

Analiza pirfenidona i njegovog metabolita u složenom biološkom uzorku HPLC-DAD-FLD-MS/MS metodom

Turković, Lu

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:087797>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-31**



Repository / Repozitorij:

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



Lu Turković

**Analiza pirfenidona i njegovog metabolita
u složenom biološkom uzorku
HPLC-DAD-FLD-MS/MS metodom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

*Hvala mojoj mentorici, doc. dr. sc. Mirandi Sertić,
na vodstvu, savjetima i izdvojenom vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada,
kao i na zaraznom entuzijazmu prema znanstvenom istraživanju.*

Također hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom cijelog studija.

KRATICE

ACN – acetonitril

DAD – detektor niza dioda (eng. *Diode Array Detector*)

EIC – kromatogram izoliranog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*)

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (eng. *Electrospray Ionization*)

FGF – faktor rasta fibroblasta (eng. *Fibroblast Growth Factor*)

FLD – fluorescencijski detektor (eng. *Fluorescence detector*)

FVC – forsirani vitalni kapacitet

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*)

IPF – idiopatska plućna fibroza

K – karboksipirfenidon

MS – spektrometar masa (eng. *Mass Spectrometer*)

P – pirfenidon

PAR – paracetamol

PDGF – faktor rasta iz trombocita (eng. *Platelet Derived Growth Factor*)

TGF – transformirajući faktor rasta (eng. *Transforming Growth Factor*)

TIC – kromatogram potpune struje iona (eng. *Total Ion Current Chromatogram*)

t_R – vrijeme zadržavanja (eng. *Retention Time*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. IDIOPATSKA PLUĆNA FIBROZA.....	1
1.2. ANTIFIBROTSKI LIJEKOVI: PIRFENIDON I NINTEDANIB	4
1.3. SPREGNUTI SUSTAV HPLC-DAD-FLD-MS	8
1.4. RAZVOJ HPLC METODE.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. KEMIČALIJE	12
3.1.2. RADNI INSTRUMENTI	12
3.1.3. PRIBOR	13
3.1.4. PROGRAMSKI PAKETI	13
3.2. METODE	14
3.2.1. PRIPREMA MOBILNE FAZE.....	14
3.2.2. PRIPREMA OTOPINA STANDARDA.....	14
3.2.3. PRIPREMA ISPITIVANIH UZORAKA.....	14
3.2.4. KROMATOGRAFSKI UVJETI.....	15
3.2.5. UVJETI ZA MASENU SPEKTROMETRIJU	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. OPTIMIZACIJA HPLC METODE	16
4.2. OPTIMIZACIJA DETEKCIJE	20
4.2.1. DETEKTOR DIODNOG NIZA.....	20
4.2.2. FLUORESCENCIJSKI DETEKTOR	21
4.2.3. SPEKTROMETAR MASA.....	22
4.3. IDENTIFIKACIJA ANALITA U BILOŠKOM UZORKU.....	26
4.4. ODABIR UNUTARNJEG STANDARDA	32

4.5. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKIH UVJETA PIRFENIDONA I NJEGOVOG METABOLITA IZ BIOLOŠKOG UZORKA	36
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA.....	41
7. SAŽETAK/SUMMARY	44
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. IDIOPATSKA PLUĆNA FIBROZA

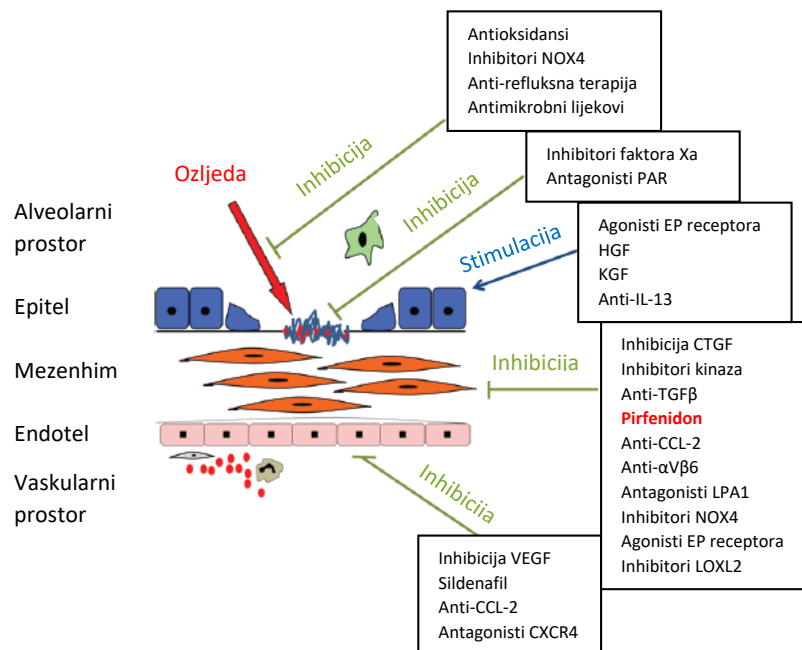
Fibrotske bolesti općenito obuhvaćaju poremećaje u kojima dolazi do formiranja tkiva sličnog ožiljnome na za to neprimjerenim mjestima, poput srca, pluća, jetre i sl. Do sada ih je okarakterizirano više od 60, a odgovorne su za približno 45% smrti u SAD-u. Fibroza pluća može biti uzrokovana autoimunim procesima, gastroezofagealnim refluksom, intoksikacijom azbestom ili teškim metalima, ali kada je uzrok nepoznat, radi se o idiopatskoj plućnoj fibrozi (IPF) (Gan i sur., 2011).

Idiopatska plućna fibroza teška je i fatalna bolest koja pogađa uglavnom mušku populaciju stariju od 60 godina (Margaritopoulos i sur., 2016). Prevalencija u svijetu je 14-42,7 na 100 000, a godišnja incidencija 6,8-16,3 na 100 000, što IPF svrstava u rijetke bolesti, međutim uočen je porast pojavnosti u posljednjih 30 godina (Adamali i Maher, 2012). Glavni simptomi su kratkoća daha i kronični kašalj, a preživljenje nakon dijagnoze u prosjeku je 3 godine (Margaritopoulos i sur., 2016). Među rizične čimbenike kao najvažniji ubrajaju se pušenje, virusne infekcije pluća u prošlosti, izloženost zagađenju i oksidativni stres (Maher i sur., 2007).

Patofiziologija bolesti još nije u potpunosti razjašnjena. Isprva se smatralo kako se radi o kroničnoj upali kao odgovoru na neprekidne mikroozljede alveolarnih plućnih stanica pa su za liječenje korišteni imunosupresivi poput kortikosteroida i azatioprina. No, utvrđeno je da takva terapija ne pokazuje značajne učinke u poboljšanju zdravstvenog stanja pacijenata kao ni u sprječavanju pogoršanja bolesti pa je tvrdnja o isključivo upalnoj podlozi odbačena (Oku i sur., 2008; Maher i sur., 2007).

Danas se IPF u mnogočemu poistovjećuje s karcinomom, budući da je izrazito individualna bolest. Uključuje poremećaje u više signalnih puteva, kada se više ne mogu mobilizirati kompenzatorni mehanizmi pleiotropizma (pojave da jedna molekula iskazuje više različitih učinaka u stanici) i redundancije (postojanje više različitih molekula koje mogu obavljati istu funkciju) kojima bi nezahvaćene molekule mogle nadoknaditi ulogu neke od pogođenih. Nova shvaćanja ukazuju na činjenicu kako je upala tek pomoćni faktor, a ne uzrok ove bolesti, dok se ključnom smatra disfunkcija epitelnog i epitelno-mezenhimalnog odgovora na kroničnu ozljedu, uz istodobnu uključenost drugih sustava poput koagulacijske kaskade, antioksidacijskih puteva, apoptoze, upalnih citokina, angiogeneze i vaskularnog remodeliranja, faktora rasta, surfaktanata te regulatornih faktora matriksa (Maher i sur., 2007).

Utvrđeno je da dolazi do disbalansa profibrotskih (faktor rasta vezivnog tkiva (eng. *Connective Tissue Growth Factor*, CTGF), transformirajući faktor rasta (eng. *Transforming Growth Factor*, TGF), faktor rasta iz trombocita (eng. *Platelet Derived Growth Factor*, PDGF), trombin, faktor Xa) i antifibrotskih agensa (prostaglandin E2, interferon γ) koji pogađa endotel, epitel i fibroblaste (slika 1). Posljedica je pretjerana aktivacija miofibroblasta, koji pristižu u plućno tkivo iz krvotoka kao cirkulirajući fibrociti i procesom epitelno-mezenhimalne tranzicije iz rezidentnih epitelnih stanica. Oni proizvode velike količine izvanstaničnog matriksa čija glavna komponenta je vlaknasti protein kolagen. Istovremeno su inhibirani mehanizmi uklanjanja viška matriksnih proteina pa tkivo biva zahvaćeno ireverzibilnim fibrozacijskim promjenama (Adamali i Maher, 2012; Maher i sur., 2007).



CCL-2 – kemokin ligand 2; CTGF – faktor rasta vezivnog tkiva; EP – prostanoid E; HGF – faktor rasta hepatocita; IL – interleukin; KGF – faktor rasta ketatinocita; LPA – lizofosfatidna kiselina; NOX4 – NADPH oksidaza 4; PAR – receptor aktiviran proteazom; TGF – transformirajući faktor rasta; VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta.

Slika 1. Prikaz poremećaja na više različitih razina uključenih u patogenezu IPF-a i na njih usmjerenih terapijskih opcija koje bi mogle pomoći u liječenju: inhibicijom fibrogeneze, poticanjem antifibrotskih puteva, smanjenjem ozljede alveolarnog epitela (prilagođeno prema Adamali i Maher, 2012)

Značajnu ulogu u patogenezi IPF-a ima i genetska podloga – polimorfizmi određenih gena, primjerice onih povezanih s funkcijom telomeraze, enzima odgovornog za produljenje telomera stanične DNA i time života stanice, kao i somatske mutacije (Margaritopoulos i sur., 2016).

Plućne infekcije virusima koji su sposobni mijenjati genetski materijal domaćina indukcijom somatskih mutacija smatraju se jednim od važnih rizičnih čimbenika za razvoj

bolesti. Također, one mogu dovesti do dodatnog pogoršanja stanja kod postojećeg IPF-a, baš kao i infekcije virusima koji svojom precipitacijom u plućima dovode do ozljede i upale alveolarnih stanica (Adamali i Maher, 2012; Maher i sur., 2007). Među spomenute viruse pripadaju Epstein-Barr, virus hepatitisa C, herpes virusi 7 i 8, citomegalovirus te parvovirus. Liječenje virusne infekcije stoga može dovesti do poboljšanja stanja pacijenata (Adamali i Maher, 2012).

Progresija IPF-a nagla je i nepredvidiva, očituje se u akutnim pogoršanjima plućne funkcije – egzacerbacijama, koja s vremenom dovode do potpunog gubitka sposobnosti izmjene plinova i smrti. Prepoznaju se kao znatno pogoršanje dispneje i snažan pad tlaka kisika u arterijskoj krvi u odsustvu plućne infekcije i uz odgovarajuć radiografski nalaz (Adamali i Maher, 2012; Maher i sur., 2007).

Najčešće komplikacije IPF-a su rekurentne infekcije, plućna hipertenzija, a zabilježena je i povećana incidencija raka pluća (Adamali i Maher, 2012).

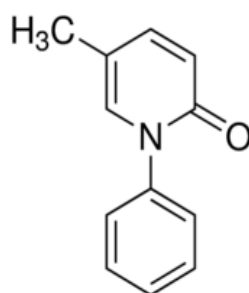
Jedan od često uočavanih komorbiditeta IPF-a je gastroezofagealna refluksna bolest (GERB) (Margaritopoulos i sur., 2016). Utvrđeno je da prisustvo GERB-a može dovesti do pogoršanja IPF-a uslijed nastanka dodatnih ozljeda kroničnom traheobronhijalnom aspiracijom želučanog sadržaja koja pogoduje stvaranju profibrotskog okruženja. Liječenje GERB-a, ukoliko je prisutan, doprinosi stabilizaciji plućne funkcije i duljem preživljavanju (Adamali i Maher, 2012).

Ciljevi u liječenju IPF-a prvenstveno su usporavanje napredovanja, ublažavanje simptoma i pravovremeno prepoznavanje komplikacija. Oštećenja koja nastaju uslijed fibroze imaju ireverzibilne posljedice pa čak ni otklanjanjem ožiljnog tkiva nije moguće povratiti normalnu funkciju organa (Adamali i Maher, 2012; Miric i sur., 2001). Stoga se uspješnim liječenjem smatra ono kojim se uspije postići stabilnost plućne funkcije, odnosno prevencija akutnih egzacerbacija (Adamali i Maher, 2012). Jedina terapijska opcija koja ostvaruje poboljšanje plućne funkcije za sada je još uvijek samo transplantacija pluća (Hernandez i sur., 2018).

U kliničkim su studijama tijekom godina ispitivani različiti lijekovi, od prekursora antioksidansa glutationa N-acetilcisteina, preko protuupalnih lijekova interferona i etanercepta, antikoagulansa varfarina, antagonista endotelinskih receptora bosentana, macitentana i ambrisentana, inhibitora fosfodiesteraze sildenafilila do inhibitora tirozin kinaza imatiniba i nintedaniba te anti-TGF agensa pirfenidona (Margaritopoulos i sur., 2016). Tek su pirfenidon i nintedanib pokazali uočljive kliničke rezultate i doveli do poboljšanja stanja pacijenata.

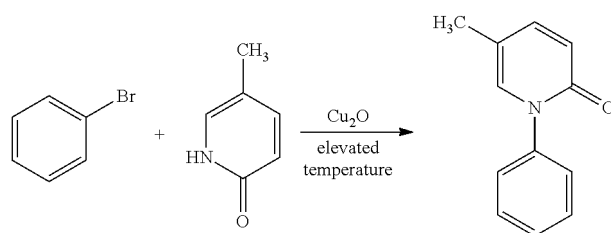
1.2. ANTIFIBROTSKI LIJEKOVI: PIRFENIDON I NINTEDANIB

Pirfenidon (slika 2) prvi je lijek koji je pokazao zadovoljavajuć terapijski učinak u idiopatskoj plućnoj fibrozi, za koju je trenutno registriran kao *orphan drug* (lijek siročče, istraživan za rijetka, životno ugrožavajuća ili kronično onesposobljavajuća stanja) (www.ema.europa.eu). Prvotno je proučavan kao analgetik, antipiretik i protuupalni agens niske toksičnosti (Gadekar, 1976), a njegovo je antifibrotsko djelovanje (sposobnost sprječavanja patološki pretjeranog odlaganja izvanstaničnog matriksa u procesu cijeljenja) otkriveno slučajno (Margolin, 1994).



Slika 2. Strukturna formula pirfenidona

Riječ je o maloj molekuli laktamske strukture (5-metil-1-fenil-2-piridinon), relativne molekulske mase 185.23 g/mol, koja se može dobiti jednostavnom sintezom iz brombenzena i 5-metil-2-piridinona u organskom otapalu uz bakrov (I) oksid kao katalizator pri povišenoj temperaturi (slika 3) (Radhakrishnan, 2013).



Slika 3. Sinteza pirfenidona (prilagođeno prema Radhakrishnan, 2013)

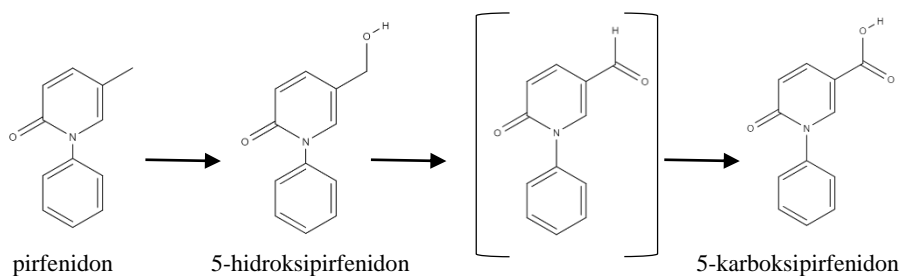
Mehanizam antifibrotskog djelovanja pirfenidona i dalje nije potpuno jasan. Do sad je najviše istraživan njegov inhibicijski utjecaj na TGF- β kao jedan od ključnih citokina u fibrozi, ali smatra se kako učinak postiže modulacijom više različitih signalnih puteva: inhibicijom bazičnog faktora rasta fibroblasta (bFGF), faktora rasta deriviranog iz trombocita (PDGF), faktora nekroze tumora α (TNF- α), faktora deriviranog iz stromalnih stanica 1 α

(SDF-1 α), interleukina 18 (IL-18), a indukcijom interleukina 10 (IL-10) i plućnog interferona γ (IFN- γ). *In vitro* i *in vivo* ispitivanjima utvrđeno je kako smanjuje proliferaciju stanica inhibicijom sinteze DNA te sintezu kolagena smanjenjem ekspresije gena, inhibira prolil hidroksilazu (enzim važan za učvršćavanje i stabilnost strukture kolagena), smanjuje razine intercelularne adhezijske molekule 1 na fibroblastima i sakuplja hidroksilne radikale (Gan i sur., 2011).

