Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za analizu pirfenidona u hrani HPLC-DAD-MS metodom

Švarc, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:060029

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Martina Švarc

Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za analizu pirfenidona u hrani HPLC-DAD-MS metodom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016. g.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. sc. Mirandi Sertić
na pomoći i trudu koji mi je pružila tokom izrade ovog rada.
Zahvaljujem se svojim roditeljima koji su mi bili velika podrška
tokom studiranja i što su mi omogućili školovanje.

1. UVOD 1
1.1. EKSTRAKCIJA 1
1.2. PIRFENIDON 4
1.3. ODREĐIVANJE LIJEKA U HRANI 5
1.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI SA DETEKTOROM NIZA DIODA I MASENIM SPEKTROMETROM 7
2. OBRAZLOŽENJE TEME 10
3. MATERIJALI I METODE 11
3.1. Materijali 11
3.1.1. Kemikalije 11
3.1.2. Radni instrumenti 11
3.1.3. Pribor 12
3.1.4. Programski paketi 12
3.2. Metode 12
3.2.1. Priprema pokretne faze 12
3.2.2. Priprema standardnih otopina 13
3.2.3. Priprema ispitivanog uzorka 13
3.2.4. Kromatografski uvjeti 13
3.2.5. Uvjeti za masenu spektrometriju 14
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
4.1. Ispitivanje linearnosti kromatografske metode 15
4.2. Optimizacija vremena eluacije analita 16
4.3. Optimizacija vremena ultrazvučne ekstrakcije 18
4.4. Identifikacija i kvantifikacija analita u hrani za štakore 20
5.ZAKLJUČAK 25
6.LITERATURA 26
7.SAŽETAK/SUMMARY 28
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

1. UVOD

1.1. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima (Kovač, 2000). Smjesa koja se odjeljuje obrađuje se otapalom da bi se iz nje izdvojila lakše topiva komponenta. Tvar koja se iz smjese tvari odjeljuje ekstrakcijom prelazi u otopinu.
Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini uzorka izloženoj otapalu, viskoznosti otapala i volumnom protoku otapala. Veći protok otapala smanjuje granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestica i time povećava brzinu ekstrakcije.

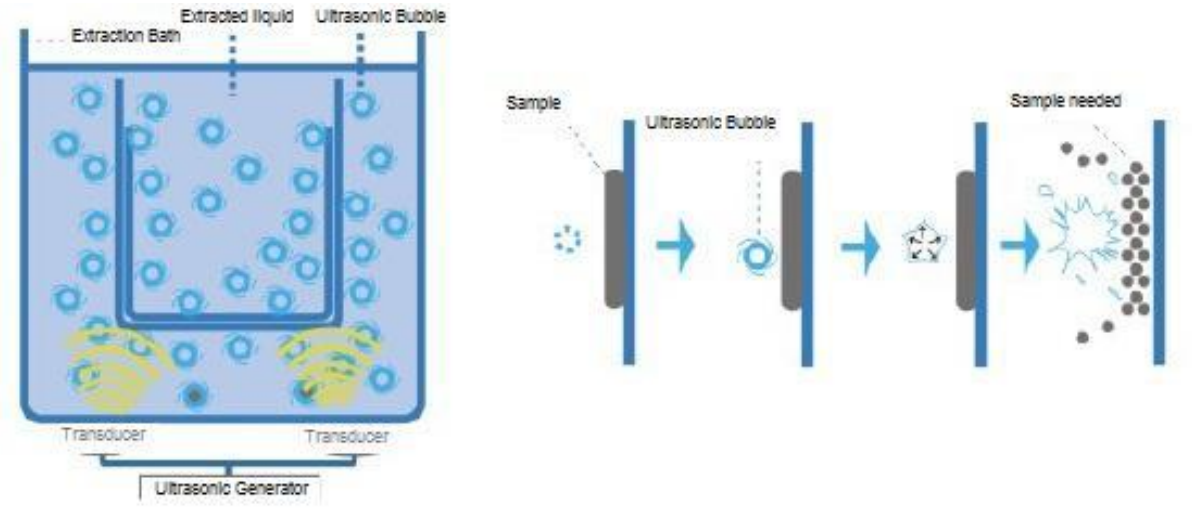
Pogodno je provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama zbog ubrzavanja procesa ekstrakcije, jer dolazi do povećanja brzine otapanja komponente, kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala. Ipak, temperature rijetko prelaze 100 ºC jer tada uglavnom dolazi do oštećenja željene supstance ili ekstrakcije nepoželjnih tvari. Budući da je brzina prijenosa mase direktno proporcionalna površini uzorka, to se prije ekstrakcije uzorak usitnjava do određenog stupnja i homogenizira.

Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. Prilikom izbora potrebno je uzeti u obzir niz čimbenika: polarnost, točku vrelišta koja treba biti što niža da olakša odvajanje otapala od komponente, reaktivnost pri čemu otapalo ne smije reagirati sa ekstraktom niti se smije razgrađivati, viskoznost otapala koja mora biti dovoljno niska da otapalo može lako prijeći sloj krutih čestica, stabilnost otapala na toplinu, kisik i svijetlo, sigurnost pri upotrebi, po mogućnosti nezapaljivo, neškodljivo za tehničara i konzumenta te prilikom odlaganja ne smije ugrožavati okoliš, mora biti dostupno u dovoljnim količinama i cijenom što jeftinije.

Razlikujemo nekoliko vrsta ekstrakcija ovisno o agregatnom stanju uzorka. Za tekuće uzorke tekućinsko- tekućinsku, čvrsto faznu, ultrazvučnu ekstrakciju, čvrsto faznu mikroekstrakciju, te druge vrste mikroekstrakcija kao što su Stir-Barova sorptivna, tekućinsko- čvrsta, membranska i mikroekstrakcija u pakiranim injekcijama. Za čvrste uzorke razlikujemo

Soxhlet, tlačno tekućinsku, mikrovalovima potpomognutu, matriks čvrsto faznu dispreziju i superkritični fluid ekstrakciju (Dean, 2009).

Ultrazvučna ekstrakcija omogućuje uklanjanje analita iz čvrstog permeabilnog uzorka pomoću otapala u koje je uvedena ultrazvučna energija frekvencije koja nije primjerena ljudskom uhu. Energija je uvedena u uzorak pomoću ultrazvučne sonde ili pomoću ultrazvučne kade u kojoj su uronjeni uzorak i otapalo. Ultrazvučna energija je toliko jaka da može pokidati i pulverizirati uzorak što povećava ekstrakciju analita (http://onlinelibrary.wiley.com/). Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacije na stanični materijal, točnije stanične stijenke, omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te također povećava prijenos mase. Uslijed pucanja staničnih stijenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice. Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena efikasnost. Mehanizam ultrazvučne ekstrakcije prikazan je na Slici 1. Industrijska važnost primjene ultrazvukom potpomognute ekstrakcije u tehnologiji prerade hrane jest od interesa u smislu povećanja ekstrakcije komponenti iz biljnog i životinjskog materijala (Drmić i Režek, 2010).



Slika 1. Prikaz mehanizma ultrazvučne ekstrakcije (www.renetech.com). Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacije na stanični materijal, točnije stanične stijenke, omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te također povećava prijenos mase. Uslijed pucanja staničnih stijenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice. Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena efikasnost.

Jedna od novijih metoda ekstrakcije i pripreme uzoraka jest QuEChERS (engl. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe, QUECHERS). Ta metoda je brza, jednostavna, jeftina,

učinkovita i sigurna. Koristi se za pripremu, ukoncentriravanje i pročišćavanje uzoraka, najčešće za analizu pesticida u uzorcima hrane. Metoda kombinira nekoliko koraka pripreme uzorka koji uključuju dodatak otapala i bezvodnih soli te vortex i centrifugu. Ovisno o vrsti uzorka, odnosno trebaju li se ekstrakcijom iz uzorka ukloniti masnoće, proteini, pigmenti ili drugi interferirajući matriks, postoji više shema prema kojima se ekstrakcija provodi. U odnosu na klasične metode ekstrakcije kao što su tekućinsko tekućinska (engl. *Liquid-liquid Extraction*, LLE) i čvrsto fazna ekstrakcija (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), QuEChERS-om se mogu ekstrahirati puno veće količine analita. Za razliku od SPE koja zahtjeva više metoda za različite klase komponenata, QuEChERS se može koristiti za ekstrakciju više od 250 komponenata odjednom. Koristi se i za ekstrakciju lijekova iz krvi, najčešće antibiotika kinolona i sulfonamida te razne ekstrakcije drugih tvari iz hrane i bioloških tekućina. Prednosti su kraće vrijeme analize, nije potrebna predobrada uzorka, koristi manje volumene otapala i ne koristi skupu aparaturu (http://www.agilent.com/cs/library/posters/public/Modified_QuEChERS_Approach_Isolation_Determination_Drugs_in_Food_LCMSMS_Pittcon2010.pdf).

Oprema za QuEChERS sastoji se od soli u bezvodnom obliku, QuEChERS tuba i otapala za čvrsto faznu ekstrakciju (Slika 2). Sol se dodaje uzorku nakon dodatka otapala s ciljem da ne dođe do egzotermne reakcije pri direktnom dodatku soli uzorku. Dodavanje otapala i soli omogućuje da se analit ekstrahira u organskom sloju. Otapalo uklanja matriks od uzorka te olakšava proteinsku precipitaciju. Sorbenti i soli se stavljaju u 50 i 15 mililitarske tube za homogenizaciju koje omogućuju uštedu vremena, visoke reproducibilne ekstrakcije, smanjenje varijacije u tehničarima te povećanje produktivnosti. QuEChERS-om obrađeni i dobiveni ekstrakti se mogu analizirati plinskom i tekućinskom kromatografijom (www.dtoservizi.it).



