

Identifikacija onečišćenja daptomicina primjenom dvodimenzionalne tekućinske kromatografije spregnute s masenim spektrometrom

Bukal, Vedrana

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:081310>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Vedrana Bukal

Identifikacija onečišćenja daptomicina primjenom dvodimenzionalne tekućinske
kromatografije spregnute s masenim spektrometrom

Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Ana Mornar Turk

Specijalistički rad obranjen je 29.rujna 2021. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Pred povjerenstvom u sastavu:

1. Biljana Nigović
2. Ana Mornar Turk
3. Maja Lusina Kregar

Rad ima _____ listova.

PREDGOVOR

Istraživanje je provedeno u okviru Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Eksperimentalni dio rada proveden je u Xellia d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

Ovim radom proširila sam svoje znanje i nadam se približila dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju analitičarima, te drugim stručnjacima i znanstvenicima koji se do sada nisu imali priliku susresti s navedenom tehnikom.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pristupačnosti, podršci i savjetima vezanim za izradu završnog rada.

Posebno se zahvaljujem kolegi Saši Grubišiću koji je bio velika podrška i pomoć pri izradi ovog rada te prenošenju i nesebičnom dijeljenju znanja i savjeta.

Hvala mami i tati koji su imali razumijevanja za moje želje o daljnjem usavršavanju te su preuzimali moje obaveze i bili potpora u svakom smislu te riječi.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

U ovom radu dan je pregled tehnike dvodimenzionalna tekućinska kromatografija.

Opisana je primjena dvodimenzionalne tekućinske kromatografije u identifikaciji onečišćenja u ljekovitim oblicima. Cilj rada bio je razviti metodu primjenom navedene tehnike za identifikaciju onečišćenja daptomicina u ljekovitim oblicima, a ista može biti primijenjena i za identifikaciju onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari.

Materijali/metode

Za identifikaciju onečišćenja daptomicina korišten je dvodimenzionalni tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s analizatorom masa Agilent 1290 Infinity II povezanim s detektorom masa Q-TOF MS, model 6545 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Analitička metoda korištena u prvoj dimenziji modificirana je prema literaturno dostupnim podacima kako bi se postiglo bolje razdvajanje kromatografskih pikova daptomicina i prisutnih onečišćenja. U drugoj dimenziji dužina i vrsta kolone, protok i gradijentni program su mijenjani sa svrhom poboljšanja selektivnosti metode. Parametri masenog spektrometra su optimirani direktnim unošenjem radnog standarda daptomicina koncentracije 0,2 mg/mL u instrument.

Teorijska pozadina s naglaskom na aktivnu modulaciju i obrnutofaznu kromatografiju istražena je koristeći znanstvene izvore: PubMed, Science Direct.

Rezultati

2D-LC/MS metoda razvijena je za identifikaciju onečišćenja daptomicina: lakton daptomicina, β -izomer daptomicina i anhidro-daptomicina. Kako bi se postigla prikladna selektivnost metode razvoj je započeo modifikacijom poznate metode koja je korištena u prvoj dimenziji. Razdvajanje analita provedeno je primjenom obrnutofazne kromatografske kolone (C8). Kromatografskim postupkom u prvoj dimenziji postignuto je zadovoljavajuće razdvajanje ispitanih onečišćenja te je druga dimenzija primijenjena za provjeru čistoće pikova onečišćenja. Za optimizaciju kromatografskog postupka u drugoj dimenziji korištene su također obrnutofazne kromatografske kolone (C18). Za „povezivanje“ dviju dimenzija korišten je prvo engl. *multi heart cutting* način rada. Međutim, utvrđeno je kako su svi „rezovi“ iz prve dimenzije bili „čisti“ odnosno nije došlo do preklapanja kromatografskih pikova osim u uzorku XEL540/02-17/032.

Kako bi se utvrdila čistoća navedenog kromatografskog pika primijenjeno je uzorkovanje u visokoj rezoluciji (engl. *High Resolution Sampling*) odnosno engl. *selective comprehensive 2D-LC* način rada. Primjenom ovog načina rada potvrđeno je preklapanje pikova onečišćenja β -izomera daptomicina i drugih strukturno sličnih onečišćenja u uzorku XEL540/02-17/032. Masenom spektrometrijom potvrđen je identitet onečišćenja daptomicina: lakton daptomicina, β -izomer daptomicina i anhidro-daptomicin u tri ispitana ljekovita oblika.

Zaključak

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija je napredna instrumentalna tehnika kojom je moguće razdvojiti sastavnice složenih uzoraka, pogotovo kada je moguće u potpunosti primijeniti ortogonalnost u separacijskim koracima i spregnuti je s masenim detektorom kako bi dodatno identificirali analit ili dobili više informacija o strukturi same molekule.

SUMMARY

Objectives

The objective of the research was to give the overview of two-dimensional liquid chromatography. This paper will present application of the two-dimensional liquid chromatography in identification of impurities in final dosage form containing daptomycin as active ingredient. The aim of the study was to develop a method using the above technique to identify daptomycin impurities in final dosage form, the same can be applied for the identification of impurities in active pharmaceutical ingredient.

Material and methods

For experimental work two-dimensional liquid chromatograph Agilent, 1290 Infinity II hyphenated with mass spectrometer Q-TOF MS, model 6545 was used.

Instrumental conditions for separation in first dimension was taken over from literature and optimized additionally with change of flow and gradient program introduction for better peak separation. In second dimension column length, flow and gradient program were investigated with the optimization purpose. Mass spectrometer instrumental parameters were optimized by injecting directly daptomycin working standard in concentration 0,2 mg/mL.

Theoretical background with accent on active modulation and reverse phase chromatography was studied using scientific sources: PubMed, Science Direct.

Results

2D-LC/MS method was developed for identification of daptomycin impurities: lactone daptomycin, β -isomer of daptomycin and anhydro-daptomycin. For development of first dimension chromatographic method previously published method was modified. Separation of selected analytes was performed using reversed phase column (C8). Satisfactory separation of all analytes was obtained using developed method. Therefore, the peak purity was evaluated using second dimensional chromatography. For optimization of chromatographic procedure reversed phase chromatography was (C18) used. Firstly, the *multi heart cutting* mode was used for connection of two dimensions. It was found that all cuts from first dimension were pure except those found in the sample XEL540/02-17/032.

Therefore, *High Resolution Sampling* or *selective comprehensive* 2D-LC mode was applied. Using this approach, co-elution of impurity daptomycin β -isomer and other daptomycin related impurities in the sample XEL540/02-17/032 was detected. Mass spectrometry was used for daptomycin impurity identification (lactone daptomycin, daptomycin β -isomer and anhydro-daptomycin) in investigated samples.

Conclusion

Two-dimensional liquid chromatography is a powerful technique for separation of components of interest, especially when it is possible to apply completely orthogonal approach in separation steps and hyphenated 2D-LC with mass spectrometer for further identification of analyte and for gathering the knowledge and more information about the molecule structure.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----|
| PREDGOVOR | III |
| SAŽETAK | IV |
| SUMMARY | VI |
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA | 1 |
| 1.1 Daptomicin ^(1,2) | 2 |
| 1.2 Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija..... | 3 |
| 1.2.1 Princip rada i svrha dvodimenzionalne tekućinske kromatografije..... | 5 |
| 1.2.1.1 Načini povezivanja ¹ D i ² D | 12 |
| 1.2.1.2 Količina analita koja se prenosi iz ¹ D u ² D | 13 |
| 1.2.1.3 Način prenošenja analita iz ¹ D u ² D - modulacija | 16 |
| 1.2.2 Princip rada masene spektrometrije..... | 23 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 25 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 26 |
| 3.1 Kemikalije, standardi i uzorci | 26 |
| 3.2 Laboratorijska oprema | 26 |
| 3.3 Priprema standardnih otopina i uzoraka | 27 |
| 3.4 2D-LC/MS metoda | 29 |
| 4. REZULTATI..... | 32 |
| 5. RASPRAVA..... | 52 |
| 6. ZAKLJUČCI | 55 |
| 7. LITERATURA | 56 |
| 7.1 Popis kratica | 59 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 60 |

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ubraja se u separacijske analitičke tehnike. Razdvajanje analita iz složenih uzorka postiže se na nekoliko načina prema kojima se tehnika dijeli na: kromatografiju obrnutih faza, kromatografiju normalnih faza, kromatografiju ionske izmjene, kromatografiju isključenjem, kromatografiju temeljenu na hidrofilnim interakcijama te kiralnu kromatografiju. Upravo stoga ne čudi da je ova tehnika prisutna u gotovo svim analitičkim laboratorijima, pa tako i u onima u farmaceutskoj industriji.

Izvanredna mogućnost razdvajanja analita iz složenih smjesa je razlog zbog kojeg se tehnika koristi za identifikaciju i određivanje procesnih i razgradnih onečišćenja kao i onečišćenja koja potječu od pomoćnih tvari i pakirnih materijala. Ukoliko se tehnika poveže s masenim spektrometrom moguće je i strukturno okarakterizirati prisutna onečišćenja.

Ipak, sve veći zahtjevi za kvalitetom farmaceutskih proizvoda zahtijevaju razlučivost veću od one koja se može postići primjenom jednodimenzionalne kromatografske tehnike. U svrhu rješavanja ovih složenih analitičkih problema koristi se tehnika dvodimenzionalne tekućinske kromatografije (engl. *Two-Dimensional Liquid Chromatography*, 2D-LC). Tehnika se zasniva na primjeni dva neovisna, u najpovoljnijim uvjetima, dva ortogonalna sustava za odvajanje tekućeg uzorka.

U ovom radu je opisana primjena 2D-LC tehnike u farmaceutskoj industriji te je dan naglasak na njenu iznimnu moć razdvajanja pred jednodimenzionalnim separacijskim tehnikama. U radu su istaknuti izazovi s kojima se analitičar može susreti tijekom razvoja 2D-LC metode te moguća rješenja istih.

1.1 Daptomicin^(1,2)

Daptomicin spada u kategoriju cikličkih lipopeptidnih antibiotika, a nastaje kao posljedica metabolizma bakterije *Streptomyces roseosporus*. Daptomicin posjeduje antimikrobno djelovanje protiv gram pozitivnih patogena, dok ne pokazuje utjecaj na gram negativne. Mehanizam djelovanja mu je prilično jedinstven te premda nije u potpunosti razjašnjen, poznato je da lipofilni dio molekule u prisutnosti kalcijevih iona prodire kroz bakterijsku membranu. Na ovaj način dolazi do depolarizacije i dezintergacije citoplazmatske membrane na način da se formiraju pore što uzrokuje izlazak citoplazme van stanice i na posljetku smrt bakterijske stanice. Daptomicin se najčešće primjenjuje u sljedećim indikacijama: ozbiljne kožne infekcije, infekcije kosti i zglobova i upale pluća. Zadržao je učinkovitost protiv multirezistentnih patogena poput *Staphylococcus aureus* (rezistentan na vankomicin i meticilin) te se nalazi u kategoriji antibiotika zadnje linije obrane od infekcija. Smatra se prikladnim odabirom u borbi protiv meticilin i vankomicin otpornih gram pozitivnih sojeva bakterija. Primjenjuje se intravenskim putem jednom dnevno. Na američkom tržištu se pojavljuje pod imenom Cubicin® Daptomicin za injekcije za intravensku primjenu (engl. *Daptomycin for Injection for Intravenous Use*), a registriran je i na europskom tržištu. Može se pronaći u dvije doze: 350 i 500 mg daptomicina.^(1,2)

Strukturu daptomicina čini 13 aminokiselinskih ostataka, lanac masne kiseline na *N*-terminalnom kraju, četiri kiselinska ostatka i bazični dio strukture koji potječe od aminokiseline ornitin. Peptid je cikličke strukture zbog esterske veze između treonina i kinurenina, a žutu boju ima zahvaljujući aminokiselinama s konjugiranim dvostrukim vezama triptofanu i kinureninu (Slika 1). Konstante disocijacije (pK_a vrijednosti) su sljedeće: 3,87, 4,26, 5,05 i 9,88. Daptomicin je dobro topljiv u vodi zbog kiselinskih dijelova ugrađenih u strukturu, a ujedno lipidni rep i bazični aminokiselinski ostatak mu daju karakteristike baze.

kromatografskih kolona ukoliko je broj analita veći od navedenog, dolazi do međusobnog preklapanja pikova analita ili preklapanja pikova analita s ostalim sastavnicama matrice uzorka.⁽⁵⁾

Upravo ova ograničenja tekućinske kromatografije usmjerila su istraživače u razvoj 2D-LC tehnike kod koje se frakcije s jedne kolone prenose na drugu na daljnje razdvajanje. Prvi dvodimenzionalni tekućinski kromatograf razvijen je 1978. godine. Međutim zbog brojnih ograničenja tehnika nije ušla u široku primjenu. Tek osamdesetih godina prošlog stoljeća Giddings i suradnici uveli su koncept dvodimenzionalnog/multidimenzionalnog razdvajanja na principu ortogonalnosti primijenjenih metoda koja se unapređuje i dan danas.⁽⁷⁾

Prema njihovoj definiciji, dvodimenzionalna tekućinska kromatografija je tehnika u kojoj se:

- (a) sastavnice uzorka razdvajaju u dva neovisna separacijska koraka,
- (b) sastavnice razdvojene u jednom separacijskom koraku ostaju razdvojene tijekom cijelog procesa razdvajanja.⁽⁷⁾

Potrebno je istaknuti kako je Giddings postavio i teorem o dimenzionalnosti uzorka, time je dimenzionalnost uzorka definirana kao broj potrebnih molekularnih blokova da bi se opisao sastav molekule. Na primjeru strukture surfaktanata objašnjava kako molekula može biti građena od dva bloka. Prvi blok podrazumijeva varijante u dužini i hidrofobnosti lanca masnih kiselina, dok drugi blok podrazumijeva razlike u broju nabijenih grupa. Prema teoremu, surfaktanti se sastoje od dva molekularna bloka i imaju dvije dimenzije te bi se mogli razdvojiti obrnuto-faznom tekućinskom kromatografijom (engl. *Reversed-Phase Liquid Chromatography*, RPLC) na temelju njihovih hidrofobnih interakcija te pomoću ionsko izmjenjivačke kromatografije (engl. *Ion exchange Chromatography*, IC) na temelju njihovog naboja.⁽⁶⁾

1.2.1 Princip rada i svrha dvodimenzionalne tekućinske kromatografije

Kao što je prije spomenuto svrha dvodimenzionalne tekućinske kromatografije je postići što bolje razdvajanje analita koje se temelji na različitom mehanizmu njihova zadržavanja na koloni u prvoj (¹D) i drugoj (²D) dimenziji. Različiti princip zadržavanja analita na koloni se naziva ortogonalnost i to je jedan od parametara koji se može izračunati zajedno s ukupnim brojem razdvojenih sastavnica uzorka (engl. *peak capacity*) i rezolucijom u kritičnom području kako bi se evaluirali dobiveni rezultati i sama metoda razdvajanja. Osim navedenog za usporedbu različitih metoda možemo evaluirati i faktor razrjeđenja što je bitan čimbenik jer može dovesti do gubitka osjetljivosti metode kao i smanjenje volumena injektiranja, utjecati na rezoluciju u drugoj dimenziji, vrijeme analize (ograničavajući čimbenik kod sveobuhvatne tekućinske kromatografije) i drugo. Važno je reći da instrumentalni parametri metode utječu na sve gore navedene parametre, a najčešće promjena jednog instrumentalnog parametra utječe na druge parametre. Različite skupine znanstvenika dizajnirale su različite algoritme za uspostavljanje optimalnih uvjeta metoda i posljedično računanje opisnih karakteristika kvalitete metode (engl. *quality descriptor*) posebno u području sveobuhvatne tekućinske kromatografije. ^(4,5,6)

Dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju moguće je podijeliti u sljedeće kategorije prema korištenim ortogonalnim tehnikama razdvajanja:

- RPLC - RPLC

Kao što je navedeno u preglednim znanstvenim radovima, kromatografija obrnutih faza je popularna metoda razdvajanja analita kako u prvoj, tako i u drugoj dimenziji. Više je činjenica koje dovode do konačnog odabira reverzno fazne kromatografije za obje dimenzije. ^(5,6,7,8)

Ortogonalnost razdvajanja je ovdje moguće postići odabirom različitih nepolarnih nepokretnih faza kolona koje uključuju razlike između funkcionalnih grupa koje su vezane na samu česticu nepokretne faze, veličinu čestice (najčešće od 1,6 μm do 5,0 μm) i površinu čestice koje mogu

biti cjelovite, sadržavati pore ili pak biti nabijene. Bitan je i način povezivanja čestica, to jest da li su funkcionalne grupe povezane u jednom sloju ili su pak povezane u više razgranatih slojeva, pa i razlika između silika čestica i kvarcnih čestica doprinosi selektivnosti.^(5,6)

Količina ugljika (engl. *carbon load*) se odnosi na udio ugljika vezanog na silika čestice. Općenito, što je veći udio ugljika to analit može ostvariti više hidrofobnih interakcija s nepokretnom fazom, duže se zadržati i posljedično bolje se razdvojiti od ostatka smjese. Ovisno o pH vrijednosti na kojoj se provodi analiza selektivnost može potjecati od samog procesa proizvodnje kolone, to jest da li su silanolni lanci na koje nisu vezane funkcionalne grupe zaštićeni (engl. *endcapped*) ili nezaštićeni (engl. *nonendcapped*) pa kod pH vrijednosti od 7 i viših mogu stupati u interakcije s bazičnim analitima zbog svog negativnog naboja. Ovakve elektrostatske interakcije najčešće utječu na izgled pika (engl. *peak shape*) i zadržavanje analita na nepokretnoj fazi. Utjecaj zaštite silanolnih grupa neće biti vidljiv niti kod bazičnih niti kiselih analita pri niskim pH vrijednostima pokretne faze jer silanolne grupe nisu nabijene.^(9,10)

Najčešći primijeri funkcionalnih grupa uključuju C 18 lance vezane na silika čestice nepokretne faze, C8 lance, fenilne grupe, amino grupe, cijano grupe, nepolarne komponente dodane između čestica i funkcionalnih grupa.

