

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Edvin Brusač

**NOVA HPLC-DAD-MSⁿ METODA ZA ODREĐIVANJE
IMUNOSUPRESIVA KORIŠTENIH U TERAPIJI
UPALNIH BOLESTI CRIJEVA I FOLNE KISELINE U
TABLETAMA I PLAZMI**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom [UIP-2017-05-3949].



KRATICE

6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-tiogvanin
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
AZA	azatioprin
CD	Crohnova bolest (engl. <i>Crohn's disease</i>)
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>Diode Array Detector</i>)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>Electrospray Ionization</i>)
FA	folna kiselina (engl. <i>folic acid</i>)
GC	plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i>)
Glu	glutaminska kiselina
FLD	fluorescencijski detektor
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS ⁿ	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s tandemskom spektrometrijom masa (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i>)
IBD	upalne bolesti crijeva (engl. <i>Inflammatory Bowel Disease</i>)
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. <i>International Conference of Harmonization</i>)
IS	unutarnji standard (engl. <i>internal standard</i>)
LOD	granica dokazivanja (engl. <i>Limit of Detection</i>)

LOQ	granica određivanja (engl. <i>Limit of Quantification</i>)
MEPS	<i>Microextraction by Packed Sorbent</i>
MS	spektrometrija masa (engl. <i>Mass Spectrometry</i>)
PABA	para-aminobenzojeva kiselina (engl. <i>para-aminobenzoic acid</i>)
Ph. Eur.	Europska farmakopeja (engl. <i>European Pharmacopoeia</i>)
PP	taloženje proteina (engl. <i>protein precipitation</i>)
QSRR	kvantitativni odnos strukture i kromatografskog zadržavanja (engl. <i>Quantitative Structure-Retention Relationship</i>)
RNK	ribonukleinska kiselina
RP	obrnuto fazna (engl. <i>reverse phase</i>)
RSD	relativno standardno odstupanje (engl. <i>Relative Standard Deviation</i>)
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
SPE	ekstrakcija čvrstom fazom (engl. <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	mikroekstrakcija čvrstom fazom (engl. <i>Solid Phase Microextraction</i>)
TDM	terapijsko praćenje koncentracije lijeka u plazmi (engl. <i>therapeutic drug monitoring</i>)
TIC	ukupna ionska struja (engl. <i>Total Ion Current</i>)
TNF	čimbenik nekroze tumora (engl. <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UC	ulcerozni kolitis (engl. <i>Ulcerative Colitis</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Upalne bolesti crijeva	2
1.2. Analizi purina kao imunosupresivi u terapiji upalnih bolesti crijeva	3
1.3. Folna kiselina i upalne bolesti crijeva	4
1.4. Određivanje sadržaja djelatnih tvari u farmaceutskim formulacijama	5
1.5. Bioanalitika – uloga analitičkih tehnika u terapijskom praćenju koncentracije lijekova	6
1.6. Pregled znanstvenih radova za određivanje azatioprina, 6-merkaptopurina, 6-tiogvanina i folne kiseline u formulacijama i plazmi HPLC-MS tehnikama.....	7
1.6.1. Azatioprin.....	7
1.6.2. 6-merkaptopurin.....	8
1.6.3. 6-tiogvanin	9
1.6.4. Folna kiselina	9
1.6.5. Zaključci pregleda znanstvenih radova.....	10
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	11
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. Kemikalije.....	14
3.1.2. Radni instrumenti i pribor	15
3.1.3. Programi i programski paketi.....	16
3.2. Metode	17
3.2.1. <i>In silico</i> predviđanja.....	17
3.2.2. Priprema poredbenih otopina	17
3.2.1.1. Matične otopine.....	17
3.2.1.2. Radne otopine.....	17
3.2.3. Priprema formulacije tablete za analizu.....	17
3.2.4. Priprema uzoraka tableta za analizu.....	18

3.2.5. Priprema uzoraka umjetne plazme za analizu	18
3.2.6. Uvjeti kromatografske analize	18
3.2.7. Uvjeti spektrometrije masa	19
3.2.8. Validacija metode	19
3.2.9. Statistička obrada rezultata	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. <i>In silico</i> predviđanje log <i>D</i> vrijednosti analita.....	22
4.2. Razvoj i optimizacija HPLC-DAD-MS ⁿ metode.....	23
4.2.1. Odjeljivanje ispitivanih spojeva.....	23
4.2.2. Odabir detektora i identifikacija analita.....	25
4.2.3. Određivanje analita	30
4.3. Validacija metode	32
4.3.1. Selektivnost.....	33
4.3.2. Linearnost.....	36
4.3.3. Osjetljivost	36
4.3.4. Preciznost	37
4.3.5. Točnost.....	38
4.3.6. Izdržljivost	38
4.3.7. Stabilnost.....	40
4.4. Primjena metode za određivanje analita	40
4.4.1. Određivanje analita u tabletama.....	40
4.4.2. Određivanje analita u umjetnoj plazmi	42
5. ZAKLJUČAK.....	44
6. ZAHVALE	46
7. POPIS LITERATURE.....	48
8. SAŽETAK.....	55
9. SUMMARY.....	57

1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

Termin upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) obuhvaća intestinalne procese koji su posljedica nekontrolirane, imunološki posredovane upale u genetički preduvjetovanih osoba. Navedeni procesi aktivirani su još nepoznatim okidačima koji interagiraju s intestinalnom florom, čime se osim intestinalnih, javljaju i ekstraintestinalni simptomi. U upalne bolesti crijeva spadaju dva poremećaja: Crohnova bolest i ulcerozni kolitis (Malik, 2015).

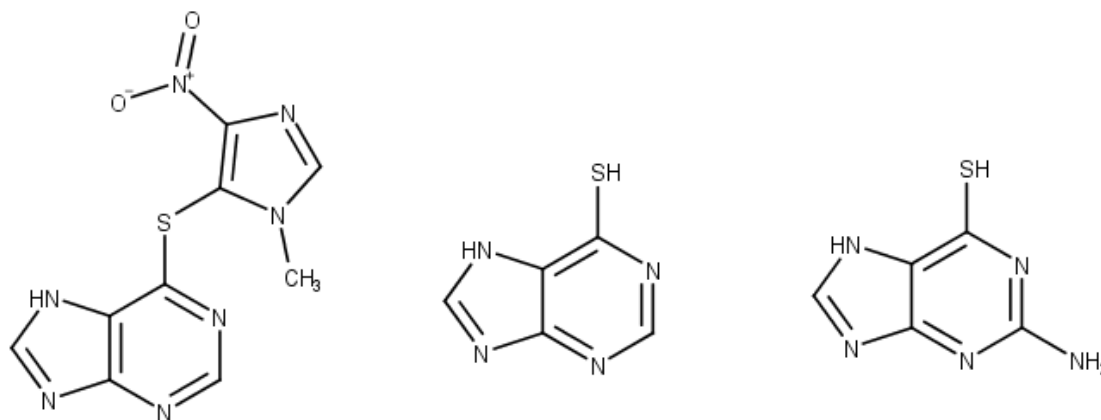
Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*, CD) je kronična sistemska granulomatozna bolest koja zahvaća sve slojeve crijevne stijenke. Samo tanko crijevo zahvaćeno je u 40%, i tanko i debelo u 30%, a samo debelo crijevo u 30% bolesnika. U bolesnika se javljaju defekti sluznice, preskačuće lezije, crijevna stijenka je zadebljana te je prisutna upala seroze. Klinička slika uključuje izmjene perioda aktivne bolesti i asimptomatskih perioda, koji mogu trajati nekoliko tjedana ili mjeseci. Javlja se kronični proljev, bolovi u trbuhu, gubitak tjelesne mase i slabost. Ekstenzivna bolest tankog crijeva može uzrokovati značajan gubitak albumina, kao i malapsorpciju vitamina. Ekstraintestinalne manifestacije bolesti mogu se javiti u velikom broju organskih sustava u vidu upala: najčešće su zahvaćeni mišićno-koštani sustav i koža, no javljaju se i u bubrezima, plućima, jetri te oku (Levine i Burakoff, 2011). U bolesnika s dugotrajnom Crohnovom bolešću povećan je rizik nastanka karcinoma debelog crijeva (Tomić i sur., 2018).

Ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative Colitis*, UC) je kronična, recidivirajuća negranulomatozna upalna bolest koja uglavnom zahvaća sluznicu i podsluznicu debelog crijeva. Karakterizirana je kontinuiranim ulceracijama sluznice i podsluznice crijeva, inflamatornim polipima te atrofijom sluznice. Bolest se očituje grčevima u trbuhu praćenim krvavim proljevima trajanja od nekoliko dana do nekoliko mjeseci. Kod težih oblika bolesti postoji i mogućnost razvoja toksičnog megakolona (Tomić i sur., 2018). Kao i kod Crohnove bolesti, prisutna je malapsorpcija vitamina, viši je rizik pojave kolorektalnog karcinoma zbog kronične intestinalne upale te se javlja mogućnost pojave sličnih ekstraintestinalnih manifestacija bolesti (Axelrad i sur., 2016).

U terapiji upalnih bolesti crijeva primjenjuju se aminosalicilati, kortikosteroidi, analozi purina i inhibitori čimbenika nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) (McQuaid, 2012).

1.2. Analози purina kao imunosupresivi u terapiji upalnih bolesti crijeva

Azatioprin (AZA), 6-merkaptopurin (6-MP) te, u slučaju rezistencije ili intolerancije na prethodno navedene, 6-tiogvanin (6-TG) (Meijer i sur., 2016; Ward i sur., 2016) su antimetaboliti iz skupine analoga purina koji se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva (strukture prikazane na Slici 1). Pokazali su zadovoljavajuću učinkovitost u prevenciji relapsa i održavanju remisije, posebice kao alternativa kortikosteroidima (Frei i sur., 2013).



Slika 1. Strukture azatioprina (lijevo), 6-merkaptopurina (sredina) i 6-tiogvanina (desno) (Chemaxon, 2017)

Mehanizam djelovanja ovih lijekova se zasniva na:

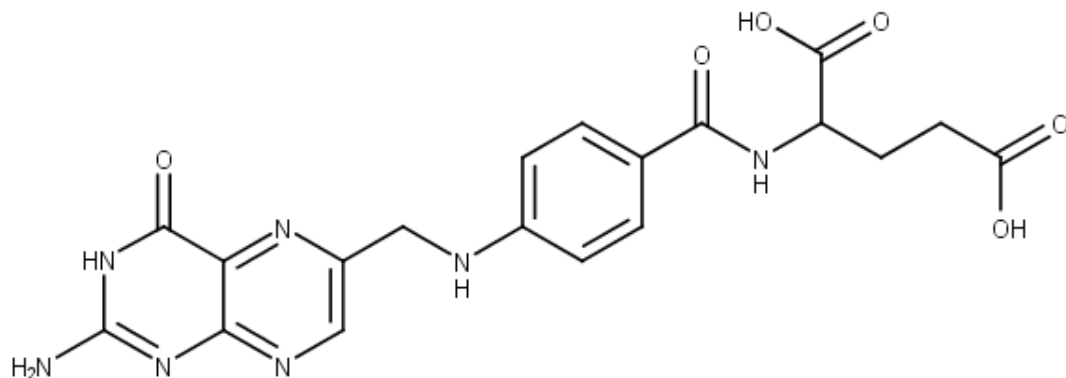
- aktivaciji u monofosfate, čime inhibiraju enzime *de novo* sinteze purina te
- aktivaciji u trifosfate, čime se ugrađuju u deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i ribonukleinsku kiselinu (RNK) te izazivaju apoptozu.

Ovisno o dozi i načinu primjene mogu djelovati imunosupresivno i citotoksično. Jedan od glavnih ciljeva terapije je tretirati i smanjiti upalne procese te održati remisiju (Sohrabpour i sur., 2010), što se analogima purina postiže uništavanjem stimuliranih limfoidnih stanica koje posreduju same upalne procese (McQuaid, 2012).

U Republici Hrvatskoj registrirana su dva pripravka s AZA: Atsimutin, filmom obložene tablete od 25 mg (PharmaSwiss, Češka Republika) i Imuran, filmom obložene tablete od 50 mg (Aspen Pharma Trading Limited, Irska). Oralna suspenzija od 20 mg/mL 6-MP pod nazivom Xaluprine (Nova Laboratories, Ujedinjeno Kraljevstvo) registrirana je centraliziranim postupkom od strane Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), dok registriranih pripravaka s 6-TG u Republici Hrvatskoj trenutno nema (www.halmed.hr).

1.3. Folna kiselina i upalne bolesti crijeva

Folna kiselina (engl. *folic acid*, FA), poznata i kao vitamin B₉ (Slika 2), vitamin je koji sudjeluje u biosintezi aminokiselina, purina i DNK.



Slika 2. Struktura folne kiseline (Chemaxon, 2017)

Redukcijom FA nastaje tetrahidrofolat koji je prijenosnik C₁ jedinice, tj. služi kao donor jednog ugljikovog atoma u različitim oksidacijskim stanjima potrebnog u gore navedenim biosintezama.

Osim kod nedovoljnog prehranbenog unosa, bolesti jetre i ovisnika o alkoholu (Masters, 2012), manjak FA javlja se i kod malapsorpcije, jednog od uobičajenih simptoma upalnih bolesti crijeva. Još prije 50 godina liječnici su utvrdili kako je manjak FA česta komplikacija kod upalnih bolesti crijeva (Hoffbrand i sur., 1968), a najnovija klinička ispitivanja potvrđuju ovu povezanost; štoviše, uočeno je kako je nedostatak ovog vitamina izraženiji kod pacijenata oboljelih od UC u odnosu na one oboljele od CD (Yakut i sur., 2010; Huang i sur., 2017; Schink i sur., 2017).

Pokazano je da suplementacija FA u pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva, osim sprječavanja pojave megaloblastične anemije uzrokovane manjkom istog vitamina (Masters, 2012), potencijalno smanjuje rizik razvoja kolorektalnog karcinoma (Burr i sur., 2017; Mason i Tang, 2017). Nadalje, suplementacija FA je nužna kod trudnica oboljelih od upalnih bolesti crijeva i to u većim dozama od onih preporučenih za zdrave trudnice (Alstead, 2002), dok je potreba za suplementacijom posebice naglašena kod trudnica koje u terapiji imaju sulfasalazin, aminosalicilat koji utječe na aktivnost enzima metaboličkog puta folata (Ng i Mahadevan, 2013). Ovakvom kombiniranom terapijom sprječava se pojava defekta neuralne cijevi ploda uzrokovanog nedovoljnim unosom FA (Masters, 2012).

U Republici Hrvatskoj registrirana su dva pripravka s FA: Elevit Pronatal, tablete koje sadrže 0,8 mg FA po tableti u kombinaciji s ostalim vitaminima i mineralima (Bayer, Njemačka) i Folacin, tablete od 5 mg (Jadran Galenski laboratorij, Republika Hrvatska) (www.halmed.hr).

1.4. Određivanje sadržaja djelatnih tvari u farmaceutskim formulacijama

Razvojem farmaceutske industrije javio se velik porast raznolikosti i broja ljekovitih farmaceutskih oblika, što uvjetuje i veću potrebu kontrole ovih pripravaka: potvrda identiteta djelatnih i pomoćnih tvari, čistoća, stabilnost, bioraspoloživost te sadržaj su samo neki od parametara koji se ispituju. Kako bi se osigurala kakvoća farmaceutskih pripravaka na tržištu, postavljeni su uvjeti, definirani u farmakopejama pojedinih zemalja i organizacija, kojima djelatne tvari, pomoćne tvari te gotove formulacije moraju odgovarati, ponajprije identitetom, sadržajem i čistoćom, kako bi bili prikladni za primjenu.

