kromatografiji, identifikacija onečišćenja može se provesti interpretiranjem spektralnih podataka dobivenih sprežanjem GC s masenim detektorom (GC-MS), atomskim detektorom (GC-AED) ili Fourierovim infracrvenim detektorom (GC-FTIR). Iako je uglavnom GC-MS odabrana metoda za identifikaciju

analita koji se odjeljuju plinskom kromatografijom, za brojna onečišćenja primjena samo GC-MS neće osigurati dovoljno informacija potrebnih za pouzdano strukturno određivanje. To se nadoknađuje kombinacijom podataka dobivenih primjenom GC-MS metode sa strukturnim podacima dobivenih iz drugih izvora, primjerice GC-AED i GC-FTIR. GC-AED daje podatak o pojedinim elementima koji se pojavljuju u analiziranoj tvari. Monitoriranje na različitim valnim duljinama provodi se kako bi se izmjerila atomska emisija izabranih elemenata i podaci se snimaju kao kromatogrami selektivni prema elementu. Nadalje, moguće je dobiti informacije o mogućoj empirijskoj formuli kalibriranjem instrumenta sa standardima poznatog sastava i usporedbom njihovog odgovora s istraživanim nepoznatim onečišćenjem. GC-FTIR osigurava informaciju o funkcionalnosti molekule u smislu prisutnosti ili odsutnosti određenih funkcionalnih skupina, kao što su esterska, eterska, karbonilna, hidroksilna, aromatska, alifatska, aminska ili neka druga. GC-IR je vrlo osjetljiva i skupa tehnika, a ne oštećuje uzorak [46].

U radu Laniewskog i suradnika [46] opisano je strukturno određivanje nepoznatih onečišćenja u farmaceutskoj analizi kombiniranjem metoda GC-MS, GC-AED i GC-FTIR. Analiziran je uzorak tert-butil-2-fluoro-3-hidroksipropilkarbamata, tijekom čije je sinteze praćen jedan od intermedijera u sintetskom putu. Analiza je provedena primjenom GC-FID metode i dobiven je kromatogram s traženom tvari i nepoznatim onečišćenjem. Daljnje istraživanje svelo se na identifikaciju navedenog nepoznatog onečišćenja.

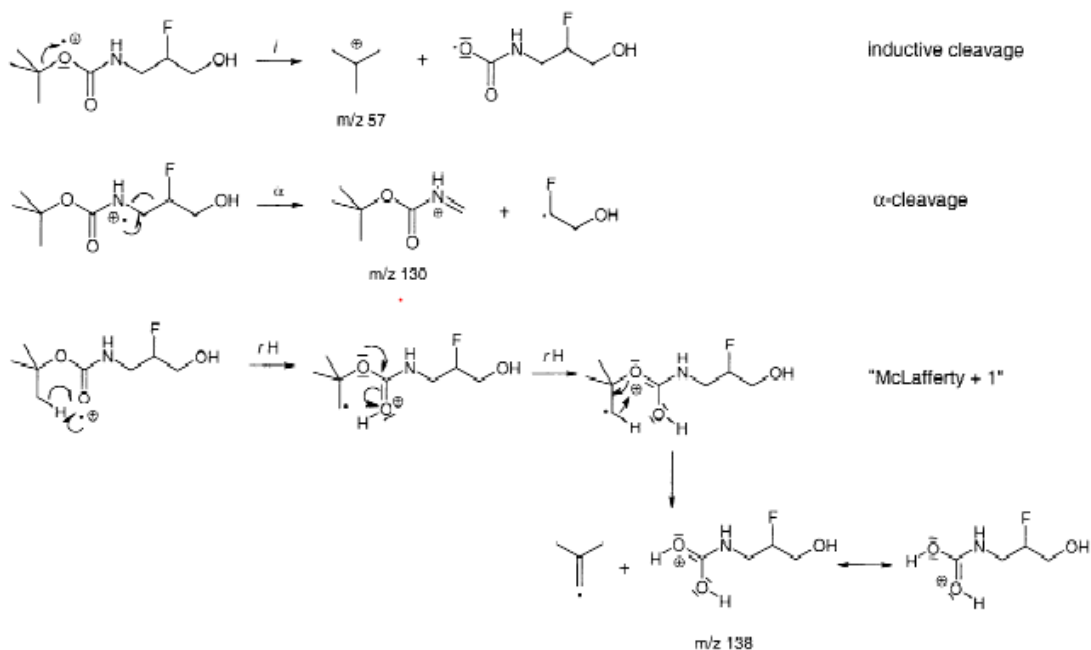
Primjenom GC-EI-MS dobiveni su kromatogrami za ciljanu komponentu i nepoznato onečišćenje koje prikazuje Slika 15.



Slika 15. GC-EI-MS analiza uzorka tert-butil-2-fluoro-3-hidroksipropilkarbamata.

A – ukupni ionski kromatogram, B – maseni spektar tert-butil-2-fluoro-3-hidroksipropilkarbamata, C – maseni spektar nepoznate tvari; preuzeto iz [46].

Kromatogramom dobivenim primjenom GC-EI-MS potvrđen je identitet komponente od interesa, ne samo prema vremenu zadržavanja (t_R), nego i masenom spektru. Na temelju dobivenih rezultata, identificiran je i njezin fragmentacijski tijek.



Slika 16. Fragmentacijski put istraživane tvari kod EI-MS-a; preuzeto iz [46].

Dobiveni spektar nepoznatog onečišćenja nije bio dovoljno jasan za interpretaciju. No, uočeno je da je prisutno nekoliko istih iona na kromatogramu ciljane tvari i nepoznatog onečišćenja i pretpostavljeno je da se radi o srodnim strukturama. U slučaju ciljane tvari nije prisutan molekulski ion pa je isto pretpostavljano i za nepoznato onečišćenje. Nakon toga je provedena i blaža, kemijska ionizacija, budući da molekulski ion nije pokazao stabilnost u elektron-ionizacijskom okruženju. Kako bi se dobio podatak o molekulskoj masi nepoznatog onečišćenja, provedena je GC-CI-MS analiza. Na kromatogramu ciljane tvari uočen je ion za kojeg je pretpostavljeno da je molekulski ion. No, nisu bili prisutni očekivani popratni ioni koji bi potvrdili da se radi o molekulskom ionu, nego ioni većih molekulskih masa. Isto je uočeno i na kromatogramu nepoznatog onečišćenja s dodatnim prisutnim ionima velikih m/z vrijednosti za koje je onda pretpostavljeno da su posljedica formiranja adukta.

U sljedećem koraku provedena je GC-AED analiza kako bi se dobile informacije o elementarnom sastavu. Dobiveni rezultati pokazali su da nepoznata komponenta sadrži iste heteroatome kao tert-butil-2-fluoro-3-hidroksipropilkarbammat, kao npr. ugljik, vodik, kisik, dušik i fluor. Obradom rezultata tert-butil-2-fluoro-3-hidroksipropilkarbamata, koji je korišten kao standard za određivanje molekulske mase i nepoznatog onečišćenja, zaključeno je da je molekulska masa tražene komponente 234, odnosno za 42 veća od molekulske mase poznate komponente.

Na temelju do tada dobivenih rezultata, zaključeno je da nepoznato onečišćenje sadrži dodatnu acetilnu grupu. Kako u sintetskom putu nije predviđeno formiranje acetilne skupine, nije bilo moguće dati objašnjenje za prisutnost navedenog onečišćenja.

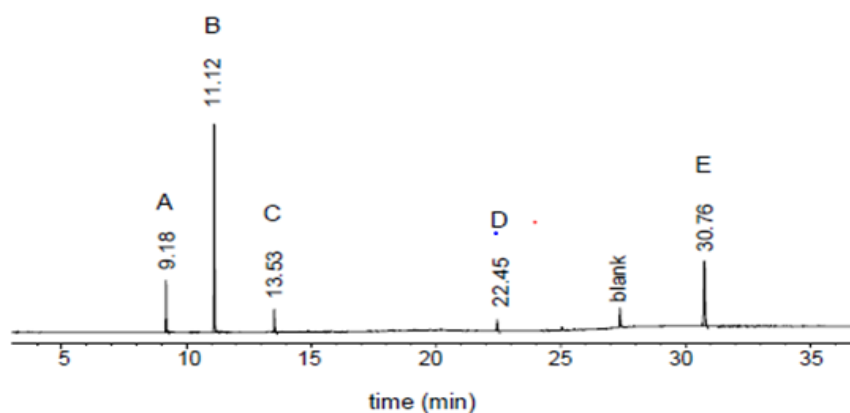
Daljnjom analizom, uz primjenu GC-FTIR, potvrđena je prisutnost dviju karbonilinih grupa, amidne i esterske skupine te odsutnost -OH skupine u nepoznatom onečišćenju [46].

