Razvoj i validacija HPLC/DAD/MS/MS metode za određivanje azatioprina u tabletama i plazmi

Zebić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:565794

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Tea Zebić

Razvoj i validacija HPLC/DAD/MS/MS metode za određivanje azatioprina u tabletama i plazmi

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pomoći pri izvršavanju eksperimentalnog dijela i pisanju diplomskog rada, te izvrsnom vodstvu. Hvala Vam na dobroj volji i podršci, a nadasve na utrošenom vremenu koje ste izdvojili da bi ovaj rad bio uspješan!

Također, hvala i prof. dr. sc. Biljani Nigović što me svojim izvrsno strukturiranim i stručnim predavanjima na kolegiju Analitika lijekova zainteresirala za područje rada Zavoda.

Hvala i svim drugim djelatnicima Zavoda koji su doprinjeli izradi diplomskog rada

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Određivanje sadržaja aktivnih tvari u farmaceutskim formulacijama 2
1.2. Određivanje sadržaja aktivnih tvari u biološkim uzorcima - Bioanalitika 2
1.3. Azatioprin 3
1.4. Pregled radova HPLC/MS za određivanje azatioprina u formulacijama i biološkim uzorcima 6
2. OBRAZLOŽENJE TEME 8
3. MATERIJALI I METODE 10
3.1. Materijali 11
3.1.1. Kemikalije 11
3.1.2. Radni instrumenti 11
3.1.3. Pribor 11
3.1.4. Programski paketi 11
3.2. Metode 12
3.2.1. Priprema pokretne faze 12
3.2.2. Priprema standardne otopine 12
3.2.3. Priprema ispitivanog uzorka 12
3.2.4. Kromatografska analiza 12
3.2.5. Masena spektrometrija 12
3.2.6. Statistička obrada rezultata 13
3.2.7. Validacija metode 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 14
4.1. Razvoj HPLC/DAD metode 15
4.2. Validacija HPLC/DAD/MS/MS metode 20
4.2.1. Linearnost 20
4.2.2. Granica dokazivanja (LOD) 21
4.2.3. Granica određivanja (LOQ) 21
4.2.4. Preciznost 22
5. ZAKLJUČCI 23
6. LITERATURA 25
7. SAŽETAK / SUMMARY 28
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

POPIS KRATICA I SIMBOLA

A	površina kromatografskog pika
APCI	kemijski ionizator pri atmosfreskom tlaku (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
c	koncentracija
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic acid*)
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (eng. *Electrospray Ionization*)
HGPRT	hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza (eng. *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*)
HPLC-MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s masenim spektrometrom (eng. *High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)
HPLC-MS/MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s tandem masenim spektrometrom (eng. *High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*)
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji (eng. *International Conference of Harmonization)*
k	koeficijent korelacije regresijskog pravca
LOD	granica dokazivanja (eng. *Limit of Detection*)

LOQ	granica određivanja (eng. *Limit od Quantitation*)
RNK	ribonukleinska kiselina (eng. *Ribonucleic acid*)
RSD	relativno standardno odstupanje (eng. *Relative Standard Deviation*)
S	nagib pravca procijenjen iz baždarne krivulje analita
SD	standardna devijacija (eng. *Standard Deviation*)
TIC	kromatogram ukupnih iona (eng. *Total Ion Chromatogram*)
TPMT	tiopurin-metil-transferaza (eng. *Thiopurine methyltransferase*)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*)
XO	ksantin oksidaza (eng. *Xanthine oxidase*)
σ	standardna devijacija signala slijepih proba/standardna devijacija regresijskog pravca u radnom području LOD/LOQ/standardna devijacija odsječka na osi y regresijskog pravca

1. UVOD

Tijekom razvoja novog lijeka od iznimnog je značaja razviti analitičke metode kojima bi se određivao sadržaj lijeka kako u gotovim formulacijama, tako i u biološkim uzorcima.

1.1. Određivanje sadržaja aktivnih tvari u farmaceutskim formulacijama

Pojam kontrola kvalitete obuhvaća sve postupke koje je potrebno izvršiti kako bi se potvrdio identitet, ali i provjerila čistoća pojedine farmaceutske sirovine.

Takvi postupci mogu uključivati vrlo jednostavne analize poput kemijskih reakcija kojima se potvrđuje identitet pojedinog analita u uzorku, ali i složene instrumentalne tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), UV/VIS spektrofotometrije, infracrvene spektroskopije itd.

Osim aktivnih, ljekovitih tvari[1] i onečišćenja u gotovim formulacijama potrebno je ispitivati i pomoćne tvari[2]. Nadalje, potrebno je utvrditi i stabilnost gotovog proizvoda te koje tvari nastaju izlaganjem proizvoda UV svjetlu, povišenoj temperaturi i oksidativnoj razgradnji.

Danas postoji preko 40 različitih farmakopeja koje podliježu svojim regionalnim, odnosno nacionalnim regulativama, a osnivanjem Svjetske zdravstvene organizacije 1948. uviđena je potreba za razvijanjem univerzalne farmakopeje, pa je tako i nastala Internacionalna farmakopeja (eng. *The International Pharmacopoeia*) koja se redovito obnavlja, a posljednje, 6. izdanje objavljeno je 2016. godine (www.who.int).

1.2. Određivanje sadržaja aktivnih tvari u biološkim uzorcima - bioanalitika

Bioanalitičke metode obuhvaćaju određivanje lijekova, odnosno njihovih metabolita u biološkim tekućinama, prvenstveno u krvi, plazmi, serumu, urinu, ali i kosi, noktima...

---

[1] Aktivna farmaceutska supstancija definira se kao bilo koja tvar, odnosno smjesa tvari koja posjeduje farmakološku aktivost ili na neki drugi način ima direktan učinak na terapiju, izlječenje, prevenciju oboljenja, ili pak utječe na neku funkciju ili strukuturu organizma.

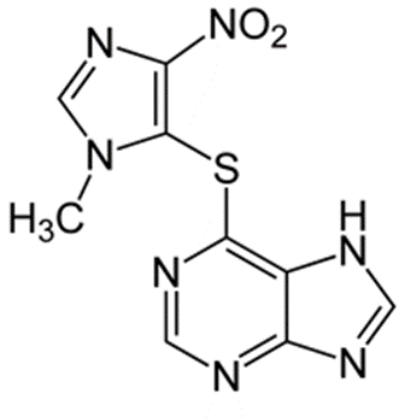
[2] Pomoćna farmaceutska tvar je svaka komponenta koja je prisutna u određenoj formulaciji, a nema farmakološki učinak.

Bioanalitička ispitivanja najčešće su podijeljena u dvije faze: priprema uzorka i analiza sastavnica uzorka.

Da bi se dobili što pouzdaniji rezultati bioanalitičkih ispitivanja vrlo često je potrebno prije same analize izvršiti nekoliko predradnji kojima se uklanjaju interferencije iz uzorka i sprječava se njihov utjecaj na rezultate analize. Osim uklanjanja interferencija, priprema uzorka za analizu vrlo često uključuje i ukoncentriravanje analita, a sve u svrhu postizanja bolje osjetljivosti analitičke metode. Među tehnike pripreme ili predobrade bioloških uzoraka ubrajaju se tehnike poput taloženje proteina, ekstrakcije tekuće-tekuće te ekstrakcije čvrstom fazom. Slobodno je moguće reći da se danas ove tehnike rutinski primjenjuju u bioanalitičkim laboratorijima (Pradeep i sur., 2013).