Sadržaj (količina djelatne tvari u ispitivanom uzorku) ima vodeći utjecaj na ishod terapije. Ukoliko je sadržaj djelatne tvari manji od onog navedenog na deklaraciji proizvoda, javlja se mogućnost subdoziranja pacijenta te izostanak farmakološkog učinka lijeka. S druge strane, u slučaju da lijek sadrži veću količinu djelatne tvari od one navedene na deklaraciji proizvoda, moguće je da će neželjene popratne pojave lijeka biti izraženije te je u konačnici moguće ozbiljno ugroziti zdravlje pacijenta. Iz navedenog proizlazi kako je određivanje sadržaja djelatne tvari jedna od ključnih stavki svakog ispitivanja kakvoće lijeka.

Analitičke tehnike koje se koriste za određivanje sadržaja djelatnih tvari u lijekovima mogu biti jednostavne, poput titracije ili UV-Vis spektrofotometrije, ali i složenije poput plinske kromatografije (engl. *Gas Chromatography*, GC) te tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Upravo je ova tehnika zbog svog brzog razvoja, velike mogućnosti razdvajanja analita te raznolikosti kolona i detektora danas najčešće primjenjivana tehnika za određivanje djelatnih tvari u formulacijama (Watson, 1999).

1.5. Bioanalitika – uloga analitičkih tehnika u terapijskom praćenju koncentracije lijekova

Pod pojmom „bioanalitika“ najčešće se podrazumijeva određivanje djelatne tvari ili njenih metabolita u biološkim uzorcima, poput krvi, plazme, seruma, urina ili tkivnih ekstrakata (Pandey i sur., 2010). Ova grana analitike u novije vrijeme je u značajnom porastu: terapijsko praćenje koncentracije lijeka i njegovih aktivnih metabolita u plazmi (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM), praćenje metabolizma lijekova određivanjem njihovih metabolita u urinu ili plazmi ili ispitivanje količine toksina u krvi, urinu ili kosi neke su od primjena ovog područja znanosti.

Bioanalitičku metodu moguće je razdvojiti u dva dijela: pripremu ili obradu uzorka te analizu samog uzorka, odnosno detekciju analita. Priprema uzorka obuhvaća prvenstveno obradu složenog biološkog uzorka u smislu uklanjanja sastavnica koje bi mogle interferirati detekciji analita. Budući da se kod ovih uzoraka ciljani analit često nalazi u vrlo niskim koncentracijama, priprema uzorka je usmjerena i na "ukoncentriravanje" analita, odnosno povećanje njegove koncentracije u uzorku, a sve u svrhu povećanja osjetljivosti metode. Najčešći postupci pripreme bioloških uzoraka su: uklanjanje proteina postupkom taloženja proteina (engl. *protein precipitation*, PP), ekstrakcija tekuće-tekuće ili ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) (Mornar i sur., 2013). Najnovija istraživanja upućuju da se u bioanalitici gotovo 80% vremena analitičara utroši na pripremu uzoraka (Nováková, 2013). Nadalje, ovaj korak bioanalitičke metode najčešće je uzrok slabe ponovljivosti i točnosti metoda, stoga je i za očekivati da se ovo područje posljednjih godina intenzivno razvija. S ciljem postizanja bolje selektivnosti, osjetljivosti, ponovljivosti, kao i automatiziranosti cjelokupnog postupka posljednjih godina razvijen je čitav niz novih tehnika poput: mikroekstrakcije čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME), *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE) i *Microextraction by Packed Sorbent* (MEPS).

Nakon obrade uzorci se analiziraju naprednim analitičkim instrumentalnim tehnikama među koje se ubraja najčešće primjenjivana tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MSⁿ). U svrhu identifikacije i određivanja lijekova i metabolita, molekula relativno male molekulske mase, u biološkim uzorcima kao sustav ionizacije analita najprikladnija je ionizacija pri atmosferskom tlaku, odnosno ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) i kemijska

ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) (Pandey i sur., 2010). Izvrsne performanse, posebice osjetljivost i ponovljivost, analizatora *triple quadropola* dovele su do činjenice da je ovaj detektor gotovo u potpunosti istisnuo detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) u većini bioanalitičkih laboratorija. Štoviše, novi modeli *triple quadropola* s iznimno kratkim vremenom prikupljanja signala iona m/z (engl. *dwell time*) omogućavaju istovremeno određivanje većeg broja analita s različitim molekulskim i fragmentnim ionima koji nisu u potpunosti kromatografski razdvojeni.

Dakle, HPLC-MSⁿ tehnika uz obradu uzoraka automatiziranim i inovativnim postupcima značajno je promijenila način provođenja bioanalitike te u konačnici i pristup terapijskom praćenju koncentracije lijekova i metabolita. Ove tehnike omogućile su znanstvenicima bolje razumijevanje učinkovitosti i metabolizma lijekova te su otvorile vrata individualiziranoj brizi za zdravlje pacijenata.

1.6. Pregled znanstvenih radova za određivanje azatioprina, 6-merkaptopurina, 6-tiogvanina i folne kiseline u formulacijama i plazmi HPLC-MS tehnikama

Iako se analizi purina već dugi niz godina koriste u terapiji IBD-a, pregledom literature utvrđeno je kako je do sada predložen manji broj analitičkih metoda za određivanje ovih lijekova u tabletama i biološkim uzorcima; isto je moguće utvrditi i za folnu kiselinu. Premda se ovi lijekovi često koriste zajedno u terapiji, do sada nije predložena niti jedna analitička metoda za istovremeno određivanje svih navedenih lijekova niti u gotovim ljekovitim oblicima niti u plazmi/serumu pacijenata. Kako bi se utvrdilo postoje li zajedničke točke objavljenih metoda za određivanje navedenih lijekova (poput pokretnih faza, ekstrakcijskih otapala itd.) kao polazište za razvoj nove metode za istovremeno određivanje ciljane skupine lijekova, u nastavku su prikazani uvjeti i postupci razvijenih HPLC i HPLC-MS metoda za određivanje AZA, 6-MP, 6-TG i FA.

1.6.1. Azatioprin

Shi i suradnici (2006) predložili su metodu za istovremeno određivanje AZA i njegova metabolita 6-MP u plazmi. Kao nepokretna faza korištena je C18 kolona, dok se pokretna faza sastojala od acetonitrila, vode i mravlje kiseline u omjerima 3:97:0,25 (V/V/V). Detekcija je provedena UV-Vis detektorom na valnoj duljini od 323 nm, a za pripremu uzorka plazme koristili su postupak taloženja proteina organskim otapalom, odnosno acetonitriplom. Nadalje,

metodu za određivanje AZA i 6-MP u plazmi razvili su i Raja i suradnici (2012). Za razliku od gore opisane metode, predobradba uzorka plazme uključivala je složeniju pripremu uzoraka, odnosno ekstrakciju čvrstom fazom. Kao nepokretna faza koristila se Zorbax SB CN kromatografska kolona, dok se kao pokretna faza koristila smjesa acetonitrila te 2 mM vodene otopine amonijevog acetata (70:30 V/V). Detekcija i određivanje provedeni su spektrometrijom masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS), korištenjem ionizacije elektroraspršenjem. Metoda se pokazala vrlo osjetljivom budući da je granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) za AZA bila manja od 2,5 ng/mL, dok je za 6-MP bila manja od 1,2 ng/mL, kao i točnom (rezultati analitičkih prinosa tableta bili su u rasponu od 95 do 105% na 5 koncentracija). S druge strane, metoda je bila niže preciznosti te je relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD), tj. omjer standardnog odstupanja i srednje vrijednosti pri određenim koncentracijama dosegalo do 13,44%.

Skupina indijskih znanstvenika (Satishchandra i sur., 2017) dala je prijedlog HPLC metode za određivanje AZA u formulacijama. Razdvajanje analita od ostalih sastavnica formulacije postignuto je primjenom C18 kolone, dok su kao pokretnu fazu primijenili acetonitril i acetatni pufer u omjeru 70:30 (V/V). Konačno, detekcija je provedena na 240 nm. Druga metoda (Ravisankar i sur., 2015) također je koristila C18 kolonu te acetonitril i vodu (50:50, V/V) zakiseljene fosfornom kiselinom kao pokretnu fazu. Standard AZA otopljen je u pokretnoj fazi, a u svrhu određivanja primijenjena je UV-Vis detekcija snimanjem na 276 nm.

1.6.2. 6-merkaptopurin

Usporedbom s ostalim lijekovima koje obuhvaća ovo istraživanje, moguće je utvrditi da je najveći broj metoda razvijen upravo za 6-MP. Kako je on metabolit AZA, razvijene su metode koje određuju oba lijeka u plazmi (Shi i sur., 2006; Raja i sur., 2012). Većina metoda za njihovo određivanje u plazmi koristi nepolarnu nepokretnu fazu (C8 ili C18), s acetonitriplom i puferom, bilo fosfatnim ili amonijevim kao pokretnom fazom (Hawwa i sur., 2009; Tolbert i sur., 2017; Kulkarni i sur., 2016). Odabir pufera koji se koristio u izradi pokretne faze prvenstveno je ovisio o odabranom detektoru. Potrebno je istaknuti kako za izradu standardne otopine sve metode koriste otapalo lužnatog pH, tj. vodenu otopinu NaOH ili smjesu vodene otopine NaOH te metanola; provedenim istraživanjima je utvrđeno kako lužnati pH otapala pospješuje otapanje gore navedenih analita. Za određivanje ovih lijekova korištena je UV-Vis detekcija s postavkama valnih duljina u rasponu od 320 do 340 nm (točnije, 322, 324, 325 i 340 nm), a predobradba uzorka plazme provedena je postupkom

taloženja proteina. U svrhu određivanja lijeka u formulacijama, Somasekhar (2014) predložila je obrnuto-faznu HPLC metodu uz detekciju na 324 nm. Standard je otopljen u 0,1 M otopini NaOH; ekstrakcija analita iz tableta provedena je istim otapalom, s tim da je oslobađanje aktivne tvari iz tableta pospješeno sonifikacijom. Konačno je potrebno istaknuti najveću prednost ovih metoda: sve opisane metode kratkog su trajanja, s vremenom zadržavanja (t_R) analita ispod 5 minuta.

Zanimljivo je uočiti kako postoji razvijena metoda za određivanje 6-MP u plazmi i formulacijama (Naik i Nandibewoor, 2013). Uz C18 kolonu, korištena je pokretna faza koja se sastoji od metanola i vode u omjeru 90:10 (V/V), a detekcija je provedena pri 325 nm. Ekstrakcija iz tableta, kao i taloženje proteina iz plazme, provedena je velikim količinama samog metanola kompliciranim postupkom sonificiranja te ponovljenih filtriranja, što umanjuje vrijednost metode za rutinske analize.

1.6.3. 6-tiogvanin

S obzirom da se 6-TG i 6-MP razlikuju samo u jednoj funkcionalnoj skupini, očekuje se kako će uvjeti analize biti slični za ova dva spoja. S ciljem istovremenog određivanja ova dva spoja te metotreksata u plazmi djece, Al-Ghobashy i suradnici (2016) razvili su RP-HPLC-MS metodu. Za razdvajanje analita primijenjena je C18 kolona, a elucija izvršena smjesom acetonitrila i mravlje kiseline (85:15 V/V). Detekcija je za 6-MP provedena na m/z vrijednosti od 153,0, a za 6-TG na 168,01. Američki znanstvenici (Kitchen i sur., 1997) također su predložili RP-HPLC metodu uz C18 kolonu te acetonitril i acetatni pufer. Detekciju su provodili pri 340 nm, a 6-TG imao je vrijeme zadržavanja oko 6 minuta. Metoda uz izokratnu eluciju na koloni srednje polarnosti te pokretnom fazom koja se sastoji od fosfatnog pufera i acetonitrila (99:1 V/V) također je predložena za određivanje 6-TG i 6-MP u plazmi (Cangemi i sur., 2012), no ukupno trajanje pojedine analize iznosilo je oko 20 minuta. Usporedivši ovu metodu s gore opisanima moguće je utvrditi da je značajno duža od ostalih. Osim u već spomenutom zaluženom metanolu, standardne otopine pripremljene su otapanjem i u zaluženoj ultračistoj vodi.

1.6.4. Folna kiselina

Kineski znanstvenici (Zheng i sur., 2015) su s ciljem određivanja FA te njenih metabolita u ljudskoj plazmi predložili HPLC-MSⁿ metodu uz korištenje unutarnjeg standarda (engl. *internal standard*, IS) moksonidina te dodatak antioksidansa 2-merkaptotetanolu kako bi

osigurali stabilnost FA u uzorcima. Korištenjem smjese acetonitrila te amonijeva acetata kao pokretne faze te C18 kolone s pretkolonom kao nepokretne faze razvijena je brza i selektivna metoda. Detekcija analita prvodila se na m/z vrijednosti od 442. U svrhu otapanja standarda koristili su pokretnu fazu, a kao postupak predobradbe uzorka plazme preferiraju taloženje proteina metanolom naspram ekstrakcije čvrstom fazom zbog jednostavnije i brže procedure.

Što se tiče formulacija, razvijena je metoda za istovremeno određivanje FA i metotreksata (Jogi i sur., 2016). C18 kolona te acetonitril : ortofosforna kiselina korišteni su kao nepokretna i pokretna faza, a UV detekcija provedena je na 215 nm. Metoda se pokazala vrlo brzom, s vremenom zadržavanja FA od svega 2,8 minuta.

1.6.5. Zaključci pregleda znanstvenih radova

Svi pregledani znanstveni radovi koristili su tehniku obrnuto-fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Većinom su primjenjivane C8 ili C18 kolone, uz smjesu acetonitrila i vodene otopine pufera ili kiseline kao pokretne faze. Standardi su najčešće otapani u otopinama lužnatog pH, bilo samo vodene faze ili smjese vodene i organske faze, najčešće metanola. Mali broj radova bavio se ekstrakcijom analita iz formulacija, gdje su također korišteni zalučeni metanol ili voda. Što se tiče UV-Vis spektra analita, njihovi apsorpcijski maksimumi znatno se razlikuju, stoga će se morati primijeniti više valnih duljina snimanja, a u slučaju spektrometrije masa, većinom je korištena ionizacija elektroraspršenjem. Kod predobradbe uzoraka plazme, manji broj istraživača odlučio se za ekstrakciju čvrstom fazom, dok je većina koristila postupak taloženja proteina, korištenjem acetonitrila ili metanola kao sredstva za taloženje. Ova saznanja biti će primijenjena u orijentaciji za razvoj metode.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Najnovija istraživanja upućuju na porast broja pacijenata oboljelih od IBD u svijetu općenito (M'Koma, 2013; Burisch i Munkholm, 2015; Ananthakrishnan, 2015). Potrebno je istaknuti kako se najznačajniji porast javlja od druge polovice 20. stoljeća te se procjenjuje kako preko 2,5 milijuna Europljana boluje od tih bolesti (Kaplan, 2015).

Budući da je folna kiselina, tj. vitamin B₉, ključan vitamin za normalnu sintezu aminokiselina i sastavnica DNK, njen deficit, čest simptom IBD-a, može dovesti do stanja poput megaloblastične anemije, kao i povećanog rizika kolorektalnog karcinoma. Kod trudnica općenito, preporučeno je povećan unos folne kiseline u svrhu sprječavanja defekata neuralne cijevi ploda, a kod trudnica oboljelih od IBD-a zbog gore navedenih razloga posebno je potrebno provoditi suplementaciju folnom kiselinom. Novija istraživanja su pokazala kako su analozi purina prihvatljivi za primjenu u trudnica s IBD-om (van den Berg i sur., 2016; Coelho i sur., 2011; Casanova i sur., 2013). Na tržištu za sada ne postoji dvokomponentni lijek koji bi sadržavao jedan od navedenih imunosupresiva te folnu kiselinu; međutim, takav dvokomponentni lijek zasigurno bi bio koristan u poboljšanju suradljivosti pacijenata oboljelih od IBD-a, jednog od čestog uzročnika relapsa bolesti.