Brojnim kliničkim studijama dokazana je njegova djelotvornost (CAPACITY, ASCEND) i sigurnost primjene (RECAP, PASSPORT) za liječenje idiopatske plućne fibroze. Pokazao se boljim od placeba u smanjenju pada forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC, maksimalne količine zraka koju bolesnik može forsirano izdahnuti nakon što je duboko udahnuo) kao markera stupnja progresije bolesti i doveo do produljenja života pacijenata (Cottin i sur., 2018; Costabel i sur., 2017; Margaritopoulos i sur., 2016; King i sur., 2014; Adamali i Maher, 2012; Noble i sur., 2011; www.ema.europa.eu).

Nuspojave koje se javljaju su ovisne o dozi, a najčešće obuhvaćaju probavne tegobe poput gubitka apetita, mučnine i proljeva te dermatološke probleme – osip i fotoosjetljivost (www.ema.europa.eu). U rijetkim slučajevima potrebno je kratkotrajno smanjenje doze ili obustavljanje primjene, ali podnošljivost se općenito popravlja nakon prvih 6 mjeseci terapije (Margaritopoulos i sur., 2016). Također se može uzimati s hranom kako bi se izbjegle gastrointestinalne nuspojave (www.ema.europa.eu) jer hrana odgađa apsorpciju lijeka i smanjuje mu vršnu koncentraciju, uz blagi učinak na smanjenje ukupne bioraspoloživosti (Rubino i sur., 2009).

Nakon oralne primjene pirfenidona natašte, vršna koncentracija u plazmi se postiže za 0,6 h, a cjelokupna doza eliminira unutar 12 h, pretežno urinom (> 80%) (Wen i sur., 2014). Metabolizam se odvija vrlo brzo nakon apsorpcije, uglavnom oksidacijom preko CYP1A2, ali i drugih CYP enzima (Schaefer i sur., 2011), do 5-hidroksipirfenidona i zatim 5-karboksipirfenidona (slika 4). U pokusima na životinjama utvrđene su visoke koncentracije 5-karboksipirfenidona u tkivima (Togami i sur., 2015) te je dokazana njegova biološka aktivnost u smanjenju razina hidroksiprolina induciranih TGF- β 1, što upućuje na sinergizam pirfenidona i njegovih metabolita u cjelokupnom antifibrotskom učinku (Togami i sur., 2013).



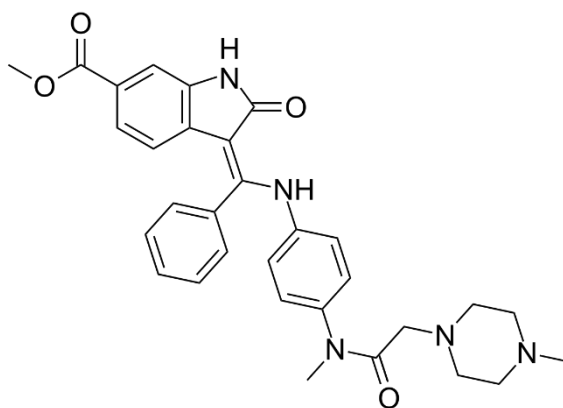
Slika 4. Metabolizam pirfenidona i njegovi glavni metaboliti (prilagođeno prema Togami i sur., 2015)

U novije se vrijeme razmatra mogućnost inhalacijske primjene kojom bi se lijek dostavio izravno na mjesto djelovanja pa bi se mogle koristiti niže doze uz manje sistemskih nuspojava, budući da je peroralna distribucija pirfenidona u pluća razmjerno mala. Do sada je ovaj oblik primjene uspješno testiran na životinjskom modelu (Togami i sur., 2015; Rasooli i sur., 2018). Osim toga, zbog velike sličnosti IPF-a s karcinomom, sve se veća pažnja posvećuje istraživanju kombinacija sinergističkih lijekova (Margaritopoulos i sur., 2016) poput pirfenidona i rapamicina (Molina-Molina i sur., 2018), ili pirfenidona i spironolaktone (Miric i sur., 2001), kojima bi se postigla bolja kontrola napredovanja te olakšanje simptoma ove teške bolesti.

Kontraindikacije za primjenu pirfenidona su ozbiljni jetreni i bubrežni problemi, budući da može dovesti do povećanja razine jetrenih enzima i da se većina doze eliminira preko bubrega. Zabranjena je kombinacija s antidepresivom fluvoksaminom zbog njegovog jakog inhibitornog učinka na CYP enzime, među kojima je i CYP1A2, uslijed čega dolazi do četverostrukog povećanja izloženosti pirfenidonu (www.ema.europa.eu).

Osim u plućnom, pokazalo se kako pirfenidon zaustavlja fibrozu i u bubrežnom, jetrenom i srčanom tkivu pa se i dalje istražuje zbog mogućnosti proširenja indikacije na terapiju fibrotskih bolesti koje ih zahvaćaju (Schaefer i sur., 2011). Također je potencijalna njegova primjena u progresivnoj multiploj sklerozi (Walker i Margolin, 2001), dijabetičkoj retinopatiji (Sun i sur., 2011), zatajenju srca (Yamagami i sur., 2015), benignoj hipertrofiji prostate, cirozi jetre, sklerodermi, Alzheimerovoj bolesti i dr. (Margolin, 1994).

Nintedanib (slika 5) je drugi trenutno registrirani lijek za IPF. Djeluje kao inhibitor receptorskih tirozin kinaza – receptora za faktor rasta fibroblasta (eng. *Fibroblast Growth Factor Receptor*, FGF-R), faktor rasta iz trombocita (eng. *Platelet Derived Growth Factor Receptor*, PDGF-R) i vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*, VEGF-R), tako što se natječe za vezno mjesto molekule adenozin trifosfata (ATP) i time onemogućava aktivaciju receptora nakon vezanja odgovarajućeg citokina. *In vitro* studije su pokazale kako interferira s proliferacijom, migracijom i diferencijacijom fibroblasta te sekrecijom izvanstaničnog matriksa. Zbog svog djelovanja na FGF-R i VEGF-R našao je primjenu i kao citostatik za karcinom ne-malih stanica pluća, kolorektalni karcinom i karcinom jajnika, dok se za antifibrotski učinak ključnom, ali ne i dovoljnom, smatra inhibicija PDGF-R.



Slika 5. Strukturna formula nintedaniba

PDGF u plućima stvaraju alveolarni makrofagi i epitelne stanice, a djeluje kao potentan mitogen za fibroblaste. FGF proizvode alveolarni makrofagi, fibroblasti, glatke mišićne stanice i alveolarne epitelne stanice. Kao i PDGF, FGF produljuje preživljavanje i aktivnost fibroblasta. VEGF ima kontroverzne učinke u plućnoj fibrozi – u samim je fibroznim žarištima njegova koncentracija snižena, dok je u okolnim krvnim žilama povećana. Davanje VEGF-a štakorima dovodi do pogoršanja fibroze, no njegovom se inhibicijom suzbijaju i njegovi pozitivni, vazoprotektivni učinci u plućima koji su posebice važni kod plućne hipertenzije, čestog komorbiditeta IPF-a. Iz tog razloga još nije u potpunosti jasno pridonosi li inhibicija angiogeneze antifibrotskom učinku (Wollin i sur., 2015).

1.3. SPREGNUTI SUSTAV HPLC-DAD-FLD-MS

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) tehnika je koja omogućuje razdvajanje molekula analita na temelju njihovih različitih karakteristika poput lipofilnosti/hidrofilnosti, naboja, veličine čestica ili optičkih svojstava, prolaskom kroz kolonu definiranog sastava nošenih tekućom mobilnom fazom pod visokim tlakom. Mehanizmi odjeljivanja ovise o vrsti interakcije analita s određenom stacionarnom fazom, a najčešći su razdioba, adsorpcija, ionska izmjena, raspodjela prema veličini čestica i stereokemijske interakcije. Uređaj se sastoji od spremnika za mobilne faze, sustava za obradu otapala, crpke pod visokim tlakom, sustava za unošenje uzorka, kolone i detektora (Nigović, 2014d).

HPLC se može spregnuti s različitim detektorima koji omogućuju identifikaciju i kvantifikaciju analita ukoncentriranih u kromatografskim pikovima, poput detektora diodnog niza (eng. *Diode Array Detector*, DAD), fluorescencijskog detektora (eng. *Fluorescence detector*, FLD) i spektrometra masa (eng. *Mass Spectrometer*, MS).

Najčešće korišten tip detektora je DAD, koji mjeri količinu apsorbirane svjetlosti u ultraljubičastom i vidljivom spektru (190-800 nm). Kako bi molekula bila vidljiva ovim detektorom, mora imati kromofor, odnosno nezasićenu organsku funkcionalnu skupinu. Ovisno o drugim skupinama vezanima za kromofor, svaka molekula ima svoj UV-Vis spektar, pokazuje maksimum apsorpcije na određenoj valnoj duljini. Brojne su molekule koje se mogu detektirati na ovaj način, što tehniku čini široko primjenjivom, ali ne i naročito selektivnom (Nigović, 2014e).

Jedan od najosjetljivijih i najselektivnijih detektora, fluorescencijski detektor, osjetljiviji je od DAD 10-1000 puta. Molekule analita se pobuđuju svjetlošću određene valne duljine, a mjeri se intenzitet emisije svjetlosti na 50-150 nm većoj valnoj duljini, budući da se molekula u temeljno stanje vraća tek nakon gubitka dijela energije na translacijsko i rotacijsko gibanje. Analiti pogodni za ovu vrstu detekcije imaju rigidne strukture s visoko konjugiranim dvostrukim vezama, što smanjuje vjerojatnost vibracijske relaksacije. Potrebno je poznavati optimalnu valnu duljinu ekscitacije analita – odgovara maksimumu apsorpcije na njegovom apsorpcijskom UV-Vis spektru. Detektor sadrži dva monokromatora – za odabir valne duljine pobude i valne duljine na kojoj promatramo emisiju zračenja (Nigović, 2014a).

Maseni spektrometar je također znatno osjetljiviji od DAD. Ionizira molekule analita u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska u visoki vakuum pri čemu dolazi do njihove fragmentacije, a nastali fragmenti se razdvajaju u električnom polju prema omjeru mase i naboja. Budući da stvara fragmente specifičnih masa, MS detekcija daje uvid u strukturu molekule. Maseni spektrometar također omogućuje snimanje MS^n spektara ako se uključi više analizatora međusobno povezanih kolizijskim ćelijama. U kolizijskoj ćeliji dolazi do dodatne fragmentacije samo odabranog iona pa se nastali fragmenti razdvajaju u sljedećem analizatoru i detektiraju (Nigović, 2014c).

Jedan od najčešće korištenih načina ionizacije u LC-MS sustavima je ionizacija elektroraspršenjem (eng. *Electrospray Ionization*, ESI). Temelji se na stvaranju pozitivno (kod ESI^+ načina) ili negativno (kod ESI^- načina) nabijenih iona analita uslijed isparavanja mobilne faze i formiranja nabijenih kapljica u struji dušika na vrhu kapilare pod naponom. Uslijed povećanja Coulombovih sila odbijanja među istovjetno nabijenim česticama dolazi do pucanja kapljica i raspršenja nastalih iona koji ulaze u analizator, bivaju razdvojeni na temelju omjera mase i naboja te detektirani. Ioni koji na taj način nastaju su najčešće protonirani ili deprotonirani pseudomolekulski ioni, a u ESI^+ načinu ionizacije često dolazi i do stvaranja metalnih adukata. Mehanizam ionizacije još nije u potpunosti razjašnjen, ali općenito vrijedi pravilo da se pozitivnim načinom ionizacije analiziraju bazični analiti, a negativnim kiseli. Uz pseudomolekulske ione, u spektru su prisutni i fragmenti nastali cijepanjem, na temelju kojih je moguće donositi zaključke o kemijskoj strukturi analita (Banerjee i Mazumdar, 2012).

1.4. RAZVOJ HPLC METODE

Promjenom različitih parametara metode može se utjecati na ponašanje analita u kromatografskoj koloni i time poboljšati međusobno odjeljivanje pikova čime se postiže veća selektivnost detekcije.

Stacionarnu fazu unutar kolone čine zrna punila veličine čestica između 3 i 10 μm građena od umreženog silikagela. Smanjenjem veličine čestica povećava se djelotvornost kolone, ali pritom raste tlačno opterećenje sustava, dok povećanjem dolazi do širenja pikova i smanjenja djelotvornosti kolone. Silikagel kao punilo može biti korišten u svom izvornom, polarnom obliku (normalno-fazna kromatografija) ili dodatno modificiran slabije polarnim, nepolarnim (obrnuto-fazna kromatografija) ili kiralnim skupinama (kiralna kromatografija). Pored veličine i kemijskih svojstava važan je i izgled čestica stacionarne faze, budući da njihov nepravilan oblik dovodi do otpora prijenosu mase analita i time širenja pikova.

Važnu ulogu imaju i parametri kolone, njena temperatura i duljina. Povećanjem temperature povećava se brzina analize uz istovremeno povećanje djelotvornosti kolone (suženje pikova) zbog smanjenja utjecaja prijenosa mase između mobilne i stacionarne faze. Pritom je potrebno voditi računa o termostabilnosti analita kako ne bi došlo do njihove razgradnje. Povećanjem duljine kolone povećava se djelotvornost, ali produljuje trajanje analize i potrošnja mobilne faze.

Mobilna faza nudi veću slobodu za finu modifikaciju budući da se regulacijom njene polarosti bitno utječe na zadržavanje analita. U najčešće korištenoj, obrnuto-faznoj kromatografiji, gdje se koristi kombinacija nepolarne stacionarne i polarne mobilne faze, dodatak nepolarnijeg otapala smanjit će vrijeme zadržavanja nepolarnih analita i produžiti polarnih. Dodatak polarnijeg otapala će pak produžiti vrijeme zadržavanja nepolarnih analita, dok će polarnih skratiti. Može se koristiti izokratna elucija mobilnom fazom konstantnog sastava, ili gradijentno ispiranje pri kojem sastav mobilne faze varira kroz vrijeme.

Osim sastava mobilne faze, važan je i njen pH – ionizacijom analita mijenja se njegova polarnost i ponašanje u koloni, te brzina protoka – pri većim brzinama protoka brža je analiza i zbog smanjenja utjecaja difuzije analita u koloni uži su pikovi. No, prevelikim povećanjem brzine protoka počinju prevladavati učinci otpora prijenosu mase između mobilne i stacionarne faze (utjecaj oblika i veličine čestica stacionarne faze) na ponašanje analita, zbog čega se pikovi proširuju (Nigović 2014 b, d).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pirfenidon je novi lijek registriran za idiopatsku plućnu fibrozu koji se zbog svojih povoljnih učinaka istražuje i za liječenje fibrotskih bolesti ostalih organa. Nakon apsorpcije podliježe brzom metabolizmu do aktivnog metabolita 5-karboksipirfenidona. U novije je vrijeme prepoznata potreba za njihovom istodobnom analizom kod praćenja farmakokinetičkih parametara poput tkivne raspodjele lijeka te prilagođavanja doze radi osiguranja učinkovitosti liječenja i smanjenja toksičnih učinaka.

Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati uvjete za ekstrakciju, separaciju i detekciju pirfenidona i njegovog metabolita unutar biološkog matriksa srčanog tkiva štakora primjenom tehnike tekućinske kromatografije spregnute s detektorom niza dioda, fluorescencijskim detektorom i masenim spektrometrom.

Bilo je potrebno postići zadovoljavajuću ekstrakciju obaju analita iz kompleksnog uzorka uz što bolje otklanjanje mogućih interferencija matriksa. Nadalje, radi postizanja separacije analita na kromatografskoj koloni uz prihvatljivu selektivnost i razlučivanje, valjalo je odabrati povoljan sastav mobilne i stacionarne faze, kao i brzinu protoka i temperaturu kolone. Naposljetku, bilo je nužno osigurati uvjete za selektivnu i osjetljivu detekciju analita u složenom biološkom uzorku u svrhu njihove identifikacije i stvaranja temelja za daljnje kvantitativno određivanje.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KEMIKALIJE

Amonijev formijat – Fluka (SAD)

Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju – Lach-Ner (Češka)

Metanol – J. T. Baker (SAD)

Mravlja kiselina – Kemika (Hrvatska)

Standard benzokain – Kemika (Hrvatska)

Standard karboksipirfenidon – Toronto Research Chemicals (Kanada)

Standard N,N-dimetilaminobenzaldehid – Lach-Ner (Češka)

Standard paracetamol – Merck (Njemačka)

Standard pirfenidon – Toronto Research Chemicals (Kanada)

Standard kodein – Lach-Ner (Češka)

Standard kofein – Kemika (Hrvatska)

3.1.2. RADNI INSTRUMENTI

Analitička vaga AG245 – Mettler Toledo (Švicarska)

Centrifuga – Eppendorf Centrifuge 5415D (SAD)

Nanofuge Hofer Scientific Instruments San Francisco (SAD)

IKA mini G (Njemačka)

Generator dušika NM30LA – Peak Scientific (UK)

Helij – Messer (Austrija)

HPLC – Agilent 1100 Series (Njemačka)

MS – Agilent Technologies LC/MSD Trap VL (Njemačka)

Sustav za pročišćavanje vode Waterpro – Labonco (SAD)

Ultrazvučna kupelj – Elma xtra TT Elmasonic (Njemačka)

Uparivač – Savant SC210A SpeedVac Concentrator (SAD)

Vorteks – IKA mini G (Njemačka)

LLG UniTEXER1 (Njemačka)

3.1.3. PRIBOR

Kromatografska kolona Symmetry C18 dimenzija 4,6 × 150 mm, veličine čestica 3,5 μm
– Waters (SAD)

Mikropipete – Rainin pipet lite (Švicarska)

Plastične epruvete Eppendorf – LLG Labware (Njemačka)

Bočice za uzorkovanje – Agilent Technologies (Njemačka)

3.1.4. PROGRAMSKI PAKETI

ChemStation for LC 3D – Agilent Technologies (Njemačka)

LC/MSD Trap Software 5.2 – Agilent Technologies (Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. PRIPREMA MOBILNE FAZE

Mobilna faza A pripremljena je kao 0,1%-tna otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (ACN), a mobilna faza B kao 0,1%-tna otopina mravlje kiseline u vodi pročišćenoj WaterPro sustavom. Umjesto 0,1%-tne vodene otopine mravlje kiseline, kao mobilna faza B isprobana je i 0,1%-tna otopina mravlje kiseline u 10 mM amonijevom formijatu.