Trenutno najčešće primjenjivana tehnika za određivanje analita u bioanalitici je zasigurno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s masenim spektrometrom (eng. *High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, HPLC-MS). Kada se govori o masenoj spektrometriji potrebno je istaknuti kako su najčešće primjenjivani ionizatori: ionizator elektro-raspršenjem (eng. *Electrspray Ionization*, ESI) te kemijski ionizator pri atmosferskom tlaku (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* APCI) (Pandey i sur., 2010).

1.3. Azatioprin



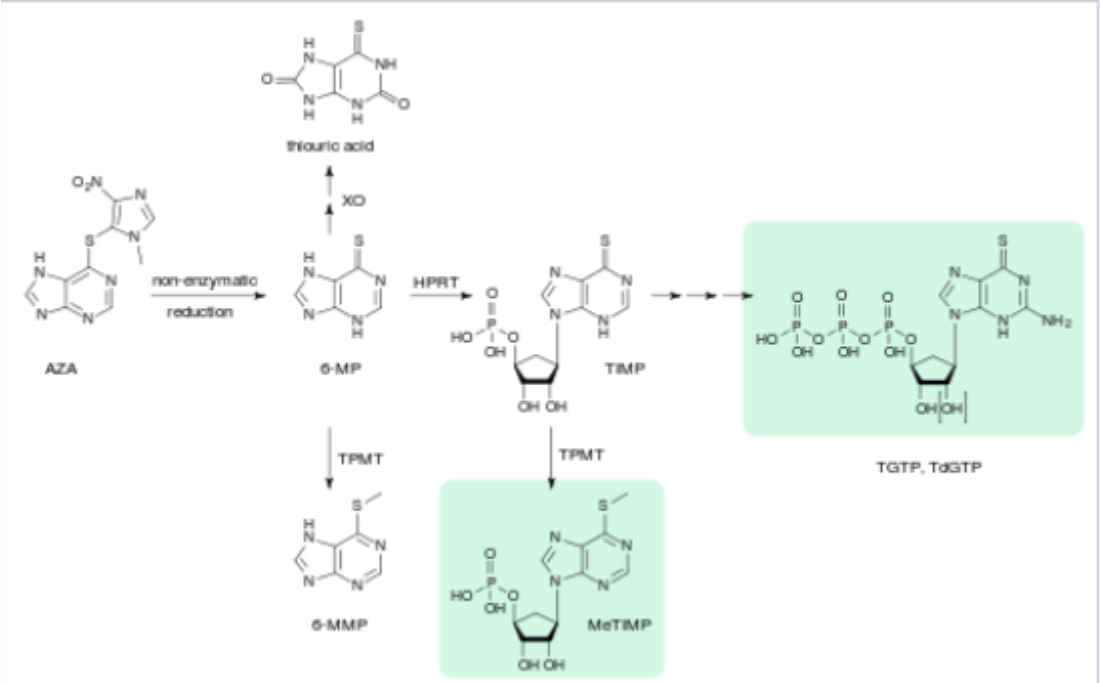
Slika 1. Struktrurna formula azatioprina.

Azatioprin je imunosupresiv koji pripada skupini antimetabolita. Osmišljen je kao prolijek. Dakle, azatioprin je imidazolski derivat lijeka 6-merkaptopurina koji aktivnošću enzima HGPRT-a (hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza) dalje prelazi u citotoksični, aktivni oblik lijeka, odnosno 6-tiogvaninske nukleotide. Njegov mehanizam djelovanja jest

ugradnja u strukturu nukleinske kiseline pri replikaciji, budući da je strukturno sličan purinskoj bazi gvaninu, koja uz drugu purinsku bazu adenin te tri pirimidinske baze timin, citozin i uracil izgađuju deoksiribonukleinsku (DNK) i ribonukleinsku kiselinu (RNK).

TPMT (tiopurin-metil-transferaza) je enzim koji metilira 6-merkaptopurin te na taj način sprječava njegovu konverziju u tiogvaninske nukleotide.

Enzim XO (ksantin oksidaza) izlučuje azatioprin u obliku tiourične kiseline, neaktivnog metabolita, a pokazano je da se čak 84% merkaptopurina metabolizira preko ksantin oksidaze, a preostalih 16% kataboliziraju enzimi TPMT i HPRT (Aberra i Lichtenstein, 2005).



Slika 2: Metabolizam azatioprina (preuzeto s: www.wikipedia.org).

U 11 % populacije zabilježena je snižena razina aktivnosti enzima TPMT-a, dok je kod 0.3% ljudi primjećen nedostatak ekspresije tog enzima. Kod tih ljudi dolazi do nakupljanja aktivnog 6-merkaptopurina, što je povezano s povećanom koncentracijom citotoksičnog 6-tiogvanina. Posljedično, kod takvih osoba može doći do krvarenja, mijelosupresije, infekcija, ali i smrti.

Stoga se u terapiji takvih pacijenata ne preporuča korištenje azatioprina, ili 6-merkaptopurina. No, ako je takva terapija zaista potrebna, nužno je primijeniti najnižu efikasnu dozu, uz redovito praćenje krvnih nalaza.

Identificirano je 28 različitih alelnih varijanti gena za TPMT. Kod većine je ustanovljena smanjena aktivnost enzima in vitro. Međutim, samo kod nekih je taj efekt i klinički izražen. Kod bijelaca najčešće je izražena varijanta TPMT*3A. Potom, alelna varijanta TPMT*3C primjećena je u 2% azijske populacije, dok kod afričke populacije u također 2% slučajeva prednjači TPMT*8 (www.medscape.com).

Citotoksičan učinak lijek ostvaruje putem tri različita mehanizma:

- inkorporacijom u molekulu DNA u obliku tiodeoksigvanozin trifosfata, odnosno tiogvanozin trifosfata u molekulu RNA,
- inhibicijom *de novo* sinteze purinskih analoga te
- sprečavanjem vezanja s Ras povezanim C3 botulin toksin supstratom 1 što uzrokuje apoptozu imunosnih stanica, aktiviranih T limfocita (smpdb.ca).

Zbog svega gore navedenog, lijek se primjenjuje u liječenju različitih bolesti kojima se nastoji suprimirati imunosni odgovor pacijenta, kao što su primjerice reumatoidni artritis, Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, sistemski eritemski lupus, autoimuni kronični aktivni hepatitis, nodozni poliarteritis, autoimuna hemolitička anemija, kronična refrakterna idiopatska trombocitopenična purpura (www.halmed.hr). Nadalje, azatioprin je svoju primjenu našao i u prevenciji odbacivanja transpantiranih organa, najčešće bubrega.

Svjetska zdravstvena organizacija (eng. WHO) uvrstila je azatioprin na listu esencijalnih lijekova za zdravstveni sustav, koji su se pokazali najučinkovitijima, najsigurnijima i optimalnog omjera cijene i učinkovitosti za određenu indikaciju (www.who.int).

Lijek je moguće primjenjivati ili u obliku monoterapije ili, češće, u kombinaciji s drugim imunosupresivima ili lijekovima poput kortikosteroida.

Kontraindiciran je kod bolesnika s poznatom preosjetljivošću na azatioprin i pri primjeni živih cjepiva, a potreban je oprez s istovremenom primjenom drugih lijekova koji inhibiraju TPMT enzim, poput olsalazina, mesalazina ili sulfasalazina.

Potrebno je istaknuti da su pacijenti na terapiji azatioprinom pod većim rizikom od oboljenja od limfoma, sarkoma, karcinoma grlića maternice te razvoja virusnih, bakterijskih ili gljivičnih infekcija (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Također je povećana i vjerojatnost od razvoja karcinoma kože zbog veće osjetljivosti na UV A zračenje. Stoga se pacijentima savjetuje ograničeno izlaganje suncu uz korištenje krema za sunčanje s visokim zaštitnim faktorom i primjerene zaštitne odjeće.