Glavni je cilj ovog rada razviti kromatografsku metodu koja bi predstavljala analitičku podršku razvoju gore navedene formulacije. Pregledom znanstvene literature utvrđeno je kako ne postoji analitička metoda za istovremeno određivanje analoga purina te folne kiseline niti u formulacijama niti u plazmi. Stoga je jedan od ciljeva ovog rada predložiti metodu za istovremeno određivanje navedenih lijekova u komercijalno dostupnim formulacijama. Prilikom razvoja metode posebna pažnja posvetit će se načelima „zelene kemije“, odnosno pristupu osmišljavanju kemijskih procesa, proizvoda i metoda kojim se minimizira stvaranje toksičnih produkata i otpada (www.acs.org). Nadalje, ispitivanje selektivnosti predložene metode biti će usmjereno na mogućnost primjene najčešće korištenih ekscipijensa u pripremi nove formulacije. Konačno, postaviti će se temelji za razvoj bioanalitičke metode koja bi se koristila u terapijskom praćenju navedenih lijekova.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- 2-amino-6-merkaptopurin $\geq 95\%$, $M_r=181,22$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 6-merkaptopurin, analitički standard, $M_r=152,18$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 6-tiogvanin $\geq 98\%$, $M_r=167,19$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- acetonitril, HPLC čistoće, $\geq 99,9\%$, $M_r=41,05$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- azatioprin, farmaceutski sekundarni standard, potvrđena poredbena tvar, $M_r=277,26$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- etanol, HPLC čistoće, $M_r=41,07$ (J.T.Baker, Center Valley, SAD)
- folna kiselina, odgovara USP specifikacijama, $M_r=441,40$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- metanol, HPLC čistoće, $M_r=32,04$ (J.T.Baker, Center Valley, SAD)
- mravlja kiselina p.a. 98-100%, $M_r=46,03$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid, $M_r=39,99$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- umjetna plazma Precicontrol ClinChem Multi 2 (Roche, Basel, Švicarska)
- ultračista voda (pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Millipore, Bradford, SAD)
- Imuran 50 mg filmom obložene tablete (Aspen Pharma Trading Limited, Dublin, Irska)
- Folacin 5 mg tablete (JGL, Rijeka, Hrvatska)
- Puri-Nethol 50 mg tablete (Aspen, München, Njemačka)
- Tioguanine ACE 10 mg tablete (ACE Pharmaceuticals, Zeevolde, Nizozemska)
- pšenični škrob (*Triticum amyllum*), odgovara zahtjevima Ph. Eur. 9 (Kemig, Zagreb, Hrvatska)

- rižin škrob (*Oryzae amylum*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- kukuruzni škrob (*Maydis amylum*) (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- magnezijev stearat 3,8-5,0% Mg, $M_r = 591,27$ (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- stearinska kiselina, $M_r = 284,48$, odgovara zahtjevima Ph. Eur. 9 (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- laktoza monohidrat, odgovara zahtjevima Ph. Eur. 9 (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- hidroksipropilmetilceluloza Methocel K100M Premium CR (Colorcon, Harleysville, SAD)
- Dušik > 99,999% V/V (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)
- Helij > 99,999% V/V (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

3.1.2. Radni instrumenti i pribor

U izradi ovog rada korišteni su sljedeći radni instrumenti i pribor:

- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- analitička vaga MX5 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- celulozni nitratni membranski filteri za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji veličine pora 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- centrifuga Jouan MR23i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- centrifuga mini G, 6000 okretaja u minuti (IKA, Staufen im Bresgau, Njemačka)
- generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Inchinnan, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- HPLC kolona Symmetry C18, dimenzija 4,6 \times 150 mm, veličine čestica punila 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- HPLC kolona XBridge Phenyl, dimenzija 4,6 \times 150 mm, veličine čestica punila 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)

- HPLC kolona Zorbax SB C8, dimenzija 4,6 × 150 mm, veličine čestica punila 5 μm s pretkolonom (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Luer slip šprica (Becton Dickinson and Co., Madrid, Španjolska)
- mikropipete Rainin Pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS, L-20 LTS i L-200 LTS (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- odmjerne tikvice od 10,0 i 500,0 mL
- PES filtar za šprice s veličinom pora 0,45 μm (Obrnuta faza d.o.o., Pazin, Hrvatska)
- Phree Phospholipid Removal (Phenomenex, Torrance, SAD)
- plastične epruvete od 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- stakleni sustav za filtriranje pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- tamne bočice za uzorkovanje od 2 mL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj Elmasonic S30H (Elma Ultrasonic, Singen, Njemačka)
- vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- vortex miješalica Lab Dancer (IKA, Staufen im Bressgau, Njemačka)

3.1.3. Programi i programski paketi

- računalni program Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, SAD)
- programski paket za obradu podataka Chemstation for LC 3D A10.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- programski paket za obradu podataka MSD Trap Control v.5.2. (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- *on-line* platforma za *in silico* predviđanje fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava Chemicalize (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska)

3.2. Metode

Identifikacija i određivanje AZA, 6-MP, 6-TG i FA u tabletama i smjesi sastojaka ljudske plazme, tzv. „umjetnoj plazmi“, provedeni su primjenom HPLC-MSⁿ tehnike.

3.2.1. *In silico* predviđanja

In silico predviđanja log D vrijednosti analita provedena su *on-line* platformom Chemicalize (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska)

3.2.2. Priprema poredbenih otopina

3.2.1.1. Matične otopine

Matične otopine AZA, 6-MP, 6-TG i IS koncentracije 0,1 mg/mL pripremljene su otapanjem 1 mg svakog od standarda u 10,0 mL otapala koje se sastoji od metanola i 0,1 M otopine NaOH u omjeru 95:5 (V/V) te sonificiranjem na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta u svrhu osiguravanja potpunog otapanja.

Matična otopina FA koncentracije 0,1 mg/mL pripremljena je otapanjem 1 mg FA u 10,0 mL otapala koje se sastoji od metanola, ultračiste vode i 0,1 M otopine NaOH u omjeru 70:29:1 (V/V/V) te sonificiranjem na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta u svrhu osiguravanja potpunog otapanja.

Matične otopine čuvane su pri 4 °C, zatvorene i zaštićene od svjetlosti.

3.2.1.2. Radne otopine

Radne otopine pripremljene su u koncentracijama od 2,5, 5, 10, 15 i 20 µg/mL razrjeđivanjem matičnih otopina AZA, 6-MP, 6-TG i FA s ultračistom vodom uz dodatak 100 µL matične otopine IS. Nakon miješanja na vortex miješalici otopine su pohranjene u tamnim bočicama za uzorkovanje u automatskom injektoru na 4 °C.

3.2.3. Priprema formulacije tablete za analizu

Jednaka količina najčešće korištenih ekscipijensa u formulacijama tableta (pšenični škrob, rižin škrob, kukuruzni škrob, magnezijev stearat, stearinska kiselina, laktoza monohidrat i hidroksipropilmetilceluloza) suspendirana je u 10,0 mL otopine koja se sastoji od metanola, ultračiste vode i radne otopine standarda koncentracije 20 µg/mL u omjeru 55:40:5 (V/V/V). Suspenzija je sonificirana na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, centrifugirana

15 minuta na 6000 okretaja u minuti te je supernatant prenešen u tamnu bočicu za uzorkovanje. Slijepa proba priprema se na identičan način uz dodatak metanola umjesto radne otopine standarda u smjesu.

3.2.4. Priprema uzoraka tableta za analizu

Izvagano je i usitnjeno po 10 tableta svakog od navedenih: Imuran, Folacin, Tioguanin ACE te Puri-Nethol. Količine usitnjenih tableta ekvivalentne 10 mg analita prenesene su u odmjernu tikvicu od 10,0 mL, dodan je unutarjni standard te je tikvica nadopunjena do oznake ekstrakcijskim otapalom (metanol i 0,1 M otopina NaOH u omjeru 50:50, V:V). Ekstrakcija se ubrzava sonificiranjem na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, nakon čega se sadržaj tikvice centrifugira 2 minute na 6000 okretaja u minuti. Otopina se razrijedi 100 puta s ultračistom vodom te se prenese u tamnu bočicu za uzorkovanje.

3.2.5. Priprema uzoraka umjetne plazme za analizu

Postupak taloženja proteina (PP): u Eppendorf epruvetu pipetiraju se umjetna plazma i radna otopina standarda koncentracije 15 µg/mL u omjeru 1:4 (V/V) te promiješaju na vortex miješalici. Smjesa se centrifugira 10 minuta na 6000 okretaja u minuti u svrhu odvajanja istaloženih proteina, nakon čega se supernatant filtrira kroz PES filter veličine pora 0,45 µm te prenosi u tamnu bočicu za uzorkovanje. Slijepa proba priprema se na jednak način, s razlikom dodatka smjese metanola i 0,1 M otopine NaOH u omjeru 95:5 (V/V) umjesto radne otopine koncentracije 15 µg/mL.

Postupak ekstrakcije čvrstom fazom (SPE): Na Phree Phospholipid Removal kolonu nanose se umjetna plazma i radna otopina standarda koncentracije 20 µg/mL u omjeru 1:4 (V/V) te promiješaju na vortex miješalici. Smjesa se centrifugira 15 minuta na 15000 okretaja u minuti pri 5000g, pri čemu se eluent skuplja u Eppendorf epruvetu, filtrira kroz PES filter veličine pora 0,45 µm te prenosi u tamnu bočicu za uzorkovanje. Slijepa proba priprema se na identičan način, s razlikom dodatka smjese metanola i 0,1 M otopine NaOH u omjeru 95:5 (V/V) umjesto radne otopine koncentracije 20 µg/mL.

3.2.6. Uvjeti kromatografske analize

Kromatografska analiza provedena je na Zorbax SB C8 koloni (dimenzije 4,6 × 150 mm, veličina čestica punila 5 µm) uz korištenje pretkolone. Kao sastavnica A pokretne faze primijenjena je smjesa ultračiste vode i mravlje kiseline u omjeru 99,9:0,1 (V/V). Kao

sastavnica B pokretne faze primijenjena je smjesa acetonitrila i mravlje kiseline u omjeru 99,9:0,1 (V/V). Sastavnice su profiltrirane pomoću sustava za filtriranje pokretnih faza i celuloznog nitratnog membranskog filtera veličine pora 0,45 µm.

Korištena je gradijentna elucija te su volumni udjeli sastavnica pokretne faze u određenim točkama analize prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Gradijentni program analize

<i>t/min</i>	$\varphi_A/ \%$	$\varphi_B/ \%$
0	95	5
3	80	20
9	30	70

Nakon provedene analize, tijekom 10 minuta provedena je priprema kromatografske kolone za analizu sljedećeg uzorka.

Protok pokretne faze iznosio je 1 mL/min, a temperatura kolone iznosila je 25 °C. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 10,0 µL. Uzorci su tijekom analize čuvani u autoinjektoru pri temperaturi od 4 °C. Detekcija i određivanje provodili su se na valnim duljinama od 280, 320 i 343 nm.

3.2.7. Uvjeti spektrometrije masa

Detekcija analita na spektrometru masa provedena je uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Broj iona u stupici iona iznosio je 30000, s vremenom zadržavanja iona u stupici od 200 ms. Kao plin nebulizator korišten je dušik protoka 10 L/min, uz primjenu tlaka od 15 psi, a napon na kapilari iznosio je 3,5 kV. Temperatura ionizatora bila je 350 °C. Za fragmentacije primijenjen je helij tlaka 6×10^{-6} mbar. Spektar snimanja masa iona postavljen je u rasponu od 100 do 600 *m/z*.

3.2.8. Validacija metode

Validacija metode provedena je prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) (ICH Secretariat,

2005). Ispitani su sljedeći validacijski parametri: selektivnost, linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja, preciznost, točnost, izdržljivost i stabilnost.

3.2.9. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata provedena je računalnim programom Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. *In silico* predviđanje $\log D$ vrijednosti analita

Kako ne postoje podaci o istovremenoj kromatografskoj analizi AZA, 6-MP, 6-TG i FA, razvoj metode započeo je *in silico* istraživanjem. Navedenim pristupom ispitala su se fizikalno-kemijska svojstva navedenih lijekova u svrhu predviđanja njihovog ponašanja na kromatografskim kolonama. Kako svi analiti posjeduju ionizirajuće skupine, očekivano je da $\log P$ parametar neće biti mjerodavan pokazatelj lipofilnosti, odnosno njihova kromatografskog ponašanja. Stoga se u istraživanju pristupilo određivanju $\log D$ vrijednosti pri različitim pH pokretne faze pomoću *on-line* platforme Chemicalize u svrhu utvrđivanja optimalnog pH za analizu (tablica 2).

Tablica 2. Predviđene $\log D$ vrijednosti analita za pH pokretne faze 2, 4, 7 i 10

analit	$\log D_{\text{pH}=2}$	$\log D_{\text{pH}=4}$	$\log D_{\text{pH}=7}$	$\log D_{\text{pH}=10}$
AZA	0,847	1,166	1,164	0,312
6-MP	-0,905	-0,159	-0,122	-0,146
6-TG	-2,193	-0,981	-0,351	-0,394
FA	-0,887	-1,275	-6,504	-7,461

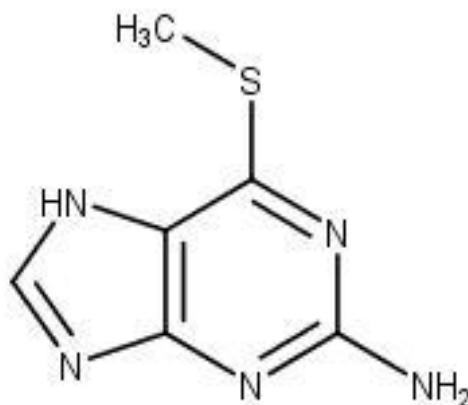
Iz tablice 2 vidljivo je kako se pri višim pH vrijednostima $\log D$ FA značajno razlikuje od $\log D$ vrijednosti ostalih analita. Iz dobivenih rezultata bilo je za očekivati i preveliku razliku u vremenima zadržavanja do razine neisplativosti ili predugog trajanja analize pri visokim pH vrijednostima. Pri nižim pH vrijednostima predviđene $\log D$ vrijednosti dovoljno se razlikuju kako bi se analiti u potpunosti mogli odijeliti, a da to ne utječe nepovoljno na vrijeme trajanja kromatografske analize. S obzirom na dobivene rezultate *in silico* istraživanja, niski pH je odabran kao pokretna faza, tj. za početne uvjete odabrani su ultračista voda i acetonitril zakiseljeni mravljom kiselinom.

Nadalje, s obzirom na dobivene vrijednosti $\log D_{\text{pH}=2}$, za preliminarna istraživanja odabrane su nepolarne pokretne faze poput fenil, C8 ili C18 kromatografskih kolona.

4.2. Razvoj i optimizacija HPLC-DAD-MSⁿ metode

Nakon *in silico* istraživanja pristupilo se optimizaciji kromatografske metode. Optimizacija je provedena tako da je postepeno svaki parametar metode promijenjen te se pratio utjecaj na ili razlučivanje između kromatografskih pikova ili njihovu površinu.

Kako bi se postigla bolja ponovljivost pripreme uzoraka i njihove analize u vidu eliminacije pogrešaka instrumenta poput varijacija u volumenu injektiranja te varijacije prilikom pripreme uzoraka poput gubitaka analita tijekom postupka te osiguralo što točnije i preciznije određivanje analita, kao IS korišten je analitima strukturno sličan 2-amino-6-metilmerkaptopurin (slika 3).