3.2.2. PRIPREMA OTOPINA STANDARDA

Korištena je otopina standarda pirfenidona i karboksipirfenidona u smjesi acetonitrila i vode (50:50, V/V). Koncentracija pirfenidona u standardnoj otopini bila je 1 mg/mL, a karboksipirfenidona 0,5 mg/mL. Unutarnji standardi (benzokain, fenazon, N,N-dimetilaminobenzaldehid, kodein, kofein i paracetamol) pripremljeni su otapanjem u smjesi acetonitrila i vode (50:50, V/V) u koncentraciji 1 mg/mL.

3.2.3. PRIPREMA ISPITIVANIH UZORAKA

Kao uzorci su poslužili desni ventrikli tri netretirana štakora i tri štakora tretirana pirfenidonom, pulverizirani u tarioniku i čuvani pri temperaturi -70 °C.

Za preliminarnu identifikaciju analita u složenom biološkom uzorku i optimizaciju HPLC metode, upotrjebljavani su uzorci štakora tretiranih pirfenidonom kao i uzorci štakora netretiranih pirfenidonom (negativni kontrolni uzorci), pripremljeni na jednak način. Odvaga od 10 mg ekstrahirana je s 200 µL smjese acetonitrila i vode 50:50 (V/V) uz vorteks 5 min. Uzorci su zatim ostavljeni stajati na sobnoj temperaturi 30 min, nakon čega su centrifugirani 5 min na 11 000 rpm. Supernatanti su uzeti u analizu.

Tijekom optimizacije ekstrakcije kao otapala korišteni su acetonitril, metanol te smjesa acetonitrila i vode 50:50 (V/V). Odvage od 10 mg uzoraka tretiranih štakora suspendirane su u 1 mL odgovarajućeg otapala, vorteksirane 5 min i ostavljene stajati na sobnoj temperaturi 30 min. Zatim su centrifugirane 5 min na 11 000 rpm, a supernatanti su upareni do suha. Suhi su ostaci nakon uparavanja otopljeni u 100 µL smjese acetonitrila i vode 50:50 (V/V) i centrifugirani 6 min na 6 000 rpm.

Za provjeru uspješnosti ekstrakcije, talog zaostao nakon prvog centrifugiranja uzoraka ponovno je ekstrahiran s 200 μ L vode uz primjenu vorteksa 5 min i ultrazvučne kupelji 10 min te centrifugiran 6 min na 6 000 rpm.

3.2.4. KROMATOGRAFSKI UVJETI

Korištena je Symmetry (Waters) C18 kolona dimenzija 4,6 \times 150 mm, veličine čestica stacionarne faze 3,5 μ m. Temperatura kolone podešena je na 28 °C. Elucija je provedena mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, vode i mravlje kiseline odnosno acetonitrila, 10 mM amonijevog formijata i mravlje kiseline. Isprobana je izokratna elucija uz sastav mobilne faze ACN:H₂O = 40:60, 45:55, 50:50 (V/V), ACN:HCOO-NH₄⁺ = 40:60 (V/V) te gradijentno ispiranje variranjem omjera ACN:H₂O. Ispitane su brzine protoka mobilne faze 0,4 i 0,5 mL/min. Pri brzini protoka 0,5 mL/min korišten je split mobilne faze u omjeru 1:3 pri ulasku u MS detektor, dok je pri brzini od 0,4 mL/min cjelokupni protok mobilne faze prenesen na maseni spektrometar.

3.2.5. UVJETI ZA MASENU SPEKTROMETRIJU

Korišten je maseni spektrometar Agilent 6300 Series Ion Trap uz pozitivni način elektrosprej ionizacije. Temperatura izvora ionizacije iznosila je 325 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za sušenje i raspršivanje mobilne faze te plin nosač korišten je dušik pri protoku od 6 L/min i tlaku 10 psi. Kao plin za fragmentaciju korišten je helij, održavajući energiju kolizije na 27%. Snimane su mase iona u rasponu m/z 100-300 uz broj sakupljenih iona 30 000 u 200 ms.

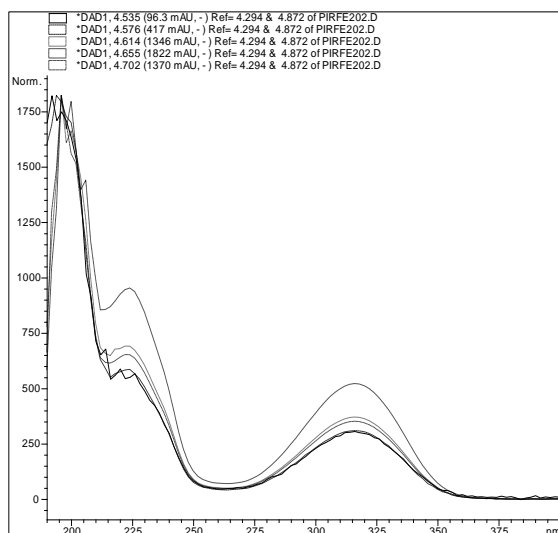
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPTIMIZACIJA HPLC METODE

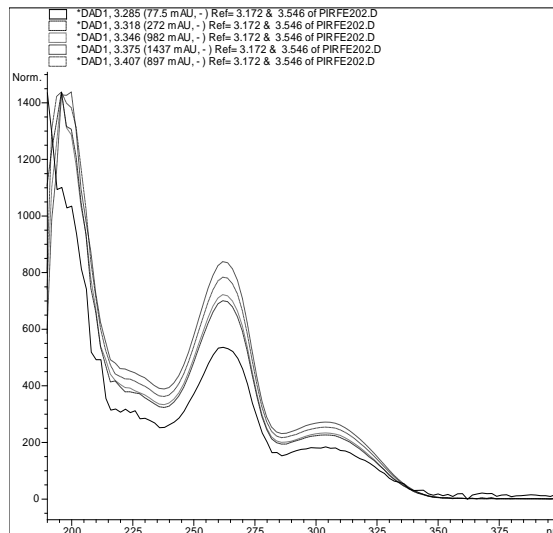
Prije pristupanja analizi samog biološkog uzorka, potrebno je optimizirati uvjete HPLC metode. Cilj je postići zadovoljavajuće razdvajanje analita uz relativno kratko vrijeme trajanja analize te ispitati dostupne mogućnosti detekcije kako bi se osigurala potrebna selektivnost i osjetljivost. To se provodi injektiranjem smjese standarda analita uz različite parametre sastava i brzine protoka mobilne faze. Može se mijenjati i kromatografska kolona (duljina, sastav, polarnost, veličina čestica stacionarne faze), no u ovom slučaju se prvotno odabrana, obrnuto-fazna C18 Symmetry (Waters) dimenzija $4,6 \times 150$ mm i veličine čestica $3,5 \mu\text{m}$ pokazala prihvatljivom, budući da je osigurala zadovoljavajuću simetriju i razlučivanje pikova.

Variranje sastava mobilne faze pruža znatno više mogućnosti za finu optimizaciju elucije pa je tijekom preliminarne analize otopine standarda analita isprobano nekoliko kombinacija otapala.

Detekcija analita u ranim fazama istraživanja izvršena je pomoću detektora diodnog niza. Pirfenidon i 5-karboksipirfenidon imaju znatno drugačije UV-Vis spektre što ih čini pogodnima za ovaj način detekcije (slike 6 i 7).



Slika 6. UV-Vis spektar pirfenidona



Slika 7. UV-Vis spektar 5-karboksipirfenidona

Tijekom optimizacije analitičke metode mijenjani su različiti kromatografski uvjeti. Variran je sastav mobilne faze pri jednakoj brzini protoka (0,4 mL/min) – korištena je izokratna elucija smjesom acetonitrila, vode i mravlje kiseline u različitim volumnim omjerima, kao i smjesom acetonitrila, 10 mM amonijevog formijata i mravlje kiseline. Također je iskušano gradijentno ispiranje smjesom acetonitrila, vode i mravlje kiseline, opisano u tablici 1. Odnosi vremena zadržavanja analita (t_R) i sastava mobilne faze prikazani su u tablici 2.

Tablica 1. Sastav mobilne faze kod gradijentne elucije:

Vrijeme (min)	udio mobilne faze A* (%)	udio mobilne faze B** (%)
0 – 5	50	50
6 – 10	90	10
11 – 15	50	50

*0,1%-tna otopina HCOOH u ACN

**0,1%-tna otopina HCOOH u vodi

Udio nepolarnijeg otapala, acetonitrila, povećan je nakon očekivanog vremena elucije 5-karboksipirfenidona ne bi li se ubrzalo ispiranje pirfenidona, no nije došlo do bitnijih promjena u njegovu vremenu zadržavanja.

Tablica 2. Ovisnost vremena zadržavanja 5-karboksipirfenidona (K) i pirfenidona (P) o sastavu mobilne faze:

Sastav mobilne faze (V/V/V)	t_R (K) (min)	t_R (P) (min)
ACN:H ₂ O:HCOOH = 40:60:0,1%	4,9	7,5
ACN:H ₂ O:HCOOH = 45:55:0,1%	4,5	6,6
ACN:H ₂ O:HCOOH = 50:50:0,1%	4,3	5,9
ACN:10 mM HCOO ⁻ NH ₄ ⁺ :HCOOH = 60:40:0,1%	4,3	6,0
Gradijentna elucija sa smjesom ACN:H ₂ O:HCOOH	4,4	6,0

Povećanjem udjela polarnijeg otapala znatno se produžuje zadržavanje nepolarnog pirfenidona, dok se zadržavanje relativno polarnijeg 5-karboksipirfenidona produžuje u manjoj mjeri. Gradijentnim ispiranjem nije postignuta značajna promjena u vremenu zadržavanja analita. Budući da je i pri manjem udjelu vode u mobilnoj fazi razdvajanje pikova potpuno, odabrana je izokratna elucija uz sastav mobilne faze ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1% (V/V/V), pri kojoj je i vrijeme analize najkraće.

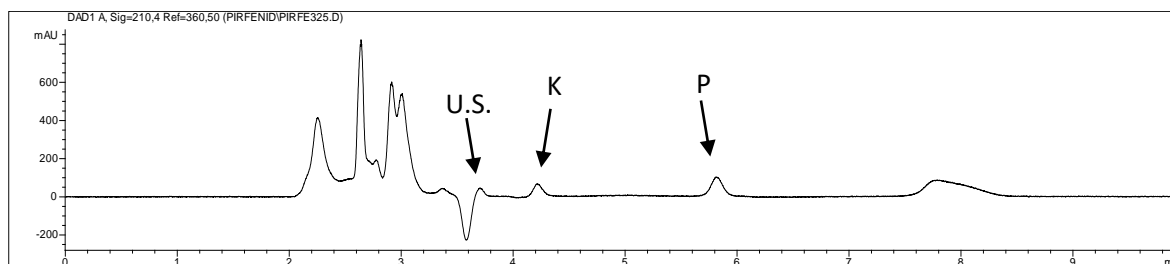
Povećanjem brzine protoka mobilne faze povećava se brzina elucije analita i time skraćuje vrijeme trajanja analize. Također se kompenzira utjecaj brzine difuzije molekula u mobilnoj fazi pa se povećava razlučivanje pikova. Tablica 3 prikazuje odnose vremena zadržavanja analita i brzine protoka mobilne faze pri jednakom sastavu (ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1%, V/V/V).

Tablica 3. Ovisnost vremena zadržavanja 5-karboksipirfenidona i pirfenidona o brzini protoka pri istom sastavu mobilne faze (ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1%, V/V/V):

Brzina protoka (mL/min)	t _R 5-karboksipirfenidona (min)	t _R pirfenidona (min)
0,4	4,3	5,9
0,5	3,3	4,6

Pri većoj brzini protoka mobilne faze također je osigurano učinkovito razdvajanje pikova analita, uz kraće trajanje analize. Međutim, uz brzine protoka veće od 0,4 mL/min ne može se cjelokupna mobilna faza prenijeti na maseni detektor, već se dio mora odbaciti. Time se gubi na osjetljivosti detekcije, koja je od velike važnosti u analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim uzorcima, stoga je odabrana brzina protoka 0,4 mL/min.

Nakon utvrđivanja uvjeta pri kojima dolazi do potpunog razdvajanja pikova standarda bilo je potrebno dobiti uvid u moguće interferencije pikova iz matriksa biološkog uzorka, radi čega je pri odabranim uvjetima – sastavu mobilne faze ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1% (V/V/V) i brzini protoka 0,4 mL/min, kromatografiran uzorak netretiranog štakora uz dodatak otopine standarda (pozitivni kontrolni uzorak; slika 8).



Slika 8. DAD kromatogram negativnog kontrolnog uzorka obogaćenog standardima: paracetamol (unutarnji standard, U.S., 10 µg/mL), 5-karboksipirfenidon (K, 5 µg/mL), pirfenidon (P, 10 µg/mL), sastav mobilne faze ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1% (V/V/V), brzina protoka 0,4 mL/min, valna duljina detekcije 210 nm

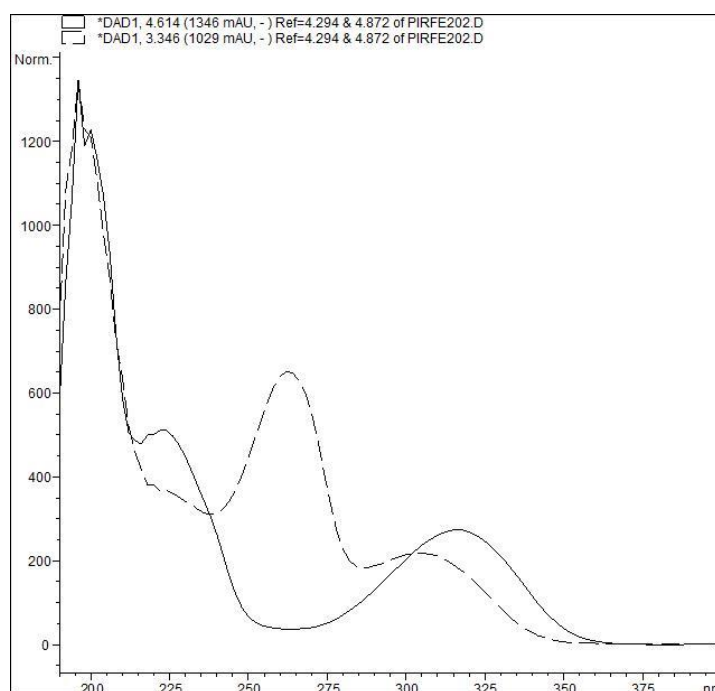
Brzina protoka i sastav mobilne faze pokazali su se prihvatljivima za analizu biološkog uzorka jer ne dolazi do koelucije analita s matriksom, koja bi se mogla javiti pri većim brzinama protoka time narušivši selektivnost DAD detekcije.

S mobilnom fazom sastava ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1% (V/V/V) i brzine protoka 0,4 mL/min postignuto je vrijeme zadržavanja pirfenidona 5,9 min, a 5-karboksipirfenidona 4,3 min te je prijeđeno na slijedeću fazu ispitivanja – optimizaciju uvjeta detekcije.

4.2. OPTIMIZACIJA DETEKCIJE

4.2.1. DETEKTOR DIODNOG NIZA

Proučeni su UV-Vis spektri analita kako bi se odredile najpovoljnije valne duljine za njihovu detekciju u složenom biološkom uzorku (slika 9). Budući da su spektri pirfenidona i 5-karboksipirfenidona značajno različiti, moguće ih je identificirati na kromatogramu dobivenom pomoću detektora diodnog niza.