Zbog citotoksičnog učinka, lijek nije primjeren za upotrebu kod trudnica.

Kada se azatioprin istodobno primjenuje s alopurinolom, oksipurinolom ili tiopurinolom dozu azatioprina treba smanjiti na jednu četvrtinu početne doze. Naime, ovi lijekovi djeluju kao inhibitori ksantin oksidaze – enzima važnog za metabolizam azatioprina.

Kako bi se primijenila prikladna doza azatioprina za pojedinog pacijenta, potrebno je pratiti aktivnost TPMT enzima. Kod njegove normalne aktivnosti doziranje je moguće započeti s 1 mg/kg tjelesne težine. Nakon primjene lijeka njegova koncentracija u plazmi redovito se provjerava zbog prevecije štetnog djelovanja, tj. suprimiranja stvaranja koštane srži. Pacijenti s viskom aktivnošću enzima (većom od 15 U/mL) dobro odgovaraju na veće doze azatioprina (veće od 2 mg/kg tjelesne mase) (Cuffari, 2006). Međutim, za standardizaciju terapije s obzirom na aktivost TPMT-a potrebne su redovite kontrole. Preporučljivo je tijekom prvih 8 tjedana nakon uvođenja lijeka pratiti potpunu krvnu sliku, uključujući trombocite. Na početku terapije koncentracija lijeka u plazmi provjerava se jednom tjedno. Ukoliko se primjenjuju visoke doze lijeka ili se lijek daje bolesnicima s teškim oštećenjem bubrega i/ili jetre tada je potrebno i češće provjeravati koncentraciju lijeka u plazmi. Kasnije tijekom liječenja moguće je smanjiti učestalost praćenja potpune krvne slike, ali se ipak preporuča kontrola jednom mjesečno ili barem u intervalima ne dužima od 3 mjeseca (www.halmed.hr).

1.4. Pregled radova HPLC/MS za određivanje azatioprina u formulacijama i biološkim uzorcima

Pregledom literature utvrđeno je kako su Bhaskar i suradnici (Bhaskar i sur, 2010) predložili metodu za određivanje azatioprina u gotovim formulacijama primjenom HPLC/DAD tehnike. Kako bi dobili prikladno odvajanje analita od ostalih sastavnica uzorka korištena je C18 kromatografska kolona (250 x 4 mm, veličina čestica 5 µm). Predložena metoda je iznimno jednostavna budući da je korištena izokratna eluacija analita primjenom acetonitrila, metanola i vode u omjeru 25:70:05. pH pokretne faze bio je 4,0 ± 0,1 što je postignuto ledenom octenom kiselinom. Kromatogrami su snimani na valnoj duljini od 280 nm, a protok pokretne faze iznosio je 1,0 ml/min. Vrijeme zadržavanja azatioprina pri navedenim uvjetima iznosilo je 3,2 min. Predložena metoda je i validirana te je potrebno istaknuti kako je limit određivanja (eng. *Limit of Quantitation*, LOQ) iznosio 30 µg/ml.

HPLC tehnika, ali uz detekciju masenim spektrometrom primjenjena je i za određivanje azatioprina i njegova metabolita 6-merkaptopurina u plazmi pacijenata. Prije

same analize azatioprin i 6-merkaptopurin ekstrahirani su iz uzoraka primjenom ekstrakcije čvrstom fazom primjenom Oasis MCX (Waters, Milford, MA, USA) čija čvrsta faza je polimer s vezanim kation izmjenjivačkim funkcionalnim skupinama. Primjenom kromatografske kolone ZORBAX SB CN (75 X 50 mm, veličina čestica 5 μm) postignuto je iznimno kratko ukupno trajanje analize od 3,0 min. Potrebno je istaknuti kako je predložena metoda značajno osjetljivija ($LOQ_{(azatioprin)}$ = 2,5 ng/ml, $LOQ_{(6\text{-merkaptopurin})}$ = 1,2 ng/ml) u odnosu na gore navedenu te je stoga i prikladna za farmakokinetička istraživanja (Mokkaisamy i sur, 2012).

UPLC tehnika primjenjena je za analizu azatioprina i njegovih metabolita, ali u perifernoj krvi mononuklearnih stanica kod pacijenata oboljelih od upalne bolesti crijeva (Nicolò i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Azatioprin je lijek koji ima imunosupresivni učinak te se iz tog razloga koristi u terapiji mnogih oboljenja kada se upravo nastoji smanjiti imunosni odgovor bolesnika, primjerice za liječenje reumatoidnog artritisa, Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa, sistemskog eritemskog lupusa i autoimune hemolitičke anemije. Također se upotrebljava kod transplatacija organa, i zato je njegovo određivanje u biološkim uzorcima od iznimne važnosti za postavljanje prikladne doze pacijentima.

Cilj ovog diplomskog rada je razviti jedinstvenu metodu za određivanje azatioprina u tabletama i plazmi primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Kako bi se osigurala pouzdanost mjerenja novorazvijena metoda će se i validirati. Dakle, ispitat će se specifičnost/selektivnost, linearnost, radno područje, osjetljivost, točnost i preciznost metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Amonijak, otopina min. 25 %, čistoća: p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Imuran, 50 mg (Aspen, St Leonards, Australija)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mravlja kiselina, 98-100%, čistoća: p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Umjetna plazma PreciControl ClinChem Multi 2 (Roche, Basel, Švicarska)

3.1.2. Radni instrumenti

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Helij, čistoće za kromatografiju (Messer, Gumpoldskirchen, Austrija)
- Magnetska mješalica (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen Njemačka)
- Mini-Vortex (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.1.3. Pribor

- Celulozni nitratni filteri za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji, veličina pora 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Injekcijski filteri Acrodise GHP, veličina pora 0,20 µm, promjer 26 mm (Gelman, Ann Arbor, SAD)
- Kromatografska kolona Symmetry C18, dimenzije: 150 mm x 4,6 mm; veličina čestica: 3,5 µm (Waters, Milford, MA, SAD)
- Stakleni sustav za filtriranje (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Tamne bočice za uzorkovanje, 2 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.1.4. Programski paketi

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

3.2. Metode

Identifikacija i određivanje azatioprina u farmaceutskom obliku te plazmi primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije.

3.2.1. Priprema pokretne faze

Kao pokretna faza primjenjena je smjesa metanola, vode te mravlje kiseline u omjeru 25 : 75 : 0,1. Pokretna faza je pripremljena te profiltrirana neposredno prije uporabe.

3.2.2. Priprema standardne otopine

Standardna otopina azatioprina pripremi se otapanjem 50 mg azatioprina u 25 ml otapala koje se dobije dodatkom 1 ml otopine amonijaka u 24 ml metanola.

3.2.3. Priprema ispitivanog uzorka

1 tableta azatioprina odvaže se na analitičkoj vagi i potom se usitni u tarioniku. Sadržaj se prenese u odmjernu tikvicu od 25 ml te se nadopuni do oznake otapalom (24 ml metanola i 1 ml otopine amonijaka). Ekstrakcija analita iz farmaceutskog oblika potakne se držanjem uzorka 1 min na Mini-Vortex uređaju te u ultrazvučnoj kupelji na sobnoj temperaturi tijekom 5 min. Nakon ekstrakcije uzorak se centrifugira 1 min, a potom se profiltrira koristeći injekcijski filter Acrodise GHP.