Slika 2. QuEChERS oprema sastoji se od tuba, soli u bezvodnom obliku i otapala za čvrsto faznu ekstrakciju.

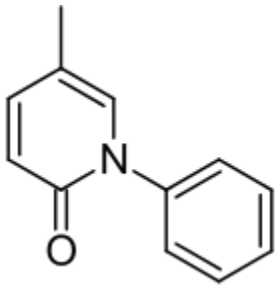
1.2. PIRFENIDON

Pirfenidon je mala, sintetska, ne-peptidna molekula koja pokazuje antifibrozne značajke u različitim in vitro i životinjskim modelima. Kemijsko ime je 5-metil-1-fenil-2-piridinon, a struktura je prikazana na Slici 3.

Pirfenidon se primjenjuje u terapiji idiopatske plućne fibroze, rijetke i fatalne bolesti pluća. Karakteriziraju ju kontinuirano stvaranje tvrdog fibroznog tkiva što uzrokuje tvrdokoran kašalj, učestale infekcije pluća i teške oblike zadihanosti. Uzrok bolesti nije poznat, zbog čega se i zove „idiopatska“. Pirfenidon smanjuje akumulaciju kolagena u plućima i odgađa progresiju plućne fibroze.

Kao modeli za ispitivanje pirfenidona koriste se hrčci i miševi, a nekoliko observacijskih i randomiziranih kontroliranih studija na pacijentima sa cističnom fibrozom su osigurale početne dokaze terapijske učinkovitosti. Povećan je životni vijek i prevenirane su akutne egzacerbacije idiopatske plućne fibroze. Unatoč tomu, malo je podataka o farmakokinetici pirfenidona u ljudima.

Pirfenidon se uzima oralnim putem, a tri glavna metabolita su 5- karboksi pirfenidon, 5-hidroksi metil pirfenidon i 4'-hidroksi pirfenidon. Kada se uzima sa hranom smanjeni su štetni gastrointestinalni učinci pirfenidona, ali je smanjena i koncentracija u plazmi (Ambrose i sur., 2009).



Slika 3. Struktura pirfenidona

Postoje razlike u vremenu i osjetljivosti analize prilikom analize pirfenidona tekućinskom kromatografijom (engl. *Liquid chromatography,* LC) , tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography,* UPLC) i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography,* HPLC). Kod analize pirfenidona primjenom tekućinsko-tekućinske ekstrakcije i LC sa UV detekcijom, osjetljivost je 50 ng/ml, a vrijeme analize 10 min (Fandian i sur., 2009). Analiza pirfenidona primjenom UPLC tehnike spregnute s masenom spektrometrijom bila je vrlo kratka (vrijeme analize 3 min), a osjetljivost je iznosila 5 ng/ml. U toj analizi prethodno je napravljena proteinska precipitacija s ciljem uklanjanja proteina iz uzorka, odnosno smanjenja vremena pripreme uzorka. Dodatkom otapala koje se miješa s vodom, acetonitrila te centrifugiranjem proteini su istaloženi (Chen i sur., 2015). Iz ova dva primjera jasno su vidljivi uobičajeni nedostaci LC metode pred UPLC-om, duže vrijeme analize, potrebni veliki volumeni uzorka plazme, vrijeme eluacije gradijenta te slabija osjetljivost. Analizom pirfenidona HPLC-om vrijeme analize bilo je 4 minute a osjetljivost 5 µg/ml (Desai i sur., 2014). S druge strane, nedostatak UPLC tehnike je visoka cijena što ju čini nedostupnom.

1.3. ODREĐIVANJE LIJEKA U HRANI

U nekliničkim istraživanjima lijek se ispituje na životinjama. Pri tome životinje lijek dobivaju u hrani stoga je važno razviti najučinkovitiju metodu za ekstrakciju i za određivanje lijeka u hrani. Određivanje lijeka u hrani također je bitno da bi se ispitalo dolazi li do promjene u strukturi lijeka pri reakciji sa hranom te može li hrana utjecati na maksimalnu koncentraciju lijeka u plazmi i na vrijeme potrebno za njeno postizanje (http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM126833.pdf).

Pri određivanju lijeka u hrani iznimno je važna osjetljivost, selektivnost, točnost i preciznost metode. Lijek u hrani se može odrediti biokemijskim i separacijskim tehnikama. Jedna od biokemijskih metoda je imunoenzimski test (engl. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay,* ELISA). Temelji se na reakciji antigen (iz uzorka)-antitijelo na kojega je vezan enzim koji dodatkom supstrata uzrokuje promjenu boje supstrata. Zatim se boja mjeri spektrofotometrijski s ciljem kvantitativnog određivanja analita. Ova metoda omogućuje određivanje niskih koncentracija analita uz relativno jednostavnu pripremu uzorka te ne zahtjeva zahtjevnu i skupu opremu poput kromatografskih tehnika.

Sljedeća metoda je metoda biosenzora, analitičkih uređaja koji se sastoje od osjetljivog biološkog elementa, bioreceptora, sonde ili elementa za detekciju i uređaja za čitanje elektronskih signala. Pri otkrivanju željenog analita (biološkog ili kemijskog) dolazi do nastanka kompleksa s bioreceptorom po principu antitijelo-antigen, enzim-supstrat odnosno receptor-ligand. Za analizu prehrambenih proizvoda često se koriste optički biosenzori koji imaju sposobnost detekcije vezanja biomolekula u nekoliko sekundi ili minuta. Upotrebljavaju se za utvrđivanje prisutnosti antibiotika u mlijeku.

Jedna od separacijskih metoda je zahtjevna i skupa tekućinska kromatografija. Tom metodom se razdvajaju tvari na temelju razdiobe između dvije faze sustava, a zatim se spektrometrom masa može ciljano pristupiti analizi te detektirati i identificirati različite spojeve u namirnici. Primjenjuje se za odjeljivanje organskih kiselina, vitamina, aminokiselina, šećera, aditiva, mikotoksina, pesticida, antibiotika, lipida, proteina i pigmenata.

Plinska kromatografija se koristi za određivanje ljekovitih tvari koje su hlapljive, ima veću moć odjeljivanja nego HPLC kada se koriste kapilarne kolone i mobilna faza je jeftinija u usporedbi sa organskim otapalima. Nedostatak je što može analizirati samo termostabilne i hlapljive tvari te se mogu injektirati vrlo mali volumeni uzorka što otežava njegovu kvantitativnu primjenu. Najčešće se koristi za određivanje hlapljivih i termostabilnih sastojaka hrane i kontaminanata (Butorac i sur., 2013).

1.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI SA DETEKTOROM NIZA DIODA I MASENIM SPEKTROMETROM

Kromatografske metode služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u složenim smjesama.

HPLC je metoda za analizu analita koja se temelji na prolasku mobilne faze pod tlakom kroz kolonu punjenu česticama stacionarne faze pri čemu mobilna faza nosi sastavnice uzorka. Mehanizam odjeljivanja sastavnica uzorka ovisi o polarnosti ispitivanog analita (Nigović, 2014). Pirfenidon kao iznimno lipofilna, nepolarna molekula zahtjeva razdiobu kao mehanizam odjeljivanja. Na odjeljivanje pirfenidona osim njegove polarnosti utječe i polarnost mobilne (sastav i pH mobilne faze, udio organskog otapala i vode, odnosno vodene otopine pufera) te polarnost stacionarne faze (odabir odgovarajuće kromatografske kolone).

Tekućinski kromatograf se sastoji od spremnika mobilne faze, sustava za obradu otapala jer u mobilnoj fazi ne smije biti otopljenih plinova, crpke koja omogućuje visoke tlakove do 400 bara (noviji sustavi poput UPLC-a omogućuju puno veće tlakove), sustava za unošenje uzorka, kolone te detektora (Slika 4).
Iz strukture analita moguće je pretpostaviti koji će sastojak smjese prvi eluirati. Kod najčešće korištene kromatografije obrnutih faza, gdje je stacionarna faza nepolarna, najpolarniji sastojak će eluirati prvi jer će se najmanje zadržavati na koloni. U kromatografiji obrnutih faza stacionarna faza je najčešće oktilsilil i oktadecilsilil silikagel (npr. kolone C8 i C18). Mobilna faza je polarna (smjesa vode i aceonitrila ili metanola) te često sadrži i pufer jer organsko otapalo potiskuje ionizaciju kiseline. Ako je pH ispod pKa vrijednosti ispitivanog spoja, a on ima kisele značajke, spoj će pri vrijednosti pH<pKa biti neioniziran te će se dulje zadržavati na nepolarnoj stacionarnoj fazi (Turkalj, 2015). Jedno od ograničenja HPLC metode je potrošnja velike količine organskih otapala.

Sastav mobilne faze tijekom analize može se ne mijenjati pa govorimo o izokratnoj eluaciji. No vrlo često se koristi gradijentna eluacija, odnosno sastav mobilne faze tijekom analize se mijenja kako bi se u što kraćem vremenu osiguralo potpuno razdvajanje svih analita. Temperatura također utječe na vrijeme zadržavanja tako da se povećanjem temperature vrijeme zadržavanja analita skraćuje.

