Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina

Sertić, Miranda

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:060606

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Miranda Sertić

NOVE KAPILARNO ELEKTROFORETSKE I KROMATOGRAFSKE METODE U ANALITICI STATINA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013



University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Miranda Sertić

NEW CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND CHROMATOGRAPHY METHODS FOR ANALYSIS OF STATINS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MIRANDA SERTIĆ

NOVE KAPILARNO ELEKTROFORETSKE I KROMATOGRAFSKE METODE U ANALITICI STATINA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Biljana Nigović

Zagreb, 2013

University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Miranda Sertić

NEW CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND CHROMATOGRAPHY METHODS FOR ANALYSIS OF STATINS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. dr. sc. Biljana Nigović

Zagreb, 2013

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u sklopu projekta „Istraživanje novih metoda u analitici ljekovitih i bioaktivnih tvari“ Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa
(006-0061117-1240).

ZAHVALE

Prof. dr. sc. Biljani Nigović, mojoj mentorici, što me od prvog dana usmjeravala prema ovom cilju. Njezina vrata su mi uvijek bila otvorena za znanstvenu raspravu, ideju i pomoć kod svakoga kromatografskog pika koji je "zapeo". Nakon što su svi eksperimenti bili napravljeni, a ovaj doktorski rad napisan u svome prvotnom obliku, svojim čitanjem i savjetima je pridonijela da u svome trajnom, zapisanom obliku bude još bolji. Svoje veliko znanje o kemiji i bogato znanstveno iskustvo nesebično je dijelila sa mnom, pazeći da mi prenese što više, a istovremeno me puštajući da se sama borim i učim.
Profesorice, nadam se da ću izrasti u tako kvalitetnu nastavnicu, znanstvenicu i mentoricu poput Vas!

Doc. dr. sc. Ani Mornar Turk, mojoj prijateljici, kolegici i najbližoj suradnici, za svu pomoć koju mi je pružila tijekom izrade ovoga doktorskog rada. Bez njezine pomoći on sigurno ne bi bio tako kvalitetan.
Ana, hvala ti za suosjećanje oko svake puknute kapilare, za sve pikove koje smo zajedno identificirale, za čitanje ovoga doktorskog rada i sve vrijedne sugestije, za znanje koje si godinama mukotrpno stjecala, a onda ga sa mnom podijelila. Hvala ti za prijateljstvo!

Programu CEEPUS na stipendiji za odlazak na Sveučilište u Ljubljani i stjecanje prvih znanja i iskustava na kapilarnoj elektroforezi.
Hvala doc. dr. sc. Radi Injacu, doc. dr. sc. Nini Kočevar Glavač, prof. dr. sc. Sami Kreftu, prof. dr. sc Borutu Štrukelju što su me puno, puno toga naučili.

Hrvatskoj zakladi za znanost što mi je dodijelila stipendiju za doktorande i omogućila odlazak na Institut za kemijsku metodologiju u Rimu, Italija, gdje sam produbila svoje kapilarnoelektroforetsko znanje. Prof. dr. sc. Danillu Corradiniu, dr. sc. Antonelli De Rossi i dr. sc. Isabelli Nicoletti na ukazanoj prilici i suradnji.

Dr. sc. Biserki Cetini-Čižmek veliko hvala za donirane standarde onečišćenja atorvastatina.

Tvrtki Pliva te Agenciji za lijekove i medicinske proizvode za aktivne ljekovite supstancije i standarde.

Suradnicama sa Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova koje su pridonijele ugodnoj radnoj atmosferi.

Ivani, Zrinki, Ivi M., Tajani, Ivi G., Kristini, Maji, Danieli, Aniti….Što su bile i prijateljice, a ne samo kolegice.

Dr. sc. Slavenu Crnkoviću, Maji Porodec i Tini Blažević za sve radove koji u Hrvatskoj nisu bili dostupni.

Dobrili Zvonarek, prof., na lektoriranju ovog rada.

Maji Porodec, mojoj kolegici i prijateljici još od školskih klupa, za sve pročitane sažetke, pregledane postere i pomoć oko tehničkog uređivanja ovoga doktorskog rada.
Majo, hvala ti za prijateljstvo!

Mojim roditeljima na bezrezervnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju od najmanjih nogu, na logističkoj pomoći bez koje ovaj rad sigurno ne bi ugledao svijetlo dana.
Mama i tata, hvala vam za sve!

Mojem suprugu što mi je bio podrška tijekom škole, studija te izrade ovoga doktorskog rada.
Hvala ti za strpljenje, pomoć i ljubav!
Mome sinu za sve trenutke njegova djetinjstva koje sam propustila dok se "kapilara ispirala". Mama će ti sve nadoknaditi!
Josipe i Luka, volim vas!

Miranda

Mojoj obitelji

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1 STATINI 2
1.1.1 Mehanizam djelovanja statina 3
1.1.2 Vrsta i podjele statina 3

1.2 ONEČIŠĆENJA U LIJEKOVIMA 5

1.3 CRVENA FERMENTIRANA RIŽA 7

1.4 KAPILARNA ELEKTROFOREZA 11
1.4.1 Načelo tehnike kapilarne elektroforeze 11
1.4.2 Vrste kapilarne elektroforeze 15
1.4.3 Primjena kapilarne elektroforeze u farmaciji 18

1.5 VEZANI SUSTAV TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI I MASENE SPEKTROMETRIJE 20
1.5.1 Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda 21
1.5.2 Fluorescencijski detektor 22
1.5.3 Maseni spektrometar 22
1.5.4 Primjena vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (LC-MS) u analitici lijekova 24

1.6 PREGLED ANALITIČKIH METODA U ISTRAŽIVANJU STATINA 25

2. OBRAZLOŽENJE TEME 34

3. MATERIJALI I METODE 37

3.1 MATERIJALI I KEMIKALIJE 38
3.1.1 Standardne supstancije 38
3.1.2 Uzorci aktivnih farmaceutskih supstancija i gotovih ljekovitih oblika 38
3.1.3 Uzorci proizvoda s crvenom fermentiranom rižom 39
3.1.4 Ostale korištene supstancije i kemikalije 39

3.2 APARATURE I PRIBOR 40
3.2.1 Radni instrumenti 40
3.2.2 Pribor 40
3.2.3 Programski paketi 42

3.3 ANALITIČKE METODE 42
3.3.1 CE metoda za istovremenu analizu statina 42
3.3.2 Određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja MEKC metodom 45
3.3.3 Određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja HPLC-DAD- MS^n metodom 48
3.3.4 Analiza proizvoda s crvenom fermentiranom rižom MEKC metodom 49
3.3.5 Analiza proizvoda s crvenom fermentiranom rižom HPLC-DAD-FLD-MS^n metodom 53
3.3.6 Analiza proizvoda s crvenom fermentiranom rižom MS metodom primjenom izravnog injektiranja 55

4. REZULTATI I RASPRAVA 56

4.1 RAZVOJ NOVE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ISTOVREMENU ANALIZU STATINA 57
4.1.1 Optimizacija vrste i pH pufera 57
4.1.2 Utjecaj surfaktanta 58
4.1.3 Utjecaj organskog otapala 59
4.1.4 Optimizacija koncentracije SDS-a i boratnog pufera 60
4.1.5 Utjecaj temperature kapilare 64
4.1.6 Utjecaj primijenjenog napona 65
4.1.7 Valna duljina detektora 65
4.1.8 Unutarnji standard 66
4.1.9 Validacija metode 66
4.1.10 Primjena novorazvijene metode za analizu gotovih ljekovitih oblika statina 71
4.1.11 Usporedba novorazvijene MEKC metode za analizu statina s postojećim analitičkim metodama 72

4.2 RAZVOJ NOVE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU ATORVASTATINA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA 75
4.2.1 Optimizacija vrste i pH pufera 76
4.2.2 Optimizacija koncentracije boratnog pufera i SDS-a 78
4.2.3 Utjecaj organskog otapala 80
4.2.4 Optimizacija primijenjenog napona 81
4.2.5 Optimizacija vremena injektiranja 82
4.2.6 Utjecaj tipa kapilare i valne duljine detektora 83
4.2.7 Unutarnji standard 84
4.2.8 Validacija metode 85
4.2.9 Primjena novorazvijene metode za analizu aktivne ljekovite supstancije i gotovoga ljekovitog oblika atorvastatina 89

4.3 RAZVOJ NOVE HPLC-DAD-MS^n METODE ZA ANALIZU ATORVASTATINA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA 91
4.3.1 Optimizacija uvjeta HPLC-DAD-MS^n metode 91
4.3.2 ESI-MS^n analiza atorvastatina 94
4.3.3 ESI-MS^n analiza dijastereomera atorvastatina 98
4.3.4 ESI-MS^n analiza desfluoroatorvastatina 99
4.3.5 ESI-MS^n analiza laktona atorvastatina 101
4.3.6 ESI-MS^n analiza metilnog estera atorvastatina 102
4.3.7 Validacija metode 103
4.3.8 Primjena novorazvijene metode za analizu aktivne ljekovite supstancije i gotovoga ljekovitog oblika atorvastatina 106
4.3.9 Identifikacija ostalih prisutnih onečišćenja atorvastatina 109
4.3.10 Usporedba novorazvijene MEKC i HPLC-DAD-MS^n metode za određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja s postojećim analitičkim metodama 118

4.4 RAZVOJ NOVE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM 121
4.4.1 Optimizacija postupka pripreme standarda lovastatin β-hidroksi kiseline 121
4.4.2 Optimizacija postupka pripreme smjese standarda za analizu kapilarnom elektroforezom 123
4.4.3 Optimizacija pH pufera 123

4.4.4 Optimizacija koncentracije pufera 125
4.4.5 Optimizacija koncentracije SDS-a 127
4.4.6 Utjecaj primijenjenog napona 130
4.4.7 Valna duljina detektora 131
4.4.8 Unutarnji standard 132
4.4.9 Validacija metode 133
4.4.10 Primjena novorazvijene metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom 137

4.5 RAZVOJ NOVE HPLC-DAD-FLD-MS^n METODE ZA ANALIZU PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM 143
4.5.1 Optimizacija uvjeta HPLC-DAD-FLD-MS^n metode 143
4.5.2 Validacija metode 148
4.5.3 Primjena novorazvijene metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom 152
4.5.3.1 Mehanizam fragmentacije lovastatina 153
4.5.3.2 Mehanizam fragmentacije lovastatin β-hidroksi kiseline 156
4.5.3.3 Identifikacija ostalih monakolina i njihov mehanizam fragmentacije 157
4.5.3.4 Određivanje sadržaja monakolina 161
4.5.3.5 Određivanje sadržaja citrinina 163
4.5.3.6 Ispitivanje ujednačenosti sadržaja između serija proizvoda s crvenom fermentiranom rižom 164
4.5.4 Usporedba novorazvijene MEKC i HPLC-DAD-FLD-MS^n metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom s postojećim analitičkim metodama 164

4.6 RAZVOJ NOVE BRZE METODE MASENE SPEKTROMETRIJE PRIMJENOM IZRAVNOG INJEKTIRANJA ZA ANALIZU MONAKOLINA 167

4.7 OSVRT NA DOBIVENE REZULTATE ANALIZE PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM 172

5. ZAKLJUČAK 175

6. LITERATURA 179

7. PRILOG 196

8. ŽIVOTOPIS 243

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 246

BASIC DOCUMENTATION CARD 247

1. UVOD

1.1 STATINI

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji upravo su koronarne bolesti, odnosno ishemijska bolest srca te moždani udar i druge cerebrovaskularne bolesti, prvi uzročnik smrtnosti u svijetu (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html). Jedan od glavnih čimbenika za razvoj kardiovaskularnih bolesti je hiperlipidemija, povišena razina kolesterola, lipoproteina i triglicerida u plazmi. Naime, brojna ispitivanja su dokazala vezu između koncentracije kolesterola, triglicerida te drugih lipida u plazmi i razvoja ateroskleroze, odnosno kardiovaskularnih bolesti. Prevencija i liječenje hiperlipidemija temelji se na dijeti, tjelovježbi i promjeni načina života, a zatim slijedi farmakoterapija. Cilj medikamentozne terapije je sniženje koncentracije ukupnoga, „lošega" aterogenog LDL-kolesterola i triglicerida, uz povećanje razine „dobrog" HDL-kolesterola. Postoji nekoliko skupina hipolipemika, a najvažniji su statini, zatim derivati fibrične kiseline (gemfibrozil, klofibrat, fenofibrat), adsorbensi žučnih kiselina (kolestiramin, kolestipol), nikotinska kiselina i njezini derivati te ostali lijekovi, poput inhibitora apsorpcije kolesterola (ezetimib) i omega-3 masnih kiselina, ili kombinirani lijekovi (primjerice ezetimib i simvastatin) (Nigović i sur., 2007). Budući da je prepoznata opasnost hiperlipidemija kao jednog od čimbenika koji dovodi do razvoja koronarnih bolesti, velika se pozornost pridaje prevenciji i pravovremenoj terapiji hipolipemicima. Kao što je već spomenuto, najvažnija skupina hipolipemika su upravo statini koji su, zbog svoje učinkovitosti u sekundarnoj prevenciji infarkta miokarda i cerebrovaskularnog inzulta u bolesnika koji imaju aterosklerotsku bolest, postali jedni od najčešće propisivanih i korištenih lijekova u svijetu. Osim u sekundarnoj prevenciji, statini se koriste i u primarnoj prevenciji arterijske bolesti kod bolesnika visokog rizika uslijed povišene koncentracije kolesterola u plazmi, osobito ako postoje drugi čimbenici rizika za razvoj ateroskleroze poput pušenja, tjelesne neaktivnosti, hipertenzije i dijabetesa (Rang i sur., 2006). Učinkovitost statina u smanjenju morbiditeta i mortaliteta dokazana je u nekoliko velikih, nasumičnih, placebo-kontroliranih studija (Almansob i sur., 2012; Bybee i sur., 2008; Heart protection Study Collaborative Group, 2002; Sacks i sur., 1996).

Budući da su se zadnjih godina preporučene koncentracije ukupnog kolesterola, triglicerida i LDL-kolesterola snižavale, sve je veća populacija koja se smatra ugroženom, odnosno sve je veći broj ljudi koji bi trebala biti na terapiji statinima. Stoga ne čudi činjenica da je primjena statina u stalnom porastu diljem svijeta. Nadalje, terapija statinima je svakodnevna i dugotrajna, pa čak i doživotna. Osim toga, u nekim zemljama svijeta, primjerice u Sjedinjenim Američkim Državama i Velikoj Britaniji, manje doze statina mogu

se kupiti čak i bez recepta liječnika. Kako je za svaki lijek važno da je djelotvoran, siguran i kvalitetan, postoji stalna potreba za razvijanjem novih, boljih, osjetljivijih i selektivnijih metoda, kako bi se osigurala kontrola kvalitete i ispitivanje čistoće statina, kao jednih od najčešće korištenih lijekova.