Priprema uzorka plazme uključivala je tehniku taloženja proteina umjetne plazme s organskim otapalom, odnosno 50% metanolom (omjer plazme i organskog otapala iznosio je 1:3).

3.2.4. Kromatografska analiza

Analiza je provedena na uređaju Agilent 1100 s obrnuto faznom kolonom Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm te veličine čestica 3,5 µm (agilent.com). Protok pokretne faze iznosio je 1 ml/min, a temperatura kolone bila je 25° C. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 5 µl. Tijekom analize uzorci su čuvani u autoinjektoru čija je temperatura iznosila 4 °C. Kromatogrami su snimani pri λ = 270 nm.

3.2.5. Masena spektrometrija

Detekcija analita provedena je na instrumentu Agilent 6300 Series Ion Trap. Provedena je pozitivna ionizacija elektroraspršenjem, dok je broj iona zadržanih u stupici iona iznosio 30

000. Vrijeme zadržavanja iona u stupici bio je 200 ms. Kao plin nebulizator primijenjen je dušik protoka 10 l/min, uz primjenu tlaka od 50,0 psi. Temperatura ionizatora bila je 350 °C. Za fragmentaciju iona primijenjen je plin helij čiji tlak je bio 6 x10^{-6} mbar. Spektar snimanja masa iona bio je postavljen u rasponu od m/z 50-500.

3.2.6. Statistička obrada rezultata

Koristeći računalni program Excel dobiveni su podaci za srednju vrijednosti, standardnu devijaciju i linearnost metode.

3.2.7. Validacija metode

Metoda je validirana prema ICH smjernicama (smjernice Međunarodne konferencije o harmonizaciji, prema eng. *International Conference of Harmonization*). Ispitani su sljedeći validacijski parametri: linearnost, osjetljivost i ponovljivost.

4. REZULTATI I RASPRAVA

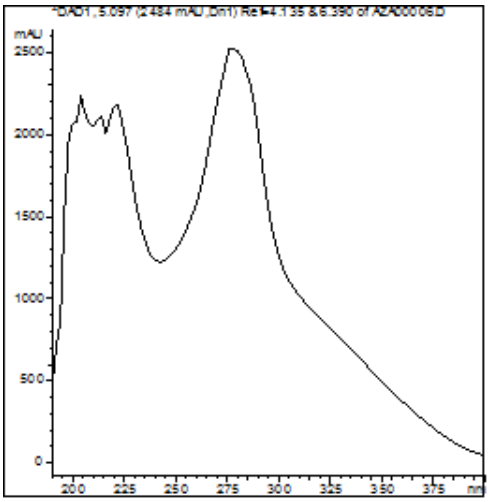
4.1. Razvoj HPLC/DAD metode

Kako bi se postigla zadovoljavajuća selektivnost, ali i osjetljivost metode određivanja azatioprina u dvjema različitim matricama tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, ispitan je utjecaj sljedećih analitičkih uvjeta:

- sastav i protok pokretne faze,
- temperatura,
- izokratni/gradijentni način eluacije,
- pH pokretne faze i
- dimenzije kromatografske kolone.

Gore opisanim uvjetima kromatografske analize postignuto je zadovoljavajuće razdvajanje azatioprina od sastavnica obiju matrica unutar 6 min primjenom jednostavne izokratne eluacije. Kako bi se postigla dobra osjetljivost metode bilo je potrebno zakiseliti pokretnu fazu s mravljom kiselinom.

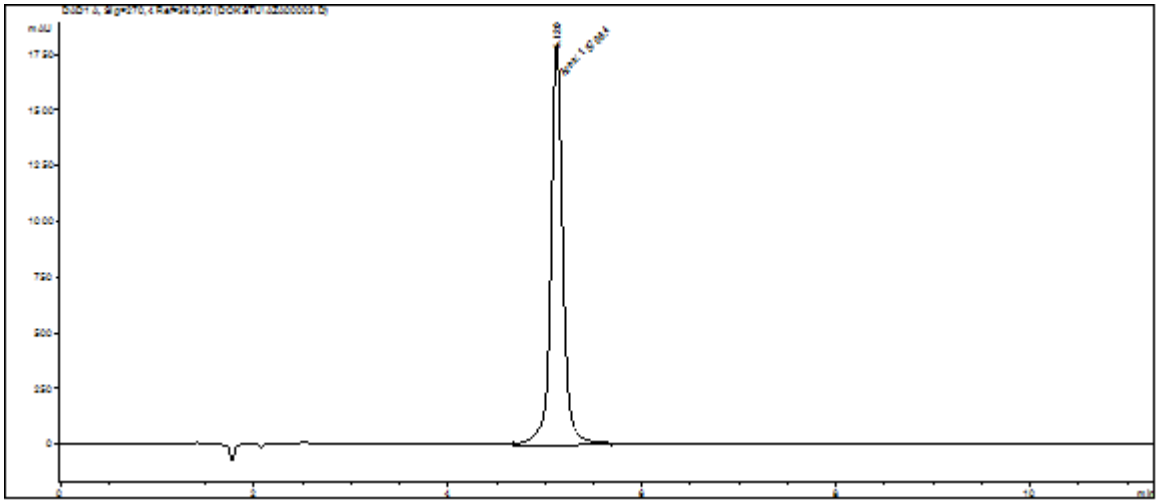
UV/Vis spektrofotometrija je analitička tehnika izbora za identifikaciju, utemeljena na fenomenu različite energije osnovnog i pobuđenog stanja elektrona, koje ovisi o strukturi analizirane molekule. Pritom, valna duljina pri kojoj molekula pokazuje apsorbanciju energije, ovisi o jakosti vezanja elektrona u nezasićenim funkcionalnim skupinama koje apsorbiraju u ultraljubičastom i vidljivom području spektra valnih duljina (Nigović, 2015). UV/Vis analiza je pokazala da azatioprin ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 285 nm (Slika 3).



Slika 3: UV/Vis spektar azatioprina.

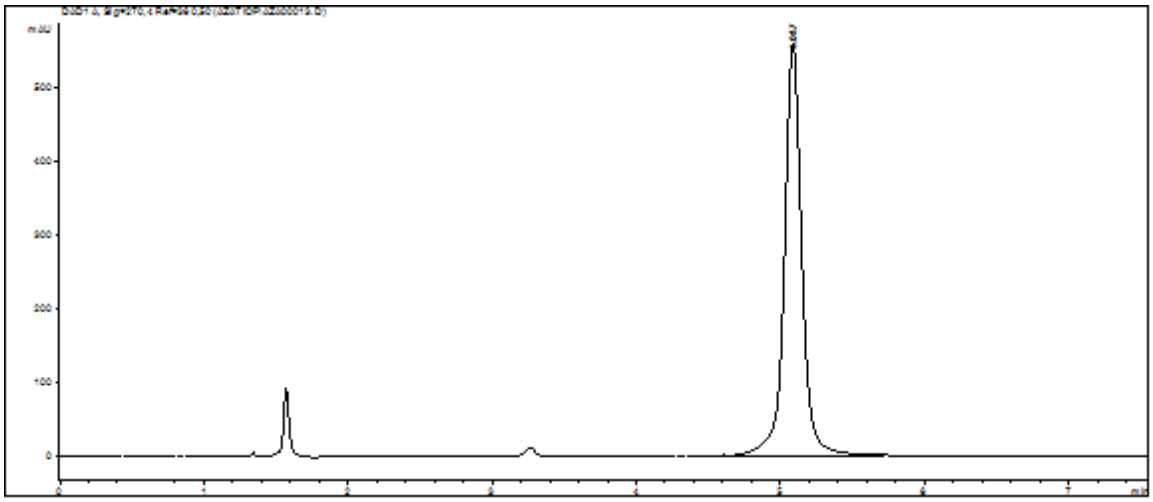
Na Slici 4. prikazan je kromatogram dobiven nakon ekstrakcije azatioprina iz uzorka tablete (koncetracija azatioprina u uzorku iznosi 2 mg/ml). Vrijeme zadržavanja azatioprina na primjenjenoj obrnuto faznoj kromatografskoj koloni iznosi 5,1 min. Nadalje, iz dobivenog kromatograma moguće je utvrditi kako je dobiven simetrični kromatografski pik azatioprina te

kako je postignuto i dobro razdvajanje od sastavnica matrice, odnosno ekscipijensa korištenih tijekom postupka proizvodnje tablete.