Slika 3. Struktura IS (Chemaxon, 2017)

4.2.1. Odjeljivanje ispitivanih spojeva

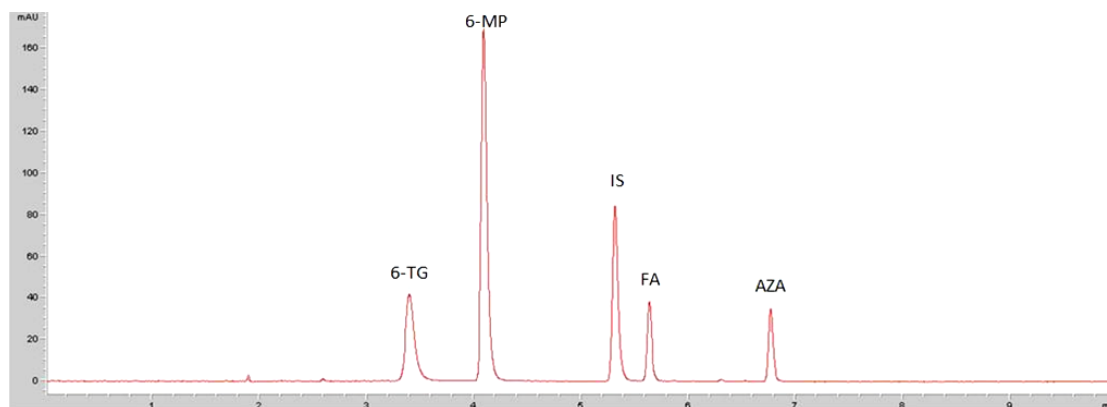
Kromatografska kolona ima vodeći utjecaj na selektivnost metode te je tijekom optimizacije metode ispitan utjecaj triju različitih obrnuto faznih kromatografskih kolona na razlučivanje pikova:

- Symmetry C18, veličine čestica punila 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- Xbridge Phenyl, veličine čestica punila 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- Zorbax SB C8, veličine čestica punila 5 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Duljina kromatografske kolone može imati značajan utjecaj na vrijeme zadržavanja analita, kao i na razlučivanje analita. Nadalje, širina kolone značajno utječe na širinu kromatografskih pikova te posljedično i selektivnost metode. Kako bi se uklonio utjecaj navedenih parametara odabrane su kolone istih dimenzija, odnosno $4,6 \times 150$ mm. Uporabom Symmetry C18 i Xbridge Phenyl kolona dobiveni pikovi bili su razvučeni i pokazivali nezadovoljavajuće razdvajanje (rezultati preliminarnih istraživanja nisu uključeni u rad), dok se uporabom Zorbax SB C8 kolone postiglo dostatno razdvajanje analita i IS, kao i zadovoljavajuća simetrija pikova, stoga je ova kolona odabrana za daljnja istraživanja.

Nakon odabira nepokretne faze pristupilo se odabiru pokretne faze. Pri tome je bilo potrebno odabrati i sastav pokretne faze i način elucije sastavnica uzorka. Zbog većih razlika u lipofilnosti analita isključena je mogućnost primjene izokratne elucije jer bi se tako nepotrebno produljilo vrijeme analize te smanjila ekonomičnost, stoga je odabrana gradijentna elucija. Većim nagibom krivulje ovisnosti udjela organske faze o vremenu ubrzava se elucija nepolarnijih analita te samim time i skraćuje vrijeme trajanja analize, no tako se smanjuje i razlučivanje te pikovi mogu koeluirati. Nadalje, nagle promjene u sastavu pokretne faze mogu imati utjecaj na baznu liniju kromatograma. U suprotnom slučaju, kod manjeg nagiba krivulje nepolarniji analiti sporije eluiraju, čime se povećava vrijeme trajanja analize te potrošnja otapala korištenih za pripremu pokretne faze. Odabranim uvjetima, prikazanima u Tablici 1, se postiglo kratko trajanje analize, prikladno razlučivanje pikova, kao i izgled, čime se skratilo vrijeme analize uz zadržavanje dostatne razlučivosti, kao i izgleda bazne linije.

Na slici 4 prikazan je kromatogram radne otopine standarda koncentracije $10 \mu\text{g/mL}$ snimljen na Zorbax SB C8 koloni uz optimiziran gradijent pokretne faze. Detekcija je provedena detektorom s nizom dioda snimanjem na valnoj duljini od 320 nm.



Slika 4. Kromatogram radne otopine standarda koncentracije $10 \mu\text{g/mL}$ snimljen na 320 nm

Na priloženom kromatogramu vidljivo je kako su svi pikovi simetrični te jasno razdvojeni. Srednje vrijednosti vremena zadržavanja i odgovarajuće RSD vrijednosti za 6 mjerenja prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Vremena zadržavanja analita i unutarnjeg standarda uz pripadajuće RSD vrijednosti

analit	\bar{t}_R/min ($n=6$)	RSD (%)
6-TG	3,38	0,47
6-MP	4,08	0,22
IS	5,29	0,11
FA	5,61	0,16
AZA	6,74	0,18

Potrebno je istaknuti kako je redoslijed elucije analita sukladan $\log D$ vrijednostima predviđenim programom Chemicalize. Naime, negativnija vrijednost $\log D$ znači da je pojedini analit hidrofilniji u odnosu na onaj za kojeg je predviđena vrijednost veća, te se za takav analit može očekivati i kraće vrijeme zadržavanja na nepolarnoj, tj. hidrofobnoj koloni. Na ovaj način se uspješno povezala struktura analita s njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima te posljedično ponašanjem u kromatografskom sustavu. Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost primjene navedenog programa u istraživanjima kvantitativnog odnosa strukture i kromatografskog zadržavanja (engl. *Quantitative Structure-Retention Relationship*, QSRR).

4.2.2. Odabir detektora i identifikacija analita

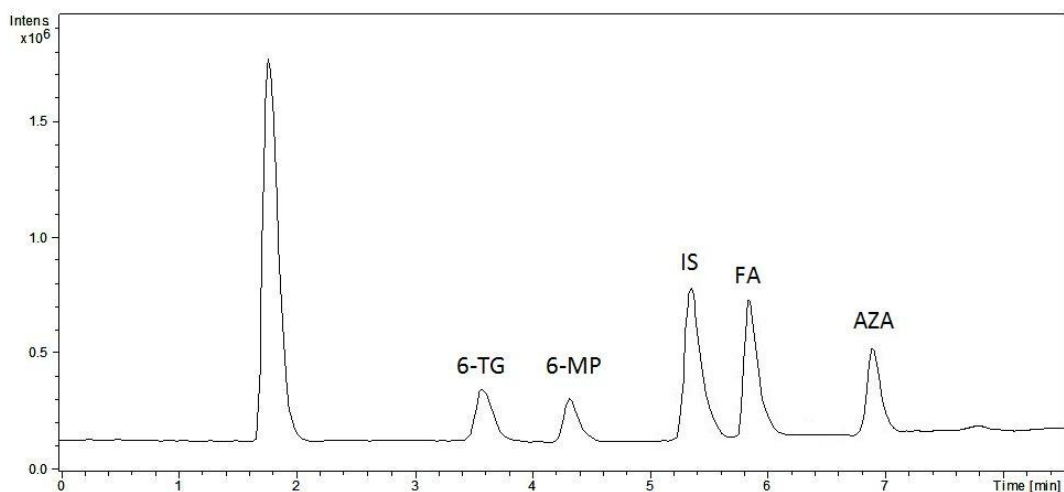
U svrhu identifikacije te kasnije moguće primjene u određivanju analita, ispitane su tri vrste detektora: DAD detektor, fluorescencijski detektor (FLD) te MS detektor.

DAD detektor je, zbog svoje niske cijene i jednostavne uporabe, jedan od najčešće korištenih detektora za identifikaciju mnoštva spojeva. Primijenjen je u metodama za određivanje 6-MP i 6-metilmerkaptopurina u plazmi (Harahap i sur., 2017), kao i za određivanje 6-TG i njegovih nukleotida u krvi (Barco i sur., 2015). U slučaju metode predložene u ovom radu, primjena DAD-a daje prikladan signal te je moguće identificirati analite te IS prema maksimumima apsorpcije u njihovim UV-Vis spektrima. Pikovi dobiveni

ovim detektorom su zadovoljavajućih površina, pa će se DAD razmatrati i za korištenje u određivanju analita.

FLD nalazi primjenu u analizi vitamina B skupine poput FA, cijanokobalamina, riboflavina i tiamina, videći kako oni pokazuju svojstvo fluorescencije (Osseyi i sur., 2001; Li i sur., 2000; Yang i sur., 2016; Gatti i Gioia, 2005). U svrhu određivanja FA u pekarskim proizvodima primijenili su ga Osseyi i suradnici (2001), uz valnu duljinu ekscitacije od 290 nm, a valnu duljinu emisije 450 nm, a u istu svrhu primijenila ga je i skupina švedskih znanstvenika (Pating i sur., 2005), no s valnom duljinom ekscitacije od 290 nm, a emisije od 360 nm. No, unatoč primjeni sličnih uvjeta (valne duljine ekscitacije od 290 nm te valne duljine emisije 350 te 450 nm), FLD se pokazao neprikladnim za razvijanu metodu u ovom radu. Dobiveni pik FA bio je razvučen, dok je bazna linija pokazivala veliku količinu šuma (rezultati preliminarnih istraživanja nisu uključeni u rad). Kako je FA dala dobar odziv na DAD detektoru, FLD nije uključen u daljnji razvoj metode.

MS detektor pruža visoku specifičnost pri određivanju ili potvrdi identiteta ili strukture analita; uz to, često je korišten i u identifikaciji onečišćenja u lijekovima ili ekscipijensima (Watson, 1999). U vidu analoga purina, korišten je za identifikaciju i određivanje AZA, 6-MP i njihovih metabolita (Raja i sur., 2012). Nelson i suradnici (2006) su, s druge strane, ovaj detektor primijenili za identifikaciju i određivanje FA u formulacijama, dok su ga Kiekens i suradnici (2015) koristili za određivanje folata u plazmi i eritrocitima, što znači da je pogodan za primjenu u identifikaciji svih analita određivanih ovom metodom. Pregledom MS i MS² spektara moguće je identificirati svaki od pojedinih spojeva s većom pouzdanošću nego pregledom maksimuma apsorpcije UV-Vis spektara. Osim toga, interpretacijom navedenih spektara može se pretpostaviti mogući put fragmentacije analita, što kasnije može koristiti u razvoju metode za identifikaciju i određivanje onečišćenja u formulacijama ili metabolita u plazmi, tako da je MS detektor odabran za identifikaciju analita. Stoga su odijeljeni analiti te IS propušteni kroz spektrometar masa te je snimljen kromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Current*, TIC) (slika 5).



Slika 5. TIC kromatogram radne otopine standarda

Iz priloženog kromatograma jasno su vidljivi pikovi sva četiri analita te IS (pik na $t_R = 1,9$ min pripada otapalu). Kao što se očekivalo, vremena zadržavanja analita očitana na masenom spektrometru su pomaknuta u odnosu na ona snimljena DAD-om zbog redoslijeda spajanja detektora ($\Delta t_R \approx 0,2$ min).

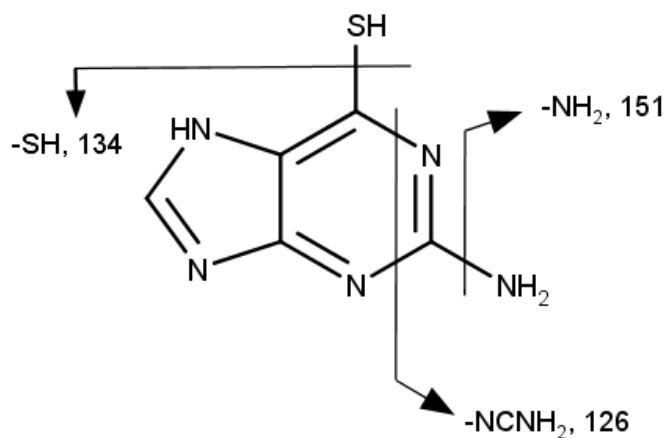
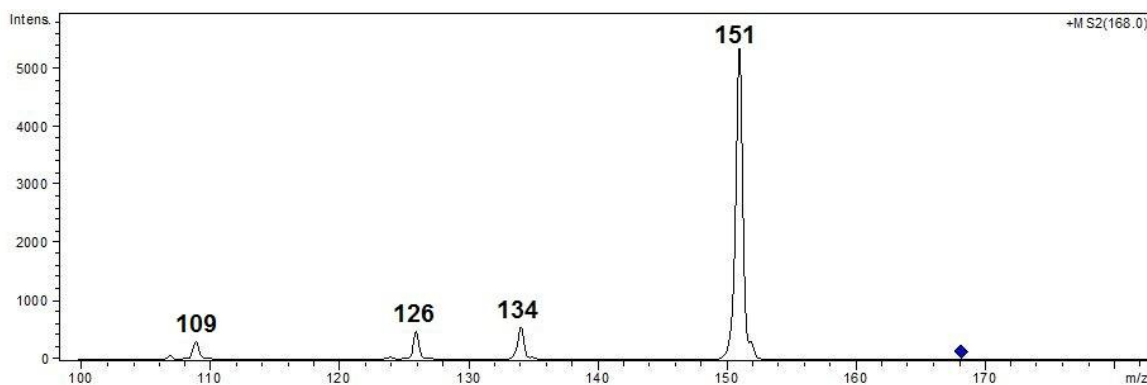
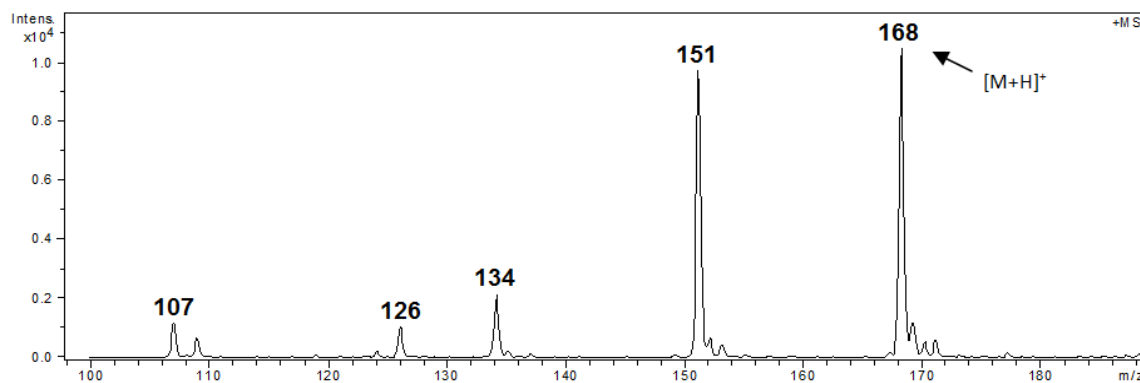
Pregledom masenih spektara svakog od pikova identificiralo se spojeve prema vrijednostima m/z omjera njihovih pseudomolekulskih i fragmentnih iona. Maseni spektri 6-TG, 6-MP i IS pokazali su kao najintenzivnije ione pseudomolekulske ione te je daljnja identifikacija provedena fragmentiranjem navedenih: 6-TG pri m/z 168, 6-MP pri m/z 153 te IS pri m/z 182. FA i AZA, s druge strane, su se pokazale nestabilnim molekulama pri zadanim MS uvjetima te su dobiveni pseudomolekulski ioni niskog intenziteta. Stoga je daljnja identifikacija FA provedena fragmentiranjem iona $[M-Glu]^+$ pri m/z 295, a AZA fragmentiranjem iona $[M-NO_2+H]^+$ pri m/z 232. U tablici 4 prikazane su m/z vrijednosti te udjeli pseudomolekulskog iona, iona adukta (ako je identificiran) te tri fragmenta MS spektara najvećeg intenziteta.