1.1.1 Mehanizam djelovanja statina

Statini svoje hipolipemičko djelovanje zasnivaju na inhibiciji enzima hidroksimetilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze. HMG-CoA reduktaza je enzim koji reducira 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA u mevalonat u jetri, što je najsporiji i ujedno ključni korak u biosintezi kolesterola. Svi statini imaju kemijsku strukturu sličnu HMG-CoA, pa djeluju kao specifični, reverzibilni i kompetitivni inhibitori HMG-CoA reduktaze. Količina sintetiziranog kolesterola ovisi upravo o aktivnosti enzima HMG-CoA reduktaze mehanizmom povratne sprege (Bulat i sur., 2001). Smanjenje količine kolesterola sintetiziranog u jetri je značajno jer je većina cirkulirajućeg kolesterola nastala biosintetskim putem, a samo manji dio se u organizam unosi hranom. Nakon što se u hepatocitima smanji količina kolesterola, inhibitori enzima HMG-CoA reduktaze povećavaju sintezu LDL-receptora kako bi se povećao unos kolesterola iz cirkulacije u stanice. Veći broj LDL-receptora na površini jetrenih stanica omogućuje povećani ulazak LDL-kolesterola u hepatocite te njihov katabolizam (Vrhovac i sur., 2003). Stoga je izravni učinak statina sniženje koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola u plazmi. Neke studije su pokazale da statini donekle povećavaju i koncentraciju HDL-kolesterola u plazmi. Osim izravnoga hipolipemičkog učinka, statini imaju niz drugih protuaterogenih učinaka poput stabilizacije postojećih aterosklerotskih plakova, poboljšanja endotelne funkcije, smanjenja vaskularne upale, povećane neovaskularizacije ishemičkog tkiva, prevencije stvaranja tromba, pojačane fibrolize te općenito utjecaja na upalni odgovor (Furberg, 1999; Nissen i sur., 2006; Rang i sur., 2006).

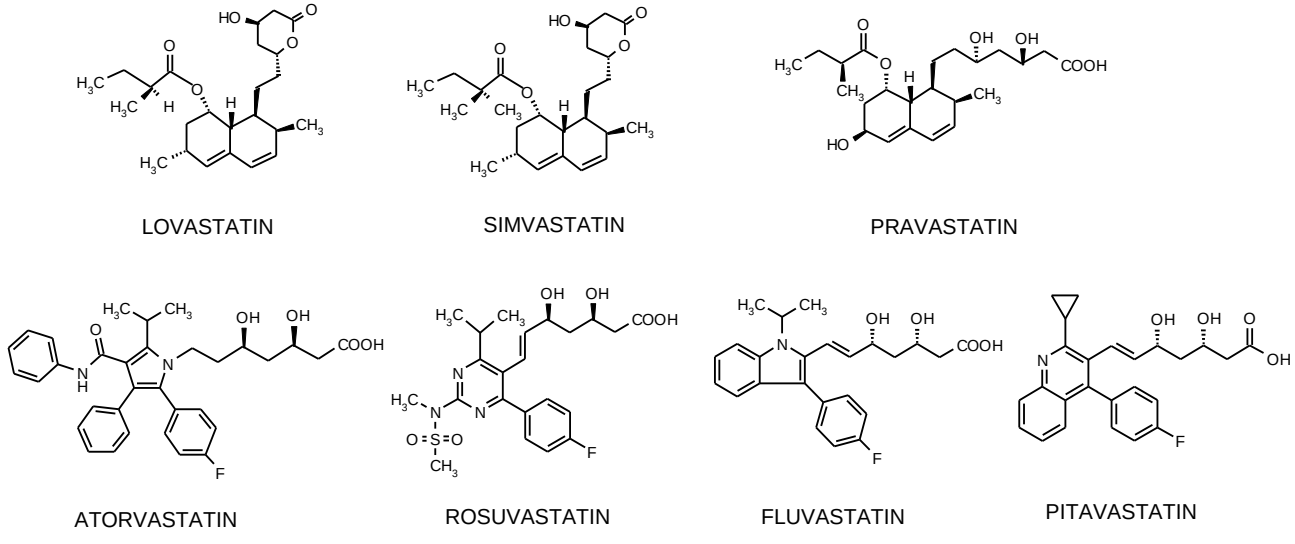
1.1.2 Vrsta i podjele statina

Danas je za medikamentoznu terapiju hiperlipidemija u svijetu registrirano sedam statina: atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin i simvastatin (Slika 1). Pitavastatin je najnoviji lijek u skupini statina i za sada je dostupan samo u Japanu te južnoj i jugoistočnoj Aziji (Mukhtar, 2005). Na tržištu je postojao i cerivastatin, ali 2001. godine ga je dobrovoljno povukla farmaceutska tvrtka Bayer uslijed brojnih prijavljenih

ozbiljnih nuspojava te nekoliko desetaka smrtnih slučajeva zbog rabdomiolize i smanjenja bubrežne funkcije.

Statini se dijele s obzirom na podrijetlo, odnosno način dobivanja, na prirodne i sintetske. Prirodni statini dobivaju se fermentacijom iz mikroorganizama, odnosno izolacijom iz plijesni roda *Penicillium* ili *Aspergillus.* Postoji niz metabolita koji su izolirani i pokazali su hipolipemički učinak, no nisu svi jednako učinkoviti ili sigurni za primjenu. Jedini prirodni statin koji se koristi u terapiji i registriran je kao lijek je lovastatin. Koristi se još i mevastatin, ali ne u terapiji, već kao prirodni izvor za dobivanje pravastatina. Polusintetski derivati statina su pravastatin i simvastatin. Mikrobiološkom hidroksilacijom mevastatina dobiva se pravastatin, dok se simvastatin dobiva kemijskom modifikacijom lovastatina, uvođenjem metilne skupine na bočni butiril esterski lanac. Potpuno sintetski derivati statina su fluvastatin, atorvastatin, cerivastatin, rosuvastatin i pitavastatin.

Novija podjela statina temelji se na njihovoj lipofilnosti (Nigović i sur., 2007). Lipofilnost predstavlja afinitet molekule za lipidno okruženje i smatra se najvažnijim fizikalno-kemijskim parametrom koji utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova (Mornar i sur., 2011). Pravastatin i rosuvastatin se smatraju hidrofilnim lijekovima; pravastatin zbog hidroksilne skupine na heksahidronaftalenskom prstenu, a rosuvastatin zbog polarne metilsulfonamidne skupine. Ostali lijekovi iz skupine statina su lipofilni, a simvastatin je najlipofilniji budući da u svojoj strukturi ima dvije metilne skupine. Lovastatin i simvastatin su prolijekovi s laktonskim prstenom koji se otvara djelovanjem karboksiesteraza u aktivni β-hidroksilirani oblik. Ostali statini već dolaze u farmakološki aktivnom obliku.



Slika 1. Kemijske strukture statina.

1.2 ONEČIŠĆENJA U LIJEKOVIMA

Onečišćenja u lijekovima su neželjene tvari u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji koje mogu zaostati iz proizvodnog postupka, nastati tijekom izrade ljekovitog oblika te stajanjem farmaceutskog proizvoda ili same aktivne supstancije. Zahtjevi kvalitete lijeka definiraju prihvatljive granice za onečišćenja koja se dozvoljavaju u roku trajanja farmaceutskog proizvoda (Nigović, 2010; Nigović i Damić, 2012). Budući da su različite nacionalne farmakopeje i nacionalne agencije imale drugačije definicije, standarde i pravilnike o lijekovima, 1995. godine je organizirana Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH). Ona predstavlja zajedničku inicijativu regulatornih tijela i proizvođača lijekova s područja Europske unije, Sjedinjenih Američkih Država i Japana da se usklade standardi i zakonska regulativa u svrhu bržeg stavljanja lijekova u promet, imajući na umu dobrobit pacijenata. Onečišćenje je, prema ICH smjernicama, svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar (ICH Q3A) ili svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u samom proizvodu (ICH Q3B).

Kako je za svaki lijek nužno da, osim što je djelotvoran, bude i siguran, provodi se određivanje farmakološko-toksikološkog profila lijeka te ispitivanje nuspojava izazvanih onečišćenjima u lijekovima. Onečišćenja mogu imati neželjene farmakološke učinke, toksična svojstva, uzrokovati nuspojave, utjecati na aktivnost i stabilnost ljekovite tvari, bioraspoloživost i učinkovitost samog lijeka, a mogu utjecati i na rezultate analitičkih ispitivanja lijekova. Danas zakonska regulativa donosi sve složenije zahtjeve u kontroli kvalitete lijekova, a poseban se naglasak stavlja upravo na praćenje onečišćenja.

Prema ICH smjernicama, onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Trenutno je u izradi četvrti dokument koji bi davao posebne smjernice za onečišćenja metalima (ICH Q3D). Onečišćenja se u ljekovitu tvar mogu unijeti samim polaznim sirovinama, a mogu nastati kao međuprodukti ili nusprodukti u složenom proizvodnom postupku ljekovite tvari (tzv. procesna onečišćenja). Nadalje, onečišćenja mogu nastati kao produkti razgradnje ljekovite tvari djelovanjem svjetla, temperature, prisutnosti vode ili promjenom pH, ili pak mogu nastati tijekom izrade i čuvanja farmaceutskoga dozirnog oblika. Onečišćenjima se također smatraju produkti reakcija ljekovite tvari s pomoćnim tvarima, ljekovite tvari i primarnog spremnika te produkti interakcije djelatnih tvari u višekomponentnim dozirnim oblicima. Ako su u izradi lijeka

korišteni prirodni produkti, onečišćenja mogu biti i usput ekstrahirane tvari (Nigović i Sertić, 2012).

Onečišćenja se u Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.) dijele na specificirana onečišćenja (engl. S*pecified impurities*) i ostala onečišćenja koja se mogu dokazati (engl. *Other detectable impurities*). Specificirana onečišćenja su stvarna, a mogu biti identificirana i neidentificirana. Identificirana onečišćenja imaju karakteriziranu kemijsku strukturu, dok su neidentificirana definirana isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvima, poput kromatografskog vremena zadržavanja. Neidentificiranog onečišćenja smije biti najviše 0,1% za doze ljekovite tvari manje od 2 g, a iznimka su jedino ljekovite tvari koje su već dugi niz godina prisutne na tržištu pa neidentificirana onečišćenja u tim proizvodima mogu iznositi više od 0,1%. Ostala onečišćenja koja se mogu dokazati su potencijalna, nisu detektirana ni u jednom ispitivanom uzorku tijekom izrade monografije, ali su ograničena ispitivanjima u Europskoj farmakopeji jer se zna da mogu nastati u proizvodnom postupku ili stajanjem, a mogu, ili ne moraju, trenutno biti prisutna u ljekovitoj tvari.

Ispitivanje profila čistoće (engl. *Impurity profiling*) lijeka obuhvaća analitičke postupke kojima je cilj detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje organskih i anorganskih onečišćenja, kao i ostatnih otapala, u ljekovitoj tvari i farmaceutskom pripravku. Ovim postupkom se precizno određuju kvaliteta i stabilnost ljekovite tvari i gotovoga farmaceutskog proizvoda, pa se ispitivanje profila čistoće smatra ključnim dijelom analize lijeka. U skladu sa sve većim zahtjevima u kontroli kvalitete lijeka i određivanju njegovih onečišćenja, razvijaju se nove analitičke metode kako bi zadovoljile potrebe regulatornih tijela i industrije, a pacijente opskrbile kvalitetnim, sigurnim i djelotvornim lijekovima.

ICH smjernice postavljaju pragove (engl. *Threshold limits*) ispod kojih nije potrebno izvještavanje o prisutnim onečišćenjima (prag izvještavanja), strukturna karakterizacija onečišćenja (prag identifikacije) ili procjena biološke sigurnosti onečišćenja (prag kvalifikacije). Pragovi izvještavanja o prisutnim onečišćenjima odnose se na razinu iznad koje je potrebno priložiti izjavu o onečišćenjima, a koja uključuje njihov točan postotak u lijeku i metodu analize kojom su određeni. Ukoliko je dnevna doza 2 g ili manja potrebno je u izjavi navesti svako onečišćenje koje se pojavljuje u količini većoj od 0,05%. Za doze veće od 2 g navode se sva onečišćenja prisutna u količini većoj od 0,03%. Karakterizacija kemijske strukture potrebna je za svako onečišćenje prisutno u količini većoj od 0,1 % za dnevnu dozu

ljekovite tvari 2 g i manju, dok je za doze veće od 2 g potrebna strukturna karakterizacija za onečišćenja prisutna u količini većoj od 0,05%.

Kako bi se tijekom svih faza proizvodnje i kontrole kvalitete lijeka osigurali zahtjevi koje donose ICH smjernice o onečišćenjima, potrebne su pouzdane i sofisticirane analitičke tehnike. Da bi se pojedine sastavnice smjese ljekovite tvari i njezinih onečišćenja odvojile, koriste se separacijske tehnike. Najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) (Bianchini i sur., 2009), plinska kromatografija (GC) (Mornar i sur., 2013c), tankoslojna kromatografija (TLC) i tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (HPTLC) te kapilarna elektroforeza (CE) (Altria, 1996). Ponekad je potrebna i izolacija pojedinog onečišćenja (Prabu i Suriyaprakash, 2010). Sve navedene separacijske tehnike se pored odjeljivanja mogu koristiti i za izolaciju. Osim njih, za izolaciju onečišćenja često se koriste ekstrakcija na čvrstoj fazi i ekstrakcija tekuće-tekuće.

Za strukturnu karakterizaciju onečišćenja koriste se spektroskopske tehnike masena spektrometrija (MS) i nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija (NMR), a vrlo često se kombiniraju sa separacijskim, pa govorimo o vezanim sustavima: tekućinska kromatografija – masena spektrometrija (LC-MS) (Pilaniya i sur., 2010), plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS), tekućinska kromatografija – nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija (LC-NMR) (Sun i sur., 2010) te kapilarna elektroforeza – masena spektrometrija (CE-MS) (Ingale i sur., 2011).

1.3 CRVENA FERMENTIRANA RIŽA

Osim uobičajene terapije hipolipemicima, mnogi pacijenti uslijed neugodnih nuspojava ili u želji da se liječe prirodnim sredstvima traže alternativne načine liječenja hiperlipidemije. Danas se na tržištu nalazi čitav niz prirodnih hipolipemika, poput omega-3 masnih kiselina, crvene fermentirane riže, zelenog čaja, češnjaka, koenzima Q10, artičoke, soje, sjemenki lana, gugulipida, fitosterola, polikonazola i brojnih drugih biljaka (maslina, ružmarin i dr.) te prirodnih proizvoda (matična mliječ, med i dr.). Na tržište većinom dolaze registrirani kao dodaci prehrani, a mogu se naći u ljekarnama, specijaliziranim prodavaonicama, trgovinama zdravom i organskom hranom, u novije vrijeme i trgovinama hranom te trgovinskim lancima. Njihova primjena je sve popularnija i češća, a broj proizvoda na tržištu raste gotovo eksponencijalno. Većina ovih proizvoda spada u područje samoliječenja, odnosno ljudi ih uzimaju na temelju vlastite procjene, bez konzultacija s liječnikom ili ljekarnikom.

Ono što je potrebno naglasiti kod dodataka prehrani je da legislativa u svijetu nije jednoznačna. Dodaci prehrani ne podliježu, kao lijekovi, strogim regulatornim zahtjevima koji osiguravaju kvalitetu, sigurnost i učinkovitost proizvoda. Dobra proizvođačka i laboratorijska praksa, kontrola regulatornih tijela i detaljna laboratorijska procjena sadržaja prilikom registracije proizvoda nisu nužne. Na nekim proizvodima se čak i navodi standardizacija prema jednoj od glavnih djelatnih tvari, ali budući da je riječ o vrlo složenim uzorcima, s velikim brojem aktivnih sastavnica, upitno je je li ovakav način deklariranja sadržaja dovoljan.