Pokretna faza može naglasiti, prilagoditi ili poništiti mehanizam zadržavanja analita s nepokretnom fazom. Ortogonalnost je moguće postići odabirom različitih pokretnih faza, različitih pH vrijednosti iste pokretne faze, različitim omjerima vode i organskog otapala, upotrebom soli ili raznih modulatora pH vrijednosti. Jedan od najboljih pokazatelja kako je moguće poništiti interakcije analita i nepokretne faze je upotreba acetonitrila ili tetrahidrofurana s kolonom koja sadrži fenilne ili pentafluorofenilne funkcionalne grupe. Tako su π - π interakcije između aromatskih analita i kolone oslabljene ili poništene. Moguće je zaključiti da je odabir pokretne faze također jedan od ključnih čimbenika razdvajanja koji utječe na eluciju analita i time doprinosi ortogonalnosti obrnuto fazne kromatografije.⁽⁶⁾

Ponekad i promjenom temperature kolone moguće je promijeniti selektivnost metode te izazvati drugačiji redoslijed elucije analita. Izrazita prednost obrnuto fazne kromatografije je što brzo dolazi do uspostavljanja ravnoteže između nepokretne i pokretne faze, posljedično nije potrebno dugo kondicionirati kolonu, a zbog svega toga moguće je primijeniti brze gradijente. Metode se razvijaju na način da gradijent na početku sadrži puno vodene faze, te da se njezin udio smanjuje gotovo do 100 % organskog sadržaja. Pokretne faze namijenjene za obrnuto faznu kromatografiju su prikladne za daljnju analizu masenim spektrometrom što dodatno povećava mogućnost identifikacije i strukture karakterizacije analita.^(5,6,11)

- SEC – RPLC

Razdvajanje analita temeljeno na različitim molekularnim masama (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) svoju primjenu prvenstveno nalazi na polju bioloških lijekova. Princip razdvajanja se temelji na različitom vremenu putovanja velikih, srednjih i malih molekula. Najveće molekule prolaze najkraći put kroz kolonu i prve dolaze do detektora, dok one najmanje prolaze najveći put i posljednje eluiraju s kolone. Ova tehnika razdvajanja je najpogodnija za razdvajanje sastavnica s velikom razlikom u masi, te se često koristi za razdvajanje proteina. Zanimljivo je što nema steričkih interakcija analita i nepokretne faze zbog visokog sadržaja soli u pokretnim fazama. Kod ove kromatografije elucije su uglavnom izokratnog tipa.^(6,12)

Obrnuto fazna kromatografija je bazirana na hidrofobnim interakcijama analita, te ove dvije tehnike zajedno pružaju veliku ortogonalnost i posljedično razdvajanje analita koje s primjenom samo jedne od navedene tehnike ne bi bilo moguće. Vrlo često se u ovoj kombinaciji separacijskih metoda obrnuto fazna kromatografija koristi za odsoljavanje pokretne faze kao priprema uzorka za MS analizu.⁽¹²⁾

- IC – RPLC

Ionskoizmjenjivačka kromatografija (engl. *Ion exchange Chromatography*, IC) se temelji na razdvajanju analita suprotnog naboja nepokretne faze. Mehanizam razdvajanja moguće je podijeliti u dvije glavne kategorije. U prvu kategoriju spadaju nepokretne faze koje su nabijene te stvaraju ionske veze s analitima koje želimo zadržati na koloni. Elucija analita se najčešće provodi gradijentnim načinom. Povećavanjem koncentracije soli u pokretnoj fazi dolazi do otpuštanja analita s nepokretne faze. U drugu kategoriju ubrajaju se kolone s kojih se elucija analita potiče promjenom pH vrijednosti pokretne faze pri čemu dolazi do promjene u naboju kolone ili analita, te posljedično dolazi do otpuštanja analita s kolone. Najčešće se ionska izmjena koristi kao metoda razdvajanja u prvoj dimenziji zbog dugog vremena potrebnog za kondicioniranje kolone. Sama separacijska tehnika daje dobru ortogonalnost s obrnuto faznom kromatografijom. Princip razdvajanja u prvoj dimenziji se razlikuje od principa razdvajanja u drugoj dimenziji. Uzorak nanesen na drugu dimenziju sadrži sol koja se može isprati i uzorak se može učiniti prikladnim za analize masenim spektrometrom, a kombinacija ove dvije separacijske tehnike se najčešće koristi kod razdvajanja bioloških lijekova/proteina i boja.^(6,12, 13)

- HILIC - RPLC

HILIC (engl. *Hydrophilic interaction liquid chromatography*) princip razdvajanja se temelji na polarnim i hidrofilnim interakcijama analita s nepokretnom fazom čiji mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, dok je pokretna faza slična pokretnoj fazi u obrnuto faznoj kromatografiji. Nepokretne faze u HILIC kromatografiji mogu biti bazirane na smolama, silici ili modificiranoj silici. Tako Buszewski i Noga zaključuju da su strukturne razlike u nepokretnim fazama HILIC kolona veće nego kod kolona za obrnuto faznu kromatografiju.⁽¹⁴⁾ Tu se nepokretne faze mogu podijeliti u tri kategorije: neutralne, polarne i nepokretne faze nabijene površine. HILIC kromatografija može biti pogodna za razdvajanje nabijenih, jako

hidrofilnih ili ujedno hidrofilnih i hidrofobnih molekula (amfifilnih) molekula. Gradijent počinje s velikim udjelom organske faze i malim polarnog otapala, te se udio polarnog otapala povećava kroz vrijeme. Kod kombinacije ove dvije tehnike, izazov predstavlja veliki udio organske faze kod HILIC razdvajanja jer se uzorak potencijalno slabo zadržava na obrnuto faznim nepokretnim fazama. Pokretna faza iz prve dimenzije čije su frakcije prenesene na drugu dimenziju je izrazito jak eluent za drugu dimenziju te uz kratko zadržavanje analita na koloni, može doći do pojave asimetričnih pikova, cijepanja pikova i loše rezolucije. Za ovu kombinaciju se preporuča „*off-line*“ primjena gdje se uzorak iz prve dimenzije može dodatno pročistiti prije unošenja na drugu dimenziju ili privremeno spremanje analita na koloni za hvatanje izrezane frakcije i njegovo ispiranje prikladnim otapalom prije unosa u drugu dimenziju.^(8,14)

Od ostalih kromatografskih tehnika imamo afinitetnu kromatografiju koja se najčešće primjenjuje kod razdvajanja proteina i smatra se najselektivnijom kromatografskom tehnikom. Nepokretna faza je ligand koji se specifično veže na određeno mjesto na analitu po principu „ključ-brava“. Normalno fazna kromatografija (engl. *Normal Phase Chromatography*, NP-LC) je metoda razdvajanja gdje je nepokretna faza polarna a pokretna faza jako nepolarna (npr. heksan). Razdvajanje analita iz smjese se vrši na temelju polarnih interakcija kolone i analita.⁽⁵⁾ U nazad nekoliko godina pojavila se popularna superkrična kromatografija (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC). Ova tehnika razdvajanja koristi pokretne faze na temelju CO₂ u koji se dodaju razni organski modifikatori. Pogodna je za razdvajanje nepolarnih i polarnih molekula malih molarnih masa.⁽⁶⁾ Važno je spomenuti i kiralnu kromatografiju koja se najčešće odvija u izokratnom modu, te se koristi za razdvajanje izomera.^(5,15) Često u primjeni je i takozvana kromatografija ionskog sparivanja (engl. *ion pairing*) gdje se modifikatori dodaju u pokretne faze, te se vezuju ili na analit ili na nepokretnu fazu.^(14,16)

Pregled mehanizama zadržavanja analita na nepokretnoj fazi prilikom upotrebe raznih kromatografskih tehnika razdvajanja je prikazan u Tablica 1. Pregled mehanizama zadržavanja analita na nepokretnim fazama raznovrsnih kromatografskih tehnika.⁽⁶⁾

Tablica 1. Pregled mehanizama zadržavanja analita na nepokretnim fazama raznovrsnih kromatografskih tehnika.⁽⁶⁾

| Kromatografske tehnike razdvajanja | Skraćenica | Mehanizam selektivnog zadržavanja na koloni | Sastav nepokretne faze |
|--------------------------------------|---------------------------|--|--|
| Obrnuta faza | RP | - hidrofobnost - dužina lanca - količina ugljika engl. carbon load | - alkilne skupine (od C1 do C30 lanci, najčešće C18) - cijano grupe (π - π) - fenilne grupe (π - π) - ugljik presvučen cirkonijem (ili grafitom) - PEG |
| Ionsko sparivanje | IP | - hidrofobnost - onemogućuje se ionizacija analita dodatkom kiseline/lužine u pokretnu fazu | - alkilne skupine |
| Hidrofobne interakcije | HIC | - hidrofobnost | - kratki lanci alkilnih skupina (C4 do C8) |
| Normalna faza | NP | - polarne interakcije funkcionalne grupe | - silika čestice, amino-propilne skupine, diolne i cijano skupine |
| Hidrofilne interakcije | HILIC | - hidrofilnost - polarne interakcije analita | - nabijene: zwitterioni (sulfobetain, fosfokolin) - bazične: aminopropil - neutralne: dioli, amidi |
| Agregacija | AgLC | - cis-trans izomeri | - silika s ionima srebra, IEC kolone (npr. sulfonska kiselina) |
| Ionska izmjena | IC | - naboj - ionske interakcije | - sulfonska kiselina, karboksilne kiseline, trietil amin, kvaterni amin |
| Razdvajanje prema masi molekule | SEC | - veličina molekule - molekularna masa | - umreženi polimeri (stiren-divenil benzen) i drugi |
| Miješani model | MM | - kombinacija različitih mehanizama | - anionska izmjena - kationska izmjena - drugo |
| Kiralno razdvajanje | Kiralna kromatografija | - svojstvo kiralnosti molekule | - većina nepokretnih faza sadrži derivate polisaharida |
| Afinitet jedne molekule prema drugoj | Afinitetna kromatografija | - svojstvo specifičnosti molekule za drugu molekulu | - nepokretna faza s kemijski vezanim proteinom ili antigenom |

1.2.1.1 Načini povezivanja 1D i 2D

Obzirom na način povezivanja prve i druge dimenzije u kojima se vrši razdvajanje analita, dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju možemo podijeliti na^(5,7,8):

- „off-line“
- „on-line“

„Off-line“ princip rada podrazumijeva razdvajanje sastavnica na 1D , te ručnu izolaciju, skupljanje i skladištenje frakcija od interesa prije unosa u 2D . Nakon skupljanja/skladištenja frakcija, one se zasebno ponovno unose u 2D na daljnje razdvajanje.

Prednosti „off-line“ sustava su jednostavno rukovanje instrumentom i računalnim programom, te velika fleksibilnost pri odabiru principa razdvajanja u drugoj dimenziji jer postoji opcija ručnog pročišćavanja uzorka prije unosa u drugu dimenziju i na taj način se izbjegava nekompatibilnost pokretnih faza u prvoj i drugoj dimenziji. Glavni nedostaci su što je znatno sporiji način od automatskog sakupljanja frakcija, postoji veliki rizik od gubitka uzorka iz prve dimenzije, može doći do njegove razgradnje ili kontaminacije prilikom ručnog pročišćavanja, te potencijalni unos prevelike koncentracije uzorka u drugu dimenziju.⁽⁴⁾ Međutim i danas se pojedini istraživači odlučuju za njenu primjenu, pogotovo u kombinaciji s HILIC analizama gdje se eluent iz prve dimenzije može u potpunosti ukloniti i uzorak učiniti prikladnim za daljnju analizu. Nadalje, potrebno je istaknuti i ekonomsku isplativost budući te je instrumentacija jednostavnija i jeftinija.^(4,17)

„On-line“ princip rada podrazumijeva razdvajanje sastavnica na 1D , te njen neprekidan i automatiziran unos na 2D . Spoj prve i druge dimenzije je jako bitan dio samog sustava, te postoji nekoliko tehničkih rješenja kako spojiti dvije dimenzije i ujedno riješiti izazove koji se mogu javiti prilikom analiza.

Online sustavi su brži, automatizirani, te postoji manja prijetnja od gubitka uzorka.

Glavni nedostatak ovog načina rada je složen spoj dimenzija (tvz. modulacija) i programska rješenja za upravljanje. Često može doći do nekompatibilnosti otopina dvaju dimenzija koje pak utječe na samo razdvajanje analita, te podešenje optimalnih instrumentalnih parametara analize.

„On-line“ 2D-LC je danas više zastupljen zbog manjeg utroška vremena za analizu i drugih prednosti.

1.2.1.2 Količina analita koja se prenosi iz 1D u 2D

Ovisno o prenesenoj količini analita iz prve u drugu dimenziju, dvodimenzionalna tekućinska kromatografija se može podijeliti na „*heart cutting*“ (LC-LC) i sveobuhvatnu „*comprehensive*“ (LC x LC) kromatografiju.

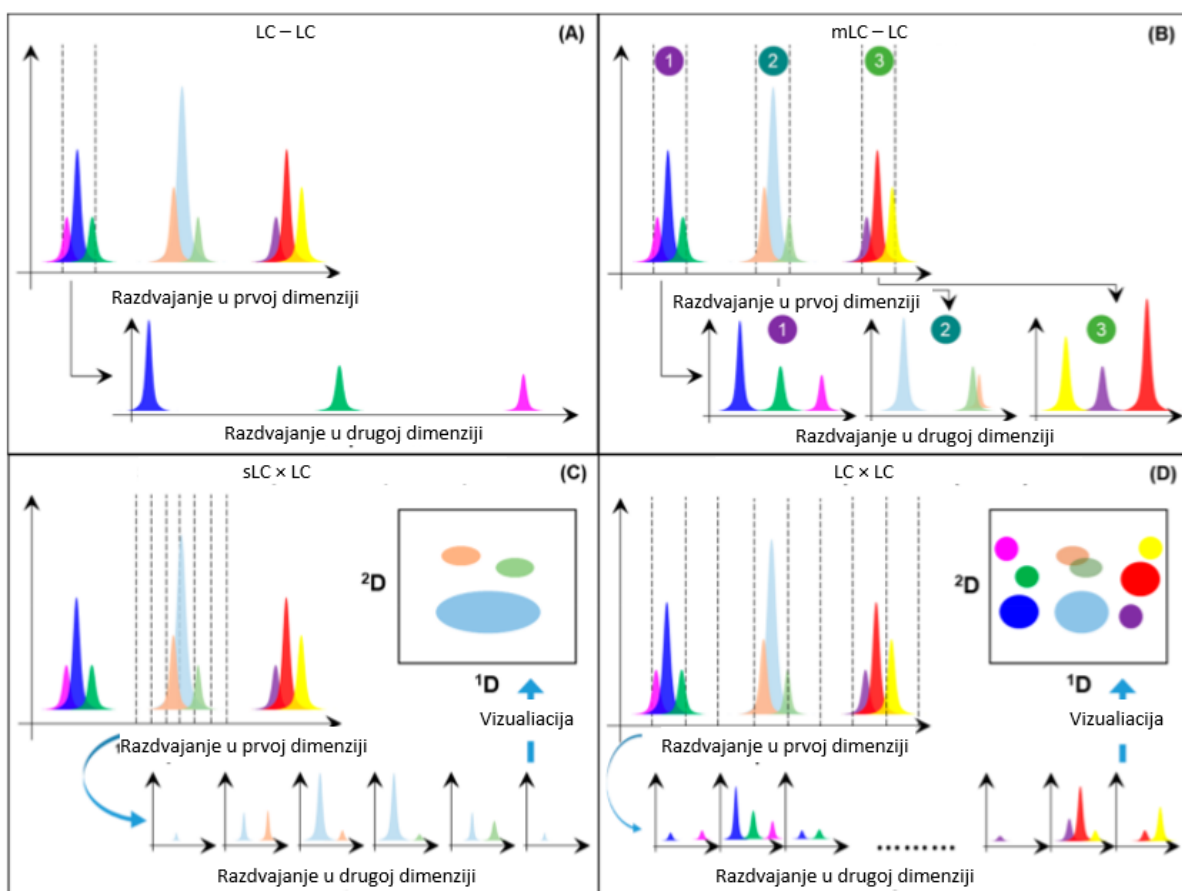
Sveobuhvatna tekućinska kromatografija (LC x LC) podrazumijeva analizu svih frakcija prve dimenzije u drugoj dimenziji s tim da razdvajanje iz prve dimenzije mora biti zadržano i u drugoj. Kapacitet razdvajanja ove metode je jako velik te se sama tehnika razdvajanja najčešće koristi za analize složenih smjesa (Slika 2D).⁽⁵⁾

Princip „*heart cutting*“ rada (LC-LC) se temelji na tome da je određena količina/volumen analita izrezan iz prve dimenzije i prenesen na kolonu druge dimenzije. Volumen koji se unosi na drugu dimenziju može biti vremenski određen na način da se pik uzorkuje u određenom vremenskom okviru ili uzorkovanje može biti potaknuto detekcijom pika u prvoj dimenziji. U tradicionalnom shvaćanju „*heart cutting*“ moda rada, samo jedna frakcija iz prve dimenzije se prenosi u drugu. Nakon „*rezanja*“ frakcija s analitom se puni u petlju (engl. *storage loop*) ili parkirno mjesto za spremanje frakcije. Prijenos analita na drugu dimenziju pokreće gradijentni program za razdvajanje sastavnica u drugoj dimenziji (Slika 2A).^(5,7,8)

Ovaj način rada je našao svoju primjenu između ostalog i u farmaceutskoj industriji te predstavlja korisni alat za izdvajanje analita iz složene smjese u svrhu daljnje identifikacije, rješava

problema ko-elucije dvaju ili više pikova, služi za pročišćavanje pika od interesa od matriksa uzorka, ukoncentriravanje željenog analita ili pak rješavanja pitanja nekompatibilnosti pokretne faze iz prve dimenzije s masenim spektrometrom. Ovaj način rada primjenjuje se u odsoljavanju pokretne faze kod analize bioloških lijekova koja u prvoj dimenziji sadrži puno soli te je nekompatibilna za daljnju analizu masenim spektrometrom.^(5,12)

Na ovaj način čistoća pikova svake metode koja se rutinski primjenjuje u laboratorijima za kontrolu kvalitete može biti dodatno ispitana.



Slika 2. Shematski prikaz načina rada 2D kromatografije s obzirom na količinu analita koji se prenosi iz prve u drugu dimenziju.

Vrlo često se u praksi koristi i kombinacija ovih dvaju tehnika, a te hibridne kombinacije imaju naziv mnogostruki *heart cutting* (engl. *multiple heart cutting*) (mLC - LC) (Slika 2B), te selektivna sveobuhvatna kromatografija (sLC x LC), (Slika 2C).

Na slici 2B je prikazano kako se više razdvojenih frakcija iz prve dimenzije izdvaja i po jedan rez upućuje na drugu dimenziju. Ukupno iz prve dimenzije je uzeto više od jednog reza, a pristup se koristi kada želimo izdvojiti i dodatno pročistiti nekoliko sastavnica u uzorku. Prednost ovog načina rada je što se frakcije iz ¹D mogu neprekidno sakupljati dok istovremeno u drugoj dimenziji provodimo razdvajanje već sakupljenih frakcija.