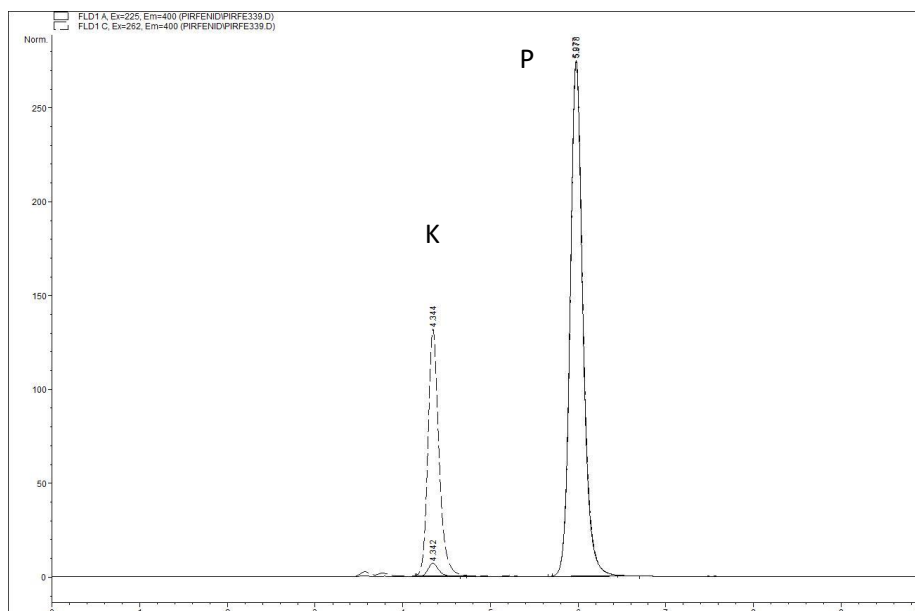


Slika 9. Usporedba UV-Vis spektara pirfenidona (puna crta) i 5-karboksipirfenidona (iscrtkano)

Moguće valne duljine za simultanu detekciju i kvantifikaciju oba analita su 210, 240 i 300 nm, budući da tamo oba pokazuju jednaku apsorbanciju, dok je za detekciju pojedinačnih analita uputno odabrati valne duljine na kojima najjače apsorbiraju, stoga su korisne valne duljine detekcije za 5-karboksipirfenidon 262 nm, a za pirfenidon 225 i 315 nm.

4.2.2. FLUORESCENCIJSKI DETEKTOR

U ranijim istraživanjima utvrđeno je kako pirfenidon i 5-karboksipirfenidon pokazuju prirodnu fluorescenciju, što ih čini podobnima za detekciju fluorescencijskim detektorom. Odabrane su valne duljine ekscitacije koje odgovaraju njihovim apsorpcijskim maksimumima na UV-Vis spektrima – 225 nm za pirfenidon i 262 nm za 5-karboksipirfenidon, dok je emisija praćena na 400 nm (slika 10). Za implementaciju ove vrste detekcije potrebni su daljnji koraci optimizacije uz odabir prikladnog unutarnjeg standarda, budući da paracetamol nije pogodan za ovaj način detekcije. Također je potrebno odabrati optimalnu valnu duljinu praćenja emisije, s obzirom na to da se ona može nalaziti u rasponu od 50 do 150 nm iznad valne duljine pobude.

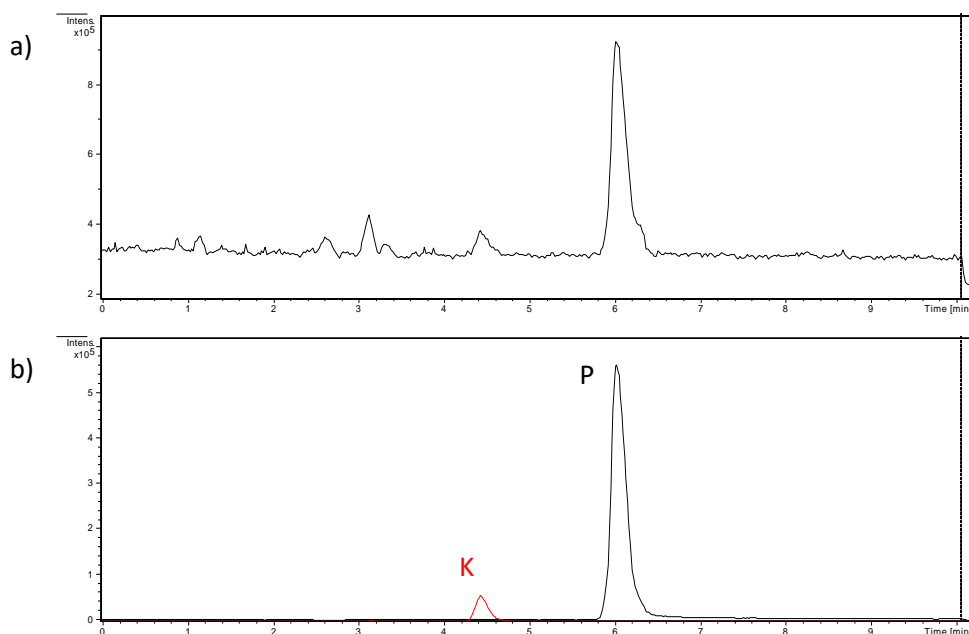


Slika 10. Kromatogram otopine standarda paracetamola (50 µg/mL, nije vidljiv primjenom fluorescencijskog detektora), 5-karboksipirfenidona (K, 10 µg/mL) i pirfenidona (P, 10 µg/mL); sastav mobilne faze ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1% (V/V/V), brzina protoka 0,4 mL/min uz FLD detekciju – valne duljine ekscitacije 225 (puna crta) i 262 nm (iscrtkano), a emisije 400 nm

4.2.3. SPEKTROMETAR MASA

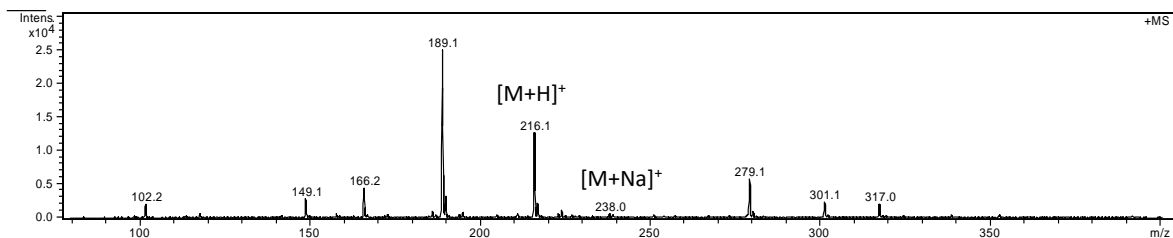
Za nedvojbenu potvrdu identiteta analita korišten je maseni detektor, koji je znatno osjetljiviji i selektivniji od DAD.

Isproban je pozitivni i negativni način ionizacije elektroraspršenjem (ESI^+ i ESI^-). Pozitivna elektrosprej ionizacija uključuje stvaranje pozitivno nabijenih, protoniranih pseudomolekulskih iona analita ili njihovih metalnih adukata. Protonirani molekularni ioni pirfenidona imaju omjer m/z jednak 186, a 5-karboksipirfenidona 216. Na slikama 11 a) i b) prikazani su ESI^+ MS kromatogrami otopine standarda – kromatogram potpune struje iona (eng. *Total Ion Current Chromatogram, TIC*) i izoliranih iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram, EIC*).

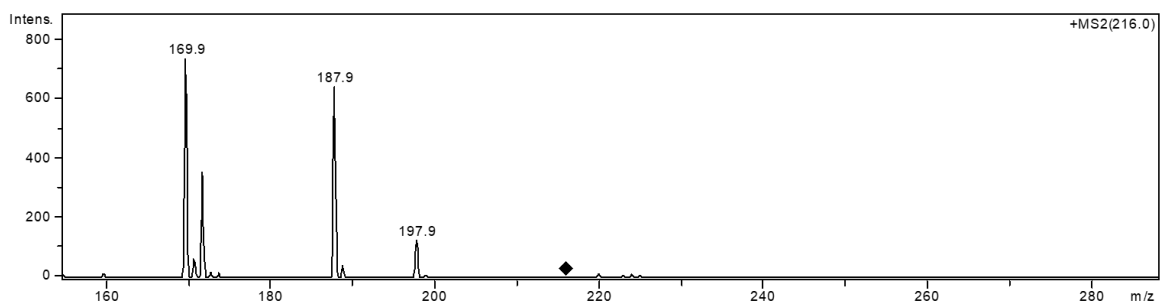


Slika 11 a) ESI^+ MS kromatogram potpune struje iona otopine standarda pirfenidona ($1 \mu\text{g/mL}$) i 5-karboksipirfenidona ($0,5 \mu\text{g/mL}$) pri sastavu mobilne faze $\text{ACN:H}_2\text{O:HCOOH} = 50:50:0,1\%$ (V/V/V) i protoku $0,4 \text{ mL/min}$;
b) ESI^+ MS kromatogram izoliranih iona m/z 186 (P, crno) i m/z 216 (K, crveno)

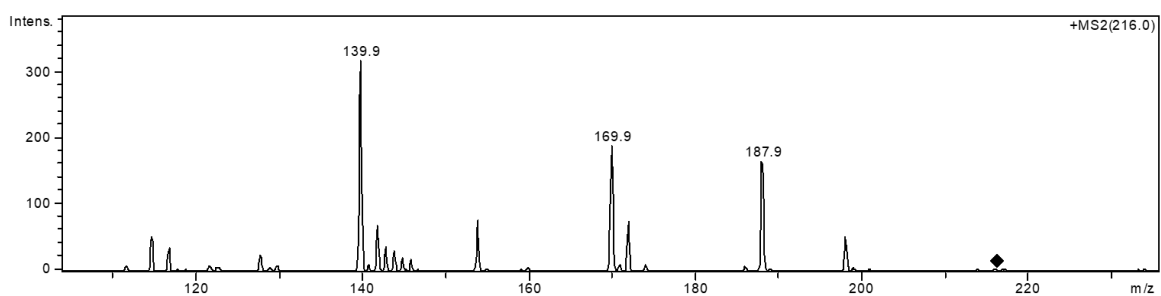
MS spektar u piknu 5-karboksipirfenidona prikazan je na slici 12. Vidljiv je njegov pseudomolekulski ion m/z 216 te adukt s natrijem m/z 238. Na MS^2 spektrima dobivenima fragmentacijom pika protoniranog molekularnog iona (slike 13 i 14) ističu se pikovi m/z 197,9 (gubitak kisika), 187,9 (gubitak karbonila), 169,9 (gubitak karboksilne skupine), 139,9 (gubitak fenila). Slika 15 prikazuje predloženu shemu fragmentacije.



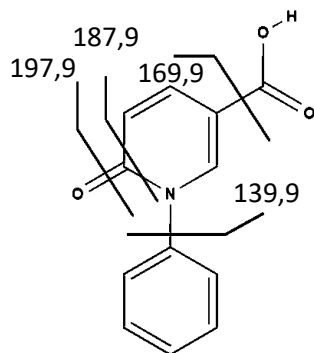
Slika 12. ESI⁺ MS spektar u pik 4,3 min – pik 5-karboksipirfenidona. Vidljiv je pseudomolekulski ion [M+H]⁺ m/z 216 te adukt s natrijem [M+Na]⁺ m/z 238.



Slika 13. ESI⁺ MS² spektar pseudomolekulskog iona m/z 216, raspon snimanih m/z 150-290

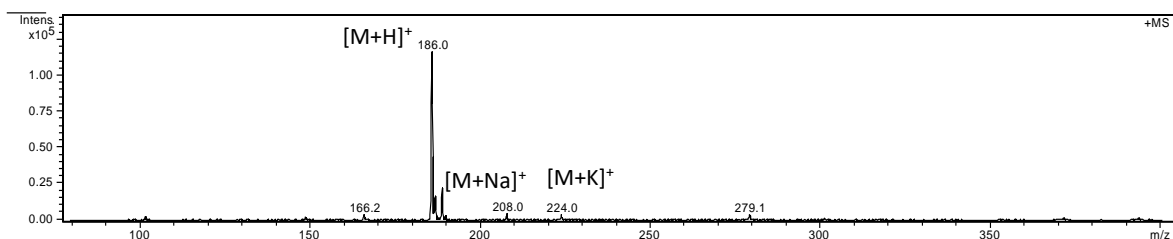


Slika 14. ESI⁺ MS² spektar pseudomolekulskog iona m/z 216, raspon snimanih m/z 100-240

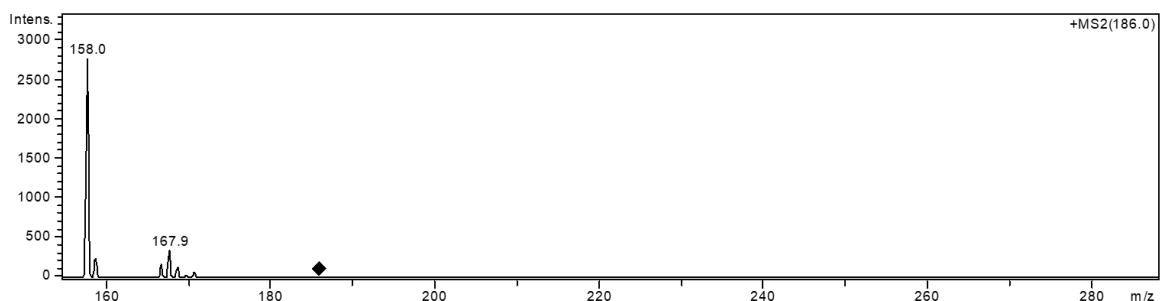


Slika 15. Predložena shema fragmentacije 5-karboksipirfenidona

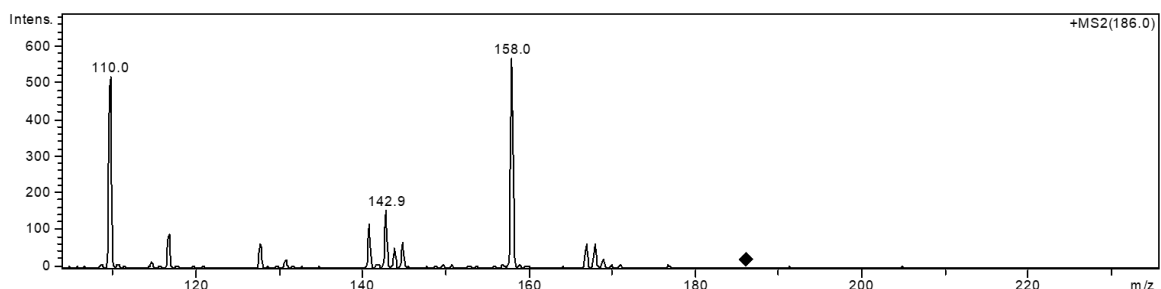
Na MS spektru u piku pirfenidona (slika 16) uočljiv je molekulski ion m/z 186 te adukti s natrijem m/z 208 i kalijem m/z 224. Na MS² spektrima dobivenima fragmentacijom pseudomolekulskog iona (slike 17 i 18) dominiraju pikovi m/z 167,9 (gubitak kisika), 158,0 (gubitak karbonila) i 110,0 (gubitak fenila). Predložena fragmentacija prikazana je na slici 19.



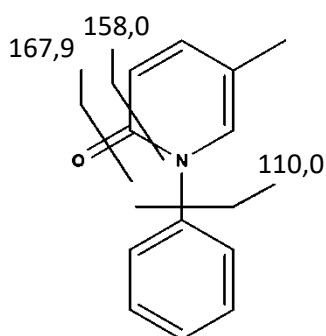
Slika 16. ESI⁺ MS spektar u piku 6,0 min – pik pirfenidona. Vidljiv je pseudomolekulski ion [M+H]⁺ m/z 186, adukt s natrijem [M+Na]⁺ m/z 208 i adukt s kalijem [M+K]⁺ m/z 224.



Slika 17. ESI⁺ MS² spektar pseudomolekulskog iona m/z 186, raspon snimanih m/z 150-290

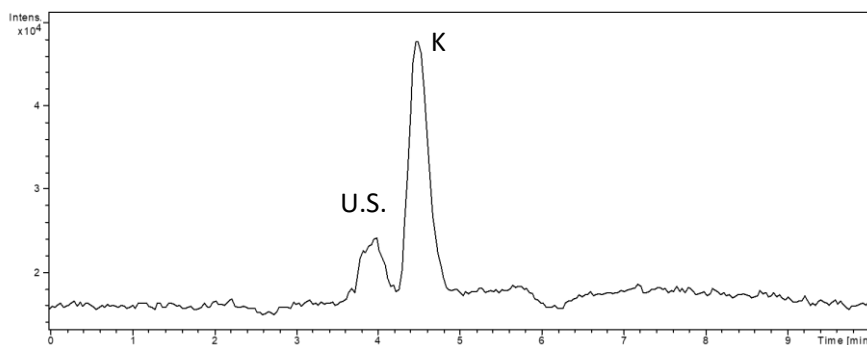


Slika 18. ESI⁺ MS² spektar pseudomolekulskog iona m/z 186, raspon snimanih m/z 100-240

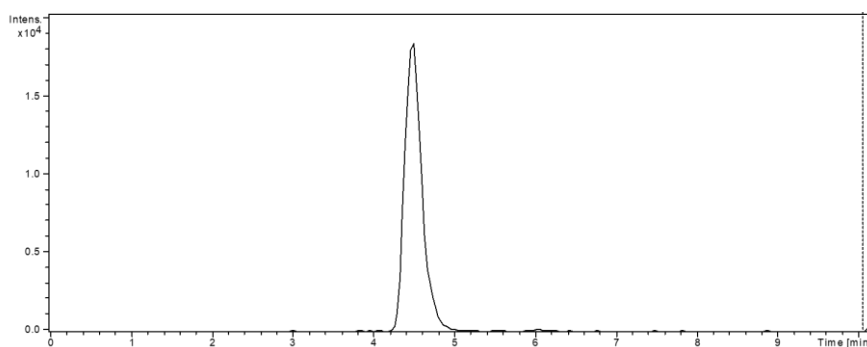


Slika 19. Predložena shema fragmentacije pirfenidona

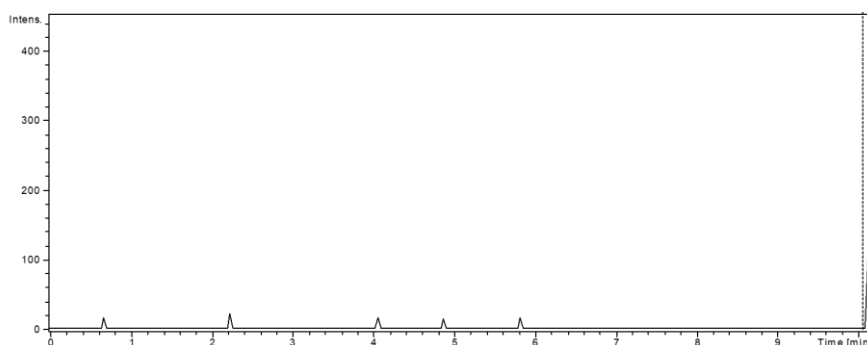
Negativna elektrosprej ionizacija provodi se pri negativnom naponu na kapilari pa dolazi do deprotoniranja analita, ukoliko je to moguće, odnosno nastanka deprotoniranog molekuskog iona $[M-H]^-$. Kromatogram potpune struje iona prikazan je na slici 20. 5-karboksipirfenidon sadrži kiselu karboksilnu skupinu te njegov signal m/z 214 možemo uočiti na kromatogramu (slika 21), no pirfenidon ne sadrži kisele funkcionalne skupine i ne dolazi do njegove deprotonacije pa ovaj način ionizacije nije primjenjiv za njegovu analizu (slika 22).