Kako bi se još jednom potvrdili dobiveni rezultati, provedena je acetilacija tert-butil-2-fluoro-3-hidroksipropilkarbamata primjenom anhidrida octene kiseline i piridina te je dobivena molekula koja je primjenom GC-EI-MS zabilježena s istim t_R i masenim spektrom kao i istraživano nepoznato onečišćenje. Dakle, nepoznato je onečišćenje identificirano kao 3-[(tert-butilkarbonil)amino]-2-fluoropropil acetat.

Niti jedna tehnika sama nije bila u mogućnosti riješiti navedeni analitički problem. Primjenom GC-MS osigurane su informacije o strukturnim fragmentima i molekulskoj masi komponente. GC-AED je potvrdio prisutnost pojedinih heteroatoma i omogućio određivanje empirijske formule. GC-FTIR je dao vrijedne rezultate u vezi funkcionalnih skupina u molekuli [46].

Isti su autori koristili još jednom sve tri spomenute spregnute tehnike prilikom identifikacije četiri glavna nusprodukta u uzorku sintetiziranog 1,3-dikloro-5-(difluorometoksi)benzena [47]. Radilo se o eksperimentalnom pokušaju sinteze navedenog API-a.

Nakon analize uzorka primjenom GC-FID metode, dobiven je kromatogram s 5 glavnih komponenata, umjesto očekivane jedne komponente u visokom udjelu.



Slika 17. GC-FID analiza uzorka 1,3-dikloro-5-(difluorometoksi)benzena; preuzeto iz [47].

GC-MS metoda potvrdila je prisutnost 5 komponenata (A-E) u uzorku, nakon čega je nastavljena istraga u smjeru njihove identifikacije, kako bi se bolje razumjele kemijske reakcije koje su se odvijale prilikom sinteze.

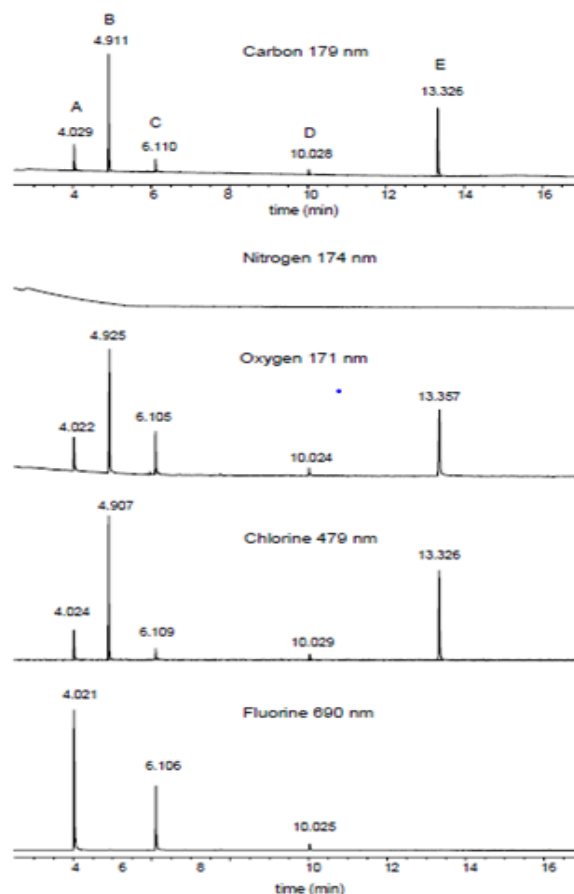
Primjenom masenog detektora, odmah su identificirane dvije komponente: ciljani intermedijer 1,3-dikloro-5-(difluorometoksi)benzen (komponenta A), čiji je maseni spektar bio poznat iz ranijih studija, te 1,3-dikloro-5-metoksibenzen (komponenta B), prepoznat u GC-MS bazi podataka.

Komponente C i D nisu bile poznate iz prijašnjih radova pa je pristupljeno njihovom određivanju kombinacijom metoda GC-MS i GC-AED.

Rezultati dobiveni analizom komponente C, primjenom GC-MS-EI i GC-MS-CI, dali su naslutiti da je molekulska masa tražene komponente $M_r = 270$, da sadrži diklorofenilnu strukturu te metil estersku grupu.

Kod komponente D je provedbom GC-MS-EI analize pretpostavljena molekulska masa od $M_r = 354$ te djelomično potvrđena primjenom GC-MS-CI metode (prisutnost iona m/z 355). Također je zaključeno da struktura sadrži 4 atoma klora prisutnih u obliku diklorofenilne strukture i dodatnog fragmenta s preostala 2 atoma klora.

Nakon primjene GC-AED metode, potvrđena je prisutnost atoma fluora kod komponente C i kod komponente D. Za obje je komponente dokazano da sadrže kisik, što je poduprlo teoriju o prisutnosti metil esterske grupe kod komponente C [47].



Slika 18. GC AED analiza uzorka 1,3-dikloro-5-(difluorometoksi)benzena; preuzeto iz [47].

Tumačenjem rezultata GC-MS analize, uz pomoć onih dobivenih primjenom GC-AED metode, komponenta C je identificirana kao metil(3,5-diklorofenoksi)(difluoro)acetat, dok je komponenta D identificirana kao 1,3-dikloro-5-[(3,5-diklorofenoksi)(fluoro)metoksi]benzen.



Slika 19. Struktura 2 od 4 različita nusprodukta dobivena pri sintezi 1,3-dikloro-5-(difluorometoksi)benzena; preuzeto iz [47].

Prilikom pokušaja identifikacije komponente E, dobiveni rezultati GC-EI-MS analize ukazivali su da bi se moglo raditi o molekuli molekulske mase $M_r = 335$. No, mnogo dulje t_R u usporedbi s onim komponente D (čija je molekulska masa iznosila $M_r = 354$), ukazivalo je na to da komponenta E mora imati veću molekulsku masu od komponente D. Osim toga, kao i kod komponenata C i D, zabilježen je diklorofenilni fragment.

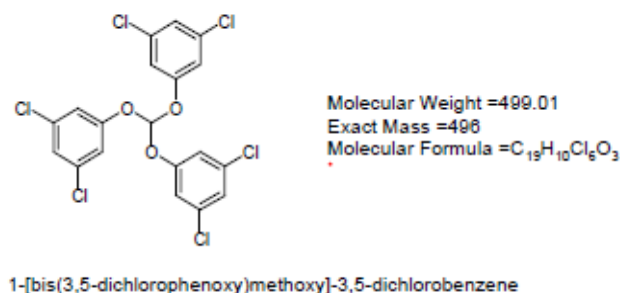
Nakon toga, provedena je GC-CI-MS analiza. I kod GC-EI-MS, i kod GC-CI-MS, zabilježeni su ioni visokih masa: m/z 335, 337, 339 i 341. Činjenica da i blaga ionizacija primjenom CI uzrokuje nastanak istih iona kao i pri elektroionizaciji, pokazala je da rezultati samo GC-MS analize ne mogu osigurati informacije o molekulskoj masi nepoznate komponente. Kako bi se dobile informacije o elementarnom sastavu, primijenjena je spregnuta metoda GC-AES. Rezultati su pokazali da u molekuli nema atoma dušika i fluora, dok sadrži atom kisika. Diklorofenilna struktura i atom kisika indicirali su da molekula sadrži diklorofeniloksi grupu.

Pri pokušaju određivanja molekulske formule, kao standard za GC-AES korišten je 1,3-dikloro-5-metoksibenzen zbog prisutnosti diklorofeniloksi grupe i odsutnosti fluora.

Točna molekulska formula nije dobivena, ali je utvrđeno da se molekulska masa komponente E mora kretati između 500 i 600, a broj atoma vodika od 10 do 15.

Komponenta E je izolirana precipitacijom nakon otapanja uzorka u diklormetanu i ispiranja u acetonitrilu, nakon čega je analizirana primjenom GC-NMR metode. Dobiveni rezultati ukazali su na prisutnost tri diklorofenilne skupine, gdje se supstitucija dogodila na pozicijama 1, 3 i 5 benzenskog prstena. Osim toga, iz rezultata dobivenih NMR-om, zaključeno je da je tražena molekula simetrična [47].

Interpretiranjem svih dobivenih rezultata, došlo se do strukture komponente E koja je prikazana na Slici 20:



Slika 20. Struktura nepoznate tvari E dobivene prilikom sinteze 1,3-dikloro-5-(difluorometoksi)benzena; preuzeto iz [47].