Vodeći nedostatak tradicionalnog i višestrukog „*heart cutting*“ načina rada je mogućnost ponovnog miješanja već razdvojenih sastavnica ukoliko se izrezuju bilo velike vremenske frakcije iz ¹D ili veliki volumen koji obuhvaća više razdvojenih pikova. Ova pojava se naziva poduzorkovanje (engl. *undersampling*). Kod „*heart cutting*“ načina rada za jedan rez u prvoj dimenziji dobiva se jedan kromatogram u drugoj dimenziji.^(4,5)

Navedenim izazovima je doskočeno sa selektivnom sveobuhvatnom kromatografijom gdje su izrezane frakcije iz prve dimenzije manje i frakcije se do trenutka analize spremaju u više različitih petlja/parkirnih mjesta, te nema bojazni od miješanja već razdvojenih frakcija iz prve dimenzije. Slika 2C prikazuje sakupljanje frakcija šireg vremenskog okvira iz prve dimenzije, njihovo spremanje u različite petlje/parkirna mjesta do trenutka analize i analizu na drugoj dimenziji. Tako iz jednog sakupljenog područja/pika u prvoj dimenziji dobijemo više kromatograma u drugoj dimenziji.^(4,5)

U znanstvenim radovima je moguće naći vrlo inovativne primjene jedne i druge tehnike, pa tako Qiao i suradnici navode u svom radu kako je „*heart cutting*“ bio korišten za izrezivanje pet glavnih pikova iz prve dimenzije kako bi se lakše u drugoj dimenziji sa sveobuhvatnom kromatografijom mogli razdvojiti i identificirati pikovi onečišćenja.⁽⁷⁾

Općenito „*heart cutting*“ pristup je više prikladan za ispitivanje manjeg broja analita. Kod primjena u kojima želimo saznati što više o uzorku ili se ispituje složen uzorak sveobuhvatna kromatografija je bolji odabir.

Eksperimentalni dio ovog rada bit će usmjeren na primjenu višestrukog „*heart cutting*“ načina rada.

Tablica 2 - Prednosti i nedostaci „*heart cutting*“ tehnike.⁽⁵⁾

| Prednosti | Nedostaci |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Vrlo visoka moć razdvajanja • Dodatna selektivnost zbog ortogonalnosti druge dimenzije • Odabir različitih ortogonalnih metoda • Dodatno pročišćavanje ili procjena čistoće analita od interesa • Smanjena nesigurnost identifikacije analita (u usporedbi s HPLC) • Kompatibilnost s MS detektorom | <ul style="list-style-type: none"> • Složena instrumentacija i računalni program • Dugo vrijeme trajanja analize (puno frakcija za analizu u drugoj dimenziji) • Smanjena osjetljivost zbog uzastopnog razrjeđivanja uzorka • Nekompatibilnost pokretnih faza • Zahtjevan razvoj metode |

1.2.1.3 Način prenošenja analita iz ¹D u ²D - modulacija

Središnji dio svakog 2D-LC sustava je međuspoj prve (¹D) i druge dimenzije (²D). Međuspoj ima funkciju prijenosa frakcije eluata prve dimenzije u drugu dimenziju. Za prenošenje analita između dimenzija kod „off-line“ uređaja najčešće se koristi sljedeće:

- Ručni prijenos u sustav
- Automatski prijenos izoliranog analita injektorom iz druge dimenzije

U ovom radu korišten je „on-line“ 2D-LC sustav te su i detaljnije objašnjene mogućnosti automatiziranog prijenosa analita iz prve u drugu dimenziju i njihova podjela.

1.2.1.3.1 *Direktan prijenos analita iz prve u drugu dimenziju – pasivna modulacija*

Direktan prijenos analita se prvenstveno koristi kod *heart cutting* kromatografije u izvedbi s mogućim šesterokanalnim, osmerokanalnim i deseterokanalnim ventilom spojenim na dvije identične petlje/parkirna mjesta za spremanje analita. Dok jedna od petlji uzorkuje analit iz prve dimenzije, sadržaj druge petlje se unosi u drugu dimenziju bez ikakve daljnje pripreme i obrade analita.

Kod višestruke „*heart cutting*“ kromatografije umjesto dvije petlje za spremanje eluenta iz prve dimenzije, možemo imati katove (engl. *decks*) od kojih svaki kat sadrži više petlji za spremanje analita što pak omogućuje uzorkovanje više frakcija iz jedne analize. Pasivna modulacija predstavlja prvi automatizirani način prijenosa analita iz jedne u drugu dimenziju koji dobro funkcionira kod primjene izokratnih elucija gdje se frakcija prve dimenzije prenosi i zadržava na početku kolone druge dimenzije, dok se vraćanjem ventila u prvobitni položaj pokreće separacija na drugoj dimenziji. Razvojem metoda s gradijentnom elucijom dolazilo je do izazova u analizama te pronalaženju optimalnih uvjeta zadržavanja analita na početku kolone druge dimenzije.

Način na koji se dvije separacijske dimenzije kombiniraju je jako bitan. Glavni izazovi koji se javljaju kod primjene pasivne modulacije je nekompatibilnost eluenta 1D s odabirom kromatografske tehnike razdvajanja u 2D . Može se dogoditi da eluent 1D utječe na separaciju u 2D . Krajnji slučaj je da se eluent 1D ne otapa u otapalima korištenim u 2D , na primjer da su pokretne faze potpuno nemješljive. Nadalje, zbog velike razlike u viskoznosti otapala dviju dimenzija može doći do nestabilnosti protoka, pojava se zove engl. *viscous fingering*. Pokretna faza druge dimenzije male viskoznosti prodire kroz stupac unesene otopine visoke viskoznosti u obliku stošca te uzrokuje deformaciju pikova u drugoj dimenziji. Međutim, navedena pojava je jako rijetka.^(5,6)

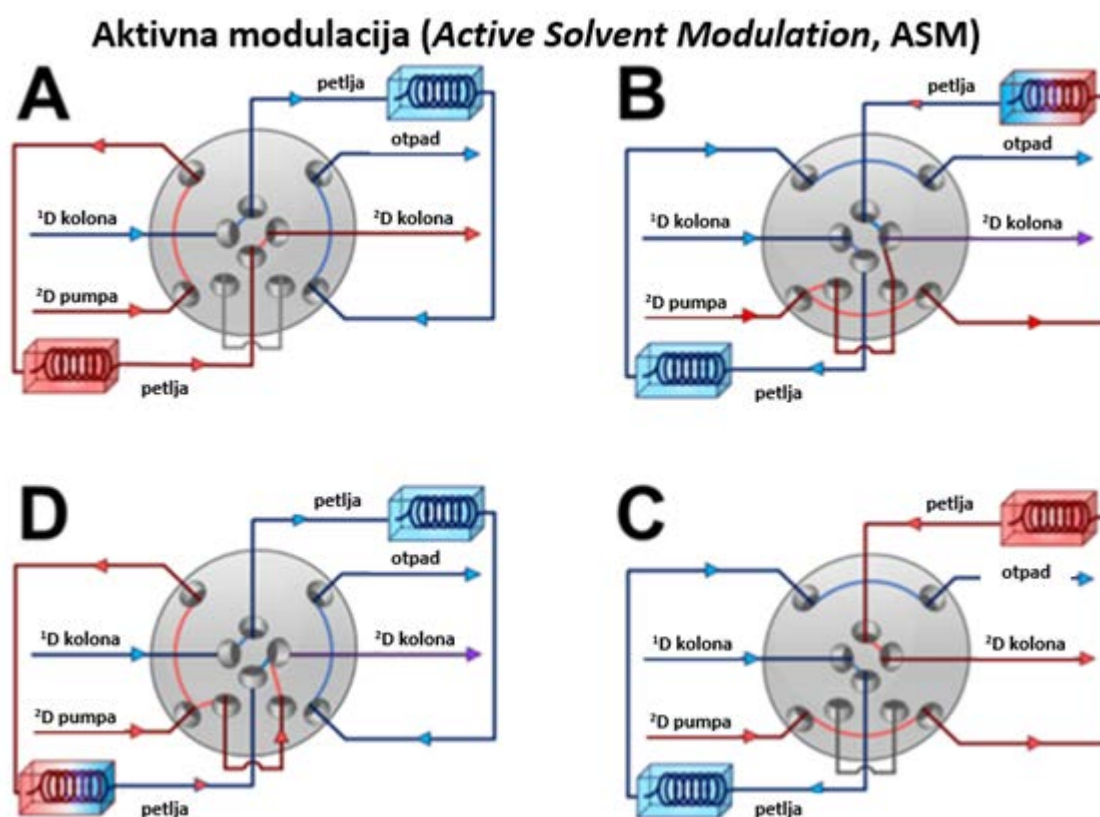
Češće dolazi do situacija gdje zbog različitih elucijskih moći pokretnih faza (engl. *solvent strength mismatch*) može doći do prekratkog zadržavanja analita od interesa na koloni ²D, pikovi se mogu deformirati, pa i doći do njihovog cijepanja. Na primjer, ako eluent ¹D sadrži puno acetonitrila (jako elucijsko otapalo), a početni sastav pokretne faze ²D sadrži mali udio acetonitrila, predviđeni mehanizam zadržavanja na drugoj dimenziji će biti narušen. Primjer ovog problema naročito dolazi do izražaja kod kombinacije SEC kromatografije i kromatografije obrnutih faza. Ukoliko unutar prenesenog uzorka na ²D prevladava veći udio organskog otapala polarni analiti se neće zadržavati na koloni te će izaći u “mrtvom” volumenu, odnosno na samom početku kromatograma druge dimenzije (engl. *breakthrough effect*).^(5,6) Također, ako se u ¹D koristi ionska kromatografija s pokretnom fazom koja sadrži natrijevu lužinu, a u ²D kromatografija obrnutih faza, natrijeva lužina može uništiti kolonu druge dimenzije, ispirući s kolone C₁₈ lance.

Kako bi se doskočilo svim navedenim izazovima razvili su se različito konstruirani instrumenti s ciljem da eluent prve dimenzije ili ispitivani analit učine više prikladnim za analizu na drugoj dimenziji.

Kada se uzorak iz prve dimenzije na bilo koji način „on-line“ prilagodi za danju analizu, govorimo o aktivnoj modulaciji.

1.2.1.3.2 *Privremeno spremanje analita u petlje/parkirno mjesto za spremanje frakcije do trenutka unosa uz podešenje elucijske moći eluenta iz prve dimenzije – Aktivna modulacija otapala (engl. Active Solvent Modulation, ASM)*

Postoje dvije glavne vrste instrumentalne izvedbe ovog tipa modulacije, u oba slučaja na centralni ventil su dodana dva dodatna ulaza s kapilaram kao i dva dodatna rotacijska položaja ventila. U prvom slučaju eluent prve dimenzije prolazi kroz jednu petlju, dok pokretna faza druge dimenzije prolazi kroz drugu, simetričnu petlju, te se sakupljeni eluent iz prve dimenzije unosi na kolonu druge dimenzije zajedno s pokretnom fazom druge dimenzije koja uzorak čini više prikladnim za analizu (Slika 3A i 3C).^(5,8)



Slika 3. Shematski prikaz aktivne modulacije otapala - ASM

U drugoj vrsti izvedbe protok iz druge dimenzije se dijeli na dva dijela. Jedan dio protoka prolazi kroz petlju, dok je drugi dio zaobilazi. Dio protoka druge dimenzije koji prolazi kroz petlju se miješa sa sakupljenom frakcijom iz prve dimenzije i čini uzorak prikladnim za analizu (Slika 3B i 3D).

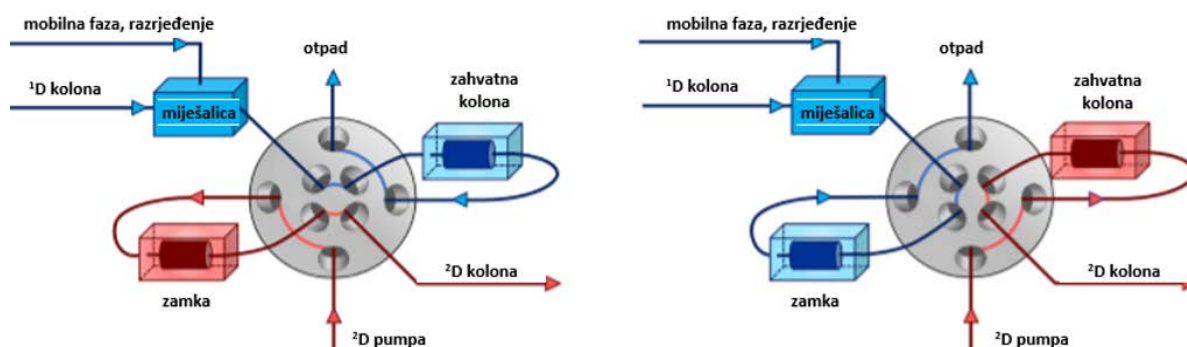
Korištenje ASM modula za razrjeđenje uzorka prve dimenzije pokretnom fazom druge dimenzije učinkovito može riješiti problem nekompatibilnosti pokretnih faza. Komercijalno se

moгу kupiti kapilare različite dužine i tako dobiti drugačiji omjeri uzorka i eluenta iz druge dimenzije, te optimirati metodu i uzorak učiniti prikladnijim za analizu na drugoj dimenziji smanjujući na primijer njegovu elucijsku moć.^(5,8)

1.2.1.3.3 *Privremeno spremanje analita na koloni za hvatanje izrezane frakcije do trenutka unosa uz ispiranje/koncentriranje uzorka (engl. Stationary Phase Assisted Modulation, SPAM) – Modulacija potpomognuta nepokretnom fazom*

Ukoliko se petlje za hvatanje analita zamijene s kolonama za hvatanje analita govorimo o modulaciji potpomognutoj nepokretnom fazom. Odabir kolone za hvatanje analita (engl. *trapping columns*) ovisi o strukturi i svojstvima ispitivanog analita, te o pokretnim fazama dviju dimenzija. Kolone za hvatanje analita su malog volumena, u praksi se često koriste predkolone slične nepokretno faze kao kolona u drugoj dimenziji, a njihova prednost je što se uzorak može ukoncentrirati i matrica uzorka se može ispirati. Navedene prednosti doprinose manjim izazovima kod unosa u drugoj dimenziji kao i boljoj osjetljivosti metode.^(5,8,13)

Aktivna modulacija (Stationary-Phase-Assisted Modulation, SPAM)



Slika 4. Shematski prikaz aktivne modulacije posredovane nepokretnom fazom - SPAM

Eluent prve dimenzije prolazi kroz kolonu i izlazi iz sustava, dok se uzorak zadržava na koloni za hvatanje. Nakon zakretanja ventila, kreće protok pokretne faze iz druge dimenzije u

gradijentnom načinu elucije i uhvaćeni analiti vidljivi su kao oštri pikovi u drugoj dimenziji. Međutim, izazovno je pronaći ravnotežu između dobrog zadržavanja ispitivanih analita i njegove elucije s kolone za privremeno spremanje, pa tako se prije ulaza na kolonu za hvatanje eluent iz prve dimenzije razrjeđuje pomoću dodatnog miksera kako bi mu se smanjila elucijska snaga i kako bi ostao zadržan na koloni za hvatanje. Prednosti ovog načina hvatanja uzorka su: unaprijeđena kompatibilnost uzorka s drugom dimenzijom zbog ispiranja eluenta iz prve dimenzije, osjetljivost metode može biti poboljšanja ako se pribjegne ukoncentriravanju uzorka na koloni za hvatanje, ukupno se mogu prenijeti manji volumeni na drugu dimenziju što omogućuje korištenje kraćih analitičkih kolona bez gubitka učinkovitosti, što posljedično dovodi do smanjenja vremena analize.^(5,8,13)

Međutim, postavlja se pitanje da li su svi željeni analiti iz prve dimenzije uistinu zadržani na koloni za hvatanje, pogotovo ukoliko imamo strukturno različite analite u jednoj frakciji. U ovom slučaju, uvjeti razrjeđenja za eluent prve dimenzije moraju biti prikladni za sve ispitivane analite.

1.2.1.3.4 Ostali tipovi aktivne modulacije

Modulacija potpomognuta evaporacijom pomoću vakuma (engl. *Vacuum-Evaporation modulation*, VEM).

Kod ovog načina prilagodbe uzorka za unos u drugu dimenziju eluent iz prve dimenzije pod utjecajem vakuma i temperature evaporira u petlji za privremeno čuvanje uzorka, dok analit od interesa ostane istaložen na stijenakama petlje. Kod sljedećeg zakretanja ventila, eluent iz druge dimenzije ulazi u petlju za privremeno čuvanje, otapa uzorak i odnosi ga do ulaza u kolonu druge dimenzije. Ovaj način prilagodbe uzorka je razvijen prvenstveno za normalno fazne kromatografije u prvoj dimenziji kod kojih se kao pokretna faza koriste otapala s niskim tlakom para koji posljedično lako odparavaju, a iza kojih slijedi obrnuto fazna kromatografija.

Preduvjet za korištenje ove modulacije je da ispitivani analit nije lako hlapljiv jer će u protivnom otpariti zajedno s eluentom prve dimenzije.^(5,6)

Od ostalih modulacija postoji još modulacija s hlapljenjem na membrani (engl. *Evaporative Membrane Modulation*), longitudinalna termalna modulacija na koloni (engl. *Longitudinal On-Column Thermal Modulation*), modulacija za frakcionirano slaganje i uzorkovanje (engl. *Fractionized Stacking and Sampling*). Međutim navedene modulacije nisu u širokoj primjeni, niti su instrumenti komercijalno dostupni.^(5,6)

Prema znanstvenicima Iguiniz i Heinisch privremeno spremanje analita u petlju/parkirno mjesto za spremanje frakcije do trenutka prijenosa u drugu kromatografsku dimenziju potpomognuto ASM aktivnom modulacijom je najrašireniji način prenošenja uzorka u dvodimenzionalnoj kromatografiji. Ovaj način prenošenja uzorka korišten je u 43 % znanstvenih radova objavljenih u razdoblju od 1980. do 2017. S druge strane, modulacija za privremeno spremanje analita na koloni je na drugom mjestu prema primjeni s 20 % objavljenih radova.⁽⁸⁾ Pojedine istraživačke grupe su i uspoređivale ova dva najraširenija načina modulacije i zaključak je da postojeće metode mogu biti dodatno optimirane koristeći bilo koju od dvije najraširenije aktivne modulacije u smislu smanjenja utroška kemikalija, smanjenja vremena analize, smanjenja razrjeđenja uzorka i postizanja većeg broja razdvojenih sastavnica, te izbjegavanju poznatih problema nekompatibilnosti između dviju dimenzija. Svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke, a njihov odabir ovisi o primjeni same metode.⁽¹⁸⁾

1.2.2 Princip rada masene spektrometrije

Maseni spektrometar je analitički instrument kojim je moguće identificirati sastavnice smjese te odrediti njihov udio. Sastavnice smjese se identificiraju na temelju spektra masa koji se temelji na strukturi molekule. Spektar masa se može prikazati u obliku grafa ili tablice. X-os predstavlja omjere masa i naboja (m/z) iona, a y-os njihove intenzitete. Intenzitet dobivenih iona ovisi o koncentraciji analita. ⁽¹⁹⁾

Mogućnost ionizacije analita osnovni je preduvjet za njegovu detekciju masenim spektrometrom. Jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanim sustavima LC-MS je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) kod koje se ionizacija postiže raspršivanjem eluata u sitne kapljice u električnom polju. Radi se o blagom načinu ionizacije molekula koji je kompatibilan sa svim analizatorima. U ovom koraku ioni se prevode iz otopine u plinsku fazu pomoću jakog električnog polja i plina za raspršivanje pri povišenoj temperaturi. Ionizacija može biti pozitivna i negativna. Prema literaturnim podacima moguće je zaključiti kako se češće koristi ionizacija u pozitivnom načinu nego negativnom. ^(19,20) Princip rada LC-MS sustava je jednostavan. Nakon što su analiti razdvojeni tekućinskom kromatografijom i ionizirani u ionizatoru uvode se pomoću vakuuma u analizator masenog spektrometra. Ioni mogu podleći fragmentaciji ili već tijekom ionizacije kod jakih ionizacijskih tehnika ili u kolizijskoj čeliji kod tandemске masene spektrometrije. U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišten je tandemski maseni spektrometar s kvadrupolom i analizatorom vremena leta (Q-TOF). Kod ovog instrumenta nabijeni molekulski ioni se filtriraju na kvadropolu, te se samo ioni određenog omjera mase i naboja propuštaju dalje na kolizijsku čeliju. U kolizijskoj čeliji pod suviškom vibracijske energije koju ion primi puca na fragmente, manje nabijene molekule i/ili neutralne fragmente. Nenabijeni fragmenti se ne mogu detektirati. Dobiveni fragmentacijski putevi jedinstveni su za svaku molekulu. Analite je moguće identificirati na temelju masenih spektara pohranjenih u bazama podataka ili uporabom standardnih otopina.