Slika 20. MS kromatogram potpune struje iona dobiven negativnom elektrosprej ionizacijom smjese standarda paracetamola (U.S., 50 $\mu\text{g/mL}$), 5-karboksipirfenidona (K, 10 $\mu\text{g/mL}$) i pirfenidona (10 $\mu\text{g/mL}$)



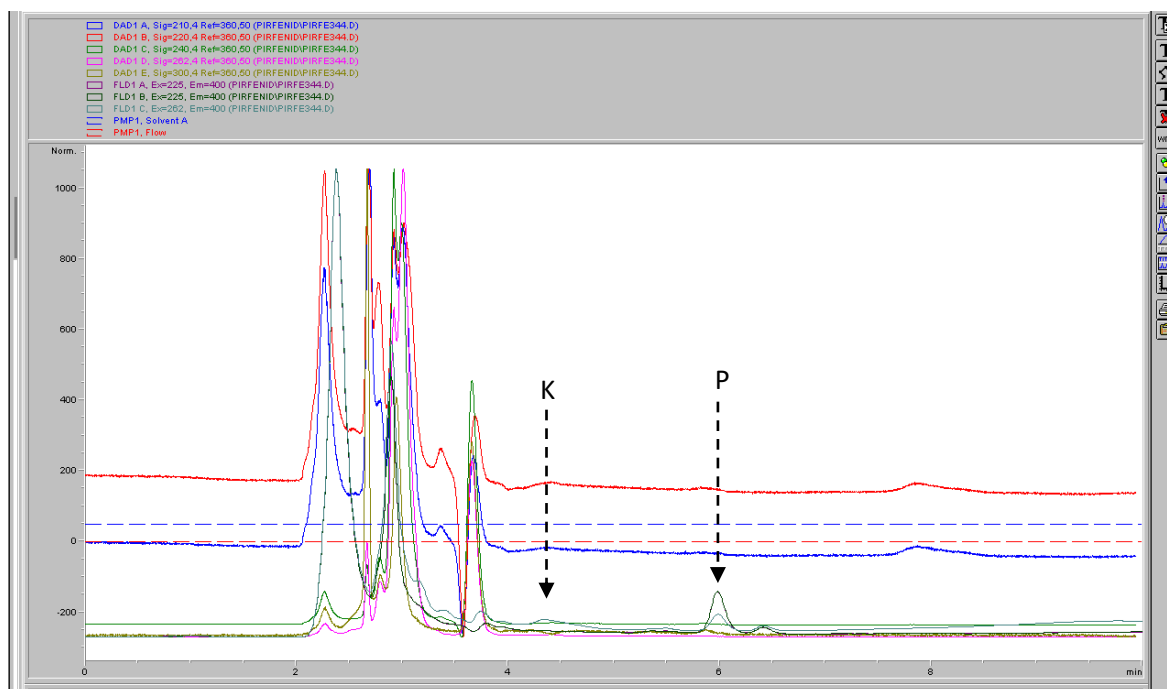
Slika 21. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 214 – pik 5-karboksipirfenidona $[M-H]^-$



Slika 22. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 184 – nema istaknutih pikova

4.3. IDENTIFIKACIJA ANALITA U BIOLOŠKOM UZORKU

Nakon što su odabrani uvjeti analize i ustanovljena vremena zadržavanja analita, pristupljeno je eluaciji uzorka tretiranog štakora uz primjenu DAD, FLD i MS detektora. Bilo je potrebno provjeriti zadovoljava li pojedini detektor kriterije osjetljivosti i selektivnosti za detekciju niskih koncentracija analita u prisustvu matriksa biološkog uzorka. Kromatogrami dobiveni DAD i FLD detekcijom prikazani su na slici 23.

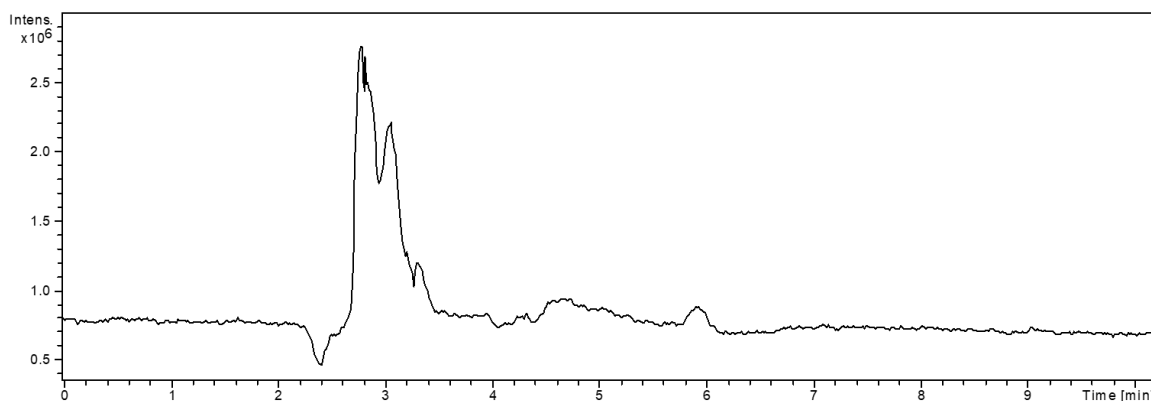


Slika 23. DAD kromatogram uzorka tretiranog štakora na valnim duljinama detekcije 210, 220, 240, 262 i 300 nm te FLD kromatogrami na valnim duljinama pobude 225 i 262 nm.

Vidljivi su pikovi pirfenidona (P) i 5-karboksipirfenidona (K) pri vremenima zadržavanja 5,9 i 4,3 min. Glavnina matriksa uzorka eluira ranije od analita stoga ne interferira s analizom.

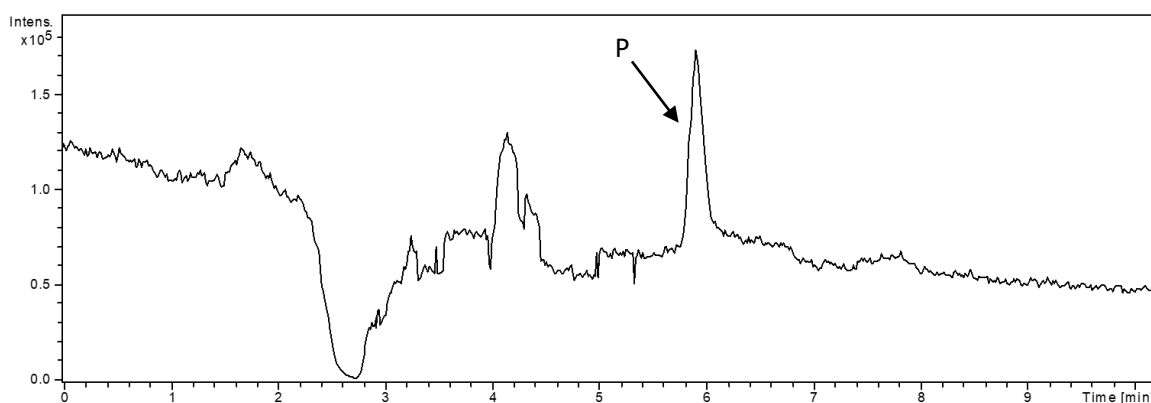
DAD detekcija nije dovoljno selektivna i osjetljiva u analizi složenih uzoraka u kojima se analiti nalaze u tragovima, pikovi analita su vrlo slabo vidljivi čak i na valnim duljinama maksimuma UV-Vis apsorpcije. Fluorescencijska je detekcija pružila bolje rezultate, ali zahtijeva složeniju optimizaciju zbog suženog izbora unutarnjih standarda, što će biti predmet budućih eksperimenata. Zato se detekcija analita u nastavku istraživanja uglavnom temeljila na masenoj spektrometriji, kao iznimno selektivnoj i osjetljivoj analitičkoj tehnici.

Priloženi su MS kromatogrami i spektri jednog od uzoraka desnog ventrikla štakora tretiranih pirfenidonom, pripremljenog jednostavnom ekstrakcijom u 50%-tnom acetonitrilu uz vorteks, ultrazvučnu kupelj i centrifugiranje pri čemu je supernatant uzet za analizu (slike 24-28).

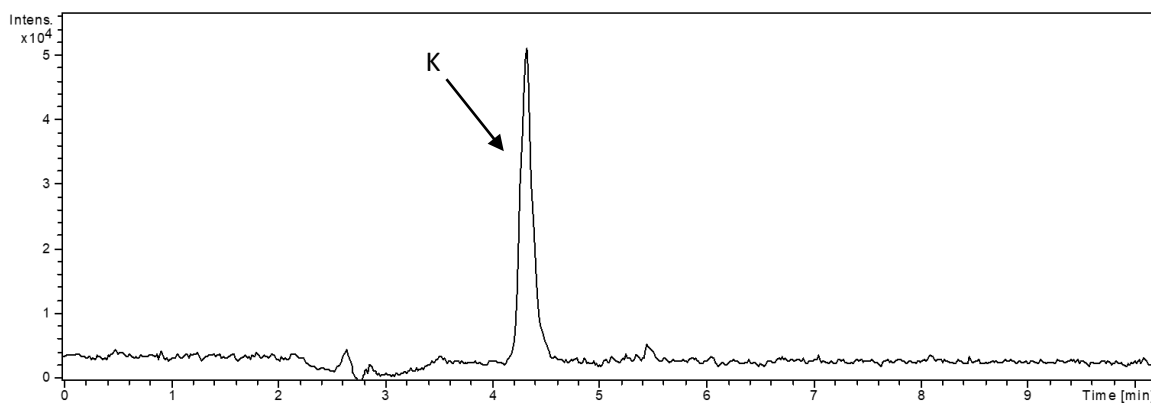


Slika 24. ESI-MS kromatogram potupne struje iona uzorka ventrikla štakora tretiranog pirfenidonom

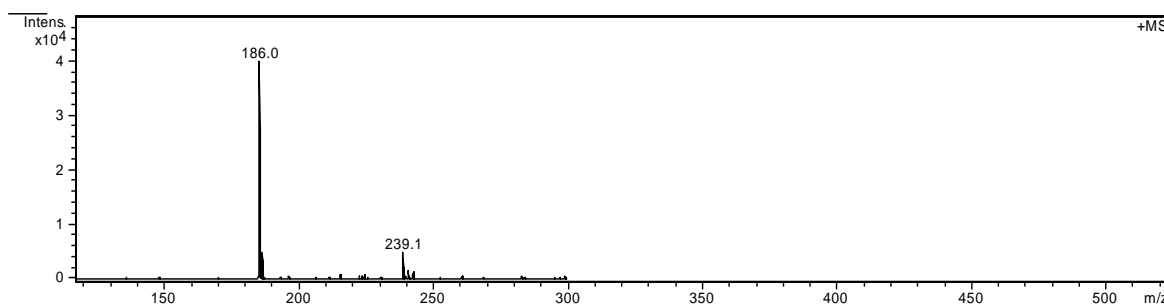
Kromatogram potpune struje iona (slika 24) kod bioloških uzoraka nije vrlo selektivan, zbog velike količine iona različitih masa koji nastaju iz matriksa. Zato se koristi kromatogram po odabranoj masi fragmenta (slike 25 i 26), koji pokazuje porast intenziteta signala samo u onom vremenu kad eluira ion određenog omjera m/z . Pripadajući MS spektri prikazani su na slikama 27 i 28. Jasno je vidljiv dominantni molekularni ion pirfenidona m/z 186, odnosno 5-karboksipirfenidona m/z 216.



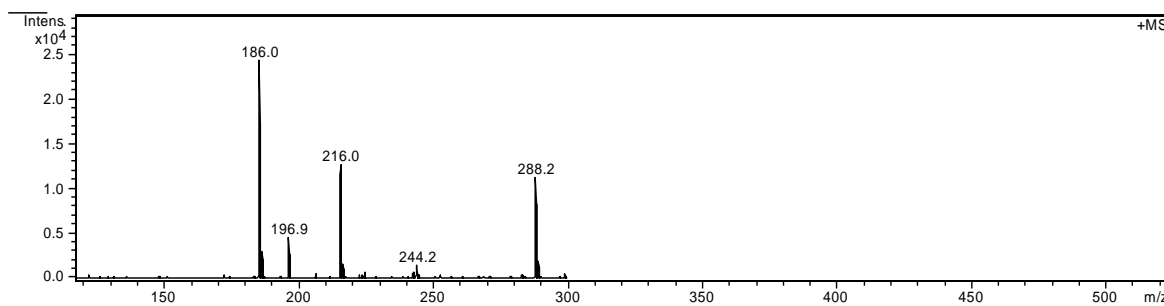
Slika 25. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 186 – pik pirfenidona (P) vidljiv je na t_R 5,9 min



Slika 26. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 216 – pik 5-karboksipirfenidona (K) vidljiv je na t_R 4,3 min

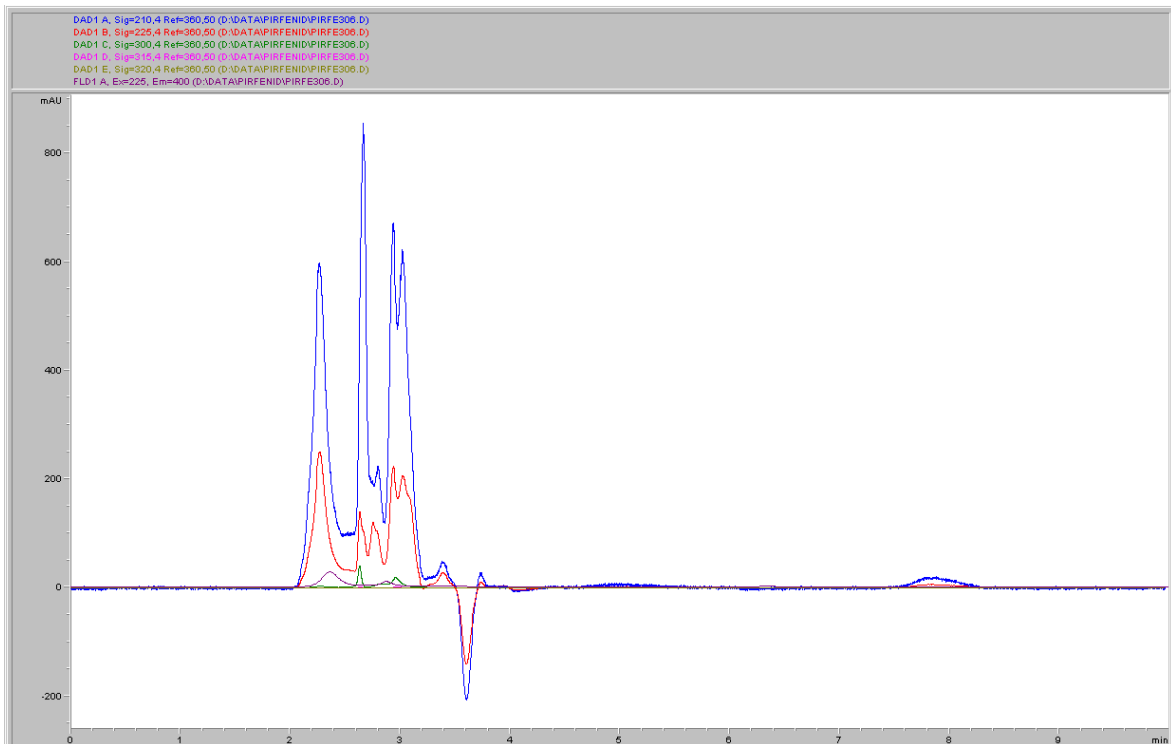


Slika 27. MS spektar u $t = 5,9$ min – vidljiv je pik protoniranog molekuskog iona m/z 186