Nažalost, diljem svijeta nadležne nacionalne agencije upozoravaju na lošu kvalitetu dodataka prehrani. Prema nekim procjenama svaki četvrti proizvod na tržištu ima neki problem s kvalitetom. Budući da se dodaci prehrani koriste svakodnevno i daju tzv. ugroženim skupinama – djeci, trudnicama i dojiljama te starijim osobama, te se koriste u samoliječenju, odnosno bez savjeta liječnika ili ljekarnika, kontrola kvalitete ovih proizvoda je od iznimne važnosti. Primjenom sofisticiranih analitičkih tehnika moguće je provoditi kontrolu kvalitete dodataka prehrani, odrediti ima li djelatne tvari u proizvodu, koliko je ima te ima li onečišćenja ili čak toksičnih nusprodukata.

U azijskim zemljama se crvena fermentirana riža stoljećima tradicionalno primjenjuje u prehrambene svrhe, kao dodatak hrani za poboljšanje okusa i boje. Tradicionalnom kulinarskom primjenom uvidjelo se da crvena fermentirana riža ima mnoge dobrobiti za organizam, posebice za poboljšanje probave i revitalizaciju krvi. Danas je crvena fermentirana riža dio tradicionalne kineske medicine i koristi se kod problema s krvožilnim sustavom.

Crvena fermentirana riža dobiva se fermentacijom obične, bijele riže (*Oryza sativa* L., *Poaceae*) pomoću kvasca *Monascus purpureus* (Slika 2).



Slika 2. Fermentacijom riže pomoću gljivice roda *Monascus* dobiva se crvena fermentirana riža.

Crvena fermentirana riža postala je poznata diljem svijeta tek 1971. godine kada se japanski znanstvenik Akira Endo počeo baviti istraživanjima spojeva koji bi mogli smanjiti sintezu endogenog kolesterola, lipida koji se nalazi u staničnim membranama svih tkiva i nužan je za normalan rad organizma. Endo je otkrio da gljivica roda *Monascus* kao sekundarne metabolite proizvodi, između ostalog, spoj nazvan monakolin K, koji ima snažni hipolipemički učinak, odnosno snižava koncentraciju kolesterola u krvi. Istovremeno je u Sjedinjenim Američkim Država farmaceutska tvrtka Merck&Co. također proučavala sekundarne metaboličke produkte gljivice roda *Aspergillus*. Godine 1976. iz plijesni *Aspergillus terreus* izolirali su mevinolin, koji je kasnije nazvan lovastatin. Lovastatin je postao prvi lijek iz skupine statina koji je prošao sva potrebna klinička ispitivanja i dobio odobrenje za stavljanje u promet. Na tržištu se pojavio 1987. godine kao Mevacor®. Nakon lovastatina na tržište je izašao čitav niz lijekova iz skupine statina, a svima je farmakološko djelovanje smanjenje endogene sinteze kolesterola.

Daljnjim istraživanjima ustanovljeno je da crvena fermentirana riža kao aktivnu sastavnicu ima monakolin K, koji ima istu kemijsku strukturu kao lovastatin. Do sada je otkriveno ukupno 14 monakolina, a njihov sastav i količina ovise o vrsti gljivice roda *Monascus* koja se koristi za fermentaciju te o uvjetima u kojima se vrši proizvodnja crvene fermentirane riže. U uobičajenim uvjetima proizvodnje najveći dio sadržaja monakolina otpada na monakolin K, odnosno lovastatin. No crvena fermentirana riža ima vrlo raznolik sadržaj, pa se uz monakoline u sastavu mogu naći škrob, proteini, nezasićene i zasićene masne kiseline, biljni steroli (β-sitosterol, kampasterol, stigmasterol, sapogenin), izoflavoni, vlakna, elementi u tragovima, kompleks B vitamina i dr. Mnogi od ovih spojeva već imaju dokazano hipolipemičko djelovanje, poput omega-3-masnih kiselina, niacina, β-sitosterola i kampasterola, koji interferiraju s apsorpcijom kolesterola u crijevima. Do sada provedena klinička ispitivanja na crvenoj fermentiranoj riži pokazuju vrlo sličan farmakološki učinak kao i lijekovi statini. Mehanizam djelovanja monakolina je inhibicija 3-HMG CoA reduktaze, dakle isti kao i komercijalno dostupnih statina. Vjerojatno zahvaljujući sinergijskom djelovanju svih spojeva u svom bogatom sastavu, crvena fermentirana riža uspješno smanjuje razinu ukupnog kolesterola, „lošeg“ LDL-kolesterola i triglicerida, a povećava i razinu „dobrog“ HDL-kolesterola, prema nekim istraživanjima čak uspješnije nego statini. Stoga ne čudi činjenica da je kasnih 90-tih godina prošlog stoljeća počela vrlo uspješna komercijalizacija proizvoda s crvenom fermentiranom rižom.

Problem sigurnosti primjene crvene fermentirane riže je mogućnost da ovi proizvodi sadrže citrinin, sekundarni produkt fermentacije kojeg proizvode neki sojevi *Monascus*,

Aspergillu i *Penicillium* roda. Citrinin je mikotoksin koji uzrokuje funkcionalna i strukturna oštećenja bubrega kao i promjene u radu i metabolizmu jetre. Smatra se da je mehanizam djelovanja citrinina na staničnoj razini gdje ometa rad sustava za prijenos elektrona u mitohondrijima. Najveća dozvoljena količina citrinina u crvenoj fermentiranoj riži je 200 ppb u Japanu, dok je preporučeni limit u Europskoj uniji 100 ppb.

Danas se crvena fermentirana riža na tržištu nalazi kao dodatak prehrani, proizvod koji se bez recepta može kupiti u ljekarnama i specijaliziranim prodavaonicama. Postojalo je nekoliko pokušaja zabrane prodaje dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom u Sjedinjenim Američkim Državama. Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) još od kraja devedesetih godina prošlog stoljeća nastoji zabraniti proizvode s crvenom fermentiranom rižom registrirane kao dodatak prehrani. Njihovo objašnjenje je da ako proizvod sadrži lovastatin, koji je registriran kao lijek, onda se ne može nalaziti na tržištu registriran kao dodatak prehrani. No činjenica ostaje da se danas na tržištu u cijelom svijetu nalaze deseci različitih proizvođača dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom (Slika 3).



Slika 3. Dodaci prehrani i prehrambeni proizvod s crvenom fermentiranom rižom.

Dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom trebali bi biti deklarirani u skladu s propisima i zahtjevima pojedinih država. Standardizacija se najčešće provodi na 1% monakolina K, odnosno lovastatina. No budući da crvena fermentirana riža može sadržavati čak 14 monakolina s hipolipemičkim učinkom, možda bi bilo potrebno provesti standardizaciju na monakolin K te ukupne monakoline, kako je kod nekih proizvoda i napravljeno. Nažalost, na tržištu se mogu naći dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom na kojima je deklarirano samo da sadrže primjerice 1,0 g ekstrakta crvene riže, što naravno nema značaja ako se ne zna koliko u tom proizvodu ima monakolina. Standardizaciji

je potrebno posvetiti dodatnu pozornost ako se uzme u obzir da će sastav, vrsta i količina monakolina u crvenoj fermentiranoj riži ovisiti o uvjetima rasta i kultiviranja te obradi nakon proizvodnje.

Dnevna doza crvene fermentirane riže je 1-2 kapsule, ovisno o proizvodu. Uglavnom je riječ o dozi od 1200-2400 mg dnevno, što odgovara dozi od 3-5 mg monakolina K, odnosno lovastatina. Na tržištu postoje dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom koji sadrže i do 10 mg monakolina K, što se već smatra terapijskom dozom lovastatina (1 tableta lijeka obično sadrži 10 ili 20 mg lovastatina). Budući da ovi dodaci prehrani sadrže lovastatin, onda se mogu javiti i nuspojave karakteristične za statine. Moguće je osjetiti bol u abdomenu, žgaravicu, mučninu i povraćanje, glavobolju, osip, vrtoglavicu, slabost u mišićima, bol u mišićima te rabdomiolizu. Primjena proizvoda s crvenom fermentiranom rižom je kontraindicirana kod trudnica i dojilja, osoba koje su iskazale preosjetljivost na statine te kod osoba s oštećenom funkcijom jetre i bubrega. Također je iznimno važno da kod pacijenata ne dolazi do dvostruke terapije, odnosno da uz uobičajenu terapiju statinima ili nekim drugim hipolipemicima ne koriste i *prirodni* proizvod za sniženje kolesterola u krvi, poput crvene fermentirane riže.

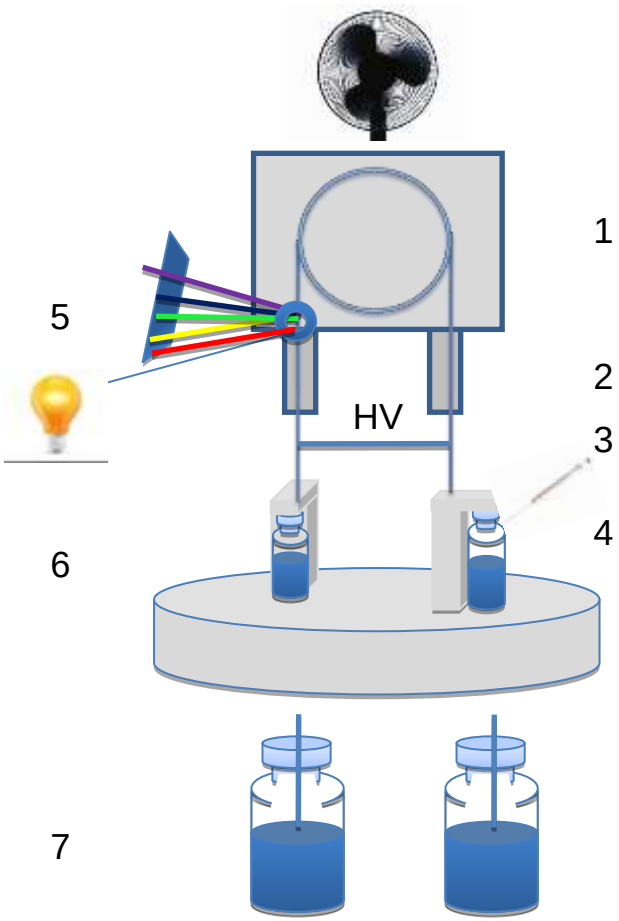
1.4 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

1.4.1 Načelo tehnike kapilarne elektroforeze

Elektroforeza je razdvajanje električki nabijenih čestica prema brzinama kretanja u električnom polju. Prvi elektroforetski eksperimenti izvedeni su još u 18. stoljeću. Arne Tiselius je 1948. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju za svoja istraživanja elektroforetskih razdvajanja i određivanja. Godine 1981. Mikkers, Jorgenson i Tsud razvili su osnovni tip kapilarne elektroforeze, odnosno instrument kakav koristimo i danas (Boone i sur., 1999). Stoga se kapilarna elektroforeza još uvijek smatra relativno novom separacijskom analitičkom tehnikom.

Osnovno načelo tehnike kapilarne elektroforeze je migracija električki nabijenih čestica u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (10-30 kV) (Nigović, 2010; Watson, 2005). Kapilara je ispunjena elektrolitnom otopinom pufera, otopinom pufera koja sadrži polimere koji povećavaju viskoznost otopine ili gelom. Iz naziva tehnike očito je da upravo kapilara ima temeljnu ulogu. O njoj ovisi učinkovitost razdvajanja, razlučivanje i obilježja signala te odaziva detektora. Kapilare mogu

biti duljine od 10 do 110 cm, unutarnjeg promjera od 50 do 300 μm. Najčešće se koriste kvarcne kapilare tankih stijenki, ali mogu se izrađivati i od fluorirane ugljikovodične smole. Krajevi kapilare su uronjeni u otopinu elektrolita, a preko elektroda iz električnog izvora se uspostavlja električni napon koji uzrokuje električno polje kroz kapilaru (Piljac, 2006). Shema instrumenta kapilarne elektroforeze prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu: termostatirana kapilara (1), dvije elektrode (2), visokonaponski izvor istosmjerne struje (3), sustav za unošenje uzorka (4), detektor (5), ulazni/izlazni spremnik za pufere (6) i sustav za izmjenu pufera (7).

Analiti se u kapilarnoj elektroforezi razdvajaju na temelju brzine kojom putuju kroz kapilaru. Brzina kojom čestice putuju opisana je izrazom:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E$$

gdje je v_{ep} brzina putovanja iona, μ_{ep} je elektroforetska pokretljivost čestice, a E je jakost primijenjenoga električnog polja.

Elektroforetska pokretljivost čestice (μ_{ep}) dana je izrazom:

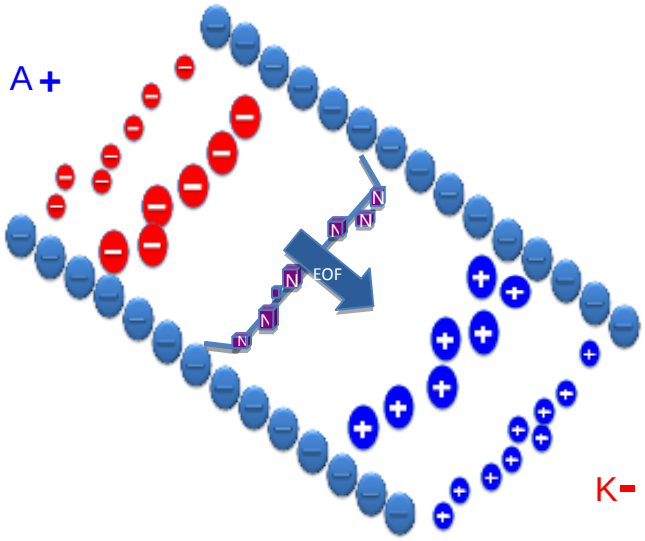
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

gdje je q naboj čestice, r polumjer čestice (Stokesov polumjer), a η viskoznost otopine elektrolita, dok jakost primijenjenoga električnog polja (E) ovisi o primijenjenom naponu i dužini kapilare:

$$E = \frac{V}{L}$$

gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L duljina kapilare u cm.

Dakle djelovanjem električnog polja analiti putuju različitom brzinom ovisno o svom naboju i ionskom radijusu. No i neutralni analiti se također mogu analizirati kapilarnom elektroforezom jer će putovati kroz kapilaru zbog djelovanja elektroosmotskog toka (engl. *Electroosmostic flow*, EOF). EOF je tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Naime, unutrašnja površina stijenke (najčešće od izvučenog kvarca) sadrži brojne silanolne grupe koje se ovisno o pH-vrijednosti elektrolita mogu nalaziti u anionskoj formi. Uz negativno nabijene silanolne skupine, elektrostatskim silama privučeni su pozitivno nabijeni ioni iz elektrolitske otopine, čime je zapravo stvoren električni dvosloj. Nakon čvrstog dijela slijedi difuzijski dio u kojem se javljaju i kationi i anioni. Kada se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi u difuznom dijelu dvostrukog sloja bivaju privučeni prema katodi. Budući da su otopljeni, oni svojim kretanjem povlače za sobom i okolnu tekućinu (Slika 5).



Slika 5. Elektroosmotski tok pufera.