Nakon odjeljivanja na kromatografskoj koloni analit se detektira primjenom različitih detektora, detektora niza dioda (engl. *Diode array UV detector* DAD), elektrokemijskog detektora (engl. *Electron Captured Detector* ECD), fluorescencijskog detektora (engl. *Fluorescence detector* FC), detektora rasipanja svjetlosti uparivačem (engl. *Evaporative light-scattering detector* ELSD) i masenog detektora (engl. *Mass spectrometry* MS). U ovom diplomskom radu korišten je DAD detektor. Prolaskom kroz njega uzorku se izmjeri apsorbancija te uzorak ostaje nepromijenjen.

Nakon detekcije, masenim spektrometrom se odredi molekulska masa molekule analita ili bilo kojeg fragmenta te molekule koji je nastao njenim cijepanjem. Spektrometar masa se sastoji od ionizatora, analizatora masa i detektora. Metoda se temelji na ioniziranju molekula u visokom vakuumu pri čemu se ioni stvaraju u plinovitoj fazi, a potom se pomoću električnog ili magnetskog polja razdvajaju prema masi.

Ionizacija molekula provodi se djelovanjem snopa elektrona (engl. *Electron impact*, EI), kemijskom ionizacijom (engl. *Chemical ionization,* CI), elektrosprej ionizacijom (engl. *Electrospray ionization,* ESI), kemijskom ionizacijom kod atmosferskog tlaka (engl. *Atmospheric- pressure chemical ionisation,* APCI) ili matriksom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (engl. *Matrix- assisted laser desorption ionization,* MALDI). Najčešće se koristi ESI pri čemu uzorak iz kolone prolazi kroz usku kapilaru na čijem kraju djeluje visoki potencijal te se uzorak raspršti djelovanjem atmosferskog tlaka. Strujanjem dušika otapalo se otpari, a kapljica dobiva sve veći broj analita koji su ionizirani (Nigović, 2014). Ionizacijom se proton akceptori prevode u kationski oblik, a proton donori u anionski. Moguće je dobiti jednostruko ili višestruko nabijene ione, ovisno o broju skupina na molekuli koje se mogu ionizirati. Prilikom ionizacije može doći do fragmentacije molekule ukoliko je ta opcija na instrumentu uključena. Tada se pomoću helija molekula fragmentira kako bi se lakše razjasnila struktura molekule.

Tako ionizirani analiti se razdvoje u analizatoru koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja. Postoje različiti tipovi analizatora koji se razlikuju prema načinu rada, preciznosti i razlučivosti. Vrste analizatora za razdvajanje iona su magnetski analizator, kvadrupolni analizator masa, stupica iona analizator i analizator vremena leta.



Slika 4. Uređaj HPLC-MS-DAD

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cistična fibroza je nasljedna bolest koja znatno skraćuje životni vijek. Broj oboljelih u Hrvatskoj je oko sto što cističnu fibrozu uvrštava u vrlo rijetke bolesti. Kvaliteta života oboljelih je smanjena te bolest predstavlja teret za cijelu obitelj.

Lijekovi za liječenje rijetkih bolesti se nazivaju "lijekovi siročadi" (engl. *Orphan drug*) zato što u normalnim tržišnim uvjetima za farmaceutsku industriju nije profitabilno razvijati i prodavati lijekove namijenje za liječenje malog broja ljudi koji boluju od rijekih bolesti. Iz istog razloga se provodi manje istraživanja vezano za navedene lijekove.

Klinička ispitivanja su neizostavan i završni korak unaprijeđenja liječenja bolesti. To su znanstvena ispitivanja lijeka pri čemu se ispituje učinak lijeka prije nego se lijek odobri za široku primjenu. Prvo se provode neklinička ispitivanja na laboratorijskim i životinjskim modelima kojima je cilj ustanoviti djelotvornost, neškodljivost, kakvoću, mehanizam djelovanja i potencijalnu dozu lijeka. Životinjama se tijekom ispitivanja lijek u većini slučajeva daje hranom. Stoga je vrlo bitno imati učinkovitu metodu ekstrakcije lijeka iz hrane te metodu kojom se može odrediti točna koncentracija lijeka u hrani.

Cilj ovog rada je optimizicija uvjeta ekstrakcije pirfenidona iz hrane za štakore, odnosno usporediti dvije ekstrakcijske metode te odrediti koja je metoda ekstrakcije učinkovitija, ultrazvučna ili QuEChERS metoda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- voda, pročišćena
- acetonitril (ACN), čistoće za tekućinsku kromatografiju (Biosolve Chimie SARL, France)
- metanol (Schurlab S.L., Španjolska)
- mravlja kiselina 98-100% (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- standard pirfenidona (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- hrana za štakore
- $MgSO_4$, Na acetat, sol u bezvodnom obliku (Quechers paket, Agilent Technologies, Ealdbronn, Njemačka)
- otapalo za čvrsto faznu ekstrakciju (Quechers paket, Agilent Technologies, Ealdbronn, Njemačka) - primarni sekundarni amin (engl. *Primary Secondary Amine* PSA) i grafitni crni ugljik (engl. *Graphitized Carbon Black* GCB)

3.1.2. Radni instrumenti

- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- generator dušika NM30LA (Peak Scientific, Renfrewshire, UK)
- helij čistoće za kromatografiju (Messer, Gumpoldskirchen, Austrija)
- sustav za pročišćavanje vode WaterPro (Labonco, Kansas City, MI, SAD)
- ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Ealdbronn, Njemačka)
- vortex mješalica (Ika, Njemačka)
- centrifuga Nanofuge (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, SAD)

3.1.3. Pribor

- boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju
- Chromafil membranski filter (Macherey- Nagel, Düren, Njemačka)
- Celulozni nitratni filteri za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji veličine pora 0,45 μm (Sartorius, Goettingen, njemačka)
- Ependorf epruveta 1,5 ml
- vijala, 1,5 ml (Agilent Technologies, USA)
- čepić za vijalu (Agilent Technologies, USA)
- luerslip štrcaljka (Beckton, Dickinson and Company, Španjolska)
- filter za špricu (Chromafil Xtra 0,2 μm, 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka)
- kromatografska kolona Symmetry C18 dimenzija 150mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 μm (Waters, Milford, MA, SAD)
- mikropipeta promjenjivi volumen (Hirschmann, Njemačka)
- pipeta staklena, graduirana, 10 ml
- stakleni sustav za filtriranje pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Quechers tuba 15 ml, 50 ml

3.1.4. Programski paketi

- ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

3.2. Metode

Ekstrakcija pirfenidona iz hrane za štakore provedena je ultrazvučnom ekstrakcijom i QuEChERS metodom ekstrakcije, a identifikacija i kvantifikacija provedene su vezanim sustavom tekućinske kromatografije i masene spektormetrije.

3.2.1. Priprema pokretne faze

Mobilna faza A je pripremljena kao 0,1% otopina mravlje kiseline u vodi pročišćenoj WaterPro sustavom, a mobilna faza B je 0,1% otopina mravlje kiseline u acetonitrilu.

Pokretne faze su profiltrirane pomoću sustava za filtriranje pokretnih faza te celuloznog nitratnog filtera veličine pora 0,45 μm.

3.2.2. Priprema standardnih otopina

Kao unutarnji standard je korištena otopina pirfenidona koncentracije 1mg/ml.

3.2.3. Priprema ispitivanog uzorka

Uzorak se pripremi odvagom 0,4981g hrane za štakore i otopi u 5 ml otapala (voda: metanol=50:50). Nakon ekstrakcije na ultrazvučnoj kupelji sa spontanim zagrijavanjem u zadanom vremenu (40 min), supernatant se stavi u ependorf epruvetu i centrifugira na 6400 o/min. Supernatant se filtrira kroz filter veličine pora 0,2 μm i tako pripremljeni uzorak stavi u vialu i analizira LC/MSD Trap sistemom.

Jednak postupak provede se sa drugim uzorkom hrane (0,5733g) te je vrijeme ekstrakcije na ultrazvučnoj kupelji različito i iznosi 100 minuta.

Treći uzorak pripremi se odvagom 0,5080 g hrane za štakore. Odvagnuta masa se stavi u plastičnu tubu namijenjenu za QuEChERS ekstrakciju te se doda otapalo, 5ml 1% octene kiseline u ACN. Zatim se doda bezvodna sol $MgSO_4$ i Na acetat. Nakon toga miješa se 2 min na vortexu te centrifugira 5 min na 5000 rpm. 4 ml gornjeg acetonitrilnog ekstrakta stavi se u epruvetu te doda 4 ml vode, miješa se na vortexu 2 min i centrifugira 5 min na 5000 rpm. 5 ml supernatanta izdvoji se u novu epruvetu te ponovi postupak sa vortexom i centrifugom još 4 puta. Nakon toga se gornji acetonitrilni ekstrakt prebaci u QuEChERS epruvetu koja sadrži otapalo za čvrsto faznu ekstrakciju- PSA i GCB te se ponovi postupak sa vortexom i centrifugom. 200 μl gornjeg acetonitrilnog ekstrakta pomiješa se sa 800 μl vode te se ponovi postupak sa vortexom i centrifugom 3 puta. Dobiveni supernatant stavi se u vialu i analizira LC/MSD Trap sistemom.

3.2.4. Kromatografski uvjeti

Razdvajanje aktivnih sastojaka provedeno je na Agilent 1100 kromatografskom sustavu korištenjem obrnuto fazne kolone Symmetry C18 (dimenzija 150 x 4,5 mm i veličine čestica 3,5 μm). Za identifikaciju je korištena izokratna metoda korištenjem mobilne faze sastava acetonitril:voda mijenjanjem omjera od 20:80 do 60:40. Protok pokretne faze podešen je na

0,4 ml/min, a temperatura kolone je bila 45° C. Snimljeni su kromatogrami pirfenidona pri 315, 210 i 225 nm, a optimalna valna duljina UV/Vis spektrometra je 210 nm.