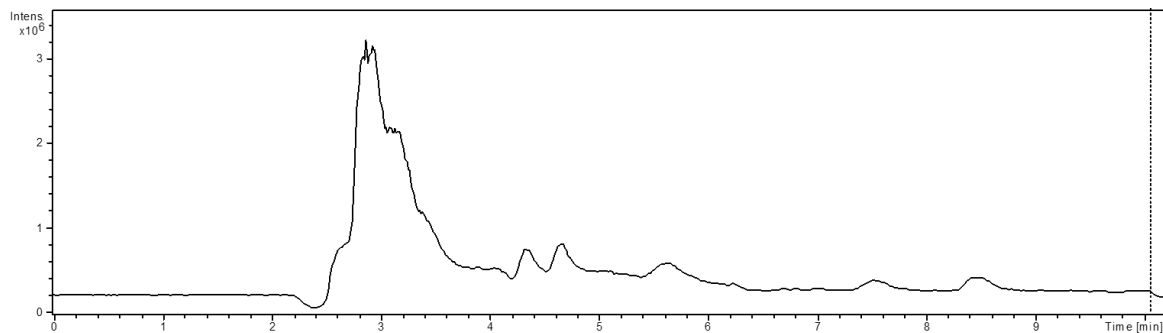


Slika 28. MS spektar u $t = 4,3$ min – vidljiv je pik protoniranog molekuskog iona m/z 216

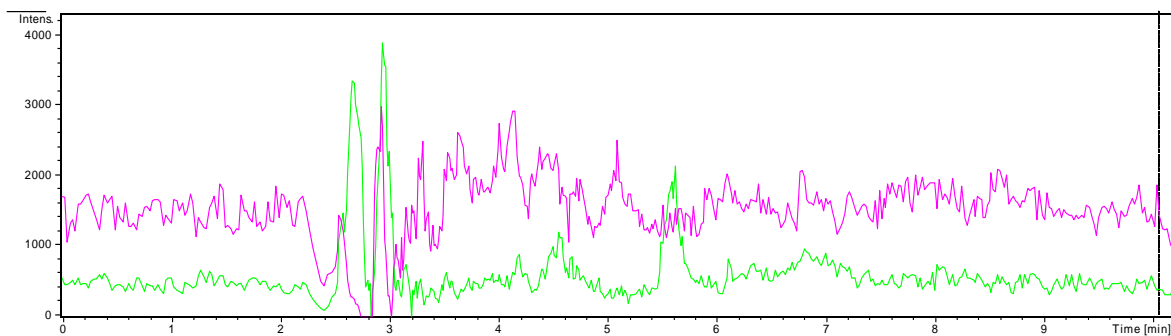
Kao negativna kontrola poslužili su štakori netretirani pirfenidonom. Ovdje je bilo moguće provjeriti potencijalne interferencije matriksa (slike 29-33).



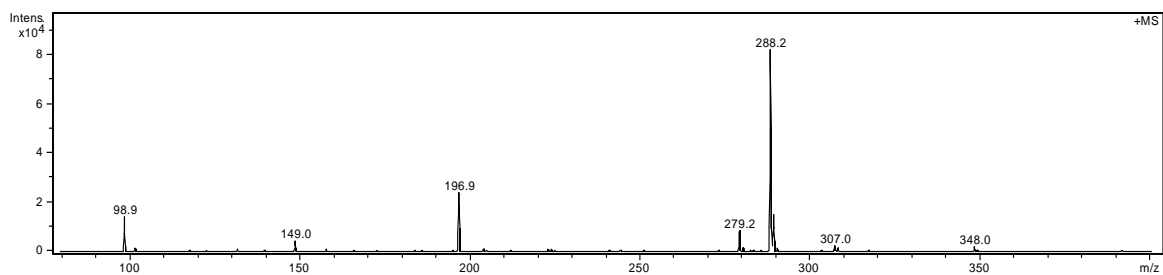
Slika 29. Kromatogram uzorka desnog ventrikla netretiranog štakora, detekcija pomoću DAD (210, 225, 300, 315, 320 nm) i FLD (ekscitacija 225 nm, emisija 400 nm)



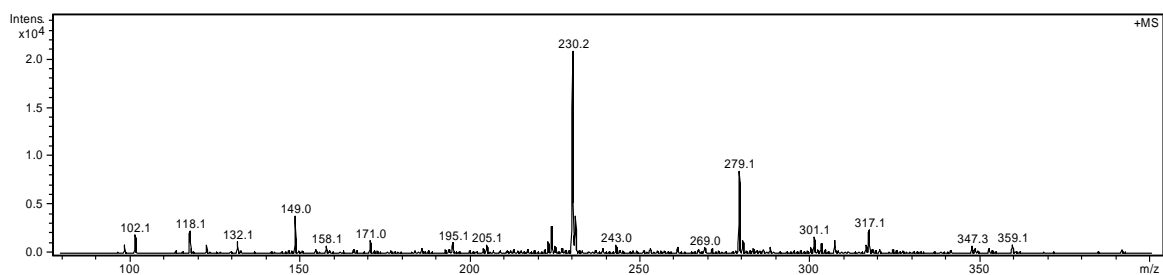
Slika 30. ESI-MS kromatogram potpune struje iona uzorka ventrikla netretiranog štakora



Slika 31. ESI-MS kromatogram izoliranih iona m/z 216 (zeleno) i m/z 186 (ružičasto)



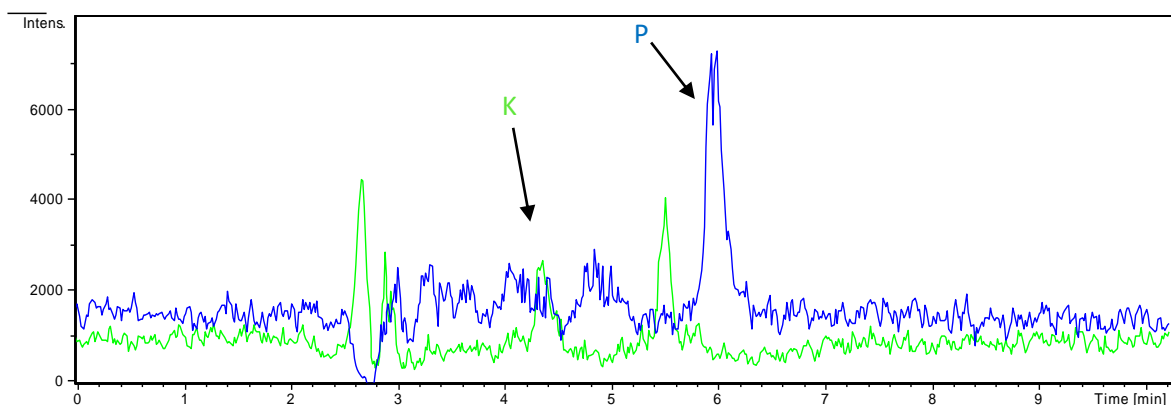
Slika 32. MS spektar u t = 4,3 min



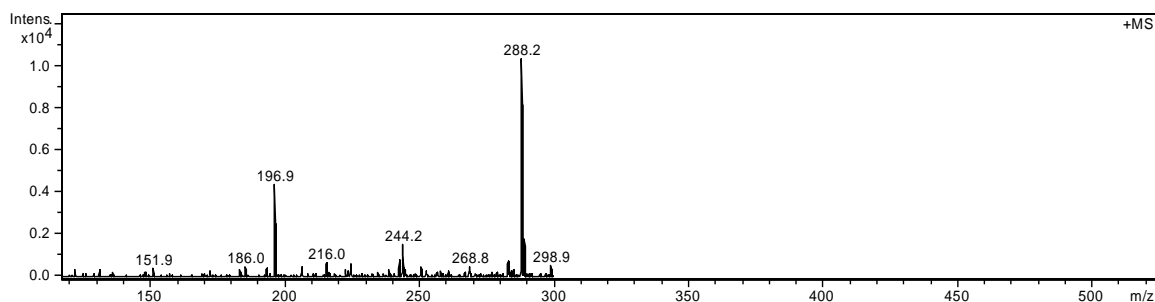
Slika 33. MS spektar u t = 5,9 min

Na priloženim kromatogramima izoliranih iona na slici 31 nisu vidljivi pikovi analita, a maseni spektri na slikama 32 i 33 ne sadrže karakteristične ione m/z 186 i 216.

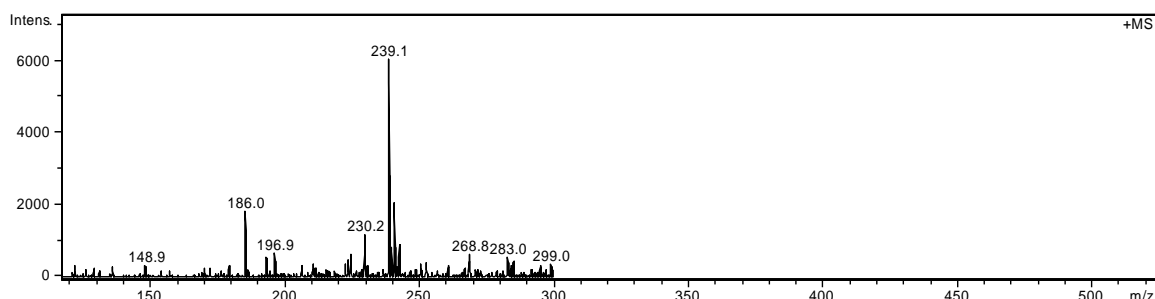
Prilikom analize uočena je pojava *carry-overa* – prijenosa uzorka na iglu autoinjektora i onečišćenje slijedećeg kromatografiranog uzorka. Na kromatogramu uzorka netretiranog štakora prikazanom na slici 34 prisutni su pikovi s vremenima zadržavanja 4,3 i 5,9 min. Na MS spektrima u vrhovima tih pikova (slike 35 i 36) vidljivi su molekularni ioni obaju analita, 5-karboksipirfenidona (m/z 216) te pirfenidona (m/z 186). Ova greška može se izbjeći ispiranjem igle čistom mobilnom fazom prije svake analize.



Slika 34. Kromatogrami izoliranih iona m/z 216 (zeleno) i m/z 186 (plavo) netretiranog uzorka s *carry-overom* 5-karboksipirfenidona (K) i pirfenidona (P) vidljivim na njihovim pripadajućim t_R (4,3 i 5,9 min); sastav mobilne faze ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1% (V/V/V), brzina protoka 0,4 mL/min



Slika 35. MS spekter u $t = 4,3$ min – vidljiv je pseudomolekulski ion m/z 216



Slika 36. MS spekter u $t = 5,9$ min – vidljiv je pseudomolekulski ion m/z 186

4.4. ODABIR UNUTARNJEG STANDARDA

Pri analizi kompleksnih bioloških uzoraka vrlo je važno postići djelotvornu ekstrakciju analita – odijeliti ga od većine smetajućih komponenata. Budući da ekstrakcijski postupci nisu uvijek potpuno učinkoviti, već dolazi do gubitaka analita, kod njihovog kvantitativnog određivanja potrebno je postupak provesti uz dodatak unutarnjeg standarda. Unutarnji standard je spoj koji mora biti stabilan, imati srodnu strukturu i svojstva analitima, kao i sličan odgovor detektora, no ne smije eluirati istovremeno s pikovima analita, kao niti znatno produljivati vrijeme analize. Pretpostavlja se da ponašanje unutarnjeg standarda odgovara ponašanju analita tijekom ekstrakcije pa dolazi do usporedivih gubitaka. Osim toga, unutarnji standard otklanja pogreške samog analitičkog postupka, poput varijacija u vremenu zadržavanja ili površini kromatografskog pika, što je također od velike važnosti kod kvantifikacije analita prisutnih u niskim koncentracijama.

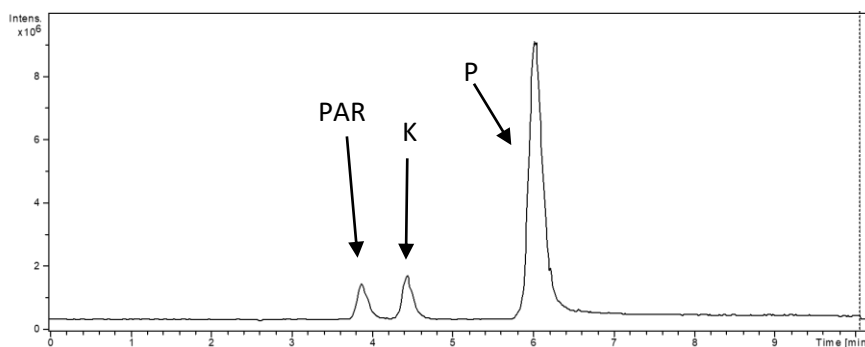
U svrhu predlaganja mogućih opcija, pripremljene su otopine standarda i promatrano njihovo vrijeme zadržavanja u odnosu na analite pri prethodno odabranim uvjetima analize (tablica 4).

Tablica 4. Isprobani unutarnji standardi, njihove relativne molekulske mase i vremena zadržavanja pri ustaljenim uvjetima analize (sastav mobilne faze ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0,1%, V/V/V, brzina protoka 0,4 mL/min)

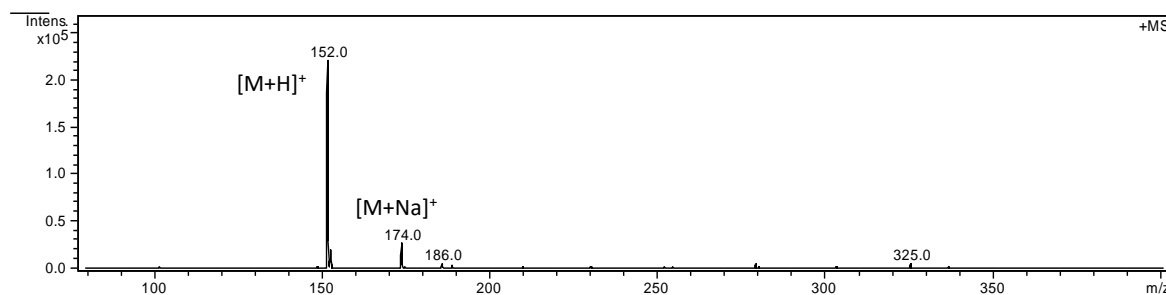
Standard	Mr	t _R (min)
Benzokain	165,19	7,90
Fenazon	188,23	4,40
N,N-dimetilaminobenzaldehid	149,08	8,60
Kodein	299,37	2,60
Kofein	194,19	3,95
Paracetamol	151,16	3,85

Benzokain i N,N-dimetilaminobenzaldehid imaju znatno duža vremena zadržavanja od analita čime dovode do produljenja trajanja analize. Kodein eluira vrlo rano pa je velika vjerojatnost smanjene selektivnosti zbog koelucije s pikovima biološkog matriksa. Vrijeme zadržavanja kofeina i fenazona vrlo je blisko vremenu zadržavanja 5-karboksipirfenidona te ne dolazi do potpunog razdvajanja pikova u baznoj liniji.

Paracetamol je pokazao najpovoljnije vrijeme zadržavanja (slika 37). Njegov je pik dobro razdvojen od pikova 5-karboksipirfenidona i pirfenidona, a ne produljuje vrijeme analize. Na MS spektru u vrhu njegovog pika vidljiv je signal pseudomolekuskog iona $[M+H]^+$ m/z 152, kao i adukt s natrijem m/z 174 (slika 38).