Slika 4. Kromatogram uzorka tablete azatioprina.

Na Slici 5. prikazan je kromatogram uzorka dobiven dodatkom standardne otopine azatioprina u umjetnu plazmu (koncentracija azatioprina u uzorku iznosi 2 mg/ml). Kao što je bilo i za očekivati, vrijeme zadržavanja azatioprina iznosi 5,1 min te je iz dobivenog kromatograma moguće utvrditi kako je dobiven simetrični kromatografski pik azatioprina. No, potrebno je istaknuti kako je postignuto i dobro razdvajanje od sastavnica složene biološke matrice.



Slika 5. Kromatogram dobiven dodatkom standardne otopine azatioprina u umjetnu plazmu.

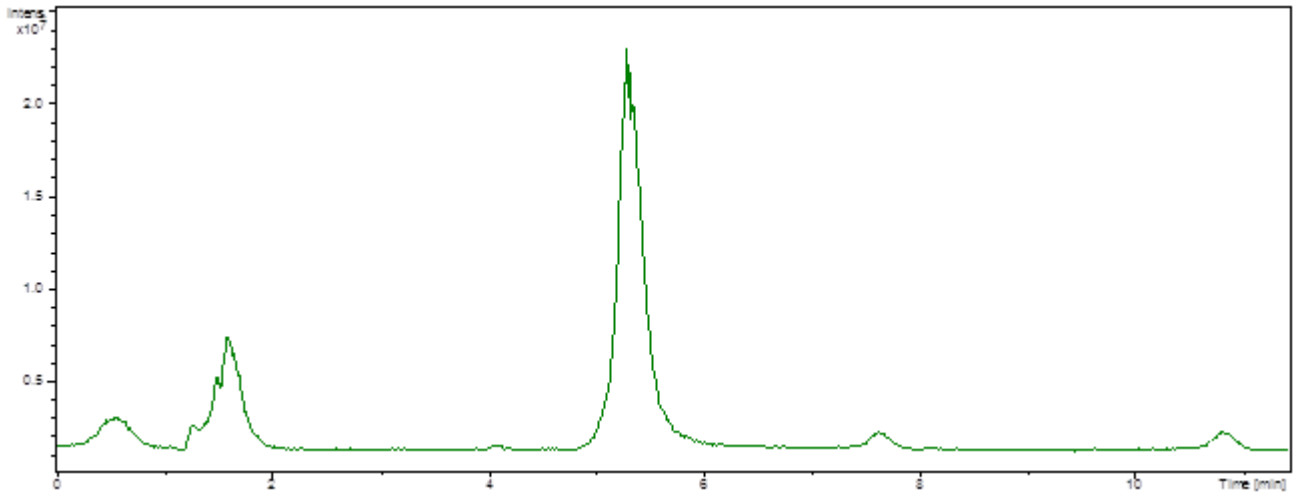
Masena spektrometrija je instrumentalna analitička tehnika kojom se molekule analiziraju na temelju njihove mase i naboja. Analiza masenim spektrometrom započinje ionizacijom molekula u dijelu instrumenta koji se naziva ionizator. Nastali ioni se potom provode kroz dio instrumenta koji se naziva analizator. U ovom dijelu instrumenta ioni se razdvajaju u prostoru i/ili vremenu. Nakon analizatora ioni odlaze na detektor gdje se proizvodi električni signal koji se na kraju registrira. U odnosu na UV/VIS detektor spektrometar masa je detektor koji omogućava razvoj selektivnije, ali i osjetljivije analitičke metode. Stoga se iznimno često koristi za složene uzorke, kao i za identifikaciju i određivanje sastavnica prisutnih u malim koncentaracijama (Mornar, 2015). No, za razvoj takve metode potrebno je optimizirati uvjete na masenom spektrometru. Stoga, su prilikom razvoja HPLC/DAD/MS/MS metode za određivanje azatioprina u tabletama i plazmi ispitani sljedeći uvjeti:

- tlak i brzina protoka plina dušika
- temperatura ionizatora,
- širina spektra snimanja,
- pozitivna/negativna ionizacija i
- broj i vrijeme zadržavanja iona u stupici.

Odabrani uvjeti na masenom spektrometru opisani su u poglavlju 3.2.5.

Kromatogram ukupnih iona (eng. *Total Ion Chromatogram*, TIC) je kromatogram dobiven zbrajanjem intenziteta svih iona. Pri čemu uključuje ione i šuma i sastavnica

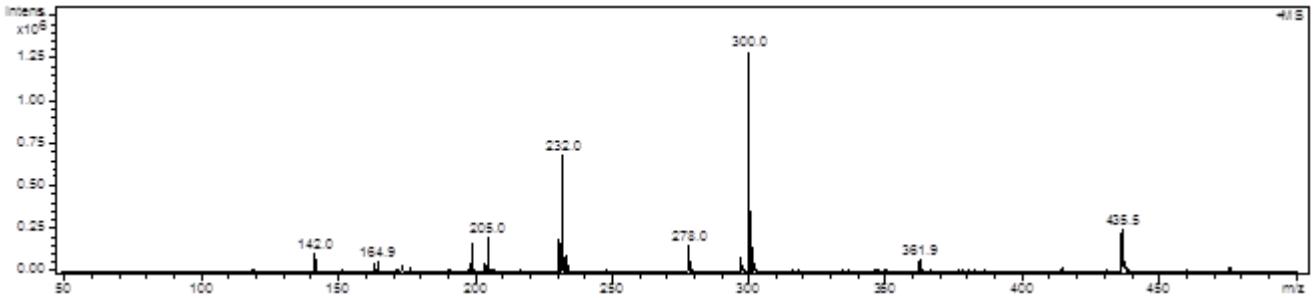
ispitivanog uzorka (www.shimadzu.com). Ova vrsta kromatograma se vrlo često prikazuje kao rezultat HPLC/DAD/MS/MS analize (Slika 6).



Slika 6. Kromatogram ukupnih iona uzorka tablete azatioprina.