Kod identifikacije onečišćenja u ljekovitoj tvari, GC nema široku primjenu. Kao što je prethodno spomenuto, razlog tome je njezina nepogodnost za analizu polarnih i termolabilnih tvari, što je često karakteristika djelatne tvari. No, pogodna je tehnika za analizu hlapljivih onečišćenja koja se pojavljuju u farmaceutskim sirovinama i poluproizvodima. Kada se radi o spregnutoj plinskoj kromatografiji, GC-MS je uvjerljivo najčešće korišteni sustav. U predstavljenom radu Pana i sur., korišten je umjesto LC-MS sustava pri određivanju molekulske mase nepoznatog onečišćenja. Kako je bilo poznato da je analizirano onečišćenje poluhlapljivo, odnosno pogodno za GC analizu, a kako ga nije bilo moguće ionizirati ESI i APCI tehnikama, primijenjen je GC-MS s manje selektivnom, kemijskom ionizacijom. Kod kompleksnijih slučajeva, gdje jedna tehnika nije dovoljna za identifikaciju, kao što je to slučaj u radovima Laniewskog i sur., GC spregnuta s drugim vrstama detektora (u predstavljenim primjerima GC-AES i GC-NMR) može poslužiti za uspješno rješavanje analitičkih problema. U odabranim radovima, pri analizi poluproizvoda djelatne tvari, uočeno je nepoznato onečišćenje. Kako je poluproizvod molekula koja je svojim karakteristikama bila pogodna za GC analizu, spregnuta plinska kromatografija odabrana je kao tehnika kojom su uspješno identificirana njegova strukturno srodna onečišćenja.

4.4. Odabrani primjeri primjene plinske kromatografije u analizi biljnih uzoraka

Osim što različiti modaliteti tradicionalne medicine imaju široku primjenu u primarnoj zdravstvenoj zaštiti u Aziji, Africi i Latinskoj Americi, oni stječu popularnost i u velikom dijelu razvijenog svijeta te se ubrzano šire u industrijalizirane države gdje se često nazivaju komplementarnom i alternativnom medicinom.

Iako je u zapadnim zemljama osnovna medicina konvencionalna, primjena terapeutika tradicionalne medicine raste iz mnogih razloga, a jedan od njih su brojne prijavljene nuspojave i visoka cijena konvencionalnih lijekova te nedovoljna učinkovitost u nekim bolestima i stanjima.

Dok se zemlje u razvoju okreću biljnim lijekovima zbog njihove pristupačnosti, znanstvenici širom svijeta smatraju biljne vrste izvorom novih kemijskih entiteta, po uzoru na biološki aktivne biljne sastavnice izolirane u prošlosti, poput digoksina, morfina, taksola, atropina, vinblastina i drugih, koji su i danas u primjeni [18].

Prema definiciji smjernica Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) [48], biljni lijek je biljna tvar ili biljni pripravak koji, primijenjen zasebno ili u kombinaciji, ima terapijski učinak, sa svrhom očuvanja zdravlja, prevencije, dijagnostike ili liječenja bolesti. Sadrži biljne komponente iz jedne ili više biljnih vrsta, a u slučajevima kada se radi o više biljnih vrsta, koristi se još i naziv „mješoviti biljni proizvod“. Nadalje, prema smjernicama Europske agencije za lijekove (EMA), gotovi biljni proizvod može sadržavati jedan ili više biljnih sastojaka, jedan ili više biljnih pripravaka ili njihovu kombinaciju [49].

Sukladno Europskoj farmakopeji [7], a prema Zakonu o lijekovima Republike Hrvatske [50], **biljni lijek** se definira kao lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka. S tim u svezi, **tradicionalni biljni lijek** je biljni lijek čiju je sigurnost primjene i djelotvornost moguće prepoznati na temelju njegove tradicionalne uporabe i koji ispunjava uvjete određene Zakonom [50]. Pri tome su **biljne tvari** cijele ili narezane biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi, gljive, u osušenom ili svježem obliku te neobrađene izlučine biljaka; biljne tvari označavaju se korištenim dijelom biljke i botaničkim nazivom biljke u skladu s binomnim sustavom (rod, vrsta, podvrsta i autor). Prema istom zakonskom izvoru [50], **biljni pripravci** jesu pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, koncentriranje, tiještenje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka.

Ovisno o načinu prikazivanja proizvoda i vezanim tvrdnjama (u skladu sa zakonskim okvirima), **biljni proizvodi** na tržištu mogu biti svrstani u skupinu lijekova, hrane ili kozmetike. Europsko je tržište do nedavno bilo slabo regulirano glede biljnih proizvoda zbog mnogih razloga, a osobito zbog manjka usklađenih zakonskih okvira. Neke su europske zemlje uvele nacionalne postupke za registraciju biljnih proizvoda, dok se u većini zemalja nije primjenjivala posebna regulativa pa su se takvi proizvodi na tržištu mogli pronaći u različitim skupinama kod kojih se ne primjenjuju strogi regulatorni zahtjevi kao za lijekove. Stoga su i danas, zbog različitih gledišta država članica EU, prisutne teškoće prilikom razvrstavanja pojedinih biljnih proizvoda kao dodataka prehrani, tradicionalnog biljnog lijeka, biljnog lijeka provjerene medicinske uporabe (WEU) ili druge dodirne skupine proizvoda [51].

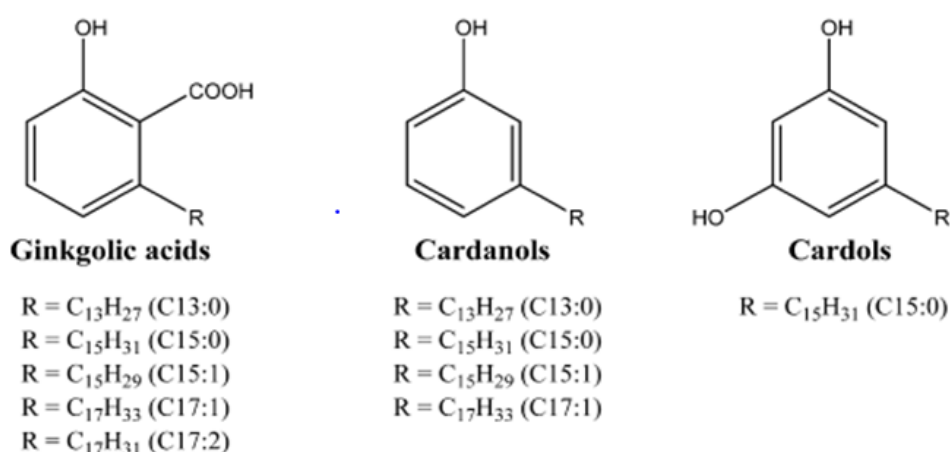
Usvajanjem novih direktiva na području lijekova i dodataka prehrani, napravljen je pomak glede razvrstavanja i registracije biljnih proizvoda. Razvoj zakonskih okvira za pojedine skupine proizvoda omogućava njihovu bolju kvalitetu na tržištu pregledom registracijske dokumentacije, uključujući provjeru prikladnosti označavanja proizvoda i upute za korisnika od strane nadležnih regulatornih tijela te kroz postmarketinško praćenje i prijavu nuspojava. Budući da su biljni sustavi iznimno kompleksni, a sadržaj bioaktivnih sastavnica često promjenjiv i ovisan o brojnim i raznolikim čimbenicima, očita je potreba uvođenja novih pristupa identifikaciji i kontroli kakvoće takvih složenih sustava [51]. Kada je riječ o studijama na biljnim uzorcima, HPLC i GC su najprimjenjivnije analitičke tehnike. U sprezi s različitim tipovima detektora ne koriste se samo za identifikaciju i kvantifikaciju komponenata u biljnim ekstraktima, nego i za usporedbu kromatografskih *fingerprinta* biljnih proizvoda i analizu *in vivo* metabolizma biljnih komponenata u svrhu farmakokinetičkih studija [18].

GC je tehnika posebice prikladna za kvantitativnu analizu prirodnih hlapljivih komponenata i lipofilnih sastavnica s niskim vrelištima te dobrom termičkom stabilnošću. Također se koristi pri određivanju ostataka pesticida i organskih otapala u biljnom materijalu i ekstraktima. Iako se biljne komponente s visokim vrelištem i one termalno osjetljive uglavnom analiziraju primjenom HPLC, neki znanstvenici još uvijek preferiraju GC pri njihovoj kvantifikaciji, prevodeći ih derivatizacijom u manje polarne spojeve. Razlog tomu je bolje razlučivanje komponenata koje je moguće postići GC analizom zbog primjene dugih kapilarnih kolona i manje interferencija s mobilnom fazom [18].

Primjer takvog slučaja je studija M. Wanga i suradnika [52] koji su primijenili GC-MS sustav za karakterizaciju i kvantitativnu analizu ginkolnih kiselina u uzorcima ginka. Naime,

proizvodi dobiveni iz biljne vrste *Ginko biloba* L. (Ginkgoaceae) čine klasu najprimjenjivanih biljnih lijekova i dodataka prehrani u svijetu. Njihove medicinske dobrobiti se uglavnom odnose na poboljšanje kognitivnih funkcija (pamćenja i koncentracije), usporavanje starenja, tretiranje kardiovaskularnih i neurodegenerativnih poremećaja te poboljšanje krvne cirkulacije. Osim navedenih, ostale dobrobiti primjene spomenutih biljnih proizvoda uključuju antitumorsko, antidepresivno i antistresno djelovanje. Pozitivni medicinski učinci biljnih proizvoda vrste *G. biloba* uglavnom se pripisuju glavnim sastojcima biljke, flavonoidima (0,5-1%), diterpenskim trilaktonima (ginkolidi A, B, C i J) te seskviterpenu bilobalidu [53].