Elektroosmotski tok pufera utječe na vrijeme zadržavanja čestice u kapilari s obzirom na to da se njegova elektroosmotska pokretljivost pridodaje ili oduzima elektroforetskoj pokretljivosti čestice, što je iskazano u jednadžbi:

$$t = \frac{L}{v_{ep} \pm v_{eo}} = \frac{L^2}{(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})V}$$

gdje je *t* vrijeme putovanja čestice cijelom dužinom kapilare.

Brzina elektroosmotskog toka u kapilari ovisi o elektroosmotskoj pokretljivosti pufera, odnosno dielektričnoj konstanti pufera, zeta-potencijalu na površini kapilare i viskoznosti pufera, te jakosti električnog polja (Shintani i sur., 1997).

Budući da je sila koja pokreće tok jednoliko raspoređena uzduž kapilare odnosno uz njezine stijenke, nema pada tlaka unutar kapilare i tok je gotovo uniforman cijelom njezinom dužinom. Stoga je odlika elektroosmotskog toka u kapilari ravan profil. Zahvaljujući tome ne dolazi do disperzije zona analita, pa su pikovi na elektroferogramu uski i oštri. To je ujedno i prednost kapilarne elektroforeze u odnosu na tekućinsku kromatografiju, gdje prilikom upotrebe vanjske pumpe koja pokreće pokretnu fazu kroz sustav i kolonu dolazi do trenja stijenke te se javlja laminarni ili parabolni tok, odnosno puno širi kromatografski pikovi.

Upravo zahvaljujući elektroosmotkom toku, svi analiti se kreću u istom smjeru, neovisno o svom naboju. Pri uobičajenom načinu analize kapilarnom elektroforezom, odnosno kada je stijenka kapilare negativno nabijena i na injektorskom kraju se nalazi pozitivno nabijena elektroda, elektroosmotski tok je usmjeren od anode prema katodi. U tim uvjetima će anioni također putovati prema negativno nabijenoj katodi, jer je veličina elektroosmotskog toka za više od jednog reda veličine veća od njihove elektroforetske pokretljivosti koja ih nosi prema pozitivno nabijenoj anodi. Zahvaljujući tome se u kapilarnoj elektroforezi mogu istovremeno analizirati kationi, neutralne molekule i anioni, budući da se svi kreću u istom smjeru. Kationi putuju najbrže jer su njihovo elektroforetsko privlačenje i EOF usmjereni u istom smjeru, tj. prema katodi. Neutralne molekule nošene su brzinom elektroosmotskog toka, ali se ne razdvajaju jedne od drugih. Anioni putuju najsporije jer su privučeni prema anodi, ali svejedno putuju prema katodi nošeni elektroosmotskim tokom.

Stoga je prilikom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode potrebno optimizirati nekoliko parametara koji u prvom redu utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita. To su vrsta i koncentracija pufera, pH pufera, dodatak organskih otapala, vrsta i koncentracija površinski aktivnih tvari, napon i temperatura pri kojima se analiza

odvija te izbor kapilare (produljeni optički put, kemijska modifikacija unutrašnje stijenke kapilare).

Nakon razdvajanja slijedi detekcija analita. Kapilarna elektroforeza može koristiti nekoliko vrsta detektora, ovisno o vrsti analita i cilju analize. Najčešće su korišteni UV-Vis detektor, fluorescencijski detektor, maseni spektrometar ili površinski poboljšana raman spektroskopija (Damić i Nigović, 2010a).

1.4.2 Vrste kapilarne elektroforeze

Kapilarna elektroforeza podrazumijeva različite mehanizme razdvajanja te različite načine detekcije, što tehnici nudi čitav niz mogućnosti primjene i brojne prednosti. Postoji nekoliko vrsta kapilarnoelektroforetskih tehnika, koje se razlikuju prema mehanizmu razdvajanja različitih analita, prikazanih u Tablici 1. Sve donedavno ova tablica je uključivala samo prvih pet tipova, no u zadnje vrijeme kapilarna elektroforeza je doživjela procvat novih mehanizama razdvajanja i vrlo specifičnih primjena, poput kapilarne elektrokromatografije ili nevodene kapilarne elektroforeze.

Tablica 1. Vrste kapilarne elektroforeze

Vrste kapilarne elektroforeze	***Vrste analita***
Kapilarna zonska elektroforeza	Nabijeni analiti
Micelarna elektrokinetička kromatografija	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza	DNK, RNK, proteini
Kapilarno izoelektrično fokusiranje	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza	Analiti netopljivi u vodi

Kapilarna zonska elektroforeza (engl. *Capillary Zone Electrophoresis*, CZE), pravim imenom „kapilarna elektroforeza slobodne otopine“, osnovni je i najvažniji tip kapilarne elektroforeze. Kapilara je ispunjena samo puferom, a do razdvajanja otopljenih tvari dolazi na temelju njihove različite elektroforetske pokretljivosti u puferu. Analiti se razdvajaju u zone koje putuju kroz kapilaru različitom brzinom. Brzina kretanja pojedine zone ovisi o električnoj pokretljivosti pojedinog analita i o brzini elektroosmotskog toka otopine pufera. Kapilarnom zonskom elektroforezom moguće je odijeliti i anionske i kationske otopljene tvari zahvaljujući elektroosmotskom toku. Neutralne otopljene tvari se ne mogu međusobno razdvojiti ovom metodom, već one koeluiraju s elektroosmotskim tokom. (Damić i Nigović, 2010a).

Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MEKC) je kombinacija elektroforeze i kromatografije. MEKC je elektroforetska tehnika koja se može koristiti i za analizu neutralnih molekula. Naime, u otopinu radnog pufera dodaju se površinski aktivne tvari (surfaktanti) koje u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije formiraju nakupine molekula surfaktanta, koje nazivamo micele. Micele su sferičnog oblika, imaju nabijene polarne glave na površini u kontaktu s puferom te hidrofobne repove okrenute prema unutrašnjosti. Neutralni spojevi stupaju u različite interakcije s micelama te zahvaljujući naboju na micelama putuju kroz kapilaru. Micele anionskih surfaktanata, poput najčešće korištenog natrijeva duodecilsulfata (SDS), putuju prema anodi, no zahvaljujući djelovanju elektroosmotskog toka ipak putuju prema katodi i detektoru. Stoga brzina kretanja neutralnih analita ovisi samo o konstanti raspodjele između micele i vodene otopine. Nabijeni analiti također stupaju u različite hidrofobne i elektrostatske interakcije te brzina njihova putovanja ovisi o konstanti raspodjele između micela i otopine pufera te o elektroforetskoj pokretljivosti samog analita (El Deeb i sur., 2001).

Kapilarna gel elektroforeza (engl. *Capillary Gel Electrophoresis*, CGE) tradicionalna je gel elektroforeza, s time da se gel nalazi unutar kapilare. Otopina polimera koji stvara gel djeluje kao molekularno sito, pa razdvaja analite na temelju njihove veličine. Tehnika se prvenstveno koristi za analizu DNK i RNK te peptida i proteina.

Kapilarno izoelektrično fokusiranje (engl. *Capillary Isoelectric Focusing*, CIEF) koristi se za razdvajanje proteina i peptida na temelju razlike u izoelektričnim točkama. U

odnosu na tradicionalno gel izoelektrično fokusiranje, CIEF je brži, automatiziran i jednostavniji za primjenu. Primjenom amfolita (zwitteriona) unutar kapilare postiže se pH-gradijent. Pod djelovanjem električnog polja nabijene molekule putuju kroz medij do područja u kojem gube naboj (pH-vrijednost jednaka njihovoj izoelektričnoj točki) i na tom mjestu se zaustavljaju. Tako odijeljene uske vrpce analita pokreću se prema detektoru primjenom tlaka ili dodatkom soli. Ovom tehnikom mogu se razdvojiti proteini koji se u izoelektričnoj točki razlikuju za svega 0,004, a u kapilari duljine 65 cm moguće je razdvojiti i do 1000 analita.

Kapilarna izotahoforeza (engl. *Capillary Isotachophoresis*, CITP) koristi diskontinuirano električno polje za stvaranje oštrih granica između sastavnica uzorka primjenom dvije elektrolitske tekućine različite pokretljivosti. Vodeća elektrolitska tekućina ima veću, a zadnja elektrolitska tekućina manju pokretljivost nego ioni analita. Djelovanjem električnog polja nastaju odijeljene zone analita između vodećeg i terminalnog elektrolita. Jednom odijeljeni, analiti u zonama putuju istom brzinom uz zadržavanje vrlo oštrih granica između zona, čime se postiže znatno koncentriranje uzorka.

Kiralna kapilarna elektroforeza (engl. *Chiral Capillary Electrophoresis*, CCE) izvodi se tako da se u otopinu radnog pufera doda kiralni selektor (primjerice ciklodekstrini, žučne soli). Selektivnost se postiže uporabom odgovarajuće vrste i koncentracije kiralnog selektora te dodatkom modifikatora poput alkohola, površinski aktivnih tvari i metalnih iona. Tehnika je puno jeftinija od uobičajeno korištene tekućinske ili plinske kromatografije, čije su analize složene i zahtjevne te koriste skupe stacionarne faze.

Kapilarna elektrokromatografija (engl. *Capillary Electrochromatography*, CEC) nova je i vrlo popularna vrsta kapilarne elektroforeze. Predstavlja kombinaciju kapilarne elektroforeze i kromatografije u tradicionalnom smislu. Naime, CEC kapilaru ispuni kromatografskom stacionarnom fazom, a razdvajanje se odvija na temelju različite elektroforetske pokretljivosti (svojstvo kapilarne elektroforeze) i na temelju razlike u konstanti raspodjele između mobilne i stacionarne faze (princip kromatografskog razdvajanja). Kapilara se puni *in situ* polimerizacijom ili silanizacijom, a postoje i komercijalno dostupne punjene kapilare.

Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (engl. *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, MEEKC) razdvaja analite između dvije faze – vodene i

uljne. Mikroemulzija se može sastojati od kapljica vode raspršenih u uljnoj fazi ili kapljica ulja u vodenoj fazi. Osim vode i organskog otapala (najčešće heptan ili oktan), u otopinu se dodaje surfaktant (najčešće SDS) i kosurfaktant u svrhu stabilizacije emulzije. Odabirom otapala i mijenjanjem koncentracije surfaktanta i organskih otapala postiže se odgovarajuća selektivnost i razlučivanje.

Nevodena kapilarna elektroforeza (engl. *Nonaqueous Capillary Electrophoresis*, NACE) koristi samo organska otapala čija viskoznost i dielektrična konstanta izravno utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita.

1.4.3 Primjena kapilarne elektroforeze u farmaciji

Kapilarna elektroforeza se u farmaceutskoj industriji, za razliku od tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), ne koristi u rutinskim svakodnevnim analizama, no njezina primjena u farmaciji je ipak vrlo široka. Upravo zahvaljujući već navedenim različitim vrstama tehnike, odnosno mehanizmima razdvajanja, moguće je analizirati sve vrste analita, od malih organskih molekula, iona i neutralnih molekula do velikih biomakromolekula, poput DNK i proteina.

Kapilarna elektroforeza je nastala ujedinjenjem moćnih mehanizama razdvajanja karakterističnih za elektroforezu, s instrumentalnim i automatiziranim pristupom koji ima kromatografija. Stoga se vrlo često kaže da se kapilarna elektroforeza nadopunjuje s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ili je zamjenjuje, i kao separacijska tehnika, ali i kao tehnika za dokazivanje i određivanje pojedinih analita. Od prednosti tehnike kapilarne elektroforeze potrebno je istaknuti kratko vrijeme analize, visoku učinkovitost, različite mehanizme razdvajanja, mogućnost analize svih vrsta analita, vrlo male količine uzoraka i otapala, niske troškove, jednostavnost tehnike i ekološku prihvatljivost. Unatoč svim navedenim prednostima te širokoj mogućnosti primjene, kapilarna elektroforeza se ipak premalo koristi u rutinskim analizama te se sama tehnika još uvijek istražuje i razvija.

Kapilarna elektroforeza je farmakopejska tehnika. Prvi put se javlja u četvrtom izdanju Europske farmakopeje (Ph. Eur. 4. izdanje). U šestom izdanju nalazi se u poglavlju opće monografije za monoklonalna antitijela za ljude te za utvrđivanje identiteta i ispitivanje čistoće u monografijama, primjerice somatropina, eritropoetina, alteplaze za ljude, faktora zgrušavanja VIII, glutationa, heparin-kalcija, heparin-natrija, levokabastin-hidroklorida, inhibitora α1-proteinaze, ropivakapin-hidroklorid-monohidrata i dr. (Ph. Eur. 6. izdanje).

Kapilarna elektroforeza se u farmaciji koristi za analizu različitih ljekovitih oblika, tableta, kapsula, krema, injekcijskih otopina, ali i složenih uzoraka poput bioloških tekućina i tkiva, otpadnih voda, stočne hrane i biljnih materijala (Damić i Nigović, 2010a). Upravo je primjena mogućnosti različitih kapilarnoelektroforetskih metoda na ovakvim složenim uzorcima bez prethodne znatnije predobrade uzorka još jedna prednost kapilarne elektroforeze.

U analitici lijekova kapilarna elektroforeza koristi se prvenstveno kao brza i jednostavna metoda za točno i precizno određivanje sadržaja aktivnih farmaceutskih supstancija u svim vrstama ljekovitih oblika. Zbog visoke moći razlučivanja koristi se za određivanje profila čistoće lijekova. Uspješno se primjenjuje u analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (urin, plazma, serum, likvor) i tkivima. Najveću prednost kapilarna elektroforeza iskazuje u analizi peptidnih lijekova i proteina. Zahvaljujući jednostavnoj primjeni kiralnih selektora, selektivna je i djelotvorna tehnika u odjeljivanju enantiomera i određivanju enantiomerne čistoće.

Najzastupljenije su kapilarna zonska elektroforeza i micelarna elektrokinetička kromatografija. Kapilarna zonska elektroforeza koristi se za određivanje djelatne tvari u ljekovitom obliku (Dong i sur., 2006), za provjeru čistoće, određivanje onečišćenja, farmakokinetičke studije (Glowka, 2002), identifikaciju i određivanje metabolita lijekova u biološkim uzorcima itd. Često se primjenjuje za analizu peptida i proteina. Značajan uspjeh postignut je upravo u peptidnom mapiranju. Kod peptidnog mapiranja se proteini enzimski ili kemijski cijepaju u manje peptidne fragmente koji se potom razdvajaju. Analiza je prvenstveno kvalitativna i koristi se da bi se otkrile suptilne promjene u proteinima.

Tehnika se također koristi i za razdvajanje anorganskih iona i organskih kiselina, za što se tradicionalno koristila ionska kromatografija. U tom je slučaju potrebna indirektna UV-detekcija zbog nedostatka kromofora kod takvih analita. Indirektna UV-detekcija se izvodi na način da se u radni pufer dodaju tvari koje jako apsorbiraju u UV-području, kao što su kromati ili imidazoli, pa im se prati apsorbancija pri valnoj duljini njihova apsorpcijskog maksimuma. Ioni analita izguraju ione kromata pa dolazi do pada apsorbancije kromata kada zone analita stignu do detektora.