Tablica 4. m/z vrijednosti i udjeli iona i fragmenata MS spektara analita te IS

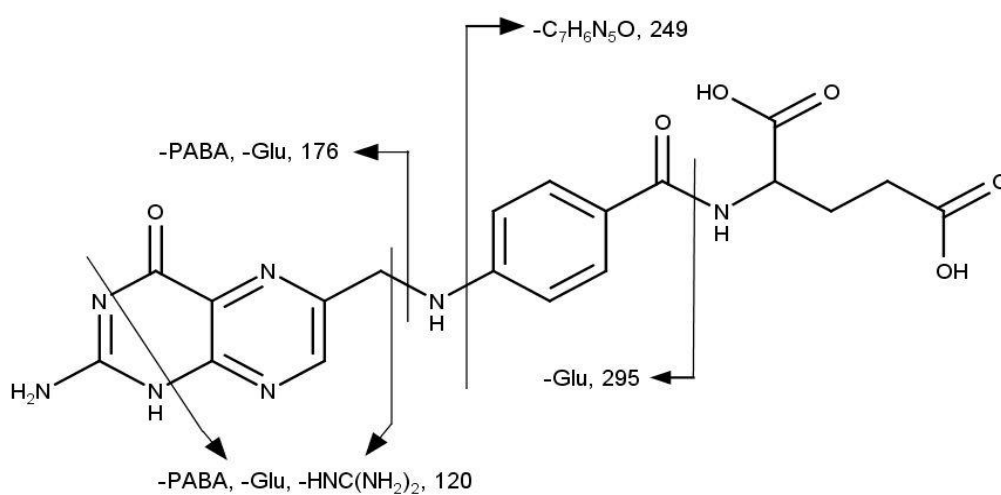
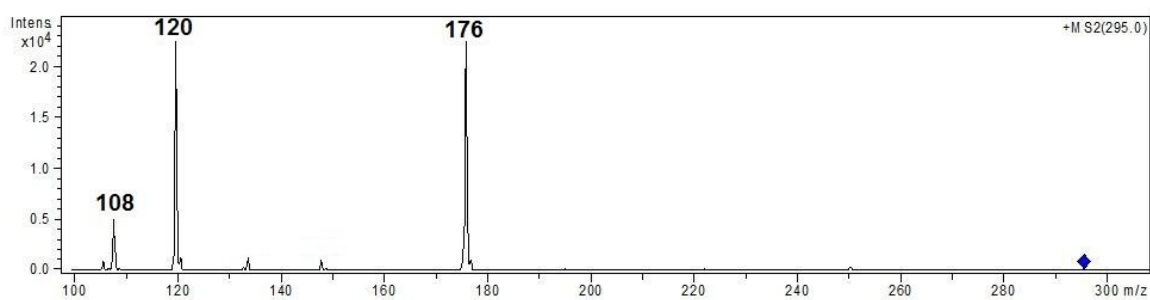
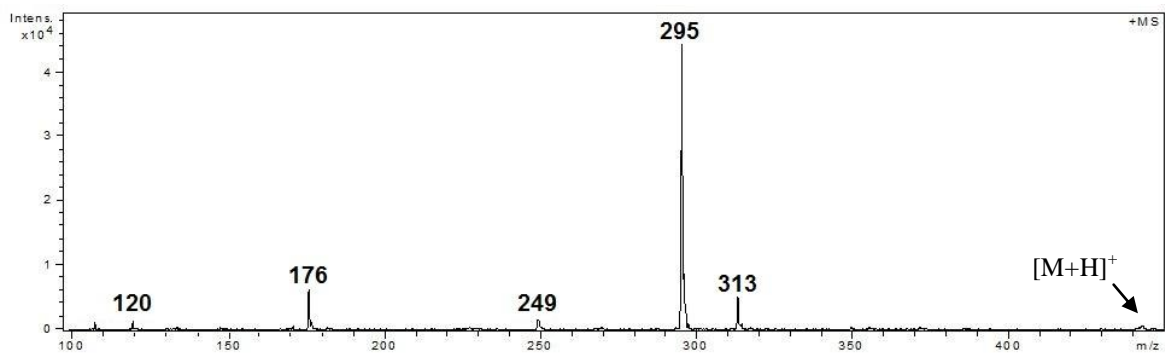
analit	ion adukt	pseudomolekulski ion	fragment 1	fragment 2	fragment 3
6-TG	/	168 (25,31%)	151 (22,81%)	134 (5,26%)	107 (2,98%)
6-MP	/	153 (37,55%)	119 (14,61%)	126 (2,49%)	120 (1,17%)
IS	/	182 (44,21%)	134 (18,53%)	167 (8,66%)	107 (5,16%)
FA	/	442 (0,44%)	295 (56,86%)	176 (6,64%)	313 (5,47%)
AZA	300 ^a (7,89%)	278 (0,47%)	232 (23,85%)	199 (6,31%)	205 (6,04%)

^aadukt AZA s ionom natrija ($[M+Na]^+$)

Reprezentativni MS i MS² spektri 6-TG i FA s pretpostavljenim putevima fragmentacije prikazani su na slikama 6 i 7.



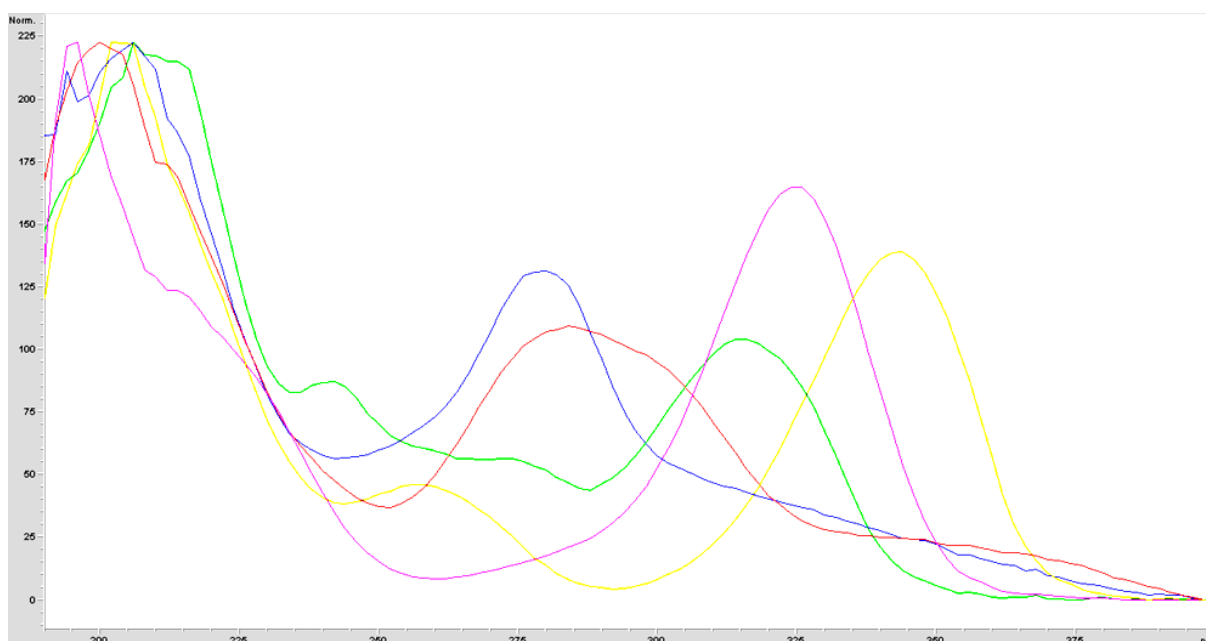
Slika 6. MS spektar 6-TG, MS² spektar pseudomolekulskeg iona pri m/z 168 te pretpostavljeni put fragmentacije



Slika 7. MS spektar FA, MS^2 spektar iona $[M+Glu]^+$ pri m/z 295 te pretpostavljeni put fragmentacije

4.2.3. Određivanje analita

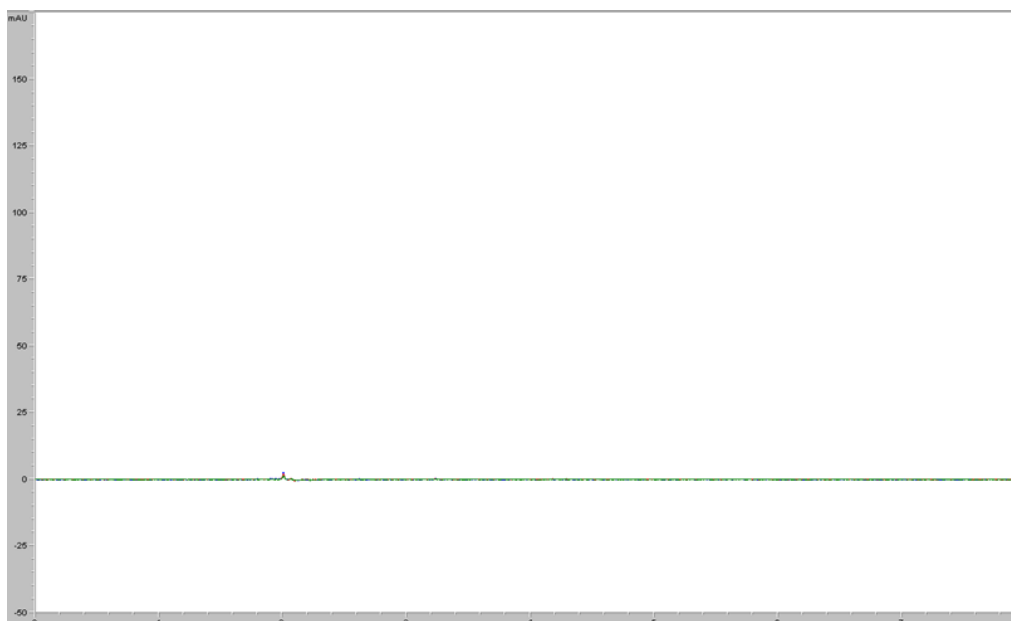
Budući da se DAD tijekom preliminarnih istraživanja pokazao kao najprikladniji, videći da je za sve analite imao široko linearno područje, visoku razinu reproducibilnosti te, u odnosu na MS, niže cijene i primjereniji za rutinske analize, daljnja istraživanja vezana uz određivanje analita su provedena na ovom detektoru. Nakon snimanja radne otopine standarda pomoću DAD na jednoj valnoj duljini (slika 4), valne duljine snimanja optimizirane su tako da se što više poklapaju s maksimumima apsorpcije kromatografiranih spojeva kako bi se povećala osjetljivost te pojednostavio postupak određivanja. Na slici 8 prikazani su UV-Vis spektri svih analita, kao i IS.



Slika 8. Preklapljeni UV-Vis spektri AZA (plavo), 6-MP (ružičasto), 6-TG (žuto), FA (crveno) i IS (zeleno)

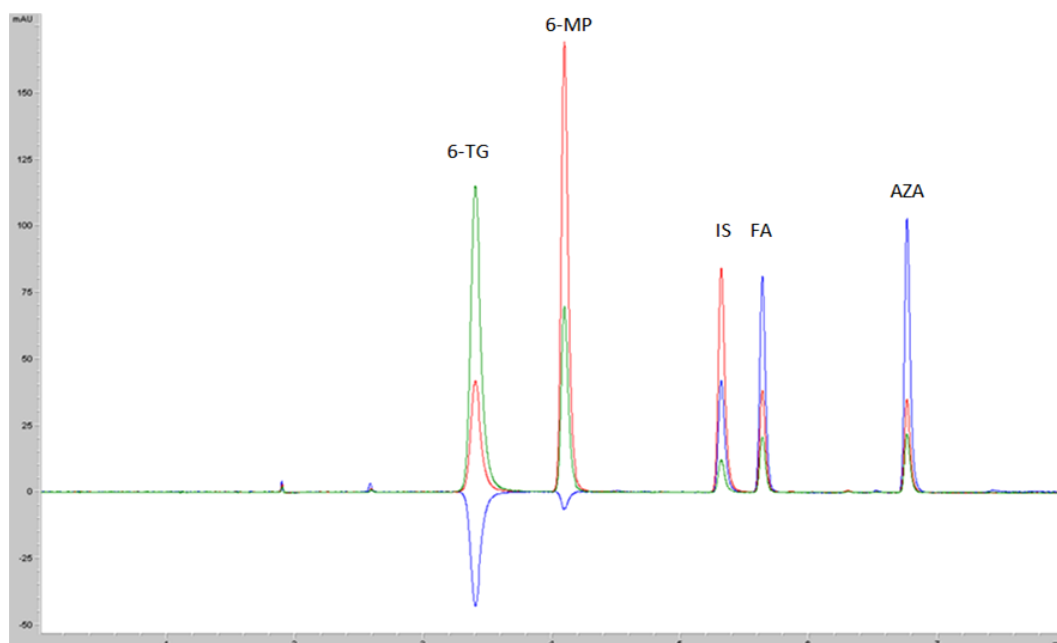
Iz slike je uočljivo kako se maksimumi apsorpcija AZA i FA razlikuju za svega 10-ak nm te se intenziteti apsorpcija na ovim valnim duljinama zbog izgleda spektra značajno ne razlikuju, stoga se ova dva analita mogu pratiti na jednoj valnoj duljini. Isto vrijedi i za 6-MP i IS, tako da su odabrane 3 valne duljine snimanja: $\lambda_1 = 280$ nm za AZA i FA, $\lambda_2 = 320$ nm za 6-MP i IS te $\lambda_3 = 343$ nm za 6-TG.

Na navedenim valnim duljinama snimljen je kromatogram samog otapala, tj. smjese metanola i 0,1 M otopine NaOH u omjeru 95:5 (V/V) kako bi se utvrdilo postoje li kakve interferencije iz otapala koje bi mogle utjecati na određivanje analita (slika 9).



Slika 9. Kromatogram otapala snimljen na $\lambda_1 = 280$ nm (plavo), $\lambda_2 = 320$ nm (crveno) i $\lambda_3 = 343$ nm (zeleno)

Kromatografski pik male površine javlja se pri $t_R = 2,00$ min, no kako se 6-TG kao prvi analit eluira u vremenu od 3,43 min, utvrđeno je kako navedeni pik nema utjecaja na selektivnost metode. Kromatogram snimljen pri navedenim postavkama metode prikazan je na slici 10.



Slika 10. Kromatogram radne otopine standarda koncentracije $10 \mu\text{g/mL}$ snimljen na $\lambda_1 = 280$ nm (plavo), $\lambda_2 = 320$ nm (crveno) i $\lambda_3 = 343$ nm (zeleno)

Pikovi pokazuju zadovoljavajuće razlučivanje, simetričnost te broj teorijskih tavana (tablica 5).

Tablica 5. Parametri efikasnosti kromatografskog odjeljivanja

analit \ parametar	R_s^a	simetrijski faktor ^b	broj teorijskih tavana ^c
6-TG	/	0,78	8667
6-MP	5,72	0,73	28849
FA	3,87	0,77	85132
AZA	14,82	0,73	129781

^arazlučivost je mjerena između pika navedenog analita i najbližeg susjednog pika

^bmjera simetrije pika; što je vrijednost bliža 1, pik je simetričniji

^cmjera efikasnosti kolone; veći broj označava bolje razlučivanje

4.3. Validacija metode

Nakon utvrđivanja optimalnih uvjeta odjeljivanja, detekcije i određivanja, pristupilo se validaciji kromatografske metode. Validacija je provedena sukladno ICH smjernicama navedenima u poglavlju 3.2.8. U tablici 6 navedene su granice prihvatljivosti validacijskih parametara.