Što se tiče neželjenih učinaka koji se vežu za biljne proizvode dobivene iz ginka, pripisuje im se kontaktni alergijski dermatitis, potencijalne interakcije s konvencionalnim lijekovima, citotoksični, mutageni, karcinogeni i neurotoksični učinci. Većina navedenih djelovanja nije medicinski potvrđena, međutim, opće je slaganje oko činjenice da su neželjeni učinci posljedica prisutnosti bioaktivnih alkilfenola, kao što su ginkolna kiselina (GA), kardanoli (ginkoli) i kardoli [52].



Slika 21. Kemijske strukture glavnih komponenata alkilfenola u vrsti *Ginko biloba*; preuzeto iz [52].

Standardizirani ekstrakti čine većinu komercijalnih ginko proizvoda i sadrže 6% diterpenskih trilaktona, 24% flavonolskih glikozida i tragove ginkolne kiseline. U proizvodnom procesu biflavoni i ginkolna kiselina se uklanjaju, a zbog negativnog učinka ginkolne kiseline trenutno je prema Europskoj farmakopeji njezina dozvoljena koncentracija svedena na <5 ppm u standardiziranim ekstraktima [52]. Naime, standardizacija je postupak kojim se određuje količina bioaktivnih tvari u jedinici mjere ljekovitog proizvoda; proizvođač time jamči da se u jedinici mase ili volumena proizvoda nalazi određena količina aktivne komponente. Standardizirani biljni ekstrakti su ekstrakti visoke kakvoće koji sadrže poznatu količinu određenih spojeva, a podvrgnuti su strogim kontrolama kvalitete tijekom svih faza rasta, berbe i proizvodnje. Dakle, standardizirani ekstrakti imaju stabilan sadržaj djelatne tvari, što se postiže standardizacijom postupka proizvodnje (ekstrakcije) i standardizacijom samog ekstrakta [54].

Glavni izazovi pri određivanju ginkolne kiseline u ekstraktima ginka su: dozvoljena vrlo niska koncentracija u ekstraktu, što zahtijeva visoku osjetljivost analitičke metode, potom kompleksan biljni matriks uzoraka vrste *G. biloba* i vezanih dodataka prehrani, teško dobivanje čistog, autentičnog standarda za identifikacijske i kvantifikacijske svrhe, te strog zahtjev za razlučivanje pri analizi izomera alkilfenola.

Kod određivanja ginkolne kiseline, uglavnom se određuje ukupna koncentracija u analiziranom uzorku, dok točan utjecaj različitih izomera u farmakološkom djelovanju vrste *G. biloba* nikada nije određen. Povezivanje točno određenog izomera s farmakološkim učinkom zahtijeva analitičku metodu koja bi omogućila kvantifikaciju svih izomera ginkolne kiseline [52].

Pri analizi ginkolne kiseline trenutno se koristi LC. No, njezin je nedostatak u tome što nije moguće postići potrebno razlučivanje između izomera ginkolne kiseline koji se

razlikuju u broju atoma ugljika i stupnju nezasićenosti, kao što su C13:0 i C15:1 ili C15:0 i C17:1, kao i nemogućnost razlikovanja izomera oko dvostruke veze [52].

U spomenutoj studiji M. Wanga i sur. [52], razvijena je i validirana GC metoda za analizu pojedinih izomera C13, C15 i C17 ginkolne kiseline u listovima ginka, ekstraktu i komercijalnom proizvodu te je postignuto željeno razlučivanje između izomera koju HPLC nije mogla ostvariti. Osim navedenoga, predstavljena je metoda omogućila i određivanje koncentracije pojedinih izomera oko dvostruke veze u analiziranim uzorcima.

Analizirano je 19 biljnih uzoraka i referentnih standarda, uključujući listove, sjemenke, biljne ekstrakte i sarkotestu te 21 komercijalni dodatak prehrani koji je sadržavao ekstrakt lista vrste *G. biloba*. Priprema uzoraka sadržavala je ekstrakciju smjesom metanola i mravlje kiseline (1:1), tekućinsko-tekućinsku ekstrakciju n-heksanom i derivatizaciju trimetilsulfonij hidroksidom (TMSH). Dobiveni rezultati pokazali su veliku varijaciju u sadržaju ginkolne kiseline, pri čemu je najmanja koncentracija detektirana u sjemenu (4-39 ppm), nešto viša u suhom ekstraktu (3-47 ppm) dok je u listu zabilježen najveći koncentracijski raspon (42-534 ppm).

Vezano za određivanje udjela pojedinih izomera, pokazalo se da je omjer udjela izomera u pojedinim uzorcima dobar pokazatelj iz kojeg dijela biljke uzorak potječe. Tako je provedenom analizom utvrđeno da su svi komercijalni ginko proizvodi izvedeni iz lista ginka, a ne iz sjemena ili sarkoteste [52].

U pravilu, GC-MS se može koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu većine biljnih uzoraka. No, nije pogodan za analizu visoko polarnih, termolabilnih i nehlapljivih makromolekula organskih spojeva [18].

Neki od primjera korištenja vezanog GC-MS sustava u studijama provedenim na biljnim uzorcima je rad L. K. Kanthala i suradnika [55], u kojemu su određivane bioaktivne komponente ekstrakta vrste *Lactuca runcinata* koja se tradicionalno koristi kao diuretik i pri stanjima kroničnih smetnji jetre i crijeva. Također je vrijedan izvor esencijalnih hranjivih tvari, kao što su ugljikohidrati, proteini, masti itd., ali i kalcija, željeza i fosfora. Sušeni biljni dijelovi prvo su podvrgnuti ekstrakciji metanolom, nakon čega je ekstrakt filtriran i koncentriran u vakuumu do suha. Prethodnim fitokemijskim rešetanjem (*screening*), primjenom različitih testova (Dragendorf, Shinoda, Fehling test itd.), potvrđena je prisutnost alkaloida, flavonoida, eteričnih ulja, terpenoida, ugljikohidrata, fenola i dr. Nakon toga je primjenom GC-MS metode identificirana 21 sastavnica, što predstavlja 84,49% od ukupnog sastava metanolnog ekstrakta. Rezultati su potvrdili prisutnost različitih bioaktivnih komponenata te pokazali da je vrsta *L. runcinata* biljka sa znatnim fitoterapijskim potencijalom.

Slična studija provedena je na metanolonom ekstraktu vrste *Clerodendrum viscosum*, biljke čiji se korijen i list koriste u tradicionalnoj indijskoj medicini za liječenje astme, bronhitisa, kožnih oboljenja, epilepsije te infekcije glistama [56]. Fitokemijskim rešetanjem potvrđena je prisutnost steroida, triterpena, alkaloida, flavonoida, tanina i ugljikohidrata, a GC-MS analizom identificirano je 16 različitih spojeva. Takve studije daju informaciju o prirodi bioaktivnih tvari prisutnih u analiziranom biljnom materijalu, ali također mogu poslužiti i u svrhu kontrole kakvoće biljnih proizvoda [56].

Kako bi se osigurala terapijska djelotvornost i sigurnost biljnih proizvoda te njihovo prihvaćanje na međunarodnom tržištu, potrebno je specificirati kontrolu kakvoće biljnih ekstrakata primjenom međunarodnih standarda, posebice kvantitativnu analizu glavnih komponenata, kvalitativnu kromatografsku analizu (kromatografski *fingerprint*),

granična određivanja pesticidnih ostataka i teških metala (limit testovi), mikrobiološka ispitivanja te analize drugih vanjskih kontaminanta [18].

Kada je riječ o kontroli kakvoće biljnog materijala, pripravaka i gotovih biljnih proizvoda i postavljanju specifikacijskih zahtjeva, primjenjuju se sljedeći testovi koji mogu uključivati kromatografske analize:

Biljni materijal: identifikacijski testovi, ispitivanje onečišćenja (pesticidi, fumiganti, radioaktivna onečišćenja), određivanje sadržaja.

Biljni pripravci: identifikacijski testovi, onečišćenja (ostatna otapala, pesticidi, fumiganti) i sadržaj.

Gotovi biljni proizvodi: identifikacija, sadržaj, onečišćenja.

Onečišćenja koja potječu iz biljnog materijala ili pripravka kao što su pesticidi, fumiganti i sl. nije potrebno kontrolirati ako se njihova kontrola provodi na sirovini. Ostatna otapala koja potječu iz procesa proizvodnje biljnog pripravka nije potrebno kontrolirati na gotovom proizvodu ako se kontroliraju na samom pripravku tijekom proizvodnje. Ostatna otapala koja se npr. koriste u procesu oblaganja tablete, potrebno je kontrolirati na završnom proizvodu. Potrebno je kontrolirati razgradne produkte biljne tvari ili pripravka ako je evidentno da se pojavljuju – npr. aglikoni iz hidroksiantracenskih glikozida [57].