Micelarna elektrokinetička kromatografija se koristi za analizu nabijenih i nenabijenih analita i za širok raspon tvari s hidrofilnim ili hidrofobnim karakteristikama (aminokiseline, nukleotidi, vitamini, velik broj lijekova, aromatski ugljikovodici, eksplozivne tvari...). U farmaciji se MEKC uspješno koristi za određivanje aktivnih tvari i onečišćenja u tabletama (Srinivasu i sur., 2002), kremama i injekcijskim formulacijama (Kuhn i sur., 2008).

Primjenjuje se za određivanje lijeka (vrlo često hidrofobnog) i njegovih polarnih metabolita u biološkim uzorcima (Theurillat i sur., 2010) te za stabilitetne studije (Al Azzam i sur., 2011).

Kapilarna elektroforeza dosta se primjenjuje i u biotehnologiji, gdje je zamijenila tradicionalnu elektroforezu u gelu za analizu DNK, RNK, proteina i ugljikohidrata. U analizi biomakromolekula koristi se najčešće kapilarna gel-elektroforeza. Primjenjuje se za određivanje slijeda nukleotida, utvrđivanje mutacija, u proizvodnji *antisense* oligonukleotida i analizi dijagnostičkih i terapijskih molekula DNK.

Osim u famaciji, kapilarna elektroforeza se koristi u molekularnoj biologiji, genetici, biokemiji, mikrobiologiji, virologiji i forenzici (www.beckmancoulter.com).

1.5 VEZANI SUSTAV TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI I MASENE SPEKTROMETRIJE

Tridesetih godina prošlog stoljeća kromatografija postaje rutinska laboratorijska metoda. Od svog početka do današnjih dana doživjela je pravi procvat. Danas se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti smatra standardom u farmaceutskoj industriji, s kojim se uspoređuju sve ostale tehnike. HPLC je separacijska tehnika koja uspješno i reproducibilno razdvaja sastojke smjese sa svrhom dokazivanja, određivanja sadržaja ili pročišćavanja uzorka, odnosno preparativne svrhe (Poole, 2003). Dokazivanje i određivanje sadržaja provodi se primjenom različitih detektora, poput ultraljubičastog spektrofotometra, detektora s nizom fotosenzitivnih dioda (engl. *Diode Array Detector,* DAD), fluorescencijskog detektora (engl. *Fluorescence Detector*, FLD), elektrokemijskog detektora (engl. *Electrochemical Detector*, ED), detektora indeksa loma (engl. *Refractive Indeks Detector*, RID) ili detektora raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD). Danas se HPLC tehnika povezuje u složene sustave s nizom drugih načina dokazivanja i određivanja sadržaja razdvojenih sastavnica smjese, poput vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS), nuklearne magnetske rezonancije (LC-NMR) ili infracrvene spektrometrije (LC-IR) i dr.

Nedostatak HPLC tehnike je visoka cijena, velika potrošnja organskih otapala koja se koriste u analizi, zagađenje okoliša, nepostojanje univerzalnog detektora za sve analite i različite vrste analiza. Za neke spojeve, bez obzira na tip detektora, osjetljivost je niska. Moguće su ireverzibilne neuočene adsorpcije analita, što dovodi do lažnih rezultata. Koeluaciju dva ili više analita je uz primjenu nekih detektora teško uočiti. Sofisticiranost i složenost tehnike zahtijeva stručnog i educiranog analitičara. No bez obzira na nedostatke,

HPLC ima niz prednosti poput brzine, visoke rezolucije, osjetljivosti, ponovljivosti, točnosti i automatiziranosti, zbog čega je postala nezaobilaznom tehnikom kako u farmaceutskoj industriji, tako i u analitici općenito.

1.5.1 Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda

DAD je detektor koji se u tekućinskoj kromatografiji najčešće koristi, budući da mnogi lijekovi apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. To je UV-Vis detektor koji može snimati cijelo ultraljubičasto i vidljivo područje (190 – 800 nm), uz razlučivanje od 1 nm. Njegova prednost pred običnim UV-Vis detektorom očituje se u tome što se za vrijeme jedne analize može istovremeno provoditi spektroskopsko skeniranje i precizno očitavanje vrijednosti apsorbancija. DAD detektor omogućuje snimanje cijelog UV-Vis spektra svakoga razdvojenoga kromatografskog pika, što pruža dodatnu dimenziju tijekom analize. Naime, dobiveni UV-Vis spektri daju dodatnu kvalitativnu informaciju, odnosno sigurnost u identifikaciji, pored vremena zadržavanja analita. Analizom dobivenih UV-Vis spektara DAD detektorom također je moguće procijeniti čistoću kromatografskog pika, odnosno utvrditi je li postignuto potpuno razdvajanje, drugim riječima utvrditi selektivnost analitičke metode, budući da sam oblik pika ne otkriva odgovara li on jednoj, dvije ili čak više sastavnica smjese. Nadalje, moguće je istovremeno dobiti kromatograme na nekoliko različitih valnih duljina (Snyder i sur., 1997; Watson, 2005). To je iznimno korisno kad nema spoznaja o molarnoj apsorptivnosti analita pri različitim valnim duljinama ili pak kada sastavnice snažno apsorbiraju pri različitim valnim duljinama. Dodatna prednost DAD detektora je što se može povezati s drugim detektorima, budući da, za razliku od masene spektrometrije, analit iz detektora izlazi nepromijenjen, a u svrhu dobivanja više informacija, bolje strukturne karakterizacije pojedinih sastavnica smjese ili osiguranja nižih granica dokazivanja i određivanja.

Nedostaci DAD detektora su što se njime mogu analizirati samo molekule koje u svojoj strukturi imaju kromofor. Šum bazne linije je relativno velik, pa je i osjetljivost manja (ovisno o apsorbanciji analita reda veličine 10^{-8} do 10^{-9} g/mL). Također su moguće promjene u radu lampe, što dovodi do pogrešaka.

1.5.2 Fluorescencijski detektor

Fluorescencijski detektor je iznimno osjetljiv i specifičan. Upravo zbog toga je pravi izbor kod analiza sastavnica koje se očekuju u vrlo malim količinama i kod složenih uzoraka. Naravno, pretpostavka za oba slučaja je da molekule analita fluoresciraju, što je ujedno glavno ograničenje primjene ovog detektora, budući da mali broj molekula lijekova pokazuje fluorescenciju. Prednost fluorescencijskog detektora je velika osjetljivost, otprilike 10 – 1000 puta veća nego za DAD detektor, pa se njime redovito analiziraju sastavnice u koncentracijama ng/mL, čak i pg/mL.

Ograničenje detektora je mali broj molekula lijekova koji se njime može analizirati. Moguće je provesti derivatizaciju reagensom koji posjeduje fluorofor, no to zahtijeva dodatnu predobradu uzoraka (Snyder i sur., 1997).

1.5.3 Maseni spektrometar

Masena spektrometrija je analitička tehnika kojom se razdvajaju ionizirane molekule na temelju razlike u omjeru mase i naboja (*m/z*). Instrument se sastoji od tri glavna dijela, ionizatora, analizatora i detektora. Nakon unošenja uzorka u maseni spektrometar, analit se ionizira, zatim se u analizatoru razdvaja s obzirom na omjer mase i naboja djelovanjem magnetskog ili električnog polja te se primjenom detektora (elektronskog pojačala ili scintilacijskog brojača) ioni detektiraju, signal se obrađuje, a moguće je provesti i kvantifikaciju analita (Mornar i sur., 2013a; Snyder i sur., 1997; Watson, 2005).

Ionizacija analita se može provoditi na nekoliko načina, pa tako razlikujemo ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI), kemijsku ionizaciju (engl. *Chemical Ionization*, CI), kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*, APCI), ionizaciju fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photo Ionization*, APPI), matriksom potpomognutu ionizaciju laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI), ionizaciju bombardiranjem brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment*, FAB) i ionizaciju termoraspršenjem (engl. Thermospray). Svi tipovi ionizacije se dijele u dvije osnovne skupine, ovisno o količini energije koju predaju molekuli analita: tzv. *blage* ionizacijske tehnike (engl. *soft ionization*) i *čvrste* ionizacijske tehnike (engl. *hard ionization*). Tijekom ionizacije može doći do fragmentacije molekule analita, a upravo o količini energije koju ionizator predaje, odnosno u tipu ionizatora, ovisi stupanj, način i vrsta pucanja veza u molekuli analita te stvaranja različitih fragmenata.

Analizator razdvaja dobivene ione analita prema omjeru mase i naboja. Neki od analizatora koji se najčešće koriste su: stupica za ione (engl. *Ion Trap*), kvadrupolni analizator (engl. *Quadropole*) i analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF).

Danas se sve više koristi tandemska masena spektrometrija (MS/MS), koja omogućuje dodatnu fragmentaciju iona. MS/MS analizatori na tržištu se dijele u tri osnovne skupine: spektrometre s više analizatora koji omogućuju analizu do MS^2 (engl. *Triple Quadrupole*, QqQ), instrumente s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija i također omogućuju analizu do MS^2 (engl. *Quadrupole-Time of Flight*, Q-TOF) te jedan analizator koji omogućuje analizu do MS^n, npr. stupica za ione (Cindrić i sur., 2009).

Tržište masene spektrometrije je iznimno dinamično, i moguće je naći brojne kombinacije ionizatora i analizatora. Osim što se ti instrumenti razlikuju prema načinu rada, cijeni, selektivnosti, osjetljivosti, preciznosti i razlučivanju, razlikuju se i prema namjeni. Naime, ovisno o tipu uzorka koji se analizira te o namjeni analize (identifikacija nepoznatih spojeva, strukturna karakterizacija onečišćenja, određivanje sadržaja analita u vrlo niskim koncentracijama), ciljano će se odabrati određeni tip ionizatora i analizatora.

Potrebno je istaknuti da je masena spektrometrija najprije korištena kao zasebna tehnika, zatim je povezana s plinskom kromatografijom, a krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća počelo je povezivanje s tekućinskom kromatografijom, dok je danas moguće povezivanje i s drugim separacijskim tehnikama, poput kapilarne elektroforeze.

Ionizacija elektroraspršenjem se najčešće koristi u vezanim sustavima tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Elektrosprej-ionizator ionizira molekule analita u otopini uzorka prije nego što dođu do samoga masenog spektrometra. Pokretna faza koja je došla s tekućinskog kromatografa se raspršuje pri atmosferskom tlaku u prisutstvu jakoga elektrostatskog polja (3 – 5 kV), koje potpomaže disocijaciju molekula analita, i zagrijanog plina za sušenje koji uzrokuje da kapljice otapala isparavaju. Isparavanjem otapala kapljice pokretne faze postaju sve manje, povećava se površinski naboj, dok ne prevladaju odbojne elektrostatske sile između iona, pri čemu se kapljice rasprsnu, a ioni analita prelaze u plinovitu fazu te ulaze u analizator. Ioni nastali elektrosprej-ionizacijom mogu biti pozitivno ili negativno nabijeni, ovisno o vrsti i kemijskoj strukturi analita, ali i o uvjetima analize. Elektrosprej-ionizator je posebno pogodan za analizu velikih biomakromolekula (do 150 000 Da), poput proteina, peptida i oligonukleotida, no njime je moguće analizirati i male molekule.

Stupica za ione je analizator koji koristi i električno i magnetsko polje za zadržavanje iona unutar vakuumskog sustava. Postoji nekoliko tipova i izvedbi stupice za ione, no najčešće se koristi analizator koji ima dvije kružne i dvije polukružne elektrode. Kada ioni uđu u stupicu, osciliraju sve dok uslijed promjene napona ne budu izbačeni van. Na ovaj način moguće je zadržati primjerice samo molekulski ion, a ostale ione ukloniti iz stupice. Jednom izolirani ion moguće je primjenom plina helija i fragmentirati. Dobiveni fragmentni ion također je moguće izolirati i još jednom dodatno fragmentirati. Prema tome, prednost stupice za ione je što omogućuje izolaciju i fragmentaciju iona u istom prostoru.

1.5.4 Primjena vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (LC-MS) u analitici lijekova

Upravo zbog svoje sposobnosti da razdvoji vrlo srodne analite, uz preciznost i osjetljivost, automatizirani pristup, pouzdanost i jednostavnost primjene, od svih separacijskih tehnika upravo je HPLC postala rutinska metoda u farmaceutskoj industriji. No osim razdvajanja sastavnica smjese, HPLC ne pruža informacije o identitetu i količini pojedinog analita. Zato je potrebno koristiti ranije navedene detektore. Primjenom DAD detektora nakon HPLC analize dobivaju se tri dimenzije, vrijeme zadržavanja, UV-spektar analita i intenzitet signala (Nageswara Rao i Nagaraju, 2003), dok povezivanje s masenom spektrometrijom unosi novu dimenziju, odnosno dodatnu sigurnost pri identifikaciji i strukturnoj karakterizaciji spoja te bolju osjetljivost kod određivanja sadržaja. No ponekad upravo prethodna kromatografska separacija osigurava točnu identifikaciju masenom spektrometrijom, budući da MS ne može razlikovati dva izomera, a kromatografsko razdvajanje također smanjuje učinak ionske supresije. Prema tome, LC-MS tehnika obuhvaća separacijske mogućnosti tekućinske kromatografije, koje se temelje na razdjeljivanju, adsorpciji, ionskoj izmjeni ili isključenju prema veličini, s brojnim prednostima masene spektrometrije.

LC-MS je posljednjih godina doživio golemi rast u primjeni u različitim područjima analitičke kemije, biokemije, farmaceutske analize, kliničke analize, forenzičke i toksičke analize, u kvalitativnoj i kvantitativnoj karakterizaciji složenih uzoraka (Holčapek i sur., 2012). U farmaceutskoj industriji se LC-MS tehnika primjenjuje u različitim fazama razvoja novog lijeka, za identifikaciju međuprodukata sintetskog postupka, određivanje farmakokinetskih parametara, identifikaciju i određivanje sadržaja aktivne farmaceutske supstancije, ispitivanje čistoće lijeka, strukturnu karakterizaciju i određivanje onečišćenja, u *in vivo* studijama za kvantitativne bioanalize, optimizaciju terapije, identifikaciju metabolita

te općenito u kontroli kvalitete lijekova. Posebnim područjem primjene LC-MS tehnike smatra se i proteomika, gdje se koristi u razvoju peptidnih i proteinskih lijekova, karakterizaciji proteina i otkriću biomarkera (Chen i Pramanik, 2009; Luterotti, 2012; Mornar i sur., 2013a). LC-MS je tehnika izbora za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju onečišćenja niske koncentracije u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima, posebice zahvaljujući svojoj brzini, osjetljivosti i selektivnosti (Liu i sur., 2007).

1.6 PREGLED ANALITIČKIH METODA U ISTRAŽIVANJU STATINA

Kontrola lijekova do početka 20. stoljeća nije bila zakonska obaveza. Stoga su se njihova djelotvornost, sigurnost i kvaliteta rijetko kad ispitivale. Nakon što su se dogodili slučajevi poput etilen-glikola, koji se koristio u proizvodnji sulfanilamidnog eliksira te uzrokovao 1937. godine brojne smrti, ili najpoznatije tragedije u farmaceutsko-medicinskoj povijesti, kada su zbog primjene lijeka talidomida kod trudnica rođene tisuće deformirane djece, zakonska legislativa se promijenila, a kontrola lijekova znatno postrožila. Analitičke metode postale su nužni korak u svim fazama razvoja lijeka, počevši od istraživanja novih potencijalnih učinkovitih molekula i praćenja međuprodukata sintetskog procesa, do gotovog formuliranog lijeka, interakcija lijeka s pomoćnim tvarima ili primarnim spremnikom i stabilnosti lijeka tijekom skladištenja. Čim lijek ulazi u fazu kliničkih ispitivanja, podrazumijeva se da novi lijek, odnosno gotovi ljekoviti oblik sadrži točnu količinu aktivne farmaceutske supstancije koja je deklarirana na proizvodu.