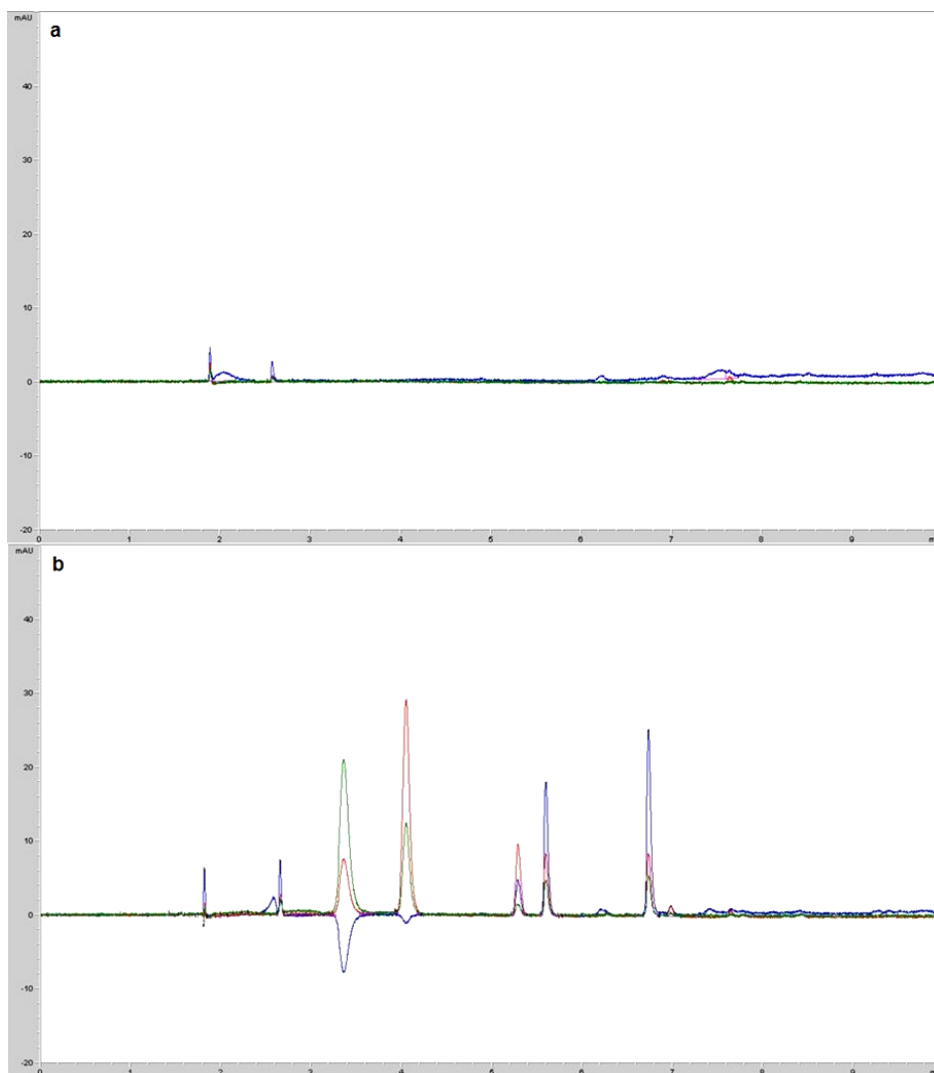
Tablica 6. Validacijski parametri i kriteriji prihvatljivosti

VALIDACIJSKI PARAMETAR	KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI
selektivnost	informacija
linearnost	$k \geq 0,999$
granica dokazivanja	informacija
granica određivanja	informacija
preciznost	RSD $\leq 3\%$ za ponovljivost RSD $\leq 5\%$ za srednju preciznost
točnost	$95\% \leq \text{analitički prinos} \leq 105\%$
izdržljivost	RSD $\leq 10\%$
stabilnost	RSD $\leq 5\%$

4.3.1. Selektivnost

Selektivnost, tj. sposobnost metode da može odrediti analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka (matrice) ispitana je na formulaciji tablete te umjetnoj plazmi.

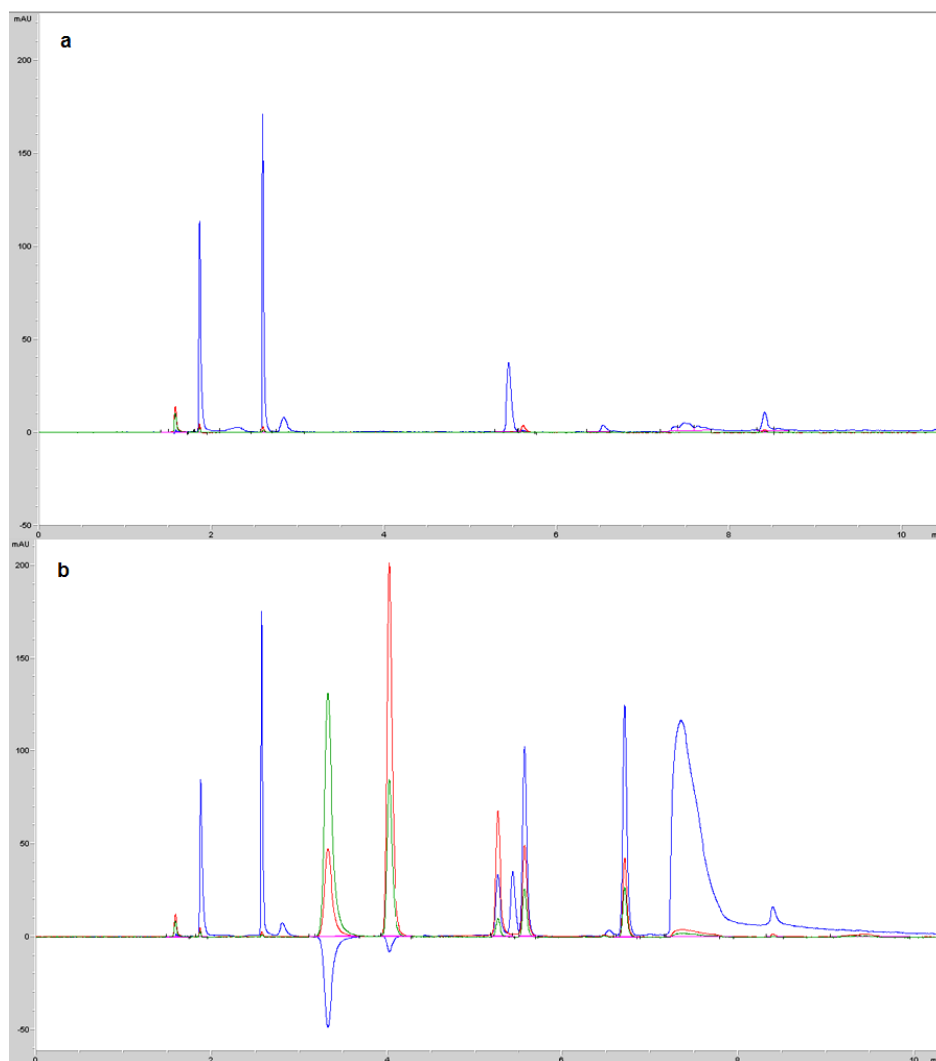
Slijepa proba i standardne otopine u koje su dodani ekscipijensi pripremljeni su na način opisan u poglavlju 3.2.3. te su kromatogrami ovih uzoraka prikazani su na slici 11.



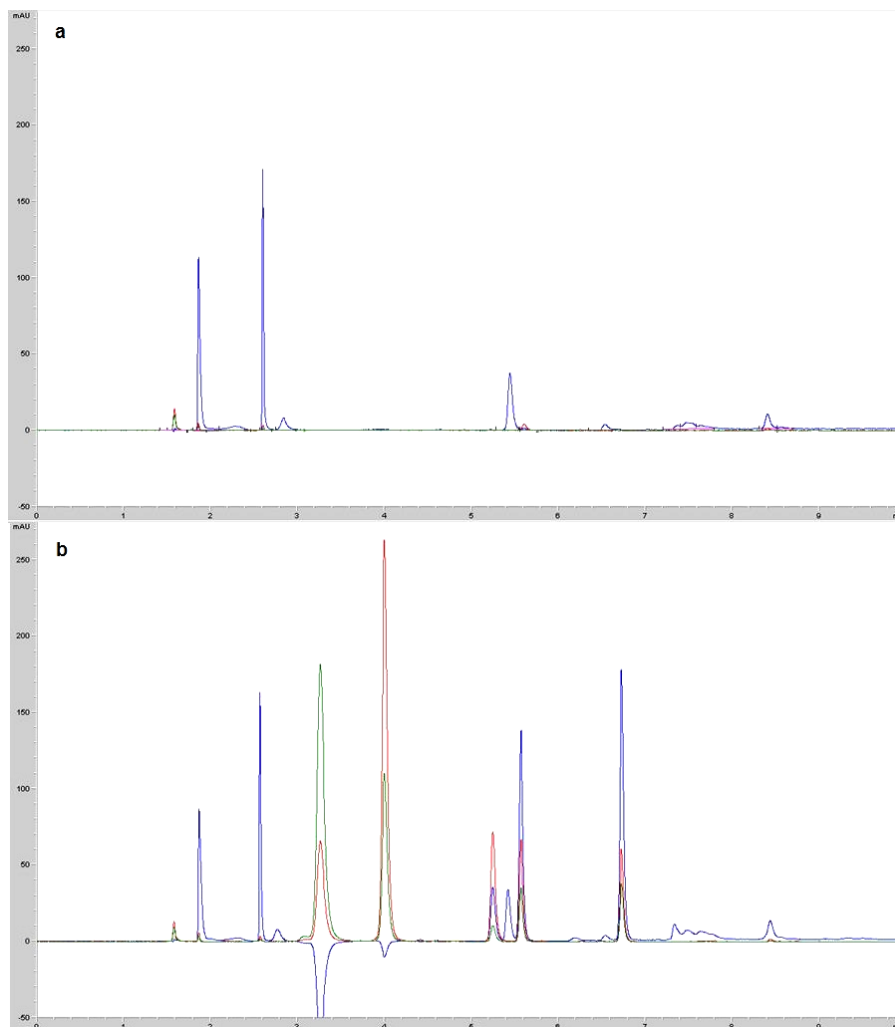
Slika 11. Kromatogrami ekscipijenas (a) i ekscipijenas s dodanom otopinom standarda (b) snimljeni na $\lambda_1 = 280$ nm (plavo), $\lambda_2 = 320$ nm (crveno) i $\lambda_3 = 343$ nm (zeleno)

Iz kromatograma moguće je utvrditi kako sastavnice ekscipijenas ne koeluiraju s analitima niti s IS, što upućuje na zadovoljavajuću selektivnost metode.

Kako bi se predložena metoda mogla primijeniti u bioanalitičkim istraživanjima, ispitana je i selektivnost metode primjenom umjetne plazme. Slijepa proba i otopina umjetne plazme u koju je dodana otopina standarda pripremljeni su na način opisan u poglavlju 3.2.5. Kromatogrami navedenih otopina prikazani su na slikama 12 (PP) i 13 (SPE).



Slika 12. Kromatogrami slijepa probe (a) i umjetne plazme s dodanom otopinom standarda (b) pripremljeni postupkom PP snimljeni na $\lambda_1 = 280$ nm (plavo), $\lambda_2 = 320$ nm (crveno) i $\lambda_3 = 343$ nm (zeleno)



Slika 13. Kromatogrami slijepe probe (a) i umjetne plazme s dodanom otopinom standarda (b) pripremljeni postupkom SPE snimljeni na $\lambda_1 = 280$ nm (plavo), $\lambda_2 = 320$ nm (crveno) i $\lambda_3 = 343$ nm (zeleno)

Na kromatogramima uzoraka umjetne plazme, pripremljenim objema postupcima, vidljivo je kako sastavnice plazme ne koeluiraju s niti jednim od analita. Međutim, kao kritičan parametar za utvrđivanje selektivnosti pokazalo se razlučivanje sastavnice plazme koja eluira s kolone u 5,5 min. Upravo ova sastavnica plazme eluira s kolone nakon IS te neposredno prije FA, te je prisutna u oba uzorka neovisno o postupku pripreme biološkog uzorka. Budući da je njeno razlučivanje od navedenih analita veće od 1,5, moguće je utvrditi kako ona ne utječe na selektivnost metode.

4.3.2. Linearnost

Linearnost, tj. sposobnost analitičke metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita, sljedeći je validacijski parametar koji je ispitan (tablica 7). Ispitivanje je provedeno na pet koncentracijskih razina: 2,5 , 5, 10, 15 i 20 µg/mL (priprema otopina standarda navedenih koncentracija opisana u poglavlju 3.2.2.2.). Kako ova metoda koristi unutarnji standard, grafički prikaz ovisnosti omjera analitičkih signala analita i unutarnjeg standarda (izraženih kao površine pikova na kromatogramu snimljenom detektorom s nizom dioda) o koncentraciji analita predstavlja kalibracijsku krivulju u obliku linearnog regresijskog pravca.

Tablica 7. Parametri linearnosti

parametar analit	linearno područje (µg/mL)	jednadžba pravca	koeficijent korelacije, <i>k</i>	rezidualni zbroj kvadrata ^a
6-TG	2,5 - 20	$y = 0,251x - 0,153$	0,9999	0,0001
6-MP	2,5 - 20	$y = 0,236x - 0,126$	0,9998	0,0027
FA	2,5 - 20	$y = 0,086x - 0,035$	0,9999	0,0003
AZA	2,5 - 20	$y = 0,109x - 0,067$	0,9998	0,0011

^azbroj kvadrata odstupanja predviđenih od empirijskih vrijednosti; što je manja vrijednost, to je veća korelacija prikupljenih podataka i predviđenog modela

Koeficijent korelacije veći je od 0,999 za sve analite, temeljem čega je moguće zaključiti kako je postignuta izvrsna linearnost metode u širokom koncentracijskom rasponu.

4.3.3. Osjetljivost

Granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) analitičkog postupka najmanja je količina analita koju je moguće nedvojbeno dokazati, ali ne nužno i odrediti, dok je granica određivanja (LOQ) najmanja količina analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i ponovljivošću. U svrhu validacije ove metode korišten je pristup omjera signal/šum, tj. otopine standarda razrijeđene su do vrijednosti omjera signal/šum 10 za LOQ te 3 za LOD. Vrijednosti ovih parametara prikazane su u tablici 8.

Tablica 8. Granice dokazivanja i određivanja

analit \ parametar	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
6-TG	0,1	0,4
6-MP	0,1	0,2
FA	0,2	0,5
AZA	0,1	0,5

4.3.4. Preciznost

Preciznost (engl. *precision*) opisuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim propisanim uvjetima. U validaciji ove metode preciznost je iskazana kao ponovljivost (engl. *intra-day repeatability*), tj. podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka pod istim uvjetima te kao srednja preciznost (engl. *intermediate precision*), tj. podudaranje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka kroz duže vremensko razdoblje.

Preciznost je ispitivana na radnoj otopini standarda koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ te izražena kao RSD omjera analitičkih signala analita i unutarnjeg standarda. Ponovljivost je ispitana kroz 6 mjerenja u istom danu, dok je srednja preciznost ispitana kroz dodatna 3 mjerenja sljedećeg dana (tablica 9).

Tablica 9. Parametri preciznosti

analit \ parametar	ponovljivost ($n = 6$) RSD (%)	srednja preciznost ($n = 9$) RSD (%)
6-TG	0,77	0,79
6-MP	0,82	0,79
FA	1,08	1,17
AZA	0,40	0,63

Vrijednosti ponovljivosti i srednje preciznosti su unutar granica definiranih u Tablici 6 za sve analite, iz čega se može zaključiti kako je razvijena metoda precizna.

4.3.5. Točnost

Točnost (engl. *accuracy*) predstavlja slaganje srednje vrijednosti eksperimentalno dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Točnost ove metode ispitana je na tri različite koncentracijske razine otopina standarda: niskoj (2,5 µg/mL), srednjoj (10 µg/mL) te visokoj (20 µg/mL). Na svakoj koncentracijskoj razini izvedena su tri mjerenja, a rezultati su iskazani kao analitički prinos (engl. *recovery*), tj. srednja vrijednost omjera izmjerene koncentracije i stvarne koncentracije izražen u postotku, uz pripadajuće RSD vrijednosti (tablica 10).