Fragmenti nastali u kolizijskoj čeliji dalje odlaze u analizator vremena leta. Brzina leta iona ovisi o njegovom omjeru mase i naboja. U konačnici razdvojeni ioni dolaze do detektora gdje se registriraju kao struja, a korisnik ih može vidjeti kao pik na sučelju.⁽²⁰⁾

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Daptomicin je ciklički lipopeptidni antibiotik koji se primjenjuje intravenskim putem. Zbog njegove složene strukture ne iznenađuje da je poznat veći broj njegovih strukturno sličnih onečišćenja. Pregledom literature utvrđeno je da dosada nije razvijena niti jedna metoda za identifikaciju daptomicina i njegovih onečišćenja primjenom dvodimenzionalne kromatografije spregnute s masenim spektrometrom (engl. *Two-Dimensional Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, 2D-LC/MS*).

Cilj ovog rada je razviti 2D-LC/MS metodu za identifikaciju razgradnih onečišćenja daptomicina.

Konačno, predložena metoda će se primijeniti za identifikaciju onečišćenja u referentnom proizvodu i gotovim ljekovitim oblicima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Kemikalije, standardi i uzorci

Popis kemikalija korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada, njihova kemijska čistoća kao i proizvođač prikazani su u Tablica 3 **Error! Reference source not found.** Popis standarada onečišćenja korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada, njihov CAS broj, kemijska čistoća i molekulska formula su prikazani u Tablica 4 te su njihove strukturne formule dane u Tablica 5. Navedeni standardi onečišćenja izolirani su u laboratorijima Xellia Pharmaceuticals (Kopenhagen, Danska), a njihove strukture su potvrđene NMR metodom, dok je čistoća određena UHPLC-UV metodom.

Uspoređeni su laboratorijski uzorci iste formule gotovog farmaceutskog oblika za intravenoznu primjenu s referentnim proizvodom. Svi korišteni uzorci navedeni su u Tablica 6, te su bili izvan roka trajanja, kao i korišteni referentni proizvod.

3.2 Laboratorijska oprema

- Dvodimenzionalni kromatograf za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti s analizatorom masa (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Analitička vaga XPE205 (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD)
- pH metar Seven Excellence, (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD)
- Volumetrijske pipete 10 mL, 2 mL
- Odmjerne tikvice 100 mL

3.3 Priprema standardnih otopina i uzoraka

Standardi onečišćenja su pripremljeni u koncentraciji od 0,1 mg/mL u 30% - tnoj otopini acetonitrila. Za optimizaciju uvjeta na masenom spektrometru korištena je standardna otopina daptomicina u koncentraciji 0,2 mg/mL u 30% - tnoj otopini acetonitrila (standard - serijski broj B7500371, čistoća 94,1 %, proizveden u laboratorijima Xellia Pharmaceuticals, Budimpešta, Mađarska). Uzorci su pripremljeni u dva koraka. U prvom koraku uzorak gotovog proizvoda je rekonstituiran s 10 mL 0,9 % NaCl i koncentracija gotovog proizvoda je iznosila 50 mg/mL. Daljnjim pipetiranjem 2 mL pripremljene otopine u odmjerne tikvice od 100,00 mL su dobiveni uzorci koncentracije 1 mg/mL. Tikvice su nadopunjene eluentom B do oznake (vidi poglavlje 3.4).

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija.

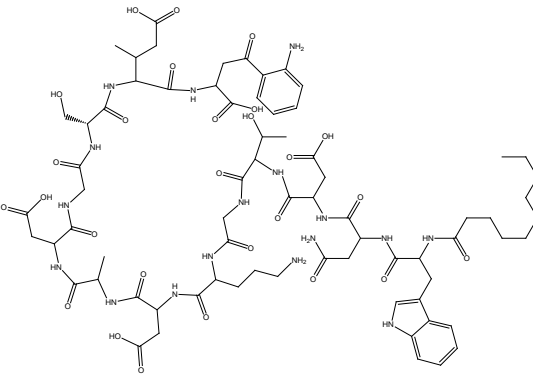
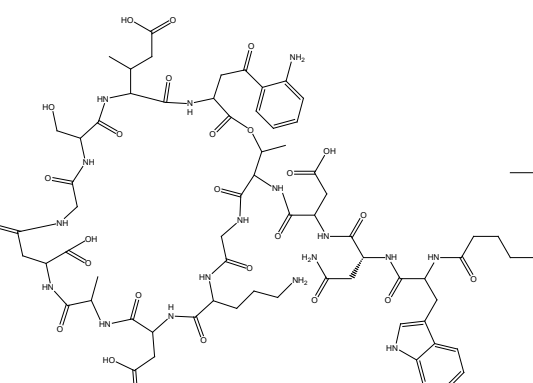
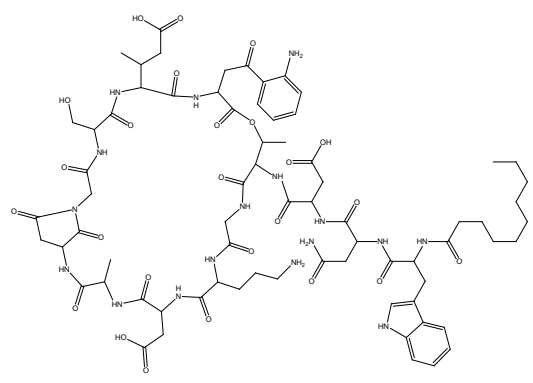
| Naziv | Molekulska formula | Proizvođač | Čistoća |
|----------------------------|--|--|---------------|
| Amonijev fosfat monohidrat | $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ | Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD | 98,0% |
| Fosforna kiselina | H_3PO_4 | VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, SAD | 85,6% |
| Acetonitril | CH_3CN | Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD | 99,98% |
| Trifluoro octena kiselina | $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$ | VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, SAD | $\geq 99,5\%$ |
| 0,9% fiziološka otopina | 0,9% NaCl | Braun, Kronberg im Taunus, Njemačka | NP* |

* NP- nije poznato

Tablica 4. Popis standarada onečišćenja.

| Broj | Naziv | CAS broj | Serijski broj | Molekulska formula | Molekulska masa | Čistoća |
|------|------------------------------|-------------|----------------|---|-----------------|---------|
| 1 | Lakton daptomicin | 351499-35-9 | TKO-2011-09-15 | $\text{C}_{72}\text{H}_{103}\text{N}_{17}\text{O}_{27}$ | 1638,68 g/mol | 89,8 % |
| 2 | β - izomer daptomicina | 123180-72-3 | CC1069 | $\text{C}_{72}\text{H}_{101}\text{N}_{17}\text{O}_{26}$ | 1620,67 g/mol | 84,3 % |
| 3 | Anhidro-daptomicin | 121869-35-0 | CC1018-FM | $\text{C}_{72}\text{H}_{99}\text{N}_{17}\text{O}_{25}$ | 1602,68 g/mol | 90,7 % |

Tablica 5. Strukturne formule onečišćenja daptomicina.

| Broj | Naziv | IUPAC kemijsko ime | Struktura |
|------|------------------------------|--|--|
| 1 | Lakton daptomicina | (8R)-32-(4-amino-2-(2-decanamido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)-4-oxobutanamido)-2-(2-(2-aminophenyl)-2-oxoethyl)-23-(3-aminopropyl)-14,20-bis(carboxymethyl)-5-(1-carboxypropan-2-yl)-29-(1-hydroxyethyl)-8-(hydroxymethyl)-17-methyl-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-decaoxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaazatetatriacontane-1,34-dioic acid |  |
| 2 | β – izomer daptomicina | 31-(2-((2R)-4-amino-2-(2-decanamido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)-4-oxobutanamido)-3-carboxypropanamido)-3-(2-(2-aminophenyl)-2-oxoethyl)-25-(3-aminopropyl)-22-(carboxymethyl)-6-(1-carboxypropan-2-yl)-9-(hydroxymethyl)-19,32-dimethyl-2,5,8,11,14,18,21,24,27,30-decaoxo-1-oxa-4,7,10,13,17,20,23,26,29-nonaazacyclodotriacontane-16-carboxylic acid |  |
| 3 | Anhidro-daptomicin | 3-(4-amino-2-(2-decanamido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)-4-oxobutanamido)-4-(11-(2-(2-aminophenyl)-2-oxoethyl)-21-(3-aminopropyl)-24-(carboxymethyl)-8-(1-carboxypropan-2-yl)-5-(hydroxymethyl)-14,27-dimethyl-3,6,9,12,16,19,22,25,28,32,33-undecaoxo-13-oxa-1,4,7,10,17,20,23,26,29-nonaazabicyclo[28.2.1]tritiacontan-15-ylamino)-4-oxobutanoic acid |  |

Tablica 6 Popis uzoraka (ljekovitih oblika).

| Broj | Serijski broj | Opis uzorka | Datum isteka roka trajanja |
|------|------------------|---------------------|----------------------------|
| 1 | XEL540/02-17/031 | Testni uzorak | NP* |
| 2 | XEL540/02-17/032 | Testni uzorak | NP |
| 3 | PA059C | Referentni proizvod | Lipanj 2018. |

* NP- nije poznato

3.4 2D-LC/MS metoda

Za određivanje onečišćenja u prvoj dimenziji korištena je oktasilil (C8) kromatografska kolona dimenzija 4,6 x 250 mm, veličina čestica 5 μ m (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD). Pokretne faze su pripravljene miješanjem 0,45 %-tne otopine pufera amonij fosfat monohidrata podešene pH vrijednosti na 3,25 i acetonitrila. Pokretna faza A sadrži 50 % acetonitrila i 50 % 0,45 %-tne otopine pufera, dok pokretna faza B sadrži 20 % acetonitrila i 80 % pufera. Za razdvajanje analita u prvoj dimenziji korištena je gradijentna elucija (Tablica 7) te je protok pokretne faze bio 0,7 mL/min. Uzorci s prve dimenzije su snimani na VWD detektoru na valnoj duljini od 214 nm. Volumen unesen u prvu dimenziju iznosio je 20 μ L, a temperatura kolone je iznosila 25 °C.

Tablica 7 Gradijentni program korišten u prvoj dimenziji.

| VRIJEME (min) | Pokretna faza A (%) | Pokretna faza B (%) |
|---------------|---------------------|---------------------|
| 0,0 | 52,5 | 47,5 |
| 22,0 | 43,0 | 57,0 |
| 36,0 | 43,0 | 57,0 |
| 36,5 | 52,5 | 47,5 |
| 66,0 | 52,5 | 47,5 |

Eluati iz prve dimenzije su „rezani“ engl. *heart cutting* metodom i frakcije su prenesene u drugu dimenziju na daljnje pročišćavanje i razdvajanje.

U drugoj dimenziji korištena je 75 mm ACE Excel, C18 PFP kolona, Aberdeen, Ujedinjeno Kraljevstvo. Protok je iznosio 0,60 mL/min, a ukupno vrijeme analize je iznosilo 8 minuta. Nakon početnog izokratnog dijela, uslijedio je gradijentni program u trajanju od 6 minuta s povećanjem pokretne faze B približno 7,5 % / min, te se kolona ekvilibrirala na početne uvjete. Protok na 150 mm Waters, Peptide C18 CSH koloni, Milford, Massachusetts, SAD je iznosio 0,37 mL/min. Ukupno vrijeme analize koje obuhvaća početne izokratne uvjete od 2 minute s 25% pokretne faze B, 10 minuta gradijentnog programa s povećanjem pokretne faze B približno 3,5 % / min, te ponovno vraćanje na početne uvjete iznosilo 12,5 min.

Kod svih korištenih kolona ²D metoda uključivala je početno vrijeme od 2 min u izokratnoj eluciji s 25 % pokretne faze B koja je služila za ispiranje eluata od fosfata iz pokretne faze ¹D. Nakon toga je slijedio gradijentni program, te ekvilibracija kolone na početne uvjete. Pokretna faza A je bila mješavina visokopročišćene vode s 0,03 % TFA, dok je pokretnu fazu B činio acetonitril. Uzorci su snimani na valnoj duljini od 214 nm na DAD detektoru.

Nakon razdvajanja analita u drugoj dimenziji ionizacija analita napravljena je primjenom dvostrukog elektrosprej ionizatora (engl. *Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization*, Dual AJS ESI) u pozitivnom modu (+) pomoću referentnih standarda za istovremenu kalibraciju detektora s omjerom mase i naboja (m/z) 121,05087 i 922,00978. Nadalje, korišten je detektor spektrometar masa visoke razlučivosti koji uključuje dva analizatora, kvadrupol (engl. *Quadrupole*, Q) i analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF).

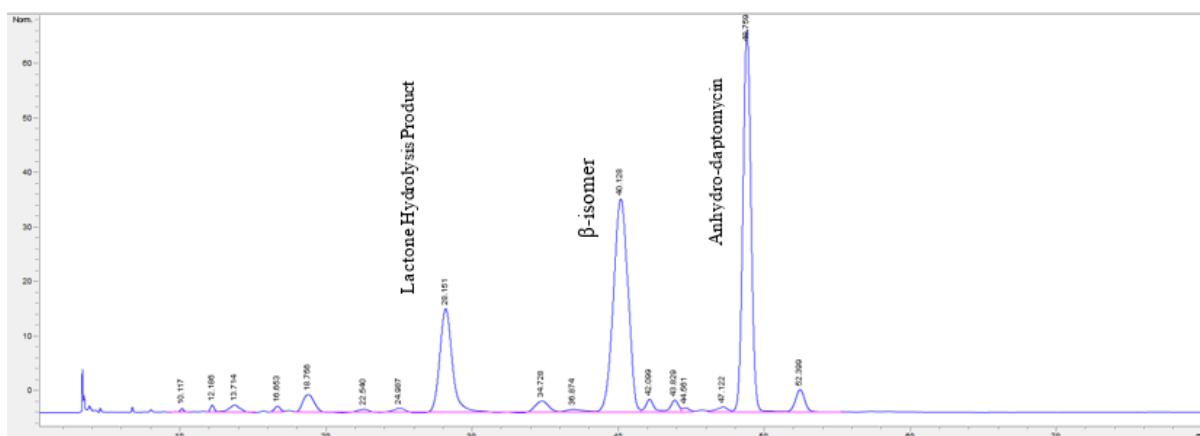
Uvjeti na masenom spektrometru su bili sljedeći: temperatura plina nosioca (350 °C), protok plina za sušenje (6 L/min), tlak nebulizatora (60 psi), struja na kapilari (3000 V), napon fragmentora (100 V). Za odabir uvjeta ionizacije korišten je direktni unos radnog standarda

daptomicina. Za identifikaciju analita praćene su m/z vrijednosti u rasponu od 100 do 3000 s brzinom snimanja 1 spektra u sekundi. Instrument je kalibriran u širokom dinamičkom rasponu (engl. *Extended Dynamic Range*) u rasponu m/z vrijednosti od 0 do 3200. Za snimanje i obradu podataka korišten je računalni program Agilent MassHunter 2003-2007 (Data Acquisition verzija B.09.00 i Data Analysis verzija 10.0).

4. REZULTATI

Cilj ovog istraživanja bio je primijeniti 2D-LC/MS tehniku za identifikaciju srodnih onečišćenja daptomicina. Optimizacija analitičkog postupka započela je modifikacijom literaturno dostupne metode koja je korištena za prvu dimenziju.⁽³⁾ Nakon optimizacije prve dimenzije kromatografskog postupka uz primjenu UV/VIS detektora, pristupilo se optimizaciji metode u drugoj dimenziji gdje se nakon DAD detektora spregnuo MS detektor. Eluati s prve dimenzije usmjerili su se u drugu korištenjem engl. *heart cutting* metode. Frakcije su prenesene pasivnom modulacijom u drugu dimenziju na pročišćavanje i razdvajanje.

Optimizacija metode započela je analizom otopine standarda tri ključna onečišćenja (Slika 5). Iz kromatograma je moguće vidjeti da je razlučivanje između pikova onečišćenja i susjednih pikova bilo veće od 2,0 što znači da su pikovi razdvojeni baznom linijom.



Slika 5 ¹D kromatogram otopine standarda onečišćenja snjimljena pri 214 nm.

Analiza tri uzorka (XEL540/02-17/031, XEL540/02-17/032 i PA059C) u prvoj dimenziji provedena je primjenom oktasilil kromatografske kolone (Tablica 8) prema metodi opisanoj u poglavlju 3.4. dok su rezultati provedenih mjerenja prikazani u Tablici 9.

Iz dobivenih rezultata moguće je uočiti kako je kromatografski profil onečišćenja usporediv u sva tri uzorka. Rezultati su prikazani kao omjer površine pika onečišćenja i djelatne

farmaceutske tvari (A_{im}/A_{API} , %), a identitet poznatih onečišćenja utvrđen je na temelju relativnih vremena zadržavanja.

Lakton daptomicina nađen je u sva tri uzorka (A_{im}/A_{API} vrijednosti bile su od 1,40 do 1,70), kao i anhidro-daptomicin (A_{im}/A_{API} vrijednosti bile su od 1,50 do 1,90). S druge strane β -izomer daptomicina nađen je u dva uzorka (A_{im}/A_{API} vrijednosti bile su 0,74 odnosno 1,10). Ostala onečišćenja imala su A_{im}/A_{API} vrijednosti manje od 3,00. U uzorcima uz tri gore navedena poznata onečišćenja utvrđeno prisustvo još 19 nepoznatih onečišćenja. Kromatogrami prve dimenzije ispitanih uzoraka prikazani su na Slikama 6. – 8.