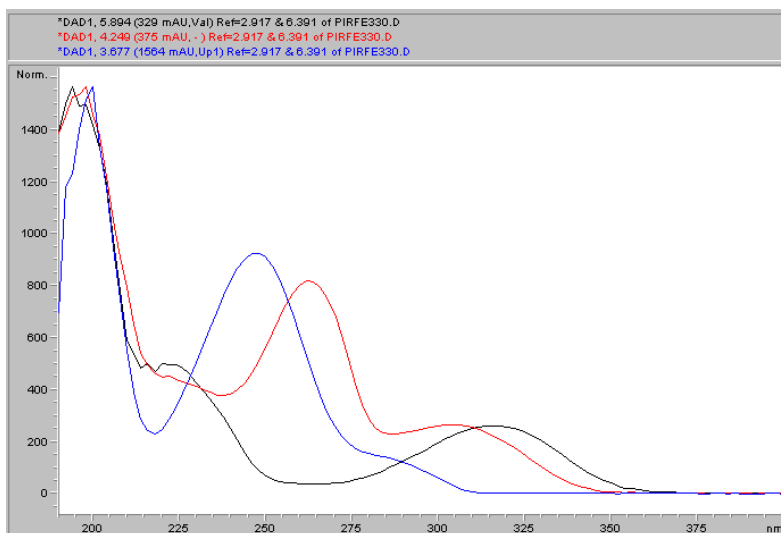


Slika 37. ESI-MS kromatogram potpune struje iona smjese standarda paracetamola (PAR, 10 $\mu\text{g/mL}$, t_R 3,85 min), 5-karboksipirfenidona (K, 5 $\mu\text{g/mL}$, t_R 4,3 min) i pirfenidona (P, 10 $\mu\text{g/mL}$, t_R 6,0 min)



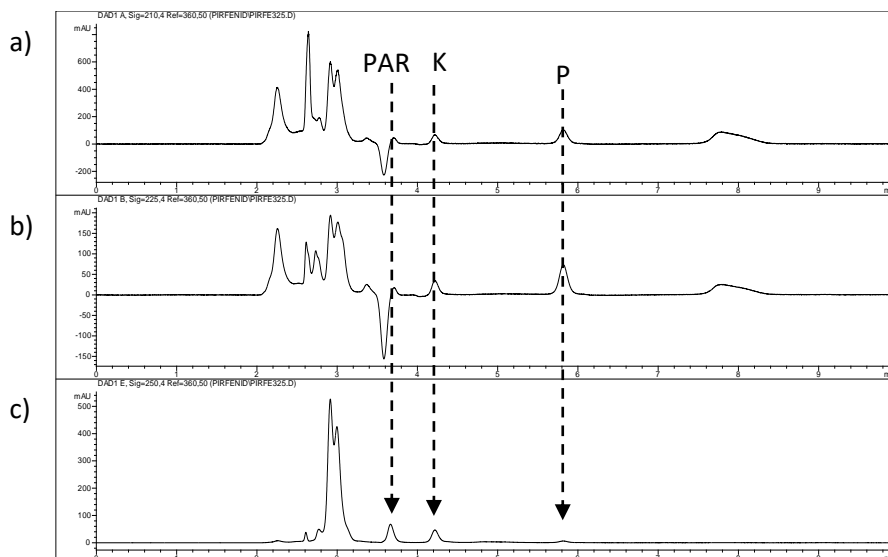
Slika 38. MS spektar u $t = 3,9$ min – vidljiv je protonirani molekularni ion paracetamola $[M+H]^+$ m/z 152 te adukt s natrijem $[M+Na]^+$ m/z 174

UV-Vis spektar paracetamola razlikuje se od spektara pirfenidona i 5-karboksipirfenidona (slika 39), što otvara mogućnost jednostavnije istovremene identifikacije i kvantifikacije primjenom UV-Vis detektora.

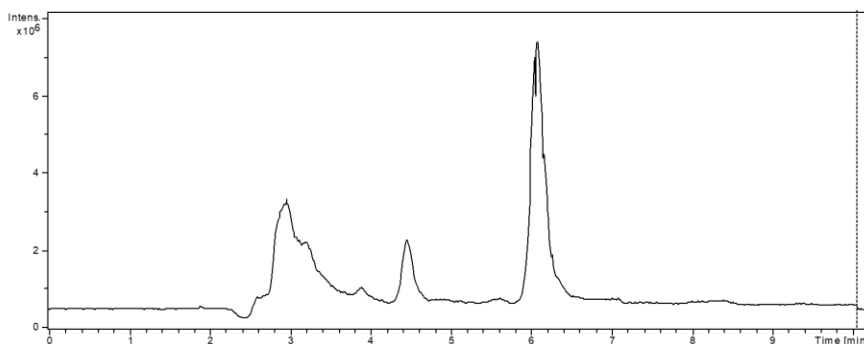


Slika 39. UV-Vis spektri paracetamola (plavo), pirfenidona (crno) i 5-karboksipirfenidona (crveno)

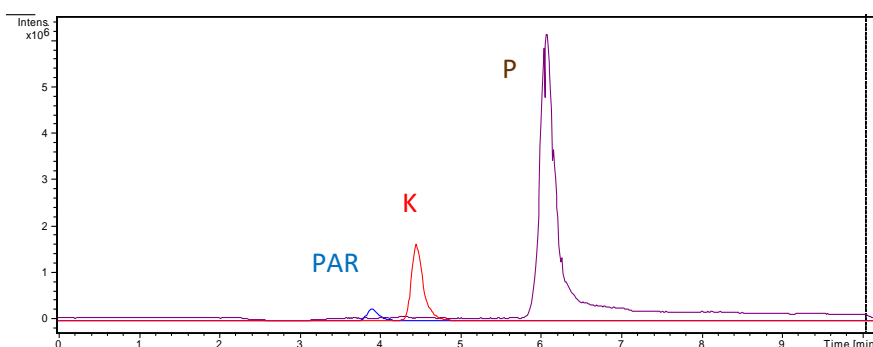
Radi utvrđivanja postoje li interferencije matriksa u detekciji unutarnjeg standarda, kromatografirani su negativni kontrolni uzorci obogaćeni otopinama standarda (slike 40-42).



Slika 40. DAD kromatogram blank uzorka cijepljenog standardima paracetamola (3,4 $\mu\text{g/mL}$, t_R 3,7 min), 5-karboksipirfenidona (1,7 $\mu\text{g/mL}$, t_R 4,2 min) i pirfenidona (3,4 $\mu\text{g/mL}$, t_R 5,8 min), pri valnim duljinama DAD detekcije a) 210, b) 225 i c) 250 nm



Slika 41. ESI-MS kromatogram potpune struje iona kontrolnog uzorka cijepljenog standardima paracetamola (3,4 $\mu\text{g/mL}$), 5-karboksipirfenidona (1,7 $\mu\text{g/mL}$) i pirfenidona (3,4 $\mu\text{g/mL}$)



Slika 42. ESI-MS kromatogrami istog uzorka kao na slici 41, izolirani su ioni m/z 152 (plavo, paracetamol, PAR), m/z 216 (crveno, 5-karboksipirfenidon, K) i m/z 186 (smeđe, pirfenidon, P)

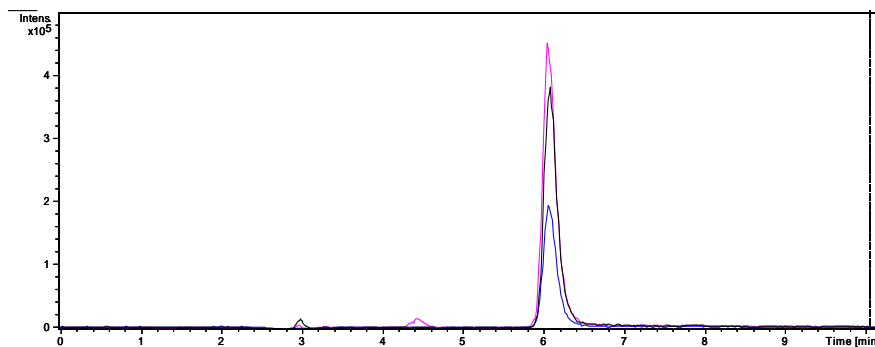
Na DAD kromatogramima na slici 40 vidljivo je kako se predloženi unutarnji standard može koristiti na svim valnim duljinama detekcije, uz najbolji odaziv i najmanje interferencije pri valnoj duljini od 250 nm. Masena se spektrometrija očekivano pokazala zadovoljavajuće selektivnom u detekciji predloženog unutarnjeg standarda, posebice primjenom kromatograma izoliranog iona.

4.5. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKIH UVJETA PIRFENIDONA I NJEGOVOG METABOLITA IZ BIOLOŠKOG UZORKA

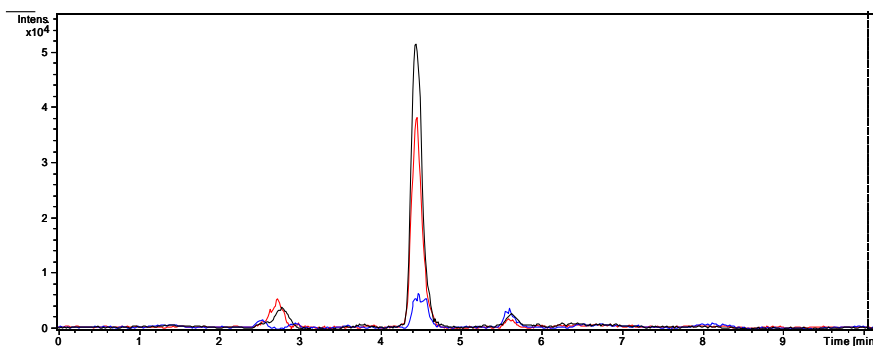
Prilikom preliminarnih eksperimenata uzorci su ekstrahirani jednostavnim postupkom izmućkivanja 50%-tnim acetonitrilom, koji je pritom i istaložio proteine iz matriksa, a supernatant nakon centrifugiranja prenijet je u bočicu za uzorkovanje. Dobivene su zadovoljavajuće koncentracije analita koje je bilo moguće detektirati predloženom analitičkom metodom, međutim one ne predstavljaju realnu sliku uzorka zbog mogućnosti da je dio analita još zaostao u talogu nakon centrifugiranja. Značajan je i šum koekstrahiranog matriksa pa je cilj optimizacije ekstrakcije, osim ukoncentriravanja željenih analita, i uklanjanje nepoželjnih komponenata.

Za potrebe daljnjeg razvoja metode i stvaranje temelja za kvantifikaciju analita u biološkom uzorku (koja će biti predmet budućih istraživanja) potrebno je provesti što potpuniju ekstrakciju, kojom se najveća moguća količina analita izdvaja iz matriksa. Budući da se pirfenidon i 5-karboksipirfenidon razlikuju u polarnosti, pretpostavljeno je da će se razlikovati i učinkovitost njihove ekstrakcije pojedinim ekstrakcijskim sredstvom, stoga je iskušano nekoliko kombinacija otapala.

Uzorci su suspendirani u različitim otapalima (čisti acetonitril, metanol i 50%-tni acetonitril), vorteksirani, ostavljeni stajati na sobnoj temperaturi i centrifugirani. Supernatanti su zatim odvojeni od taloga kako bi se oboje zasebno mogli dodatno obrađivati. Radi postizanja bolje osjetljivosti metode supernatanti su upareni do suha, a ti suhi ostaci otopljeni u 50%-tnom acetonitrilu (uz ultrazvučnu kupelj po potrebi) i centrifugirani, nakon čega su bistri ekstrakti iznad taloga injektirani na HPLC kolonu (slike 43 i 44).



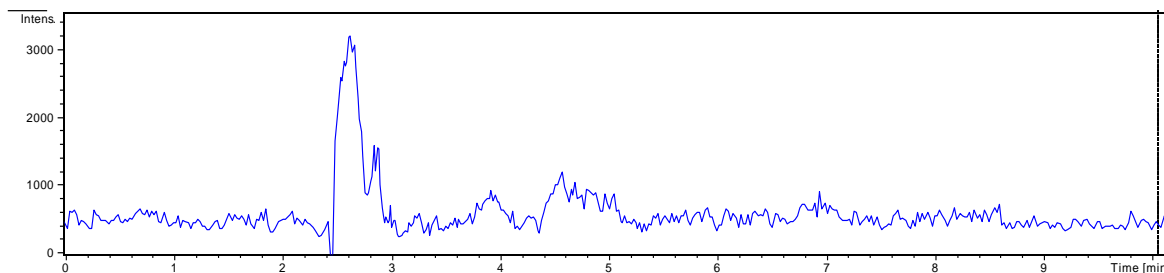
Slika 43. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 186 (pirfenidon): ekstrakt u metanolu (ružičasto), 50%-tnom acetonitrilu (crno) i acetonitrilu (plavo)



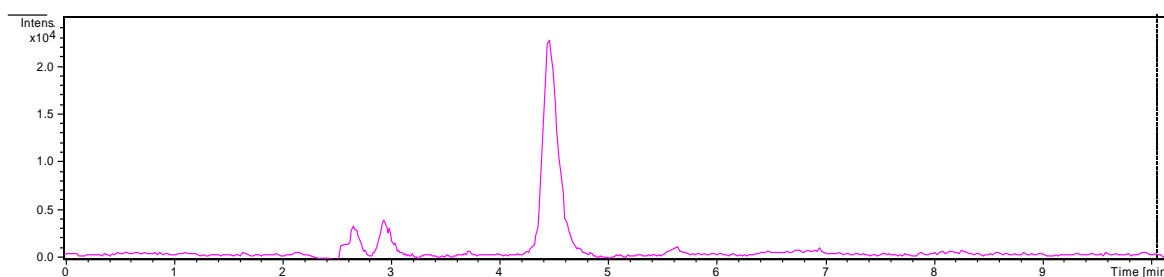
Slika 44. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 216 (5-karboksipirfenidon): ekstrakt u 50%-tnom acetonitrilu (crno), metanolu (crveno) i acetonitrilu (plavo)

Iz priloženih MS kromatograma na slikama 43 i 44 moguće je zaključiti kako je najbolje otapalo za pirfenidon metanol, a za 5-karboksipirfenidon 50%-tni acetonitril, dok čisti acetonitril nije pogodno ekstrakcijsko sredstvo niti za jedan analit.

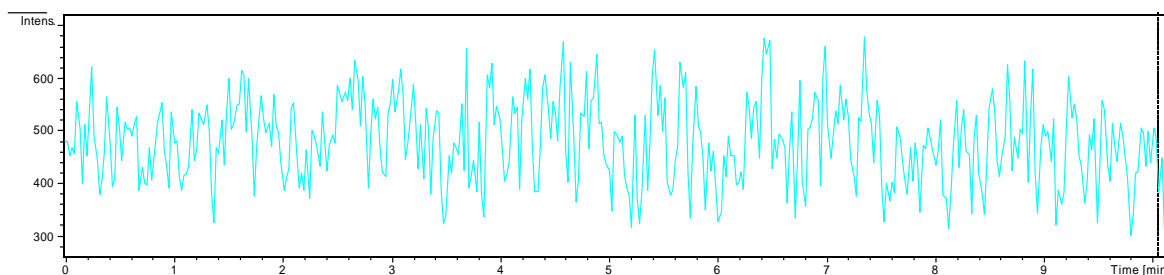
Kako bi se dodatno provjerila učinkovitost ekstrakcijskih otapala, talozi zaostali nakon prvog centrifugiranja ekstrahirani su vodom, ne bi li se izdvojio moguće zaostali polarni 5-karboksipirfenidon (količina koja je preostala ovisi o tome koliko je prvo primijenjeno otapalo bilo učinkovito u njegovoj izolaciji). Primijenjena je ultrazvučna kupelj, kako bi se poboljšalo otapanje i ekstrakcija, te su uzorci ponovno centrifugirani, a supernatanti analizirani novorazvijenom metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenim spektrometrom (slike 45-47).



Slika 45. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 216 taloga iz 100%-tnog metanola u vodi – pik 5-karboksipirfenidona nije vidljiv



Slika 46. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 216 taloga iz 100%-tnog acetonitrila u vodi – vidljiv je intenzivan pik 5-karboksipirfenidona na t_R 4,4 min



Slika 47. ESI-MS kromatogram izoliranog iona m/z 216 taloga iz 50%-tnog acetonitrila u vodi – pik 5-karboksipirfenidona nije vidljiv

Iz priloženih MS kromatograma na slikama 45-47, analizom dodatnih ekstrakata taloga uzorka, vidljivo je kako 5-karboksipirfenidon nije zaostao u uzorku niti nakon ekstrakcije 100%-tnim metanolom, niti 50%-tnim acetonitriplom, dok je značajnija količina preostala nakon izmučkivanja s čistim acetonitriplom. Ovi rezultati potvrđuju tvrdnju kako su 50%-tni acetonitril i 100%-tni metanol dobra ekstrakcijska otapala za 5-karboksipirfenidon.

5. ZAKLJUČCI

Razvijena je nova HPLC-DAD-FLD-MS/MS metoda za selektivnu i osjetljivu istovremenu analizu pirfenidona i njegovog metabolita 5-karboksipirfenidona u biološkom uzorku – tkivu desnog ventrikla štakora tretiranog pirfenidonom.

Zadovoljavajuća kromatografska separacija analita postignuta je na Symmetry (Waters) C18 koloni dimenzija $4,6 \times 150$ mm i veličine čestica $3,5 \mu\text{m}$ pri temperaturi 28°C . Primijenjena je izokratna elucija mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, vode i mravlje kiseline u omjeru 50:50:0,1% brzine protoka $0,4 \text{ mL/min}$. Vremena zadržavanja analita iznosila su $5,9 \text{ min}$ za pirfenidon i $4,3 \text{ min}$ za 5-karboksipirfenidon.

Detekcija je vršena pomoću tri detektora – detektora diodnog niza, fluorescencijskog detektora i masenog spektrometra.

Detektor diodnog niza poslužio je u preliminarnim ispitivanjima radi utvrđivanja optimalnih kromatografskih postavki, ali se u analizi složenog biološkog uzorka nije pokazao dovoljno osjetljivim čak niti upotrebom valnih duljina maksimuma apsorpcije (262 nm za pirfenidon te 225 nm za 5-karboksipirfenidon).

Uočeno je kako oba analita pokazuju prirodnu fluorescenciju, što otvara mogućnost njihove detekcije tim putem, ali je potrebna daljnja optimizacija: odabir najprikladnije valne duljine praćenja emisije ($50\text{-}150 \text{ nm}$ iznad optimalnih valnih duljina ekscitacije, koje odgovaraju apsorpcijskim maksimumima – 262 i 225 nm), kao i fluorescirajućeg unutarnjeg standarda.

Maseni je spektrometar uz pozitivni elektrosprej način ionizacije omogućio istovremenu detekciju oba analita uz minimalne interferencije matriksa. U složenim su uzorcima praćeni signali pseudomolekulskih iona $[\text{M}+\text{H}]^+$ pirfenidona (m/z 186) i 5-karboksipirfenidona (m/z 216).