3.2.5. Uvjeti za masenu spektrometriju

Masena spektrometrija je provedena na instrumentu Agilent 6300 Series ion Trap. Kako bi se povećala osjetljivost metode temperatura izvora elektrosprej ionizacije je podešena na 350 °C dok je napon na kapilari iznosio 3,5 kV. Dušik je korišten kao plin za sušenje i raspršivanje pokretne faze te su optimalni uvjeti ionizacije postignuti pri njegovom protoku od 10 L/min te tlaku 20 psi. Kao plin nosač je korišten helij pod tlakom 6x10 mbar. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od m/z 100-600.

4. REZULTATI I RASPRAVA

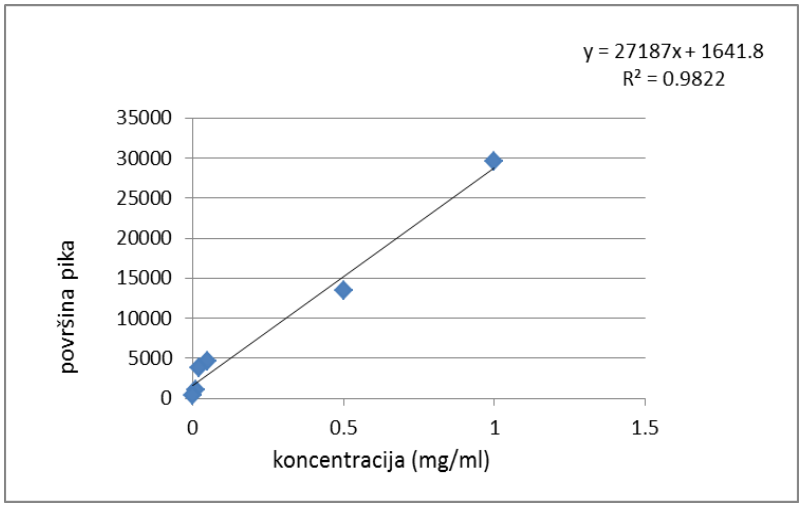
4.1. Ispitivanje linearnosti kromatografske metode

Linearnost je sposobnost analitičke metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Za ispitivanje linearnosti metode napravi se serija uzoraka sa različitim koncentracijama analita. Grafički prikaz ovisnosti signala o koncentraciji analita predstavlja kalibracijsku krivulju.

Korištena je tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnuta sa masenim spektrometrom. Linearnost se ispitivala na šest koncentracijskih razina u rasponu koncentracija od 0,001 mg/mL do 1 mg/mL. Kalibracijska krivulja dobivena je kao ovisnost vrijednosti površina pikova pirfenidona dobivenih u HPLC kromatogramima standarda o koncentraciji pirfenidona (Tablica 1 i Slika 5). Jednadžba pravca dobivena je linearnom regresijom metodom najmanjih kvadrata i iznosila je y = 27187x + 1641,8. Metoda se pokazala linearnom uz koeficijent korelacije R^2=0,9822.

Tablica 1. Vrijednosti koncentracija i izmjerenih površina pikova pirfenidona u HPLC kromatogramima.

koncentracija (mg/ml)	1	0,5	0,05	0,02	0,01	0,001
površina pika	29605.5	13479.3	4585.1	3763.6	1091.3	308.5



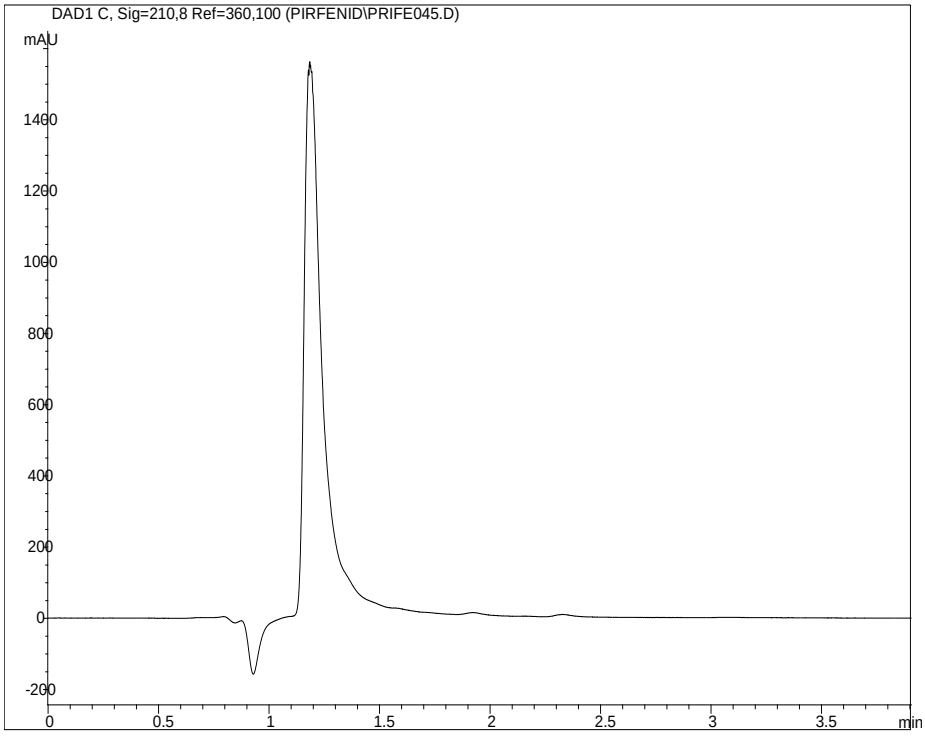
Slika 5. Ovisnost površine pikova pirfenidona o koncentraciji otopine standarda.

4.2. Optimizacija vremena eluacije analita

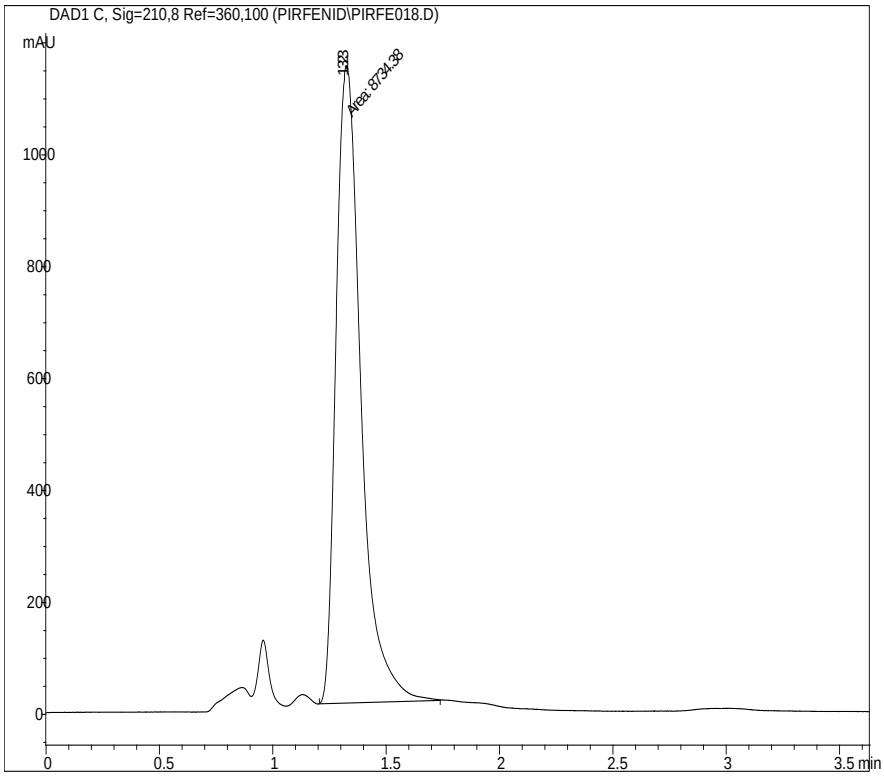
Na vrijeme eluacije analita u HPLC koloni utječe, između ostalog, sastav mobilne faze. Povećanjem udjela vode produžuje se vrijeme eluacije, a povećavanjem udjela acetonitrila u mobilnoj fazi skraćuje se analiza nepolarne molekule uz primjenu nepolarne C18 stacionarne faze. Pirfenidon će kao nepolarna molekula brže eluirati kada se poveća nepolarnost mobilne faze, jer se manje zadržava na stacionarnoj fazi. U tablici 2 prikazana su vremena zadržavanja pirfenidona s obzirom na sastav mobilne faze. Na slikama 6, 7, 8 i 9 prikazani su UV/ VIS kromatogrami pirfenidona pri različitom sastavu mobilne faze.

Tablica 2. Vrijednosti vremena zadržavanja pirfenidona u ovisnosti o sastavu mobilne faze acetonitril: voda.