Tablica 10. Parametri točnosti

parametar analit	niska konc. razina		srednja konc. razina		visoka konc. razina	
	analitički prinos (%)	RSD (%)	analitički prinos (%)	RSD (%)	analitički prinos (%)	RSD (%)
6-TG	99,97	0,96	98,68	1,25	101,33	0,86
6-MP	101,47	0,65	96,63	1,41	101,08	1,44
FA	99,09	0,20	97,65	1,60	102,47	1,06
AZA	104,24	0,51	97,69	0,44	98,11	0,74

Analitički prinosi na sve tri koncentracijske razine su u intervalu od 95 do 105%, što znači da je validirana metoda točna u širokom koncentracijskom rasponu.

4.3.6. Izdržljivost

Izdržljivost (engl. *robustness*) predstavlja sposobnost metode da ostane nepromijenjena uslijed malih te namjernih promjena parametara metode. Ispitan je utjecaj promjene tri kromatografska parametra: protoka pokretne faze, temperature kolone te sastava pokretnih faza. Definirani optimalni uvjeti su protok pokretne faze od 1 mL/min, temperatura kolone od 35 °C te sastav pokretnih faza acetonitril/ultračista voda : mravlja kiselina u omjeru 99,9:0,1 (V/V). Promjene u vremenima zadržavanja (tablica 11) i omjerima signala analita i unutarnjeg standarda (tablica 12) prikazane su kao RSD naspram vremena zadržavanja i omjera signala pri optimalnim uvjetima.

Tablica 11. Parametri robustnosti vremena zadržavanja

parametar analit	protok pokretne faze		temperatura kolone		promjena sastava pokretne faze ^a RSD (%)
	0,95 mL/min RSD (%)	1,05 mL/min RSD (%)	20 °C RSD (%)	30 °C RSD (%)	
6-TG	2,43	4,69	3,62	7,15	4,69
6-MP	2,88	3,73	2,38	4,09	2,46
FA	1,99	2,41	1,13	1,77	1,87
AZA	1,78	1,98	0,66	1,23	3,30

^apokretna faza A sastoji se od ultračiste vode, acetonitrila i mravlje kiseline u omjeru 99:1:0,1 (V/V/V), pokretna faza B sastoji se od acetonitrila, ultračiste vode i mravlje kiseline u omjeru 99:1:0,1 (V/V/V)

Tablica 12. Parametri robustnosti omjera signala

parametar analit	protok pokretne faze		temperatura kolone		promjena sastava pokretne faze ^a RSD (%)
	0,95 mL/min RSD (%)	1,05 mL/min RSD (%)	20 °C RSD (%)	30 °C RSD (%)	
6-TG	2,38	0,95	0,02	1,59	3,20
6-MP	0,50	0,85	0,02	2,24	1,33
FA	0,59	0,09	0,05	0,95	1,03
AZA	0,85	0,65	0,24	1,59	1,59

^apokretna faza A sastoji se od ultračiste vode, acetonitrila i mravlje kiseline u omjeru 99:1:0,1 (V/V/V), pokretna faza B sastoji se od acetonitrila, ultračiste vode i mravlje kiseline u omjeru 99:1:0,1 (V/V/V)

4.3.7. Stabilnost

Stabilnost radne otopine standarda koncentracije 10 µg/mL procijenjena je nakon jednog dana (čuvana u autoinjektoru pri 4 °C) te 30 dana (čuvana pri -20 °C), dok je stabilnost uzorka umjetne plazme s dodanom radnom otopinom standarda procijenjena nakon 10 dana (čuvana pri 4 °C) (tablica 13).

Tablica 13. Parametri stabilnosti

parametar analit	stabilnost u autoinjektoru (4 °C) RSD (%)	stabilnost (-20 °C) RSD (%)	stabilnost umjetne plazme (4 °C) RSD (%)
6TG	1,39	2,41	3,11
6MP	0,50	2,26	0,22
FA	0,22	2,46	0,69
AZA	0,47	1,93	1,44

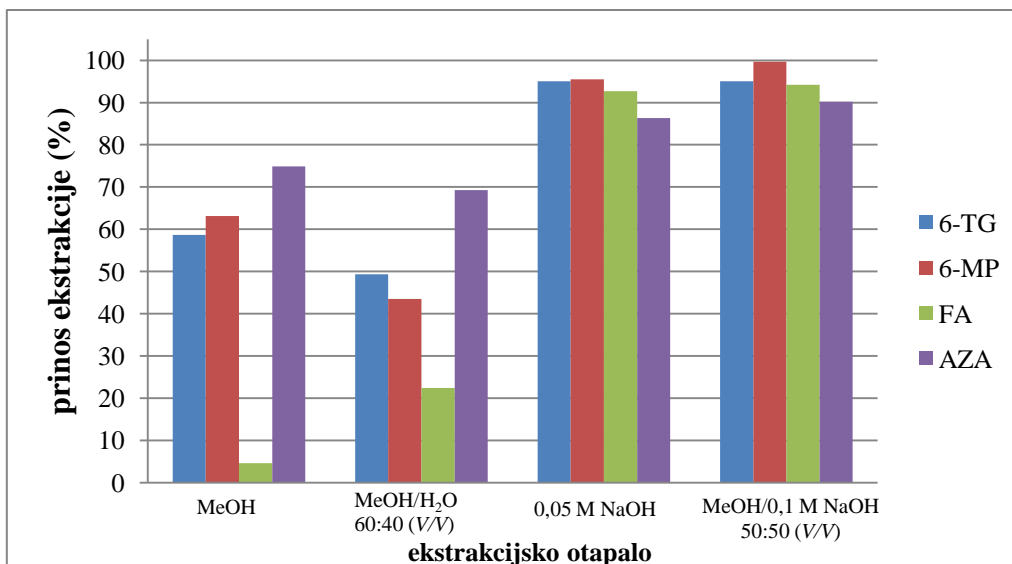
Uzorci su stabilni i nakon čuvanja duže vrijeme, što je dodatna prednost videći kako se po potrebi mogu pohraniti za evidenciju i daljnja ispitivanja.

4.4. Primjena metode za određivanje analita

Nakon što je metoda razvijena, optimizirana te validirana, primijenjena je za identifikaciju i određivanje 6-TG, 6-MP, FA i AZA u tabletama te umjetnoj plazmi.

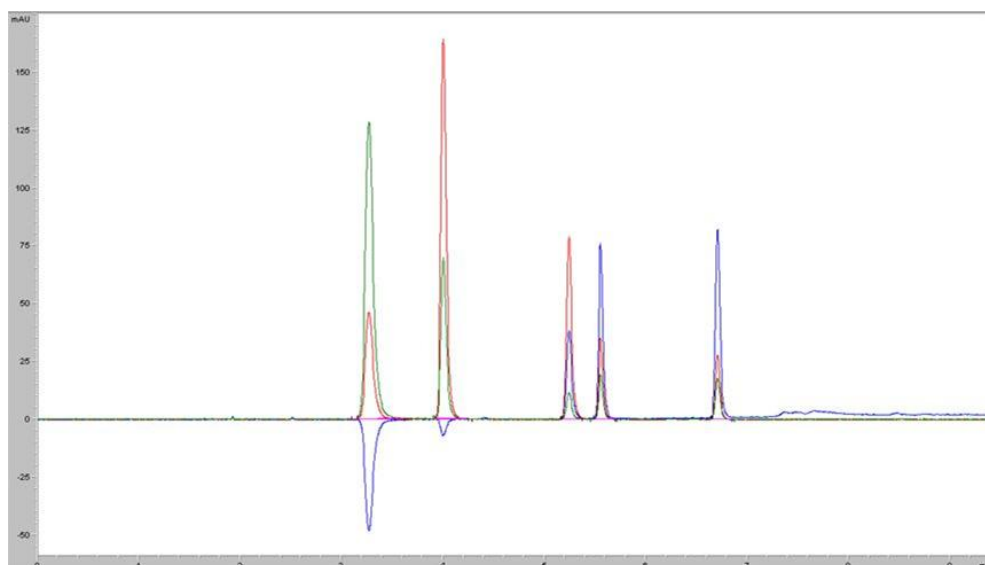
4.4.1. Određivanje analita u tabletama

Kako bi se odredio sadržaj analita u tabletama, potrebno je optimirati ekstrakcijski postupak. Metode opisane u literaturi kao otapalo za standardne otopine analita koriste zaluženi metanol (Raja i sur., 2012) ili vodene otopine hidroksida (Somasekhar, 2014; Sorouraddin i sur., 2011), stoga su se, s pretpostavkom da su analiti dobro, a ekscipijensi slabije topljivi u navedenim otapalima, u svrhu ispitivanja prinosa ekstrakcije koristila slična otapala. Uzorci tableta pripremili su se na način opisan u poglavlju 3.2.4., dok su kao ekstrakcijska otapala ispitani metanol, metanol i ultračista voda u omjeru 60:40 (V/V), 0,05 M otopina NaOH te metanol i 0,1 M otopina NaOH u omjeru 50:50 (V/V). Ekstrakcijska učinkovitost izražena kao prinosi ekstrakcije određeni iz kalibracijskih pravaca analita prikazani su na slici 14.



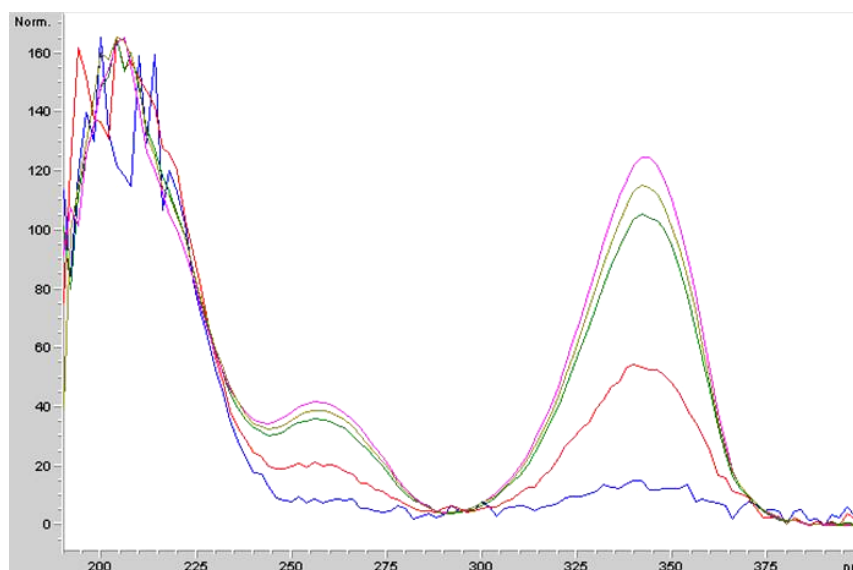
Slika 14. Prinosi ekstrakcije analita pri korištenju različitih ekstrakcijskih otapala

Kao što je vidljivo na slici, FA pokazuje nizak postotak ekstrakcije (4,63%) pri korištenju samog metanola, dok je uz vodu postotak nešto viši (22,41%). Ostali analiti pokazuju osrednju iskoristivost ekstrakcije s istim otapalima, no dodatkom lužine postiže se veliko iskorištenje ekstrakcije svih analita iz tableta. Na temelju rezultata ekstrakcije moguće je zaključiti kako je od ispitanih otapala za ekstrakciju najpogodnija smjesa metanola i 0,1 M otopine NaOH u omjeru 50:50 (V/V), pri čemu prinosi ekstrakcije iznose 95,04% za 6-TG, 99,66% za 6-MP, 94,22% za FA te 90,17% za AZA. Kromatogram analize tableta korištenjem ovog ekstrakcijskog otapala prikazan je na slici 15.



Slika 15. Kromatogram analize tableta snimljen na $\lambda_1 = 280$ nm (plavo), $\lambda_2 = 320$ nm (crveno) i $\lambda_3 = 343$ nm (zeleno)

Provjerena je i čistoća pikova na prethodno prikazanom kromatogramu. Za svaki analit te IS odabrano je pet točaka na kromatografskom piku te su u njima uspoređeni UV-Vis spektri. Kao primjer uzet je pik 6-TG (slika 16).



Slika 16. UV-Vis spektri 5 različitih točaka kromatografskog pika 6-TG

Apsorpcijski maksimumi se poklapaju u svih pet točaka, što upućuje kako je pik visoke čistoće. Ostali pikovi pokazuju slične profile čistoće, što upućuje kako se određivanje analita može pouzdano provesti, videći da se ono provodi prema površini navedenog pika.

U daljnjim ispitivanjima provesti će se kontrola proizvoda različitih proizvođača s tržišta, kao i iz različitih proizvodnih linija.

4.4.2. Određivanje analita u umjetnoj plazmi

Uzorci umjetne plazme pripreme se na oba načina opisana u poglavlju 3.2.5. te analiziraju predloženom metodom. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slikama 12b (PP) i 13b (SPE), dok su rezultati određivanja prikazani u tablici 14.

Tablica 14. Analitički prinosi u uzorcima pripremljenim PP i SPE

analit	PP analitički prinos (%)	SPE analitički prinos (%)
6-TG	98,07	96,69
6-MP	103,28	100,51
FA	102,24	102,47
AZA	96,15	101,23

Metoda pokazuje mogućnost određivanja analita bez interferencije matrice, tj. ostalih sastavnica uzorka. Uz to, iz podataka o analitičkim prinosima moguće je zaključiti kako nema gubitaka analita (npr. u vidu kemijske reakcije ili taloženja sa matricom uzorka) nakon dodatka otopine standarda u uzorke te njihove predobradbe za analizu na oba navedena načina. Dakle, u slučaju ove skupine analita, oba postupka se mogu učinkovito primijeniti u predobradbi uzorka.

Valja istaknuti kako je analitički prinos dobiven ovom metodom veći od nekih od već predloženih metoda za određivanje navedenih analita u plazmi: Hawwa i suradnici (Hawwa i sur., 2009) su, primjerice, u uzorku predobrađenom PP (taloženjem pomoću perklorne kiseline) dobili analitički prinos 6-TG 93,3%, a 6-MP 96,5%, dok su kineski znanstvenici (Zheng i sur., 2015) utvrdili analitički prinos FA u uzorku predobrađenom PP (taloženjem metanolom i amonijevim hidroksidom) od 87,0%. Uz to, inovativni sorbens Phree Phospholipid kolone po prvi put je primijenjen u svrhu određivanja ovih analita u biološkim uzorcima. U usporedbi s tradicionalno korištenim sorbensima, poput modificiranog silikagela, polimera ili ionskih izmjenjivača, postupak je značajno jednostavniji, nema optimizacije SPE metode te je postignuta izvrsna ekstrakcijska učinkovitost.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu predložena je nova HPLC-DAD-MSⁿ metoda za istovremeno određivanje azatioprina, 6-merkaptopurina, 6-tiogvanina i folne kiseline u formulacijama tableta te plazmi. Prema literaturnim podacima, metoda za istovremeno određivanje navedenih lijekova dosad još nije razvijena te se njome postiže smanjenje potrošnje kemikalija (čime se metoda može smatrati ekološki prikladnijom od većine dosad razvijenih), kao i olakšavanje analitičaru koji provodi metodu jer nema promjene nepokretnih i pokretnih faza kako bi se analizirali različiti lijekovi. Metoda je validirana prema ICH smjernicama te pokazuje veliku selektivnost, linearnost ($k \geq 0,999$), točnost ($95\% \leq$ analitički prinos $\leq 105\%$) i preciznost ($RSD < 1,5\%$) u radnom području. Optimirana i validirana metoda je primijenjena za određivanje analita u uzorcima tableta i umjetne plazme. Pri određivanju analita u umjetnoj plazmi, oba načina predobradbe uzorka (taloženje proteina i ekstrakcija čvrstom fazom) daju slične rezultate, tj. jednako su učinkovita; uz to, inovativni sorbens primijenjen pri predobradbi uzorka SPE postupkom pokazuje potencijal primjene u analitici drugih lijekova, posebice lipofilnijih, uzimajući u obzir kako fosfolipidi plazme imaju značajan utjecaj na selektivnost bioanalitičkih metoda. Neke od prednosti metode su kratko trajanje vremena analize, jednostavna priprema uzoraka te mogućnost primjene iste metode na tablete i plazmu, što ju čini pogodnom za primjenu u rutinskim analizama, bilo terapijskom praćenju lijekova ili određivanju sadržaja tableta. Daljnja istraživanja, koja prelaze granice ovog rada, usmjeriti će se na određivanje onečišćenja u formulacijama te primjenu metode na plazmi pacijenata u svrhu određivanja lijekova, ali i njihovih metabolita u plazmi.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova. Posebno hvala izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pruženoj prilici, mentorstvu, mnoštvu korisnih savjeta i podršci u izradi ovog rada.