Kromatografija se primjenjuje također pri kemijskoj standardizaciji i kontroli kakvoće biljnih lijekova. Kemijsku standardizaciju biljnih ekstrakata potrebno je provoditi za potrebe bioloških, farmakoloških i kliničkih studija, a između ostalog i zbog česte prisutnosti patvorina. Čak i kada se ne radi o takvim slučajevima, nego o odgovarajućim vrstama, njihov kemijski sastav može znatno varirati ako se radi o različitim sezonama berbe, različitim regijama, kao i razlikama pri skladištenju [18].

Identifikacijske metode koje se koriste pri analizi biljnih materijala obuhvaćaju morfološku, mikroskopsku, genetsku i fizikalno-kemijsku identifikaciju.

Fizikalno-kemijska identifikacija biljnih materijala odnosi se na kvalitativnu i kvantitativnu analizu aktivne komponente, glavnih komponenata ili karakterističnih komponenata primjenom fizikalnih i kemijskih metoda.

Kromatografska identifikacija uključuje TLC, GC, HPLC i CE. Za materijale čija je kemijska struktura poznata, identifikaciju je lako provesti jednostavnim uspoređivanjem uzorka sa standardnim ili poznatim materijalom. TLC, GC i HPLC su najpouzdanije i uobičajeno korištene metode za takve usporedbe, pogotovo u slučajevima kada morfološka i mikroskopska identifikacija materijala nije sigurna. Ukoliko kemijski sastav uzorka nije u potpunosti poznat, uzorak je uglavnom potrebno ekstrahirati, zatim izolirati primjenom kromatografije te identificirati spektralnim metodama.

Kontrola kvalitete biljnog materijala (sirovina) ne uključuje samo kvantitativnu analizu glavnih komponenata, nego i ostale analize vezane za ispitivanje sigurnosti, kao što su ispitivanja teških metala, pesticida i mikroorganizama [18].

Kada je riječ o kontaminantima biljnih materijala i proizvoda, može ih se podijeliti na fizikalno-kemijske i biološke kontaminante, a uključuju pesticide, radioaktivne čestice, mikrobe, uključujući patogene, mikotoksine, teške metale i arsen.

Također se kao rezidui mogu pojaviti različiti agrokemijski agensi i neka organska otapala [48].

Plinska kromatografija primjenjuje se u kontroli kakvoće biljnih proizvoda, a uključuje sljedeće skupine tvari:

Kemijski kontaminanti:

- Trajna organska onečišćenja (*POP, persistent organic pollutants*): uključuju organske kemikalije, kao što su sintetski aromatski klorirani ugljikovodici koji su slabo topljivi u vodi i stabilni u prisutnosti sunca, vlage, zraka i topline te mogu naštetiti zdravlju ljudi i životinja koji ih unose u organizam; u prošlosti su se široko koristili u poljoprivredi kao pesticidi, a još uvijek nastaju slučajno kao nusprodukti izgaranja ili industrijskih procesa;
- Otapala koja se pojavljuju kao kontaminati.

Agrokemijski kontaminanti:

- Agrokemijski ostatci potječu iz pesticida i fumiganata. Pesticidni ostatci mogu potjecati od pesticida korištenih kod uzgoja ljekovitog bilja ili su to pesticidni ostatci iz okoliša, kao npr. diklordifeniltrikloroetan (DDT) i benzen heksaklorid (BHC). Trajni pesticidi, kao što su DDT i BHC, već su dugo izbačeni iz upotrebe u mnogim državama, no još ih je uvijek moguće naći u područjima u kojima su nekada primjenjivani i česti su zagađivači ljekovitog bilja koje se uzgaja u okolini. Osim toga, još uvijek se koriste u svrhe javnog zdravlja, kao npr. pri suzbijanju komaraca prijenosnika malarije i tu se često primjenjuju uz poljoprivredna tla gdje se mogu putem zraka prenijeti i onečistiti kulture uzgajane u okolini.

Ostatna otapala:

- niz organskih otapala koristi se pri proizvodnji biljnih pripravaka ili lijekova te se mogu pojaviti kao onečišćenja u gotovim proizvodima [48].

Zongyang Cui i suradnici razvili su GC-MS/MS metodu [58] kombiniranu s ekstrakcijom čvrstom fazom za određivanje 16 različitih policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) u različitim vrstama tradicionalnog kineskog ljekovitog bilja.

PAH su velika skupina poluhlapljivih organskih sastojaka koji sadrže dva ili više spojenih aromatskih prstenova. Većina ih je identificirana kao okolišni kontaminanti zbog svojih kancerogenih svojstava, a 16 vrsta je označeno kao onečišćenja koja se prioritetno kontroliraju. PAH nastaju prilikom nepotpunog izgaranja ili pirolize organskog materijala tijekom industrijske proizvodnje ili ljudskih aktivnosti. Ove hidrofobne komponente prisutne su u atmosferi u obliku plina ili vezanih čestica, što omogućava njihov transport na velike udaljenosti te taloženje u zemlji, sedimentu i bilju. Nakon taloženja, akumuliraju se u vegetaciji te konzumacijom mogu doprijeti u ljudski organizam i utjecati na zdravlje. Uobičajeno korišteni tradicionalni kineski biljni lijekovi podrazumijevaju uporabu različitih biljnih dijelova kao što su korijen, cvijet, sjemenka, list, stabljika i kora. Oni mogu biti onečišćeni PAH-ima, ne samo preko akumulacije iz zemlje, nego i tijekom termalnih procesa obrade u proizvodnom procesu.

Predstavljena metoda Zongyang Cui i sur. [58] uspješno je primijenjena pri određivanju PAH-a u 24 vrste tradicionalnog kineskog ljekovitog bilja, 5 uzoraka korijena, 3 uzorka stabljike, 3 uzorka lista i 3 uzorka kore. U svim analiziranim uzorcima bili su prisutni policiklički aromatski ugljikovodici u količinama od 21,1 µg/kg do 2236,3 µg/kg.

Kontaminanti također mogu biti otapala koja se koriste u nekim drugim industrijskim procesima pa preko vode za navodnjavanje ili za industrijske potrebe mogu naći put do biljnog materijala u različitim fazama rasta i procesiranja [58].

Potreba za praćenjem ostataka pesticida u biljnim lijekovima potaknula je razvoj analitičkih metoda za istovremeno određivanje velikog broja pesticida.

U studiji H. Tong i suradnika iz 2012. god. [59] razvijena je jednostavna, brza i selektivna GC/MS/MS metoda za određivanje većeg broja pesticida u komercijalnim kineskim biljnim lijekovima, a oni uključuju organoklorine, piretroid, karbamat i organofosforne pesticide. Metoda se zasniva na pripremi uzoraka primjenom ekstrakcije i pročišćavanja koji su prethodno optimizirani kako bi se dobila maksimalna učinkovitost uz minimalne troškove. Pri razvoju metode primijenjen je uzorak droge *Fructus Lycii* kao reprezentativni primjerak tradicionalnog kineskog biljnog lijeka, nakon čega su analizirana 132 uzorka kineskih biljnih lijekova kako bi se prikazala primjenjivost metode te dobila slika i istražila trenutna situacije vezana za kontaminiranost pesticidima u biljnom materijalu za ljekovite svrhe. Uzorci droge *Fructus Lycii* koji su sabrani s nekontaminiranog područja uzgoja kineskog ljekovitog bilja (tijekom uzgoja nisu korišteni pesticidi) primijenjeni su kao slijepi uzorak.

LOD razvijene metode za sve istražene pesticide kretali su se od 0,01 µg/kg do 3,6 µg/kg (ppb), a LOQ od 0,03 ppb do 11,88 ppb. Dobiveni rezultati pokazali su da su ostatci pesticida pronađeni u 74 uzorka, a kretali su se u rasponu od 0,5 ppb do 203,5 ppb [59].

U studiji koju su proveli N. Campillo, R. Penalver i M. Hernandez-Cordoba [60] razvijena je metoda za određivanje 10 različitih vrsta pesticida (organoklorina, organofosfornih sastojaka i piretrina) u biljkama i infuzima (biljnim čajevima). Metoda se temelji na kombinaciji SPME tehnike s plinskom kromatografijom spregnutom s AED (GC-AED).

Mnogo se biljnih vrsta konzumira širom svijeta u obliku infuza (biljnih čajeva), a biljni materijal koji se koristi za pripremu infuza mora biti podvrgnuti kontroli kakvoće, vezano na prisutnost pesticida primijenjenih pri kultivaciji biljaka kako bi se

minimizirao njihov mogući utjecaj na ljudsko zdravlje. Čaj je jedno od najpopularnijih svjetskih pića čiji dnevni unos u nekim državama doseže i 3 L po osobi, tako da neupitno može biti izvor znatnog izlaganja ljudi pesticidima. Neke su zemlje postavile vlastite maksimalne dozvoljene granice ostalih pesticida za čajeve i ostale biljke koje se konzumiraju u obliku infuza [60].