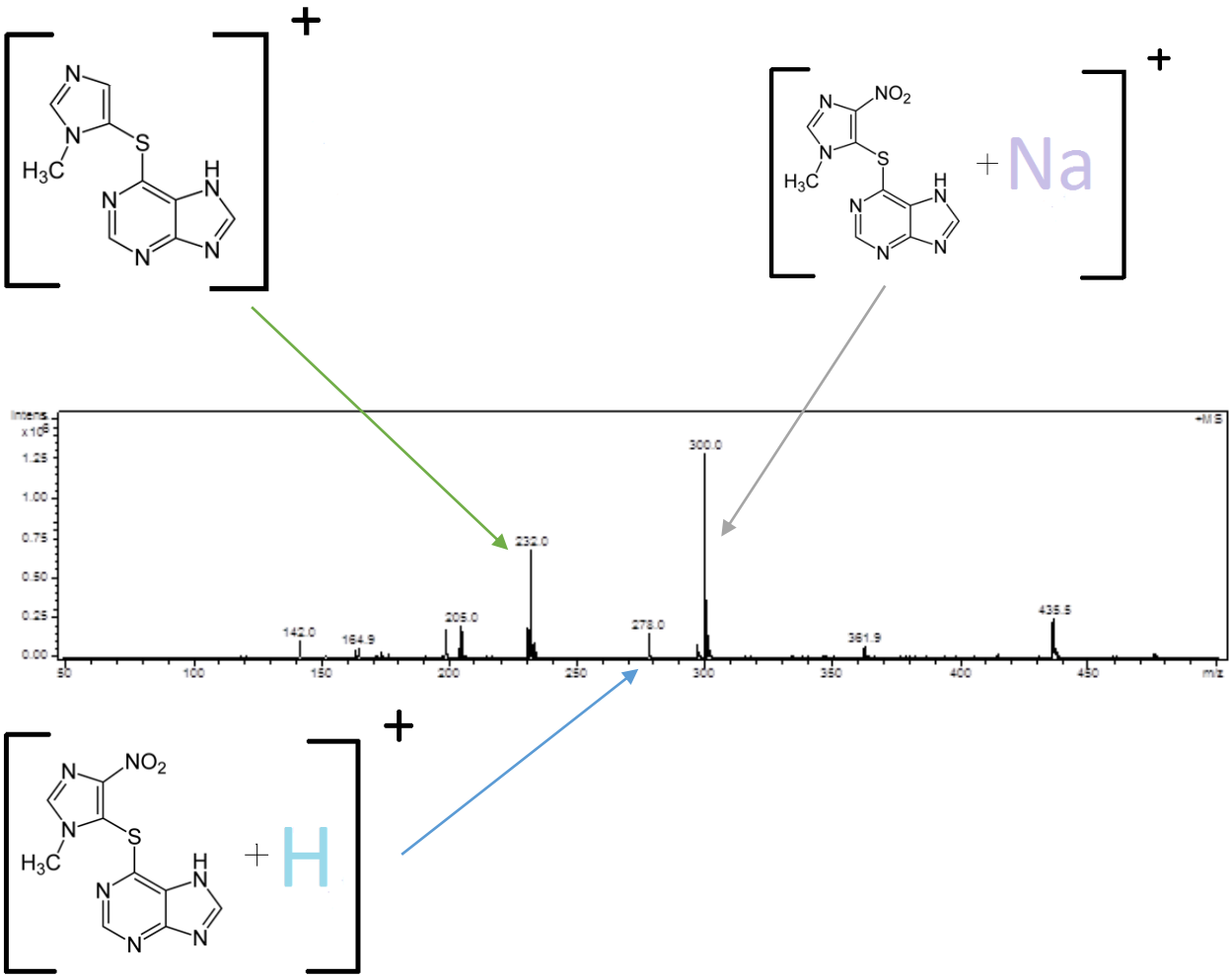
Usporedbom kromatograma uzorka tablete azatioprina dobivenog pri λ = 270 nm primjenom DAD detektora (Slika 4) te kromatograma ukupnih iona za isti uzorak primjenom masenog spetrometra (Slika 6) moguće je utvrditi kako se veći broj sastavnica uzorka vidi nakon snimanja MS detektorom. Neke od prisutnih sastavnica su više polarne od azatioprina te imaju kraće vrijeme zadržavanja, dok su druge manje polarne te se duže zadržavaju na kromatografskoj koloni.

Na Slici 7. prikazan je maseni spektar azatioprina. Analizom dobivenog masenog spektra utvrđeno je da su prisutni osim molekulskog iona i fragmentni ioni azatioprina, kao i njegovi adukti (Slika 8).



Slika 7. Maseni spektar azatioprina.

Budući da relativna molekulska masa azatioprina iznosi 277, signal omjera mase i naboja m/z = 278 odgovara protoniranom molekulskom ionu, što je i očekivano jer je uzorak sniman pri pozitivnoj ionizaciji. Nadalje, najintezivniji signal dobiven je za omjer mase i naboja *m/z* = 300, odnosno ion dobiven adicijom atoma natrija na molekulu azatioprina. Od fragmentnih iona najveći intezitet je dobiven za *m/z* =232, odnosno za fragmentni ion dobiven nakon gubitka nitro skupine (www.leeds.ac.uk).



Slika 8: Maseni spektar azatioprina s označenim pripadajućim fragmentom i aduktima.

4.2. Validacija HPLC/DAD/MS/MS metode

Tijekom postupka validacije metode ispitane su sljedeće validacijske značajke: linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja i ponovljivost. Za validaciju metode korištena je standardna otopina azatioprina (2 mg/ml) dok su radne otopine priređene razrjeđivanjem standardne otopine azatioprina s umjetnom plazmom.

4.2.1. Linearnost

Linearnost je svojstvo analitičkog postupka kojim se dobivaju rezultati izravno proporcionalni koncentraciji analita unutar radnog područja.

Rezultat se izražava grafičkim prikazom ovisnosti izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita u obliku linearnog regresijskog pravca. Kako bi se moglo reći da je signal proporcionalno ovisan o koncentraciji analita, koeficijent korelacije (*k*) regresijskog pravca mora biti veći od 0,999.

Ishodište pravca pritom ne smije biti bitno različit od 0. U tom slučaju treba se dokazati da nema učinka na točnost metode.

Za provedbu tog validacijskog parametra bilo je potrebno postaviti kalibracijsku krivulju na način da se priredi serija uzoraka s minimalno 5 različitih koncentracija analita te se provedu 3-6 određivanja (www.labcompliance.com; Nigović i sur., 2014).

Linearnost metode je ispitana na 5 različitih koncentracija u rasponu od 0,02 do 0,6 µg/µl. Dobiveni podaci prikazani su u Tablici 1. Jednadžba regresijskog pravca iznosila je y = 7901,2 + 6,7969, dok je koeficijent korelacije (*k*) bio veći od 0,999 te je moguće utvrditi kako je postignuta izvanredna linearnost metode.

Tablica 1. Linearnost razvijene HPLC/DAD/MS/MS metode.

Koncentracija azatioprina c (µg/µl)	**Površina kromatografskih pikova A (mAU)**
0,02	158,0
0,1	803,7
0,2	1583,3
0,4	3174,4
0,6	4742,9

4.2.2. Granica dokazivanja (LOD)

Granica dokazivanja (eng. *Limit of Detection*, LOD) analitičkog postupka je najniža količina analita u uzorku koju je moguće dokazati, ali ne mora se nužno moći i odrediti (www.ich.org).

Postoji nekoliko pristupa za određivanje granice dokazivanja ovisno o tome je li analitički postupak instrumentalan ili neinstrumentalan.

- Vizualno ocjenjivanje koristi se za neinstrumentalne metode, ali se također može koristiti s instrumentalnim metodama. Granica dokazivanja određuje se analizom uzoraka s poznatim koncentracijama analita i uspostavom minimalne razine na kojoj se analit može pouzdano dokazati.
- Na temelju omjera signal-šum. Određivanje omjera signal-šum provodi se usporedbom izmjerenih signala iz uzoraka s poznatim niskim koncentracijama analita s onima slijepe probe i određivanje minimalne koncentracije pri kojoj se analit može pouzdano dokazati. Signal prema šumu omjera 3:1, odnosno 2:1, općenito se smatra prihvatljivim za procjenu granice dokazivanja.
- Na temelju standardne devijacije odgovora i nagiba pravca koji se mogu izraziti kao: $LOD = 3{,}3\frac{\sigma}{S}$ gdje σ predstavlja standardnu devijaciju signala slijepih proba (standardnu devijaciju regresijskog pravca u radnom području LOD/LOQ, standardnu devijaciju odsječka na osi y regresijskog pravca), a S nagib pravca procijenjen iz baždarne krivulje analita (Nigović, 2015; www.ich.org).