Analizom MS^2 fragmentacije molekulskog iona pirfenidona utvrđeno je kako nastaju sljedeći ioni: m/z 167,9 (gubitak kisika), 158,0 (gubitak karbonila), 110,0 (gubitak fenila).

MS^2 fragmentacijom molekulskog iona 5-karboksipirfenidona dobiveni su ioni m/z 197,9 (gubitak kisika), 187,9 (gubitak karbonila), 169,9 (gubitak karboksilne skupine), 139,9 (gubitak fenila).

Na temelju povoljnog vremena zadržavanja (3,85 min) i svojstava bliskih analitima, kao unutarnji standard predložen je paracetamol.

Uspoređena je ekstrakcija analita iz tkiva pomoću triju otapala – čistog i 50%-tnog acetonitrila te čistog metanola. Nakon izmućkivanja, ostatak uzorka je dodatno tretiran vodom, čime je provjerena učinkovitost ekstrakcije polarnog metabolita navedenim otapalima. Kao rezultat, utvrđeno je da su metanol i 50%-tni acetonitril dobra ekstrakcijska otapala za oba analita, s tim da se metanol pokazao boljim za pifafenidon, a polarniji 50%-tni acetonitril za 5-karboksipifafenidon. Čisti acetonitril nije pogodno ekstrakcijsko sredstvo niti za jedan analit.

6. LITERATURA

1. Adamali HI, Maher TM. Current and novel drug therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Drug Des Devel Ther*, 2012, 6, 261-272.
2. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem*, 2012.
3. Costabel U, Albera C, Lancaster LH, Lin CY, Hormel P, Hulter HN, Noble PW. An Open-Label Study of the Long-Term Safety of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (RECAP). *Respiration*, 2017, 94(5), 408-415.
4. Cottin V, Koschel D, Günther A, Albera C, Azuma A, Sköld CM, Tomassetti S, Hormel P, Stauffer JL, Strombom I, Kirchgaessler KU, Maher TM. Long-term safety of pirfenidone: results of the prospective, observational PASSPORT study. *ERJ Open Res*, 2018, 4(4).
5. Gadekar SM. 1976. U.S. Patent 3,974,281.
6. Gan Y, Herzog EL, Gomer RH. Pirfenidone treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Clin Risk Manag*, 2011, 7, 39-47.
7. Hernandez RL, Aguilar Perez M, Lázaro Carrasco MT, Gil PU. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Med Sci*, 2018, 6, 68.
8. King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, Gorina E, Hopkins PM, Kardatzke D, Lancaster L, Lederer DJ, Nathan SD, Pereira CA, Sahn SA, Sussman R, Swigris JJ, Noble PW. ASCEND Study Group. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2014, 370, 2083-2092.
9. Maher TM, Wells AU, Laurent GJ. Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms? *Eur Respir J*, 2007, 30, 835-839.
10. Margaritopoulos GA, Vasarmidi E, Antoniou KM. Pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid*, 2016, 11, 11-22.
11. Margolin SB. 1994. U.S. Patent 5,310,562.
12. Miric G, Dallemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L. Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 2001, 133, 687-694.

13. Molina-Molina M, Machahua-Huamani C, Vicens-Zygmunt V, Llatjós R, Escobar I, Sala-Llinas E, Luburich-Hernaiz P, Dorca J, Montes-Worboys A. Anti-fibrotic effects of pirfenidone and rapamycin in primary IPF fibroblasts and human alveolar epithelial cells. *BMC Pulm Med*, 2018, 18(1), 63.
14. Nigović B. Interna skripta za predavanja, predavanje: Fluorescencijska spektrofotometrija. Zagreb, 2014a.
15. Nigović B. Interna skripta za predavanja, predavanje: Kromatografske tehnike odjeljivanja. Zagreb, 2014b.
16. Nigović B. Interna skripta za predavanja, predavanje: Masena spektrometrija. Zagreb, 2014c.
17. Nigović B. Interna skripta za predavanja, predavanje: Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Zagreb, 2014d.
18. Nigović B. Interna skripta za predavanja, predavanje: Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija. Zagreb, 2014e.
19. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE Jr, Lancaster L, Sahn SA, Szwarzberg J, Valeyre D, du Bois RM; CAPACITY Study Group. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*, 2011, 377, 1760-1769.
20. Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol*, 2008, 590, 400-408.
21. Radhakrishnan R, Cyr M, Pyles SM. 2013. U.S. Patent 8,519,140.
22. Rasooli R, Rajaian H, Pardakhty A, Mandegary A. Preference of aerosolized pirfenidone to oral intake: an experimental model of pulmonary fibrosis by paraquat. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2018, 31(1), 25-32.
23. Rubino CM, Bhavnani SM, Ambrose PG, Forrest A, Loutit JS. Effect of food and antacids on the pharmacokinetics of pirfenidone in older healthy adults. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22, 279-285.
24. Sažetak opisa svojstava lijeka Esbriet, 2019., URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/esbriet-epar-product-information_hr.pdf, pristupljeno 23.5.2019.
25. Schaefer CJ, Ruhrmund DW, Pan L, Seiwert SD, Kossen K. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *Eur Respir Rev*, 2011, 20(120), 85-97.

26. Sun G, Lin X, Zhong H, Yang Y, Qiu X, Ye C, Wu K, Yu M. Pharmacokinetics of pirfenidone after topical administration in rabbit eye. *Mol Vis*, 2011, 17, 2191-2196.
27. Togami K, Kanehira Y, Tada H. Possible involvement of pirfenidone metabolites in the antifibrotic action of a therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(10), 1525-1527.
28. Togami K, Kanehira Y, Tada H. Pharmacokinetic evaluation of tissue distribution of pirfenidone and its metabolites for idiopathic pulmonary fibrosis therapy. *Biopharm Drug Dispos*, 2015, 36, 205-215.
29. Walker JE, Margolin SB. Pirfenidone for chronic progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2001, 7, 305-312.
30. Wen Y-G, Liu X, He X-L, Shang D-W, Ni X-J, Zhang M, Wang Z-Z, Hu J-Q, Qiu C. Simultaneous determination of pirfenidone and its metabolite in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. *J Anal Toxicol*, 2014, 38, 645-652.
31. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, Kolb M. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2015, 45, 1434-1445.
32. Yamagami K, Oka T, Wang Q, Ishizu T, Lee J-K, Miwa K, Akazawa H, Naito AT, Sakata Y, Komuro I. Pirfenidone exhibits cardioprotective effects by regulating myocardial fibrosis and vascular permeability in pressure-overloaded hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309, H512-H522.

7. SAŽETAK

Pirfenidon je novi antifibrotski, antioksidativni i protuupalni lijek registriran za terapiju idiopatske plućne fibroze. Uz to pokazuje značajan terapijski potencijal u srčanom, bubrežnom i jetrenom tkivu, zbog čega se i dalje istražuje. Za dio antifibrotskog učinka odgovoran je i njegov glavni metabolit, 5-karboksipirfenidon.

Cilj rada bio je razviti selektivnu i osjetljivu analitičku metodu za istovremenu analizu pirfenidona i 5-karboksipirfenidona unutar matriksa složenog biološkog uzorka, desnog ventrikla štakora tretiranog pirfenidonom.

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti korištena je stacionarna faza Symmetry (Waters) C18 ($4,6 \times 150$ mm, $3,5 \mu\text{m}$) pri temperaturi 28°C . Ispitane su mobilne faze različitih omjera acetonitrila ili amonijevog formijata i vode. Isprobana je izokratna elucija i gradijentno ispiranje, kao i različite brzine protoka. Najpovoljnijom se pokazala izokratna elucija uz sastav $\text{ACN:H}_2\text{O:HCOOH} = 50:50:0,1\%$ i brzinu protoka $0,4 \text{ mL/min}$, pri čemu su vremena zadržavanja pirfenidona i 5-karboksipirfenidona iznosila $5,9$ i $4,3$ min.

Za detekciju su korištena tri detektora: DAD, FLD i MS. DAD je poslužio u preliminarnoj optimizaciji HPLC metode, no za analizu složenih bioloških uzoraka nije bio dovoljno osjetljiv. FLD je pokazao potencijal primjene u detekciji oba spoja, ali zahtijeva daljnju optimizaciju. MS detektorom su analiti selektivno i osjetljivo detektirani u prisustvu kompleksnog matriksa, korištenjem kromatograma izoliranih iona m/z 186 za pirfenidon i m/z 216 za karboksipirfenidon, a također je proučena i njihova MS^2 fragmentacija.

Paracetamol je odabran kao unutarnji standard na temelju povoljnog vremena zadržavanja ($3,85$ min) i svojstava (polarnosti i molekulske mase) bliskih analitima.

Za ekstrakciju analita isprobana su otapala čisti i 50%-tni acetonitril te čisti metanol. Također je dodatnom ekstrakcijom zaostalog taloga uzorka vodom provjerena učinkovitost navedenih otapala u izdvajanju polarnijeg 5-karboksipirfenidona. Utvrđeno je da je najbolje otapalo za pirfenidon metanol, dok je 50%-tni acetonitril također zadovoljavajuće ekstrakcijsko sredstvo. Za metabolit 5-karboksipirfenidon 50%-tni acetonitril je osigurao najveću ekstrakcijsku učinkovitost, a i metanol se pokazao prihvatljivim. Čisti acetonitril nije pogodno ekstrakcijsko sredstvo niti za jedan analit.

SUMMARY

Pirfenidone is a novel antifibrotic, antioxidative and antiinflammatory agent registered for the therapy of idiopathic pulmonary fibrosis. In addition, it shows significant therapeutic potential in heart, kidney and liver tissue, due to which it is still under research. Its main metabolite, 5-carboxypirfenidone, is also partially responsible for the total antifibrotic action.

The aim of the work was to develop a selective and sensitive method for the analysis of pirfenidone and 5-carboxypirfenidone within the matrix of a complex biological sample, right rat ventricle.

In High Performance Liquid Chromatography, a Symmetry (Waters) C18 (4.6×150 mm, $3.5 \mu\text{m}$) stationary phase was used, with the temperature of 28°C . Mobile phases of various acetonitrile or ammonium formate vs. water ratios were tested, along with isocratic and gradient elution and different flow rates. Isocratic elution by a mobile phase consisting of $\text{ACN:H}_2\text{O:HCOOH} = 50:50:0.1\%$ (V/V/V) at a 0.4 mL/min flow was chosen as best. The retention times of pirfenidone and 5-carboxypirfenidone under such conditions were 5.9 and 4.3 min, respectively.

For the detection, DAD, FLD and MS detectors were used. DAD was applied in the preliminary HPLC method optimisation, but proved insufficiently sensitive for the analysis of complex biological samples with low analyte concentrations. FLD showed a potential in detecting both compounds, although it requires further optimisation. MS detector enabled a selective and sensitive detection in the presence of a complex matrix by using Extracted Ion Chromatograms of m/z 186 for pirfenidone and 216 for 5-carboxypirfenidone. Also, their MS^2 fragmentations were studied.

Paracetamol was chosen as the internal standard due to its favourable retention time (3.85 min) and the characteristics (polarity and molar mass) similar to the analytes.

As extraction solvents, pure and 50% acetonitrile along with pure methanol were tested. An additional extraction of the residual precipitate with water was performed in order to check the efficiency of the aforementioned solvents for the extraction of the more polar 5-carboxypirfenidone metabolite. Pure methanol turned out to be the most favourable solvent choice for pirfenidone, while 50% acetonitrile was also satisfactory. 50% acetonitrile provided highest extraction yields for 5-carboxypirfenidone, although methanol also proved acceptable. However, pure acetonitrile was not a good extraction solvent for either of the analytes.

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

Analiza pirfenidona i njegovog metabolita u složenom biološkom uzorku HPLC-DAD-FLD-MS/MS metodom

Lu Turković

SAŽETAK

Pirfenidon je novi antifibrotski, antioksidativni i protuupalni lijek registriran za terapiju idiopatske plućne fibroze. Uz to pokazuje značajan terapijski potencijal u srčanom, bubrežnom i jetrenom tkivu, zbog čega se i dalje istražuje. Za dio antifibrotskog učinka odgovoran je i njegov glavni metabolit, 5-karboksipirfenidon.

Cilj rada bio je razviti selektivnu i osjetljivu analitičku metodu za istovremenu analizu pirfenidona i 5-karboksipirfenidona unutar matriksa složenog biološkog uzorka, desnog ventrikla štakora tretiranog pirfenidonom.

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti korištena je stacionarna faza Symmetry (Waters) C18 ($4,6 \times 150$ mm, $3,5 \mu\text{m}$) pri temperaturi 28°C . Ispitane su mobilne faze različitih omjera acetonitrila ili amonijevog formijata i vode. Isprobana je izokratna elucija i gradijentno ispiranje, kao i različite brzine protoka. Najpovoljnijom se pokazala izokratna elucija uz sastav $\text{ACN:H}_2\text{O:HCOOH} = 50:50:0,1\%$ i brzinu protoka $0,4 \text{ mL/min}$, pri čemu su vremena zadržavanja pirfenidona i 5-karboksipirfenidona iznosila 5,9 i 4,3 min.

Za detekciju su korištena tri detektora: DAD, FLD i MS. DAD je poslužio u preliminarnoj optimizaciji HPLC metode, no za analizu složenih bioloških uzoraka nije bio dovoljno osjetljiv. FLD je pokazao potencijal primjene u detekciji oba spoja, ali zahtijeva daljnju optimizaciju. MS detektorom su analiti selektivno i osjetljivo detektirani u prisustvu kompleksnog matriksa, korištenjem kromatograma izoliranih iona m/z 186 za pirfenidon i m/z 216 za karboksipirfenidon, a također je proučena i njihova MS^2 fragmentacija.

Paracetamol je odabran kao unutarnji standard na temelju povoljnog vremena zadržavanja (3,85 min) i svojstava (polarnosti i molekulske mase) bliskih analitima.

Za ekstrakciju analita isprobana su otapala čisti i 50%-tni acetonitril te čisti metanol. Također je dodatnom ekstrakcijom zaostalog taloga uzorka vodom provjerena učinkovitost navedenih otapala u izdvajanju polarnijeg 5-karboksipirfenidona. Utvrđeno je da je najbolje otapalo za pirfenidon metanol, dok je 50%-tni acetonitril također zadovoljavajuće ekstrakcijsko sredstvo. Za metabolit 5-karboksipirfenidon 50%-tni acetonitril je osigurao najveću ekstrakcijsku učinkovitost, a i metanol se pokazao prihvatljivim. Čisti acetonitril nije pogodno ekstrakcijsko sredstvo niti za jedan analit.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 47 grafičkih prikaza, 4 tablice i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: pirfenidon, 5-karboksipirfenidon, HPLC-DAD-FLD-MS/MS, bioanaliza

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

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

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

Dr. sc. Slaven Crnković

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

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

Analysis of pirfenidone and its metabolite in a complex biological sample by a HPLC-DAD-FLD-MS/MS method

Lu Turković

SUMMARY

Pirfenidone is a novel antifibrotic, antioxidative and antiinflammatory agent registered for the therapy of idiopathic pulmonary fibrosis. In addition, it shows significant therapeutic potential in heart, kidney and liver tissue, due to which it is still under research. Its main metabolite, 5-carboxypirfenidone, is also partially responsible for the total antifibrotic action.

The aim of the work was to develop a selective and sensitive method for the analysis of pirfenidone and 5-carboxypirfenidone within the matrix of a complex biological sample, right rat ventricle.

In High Performance Liquid Chromatography, a Symmetry (Waters) C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) stationary phase was used, with the temperature of 28 °C. Mobile phases of various acetonitrile or ammonium formate vs. water ratios were tested, along with isocratic and gradient elution and different flow rates. Isocratic elution by a mobile phase consisting of ACN:H₂O:HCOOH = 50:50:0.1% (V/V/V) at a 0.4 mL/min flow was chosen as best. The retention times of pirfenidone and 5-carboxypirfenidone under such conditions were 5.9 and 4.3 min, respectively.

For the detection, DAD, FLD and MS detectors were used. DAD was applied in the preliminary HPLC method optimisation, but proved insufficiently sensitive for the analysis of complex biological samples with low analyte concentrations. FLD showed a potential in detecting both compounds, although it requires further optimisation. MS detector enabled a selective and sensitive detection in the presence of a complex matrix by using Extracted Ion Chromatograms of *m/z* 186 for pirfenidone and 216 for 5-carboxypirfenidone. Also, their MS² fragmentations were studied.

Paracetamol was chosen as the internal standard due to its favourable retention time (3.85 min) and the characteristics (polarity and molar mass) similar to the analytes.

As extraction solvents, pure and 50% acetonitrile along with pure methanol were tested. An additional extraction of the residual precipitate with water was performed in order to check the efficiency of the aforementioned solvents for the extraction of the more polar 5-carboxypirfenidone metabolite. Pure methanol turned out to be the most favourable solvent choice for pirfenidone, while 50% acetonitrile was also satisfactory. 50% acetonitrile provided highest extraction yields for 5-carboxypirfenidone, although methanol also proved acceptable. However, pure acetonitrile was not a good extraction solvent for either of the analytes.

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

Thesis includes: 45 pages, 47 figures, 4 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pirfenidone, 5-carboxypirfenidone, HPLC-DAD-FLD-MS/MS, bioanalysis

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

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Slaven Crnković, Ph.D.

The thesis was accepted: July 2019.