Pri provođenju analitike, uzeto je u obzir da se takve biljke ne konzumiraju izravno i da transfer komponenata iz krutog materijala u infuz nije potpun pa je fokus postavljen na analizu infuza, a ne na biljke korištene za njezin pripravak. Za takvu je svrhu plinska kromatografija prikladna tehnika, ali zbog niskih koncentracija koje je potrebno odrediti, komponente od značaja trebaju biti odvojene od matriksa i koncentrirane kako bi dosegle minimalnu razinu potrebnu za primijenjeni detektor. Taj korak koncentriranja, koji je nužan za dobivanje pouzdanih podataka, mora biti pažljivo optimiziran jer je istovremeno moguć izvor pogrešaka. SPME, LLE, SBSE (*stir bar sorptive extraction*) i SPME koriste se za separaciju i koncentriranje pesticida iz infuzijskih matrica. Bitni nedostatak SPE i LLE tehnike je korištenje organskih otapala i veći broj potrebnih koraka pri njihovoj provedbi. SPME je zato lako dostupna, jeftina alternativna metoda koja obuhvaća uzorkovanje, ekstrakciju, koncentriranje i pročišćavanje u jednom koraku, pri čemu je izbjegnuto korištenje organskih otapala. Budući da pesticidi gotovo uvijek sadrže heteroatome, prilikom izbora detektora zaključeno je da bi AED, koji je visoko selektivan detektor, bio zadovoljavajući izbor i na taj način postavio alternativu MS detektoru.

U spomenutoj su studiji [60] istovremeno određivane komponente triju različitih skupina: organoklorni i organofosforni pesticidi te piretrini. Analizirani su uzorci sljedećih čajeva: uzorci četiri tipa čaja vrste *Camellia sinensis* (bijeli, Oolong, zeleni i tip crnog čaja poznat kao Earl Grey), dva uzorka kamilice (*Matricaria chamomilla*) i dva

uzorka mirisne metvice (*Mentha pulegium* L.). Uzorci su pribavljeni u supermarketu, u obliku filter-vrećica i infuz svake vrste čaja pripremljen je isti dan umakanjem čajne vrećice (otprilike 1,5 g biljnog materijala) u 100 mL kipuće vode u trajanju od 3 min, kako bi se reproducirali uvjeti u kojima se biljni čajevi konzumiraju. Nakon toga je 7 mL tako dobivenog infuza (zajedno s određenim volumenom fosfatnog pufera) preneseno u SPME bočice. Za potrebe kvantifikacije monitorirani su heteroatomi klora i broma te su oba istovremeno detektirana unutar jedne GC analize (*run-a*). Analizirani su sljedeći pesticidi, uz navedene granice dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ) [60]:

Pesticid	Molekulska formula	LOD [mg/mL]	LOQ [mg/mL]
Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	0,04	0,12
Kaptan	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	/	/
Klorfenvinfos	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	1,08	3,81
Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	0,04	0,15
p,p'-DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	0,03	0,12
p,p'-DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	0,03	0,11
p,p'-DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	0,04	0,12
Bromopropilat	C ₁₇ H ₁₆ Br ₂ O ₃	0,05	0,18
Tetradifon	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S	0,06	0,19
Kumafos	C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS	1,95	6,49
Deltametrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	11,90	39,60

Kako osjetljivost svake pojedine komponente ne ovisi samo o broju prisutnih heteroatoma u molekulskoj formuli, nego u velikoj mjeri i o afinitetu komponente za vezanje na SPME vlakno, konačni rezultat za kaptan je pokazao da provedena procedura nije odgovarajuća za njegovo određivanje te u konačnici nije uzet u obzir.

Osam različitih uzoraka biljnih infuza analizirano je spomenutom metodom i u pet uzoraka nije detektiran niti jedan od analiziranih pesticida. U uzorku mirisne metvice detektirano je 0,9 ng/mL (0,9 ppb) p,p'-DDE-a, a u uzorcima bijelog čaja i kamilice

različite količine sedam vrsta analiziranih pesticida (aldrin, bromopropilat, tetradifon te *p,p*-DDT i njegovi metaboliti), u rasponu 0,2-0,8 ppb. Identitet ovih komponenata naknadno je potvrđen GC-MS analizom [60].

Dakle, identifikacija i kvantifikacija pesticida provodi se primjenom GC vezane s različitim vrstama detektora, kao što su FID, NPD, FPD i ECD. Iako je u posljednje vrijeme pojava novih, polarnijih vrsta pesticida potaknula primjenu analitičkih metoda temeljenih na tekućinskoj kromatografiji, i dalje su GC-MS ili GC/MS/MS najprimjenjivnije tehnike za višestruko određivanje pesticidnih ostataka [59].

Kod identifikacije biljnog materijala, moguće je primjenjivati ispitivanja koja se temelje na makroskopskim i mikroskopskim tehnikama te korištenju biljnih biljega (markera). No, korištenje biljega nije uvijek prikladno zbog nedostatka univerzalnih kemijskih komponenata i sinergijskog učinka između sastojaka. Kako bi se riješio ovaj problem, WHO je prihvatila *fingerprint* analize kao metodologiju u kontroli kakvoće biljnih materijala i proizvoda. *Fingerprint* se može definirati kao karakterističan profil koji prikazuje kompleksan sastav analiziranog uzorka, a moguće ga je dobiti primjenom spektroskopskih, kromatografskih ili elektroforetskih tehnika.

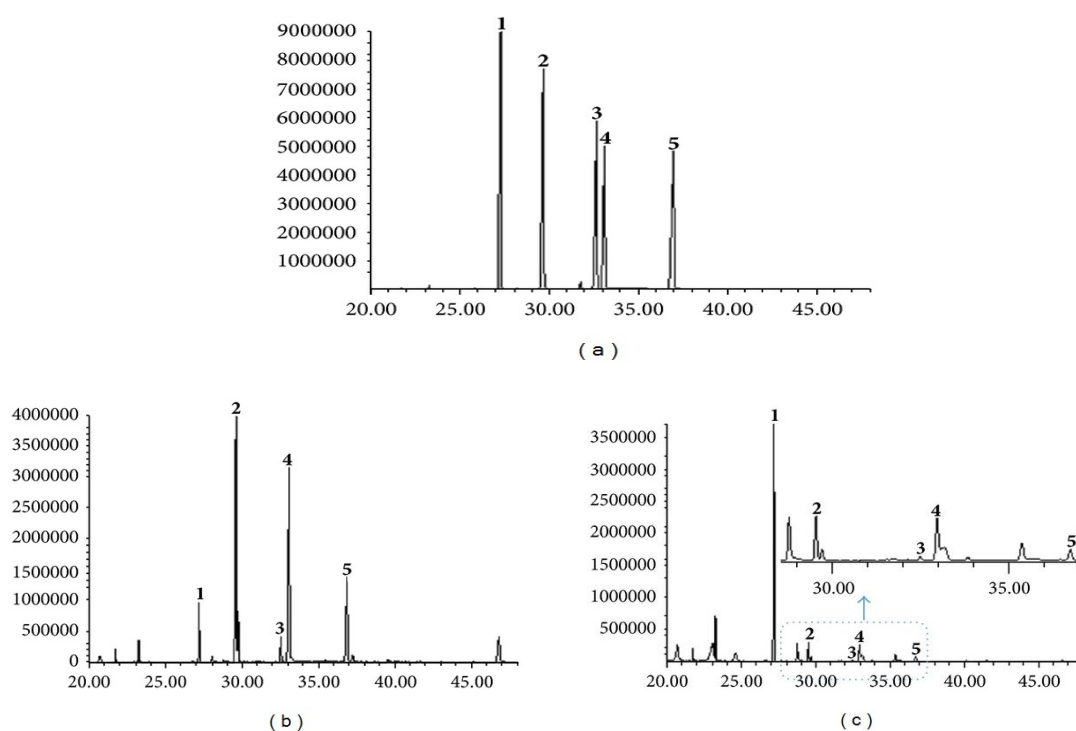
Biljni materijal može sadržavati do stotine različitih sastojaka. Iako je većina njih prisutna u malim količinama, mogu imati utjecaj na kvalitetu, sigurnost i učinkovitost biljnog proizvoda zbog toga što je njihov terapijski učinak uglavnom zasnovan na sinergijskom djelovanju većeg broja sastojaka. Kod procjene kompletnog biljnog sastava, kromatografija u kombinaciji s prikladnim detekcijskim tehnikama predstavlja moćan alat koji omogućava separaciju pojedinih komponenata i dobivanje karakterističnog profila uzorka, odnosno *fingerprinta* [61].