Hvala i prof. dr. sc. Biljani Nigović na poticanju mog interesa ka analitici lijekova i znanstvenom radu.

Hvala dr. sc. Danieli Amidžić Klarić i doc. dr. sc. Mirandi Sertić na svojoj pomoći i društvu u laboratoriju te stručnim savjetima.

Hvala i djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju na ustupanju korištenja centrifuge Jouan MR23i.

7. POPIS LITERATURE

1. Al-Ghobashy MA, Hassan Asm Abdelaziz DH, Elhosseiny NM, Sabry NA, Attia AS, El-Sayed MH. Development and validation of LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of methotrexate, 6-mercaptopurine and its active metabolite 6-thioguanine in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia: Correlation with genetic polymorphism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1038, 88-94.
2. Alstead EM. Inflammatory bowel disease in pregnancy. *Postgrad Med J*, 2002, 78(915), 23-26.
3. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12, 205-217.
4. Axelrad JE, Lichtiger S, Yajnik V. Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(20), 4794-4801.
5. Barco S, Gennai I, Bonifazio P, Maffia A, Barabino A, Arrigo S, Tripodi G, Cangemi G. A Rapid and Robust HPLC-DAD Method for the Monitoring of Thiopurine Metabolites in Whole Blood: Application to Paediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Curr Pharm Anal*, 2015, 11(2), 80-85.
6. Baza lijekova | Lijekovi .: HALMED, URL: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/#rezultati>, pristupljeno 5.1.2018.
7. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 2015, 50(8), 942-951.
8. Burr NE, Hull MA, Subramanian V. Folic Acid Supplementation May Reduce Colorectal Cancer Risk in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Gastroenterol*, 2017, 51(3), 247-253.
9. Cangemi G, Barabino A, Barco S, Parodi A, Arrigo S, Melioli G. A validated HPLC method for the monitoring of thiopurine metabolites in whole blood in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Int J Immunopath Ph*, 2012, 25(2), 435-444.
10. Casanova MJ, Chaparro M, Domenech E, Barreiro-de Acosta M, Bermejo F, Iglesias E, Gomollón F, Rodrigo L, Calvet X, Esteve M, Garcia-Planella E, Garcia-López, Taxonera C, Calvo M, López M, Ginard D, Gómez-García M, Garrido E, Pérez-Calle JL, Beltraán B, Piqueras M, Saro C, Botella B, Dueñas C, Ponferrada A, Mañosa M, Garcia-Sánchez V, Máté J, Gisbert JP. Safety of Thiopurines and Anti-TNF- α Drugs

- During Pregnancy in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108, 433-440.
11. Chemaxon, MarvinSketch v.17.29, 2017, dostupno na <https://chemaxon.com/products/marvin>
 12. Coelho J, Beaugerie L, Colombel JF, Hébuterne X, Lerebours E, Lémann M, Baumer P, Cosnes J, Bourreille A, Gendre JP, Seksik P, Blain A, Metman EH, Nisard A, Cadiot G, Veyrac M, Coffin B, Dray X, Carrat F, Marteau P. Pregnancy outcome in patients with inflammatory bowel disease treated with thiopurines: cohort from the CESAME Study. *Gut*, 2011, 60, 198-203.
 13. Frei P, Biedermann L, Nielsen OH, Rogler G. Use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(7), 1040-1048.
 14. Gatti R, Gioia MG. Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B₆ vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals. *Anal Chim Acta*, 2005, 538(1-2), 135-141.
 15. Harahap Y, Azizah N, Andalusia R, Supandi. Simultaneous Analytical Method Development of 6-Mercaptopurine and 6-Methylmercaptopurine in Plasma by High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array. *J Young Pharm*, 2017, 9(1), Suppl:s29-s34.
 16. Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, McElnay JC. Development and validation of an HPLC method for the rapid and simultaneous determination of 6-mercaptopurine and four of its metabolites in plasma and red blood cells. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49, 401-409.
 17. Hoffbrand AV, Stewart JS, Booth CC, Mollin DL. Folate deficiency in Crohn's disease: incidence, pathogenesis, and treatment. *Br Med J*, 1968, 2(5597), 71-75.
 18. Huang S, Ma J, Zhu M, Ran Z. Status of serum vitamin B12 and folate in patients with inflammatory bowel disease in China. *Intest Res*, 2017, 15(1), 103-108.
 19. ICH Harmonized Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH Secretariat, Ženeva, 2005.
 20. Jogi K, Rao MB, Raju RR. Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method for the Estimation of Methotrexate and Folic Acid in Bulk and Tablet Dosage Form. *Int J Eng Technol Sci Res*, 2016, 3(10), 45-53.
 21. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12, 720-727.

22. Kiekens F, Van Daele J, Blacquaert D, Van Der Straeten D, Lambert WE, Stove CP. A validated ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the selective analysis of free and total folate in plasma and red blood cells. *J Chromatogr A*, 2015, 1398, 20-28.
23. Kitchen BJ, Balis FM, Poplack DG, O'Brien M, Craig CE, Adamson PC. A Pediatric Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Thioguanine Administered by Continuous i.v. Infusion. *Clin Cancer Res*, 1997, 3, 713-717.
24. Kulkarni P, Karanam A, Gurjar M, Dhoble S, Naik AB, Vidhun BH, Gota V. Effect of various anticoagulants on the bioanalysis of drugs in rat blood: implication for pharmacokinetic studies of anticancer drugs. *Springerplus*, 2016, 5, 2102.
25. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2011, 7(4), 235-241.
26. Li HB, Chen F, Jiang Y. Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2000, 891(2), 243-247.
27. Malik TA. Inflammatory bowel disease: Historical perspective, Epidemiology, and Risk Factors. *Surg Clin North Am*, 2015, 95(6), 1105-1122.
28. Mason JB, Tang SY. Folate status and colorectal cancer risk: A 2016 update. *Mol Aspects Med*, 2017, 53, 73-79.
29. Masters SB. Drugs used in Anemias; Hematopoietic Growth Factors. U: Basic & Clinical Pharmacology, 12th Ed. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill, 2012, str. 581-599.
30. McQuaid KR. Drugs used in the Treatment of Gastrointestinal Diseases. U: Basic & Clinical Pharmacology, 12th Ed. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill, 2012, str. 1081-1114.
31. Meijer B, Mulder CJJ, Peters GJ, van Bodegraven AA, de Boer NKH. Efficacy of thioguanine treatment in inflammatory bowel disease: A systematic review. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(40), 9012-9021.
32. M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. *Clin Med Insights Gastroenterol*, 2013, 6, 33-47.
33. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013.

34. Naik KM, Nandibewoor ST. RP-HPLC Method for the Estimation of 6-Mercaptopurine in Spiked Human Plasma and Pharmaceutical Formulations. *J Anal Chem*, 2013, 68(12), 1085-1088.
35. Nelson BC, Sharpless KE, Sander LC. Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006, 1135, 203-211.
36. Ng SW, Mahadevan U. Management of inflammatory bowel disease in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol*, 2013, 9(2), 161-174.
37. Nováková L. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *J Chromatogr A*, 2013, 1292, 25-37.
38. Osseyi ES, Wehling RL, Albrecht JA. HPLC Determination of Stability and Distribution of Added Folic Acid and Some Endogenous Folates During Breadmaking. *Cereal Chem*, 2001, 78(4), 375-378.
39. Pandey S, Pandey P, Tiwari G, Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods*, 2010, 1(1), 14-24.
40. Patring JDM, Jastrebova JA; Hjortmo SB, Andlid TA, Jägerstad IM. Development of a Simplified Method for the Determination of Folates in Baker's Yeast by HPLC with Ultraviolet and Fluorescence Detection. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 2406-2411.
41. Raja MJ, Kavitha JR, Kumar KP, Sivakumar T. Simultaneous determination of azathioprine and its metabolite 6-mercaptopurine in human plasma using solid phase extraction-evaporation and liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. *Int Curr Pharm J*, 2012, 1(11), 342-352.
42. Ravisankar P, Anusha Rani K, Vineela C, Laya Sri V, Vijaya Bharathi M. Development and validation of Rapid RP-HPLC Method for the Determination of Azathioprine in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Pharm Lett*, 2015, 7(3), 85-95.
43. Satishchandra MH, Singhvi I, Raj H. Development and validation of RP-HPLC method for azathioprine in pharmaceutical dosage form. *Eur J Pharm Med Res*, 2017, 4(8), 500-503.
44. Schink M, Mirsch HSM, Dieterich W, Schwappacher R, Atreya R, Neurath MF, Zopf Y. Dietary Habits and Nutrient Intake in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Nutr Food Sci*, 2017, 7(6), 642.

45. Shi SJ, Li ZF, Chen HT, Zeng FD. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of azathioprine in healthy Chinese volunteers. *Asian J Pharmacodynam Pharmacokinet*, 2006, 6(4), 331-336.
46. Sohrabpour AA, Malkzadeh R, Keshavarzian A. Current therapeutic approaches in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(33), 3668-3883.
47. Somasekhar V. Optimization and validation of an RP-HPLC method for the estimation of 6-mercaptopurine in bulk and pharmaceutical formulations. *Braz J Pharm Sci*, 2014, 50(4), 793-797.
48. Sorouraddin MH, Khani MY, Amini K, Naseri A, Asgari D, Rashidi MR. Simultaneous Determination of 6-Mercaptopurine and its Oxidative Metabolites in Synthetic Solutions and Human Plasma using Spectrophotometric Multivariate Calibration Methods. *BioImpacts*, 2011, 1(1), 53-62.
49. Tolbert JA, Bai S, Abdel-Rahman SM, August KJ, Weir SJ, Kearns GL, Neville KA. Pharmacokinetics of two 6-mercaptopurine liquid formulations in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 2017, 64, e26465.
50. Tomić S, Jakić-Razumović J, Kuzmić-Prusac I, Glavina-Durdov M, Forempoher G. Bolesti probavnoga sustava. U: Patologija: peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, urednici, Zagreb, Hrvatska, Medicinska naklada, 2018, str. 448-451.
51. van den Berg S, de Boer M, van der Meulen-de Jong AE, Jansen JM, Hoentjen F, Russel MGVM, Mahmmud N, van Bodegraven AA, van der Woude CJ, Mulder CJJ, de Boer NKH. Safety of Thioguanine During Pregnancy in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 2016, 10(2), 159-165.
52. Ward MG, Patel KB, Kariyawasam VC, Goel R, Warner B, Elliott TR, Blaker PA, Irving PM, Marinaki AM, Sanderson JD. Thioguanine in inflammatory bowel disease: Long-term efficacy and safety. *United European Gastroenterol J*, 2016, 5(4), 563-570.
53. Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, prvo izdanje. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 238-276.
54. What is Green Chemistry? – American Chemical Society, URL: <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry.html>, pristupljeno 3.2.2018.
55. Yakut M, Ustün Y, Kabaçam G, Soykan I. Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel diseases. *Eur J Intern Med*, 2010, 21(4), 320-323.

56. Yang H, Xiao X, Zhao XS, Hu L, Xue XF, Ye JS. Study on Fluorescence Spectra of Thiamine and Riboflavin. *MATEC Web Conf*, 2016, 63,03013
57. Zheng XH, Jiang LY, Zhao LT, Zhang QY, Ding L. Simultaneous quantitation of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Anal*, 2015, 5, 269-275.

8. SAŽETAK

Nova HPLC-DAD-MSⁿ metoda za određivanje imunosupresiva korištenih u terapiji upalnih bolesti crijeva i folne kiseline u tabletama i plazmi

U novije vrijeme incidencija upalnih bolesti crijeva (Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa) je u porastu. Jedan od čestih simptoma ovih bolesti je malapsorpcija hranjivih tvari, od kojih su mnoge bitne za održavanje zdravlja. Folna kiselina, kao jedan od vitamina ključnih za prevenciju anemija te smanjenje rizika kolorektalnog karcinoma, također se malapsorbira kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva. Primjena dvokomponentnih tableta koje bi sadržavale jedan od imunosupresivnih lijekova uz folnu kiselinu mogla bi poboljšati suradljivost pacijenata oboljelih od ovih bolesti. U ovom radu razvijena je analitička metoda za istovremeno određivanje folne kiseline i imunosupresiva iz skupine analoga purina (azatioprina, 6-merkaptopurina te 6-tiogvanina) u tabletama i plazmi primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti te spektrometrije masa koja bi služila kao analitička podrška navedenoj formulaciji tableta. Metoda za istovremeno određivanje ovih lijekova dosad nije razvijena, a razvojem iste povećava se učinkovitost i brzina rutinskih analiza te smanjuje stvaranje otpada. Mjerenja su provedena na instrumentu Agilent 1100 Series LC/MSD Trap. Kao nepokretna faza korištena je Zorbax SB C8 kolona veličine čestica 5 µm. Primijenjena je gradijentna elucija, sa sastavnicom A pokretne faze 0,1% mravljom kiselinom u ultračistoj vodi, a sastavnicom B pokretne faze 0,1% mravljom kiselinom u acetonitrilu. Za snimanje masenih spektara primijenjena je ionizacija elektroraspršenjem uz dušik kao plin nebulizator, dok je helij korišten za fragmentiranje. Metoda je validirana sukladno ICH smjernicama te primijenjena na uzorcima tableta i umjetne plazme, u čemu se pokazala pogodnom, uz kratku i jednostavnu pripremu uzoraka te trajanju metode do 10 minuta.

KLJUČNE RIJEČI: upalne bolesti crijeva, folna kiselina, imunosupresivi, LC-DAD-MSⁿ

9. SUMMARY

A novel HPLC-DAD-MSⁿ method for the determination of immunosuppressants used in the therapy of Inflammatory Bowel Disease and folic acid in tablets and plasma

In recent years, the incidence of Inflammatory Bowel Disease (Crohn's disease and Ulcerative Colitis) has been on the rise. One of the common symptoms of these illnesses is the malabsorption of nutrients, many of which are crucial for maintaining good health. Folic acid, one of the vitamins necessary to prevent anemia and reduce the risk of colorectal carcinoma, is also malabsorbed in patients with Inflammatory Bowel Disease. The use of two-component tablets which would contain one of the immunosuppressant drugs, as well as folic acid, could improve the adherence of patients suffering from these illnesses. In this study, an analytical method for simultaneous determination of folic acid and immunosuppressants of the purine analogues group (azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine) in tablets and plasma by the use of High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry has been developed; the method might serve as analytical support to the beforementioned tablet formulation. Up to now, a method for simultaneous determination of these drugs has not been developed – by developing the former, more efficient and faster analyses, as well as waste reduction, are achieved. Measurements were made on Agilent 1100 Series LC/MSD Trap instrument. Zorbax SB C8 column with particle size of 5 µm was used as stationary phase. Gradient elution, with 0,1% formic acid in ultrapure water as component A and 0,1% formic acid in acetonitrile as component B of mobile phase was used. For the mass spectra, Electrospray Ionisation with nitrogen as the nebulizer and helium as collision gas was applied. The method has been validated according to ICH guidelines and applied to the tablet and artificial plasma samples. The method has proved to be suitable for the intended purpose, with a short and simple sample preparation and the run time of 10 minutes.

KEYWORDS: Inflammatory Bowel Disease, folic acid, immunosuppressants, LC-DAD-MSⁿ