Tablica 8 Popis korištenih kromatografskih kolona.

| Naziv kolone | IB – Sil C8 125A | Acquity UPLC BEH Shield RP18 | Acquity UPLC PEPTIDE CSH C18 | ACE Excel C18-PFP |
|------------------------|--|---|---|---|
| Dimenzije kolone | 4,6 x 250 mm 5,0 μ m | 2,1 x 150 mm 1,7 μ m | 2,1 x 150 mm 1,7 μ m | 3,0 x 75 mm 1,7 μ m |
| Proizvođač | Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD | Waters, Milford, Massachusetts, SAD | Waters, Milford, Massachusetts, SAD | ACE, Aberdeen, Ujedinjeno Kraljevstvo |
| Kataloški broj | 00G-0081-E0 | 186003376 | 186006938 | EXL-1710-7503U |
| Serijski broj | H17-047993 | 01783835318334 | 1683031018395 | A216913 |
| Separacijska dimenzija | ¹ D | ² D | ² D | ² D |

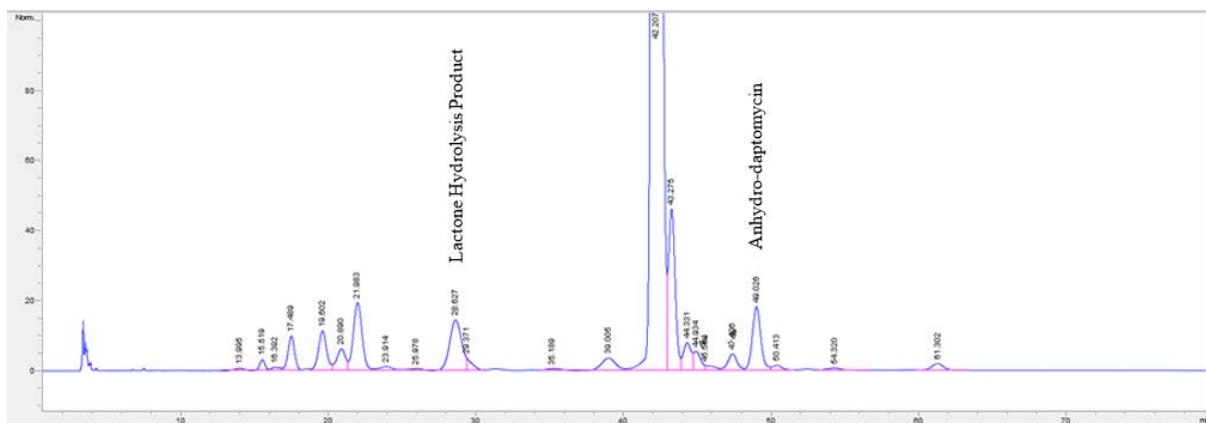
Tablica 9 Rezultati analize uzoraka iz prve dimenzije.

| Onečišćenje | Relativno vrijeme zadržavanja (RRT) | Naziv uzorka | | |
|--|-------------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| | | XEL540/02-17/031 (A_{im}/A_{API} , %) | XEL540/02-17/032 (A_{im}/A_{API} , %) | PA059C (A_{im}/A_{API} , %) |
| NO* 1 | 0,33 | 0,07 | 0,09 | 0,10 |
| NO 2 | 0,36 | 0,18 | 0,16 | 0,15 |
| NO 3 | 0,38 | 0,09 | 0,06 | 0,10 |
| NO 4 | 0,41 | 0,66 | 0,64 | 0,58 |
| NO 5 | 0,46 | 0,92 | 0,90 | 0,94 |
| NO 6 | 0,49 | 0,55 | 0,50 | 0,34 |
| NO 7 | 0,52 | 1,70 | 0,64 | 1,0 |
| NO 8 | 0,56 | 0,16 | 0,12 | 0,13 |
| NO 9 | 0,60 | NP** | NP | 0,13 |
| NO 10 | 0,62 | 0,09 | NP | 0,12 |
| Lakton daptomicin ~29,5 min | 0,69 | 1,70 | 1,60 | 1,40 |
| NO 11 | 0,69 | 0,20 | 0,22 | 0,13 |
| NO 12 | 0,75 | NP | NP | 0,11 |
| NO 13 | 0,79 | NP | NP | 0,13 |
| NO 14 | 0,83 | 0,09 | 0,11 | 0,32 |
| NO 15 | 0,92 | 0,51 | 0,51 | 0,83 |
| β-izomer daptomicina ~40,5 min | 0,96 | NP | 0,74 | 1,10 |
| NO 16 | 1,03 | 3,00 | 2,70 | 1,90 |
| NO 15 | 1,05 | 0,63 | 0,57 | 0,42 |
| NO 15 | 1,06 | 0,38 | 0,42 | ND |
| NO 15 | 1,07 | NP | NP | 0,92 |
| NO 15 | 1,08 | 0,12 | 0,10 | 0,09 |
| NO 15 | 1,12 | 0,44 | 0,45 | 0,37 |
| Anhidro-daptomicin ~49,7 min | 1,14 | 1,50 | 1,90 | 1,90 |
| NO 16 | 1,20 | 0,15 | 0,13 | 0,26 |
| NO 17 | 1,26 | NP | NP | 0,29 |
| NO 18 | 1,29 | 0,11 | NP | 0,48 |
| NO 19 | 1,45 | 0,24 | 0,19 | 0,17 |

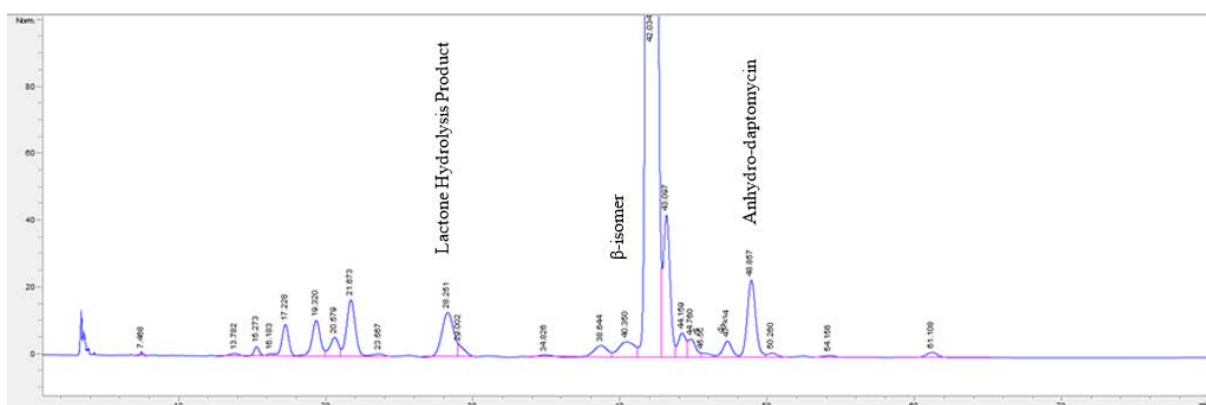
* A_{im}/A_{API} - omjer površine pika onečišćenja i djelatne farmaceutske tvari

**NO – nepoznato onečišćenje

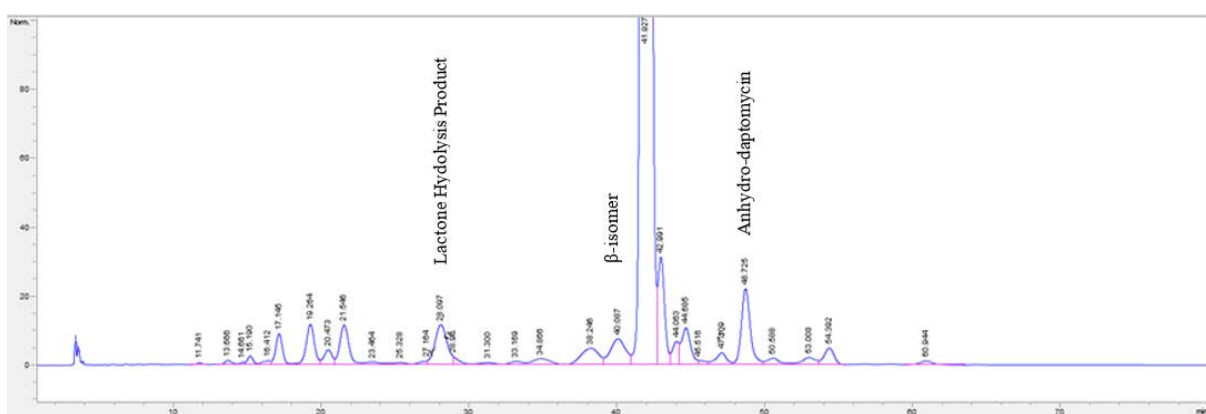
***NP – nema podataka



Slika 6 ¹D kromatogram otopine uzorka Xe1540/02-17/031 snimljen pri 214 nm.



Slika 7 ¹D kromatogram otopine uzorka Xe1540/02-17/032 snimljen pri 214 nm.

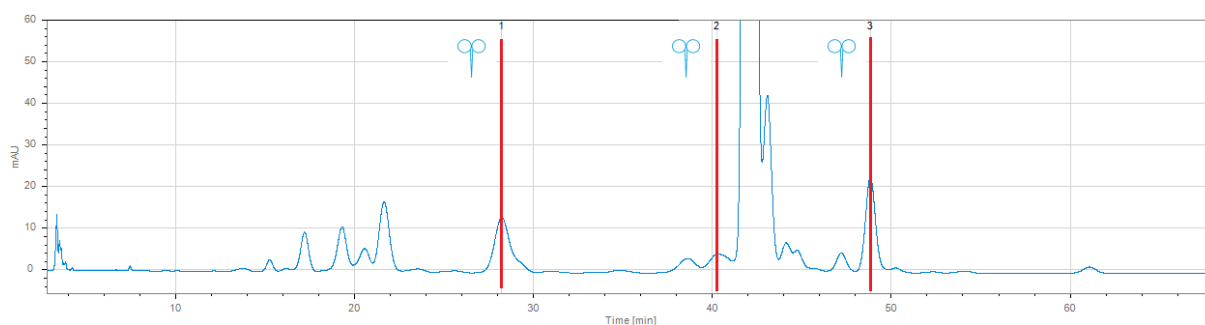


Slika 8 ¹D kromatogram otopine uzorka PA052C snimljen pri 214 nm.

Uz postizanje prikladne selektivnosti metode cilj korištenja druge kromatografske dimenzije bio je i pročišćavanje uzorka/eluata od soli amonijeva fosfata koja je korištena kao sastavni dio pokretne faze u prvoj dimenziji kako bi se uzorak učinio prikladnim za MS analizu.

Nakon nanošenja uzorka na kolonu druge dimenzije primijenjeni su izokratni uvjeti elucije s nižim postotkom organske faze, to jest višim udjelom polarne vodene faze kako bi se polarni fosfati koji ne mogu stvarati interakcije s nepokretnom fazom isprali s kolone, a nepolarni analit od interesa zadržao na ulazu u kolonu.

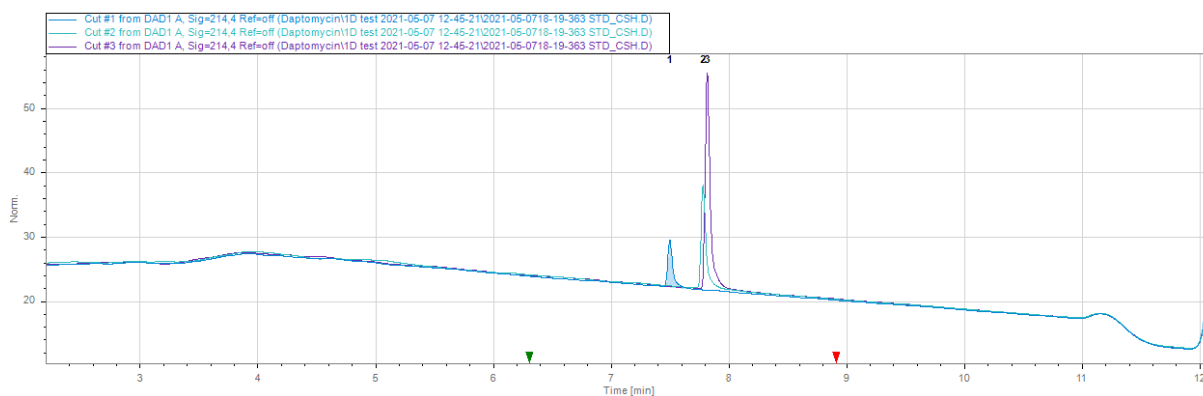
Razvoj 2D-LC/MS metode započeo je primjenom engl. *multiple heart cutting* načina rada bez primjene aktivne modulacije za prijenos poznatih onečišćenja iz prve u drugu kromatografsku dimenziju (Slika 9.). Svaki od pikova je izrezan iz prve dimenzije na temelju svog vremena zadržavanja te je 40 μ L eluata preneseno je u drugu dimenziju.



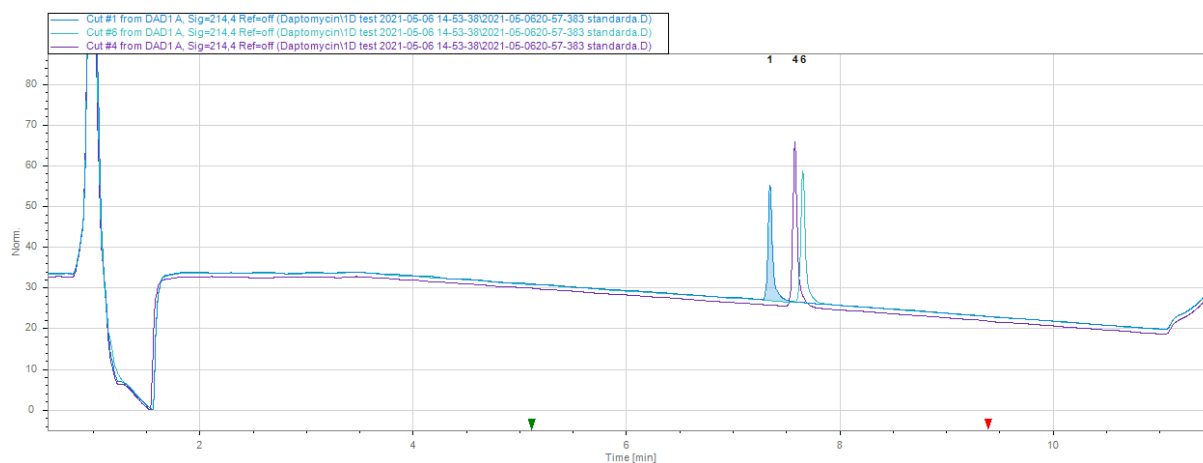
Slika 9 Grafički prikaz engl. *multiple heart cutting* načina rada na 1D kromatogramu uzorka PA052C.

Za optimizaciju kromatografskog postupka u drugoj dimenziji korištene su tri različite kolone (Tablica 8). U odnosu na prvu dimenziju u drugoj su korištene kraće kolone (od 75 do 150 mm), užeg promjera (od 2,1 do 3,0 mm) te manjih čestica punila (1,7 μ m).

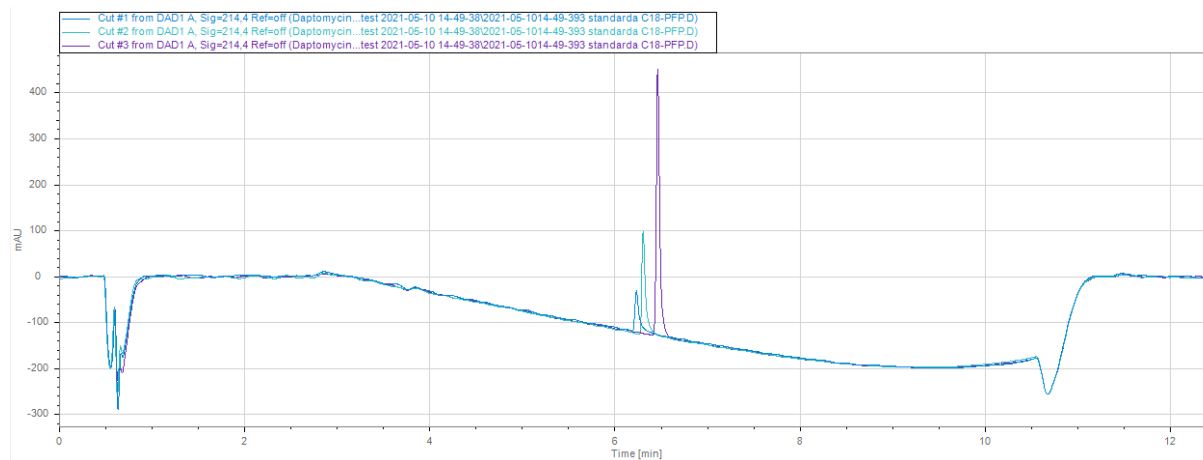
U drugoj dimenziji protok na C18 CSH i C18 BEH kolonama je podešen na 0,37 mL/min, dok je tlak pri tom protoku iznosio oko 800 bara. Treća kolona C18 PFP je kraća u odnosu na prethodne dvije te su njene dimenzije dopuštale povećanje protoka na 0,60 mL/min što je rezultiralo tlakom od oko 500 bara (Slike 10. – 12.).



Slika 10. ²D kromatogram standardne otopine onečišćenja snimljen pri 214 nm primjenom C18 CSH kolone. Legenda: lakton daptomicina (plavo), β-izomer daptomicina (zeleno), anhidro-daptomicin (ljubičasto).



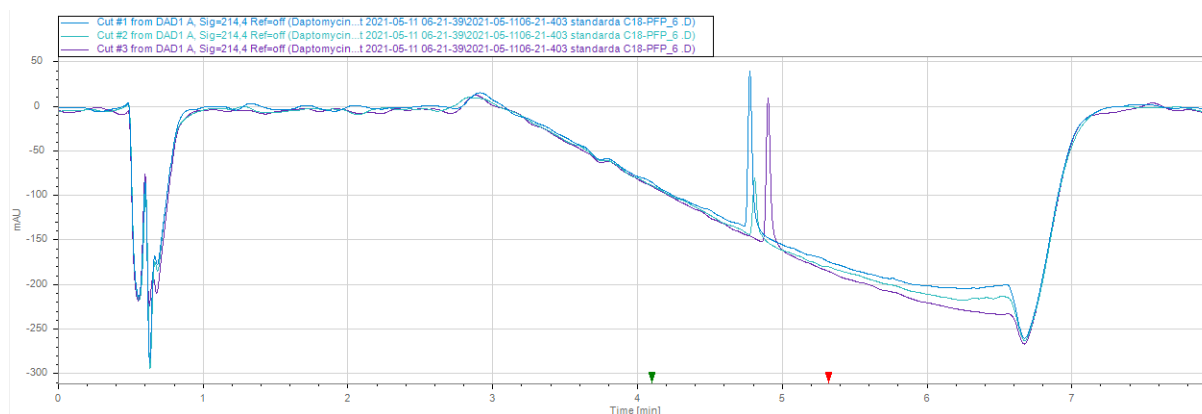
Slika 11. ²D kromatogram standardne otopine onečišćenja snimljen pri 214 nm primjenom C18 BEH kolone. Legenda: lakton daptomicina (plavo), β-izomer daptomicina (ljubičasto), anhidro-daptomicin (zeleno).