Farmaceutska analiza danas pretpostavlja detaljan izvještaj o identitetu, čistoći, sadržaju i stabilnosti kako početnih sirovina i pomoćnih tvari, tako i aktivnih farmaceutskih supstancija (Nigović i sur., 2012). Posljednjih godina prošlog stoljeća, pogotovo od kada su uvedene ICH smjernice o onečišćenjima u lijekovima (ICH Q3A; ICH Q3B; ICH Q3C; ICH Q3D), promijenila se definicija kvalitete lijekova. Fokus je pomaknut s pojma *čistoća*, na pojam *onečišćenja* u ljekovitim tvarima i *razgradne produkte* u gotovim ljekovitim oblicima (Singh i sur., 2012). Sve se češće razvijaju metode koje analiziraju istovremeno lijek, njegove metabolite i razgradne produkte te procesna onečišćenja. Najčešće se koriste separacijske tehnike, poput tekućinske i plinske kromatografije te kapilarne elektroforeze, uz različite načine detekcije. Za ovako specifične analize kompleksnih uzoraka, s velikim brojem strukturno sličnih spojeva, sve se više primjenjuje ESI-MS tehnika koja pruža detaljne strukturne informacije o lijeku i njegovim onečišćenjima (Smyth, 2005). Upravo je za njezin razvoj 2002. godine John Fenn dobio Nobelovu nagradu iz kemije. LC-MS tehnika općenito

je vrlo selektivna i osjetljiva, robusna te omogućuje analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. Ipak, u analizi lijekova i onečišćenja te razgradnih produkata postoje ograničenja ove tehnike. Prvo je sposobnost analita da se ionizira prije ulaska u maseni spektrometar. Nedostatak LC-MS tehnike je i potencijalna supresija ionizacije, pri čemu kod velikog broja analita u uzorku može doći do slabljenja intenziteta stvaranja iona za pojedine sastavnice smjese (Sheldon, 2003).

Statini spadaju među najpropisivanije lijekove, a njihova primjena je svakodnevna i dugotrajna (Kaufmann i sur., 2002), stoga ne iznenađuje veliki broj različitih analitičkih metoda razvijenih za njihovu analizu. Posljednjih godina objavljen je niz radova s pregledom analitičkih metoda za određivanje statina (Erturk i sur., 2003; Nirogi i sur., 2007; Novakova i sur., 2008). Većina metoda temelji se tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti obrnutih faza. Analitičke metode u analitici lijekova, pa tako i statina, mogu se podijeliti u dvije velike skupine. Prva je primjena na aktivnim farmaceutskim supstancijama i njihovim dozirnim oblicima, a druga u biološkim ispitivanjima. Analiza lijekova pruža informacije o identitetu, čistoći, sadržaju i stabilnosti farmaceutskih sirovina, aktivnih farmaceutskih suptancija i pomoćnih tvari, uz različite pristupe analizi čistih aktivnih farmaceutskih supstancija te gotovih ljekovitih oblika. Posebna se pozornost posvećuje ispitivanju čistoće i određivanju onečišćenja zbog njihova potencijalno neželjenoga farmakološkog učinka, moguće toksičnosti i utjecaja na aktivnost, bioraspoloživost, sigurnost i stabilnost lijeka (Nigović i sur., 2012).

Osim analize čistih aktivnih farmaceutskih supstancija i gotovih ljekovitih oblika, postoji čitav niz metoda razvijenih za analizu statina u različitim biološkim uzorcima, najčešće serumu i plazmi, ali i punoj krvi, urinu, slini ili kosi. Bioanalitičke metode su iznimno važne za praćenje lijeka i njegovih metabolita u svim fazama razvoja lijeka. Primjenjuju se za ispitivanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava lijeka, u toksikološkim ispitivanjima na životinjama u ranim fazama kliničkih ispitivanja, za ispitivanje bioraspoloživosti, u bioekvivalencijskim studijama, na temelju kojih se donose odluke o sigurnosti, učinkovitosti, načinu primjene, doziranju i stabilnosti lijeka.

Budući da su u ovom istraživanju razvijene nove metode za analizu statina u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima te dodacima prehrani, te zbog opsega objavljivanih radova u analitici statina, u ovom pregledu literature bit će navedene samo najznačajnije i novije analitičke metode u analitici statina u spomenutim vrstama uzoraka.

Najčešće korištena tehnika u analizi lijekova je već spomenuti standard u farmaceutskoj industriji, **tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.** Objavljen je niz HPLC metoda za analizu pojedinih statina. Pri tome se najčešće koristi UV, odnosno DAD detektor. Osim HPLC tehnike, u analitici statina ponekad se koristi i **tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti**.

Simvastatin je, uz atorvastatin, najčešće korišteni lijek iz skupine statina, pa postoji nekoliko metoda za njegovu analizu. U već spomenutom radu Novakova i suradnici su objavili pregled analitičkih metoda za analizu simvastatina i atorvastatin, s naglaskom na primjenu, farmaceutske formulacije, kliničku primjenu te ekološka ispitivanja (Novakova i sur., 2008). Od te godine objavljene su još neke HPLC-UV metode za analizu samog simvastatina (Hill i sur., 2009; Ortega i sur., 2010). Također, razvijen je niz metoda za istovremeno određivanje simvastatina i nekoga drugog lijeka. Objavljena je HPLC metoda za istovremeno određivanje simvastatina i tokotrienola (Ali i Nazzal, 2009). Razvijena je HPLC metoda za ispitivanje i procjenu pripravaka peleta s postepenim otpuštanjem visokih doza nikotinske kiseline i trenutnim oslobađanjem simvastatina (Zhao i sur., 2010). Budući da se u terapiji simvastatin često primjenjuje s ezetimibom, lijekom koji također snižava razinu LDL-kolesterola smanjivanjem apsorpcije kolesterola u probavnom sustavu, dakle drugim mehanizmom nego što ga imaju statini, objavljen je čitav niz metoda za njihovu istovremenu analizu i ispitivanje stabilnosti (Chaudhari i sur., 2007b; Hefnawy i sur., 2009a; Oliveira i sur., 2007; Ozaltin i Ucakturk, 2007).

Za identifikaciju i određivanje sadržaja najčešće se koristi HPLC metoda uz primjenu DAD i MS detektora koji omogućuju detaljnu strukturnu karakterizaciju. Ponekad se za potvrdu identiteta onečišćenja koristi i FT-IR ili NMR analiza. Objavljeno je nekoliko metoda za ispitivanje simvastatina i njegovih onečišćenja i razgradnih produkata u ljekovitim oblicima (Bertacche i sur., 2007; Bhatia i sur., 2011; Plumb i sur., 2007; Reddy i sur., 2009; Vuletić i sur., 2005). Plumb i suradnici razvili su i UPLC metodu uz primjenu TOF-MS detektora za brzu klasifikaciju velikog broja proizvedenih serija tableta simvastatina s obzirom na onečišćenja (Plumb i sur., 2008).

Objavljeno je nekoliko HPLC metoda za određivanje sadržaja pravastatina u gotovim ljekovitim oblicima, određivanje onečišćenja, provođenje stabilitetnih studija te analizu u biološkim tekućinama (Brain-Isasi i sur., 2008; Campos-Lara i sur., 2008; Kocijan i sur., 2006; Mulvana i sur., 2000; Onal i Sagirli, 2006).

Fluvastatin je manje zastupljen u kliničkoj praksi nego primjerice simvastatin i atorvastatin, pa iako je lijek uveden na tržište 1993. godine, nema puno objavljenih analitičkih

metoda za njegovu analizu. Razvijena je metoda za fotodegradacijsko ispitivanje fluvastatina primjenom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti i spektrofotometrije (Mielcarek i sur., 2009).

Pregledom literature može se ustanoviti da je prva HPLC metoda za određivanje rosuvastatina, u prisutnosti njegovih razgradnih produkata, u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku objavljena 2005. godine (Mehta i sur., 2005). Također je razvijena, u analitici lijekova rjeđe korištena, HPTLC metoda za analizu rosuvastatina (Sane i sur., 2005). Za istovremeno određivanje rosuvastatina u kombiniranim pripravcima s ezetimibom također je objavljena HPTLC metoda (Varghese i Ravi, 2010) i HPLC metoda (Gajjar i Shah, 2010). Predložena je HPLC metoda za istovremenu identifikaciju i određivanje sadržaja atenolola, rosuvastatina, spironolaktona, glibenklamida i naproksen-natrija u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji, gotovom ljekovitom obliku te ljudskoj plazmi (Sultana i sur., 2008).

Pitavastatin je najnoviji lijek iz skupine statina. Registriran je u Japanu 2003., dok je odobrenje za ulazak na tržište SAD-a dobio 2009. godine. U Velikoj Britaniji je odobren 2010., dok se trenutno razmatra njegovo puštanje na tržište u ostatku Europske unije. Objavljene su dvije HPTLC metode za određivanje pitavastatina u gotovim ljekovitim oblicima (Kumar i Baghyalakshmi, 2007; Panchal i sur., 2008). Nekoliko HPLC-UV metoda razvijeno je za analizu pitavastatina te za provođenje stabilitetnih studija (Grobleny i sur., 2009; Kumar i sur., 2011; Panchal i Suhagia, 2011b; Panchal i sur., 2009). Objavljena je UPLC metoda za ispitivanje razgradnje pitavastatina (Gomas i sur., 2010). Za istovremeno određivanje pitavastatina i ezetimiba objavljena je HPLC metoda (Panchal i Suhagia, 2011a).

Atorvastatin je lijek iz skupine statina koji se najčešće primjenjuje u kliničkoj praksi te jedan od najčešće korištenih lijekova uopće. Stoga ne čudi veliki broj analitičkih metoda razvijenih za njegovu analizu. Novakova i suradnici su u svom radu iz 2008. godine dali detaljan pregled do tada objavljenih HPLC metoda za određivanje atorvastatina u lijekovima i biološkim uzorcima (Novakova i sur., 2008), pa će ovdje biti navedene samo novije HPLC metode i druge tehnike korištene u analitici atorvastatina. HPTLC metoda je razvijena za određivanje atorvastatina i fenofibrata u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku (Skirkhedkar i Surana, 2010). Razvijeno je nekoliko HPLC metoda za stabilitetne studije uz primjenu UV ili fluorescencijskog detektora (Khedr, 2008; Mohammadi i sur., 2007; Mustafa i sur., 2010). No, do sada je objavljen mali broj analitičkih metoda za analizu onečišćenja atorvastatina. HPLC-UV metoda razvijena je za istodobnu analizu atorvastatina i njegovih sedam onečišćenja (Petkovska i sur., 2008). Predložena je micelarna

LC metoda za predviđanje kromatografskog ponašanja atorvastatina i njegovih onečišćenja (Malenović i sur., 2011). Za strukturnu karakterizaciju i identifikaciju razgradnih produkata atorvastatina razvijene su dvije LC-MS metode. Prva je koristila APCI ionizator u pozitivnom načinu snimanja i TOF analizator (Shah i sur., 2008). Identificirano je šest nepoznatih razgradnih produkata atorvastatina. Oksidativni razgradni produkti atorvastatina izolirani su i identificirani primjenom preparativne HPLC tehnike, nakon čega je uslijedila MS i NMR spektroskopska analiza (Kračun i sur., 2009).

Atorvastatin, kao i simvastatin, dolazi u kombiniranim pripravcima s drugim lijekovima, najčešće s lijekovima koji također snižavaju koncentraciju kolesterola u plazmi nekim drugim mehanizmom, ali i primjerice s lijekovima za snižavanje krvnog tlaka ili s antitromboticima. Brza UPLC metoda predložena je za istovremeno određivanje atorvastatina, acetilsalicilne kiseline i njihovih razgradnih produkata u kombiniranim gotovim ljekovitim oblicima (Vora i Kadav, 2008). Isti autori razvili su brzu UPLC metodu za istodobnu analizu atorvastatina i fenofibrata te njihovih razgradnih produkata u kombiniranim pripravcima (Kadav i Vora, 2008). HPTLC metode su predložene za određivanje atorvastatina u kombiniranim pripravcima s fenofibratom (Skirkhedkar i Surana, 2009) i ramiprilom (Panchal i Suhagia, 2010). Objavljeno je nekoliko HPLC metoda za istovremeno određivanje atorvastatina u kombiniranim dozirnim oblicima s amlodipinom (Raja Rajeswai i sur., 2006; Sivakumar i sur., 2007), fenofibratom (Nakarani i sur., 2007), ezetimibom (Sechachalam i Kothapally, 2008), ramiprilom (Panchal i Suhagia, 2010; Lincy i sur., 2008) te atorvastatina u kombinaciji s acetilsalicilnom kiselinom i klopidogrelom (Londhe i sur., 2011), odnosno s acetilsalicilnom kiselinom i ramiprilom (Damle i sur., 2010).

Lovastatin je prvi registrirani statin, a danas je u kliničkoj praksi uglavnom zamijenjen atorvastatinom i simvastatinom. Stoga nema puno novijih analitičkih metoda za identifikaciju i određivanje njegova sadržaja u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku. No u novije vrijeme objavljeno je nekoliko metoda za analizu lovastatina kao djelatne tvari u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom, registriranima kao dodatak prehrani. U većini tih metoda lovastatin se naziva *monakolin K*, jedna od 14 aktivnih sastavnica crvene fermentirane riže koje snižavaju razinu kolesterola inhibicijom enzima HMG-CoA reduktaze. Razvijeno je nekoliko HPLC metoda s DAD i MS detektorom za određivanje lovastatina u dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom (Chairote i sur., 2008; Gordon i sur., 2010; Heber i sur., 2001; Huang i sur., 2006; Li i sur., 2004; Li i sur., 2005). Mnoge od ovih provedenih studija su ukazale na razlike u sastavu i sadržaju monakolina. Također, uočeni su problemi odstupanja od deklariranog sadržaja monakolina K, odnosno lovastatina. Sve

objavljene metode traju od 20 do čak 40 minuta po analizi. Nedavno je objavljena brza metoda masene spektrometrije injektiranjem u protok (engl. *Flow injection tandem mass spectrometry*), u kojoj analiza traje jednu minutu, ali je metodom moguće provesti samo polukvantitativno određivanje sadržaja lovastatina (Song i sur., 2012).

Razvijen je niz metoda za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom u kojima je određivan citrinin, nefrotoksični nusprodukt fermentacije. No u većini metoda lovastatin ili svi monakolini određuju se jednom tehnikom, dok se citrinin određuje drugom. Objavljene su HPLC metode u kojima se lovastatin u dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom određuje UV-detektorom, dok se citrinin određuje indirektnom kompetitivnom ELISA analizom (Chen i Hu, 2005), drugom HPLC metodom uz primjenu MS detektora (Pattanagul i sur., 2008) ili TLC tehnikom (Becker i sur., 2009). Pregledom literature pronađena je jedna kapilarnoelektroforetska metoda za određivanje lovastatina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom, ali samo u njegovu laktonskom obliku (Li i sur., 2007b). Do sada su razvijene samo dvije, vrlo slične HPLC metode za istovremeno određivanje lovastatina u laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku te citrinina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom (Lee i sur., 2006; Wu i sur., 2011). Metode je objavila ista grupa autora, uz minimalnu izmjenu sastava pokretne faze. Nakon kromatografskog razdvajanja lovastatin se analizirao primjenom UV-detektora, dok se citrinin odredio pomoću fluorescencijskog detektora. U obje metode sastav i sadržaj ostalih monakolina nije se ispitivao. Prema tome, pregledom literature nije pronađena nijedna HPLC metoda koja istovremeno analizira lovastatin u laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku, ostale monakoline i citrinin u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom.