Jedan primjer primjene plinske kromatografije u tu svrhu je rad Y-G. Xia i suradnika [62]. U njemu je opisana metoda za procjenu kvalitete droge *Fructus Schisandrae*, primjenom GC uparene s MS detektorom. Dobiven je specifičan lignanski *fingerprint* i provedena kvantifikacija karakterističnih sastojaka.

Fructus Schisandrae, zreli plod biljke *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils i *S. chinensis* (Turcz.) (Schisandraceae) jedan je od najpoznatijih tradicionalnih kineskih lijekova i primjenjuje se tisućama godina. Od izdanja Kineske farmakopeje iz 2000. god., plod vrsta *S. sphenanthera* i *S. chinensis* prihvaćen je u obliku dviju različitih droga, "Nan-wuweizi" (*Fructus Schisandrae Sphenanthera*) i "Bei-wuweizi" (*Fructus Schisandrae Chinensis*). Wuweizi se koristi kao sedativ i tonik za tretiranje zdravstvenih tegoba, kao što su kronični kašalj i dispneja, enureza i spermatoreja, a može se koristiti i kao začim u prehrani. Mnogi ljekoviti pripravci koji sadrže Wuweizi ili njegov ekstrakt široko se primjenjuju u Kini, npr. kao Huguang tablete, Jiangtang pilule itd. Suvremena znanstvena istraživanja pokazala su da se većina farmakoloških djelovanja Wuwezija može pripisati njegovim dibenzociklooktadienskim lignanima za koje se pokazalo da imaju važnu ulogu u antioksidativnim, protuupalnim i antidepresivnim učincima, inhibiciji acetilkolinesteraze, stimulaciji ugljikohidratno-fosfornog metabolizma itd. Stoga je kvantitativna analiza lignana u drogi *Fructus Schisandrae* od velikog značenja za kontrolu njezine kvalitete.

Spomenuta metoda [62] primijenjena je za analizu 15 *Schisandra* uzoraka skupljenih u različitim regijama Kine. Njihov GC-MS *fingerprint* pokazao je sličan lignanski profil. Temeljitom analizom dobivenih *fingerprinta*, pet je pikova odabrano kao karakteristični pikovi koji će se koristiti pri identifikaciji krute droge koja potječe od vrsta *S. chinensis* i *S. sphenanthera*. Navedeni su pikovi identificirani primjenom GC-MS metode.

Radi se o biološki aktivnim komponentama schisandrinima A–C (**1–3**) i schizandrolima A i B (**4** i **5**) te su oni potom, uz primjenu standarda, i kvantificirani. Njihova relativna vremena zadržavanja u *fingerprintu* pokazala su se kao važan parametar pri identifikaciji *Schisandra* uzoraka. Također su se relativne površine njihovih pikova pokazale kao mogući parametar međusobnog razlikovanja vrsta *S. chinensis* i *S. sphenanthera* (Slika 22).



Slika 22. Tipični GC-MS *fingerprint* kromatogrami: a) smjesa standarda b) *S. chinensis* c) *S. sphenanthera*; preuzeto iz [62].

Dakle, razvijena GC-MS metoda primijenjena je za određivanje navedenih 5 komponenata u 15 uzoraka vrsta roda *Schisandra*, prikupljenih iz različitih izvora i različitog geografskog podrijetla. Dobiveni rezultati pokazali su velike razlike u sadržaju sastavnica koje mogu biti posljedica varijabilnosti među vrstama, razlike u podrijetlu biljaka, periodu prikupljanja biljnog materijala, uvjetima čuvanja itd., što ide u prilog činjenici da su plodovi vrsta *S. sphenanthera* i *S. chinensis* svrstani u različite droge prema Kineskoj farmakopeji [62].

Kao što je vidljivo iz predstavljenih radova, plinska kromatografija ima široku primjenu pri analizi biljnih uzoraka. Osim kod određivanja onečišćenja, kao što su pesticidi i organska otapala, koristi se i za identifikaciju biljnog materijala. Zbog utjecaja različitih okolišnih čimbenika, biljni materijal predstavlja vrlo kompleksne analitičke uzorke koji mogu znatno varirati u svom sastavu. Posljedično tome, za identifikaciju biljnih komponenata nije dovoljan samo plinski kromatograf uparen s jednostavnim detektorima, nego dodatni detektorski sustavi koji omogućavaju prepoznavanje pojedinih komponenata tako kompleksnog uzorka. Zbog svega navedenog, analize biljnih materijala dobar su pokazatelj značaja plinske kromatografije spregnute s masenim detektorom (GC-MS), kao vrlo kvalitetnog alata u identifikaciji, karakterizaciji i kontroli kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka.

5. ZAKLJUČAK

Plinska kromatografija (GC) analitička je tehnika s dugogodišnjom zastupljenošću u farmaceutskoj analizi. No, razvojem drugih analitičkih tehnika i metoda, posebice tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), čije su značajke pogodnije za analizu farmaceutika, važnost GC u farmaceutskoj analizi znatno opada. Posljedično tome, pregledom relevantne literature vezane uz spregnute analitičke tehnike, moguće je vidjeti da se primjena GC većinom svodi na uparivanje s masenim detektorom (MSD), dok se HPLC spreže s nizom različitih detektora. Nadalje, primjena kompleksnih spregnutih tehnika uglavnom se provodi u istraživačke svrhe, dok su analize u kontroli kvalitete (QC) rutinske i podrazumijevaju znatno jednostavnije analize koje obuhvaćaju određivanje unaprijed poznatih i očekivanih tvari.

Pregledom odabranih literaturnih primjera iz područja plinske kromatografije, vidljivo je da se njezin razvoj usmjerio na nekoliko ciljeva: povećanje osjetljivosti i smanjenje vremena trajanja analize, potom na pojednostavljenje pripreme uzorka, automatizaciju i smanjenje sveukupnog troška analize.

Pri rutinskim analizama u laboratorijima za kontrolu kakvoće, tehnike kao mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME) ili korištenje ionskih tekućina, nemaju široku primjenu unatoč svojim prednostima, čemu je vjerojatno razlog njihova cijena. Pojavom kapilarnih kolona s različitim stacionarnim fazama i velikom moći odjeljivanja, kao i povećanjem osjetljivosti detektora, postignut je optimalan odnos između izvedbe analize i njezine cijene.

GC nema široku primjenu u identifikaciji onečišćenja djelatne tvari. Razlog tome je njezina nepogodnost za analizu polarnih i termolabilnih tvari, a što je često njihova karakteristika. No, pogodna je tehnika za analizu hlapljivih onečišćenja koja se pojavljuju u farmaceutskim sirovinama i poluproizvodima. Kada je riječ o spregnutoj plinskoj kromatografiji, GC-MS je uvjerljivo najčešće korišteni sustav.

Kod kompleksnijih slučajeva, gdje jedna tehnika nije dovoljna za identifikaciju, GC spregnuta s drugim vrstama detektora (npr. GC-AES i GC-NMR) može poslužiti za uspješno rješavanje analitičkih problema.

Plinska kromatografija ima znatnu primjenu i pri analizi biljnih uzoraka. Osim kod određivanja onečišćenja (npr. pesticidi i organska otapala), koristi se i u identifikaciji biljnog materijala. Budući da je biljni materijal varijabilan i kao takav predstavlja vrlo složene analitičke uzorke koji mogu znatno varirati svojim sastavom i sadržajem, GC-MS sustav može poslužiti kao vrlo kvalitetan alat u identifikaciji, karakterizaciji i kontroli kakvoće raznovrsnog biljnog materijala.

Iz svega navedenog može se zaključiti da GC i njezine spregnute tehnike imaju svoje mjesto, značaj i smisao daljnjeg razvoja u suvremenoj analitici i kontroli kakvoće farmaceutskih tvari i proizvoda, kao i kompleksnih biljnih uzoraka.

6. LITERATURA

- [1] Kar A. Pharmaceutical drug analysis. New Age International; 2005, str. 3.
- [2] Siddiqui R, Allothman ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. Arabian Journal of Chemistry, 2017;10:S1410,S1412.
- [3] Hanseg S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. A John Wiley & Sons; 2012, str. 9-10, 208.
- [4] Görög S. The changing face of pharmaceutical analysis. Trends in Analytical Chemistry, 2007;26:12-13.
- [5] Sandra P, David F, Szücs R. Some applications of state-of-art cappilary gas chromatography in the pharmaceutical industry. TrAC Trends in analytical chemistry, 2002;21:662.
- [6] Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2009; str. 204,207,213, 215-218.
- [7] European Pharmacopoeia 9.5. Online. 2018. General chapters: 2.2.46., 2.4.24., 2.4.22., 2.4.23., 2.2.28. Dostupno na: <http://online6.edqm.eu/ep900/>
- [8] Chromacademi. Theory and Instrumentation of GC, 2014.; str. 3-6,8-9,14,19.
Dostupno na:
<http://www.chromacademy.com/lms/sco10/Theory and Instrumentation Of GC Introduction.pdf>
- [9] Rood D. The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2007, 4. izd., str. 3-6.
- [10] Patel KN, Patel JK, Patel MP, Rajput GC, Patel HA. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. Pharmaceutical Methods, 2010;1:2-3.
- [11] Wilson ID, Th Brinkman UA. Hyphenation and hypernation: The practice and prospects of multiple hyphenation. Journal of Chromatography A, 2003;1000:1.