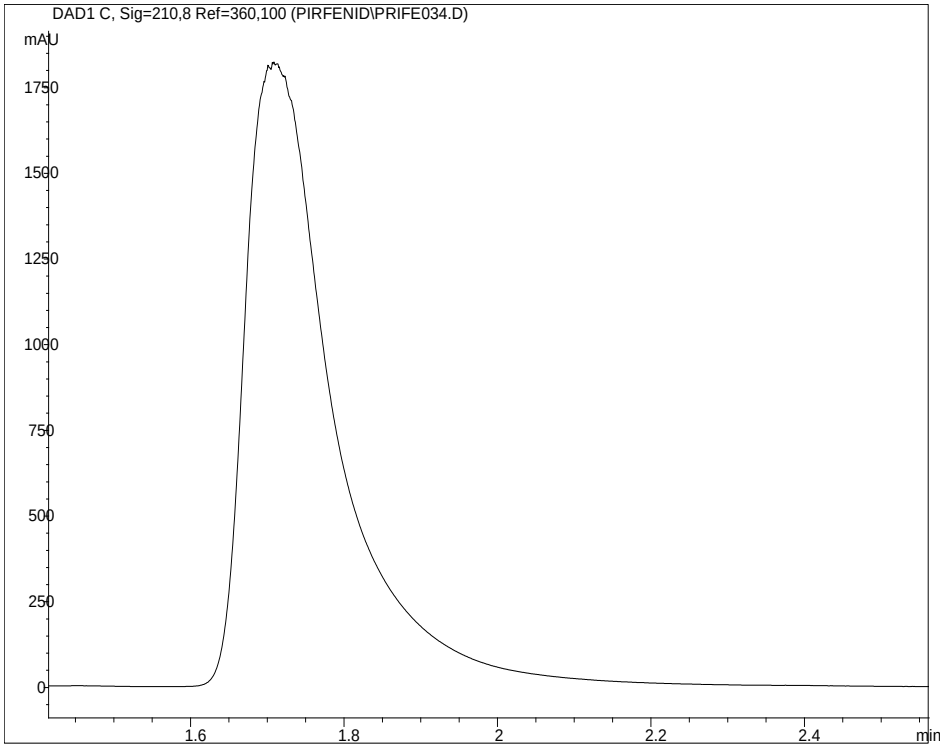
Sastav mobilne faze acetonitril:voda (v/v, %)	60:40	50:50	40:60	30:70
vrijeme zadržavanja(min)	1.2	1.3	1.7	2.6



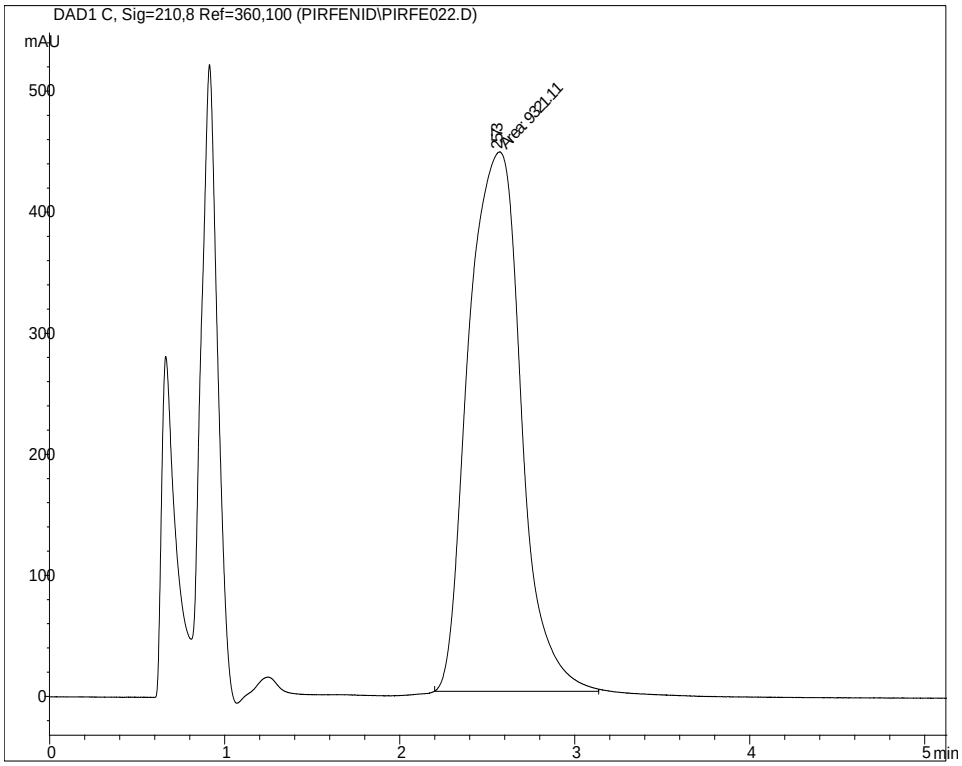
Slika 6. UV/ VIS kromatogram pirfenidona pri sastavu mobilne faze acetonitril: voda= 60:40.



Slika 7. UV/ VIS kromatogram pirfenidona pri sastavu mobilne faze acetonitril:voda= 50:50.



Slika 8. UV/ VIS kromatogram pirfenidona pri sastavu mobilne faze acetonitril: voda= 40:60.



Slika 9. UV/ VIS kromatogram pirfenidona pri sastavu mobilne faze acetonitril:voda=30:70.

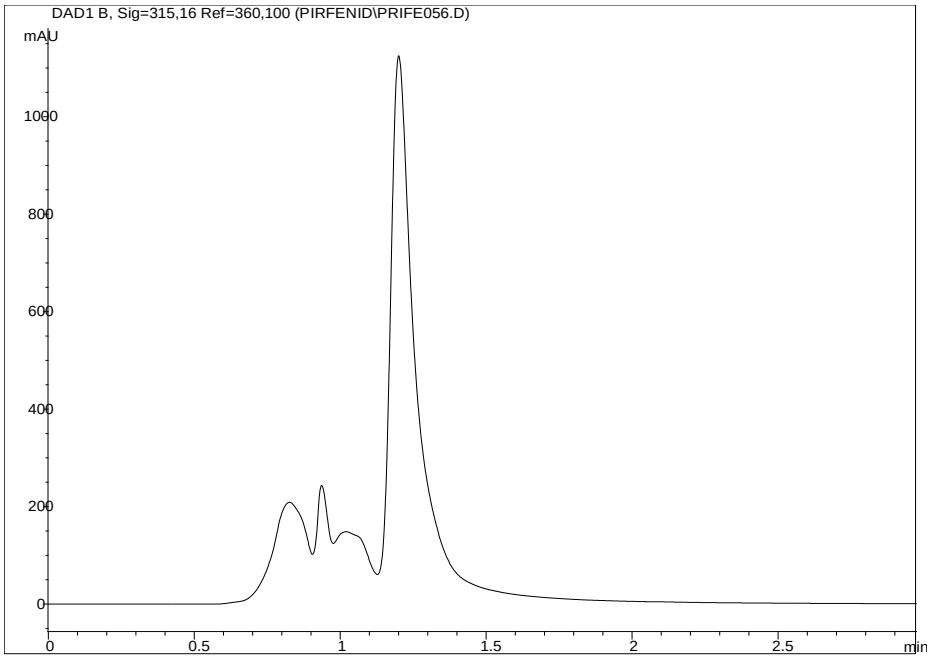
4.3. Optimizacija vremena ultrazvučne ekstrakcije

Kao otapalo za ekstrakciju pirfenidona iz hrane za štakore odabrana je smjesa metanol:voda= 50:50 (v/v, %) na temelju poznavanja učinkovitosti toga otapala iz već objavljenog rada (Ambrose i sur., 2009). Nakon odabira otapala, bilo je potrebno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije. Za ispitivanje vremena ekstrakcije usitnjeni uzorak hrane je pomiješan sa otapalom i ekstrahiran na ultrazvučnoj kupelji uz spontano zagrijavanje pri sobnoj temperaturi. Uzorak 1 mase 0,4981 g je ekstrahiran na ultrazvučnoj kupelji kroz 40 min, a uzorak 2 mase 0,5733 g kroz 100 minuta. Nakon ekstrakcije supernatant je centrifugiran i filtriran kroz mikro filter veličine čestica 0,2 μm u vialu za uzorkovanje nakon čega su uzorci analizirani LC-DAD-MS metodom. Dobiveni kromatogrami su prikazani na slikama 10 i 11.

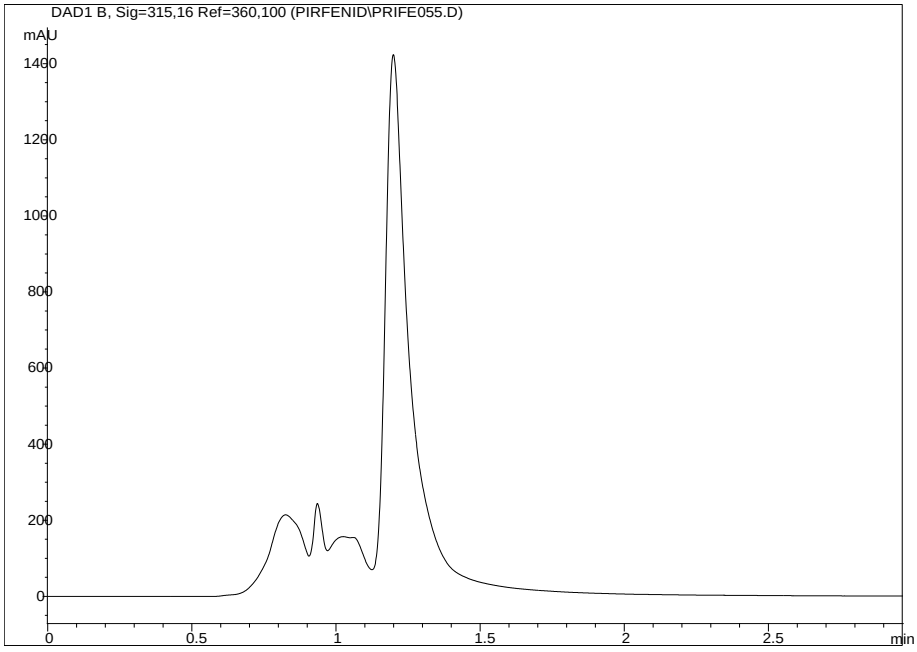
Nakon integriranja površina ispod pikova te izračunavanja ekstrakcijske učinkovitosti dobiveni rezultati pokazuju da je veća učinkovitost postignuta ekstrakcijom u trajanju od 100 min. Veća je količina pirfenidona po gramu hrane izolirana nakon ekstrakcije u trajanju od 100 min (Tablica 3).