Plinska kromatografija se općenito rijetko primjenjuje u analitici lijekova budući da postupci zahtijevaju složenu predobradu uzorka i obaveznu derivatizaciju analita kako bi se osigurali hlapljivi derivati molekula lijeka, no razvijene su i GC metode za analizu statina (Kublin i sur., 2006; Morris i sur., 1993).

UV spektrofotometrija je jednostavna metoda koja ne iziskuje sofisticiranu analitičku opremu i velike troškove, pa se koristi za određivanje lijekova u ljekovitim oblicima. No s obzirom na sve navedene postrožene zahtjeve o čistoći i identifikaciji, strukturnoj karakterizaciji i određivanju sadržaja onečišćenja lijekova, teško se može usporediti sa separacijskim tehnikama poput tekućinske kromatografije vezane s različitim selektivnim i osjetljivim detektorima. Objavljeno je nekoliko UV spektrofotometrijskih metoda za analizu statina (Ashour i sur., 2011; Erk, 2003; Markopoulou i Koundourellis,

2003). **Spektrofluorimetrijska metoda** je korištena za određivanje atorvastatina u gotovim ljekovitim oblicima (Sharaf El-Din i sur., 2012)

Elektrokemijske metode iznimno su brze i vrlo osjetljive. Iako nije riječ o separacijskoj tehnici, elektrokemijska analiza dala je veliki doprinos u razjašnjenju redoks-reakcija tijekom metaboličke razgradnje statina (Nigović i sur., 2007). Razvijeno je nekoliko elektrokemijskih metoda za određivanje lovastatina (Nigović i Pavković, 2009; Zhang i sur., 2004), atorvastatina (Dogan-Topal, 2007; Erk, 2010), simvastatina (Komorsky-Lovrić i Nigović, 2006; Nigović i sur., 2008;), pravastatina (Nigović, 2006) i fluvastatina (Dogan i sur., 2007) u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima.

Pregledom literature pronađeno je samo nekoliko metoda **kapilarne elektroforeze** za statine. Kapilarnoelektroforetska metoda primijenjena je za analizu pravastatina u procesu proizvodnje lijeka (Kocijan i sur., 2005). Za određivanje pravastatina u gotovom ljekovitom obliku razvijena je metoda kapilarne zonske elektroforeze, dok je MEKC metoda razvijena za analizu njegovih oksidacijskih produkata (Nigović i Vegar, 2008). Kapilarnoelektroforetska metoda koristi se za brzo određivanje razine proizvodnje lovastatina nakon primjene različitih sojeva vrste *Aspergillus terreus* (Kittel i sur., 2005). Za rutinske analize lovastatina i praćenje njegovih oksidacijskih produkata razvijena je CE metoda (Javernik Rajh i sur., 2003). Za praćenje učinkovitosti terapije i optimizaciju doze nužno je praćenje koncentracije lijeka u urinu. U tu svrhu razvijena je CE metoda za određivanje lovastatina u uzorcima urina. Kako su očekivane količine lijeka u urinu male, a osjetljivost kapilarnoelektroforetske metode niska, autori su proveli ukoncentriravanje uzorka primjenom metode prolazne pokretne granice kemijske reakcije (engl. *Transient moving chemical reaction boundary method*), čime su osjetljivost metode povećali za više od 100 puta (Li i sur., 2007a). Pregledom literature pronađena je samo jedna kapilarnoelektroforetska metoda za određivanje lovastatina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom (Li i sur., 2007b). Autori su prije analize proveli baznu hidrolizu proizvoda kako bi sav lovastatin u laktonskom obliku preveli u β-hidroksi kiselinski oblik. Stoga je nedostatak predložene metode što se dva glavna djelatna sastojka crvene fermentirane riže, monakolin K (lovastatin) i monakolin K kiselina (lovastatin β-hidroksi kiselina), koji čine oko 90% sadržaja ukupnih monakolina, nisu određivala zasebno. Do sada objavljena znanstvena literatura pruža samo jednu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu simvastatina (Srinivasu i sur., 2002a). Predložena MEKC metoda razvijena je za određivanje simvastatina i lovastatina u gotovim ljekovitim oblicima. Za analizu atorvastatina u farmaceutskim proizvodima razvijena je brza kapilarnoelektroforetska metoda, kasnije primijenjena i na mikročipu (Guihen i sur., 2006). Objavljena je metoda za istodobno

određivanje atorvastatina i amlodipina u kombiniranim pripravcima (Hefnawy i sur., 2009b). CE metoda razvijena je za ispitivanje enantiomerne čistoće fluvastatina te omogućuje daleko jednostavniju i jeftiniju analizu nego uobičajene LC metode koje zahtijevaju primjenu specijalnih kiralnih kolona (Trung i sur., 2008). Metode za analizu rosuvastatina i pitavastatina su malobrojne, što nije iznenađujuće, budući da je riječ o novijim lijekovima iz skupine statina. Pregledom literature pronađena je samo jedna CZE metoda za određivanje sadržaja rosuvastatina u gotovom ljekovitom obliku (Süslü i sur., 2007) te jedna CE metoda za razdvajanje i analizu enantiomera pitavastatina (Cheng i sur., 2010).

Budući da statini imaju različite kemijske strukture, razvoj metoda za njihovu analizu provodi se zasebno za svaki pojedini statin. Osim toga, kako se statini nikada ne propisuju skupa u terapiji, do sada se nije javila potreba za njihovim istovremenim određivanjem. U novije vrijeme objavljeno je svega nekoliko analitičkih metoda za istovremenu analizu dvaju ili više statina. Razvijene metode mogu se koristiti kao jedinstvena analitička metoda za bilo koji od predloženih statina, a primijenjene su na različitim uzorcima, farmaceutskim pripravcima, biološkim uzorcima te otpadnim vodama. Predložena je HPTLC metoda za određivanje simvastatina, pravastatina i rosuvastatina u gotovim ljekovitim oblicima (Chaudhari i sur., 2007a). HPLC-UV metoda razvijena je za istovremeno određivanje atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina u gotovim ljekovitim oblicima te za praćenje *in vitro* metabolizma lijeka (Pasha i sur., 2006). HPLC metoda uz primjenu detektora s nabijenim aerosolom (engl. *Charged aerosol detector*, CAD) razvijena je za farmaceutsku analizu atorvastatina, simvastatina i lovastatina (Novakova i sur., 2009a). Za istovremeno određivanje atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, rosuvastatina i simvastatina te četiriju lijekova iz skupine fibrata razvijena je HPLC-UV metoda (Kublin i sur., 2012). Autori su u istom radu predložili i GC-FID metodu za identifikaciju atorvastatina, lovastatina i simvastatina. Razvijene su dvije HPLC metode za ispitivanje stabilnosti pravastatina, fluvastatina, atorvastatina i rosuvastatina u gotovim ljekovitim oblicima (Gomes i sur., 2009). Za istovremeno određivanje statina u biološkim uzorcima razvijeno je nekoliko analitičkih metoda. Dvije HPLC-UV metode su razvijene za analizu atorvastatina i rosuvastatina (Shah i sur., 2011) te atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina (Sultana i sur., 2010). Brza UPLC metoda uz primjenu masenog detektora razvijena je za istovremeno određivanje atorvastatina i simvastatina (Novakova i sur., 2009b).

Zbog česte upotrebe statina u svijetu, a potencijalnoga štetnog učinka na prirodu, biljni i životinjski svijet te čovjeka, u posljednje vrijeme razvijeno je nekoliko metoda za određivanje statina u uzorcima iz okoliša, uglavnom otpadnim vodama. Tako je prva

objavljena metoda za istovremenu analizu statina razvijena za određivanje atorvastatina, lovastatina, pravastatina i simvastatina u vodenim uzorcima iz okoliša primjenom osjetljive LC-ESI-MS/MS metode (Miao i Metcalfe, 2003). Budući da su očekivane količine lijeka u otpadnim vodama i prirodnim vodotocima iznimno niske, uz HPLC-Q-TOF metodu za analizu atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina predložene su tri tehnike ukoncentriravanja: ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE), disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Disperzive liquid-liquid microextraction*,) i ekstrakcija mješalom (engl. *Stir-bar sorptive extraction*). Primjenom HPLC-Q-TOF-MS metode provedena je usporedba različitih ektrakcijskih postupaka za određivanje statina u otpadnim vodama (Martin i sur., 2011). Pregledom literature pronađena je samo jedna kapilarnoelektroforetska metoda za analizu atorvastatina, fluvastatina, gemfibrozila, lovastatina, mevastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina u otpadnim vodama (Dawod i sur., 2010). Predložena su tri različita načina ukoncentriravanja analita: *sweeping*, fokusiranje urušavanjem micela (engl. *Focusing by micelle collapse*) te slaganje uzorka uz pojačano polje (engl. *Simultaneous field-amplified sample stacking*) uz istovremeni *sweeping*.

Službene farmakopejske monografije postoje već neko vrijeme za starije statine, lovastatin, pravastatin i simvastatin. Monografija u Europskoj farmakopeji za atorvastatin 2008. godine, kada je ovo istraživanje započelo, nije postojala. U međuvremenu je uvrštena u najnovije 7. izdanje Europske farmakopeje (Ph. Eur. 7. izdanje). Predložena je HPLC metoda za određivanje onečišćenja atorvastatina, i traje dugačkih 80 minuta uz trošenje velikih količina organskih otapala.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kardiovaskularne bolesti su glavni uzrok smrtnosti u razvijenom svijetu. Hiperlipidemija se smatra jednim od najvažnijih rizičnih čimbenika za razvoj bolesti kardiovaskularnog sustava. Liječenje se provodi, osim dijetoterapijom te promjenom načina života, lijekovima kojima je osnovna funkcija sniženje serumske koncentracije aterogenih lipoproteina i triglicerida te povišenje koncentracije antiaterogenog HDL lipoproteina. Danas postoji nekoliko skupina hipolipemika, a najvažniji su statini. Oni djeluju kao reverzibilni kompetitivni inhibitori HMG-CoA reduktaze, enzima koji katalizira limitirajući korak u biosintezi kolesterola, pretvorbu 3-hidroksi-3metilglutaril CoA u mevalonat. Statini spadaju među najpropisivanije lijekove, a njihova primjena je svakodnevna i dugotrajna.

U Hrvatskoj je 2008. bilo registrirano šest statina: atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin i simvastatin. Noviji statini još uvijek nemaju monografije u Europskoj farmakopeji, pa postoji velika potreba za razvojem novih analitičkih metoda za njihovu identifikaciju i određivanje sadržaja u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima. Budući da je terapija statinima dugoročna i svakodnevna, procjena čistoće je od velikog značaja. Stoga je razvoj osjetljivih i specifičnih metoda za strukturnu karakterizaciju, identifikaciju i određivanje sadržaja onečišćenja neophodan.

Crvena fermentirana riža dobiva se fermentacijom obične, bijele riže (*Oryza sativa* L., *Poaceae*) pomoću kvasca *Monascus purpureus.* Glavne farmakološki aktivne sastavnice s hipolipemičkim učinkom su monakolini, a najvažniji je monakolin K, poznat kao lovastatin, prvi komercijalno dostupan statin na tržištu. Standardizacija dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom najčešće se provodi na 1% monakolina K, odnosno lovastatina, samo jednog od 14 monakolina s hipolipemičkim učinkom koji se mogu naći u fermentiranoj riži.

No dodaci prehrani ne podliježu, kao lijekovi, strogim regulatornim zahtjevima koji osiguravaju kvalitetu, sigurnost i učinkovitost proizvoda, Dobroj proizvođačkoj i laboratorijskoj praksi te kontroli prilikom registracije proizvoda. Diljem svijeta nadležne nacionalne agencije upozoravaju na njihovu lošu kvalitetu. Prema nekim procjenama, svaki četvrti proizvod na tržištu ima neki problem s kvalitetom, najčešće nema djelatne tvari uopće, ili je nema u količini koja je deklarirana.

Stoga je svrha ovog istraživanja razviti nove, selektivne, brze, osjetljive, precizne i točne analitičke metode za analizu statina.

Specifični ciljevi ovoga doktorskog rada su:

1. razviti novu, univerzalnu metodu koja omogućuje analizu bilo kojeg od šest statina registriranih u Europi, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina, njihovu identifikaciju i određivanje sadržaja u gotovim ljekovitim oblicima
2. razviti novu metodu za praćenje čistoće atorvastatina, kao najčešće korištenog statina i jednog od najpropisivanijih lijekova u svijetu, koja će omogućiti istovremenu identifikaciju i određivanje sadržaja atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, laktona atorvastatina i metilnog estera atorvastatina u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima
3. identifikacija i strukturna karakterizacija nepoznatih onečišćenja atorvastatina u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji i gotovim ljekovitim oblicima primjenom masene spektrometrije
4. razviti novu metodu za identifikaciju i određivanje sadržaja lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline te mikotoksina citrinina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom u svrhu kontrole njihove kvalitete
5. strukturna karakterizacija i kvantifikacija ostalih, manje zastupljenih monakolina u dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom

Kako bi se gore navedeni specifični ciljevi ovoga doktorskog rada ostvarili, bit će korištene sofisticirane analitičke tehnike: kapilarna elektroforeza, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i masena spektrometrija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI I KEMIKALIJE

3.1.1 Standardne supstancije

- Atorvastatin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Citrinin (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Desfluoroatorvastatin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Dijastereomer atorvastatina (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Fluvastatin (Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, Hrvatska)
- Ketoprofen (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Lakton atorvastatina (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Lovastatin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Metilni ester atorvastatina (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Pravastatin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Rosuvastatin (Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, Hrvatska)
- Simvastatin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2 Uzorci aktivnih farmaceutskih supstancija i gotovih ljekovitih oblika

- Artein, tablete lovastatina 20 mg (Lek, Ljubljana, Slovenija)
- Atoris, tablete atorvastatina 10 mg (Krka d.d, Novo mesto Slovenija)
- Atorvastatin, aktivna farmaceutska supstancija (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Atorvastatin, aktivna farmaceutska supstancija (Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, Hrvatska)
- Crestor, tablete rosuvastatina 10 mg (AstraZeneca, Cheshire, Velika Britanija)
- Lescol XL, tablete fluvastatina 80 mg (Novartis, Basel, Švicarska)
- Lipex, tablete simvastatina 10 mg (Merck, Sharp & Dohme, Whitehouse Station, SAD)
- Pravachol, tablete pravastatina 20 mg (Bristol Myers Squibb, New York, SAD)
- Tulip, tablete atorvastatina 20 mg (Lek, Ljubljana, Slovenija)

3.1.3 Uzorci proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

- Cholesterol maintenance (KAL, Park City, SAD)
- No-Colest Omegasol (Specchiasol, Bussolengo, Italy)
- Normolip 5 (ESI, Albissola Marina, Italy)
- Omelip (Aktival, Ludbreg, Croatia)
- Red rice (Encian, Donji Stupnik, Croatia)
- Red yeast rice (Dutch organic, Thailand)
- Rizolip (Aktival, Ludbreg, Croatia)
- Thailand red jasmine rice (Ecor, Thailand)