Tijekom postupka validacije predložene HPLC/DA/MS/MS metode za određivanje azatioprina LOD vrijednost dobivena je iz omjera signal-šum te iznosi 0,0016 µg/ml.

4.2.3. Granica određivanja (LOQ)

Granica određivanja (eng. *Limit of Quantitation*, LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i pouzdanošću, a definira se analogno granici dokazivanja, prema formuli: LOQ = 10 $\frac{\sigma}{S}$ (Nigović i sur., 2014).

Tijekom postupka validacije predložene HPLC/DAD/MS/MS metode za određivanje azatioprina LOQ vrijednost dobivena je iz omjera signal-šum te iznosi 0,0054 µg/ml.

Niske vrijednosti LOD i LOQ upućuju na to da je metoda osjetljiva i stoga prikladna za analizu niskih koncentracija azatioprina u uzorcima.

4.6.4. Preciznost

Preciznost je validacijski parametar koji pokazuje podudarnost rezultata niza ponovljenih mjerenja istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Može biti iskazana kao ponovljivost (eng. *repeatability*), srednja preciznost (eng. *intermediate precision*), odnosno obnovljivost (eng. *reproducibility*). Preciznost iskazana kao ponovljivost znači podudarnost rezultata analize provedenih pri istim uvjetima u kratkom vremenskom periodu, dobiveni istom metodom (Nigović i sur., 2014).

Ponovljivost metode ispitana je primjenom otopine azatioprina. Ispitana je ponovljivost metode unutar istog dana te između dva različita dana primjenom otopine azatioprina (0,6 µg/ml).

Tablica 2. Ponovljivost razvijene HPLC/DAD/MS/MS metode.

Validacijski parametar	**Srednja vrijednost površine kromatografskog pika (mAU)**	**RSD (%)**
Unutar istog dana (n = 3)	4779,3	0,21
Unutar dva dana (n = 6)	4770,2	0,36

Budući da su dobivene iznimno niske RSD vrijednosti (manje od 0,36%) moguće je utvrditi kako je predložena HPLC/DAD/MS/MS metoda ponovljiva.

5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu razvijena je HPLC/DAD/MS/MS metoda za određivanje azatioprina u tabletama i plazmi.

Prema literaturnim podacima do sada nije objavljena niti jedna metoda koja bi se mogla koristiti i za gotove farmaceutske oblike, kao i za biološke uzorke.

Među prednostima metode ubrajaju se kratko trajanje analize, kao i jednostavna priprema bioloških uzoraka (tehnika taloženja proteina).

Predložena metoda je i validirana te je utvrđeno kako je metoda linearna, osjetljiva te ponovljiva.

Iz svega gore navedenog, proizlazi da bi se predložena metoda mogla primjenjivati u rutinskim kliničkim ispitivanjima, što je od izuzetne važnosti jer je azatioprin imunosupresiv koji se često koristi u terapijama raznih oboljenja.

6. LITERATURA

- Aberra FN, Lichtenstein GR. Monitoring of Immunomodulators in Inflammatory Bowel Disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 21(4), 307-319.
- Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2017., http://www.halmed.hr, pristupljeno
  19. 02. 2017.
- Agilent Technologies, Techniques of HPLC, 2017., http://www.agilent.com, pristupljeno
  26. 02. 2017.
- An Introduction to Mass Spectrometry, 2006., http://www.leeds.ac.uk, pristupljeno 04. 03. 2017.
- Azathioprine, 2017., https://www.wikipedia.org, pristupljeno 24. 04. 2017.
- Azathioprine (By mouth), 2017., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, pristupljeno 19. 02. 2017.
- Azathioprine Metabolism and TPMT, 2015., http://emedicine.medscape.com/article/1829596-overview, pristupljeno 04. 03. 2017.
- Azathioprine Pathway, 2012., http://smpdb.ca, pristupljeno 26. 02. 2017.
- Bhaskar M, Gayasuddin Mouid M, Kulkarni U, Balaraju M, Venkatesh M. RP-HPLC Method Development for the Determination of Azathioprine in Bulk drug and Pharmaceutical Dosage Forms. *J ChemTech*, 2010, 2, 1176-1179.
- Cuffari C. A physician's guide to azathioprine metabolite testing. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 2(1), 58-63.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005., http://www.ich.org, pristupljeno 27. 02. 2017.
- Mokkaisamy JR, Jegadeesh Raja K, Kothamasu P, Thangavel S. Simultaneous determination of azathioprine and its metabolite 6-mercaptopurine in human plasma using solid phase extraction-evaporation and liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometr. *Int Curr Pharm J*, 2012, 1(11), 342-352.
- Mornar A. Predavanja iz kolegija Analitika u razvoju farmacetuskih proizvoda 2015./2016.
- Nicolòa A, Agnesod D, Simiele M, Riganò D, Adriani A, Canaparo R, Astegiano M, Rizzetto M, Di Perri G, D'Avolio G. UPLC–MS/MS method for quantification of the azathioprine metabolites 6-mercaptoguanosine and 6-methylmercaptopurine riboside in peripheral blood mononuclear cells. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 98, 271–278.

- Nigović B. Predavanja iz kolegija Analitika lijekova 2015./2016.
- Nigović B. Seminari iz kolegija Analitika lijekova 2015./2016.
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – Praktikum, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 135-137.
- Pandey S, Pandey P, Tiwari G, Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *J Pharm Methods*, 2010, 1(1), 14-24.
- Pradeep KV, Dileep RJ, Pavan B. Importance of ADME and Bioanalysis in the Drug Discovery. *J Bioequiv Availab*, 2013, 5: e31
- The International Pharmacopoeia: Sixth Edition, 2016., http://www.who.int, pristupljeno 03. 03. 2017.
- Total Ion Chromatogram, 2010., http://www.shimadzu.com, pristupljeno 28. 02. 2017.
- Validation of Analytical Methods and Procedures, 2007., http://www.labcompliance.com, pristupljeno 04. 03. 2017.
- WHO Model List of Essential Medicines, 19th list, 2015., http://www.who.int, pristupljeno, 23. 04. 2017.

7. SAŽETAK /SUMMARY

Azatioprin je lijek, točnije prolijek, koji se pokazao kao učinkoviti imunosupresiv te se iz tog razloga često koristi u terapijama mnogih oboljenja kada se upravo nastoji smanjiti imunosni odgovor bolesnika. Budući da profil njegovih nuspojava među ostalim uključuje krvarenja, infekcije, razvoja limfoma, karcinoma kože,od iznimne je važnosti razviti analitičku metodu kojom se može odrediti njegova koncentracija u biološkim uzorcima s ciljem propisivanja optimalne doze pacijentima.Tim više, što je za enzim TPMT koji ovaj lijek metabolizira, pokazano da su u sveukupnoj populaciji od 11% ljudi prisutne mutacije alela tog genskog produkta, što znači da je kod takvih osoba indiciran ili prekid nastavka liječenja ili obavezno smanjenje doze kako bi se što više minimizirali njegovi toksični učinci.

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti jedinstvenu metodu za određivanje azatioprina u tabletama i plazmi primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Kako bi se osigurala pouzdanost mjerenja novorazvijena metodu je bilo potrebno validirati. Tijekom postupka validacije metode ispitane su sljedeće validacijske značajke: linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja i ponovljivost.