Slika 12. ²D kromatogram standardne otopine onečišćenja snimljen pri 214 nm primjenom ACE C18-PFP kolone. Legenda: lakton daptomicina (plavo), β-izomer daptomicina (zeleno), anhidro-daptomicin (ljubičasto).

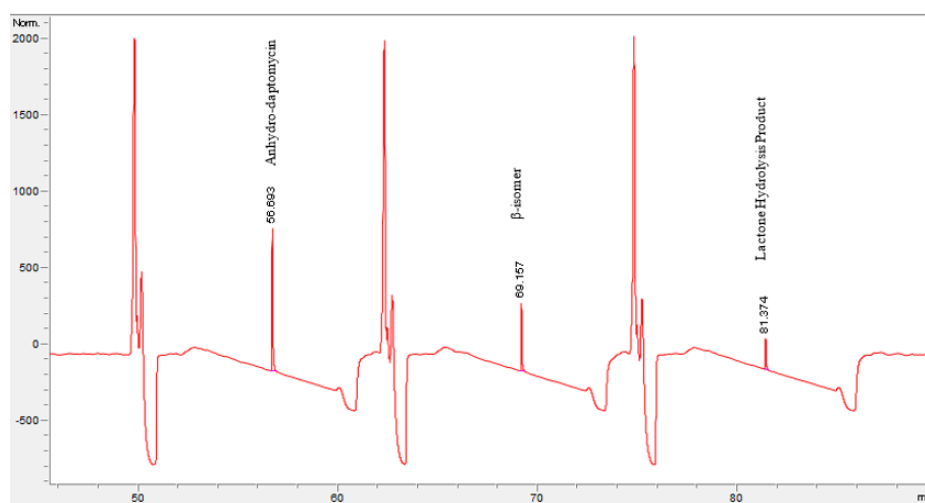
Na temelju dobivenih kromatograma moguće je uočiti kako je najkraće vrijeme zadržavanja u drugoj kromatografskoj dimenziji dobiveno primjenom ACE C18-PFP kolone, te je ova kolona izabrana za daljnja ispitivanja (onečišćenja su imala redom sljedeća vremena zadržavanja: 6,238 min, 6,311 min i 6,468 min). Nadalje, potrebno je istaknuti kako ciklus jedne analize u drugoj kromatografskoj dimenziji uključuje uspostavljanje ravnoteže na koloni, gradijentni program i vraćanje na početne uvjete analize. Primjenom ACE C18-PFP kolone ciklus je skraćen sa 17 minuta na 12,5 minuta uz iste kromatografske uvijete.

Kako bi se dodatno skratilo vrijeme analize metoda je optimizirana na način da je udio pokretne faze B u gradijentnom programu povećan. U gore opisanim 2D kromatogramima nakon druge minute analize porast udjela pokretne faze B iznosi je 3,5 % po minuti do 10 minute. Primjenom porasta udjela pokretne faze B od 7,5 % / minuti postignuta su kraća vremena zadržavanja poznatih onečišćenja daptomicina. Analizirana onečišćenja imala su sljedeća vremena zadržavanja: 4,770 min, 4,813 min i 4,899 min (Slika 13).

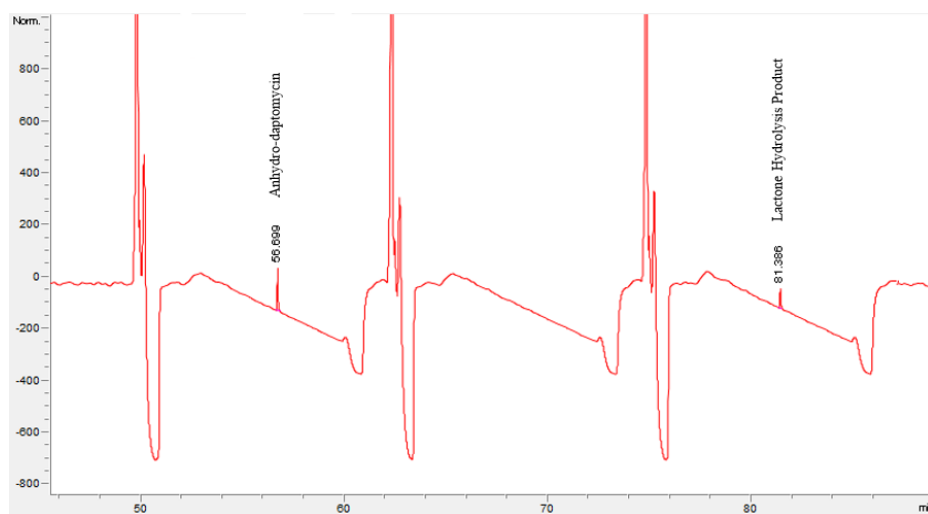


Slika 13. 2D kromatogram standardne otopine onečišćenja snimljen pri 214 nm primjenom ACE C18-PFP kolone (protok pokretne faze 0,60 mL/min, gradient od 2 do 10 min - 7,5 % B / min). Legenda: lakton daptomicina (plavo), β -izomer daptomicina (zeleno), anhidrodaptomicin (ljubičasto).

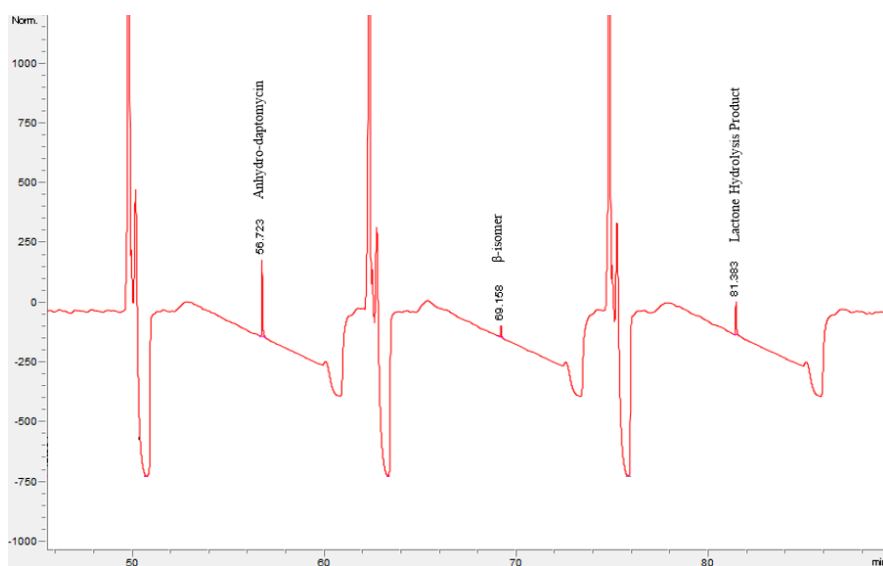
Nakon optimizacije kromatografskih uvjeta na standardnoj otopini (Slika 14.) metoda je primijenjena za analizu uzoraka (Slike 15. – 17.). Dodatno, na Slikama 18 – 20 su prikazani UV – VIS spektri standardne otopine onečišćenja iz druge dimenzije sa Slike 14. Na temelju UV – VIS spektara onečišćenja nije moguće međusobno razlikovati idenitificirana onečišćenja daptomicina. U ²D kromatogramu uzorka Xel540/02-17/031 moguće je uočiti pikove poznatih onečišćenja lakton daptomicina i anhidrodaptomicina što je u skladu s kromatogramima dobivenih u prvoj dimenziji. Također sukladno kromatogramima dobivenim u prvoj dimenziji u uzorcima XEL540/02-17/032 i PA059C nađena su sva tri poznata onečišćenja. Rezultati provedenog istraživanja objedinjeni su u Tablici 6.



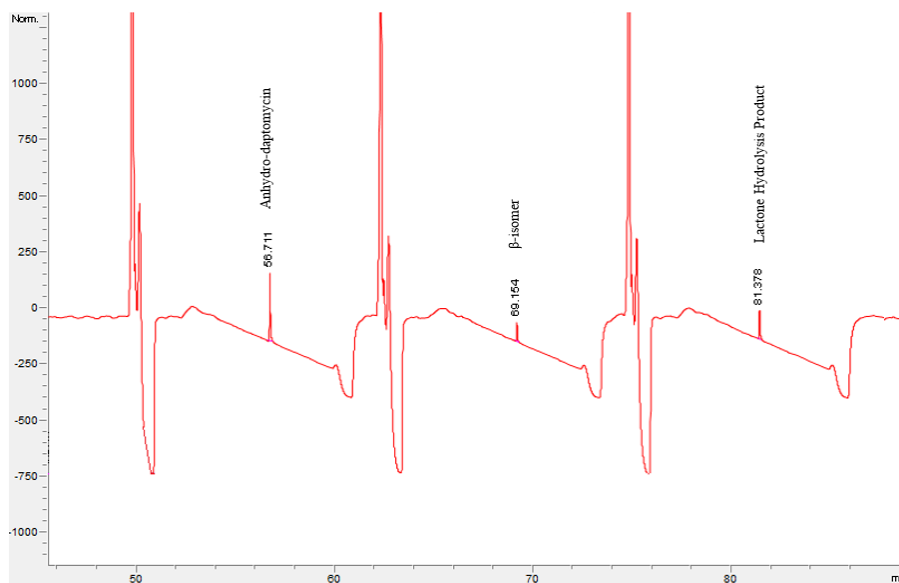
Slika 14. ²D kromatogram standardne otopine onečišćenja snimljen pri 214 nm.



Slika 15. ²D kromatogram uzorka Xel540/02-17/031 snimljen pri 214 nm.



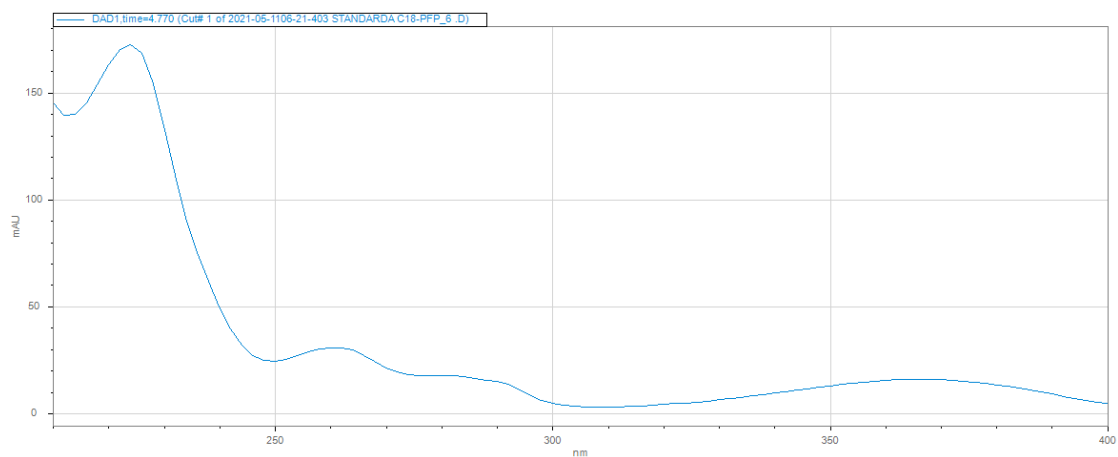
Slika 16. ²D kromatogram uzorka Xel540/02-17/032 snimljen pri 214 nm.



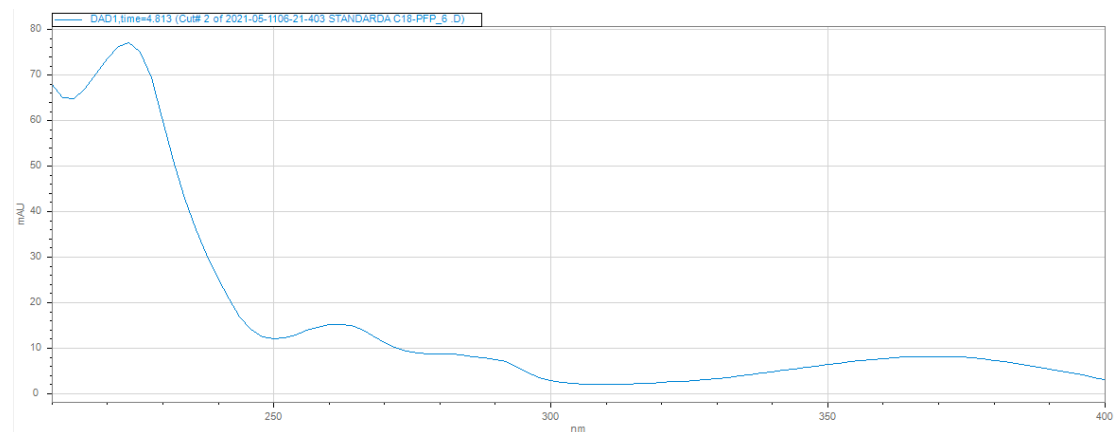
Slika 17. ²D kromatogram uzorka PA052C snimljen pri 214 nm.

Tablica 10. Vremena zadržavanja onečišćenja u ispitanim uzorcima snimljeni 2D-LC/MS tehnikom.

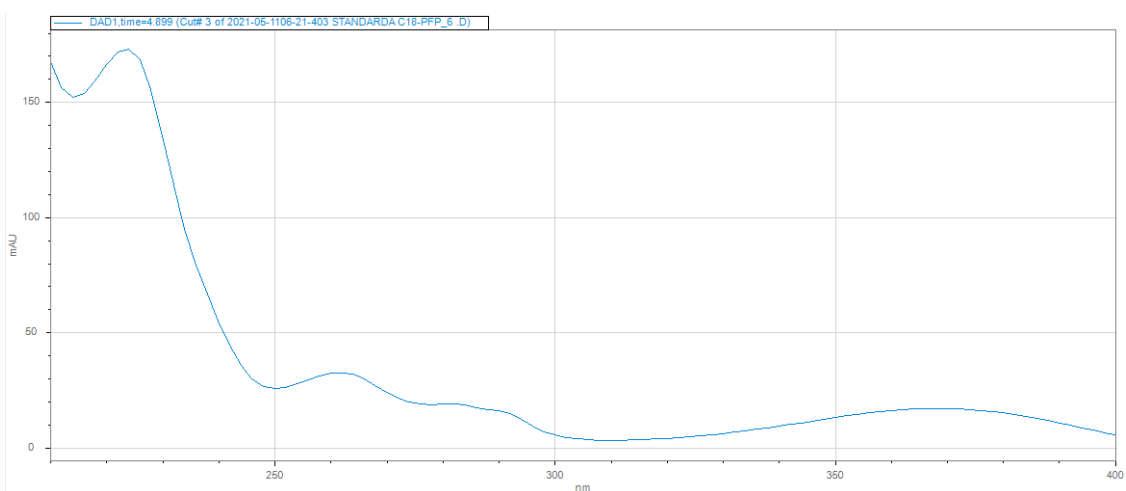
| Uzorak \ Analit | Lakton daptomicin (<i>t_R</i> , min) | β-izomer daptomicin (<i>t_R</i> , min) | Anhidro- daptomicin (<i>t_R</i> , min) |
|--------------------|--|---|---|
| Xel540/02-17/031 | 56,699 | NP | 81,386 |
| Xel540/02-17/032 | 56,723 | 69,158 | 81,383 |
| PA059C | 56,711 | 69,154 | 81,378 |
| standardna otopina | 56,693 | 69,157 | 81,374 |



Slika 18. UV – VIS spektar standardne otopine laktona daptomicina iz druge dimenzije.



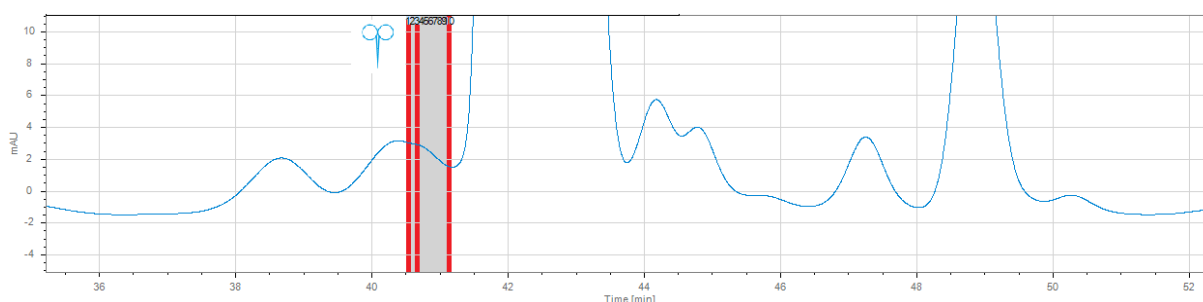
Slika 19 UV – VIS spektar standardne otopine β -izomera daptomicina iz druge dimenzije.



Slika 20 UV – VIS spektar standardne otopine anhidro - daptomicina iz druge dimenzije.

Na temelju dobivenih rezultata moguće je utvrditi kako su svi „rezovi“ iz prve dimenzije bili „čisti“ odnosno nije došlo do preklapanja kromatografskih pikova osim u uzorku XEL540/02-17/032. U ovom uzorku nije dobivena zadovoljavajuća simetrija pika β -izomera daptomicina u prvoj dimenziji što je upućivalo na koeluiranje navedenog onečišćenja i nepoznate sastavnice uzorka.

Kako bi se utvrdila čistoća navedenog kromatografskog pika primijenjeno je uzorkovanje u visokoj rezoluciji (engl. *High Resolution Sampling*) odnosno engl. *selective comprehensive 2D-LC* način rada. Pik je uzorkovan na temelju vremenskog okvira s prvim „rezom“ na 40,50 minuti, trećim na 40,63 minuti i desetim na 41,10 minuti. Vrijeme uzorkovanja svake frakcije je bilo 4 sekunde, a protok u prvoj dimenziji iznosio je 0,700 mL/min. Uzorkovanje je grafički prikazano na Slici 21. te je označeno crvenim i sivim poljima.

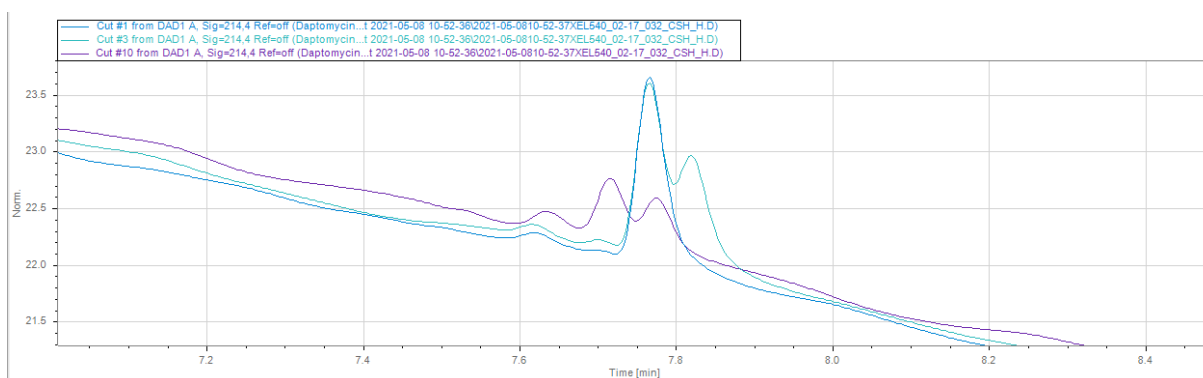


Slika 21 Grafički prikaz uzorkovanja engl. *selective comprehensive 2D-LC* načinom rada na ¹D kromatogramu uzorka pri 214 nm. Crvenim i sivim poljima obilježene su frakcije eluata prenesene u drugu kromatografsku dimenziju.