- [12] Mohd MA. Advanced gas chromatography – progress in agricultural, biomedical and industrial applications. InTech; 2012, str. 93.
- [13] Phalke P, Kadave S. Review on Hyphenated Techniques. International Journal of Chemical Studies, 2013;1:158.
- [14] Berger TA. Separation of a gasoline on an open tubular column with 1.3 milion effective plates. Chromatographia, 1996;42:63-71.
- [15] Watson DG. Pharmaceutical analysis – a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Churchill Livingstone Elsevier, 2012, 3. izd. str. 266.
- [16] McNair H.M., Miller JM. Basic gas chromatography. A John Wiley & Sons; 2009, 2. izd. str. 11.
- [17] Grob R.L, Barry E.F. Modern practise of gas chromatography. A John Wiley & Sons; 2004, 4. izd. str. 27,37.
- [18] Liu W. J. H. Traditional Herbal Medicine Research Methods – Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies. A John Wiley & Sons; 2011, str. 1, 3,24,69-70,392,402,422-423.
- [19] Joshi DD. Herbal Drugs and Fingerprints Evidence Based Herbal, Springer India; 2012, str. 83-85.
- [20] Liang Y-Z, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. Journal of Chromatography B, 2004;812:57.
- [21] United States Pharmacopoeia. General Chapters <467>,<469>,<563>,<401>,<415>. 2016.
Dostupno na: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>
- [22] Görög S. The paradigm shifting role of chromatographic methods in pharmaceutical analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012; 69:3-4.

- [23] Beesley TE, Buglio B, Scott RPW. Quantitative chromatographic analysis. Marcel Dekker, Inc; 2001, str. 1.
- [24] Kushwaha P. Organic volatile impurities: A regulatory overview. Asian Journal of pharmaceutical sciences and research, 2011;1:1-2,8.
- [25] Tankiewicz M, Namieśnik J, Sawicki W. Analytical procedures for the quality control of pharmaceuticals in terms of residual solvents content – challenges and recent developments. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016;80:330-331 .
- [26] International council for harmonization of technical requirements for pharmaceutical for human use. ICH Harmonized Guideline, Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R6). 2016, step 4 version. Dostupno na:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C_R6_Step_4.pdf
- [27] Hu C, Liu Y. Quality control of pharmaceuticals, residual solvents testing and analysis. Wide Spectra of Quality Control. IntechOpen; 2011, str. 183.
- [28] Haky JE, Stickney TM. Automated gas chromatographic method for the determination of residual solvents in bulk pharmaceuticals. Journal of Chromatography, 1985;321:137-144.
- [29] Guimbard JP, Person M, Vergnaud JP. Determination of residual solvents in pharmaceutical products by gas chromatography coupled to a head-space injection system and using an external standard. Journal of Chromatography, 1987;403:109-121.
- [30] Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fiber. Analytical Chemistry, 1990;62:2145-2148.
- [31] Vas G, Vékey K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. Journal of Mass Spectrometry, 2004;39:233.

- [32] Legrand S, Dugay J, Vial J. Use of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for the determination of residual solvents in pharmaceutical products. *Journal of Chromatography A*, 2003;999:195-196.
- [33] Yu Y, Chen B, Shen C i sur. Multiple headspace single-drop microextraction coupled with gas chromatography for direct determination of residual solvents in solid drug product. *Journal of Chromatography A*, 2010;1217:5158-5164.
- [34] Rocheleau M-J, Titley M, Bolduc J. Measuring residual solvents in pharmaceutical samples using fast gas chromatography techniques. *Journal of Chromatography A*, 2004;805:77-86.
- [35] Chen TK, Philips JG, Durr W. Analysis of residual solvents by fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A*; 1998;811:145-150.
- [36] Laus G, Andre M, Bentivoglio G, Schottenberger H. Ionic liquids as superior solvents for headspace gas cromatography of residual solvents with very low vapor pressure, relevant for pharmaceutical final dosage forms. *Journal of Chromatography A*, 2009; 1216:6020-6023.
- [37] Ho TD, Yehl PM, Chetwyn NP, Wang J, Anderson JL, Zhong Q. Determination of trace level genotoxic impurities in small moleculdrug substances using conventional headspace gas chromatography with contemporary ionic liquid diluents and electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 2014;1362:217-228.
- [38] Nacham O, Ho TD, Anderson JL, Webster GK. Use of ionic liquids as headspace gas chromatography diluents for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017;145:880-881,883-884.
- [39] Chaturvedi KK, Nanda RK. Hyphenated gas chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2010;5:18.
- [40] 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012; 69:149,154-155.
- [41] Pan C, Liu F, Ji Q, Wang W, Drinkwater D, Vivilecchia R. The use of LC/MS, GC/MS, and LC/NMR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006;40:581-590.
- [42] Zhang C, Huang L, Wu Z, Chang C, Yang Z. Determination of sulfonate ester genotoxic impurities in imatinib mesylate by gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2016;39:148-173.
- [43] Li W. Trace analysis of residual methyl methansulfonate, ethyl metansulfonate and isopropyl methansulfonate in pharmaceuticals by capillary gas chromatography with flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*, 2004;1046:297-301.
- [44] Gudat AE, Firor RL. The determination of extractables and leachables in pharmaceutical packaging materials using headspace GC/MS. Agilent Technologies Application Note, 2006.
Dostupno na: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-5494EN.pdf>
- [45] Pan C, Liu E, Motto M. Identification of Pharmaceutical Impurities in Formulated Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2011;4:1228-1259.
- [46] Laniewski K, Wännman T, Hagman G. Gas chromatography with mass spectrometric, atomic emission and Fourier transform infrared spectroscopic detection as complementary analytical techniques for the identification of unknown impurities in pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, 2003;985:275-282.
- [47] Laniewski K, Vågerö M, Forsberg E, Forngren T, Hagman G. Complementary use of gas chromatography–mass spectrometry, gas chromatography–atomic emission detection and nuclear magnetic resonance for identification of pharmaceutically related impurities of unknown structures. *Journal of Chromatography A*, 2004;1027:93-102.

- [48] World Health Organization. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. 2007, str. 5.
Dostupno na: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14878e/s14878e.pdf>
- [49] European Medicines Agency. Guideline on quality of combination herbal products/traditional herbal medicinal products. 2011, str. 8. Dostupno na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113209.pdf
- [50] Zakon o lijekovima (Narodne novine br. 76/13). Dostupno na:
https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2013_06_76_1521.html
- [51] Janeković Petras K. Kemijski fingerprint u identifikaciji i kontroli kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka, specijalistički rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 2017, str. 3-4.
- [52] Wang M, Zhao J, Avula B i sur. High-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for Characterization and Quantitative Analysis of Ginkgolic Acids in Ginkgo biloba Plants, Extracts, and Dietary Supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014; 62:12103-12105.
- [53] Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Golden Marketing – Tehnička Knjiga Zagreb; 2005, str. 423-424.
- [54] Bakrač Posavec K. Analiza temeljena na biljezima, specijalistički rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 2013, str. 13.
- [55] Kanthal LK, Dey A, Satyavathi K, Bhojaraju P. GC-MS analysis of bio-active compounds in methanolic extract of Lactuca runcinata DC. Pharmacognosy Research, 2014;6:58-61.

- [56] Ghosh G, Panda P, Rath M, Pal A, Sharma T, Das D. GC-MS analysis of bioactive compounds in the methanol extract of *Clerodendrum viscosum* leaves. *Pharmacognosy Research*, 2015;7:110-113.
- [57] European Medicines Agency. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products, 2011. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113210.pdf
- [58] Cui Z, Ge N, Zhang A, Liu Y, Zhang J, Cao Y. Comprehensive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese herbal medicines by solid phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015;407:1989-1991.
- [59] Tong H, Tong Y, Xue J, Liu D, Wu X. Multi-residual Pesticide Monitoring in Commercial Chinese Herbal Medicines by Gas Chromatography–Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 2014;7:136.
- [60] Campillo N, Penalver R, Hernandez-Cordoba M. Pesticide analysis in herbal infusions by solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta*, 2007;71:1417-1418.
- [61] Joshi DD. *Herbal Drugs and Fingerprints Evidence Based Herbal*. Springer India; 2012, str. 35.
- [62] Xia YG, Yang BY, Liang J, Yang Q, Wang D, Kuang HX. Quantitative Analysis and Fingerprint Profiles for Quality Control of *Fructus Schisandrae* by Gas Chromatography: Mass Spectrometry. *The Scientific World Journal*, 2014;2014:1-2.