Tablica 3. Vrijednosti mase hrane, koncentracije ekstrakta te udjela lijeka u hrani za uzorke 1 i 2.

	masa ispitanog uzorka hrane (g)	koncentracija ekstrakta (mg/ml)	udio lijeka u hrani (mg/g)
uzorak 1	0,4981	0,1524	0,3060
uzorak 2	0,5733	0,2047	0,3571



Slika 10. UV/ VIS kromatogram ekstrakta 1 dobivenog otapanjem uzorka hrane mase 0,4981 g u otapalu (metanol:voda=50:50, v/v %) i ekstrahiranjem na ultrazvučnoj kupelji uz spontano zagrijavanje kroz 40 min.

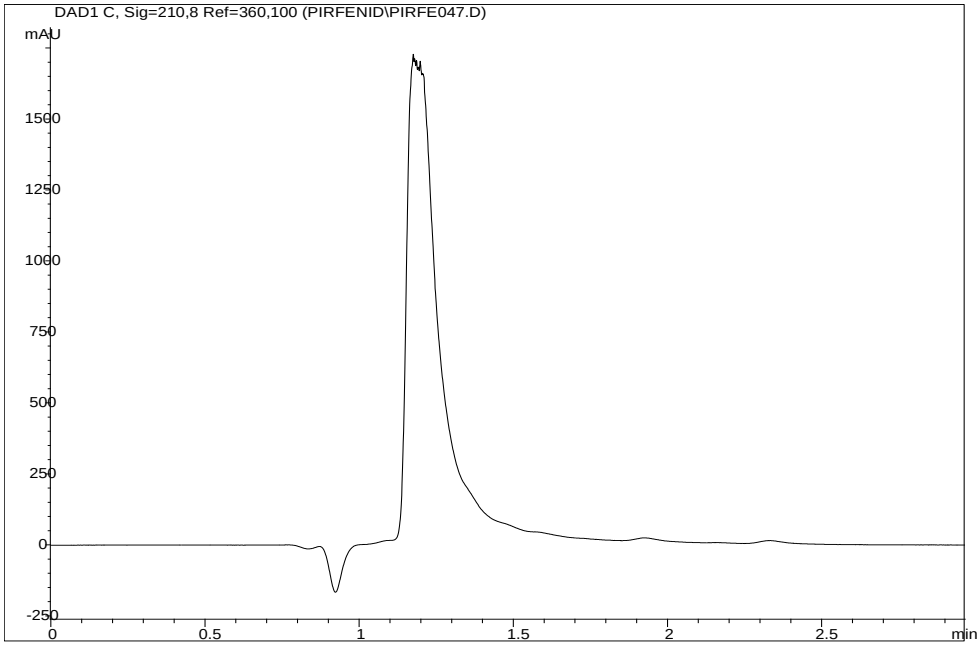


Slika 11. UV/ VIS kromatogram ekstrakta 2 dobivenog otapanjem uzorka hrane mase 0,5733 g u otapalu (metanol:voda=50:50, v/v %) te ekstrahiranjem na ultrazvučnoj kupelji uz spontano zagrijavanje kroz 100 min.

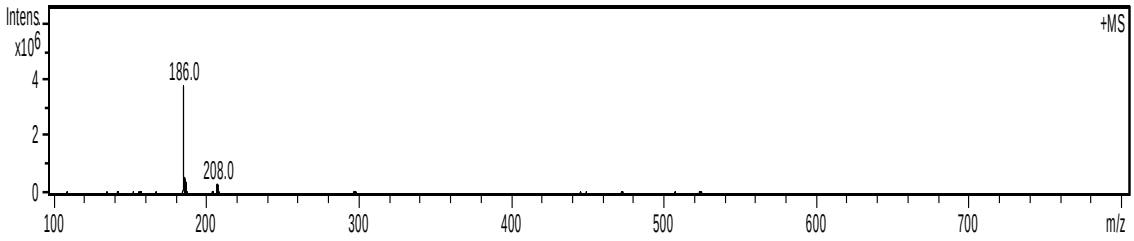
4.4. Identifikacija i kvantifikacija analita u hrani za štakore

Nakon što su odabrani najpogodniji ekstrakcijski uvjeti ultrazvučne ekstrakcije metoda je primijenjena za identifikaciju i kvantifikaciju pirfenidona u hrani za štakore. Također je provedena identifikacija i kvantifikacija pirfenidona nakon QuEChERS ekstrakcije, kako bi se utvrdilo koja od provedenih metoda ekstrakcije je učinkovitija za dobivanje pirfenidona.

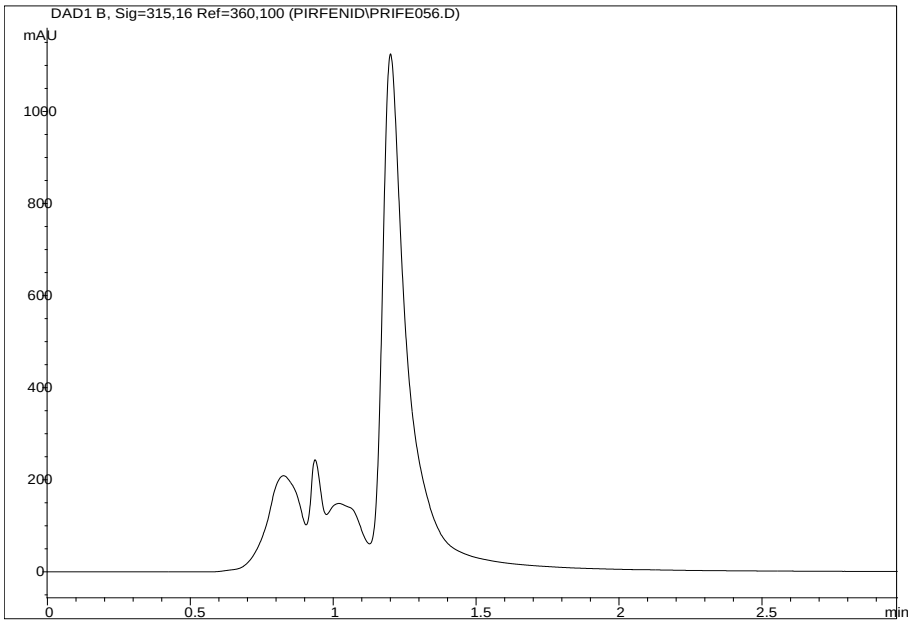
Identifikacija analita u hrani za štakore utvrđena je usporedbom vremena zadržavanja analita u hrani nakon ultrazvučne ekstrakcije sa vremenom zadržavanja standarda pirfenidona, zatim usporedbom snimljenih UV/VIS spektara kao i na temelju dobivenog MS spektra. Iz slike 13 i 15 vidljivo je da su vremena zadržavanja pirfenidona iz otopine standarda te iz ekstrakta hrane jednaka te iznose 1.2 minute. Na slikama 14 i 16 prikazani su MS spektri pirfenidona iz otopine standarda odnosno iz ekstrakta 1. Iz spektara se vidi da analit dobro ionizira pri pozitivnoj ionizaciji i daje molekulski fragment *m/z* 186 pirfenidon.



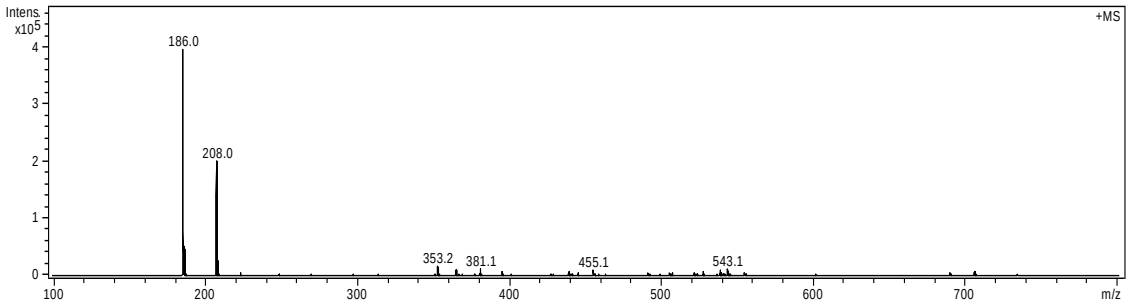
Slika 13. UV/ VIS kromatogram otopine standarda pirfenidona, vrijeme zadržavanja je 1.2 minuta.



Slika 14. MS spektar pirfenidona u otopini standarda, molekulski fragment *m/z* 186.