²D kromatogrami dobiveni analizom prve, treće i desete frakcije prikazani su na Slici 22. Na kromatogramu prve frakcije u drugoj dimenziji vidljiv je samo jedan pik s vremenom zadržavanja od 7,766 minuta koji odgovara onečišćenju β -izomeru daptomicina. S druge strane, u ²D kromatogramu treće frakcije vidljiva su dva kromatografska pika, jedan odgovara β -izomeru daptomicina s vremenom zadržavanja 7,765 minuta, a drugi pik odgovara nepoznatom

analitu s vremenom zadržavanja od 7,819 minuta. Konačno, u ²D kromatogramu desete frakcije vidljiv je pik β-izomera daptomicina s vremenom zadržavanja od 7,774 minuta, te pik nepoznatog analita s vremenom zadržavanja od 7,715 minuta.

Selective comprehensive 2D-LC načinom rada potvrđeno je da pik onečišćenja β-izomera daptomicina u uzorku XEL540/02-17/032 nije čist, te da se u ovom vremenu s kolone eluiraju i druga onečišćenja koja su vrlo vjerojatno strukturno slična djelatnoj farmaceutskoj tvari.



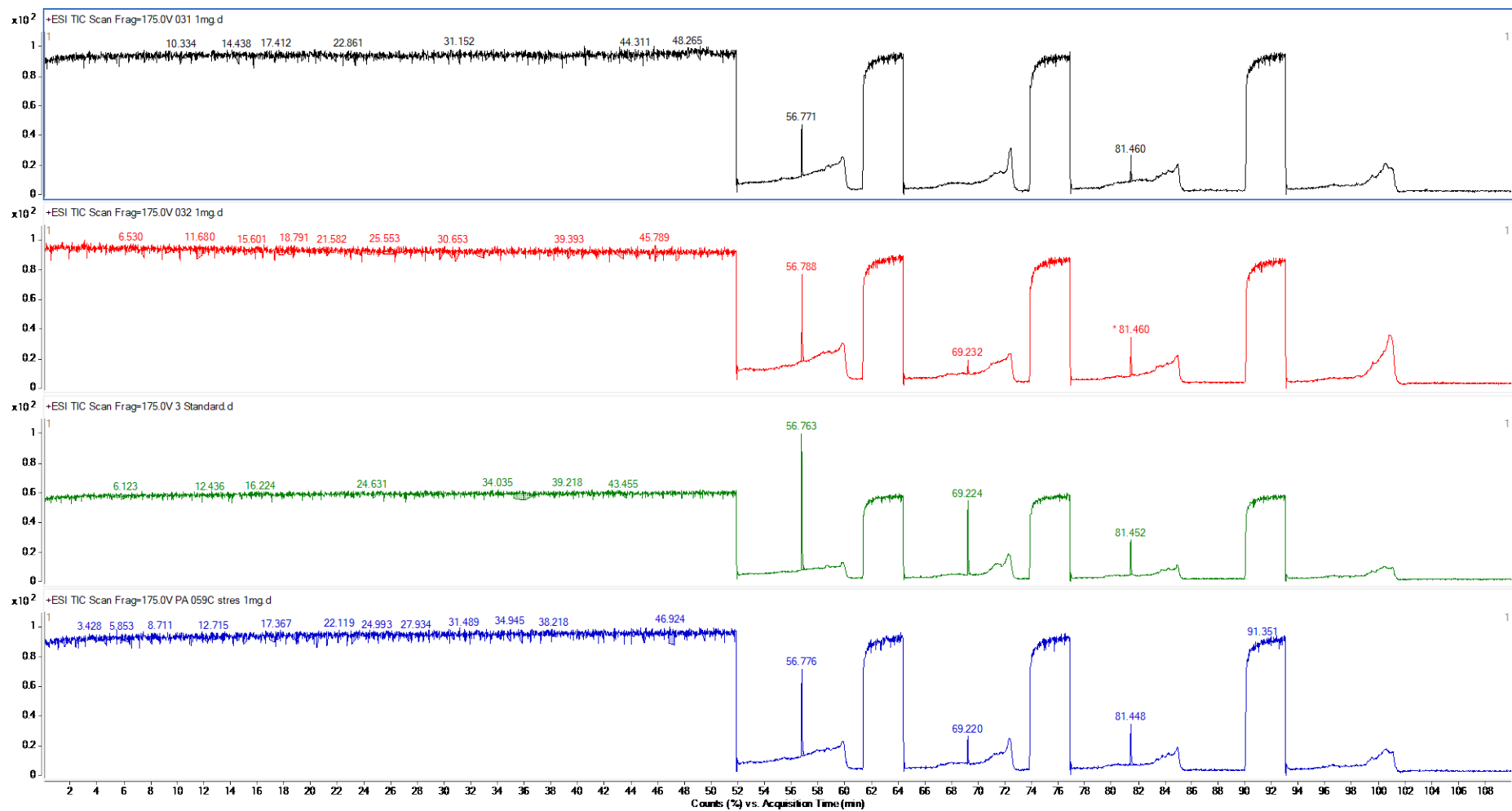
Slika 22 ²D kromatogram uzorka XEL540/02-17/032 snimljen pri 214 nm (uzorkovanje eluata za drugu kromatografsku dimenziju provedeno engl. selective comprehensive 2D-LC načinom rada). Legenda: plavo – prvi „rez“, zeleno – treći „rez“ i ljubičasto deseti „rez“.

Za identifikaciju onečišćenja lakton daptomicin, β-izomer daptomicin i anhidro-daptomicin korišten je maseni spektrometar s Q-TOF analizatorom. Kako bi kromatografska metoda bila kompatibilna s masenim detektorom uklonjen je fostat iz eluata tijekom izokratne elucije unutar prve dvije minute ²D metode te su uzorci snimani na masenom detektoru isključivo tijekom izvođenja gradijentnog programa kako bi se smanjila njegova kontaminacija fosfatnim puferom (Slika 23).

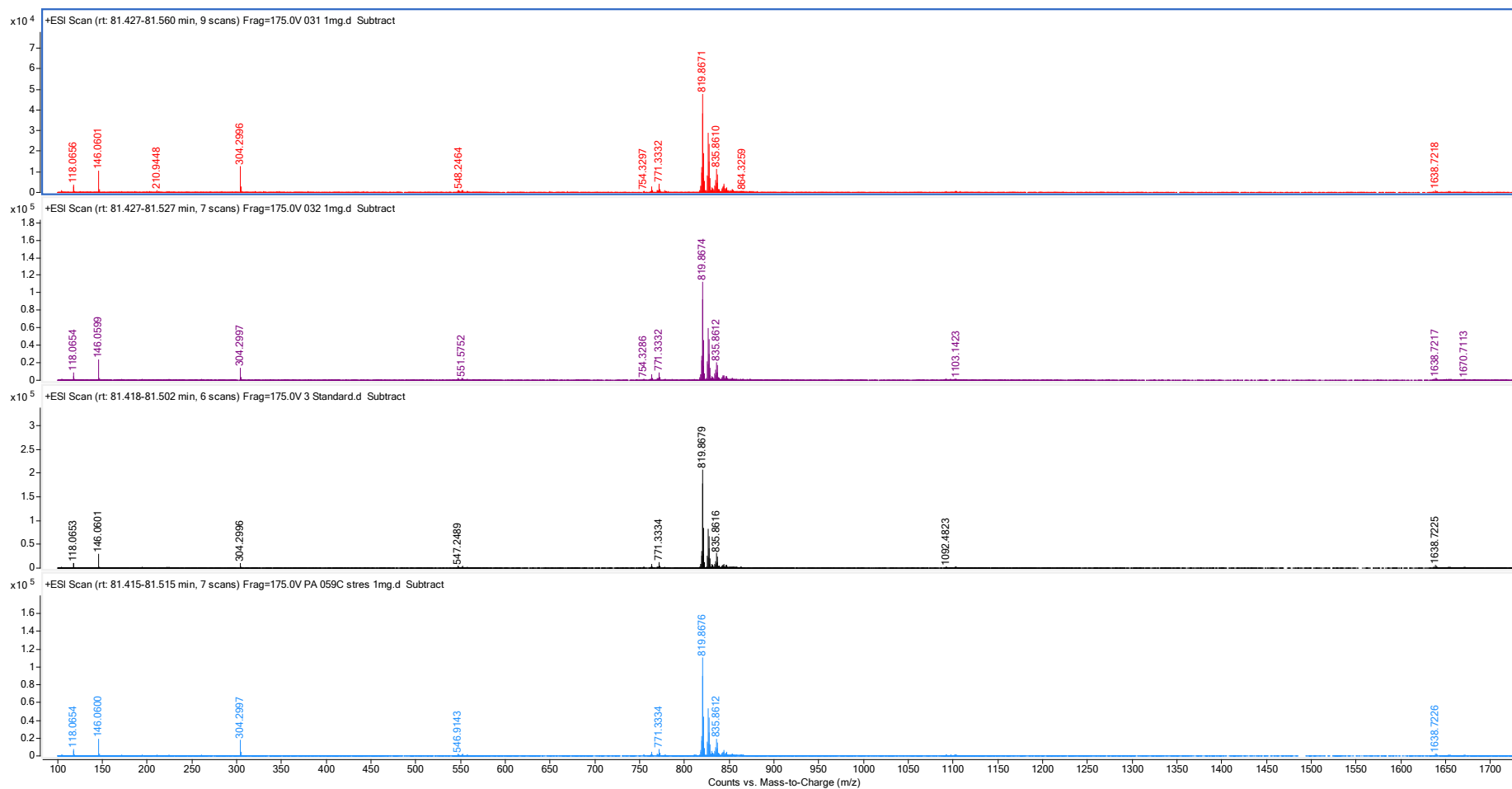
Na Slikama 24. – 26. prikazani su maseni spektri ispitanih onečišćenja daptomicina. U MS spektru lakton daptomicina u otopini standarda te uzorcima vidljiv je pseudomolekulski ion $[M+H]^+$ čija m/z vrijednost iznosi 1638,72. Najintenzivniji signal u spektrima je dvostruko nabijeni ion čija m/z vrijednost iznosi 819,87. U MS spektru dobivenog analizom uzorka PA059C vidljiv je i signal trostruko nabijenog iona čija m/z vrijednost iznosi 546,91.

U MS spektru β -izomera daptomicina u otopini standarda te uzorcima vidljiv je pseudomolekulski ion $[M+H]^+$ čija m/z vrijednost iznosi 1620,71. Također su vidljivi signali dvostruko i trostruko nabijenih iona čije m/z vrijednosti iznose 810,86 odnosno 540,91.

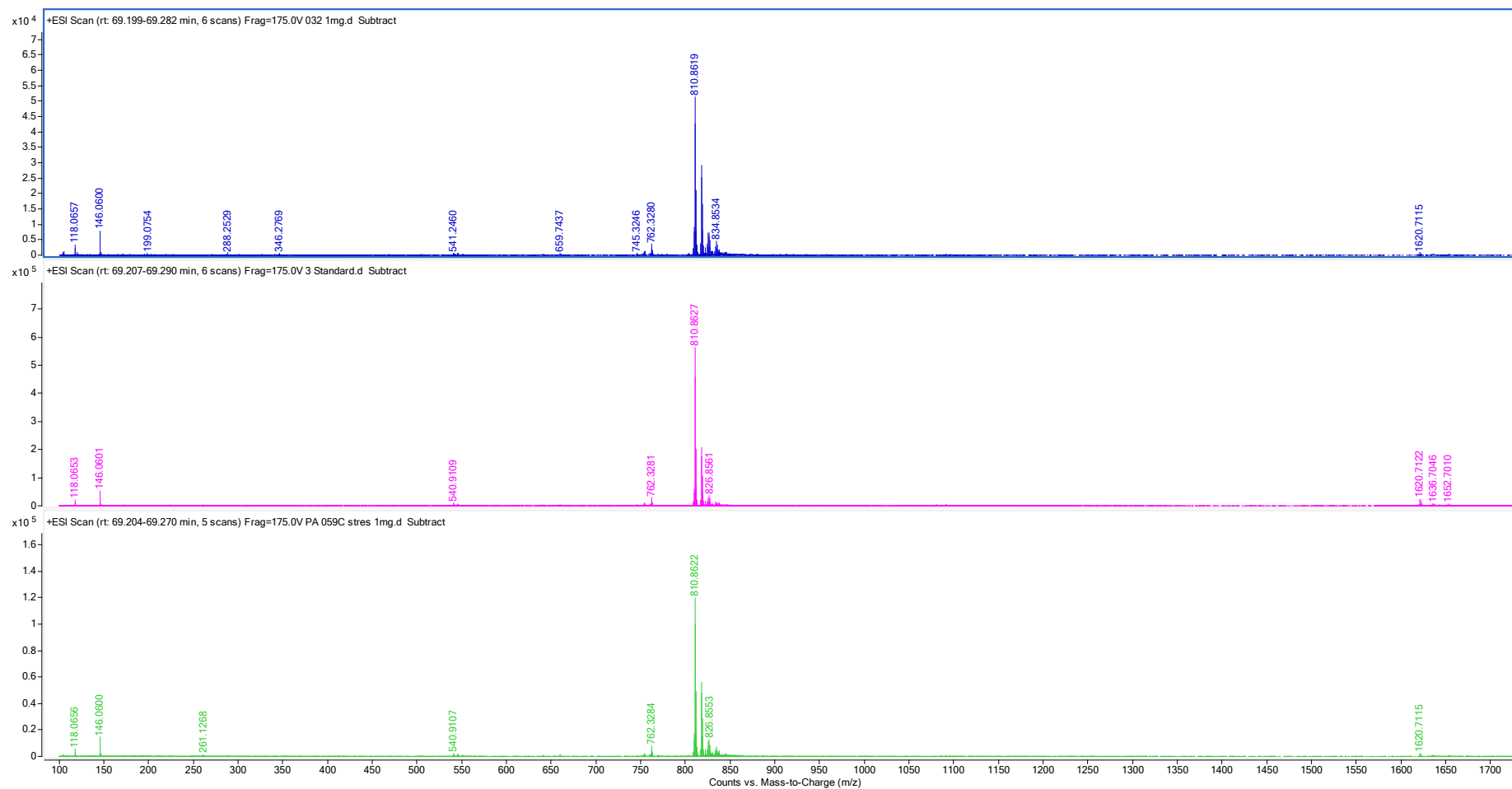
Kao u prethodno dva opisana MS spektra i u spektru anhidro-daptomicina vidljivi su signali pseudomolekulskog iona te dvostruko i trostruko nabijenih iona pri m/z vrijednostima 1602,70, 801,86 i 534,90.



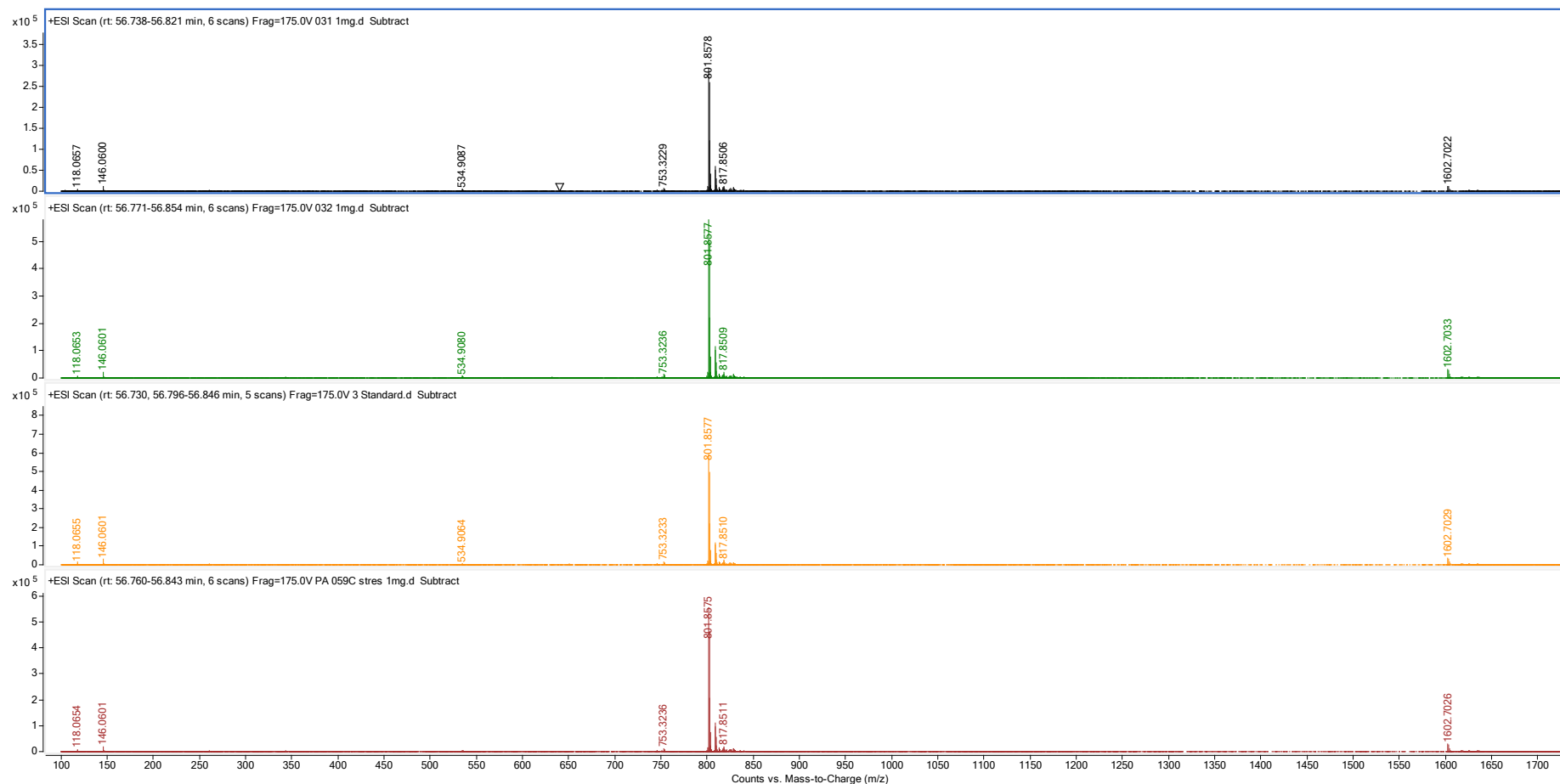
Slika 23. Kromatogram toka ukupnih iona. Legenda: uzorak Xel540/02-17/031 (crno), uzorak Xel540/02-17/032 (crveno), standarda otopina tri poznata onečišćenja (zeleno), uzorka PA059C (plavo).