Linearnost metode je ispitana na 5 različitih koncentracija u rasponu od 0,02 do 0,6 µg/µl. Jednadžba regresijskog pravca iznosila je y = 7901,2 + 6,7969, dok je koeficijent korelacije (*k*) bio veći od 0,999 te je moguće utvrditi kako je postignuta izvanredna linearnost metode.

LOD vrijednost dobivena je iz omjera signal-šum iznosila je 0,0016 µg/ml, a za LOQ 0,0054 µg/ml.

Niske vrijednosti LOD i LOQ upućuju na to da je metoda osjetljiva i stoga prikladna za analizu niskih koncentracija azatioprina u uzorcima.

Ispitana je ponovljivost metode unutar istog dana te između dva različita dana primjenom otopine azatioprina (0,6 µg/ml).

Budući da su dobivene iznimno niske RSD vrijednosti (manje od 0,36%) moguće je utvrditi kako je predložena HPLC/DAD/MS/MS metoda ponovljiva.

Iz svega gore navedenog, proizlazi da bi se predložena metoda mogla primjenjivati u rutinskim kliničkim ispitivanjima.

Azathioprine is a medicine, more specifically a prodrug, which has proven to be an effective immunosuppressant, and is therefore often used in many disease therapies when it is trying to reduce the patient's immune response. Since the profile of its side effects among others includes bleeding, infections, lymphoma and skin cancer, it is of a great importance to develop an analytical method to determine its concentration in biological samples with the aim of prescribing optimal doses to patients. Moreover, in the total population of 11% of people there are present allele mutations of the gene coding for TPMT enzyme which metabolises azathioprine. That is why such persons are advised to discontinue treatment or to reduce mandatory dose to minimize its toxic effects.

The aim of this graduate thesis was to develop a unique method for the determination of azathioprine in tablets and plasma using a coupled system of liquid chromatography and mass spectrometry. To ensure the reliability of the measurement, the newly developed method needed to be validated. During the validation process the following validation features were examined: linearity, limit of detection, limit of quantitation and repeatability.

The linearity method was tested at 5 different concentrations ranging from 0.02 to 0.6 μg / μl. The equation of the regression line was y = 7901.2 + 6.7969, while the coefficient of correlation (*k*) was greater than 0.999 which shows the remarkable linearity of the method.

The LOD value was obtained from a signal-to-noise ratio of 0.0016 μg / ml and for LOQ 0.0054 μg / ml.

The low values of LOD and LOQ indicate that the method is sensitive and therefore suitable for low concentrations of azathioprine in the samples.

The repeatability of the method was tested on the same day and between two different days using azathioprine solution (0.6 μg / ml).

Since extremely low RSD values (less than 0.36%) were obtained, it is possible to conclude th proposed HPLC/DAD/MS/MS method is repeatable.

From all of the above, it follows that the proposed method could be applied in routine clinical trials.

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

RAZVOJ I VALIDACIJA HPLC/DAD/MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE AZATIOPRINA U TABLETAMA I PLAZMI

Tea Zebić

SAŽETAK

Azatioprin je lijek, točnije prolijek, koji se pokazao kao učinkoviti imunosupresiv te se iz tog razloga često koristi u terapijama mnogih oboljenja kada se upravo nastoji smanjiti imunosni odgovor bolesnika. Budući da profil njegovih nuspojava među ostalim uključuje krvarenja, infekcije, razvoj limfoma i karcinoma kože, od iznimne je važnosti razviti analitičku metodu kojom se može odrediti njegova koncentracija u biološkim uzorcima s ciljem propisivanja optimalne doze pacijentima. Tim više, što je za enzim TPMT koji ovaj lijek metabolizira, pokazano da su u sveukupnoj populaciji od 11% ljudi prisutne mutacije alela tog genskog produkta, što znači da je kod takvih osoba indiciran ili prekid nastavka liječenja ili obavezno smanjenje doze kako bi se što više minimizirali njegovi toksični učinci. Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti jedinstvenu metodu za određivanje azatioprina u tabletama i plazmi primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Kako bi se osigurala pouzdanost mjerenja novorazvijenu metodu je bilo potrebno validirati. Tijekom postupka validacije metode ispitane su sljedeće validacijske značajke: linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja i ponovljivost. Linearnost metode je ispitana na 5 različitih koncentracija u rasponu od 0,02 do 0,6 µg/µl. Jednadžba regresijskog pravca iznosila je y = 7901,2 + 6,7969, dok je koeficijent korelacije (*k*) bio veći od 0,999 te je moguće utvrditi kako je postignuta izvanredna linearnost metode. LOD vrijednost dobivena iz omjera signal-šum iznosila je 0,0016 µg/ml, a za LOQ 0,0054 µg/ml. Niske vrijednosti LOD i LOQ upućuju na to da je metoda osjetljiva i stoga prikladna za analizu niskih koncentracija azatioprina u uzorcima. Ispitana je ponovljivost metode unutar istog dana te između dva različita dana primjenom otopine azatioprina (0,6 µg/ml). Budući da su dobivene iznimno niske RSD vrijednosti (manje od 0,36%) moguće je utvrditi kako je predložena HPLC/DAD/MS/MS metoda ponovljiva. Iz svega gore navedenog, proizlazi da bi se predložena metoda mogla primjenjivati u rutinskim kliničkim ispitivanjima.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: azatioprin, imunosupresiv, HPLC/DAD/MS/MS, bioanalitika, validacija

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Biljana Nigović, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Petra Turčić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC/DAD/MS/MS METHOD FOR DETERMINING AZATHIOPRINE IN TABLETS AND PLASMA

Tea Zebić

SUMMARY

Azathioprine is a medicine, more specifically a prodrug, which has proven to be an effective immunosuppressant, and is therefore often used in many disease therapies when it is trying to reduce the patient's immune response. Since the profile of its side effects among others includes bleeding, infections, lymphoma and skin cancer, it is of a great importance to develop an analytical method to determine its concentration in biological samples with the aim of prescribing optimal doses to patients. Moreover, in the total population of 11% of people there are present allele mutations of the gene coding for TPMT enzyme which metabolises azathioprine. That is why such persons are advised to discontinue treatment or to reduce mandatory dose to minimize its toxic effects. The aim of this graduate thesis was to develop a unique method for the determination of azathioprine in tablets and plasma using a coupled system of liquid chromatography and mass spectrometry. To ensure the reliability of the measurement, the newly developed method needed to be validated. During the validation process the following validation features were examined: linearity, limit of detection, limit of quantitation and repeatability. The linearity method was tested at 5 different concentrations ranging from 0.02 to 0.6 μg / μl. The equation of the regression line was y = 7901.2 + 6.7969, while the coefficient of correlation (*k*) was greater than 0.999 which shows the remarkable linearity of the method. The LOD value was obtained from a signal-to-noise ratio of 0.0016 μg / ml and for LOQ 0.0054 μg / ml. The low values of LOD and LOQ indicate that the method is sensitive and therefore suitable for low concentrations of azathioprine in the samples. The repeatability of the method was tested on the same day and between two different days using azathioprine solution (0.6 μg / ml). Since extremely low RSD values (less than 0.36%) were obtained, it is possible to conclude that proposed HPLC/DAD/MS/MS method is repeatable. From all of the above, it follows that the proposed method could be applied in routine clinical trials.

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

Thesis includes: 30 pages, 8 figures, 2 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: azathioprine, immunosuppressant, HPLC/DAD/MS/MS, bioanalytics, validation

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

Reviewers: **Ana Mornar Turk**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Petra Turčić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.