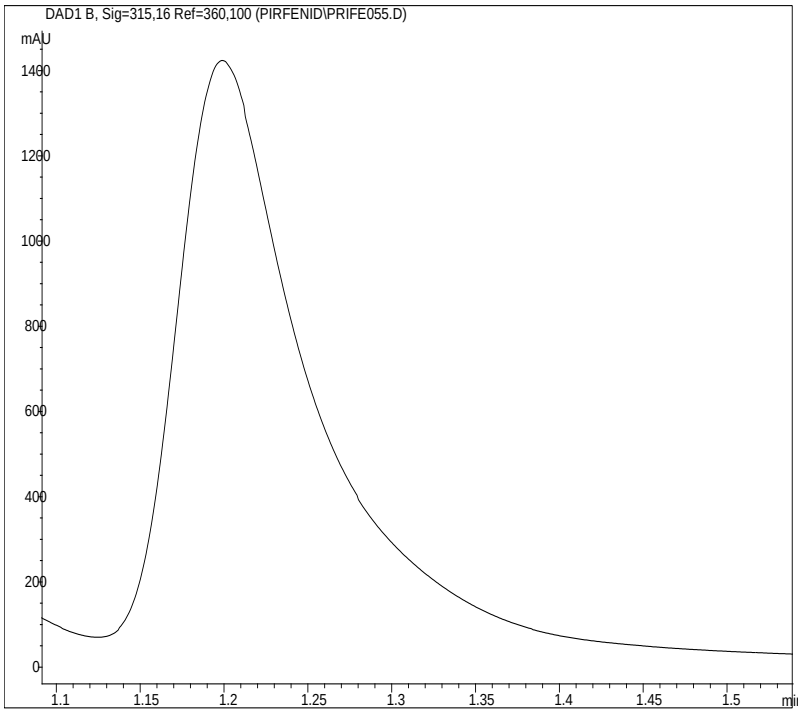


Slika 15. UV/ VIS kromatogram ekstrakta 1 pirfenidona, vrijeme zadržavnja pirfenidona je 1.2 minute.

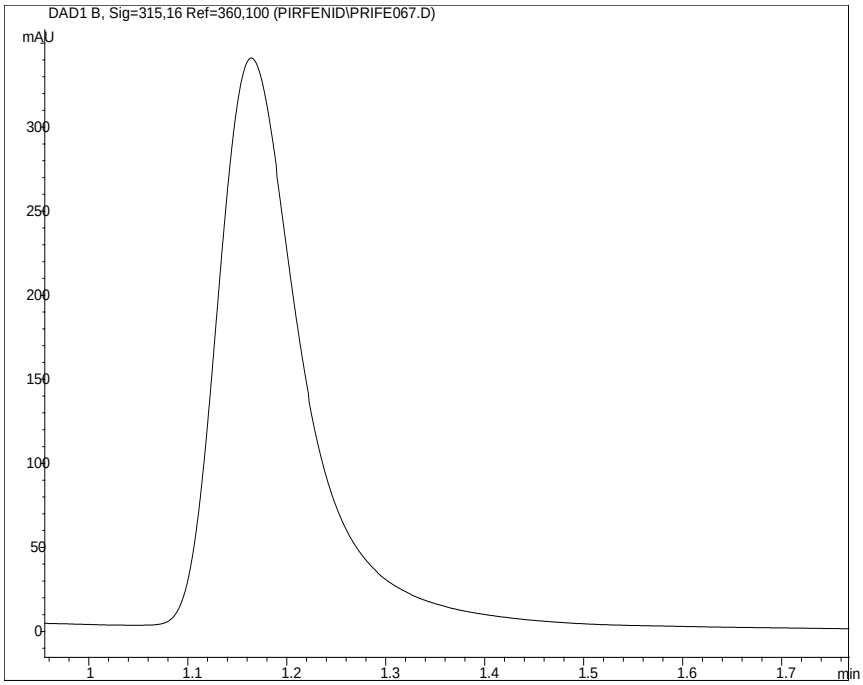


Slika 16. MS spektar pirfenidona u ekstraktu 1 nakon ultrazvučne ekrakcije u trajanju od 40 minuta, molekulski fragment *m/z* 186.

Koncentracija analita u ekstraktu hrane 2 (masa hrane = 0,5733 g) nakon ultrazvučne ekstrakcije kao i ekstrakta hrane 3 nakon QuEChERS ekstrakcije (masa hrane = 0,5080 g) izračuna se iz integrirane površine pika na kromatogramu pomoću kalibracijskog pravca dobivenog za otopine standarda kako je opisano u poglavlju 4.1. UV/VIS kromatogrami ekstrakta hrane 2 i ekstrakta hrane 3 prikazani su na slikama 17 i 18. Rezultati su prikazani u tablici 4.



Slika 17. UV/ VIS kromatogram ekstrakta hrane 2 nakon ultrazvučne ekstrakcije u trajanju od 100 min, površina ispod pika iznosi 7208.3.



Slika 18. UV/VIS kromatogram ekstrakta hrane 3 nakon QuEChERS metode ekstrakcije, površina ispod pika iznosi 1981.1.

Tablica 4. Dobivene količine pirfenidona (mg) izražene po gramu hrane nakon ultrazvučne ekstrakcije u trajanju od 100 min te QuEChERS ekstrakcije.

	mg pirfenidona po g hrane
Nakon UZV ekstrakcije	0,3571
Nakon QuEChERS ekstrakcije	0,0246

QuEChERS metoda ekstrakcije trajala je 70 minuta. Iako je QuEChERS metoda ekstrakcije trajala kraće od ultrazvučne ekstrakcije iz dobivenih rezultata vidljivo je da je ultrazvučna ekstrakcija učinkovitija za ekstrakciju pirfenidona u hrani za štakore. Nakon ultrazvučne ekstrakcije ekstrahira se 0,3571 mg pirfenidona po g hrane, a nakon QuEChERS 0,0246 mg pirfenidona po g hrane. Unatoč mnogim prednostima QuEChERS-a, brzini, jednostavnosti, štedljivosti, sigurnosti i mogućnosti metode da odjednom ekstrahira veliki broj komponenata, u ovome radu kao učinkovitija pokazala se ultrazvučna ekstrakcija, koja je unutoč nešto dužem trajanju, u ovom slučaju puno jednostavnija ekstrakcijska tehnika od predložene QuEChERS metode.

5.ZAKLJUČAK

- Uspoređene su ultrazvučna i QuEChERS ekstrakcija za izolaciju pirfenidona iz hrane za štakore. QuEChERS je vrlo učinkovita metoda ekstrakcije čije su prednosti jednostavnost, brzina, štedljivost, sigurnost i mogućnost da odjednom ekstrahira više od 250 komponenata. Unatoč tome u ovome radu ultrazvučna metoda ekstrakcije je odabrana kao prikladnija u odnosu na QuEChERS jer su ekstrahirane veće količine pirfenidona nakon ultrazvučne ekstrakcije a razlika u vremenu nije bila velika. QuEChERS je trajala 70 min, a ultrazvučna ekstrakcija 100 min.

- Kao otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju pirfenidona iz hrane za štakore je korištena smjesa otapala metanol:voda=50:50, v/v %, jer je u prijašnjim radovima s pirfenidonom dokazano da je upravo ta smjesa otapala učinkovita.

- Navedene metode zajedno sa kromatografskom metodom spregnutom sa masenom spektrometrijom uspješno su upotrijebljene za identifikaciju i kvantifikaciju pirfenidona u hrani za štakore.

6.LITERATURA

1. A Modified QuEChERS Approach to the Isolation and Determination of Drugs in Food Products, 2010., http://www.agilent.com/cs/library/posters/public/Modified_QuEChERS_Approach_Isolation_Determination_Drugs_in_Food_LCMSMS_Pittcon2010.pdf, pristupljeno 5. 07. 2016.
2. Agilents Sampli Q Quechers Kits, 2009., http://www.dtoservizi.it/UserFiles/File/5990-3562EN.pdf, pristupljeno 21. 03. 2016.
3. Ambrose PG, Bhavnani SM, Forest A, Loutit JS, Rubino CM. Effect of food and antacids on the pharmakocinetics of pirfenidone in older healthy adults. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22, 279-285.
4. Butorac A, Bačun Družina V, Badanjak Sabolović M, Hruškar M, Marić M, Rimac Brnčić S. Analitičke metode u forenzici hrane, *Croat J Food Techn*, 2013, 8, 90-101.
5. Chen RM, Chen RJ, Hu G, Jiang S, Jiang Z, Li W, Sun W, Zhou L, Wang Z. Determination and pharmacokinetic study of pirfenidone in rat plasma by UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 981-982, 14-18.
6. Dean RJ. Extraction Techniques in Analitical Science. Analytical Techniques in the Sciences. New Castle, John Walley and Sons, 2009, str. 223-240.
7. Desai SB, Parmar VK, Vaja T. RP-HPLC and UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Pirfenidone in Pharmaceutical Formulations. *Indian J Pharm Sci*, 2014, 76, 225–229.
8. Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat J Food Techn*, 2010, 2, 22-33.
9. Explanation of Ultrasonic Extraction Technology, 2016., www.renetech.com, pristupljeno 13.05.2016.
10. Fandian Z, Jianhong W, Jun W, Shaojun S. Development and Validation of an Improved LC Method for the Simultaneous Determination of Pirfenidone and Its Carboxylic Acid Metabolite i Human Plasma. *Chromatographia*, 2009, 69, 459-463.

11. Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies, 2002., http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM126833.pdf , pristupljeno 05.07.2016.
12. Gouxin H, Haiyan J, Jiao W, Jie D, Kumning C, Qiaoqiao X, Shuhua T, Xianqin W, Xuegu X, Yibin P. Determination of Pirfenidone in Rat Plasma by LC- MS-MS and its Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*, 2010, 709-713.
13. Kovač KA, 2000., http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=873, pristupljeno 05.04.2016.
14. Nigović B. Interna skripta za predavanja, predavanja: Masena spektrometrija, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, 2014.
15. Soxhlet and Ultrasonic Extraction of Organics in Solids, 2000., http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a0864/abstract , pristupljeno 05.04.2016.
16. Turkalj H. Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za analizu proizvoda namijenjenih ženama u menopauzi. Diplomski rad. Zagreb, 2015.

7.SAŽETAK/SUMMARY

Cistična fibroza je vrlo rijetka i fatalna bolest. Najozbiljnija komplikacija bolesti je kronična plućna bolest od koje oboli skoro svaki bolesnik sa cističnom fibrozom. O težini plućne bolesti ovisi duljina i kvaliteta života oboljelih. Sluz koja oblaže dišne puteve postaje gusta i ljepljiva što pogoduje nastanku infekcija te otežava disanje.

Lijekovi za liječenje cistične fibroze nazivaju se i "lijekovi siročadi" jer za farmaceutsku industriju nije profitabilno razvijati i prodavati lijekove za liječnje malog broja ljudi, oboljelih od rijetkih bolesti. Zbog toga je vrlo važno provoditi ispitivanja za lijekove siročadi, kako bi olakšali liječenje rijetkih bolesti.

Cilj ovoga rada bio je usporediti dvije ekstrakcijske tehnike: ultrazvučnu ekstrakciju i QuEChERS ekstrakciju. Uzorak hrane je homogeniziran te otopljen u smjesi otapala metanol:voda=50:50, *v/v* %. Istražena su različita vremena ultrazvučne ekstrakcije (40 i 100 minuta) te je kao učinkovitija odabrana ultrazvučna ekstrakcija u trajanju od 100 min jer se njome ekstrahirala veća količina pirfenidona. Prva metoda ekstrakcije je provedena korištenjem ultrazvučne kupke dok je druga metoda bila QuEChERS. QuEChERS ekstrakcija je provedena pomoću QuEChERS opreme te prema shemi za ekstrahiranje uzoraka koji sadrže masti jer se u hrani za štakore nalaze masti koje bi smetale analizi HPLC-om. Nakon analize uzoraka LC/DAD/MS metodom korištenjem Agilent 1100 Series LC/MSD Trap sistema, kao bolja metoda za izolaciju prifenidona iz hrane za štakore je odabrana ultrazvučna ekstrakcija u trajanju od 100 minuta. Unatoč mnogim prednostima QuEChERS-a, jednostavnosti primjene, brzini, štedljivosti, sigurnosti i mogućnosti da odjednom ekstrahira više od 250 komponenata, ultrazvučnom ekstrakcijom je ekstrahirana veća količina pirfenidona. Razlika u vremenu ekstrakcije nije bila velika. Ultrazvučna ekstrakcija je trajala 100 min, a QuEChERS 70 min.

Optimizirani ekstrakcijski uvjeti su uspješno primijenjeni za analizu pirfenidona u hrani za štakore.

Cystic fibrosis is a very rare and fatal desease. The most dangerous complication is chronic pulmonary desease from which almost every patient get sick. Duration and quality of life depends on severity of the pulmonary desease. Mucus that lines the airways becomes thick and sticky what then leads to the infections and shortness of breath.

Drugs for treatment of cystic fibrosis are called "orphan drugs" because it is not profitable for the pharmaceutical industry to develop and sell drugs for treatment of only small percentage of population. Because of that it is very important to conduct clinical testing of new orphan drugs, so we can facilitate treatment of rare deseases.

The aim of this study was to compare two extraction techniques: ultrasonic extraction and Quechers extraction. Sample of rat chow was homogenized and dissolved in solvent methanol:water=50:50, *v/v* %. Different extraction time (40 and 100 minutes) were investigated and ultrasonic extraction, with duration time 100 minutes, was more effective because more pirfenidone was extracted. First extraction method was performed using ultrasonic bath while the other one was a QuEChERS method. QuEChERS was made with QuEChERS equipment and by the scheme for extracting sample with fats because in rat chow there are fats that would make trouble when analysing them with an HPLC. After the analysis of the sample by LC/DAD/MS method, using Agilent 1100 Series LC/MSD trap system, ultrasonic extraction in duration of 100 minutes is selected as the better method for isolation pirfenidone from a rat chow. Despite all the advantages that QuEChERS has, e.g. simplicity, rapidity, cheapness, safety and possibility to extract more than 250 components at once, ultrasonic extraction has extracted bigger amount of pirfenidone. The difference in the time of extraction was not significant. Ultrasonic extraction lasted for 100 minutes and QuEChERS for 70 minutes.

Optimized extraction conditions were successfully applied for analysis of pirfenidone in rat chow.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za analizu pirfenidona u hrani HPLC-DAD-MS metodom

Martina Švarc

SAŽETAK

Cistična fibroza je vrlo rijetka i fatalna bolest. Najozbiljnija komplikacija bolesti je kronična plućna bolest od koje oboli skoro svaki bolesnik sa cističnom fibrozom. O težini plućne bolesti ovisi duljina i kvaliteta života oboljelih. Sluz koja oblaže dišne puteve postaje gusta i ljepljiva što pogoduje nastanku infekcija te otežava disanje.

Lijekovi za liječenje cistične fibroze nazivaju se i "lijekovi siročadi" jer za farmaceutsku industriju nije profitabilno razvijati i prodavati lijekove za liječnje malog broja ljudi, oboljelih od rijetkih bolesti. Zbog toga je vrlo važno provoditi ispitivanja za lijekove siročadi, kako bi olakšali liječenje rijetkih bolesti.

Cilj ovoga rada bio je usporediti dvije ekstrakcijske tehnike: ultrazvučnu ekstrakciju i QuEChERS ekstrakciju. Uzorak hrane je homogeniziran te otopljen u smjesi otapala metanol:voda=50:50, v/v %. Istražena su različita vremena ultrazvučne ekstrakcije (40 i 100 minuta) te je kao učinkovitija odabrana ultrazvučna ekstrakcija u trajanju od 100 min jer se njome ekstrahirala veća količina pirfenidona. Prva metoda ekstrakcije je provedena korištenjem ultrazvučne kupke dok je druga metoda bila QuEChERS. QuEChERS ekstrakcija je provedena pomoću QuEChERS opreme te prema shemi za ekstrahiranje uzoraka koji sadrže masti jer se u hrani za štakore nalaze masti koje bi smetale analizi HPLC-om. Nakon analize uzoraka LC/DAD/MS metodom korištenjem Agilent 1100 Series LC/MSD Trap sistema, kao bolja metoda za izolaciju prifenidona iz hrane za štakore je odabrana ultrazvučna ekstrakcija u trajanju od 100 minuta. Unatoč mnogim prednostima QuEChERS-a, jednostavnosti primjene, brzini, štedljivosti, sigurnosti i mogućnosti da odjednom ekstrahira više od 250 komponenata, ultrazvučnom ekstrakcijom je ekstrahirana veća količina pirfenidona. Razlika u vremenu ekstrakcije nije bila velika. Ultrazvučna ekstrakcija je trajala 100 min, a QuEChERS 70 min.

Optimizirani ekstrakcijski uvjeti su uspješno primijenjeni za analizu pirfenidona u hrani za štakore.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Rad sadrži: 31 stranica, 18 grafičkih prikaza, 4 tablice i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: pirfenidon, QuEChERS, HPLC-DAD-MS

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

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

Dr. sc. PetraTurčić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analitics and control of the Drugs
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Optimization of extraction conditions for the analysis of pirfenidon in rat chow

Martina Švarc

SUMMARY

Cystic fibrosis is a very rare and fatal desease. The most dangerous complication is chronic pulmonary desease from which almost every patient get sick. Duration and quality of life depends on severity of the pulmonary desease. Mucus that lines the airways becomes thick and sticky what then leads to the infections and shortness of breath.

Drugs for treatment of cystic fibrosis are called "orphan drugs" because it is not profitable for the pharmaceutical industry to develop and sell drugs for treatment of only small percentage of population. Because of that it is very important to conduct clinical testing of new orphan drugs, so we can facilitate treatment of rare deseases.

The aim of this study was to compare two extraction techniques: ultrasonic extraction and Quechers extraction. Sample of rat chow was homogenized and dissolved in solvent methanol:water=50:50, *v/v* %. Different extraction time (40 and 100 minutes) were investigated and ultrasonic extraction, with duration time 100 minutes, was more effective because more pirfenidone was extracted. First extraction method was performed using ultrasonic bath while the other one was a QuEChERS method. QuEChERS was made with QuEChERS equipment and by the scheme for extracting sample with fats because in rat chow there are fats that would make trouble when analysing them with an HPLC. After the analysis of the sample by LC/DAD/MS method, using Agilent 1100 Series LC/MSD trap system, ultrasonic extraction in duration of 100 minutes is selected as the better method for isolation pirfenidone from a rat chow. Despite all the advantages that QuEChERS has, e.g. simplicity, rapidity, cheapness, safety and possibility to extract more than 250 components at once, ultrasonic extraction has extracted bigger amount of pirfenidone. The difference in the time of extraction was not significant. Ultrasonic extraction lasted for 100 minutes and QuEChERS for 70 minutes.

Optimized extraction conditions were successfully applied for analysis of pirfenidone in rat chow.

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

Thesis includes: 31 pages, 18 figures, 4 tables and 16 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pirfenidone, QuEChERS, HPLC-DAD-MS

Mentor: **Miranda Sertić**, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić**, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

Petra Turčić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted:July 2016.