Slika 24. Maseni spektar onečišćenja lakton daptomicina dobiven analizom: uzorka Xel540/02-17/031 (crveno), uzorka Xel540/02-17/032 (ljubičasto), standardne otopine onečišćenja (crno) i uzorka PA059C (plavo).



Slika 25. Maseni spektar onečišćenja β -izomer daptomicina dobiven analizom: uzorka Xel540/02-17/032 (plavo), standardne otopine onečišćenja (rozo) i uzorka PA059C (zeleno).



Slika 26. Maseni spektar onečišćenja anhidro-daptomicina dobiven analizom: uzorka Xel540/02-17/031 (crno), uzorka Xel540/02-17/032 (zeleno), standardne otopine onečišćenja (žuto) i uzorka PA059C (smeđe).

Tablica 11. Teorijski izračunati i eksperimentalno utvrđene m/z vrijednosti u spektrima onečišćenja daptomicina.

| Lakton daptomicina | | | XeI540/02-17/031 | | | XeI540/02-17/033 | | PA 059C | | Standard | |
|-----------------------------|------------------|------------------------|------------------------------|--------------|------------------------------|------------------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|------|
| Specija | Formula | Teorijski (m/z) | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | |
| (M+H)+ | C72 H103 N17 O27 | 1638,7282 | 1638,7218 | 3,91 | 1638,7217 | 3,97 | 1638,7226 | 3,42 | 1638,7225 | 3,48 | |
| (M+NH4)+ | | 1655,7548 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+Na)+ | | 1660,7102 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+K)+ | | 1676,6841 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2H)+2 | | 819,8677 | 819,8671 | 0,73 | 819,8674 | 0,37 | 819,8676 | 0,12 | 819,8679 | 0,24 | |
| (M+2(NH4))+2 | | 836,8943 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2Na)+2 | | 841,8497 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2K)+2 | | 857,8236 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+3H)+3 | | 546,9143 | NP | NP | NP | NP | 546,9143 | 0,00 | NP | NP | |
| β -izomer daptomicina | | | XeI540/02-17/031 | | | XeI540/02-17/033 | | PA 059C | | Standard | |
| Specija | Formula | Teorijski (m/z) | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | |
| (M+H)+ | C72 H101 N17 O26 | 1620,7176 | NP | NP | 1620,7115 | 3,76 | 1620,7115 | 3,76 | 1620,7122 | 3,33 | |
| (M+NH4)+ | | 1637,7442 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+Na)+ | | 1642,6996 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+K)+ | | 1658,6735 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2H)+2 | | 810,8625 | NP | NP | NP | 810,8619 | 0,74 | 810,8622 | 0,37 | 810,8627 | 0,25 |
| (M+2(NH4))+2 | | 827,889 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2Na)+2 | | 827,889 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2K)+2 | | 848,8183 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+3H)+3 | | 540,9107 | NP | NP | NP | NP | 540,9107 | 0,00 | 540,9109 | 0,37 | |
| Anhidro-daptomicin | | | XeI540/02-17/031 | | | XeI540/02-17/033 | | PA 059C | | Standard | |
| Specija | Formula | Teorijski (m/z) | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | Eksperimentalni (m/z) | Δ ppm | |
| (M+H)+ | C72 H99 N17 O25 | 1602,7071 | 1602,7022 | 3,06 | 1602,7033 | 2,37 | 1602,7026 | 2,81 | 1602,7029 | 2,62 | |
| (M+NH4)+ | | 1619,7336 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+Na)+ | | 1624,689 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+K)+ | | 1640,663 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2H)+2 | | 801,8572 | 801,8578 | 0,75 | 801,8577 | 0,62 | 801,8575 | 0,37 | 801,8577 | 0,62 | |
| (M+2(NH4))+2 | | 818,8837 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2Na)+2 | | 823,8391 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+2K)+2 | | 839,8131 | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | |
| (M+3H)+3 | | 534,9072 | 534,9087 | 2,80 | 534,9080 | 1,50 | NP | NP | 534,9064 | 1,50 | |

Pretraživani su protonirani oblici pseudomolekulskih iona dvostruko i trostruko nabijenih specija kao i aduktori s ionima kalija, natrija i amonija (Tablica 11). Međutim navedeni ioni s teorijskim omjerom mase i naboja nisu pronađeni u testiranim uzorcima.⁽²³⁾

Na temelju relativnih vremena zadržavanja kromatografskih pikova u prvoj dimenziji i vremena zadržavanja u drugoj kromatografskoj dimenziji, te masenih spektra dobivenih analizom standardne otopine onečišćenja moguće je potvrditi prisustvo navedenih razgradnih onečišćenja daptomicina u ispitanim uzorcima (Tablica 5).

5. RASPRAVA

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija je napredna tehnika razdvajanja sastavnica složenih uzorka. Njezna mogućnost razdvajanja posebice dolazi do izražaja kada je moguće u potpunosti primijeniti ortogonalnost u separacijskim koracima. Postoje dvije glavne metode rada dvodimenzionalne kromatografije, engl. *heart cutting* (LC - LC) i engl. *comprehensive* (LC x LC) način rada. Vrlo često potpunu ortogonalnost nije moguće zadovoljiti zbog različitih izazova koji se javljaju pri miješanju otapala različite viskoznosti, gustoće i elucijske snage. Suvremena znanost i tehnologija je pronašla nekoliko rješenja kako provesti analize i u takvim sustavima gdje otapala nisu u potpunosti komplementarna, te pojam aktivna modulacija podrazumijeva svaki pokušaj manipulacije uzorkom ili pokretnom fazom kako bi uzorak ili eluat bili prikladni za analizu u drugoj kromatografskoj dimenziji. Pod ovaj pojam ubrajaju se aktivna modulacija otapala - ASM, aktivna modulacija posredovana nepokretnom fazom - SPAM, modulacija potpomognuta evaporacijom pomoću vakuma – VAM i druge.

Dodatan izazov kod razvoja 2D-LC metoda je brzina protoka pokretne faze u prvoj dimenziji, posebice ukoliko se drugom dimenzijom ispituje čistoća pikova prve dimenzije. Kod visokih protoka u prvoj dimenziji vrlo često izrezana frakcija ne može uhvatiti cijeli kromatografski pik zbog konfiguracije samih instrumenata. U tom slučaju pik se „reže“ u vrhu i šalje na analizu u drugu dimenziju. Zaključak o čistoći pika donosi se samo na temelju analize jedne od njegovih frakcija (središnjeg dijela pika) što može dovesti do pogrešnog zaključka budući da analiti mogu koeluirati i u drugim frakcijama. Prema tome, ukoliko je u prvoj dimenziji korišten visok protok pokretne faze prikladno je primijeniti engl. *selective comprehensive* (sLC x LC) način uzorkovanja kako bi se provjerila čistoća pika u cijeloj njegovoj širini. Kod nižih protoka ili ukoliko petlja za spremanje frakcija ima veliki kapacitet, moguće je provesti uzorkovanje područja koje sadrži nekoliko pikova, te može doći do njihovog ponovnog miješanja i gubitka željenog učinka razdvajanja. Ova pojava se naziva poduzorkovanje (engl. *undersampling*).

2D-LC tehnika je učinkovita separacijska tehnika, međutim visoke zahtjeve za selektivnost i osjetljivost pojedinih analitičkih postupaka ni ova napredna tehnika nije u mogućnosti zadovoljiti. Kako bi se tome doskočilo nakon razdvajanja analita u dvije kromatografske dimenzije potrebno je analite analizirati masenom spektrometrijom. Dodatan izazov kod razvoja ovih metoda je pronalaženja kromatografskih uvjeta u drugoj dimenziji koji su kompatibilni s masenim spektrometrom. Pojedini istraživači maseni detektor računaju kao dodatnu dimenziju razdvajanja,⁽¹⁷⁾ te se vrlo često upravo masena spektrometrija spreže s dvodimenzionalnom kromatografijom u svrhu identifikacije i sakupljanja više informacija i znanja o analitu.^(12,13,15,17,21,22)

Kada se sagleda sve gore navedeno jasno je da za razvoj 2D-LC/MS metode potrebno dobro poznavanje analitičkih postupaka i iskustvo analitičara.

U ovom radu razvijena je 2D-LC/MS metoda za identifikaciju onečišćenja daptomicina: lakton daptomicina, β -izomer daptomicina i anhidro-daptomicin (strukturne formule onečišćenja prikazane su u Poglavlju 3. Tablici 5). Kako bi se postigla prikladna selektivnost metode razvoj je započeo modifikacijom poznate metode koja je korištena u prvoj dimenziji. Razdvajanje analita provedeno je primjenom obrnutofazne kromatografske kolone (C8). Na temelju dobivenih kromatograma moguće je utvrditi kako su onečišćenja lakton daptomicina i β -izomer daptomicina hidrofilniji od djelatne tvari daptomicina dok onečišćenje anhidro-daptomicin ima duže vrijeme zadržavanja na obrnutofaznoj koloni te je lipofilniji (Slike 6. – 8.). Kromatografskim postupkom u prvoj dimenziji postignuto je zadovoljavajuće razdvajanje ispitanih onečišćenja te je druga dimenzija primijenjena za provjeru čistoće pikova onečišćenja. Za optimizaciju kromatografskog postupka u drugoj dimenziji korištene su također obrnutofazne kromatografske kolone (C18). U odnosu na prvu dimenziju u drugoj su korištene kraće kolone (od 75 do 150 mm), užeg promjera (od 2,1 do 3,0 mm) te manjih čestica punila (1,7 μ m). Za „povezivanje“ dviju dimenzija korišten je prvo engl. *multi heart cutting* (mLC -

LC) način rada. Međutim, utvrđeno je kako su svi „rezovi“ iz prve dimenzije bili „čisti“ odnosno nije došlo do preklapanja kromatografskih pikova osim u uzorku XEL540/02-17/032. Naime, simetrija pika β -izomera daptomicina je upućivala na koeluiranje navedenog onečišćenja i nepoznate sastavnice uzorka.

Engl. *heart cutting* i *multiple heart cutting* načini rada su tehnike rezanja koje su bliže u primjeni svakom analitičaru, no dobivene informacije su donekle ograničene. S druge strane, engl. *selective comprehensive* načinom rada moguće je dobiti više informacija na temelju kojih je moguće provjeriti čistoću željenog pika ili užeg područja ¹D kromatograma.

Kako bi se utvrdila čistoća navedenog kromatografskog pika primijenjeno je uzorkovanje u visokoj rezoluciji (engl. *High Resolution Sampling*) odnosno engl. *selective comprehensive 2D-LC* način rada. Primjenom ovog načina rada potvrđeno je preklapanje pikova onečišćenja β -izomera daptomicina i drugih strukturno sličnih onečišćenja u uzorku XEL540/02-17/032. Konačno, za identifikaciju onečišćenja korišten je maseni spektrometar. Budući da je kromatografska metoda u prvoj dimenziji uključivala uporabu pufera kao sastavnice pokretne faze bilo je potrebno modificirati metodu druge dimenzije kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije detektora. Stoga je u gradijentni program druge dimenzije postavljen segment od dvije minute tijekom kojih pokretna faza nije bila usmjerena na maseni spektrometar. Masenom spektrometrijom potvrđen je identitet onečišćenja daptomicina: lakton daptomicina, β -izomer daptomicina i anhidro-daptomicin u tri ispitana ljekovita oblika budući da su isti signali nađeni u spektrima dobivenim analizom standardnih otopina i uzoraka bili sukladni (Slike 24. – 26.). Štoviše, iste signale predložio je i računalni program (Tablica 11).

6. ZAKLJUČCI

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija je napredna analitička tehnika kojom je moguće razdvojiti analite iz složenih smjesa. Smatra se da broj razdvojenih sastavnica primjenom ove tehnike može doseći i do 10 000. Upravo stoga ova tehnika je izbor za analizu složenih uzoraka kao i onih koji sadrže strukturno slične sastavnice. Premda se aktivna modulacija razvila zadnja među dvodimenzionalnim kromatografskim tehnikama, njena uloga u analitici lijekova sve više raste, posebice pronalaskom analitičkih rješenja za probleme poput smanjene osjetljivosti i nekompatibilnosti pokretnih faza.

U ovom radu razvijena je 2D-LC/MS metoda za identifikaciju tri razgradna onečišćenja daptomicina u ljekovitim oblicima. Primjenom dva načina rada engl. *multiple heart cutting* (*mLC - LC*) i selektivne sveobuhvatne dvodimenzionalne kromatografije engl. *selective comprehensive* (*sLC x LC*) pratila se čistoća dobivenih kromatografskih pikova te su se usporedile prednosti kao i nedostaci svake od njih.

7. LITERATURA

1. Totoli EG, Garg S, Salgado HRN. Daptomycin: Physiochemical, Analytical, and Pharmacological Properties. *The Drug Monit*, 2015;6:699-710
2. Sauermann R, Rothenburger M, Grainger W, Joukhadar C. Daptomycin: A Review 4 Years after First Approval. *Pharmacology*, 2008;81:79-91
3. US 6,696,412 B1, High purity lipopeptides, lipopeptide micelles and process for preparing same, Inventor: Kelleher TJ, Lai J, DeCoursey JP, Lynch P, Zenoni M, Tagliani A. Original Assignee: Cubist Pharmaceuticals Inc (2004).
4. Carr PW, Stoll DR. ur. Two-dimensional liquid Chromatography. Principles, Practical implementation and sppliectiond. Primer; 2015
5. Pirok BWJ, Stoll DR, Schoenmakers PJ. Recent Developments in Two-Dimensional Liquid Chromatography: Fundamental Improvements for Practical Applications. *Anal.Chem* 2019; 91: 240-263
6. Pirok BWJ, Gargano AFG, Schoenmakers PJ. Optimizing separations in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J Sep. Sci.* 2018; 41: 68-98.
7. Ji S, Wang S, Xu H i sur. The application of on-line two-dimensional liquid chromatography (2DLC) in the chemical analysis of herbal medicines. *Jurnal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018; 160: 301-313.
8. Iguinez M, Heinisch S. Two-dimensional liquid chromatography in pharmaceutical analysis. Instrumental aspects, trends and applications. *Jurnal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017;145: 482-503
9. Oxford Academic: Liquid chromatography problem solving and troubleshooting. Dostupno na <https://academic.oup.com/chromsci/article/40/7/417/341022>, pristup stranici 6. svibanja 2021.

10. Wilson NS, Gilroy J, Dolan JW, Snyder LR. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. VI. Columns with embedded or end-capping polar groups. *J Chromatogr A*. 2004; 1026: 91-100.
11. Wilson NS, Nelson MD, Gilroy J, Dolan JW, Snyder LR, Carr PW. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: II Effect of a change in conditions. *J Chromatogr A*. 2002; 961: 195-215.
12. Camperi J, Goyon A, Guillarme D, Zhang K, Stella C. Multi-dimensional LC-MS: the next generation characterization of antibody-based therapeutics by unified online bottom-up, middle-up and intact approaches. *Analyst*, 2021;146:747-769
13. Pirok BWJ, Uijl MJ, Moro G i sur. Characterization of Dye Extracts from Historical Cultural-Heritage Objects Using State-of-the-Art Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography and Mass Spectrometry with Active Modulation and Optimized Shifting Gradients. *Anal. Chem*. 2019; 91: 3062-3069.
14. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*, 2012; 402:231-247
15. Sheng N, Zheng H, Xiao Y, Wang Z, Li M, Zhang J. Chiral separation and chemical profile of Dengzhan Shengmai by integrating comprehensive with multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. 2017;1517:97-107.
16. Cecchi T, Passamonti P. Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents. 2009;1216:1789-1797
17. Qian Y, Li W, Wang H i sur. A four-dimensional separation approach by offline 2D-LC/IM-TOF-MS in combination with database-driven computational peak annotation facilitating the in-depth characterization of the multicomponents from *Atractylodis*

- Macrocephalae Rhizoma (*Atractylodes macrocephala*). *Arabian Journal of Chemistry*, 2021;14,1-14
18. Gargano AFG, Duffin M, Navarro P, Schoenmakers PJ. Reducing dilution and Analysis Time in Online Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography by Active Modulation. *Anal. Chem.* 2016; 88: 1785-1793.
19. Liigand P, Liigand J, Kaupmees K, Kruve A. 30 Years of research on ESI/MS response: Trends, contradictions and application. *Analytica Chimica Acta*, 2021;1152
20. Alsaleh M, Barbera TA, Andrews RH i sur. Mass Spectrometry: A Guide for the Clinician. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2019;9:597-606
21. Kormoczi T, Szabo I, Farkas E. Heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry for determination of N,N-dimethyltryptamine in rat plasma and brain; Method development and application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020; 191:1-10
22. Roca LS, Gargano AFG, Schoenmakers PJ. Development of comprehensive two-dimensional low-flow liquid-chromatography setup coupled to high-resolution mass spectrometry for shotgun proteomics. *Analytica Chimica Acta*, 2021; 1156:1-10
23. Steckel A, Schlosser G. An Organic Chemist`s Guide to Electrospray Mass Spectrometric Structure Elucidation. *Molecules*, 2019; 24:611

7.1 Popis kratica

| Kratica | Engleski | Hrvatski |
|-----------------|---|--|
| ¹ D | First dimension | Prva dimenzija |
| ² D | Second dimension | Druga dimenzija |
| 2D-LC | Two dimensional liquid chromatography | Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija |
| ASM | Active Solvent Modulation | Aktivna modulacija otapala |
| CO ₂ | Carbon Dioxide | Ugljikov dioksid |
| DAD | Diode array detector | Detektor s nizom dioda |
| ESI | Electrospray ionization | Ionizacija elektroraspršenjem |
| HILIC | Hydrophilic interaction liquid chromatography | Tekućinska kromatografija hidrofilnih interakcija |
| HPLC | High performance liquid chromatography | Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti |
| IC | Ion chromatography | Ionsko izmjenjivačka kromatografija |
| MS | Mass spectrometry | Masena spektrometrija |
| NaCl | Sodium chloride | Natrijev klorid |
| PEG | Polyethylene glycol | Polietilen glikol |
| RPLC | Reverse phase liquid chromatography | Kromatografija obrnutih faza |
| SEC | Size exclusion chromatography | Tekućinska kromatografija sa razdvajanjem po masi |
| SPAM | Stationary Phase assisted Modulation | Modulacija potpomognuta stacionarnom fazom |
| TFA | Trifluoroacetic acid | Trifluor octena kiselina |
| UPLC | Ultra high performance liquid chromatography | Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti |
| VEM | Vacuum-Evaporation modulation | Modulacija potpomognuta evaporacija pomoću vakuma |
| VWD | Variable Wavelength Detector | Detektor s varijabilnim valnim duljinama |