3.1.4 Ostale korištene supstancije i kemikalije

OTAPALA

- Acetonitril za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Etanol za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Metanol za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Ultračista deionizirana voda provodljivosti 0,055 μS/cm

PLINOVI

- Dušik > 99,999 %vol (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)
- Helij > 99,999 %vol (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

KEMIKALIJE

- Acetatni pufer, p.a. čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Amonijev formijat, p.p.a. čistoće za spektrometriju masa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Dinatrijev hidrogenfosfat, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Fosfatni pufer, p.a. čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kloridna kiselina 35%, p.a. čistoće (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Ledena octena kiselina, p.a. čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Mravlja kiselina 98-100%, p.a. čistoće (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev acetat, p.a. čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev duodecilsulfat, p.a. čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev duodecilsulfat, p.a. čistoće (Poch, Gliwice, Poljska)
- Natrijev dihidrogenfosfat, p.a. čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, p.a. čistoće (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev tetraborat dekahidrat, p.a. čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina natrijeva hidroksida, 1 mol/L (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.2 APARATURE I PRIBOR

3.2.1 Radni instrumenti

- LC/MSD Trap VL maseni detektor s elektrosprej-ionizatorom i analizatorom stupicom za ione (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Sustav za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf (Agilent 1100 chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) sastavljen od kvaterne gradijent-pumpe (G1311A) s integriranim degazerom (G1379A), autoinjektora (G1329A) s termostatom (G1330B), termostatirane pećnice za kolonu (G1316A) te s mogućnošću povezivanja s detektorom niza dioda (G1315B), fluorescencijskim detektorom (G1321A) i masenim spektrometrom (LC/MSD Trap VL)

3.2.2 Pribor

- Analitička vaga AG245 na četiri decimale (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Bočice za uzorkovanje 2,0 mL sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Celulozni nitratni membranski filter za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji veličine pora 0,45 μm (Sartorius, Goettingen, Njemačka)

- Centrifugirka (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Centrifugirka Jouan MR231 (Thermo Electron Corporation, Madison, SAD)
- Digitalni pH-metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)
- Injekcijski membranski Acrodisc GHP filteri, veličina pora 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor, SAD)
- Injekcijski membranski Acrodisc GHP filteri, veličina pora 0,45 μm (Gelman, Ann Arbor, SAD)
- Injekcijski membranski poliesterski filteri, veličina pora 0,45 μm (Chromafil, Macherey-Nagel, Njemačka)
- Vanjska pumpa za direktno injektiranje u spektrometar masa (KD Scientific Inc., Holliston, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 32,0 cm, duljine do detektora 23,5 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm, (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 32,5 cm, duljine do detektora 24,0 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 48,5 cm, duljine do detektora 40,0 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 48,5 cm, duljine do detektora 40,0 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm, proširenje optičkog puta na mjestu detektora 150 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Hypersil C18, dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Xbridge C18, dimenzija 50 mm x 3,0 mm, veličina čestica 2,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Zorbax SB-C18, dimenzija 250 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Magnetska mješalica *lab disc* (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Magnetska mješalica C-MAG HS7 (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Mikrolitarska injekcijska šprica (Hamilton, Bonaduz, Švicarska)

- Stakleni sustav za filtriranje mobilnih faza u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode (Millipore, Bedford, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Tamne bočice za uzorkovanje sustavom za tekućinsku kromatografiju (2,0 mL) (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.2.3 Programski paketi

- Program ^{3D}CE/MSD ChemStation, ver A 10.02 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, SAD)
- HP845 UV-Visible Chemstation System Rev. A. 07.02 (Agilent Technologies, Mulgrave, SAD)
- OriginPro 7,5 SRO (OriginLab Corporation, Northampton, SAD)
- MDL ISIS^{TM}/Draw 2,5 (MDL Information Systems, Inc., SAD)

3.3 ANALITIČKE METODE

3.3.1 CE METODA ZA ISTOVREMENU ANALIZU STATINA

Priprema matičnih i radnih standardnih otopina statina

Matična standardna otopina pravastatina pripremljena je vaganjem odgovarajuće količine standarda i otapanjem u odmjernoj tikvici od 10,0 mL u ultračistoj vodi kako bi se postigla koncentracija 0,5 mg/mL.

Matične standardne otopine lovastatina, simvastatina i fluvastatina pripremljene su u odmjernim tikvicama od 10,0 mL otapanjem odgovarajuće količine tvari u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*) u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1}. Osnovne otopine rosuvastatin-kalcija i atorvastatin-kalcija pripremljene su otapanjem u smjesi acetonitril-voda (50:50, *v/v*) u koncentraciji 1,0 mg mL^{-1}.

Matična standardna otopina unutarnjeg standarda, ketoprofena, također je pripremljena otapanjem u smjesi acetonitril-voda (50:50, *v/v*) u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1}.

Matične standardne otopine statina čuvale su se u hladanjaku na + 4°C i bile su stabilne četiri tjedna.

Radne standardne otopine korištene za razvoj, optimizaciju i validaciju metode pripremane su svježe svaki dan neposredno prije mjerenja dodatkom odgovarajuće količine matične standardne otopine statina i unutarnjeg standarda ketoprofena te razrjeđenjem do odgovarajuće koncentracije smjesom acetonitril:voda (50:50, *v/v*). Prije unošenja u kapilarnoelektroforetski sustav sve su standardne otopine profiltrirane kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD).

Hidroliza matičnih standardnih otopina lovastatina i simvastatina

Prije analize kapilarnom elektroforezom, laktonski oblici lovastatina i simvastatina su hidrolizirani u svoje odgovarajuće β-hidroksi kiseline. Hidroliza je provedena dodatkom 1,0 mL 0,2 M NaOH u 1,0 mL matične standardne otopine lovastatina i simvastatina. Kako bi se osigurala potpuna hidroliza u lužnatome, uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 minuta prije analize.

Priprema uzoraka gotovih ljekovitih oblika statina

Otopine uzoraka svakoga ispitivanoga gotovoga ljekovitog oblika pripremljene su tako da je deset tableta usitnjeno u tarioniku do finog praha. Točna odvaga koja odgovara količini 1 tablete kvantitativno je prenesena u odmjernu tikvicu od 10,0 mL te je dodan 1 mL odgovarajućeg otapala. Za pripremu otopina tableta simvastatina, atorvastatina i fluvastatina dodan je metanol, lovastatina i rosuvastatina acetonitril, a pravastatina ultračista voda. Kako bi se pospješilo otapanje odnosno ekstrakcija, smjese su stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga su nadopunjene do oznake odgovarajućim otapalom. Zatim su sve otopine uzoraka centrifugirane (10 min pri 3000 okretaja/min) i filtrirane kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD). Alikvot svakog filtrata je prenesen u odmjernu tikvicu od 5,0 mL, dodan je unutarnji standard i otopina je razrijeđena smjesom acetonitril:voda (50:50, *v/v*) do konačne koncentracije lijeka 50 μg/mL.

Otopine tableta lovastatina i simvastatina su prije završnog razrjeđenja hidrolizirane u odgovarajuće β-hidroksi kiselinske oblike prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.1.

Prije unošenja u kapilarnoelektroforetski sustav, otopine uzoraka gotovih ljekovitih oblika još su jednom filtrirane kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD).

Priprema otopina radnih pufera

Priređena je otopina acetatnog pufera koncentracije 100 mM u odmjernoj tikvici od 100,0 mL tako što je u određenom volumenu octene kiseline i ultračiste vode otopljena odgovarajuća odvaga natrijeva acetata. Nakon otapanja pH je po potrebi dodatno podešen na željene vrijednosti, 3,9, 4,5 i 6,0, dodatkom odgovarajuće količine otopine octene kiseline ili natrijeva hidroksida. Tikvica je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Otopina se čuvala na sobnoj temperaturi i bila je stabilna cijelo vrijeme analize.

Otopina boratnog pufera u koncentraciji 100 mM pripremljena je u odmjernoj tikvici od 100,0 mL otapanjem odgovarajuće količine natrijeva tetraborata dekahidrata u ultračistoj vodi i prilagođavanjem pH na željenu vrijednost dodatkom odgovarajućeg volumena 0,1 M klorovodične kiseline ili 0,1 M natrijeva hidroksida. Otopina boratnog pufera čuvana je na sobnoj temperaturi i bila je stabilna za vrijeme rada.

Priređena je otopina fosfatnog pufera u koncentraciji 100 mM otapanjem odgovarajuće odvage natrijeva dihidrogenfosfata i dinatrijeva hidrogenfosfata u odmjernoj tikvici od 100,0 mL dodatkom ultračiste vode. Po potrebi je pH otopine podešen na 7,0 odgovarajućim volumenom 0,1 M natrijeva hidroksida. Otopina fosfatnog pufera čuvala se u frižideru na +4 °C te je bila stabilna tjedan dana.

Otopina surfaktanta SDS-a pripremljena je u odmjernoj tikvici od 100,0 mL otapanjem odgovarajuće količine natrijeva duodecilnog sulfata u oko 80 mL ultračiste vode. Kako bi se pospješilo otapanje, otopina je stavljena u utrazvučnu kupelj na 5 min. Nakon toga je nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Otopina je čuvana pri sobnoj temperaturi i bila je stabilna tijekom rada.

Otopine radnih pufera pripremljene su neposredno prije analize miješanjem odgovarajućih volumena otopine odabranog pufera određene pH vrijednosti, otopine SDS-a, organskog otapala i ultračiste vode. U ovom istraživanju ispitan je niz vrsta, pH-vrijednosti i koncentracija pufera: 50 mM acetatni pufer (pH 3,9-6,0), fosfatni pufer pH 7,0 (25-50 mM) i boratni pufer pH 9,5 (10-40 mM).

Prije primjene sve su otopine radnih pufera profiltrirane kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD).

Kapilarnoelektroforetski uvjeti

Kapilara je prije prve upotrebe aktivirana ispiranjem pod visokim tlakom s 1 M NaOH 20 minuta, 0,1 M NaOH 20 minuta, vodom 10 minuta te otopinom radnog pufera 20 minuta. Na početku svakoga radnog dana kapilara je isprana s 0,1 M NaOH 10 minuta, vodom 10 minuta te otopinom radnog pufera 10 minuta. U kapilarnoj elektroforezi ponovljivost metode ovisi o ispiranju kapilare između analiza, pa se ovaj postupak zasebno optimizira za svaku vrstu analize, uzorka i radnog pufera. U ovom radu prije svakog injektiranja kapilara je prekondicionirana otopinom radnog pufera ispiranjem tijekom 5 min.

Radni pufer, odabran u postupku optimizacije metode, sastojao se od boratnog pufera u koncentraciji 25 mM, pH 9,5, 25 mM SDS-a i 10% (*v/v*) metanola. Korištena je kapilara od izvučenog kvarca (Agilent Technologies, Wladbron, Njemačka) ukupne duljine 32 cm i efektivne duljine 23,5 cm, s unutarnjim promjerom 50 μm. Uzorci su hidrodinamički injektirani pri tlaku od 30 mbar 4 sekunde. Temperatura kapilare održavala se na 30 °C, a razdvajanje se vršilo pri konstantnom naponu od 23 kV. Valna duljina detektora podešena je na 237 nm, prema maksimumu apsorpcije statina.

Sva mjerenja su provedena u triplikatu.

3.3.2 ODREĐIVANJE ATORVASTATINA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA MEKC METODOM

Priprema matičnih i radnih standardnih otopina

Matična standardna otopina atorvastatina pripremljena je vaganjem odgovarajuće količine standarda i otapanjem u odmjernoj tikvici od 10,0 mL u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*) kako bi se postigla koncentracija 1,5 mg/mL. Matične standardne otopine desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina pripremljene su odmjernim tikvicama od 5,0 mL otapanjem odgovarajuće količine supstancije u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*) u koncentraciji 0,1 mg/mL. Matična standardna otopina pravastatina, korištenog kao unutarnji standard, u koncentraciji 1,0 mg/mL pripremljena je otapanjem odgovarajuće odvage pravastatina u odmjernoj tikvici od 10,0 mL dodatkom ultračiste vode. Matične standardne otopine čuvane su u hladanjaku na + 4°C i bile su stabilne dva mjeseca. Prije daljnjeg korištenja sve su standardne otopine profiltrirane kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD).

Radne standardne otopine korištene za razvoj, optimizaciju i validaciju metode pripremane su svježe svaki dan neposredno prije mjerenja miješanjem odgovarajućih

volumena matične standardne otopine atorvastatina i njegovih onečišćenja, uz dodatak unutarnjeg standarda, te razrjeđenjem do željene koncentracije dodatkom smjese acetonitril:voda (50:50, *v/v*). Tijekom razvoja metode korištena je smjesa radnih standardnih otopina sljedećih koncentracija: 50 μg/mL atorvastatina, 100 μg/mL pravastatina, 20 μg/mL desfluoroatorvastatina, 25 μg/mL dijastereomera atorvastatina, 15 μg/mL metilnog estera atorvastatina i 20 μg/mL laktona atorvastatina.

Priprema uzoraka aktivne farmaceutske supstancije i gotovoga ljekovitog oblika atorvastatina

Otopine uzoraka aktivne farmaceutske supstancije pripremljene su u odmjernoj tikvici od 10,0 mL otapanjem odgovarajuće količine atorvastatina i otapanjem u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*) u koncentraciji 1,0 mg/mL. Prije injektiranja u kapilarnoelektroforetski sustav uzorci su filtrirani kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD).

Otopine uzoraka gotovoga ljekovitog oblika pripremljene su tako da je 20 tableta usitnjeno u tarioniku do finog praha. Točna odvaga koja odgovara količini jedne tablete kvantitativno je prenesena u odmjernu tikvicu od 5,0 mL te je dodan 1 mL metanola. Smjesa je stavljena u ultrazvučnu kupelj 30 minuta pri sobnoj temperaturi, a zatim nadopunjena do oznake metanolom. Nakon centrifugiranja uzorci su filtrirani kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD). Odgovarajući volumen filtrata prenesen je odmjernu tikvicu od 10,0 mL i nadopunjen smjesom acetonitril:voda (50:50, *v/v*) kako bi se postigla konačna koncentracija atorvastatina 1 mg/mL.

Priprema otopina radnih pufera

Acetatni pufer u koncentraciji 50 mM pripremljen je u odmjernoj tikvici od 50,0 mL otapanjem odgovarajuće količine natrijeva acetata u ultračistoj vodi i dodatkom odgovarajućeg volumena octene kiseline te podešavanjem pH vrijednosti. Tikvica je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Otopina se čuvala na sobnoj temperaturi i bila je stabilna cijelo vrijeme analize.

Otopina boratnog pufera u koncentraciji 100 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrijeva tetraborata dekahidrata u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100,0 mL. pH je prilagođen na željenu vrijednost (pH 7,5 – 9,5) dodatkom odgovarajućeg

volumena 0,1 M klorovodične kiseline ili 0,1 M natrijeva hidroksida. Otopina boratnog pufera čuvala se na sobnoj temperaturi i bila je stabilna tijekom četiri tjedna.

Otopina SDS-a u koncentraciji 100 mM pripremljena je u odmjernoj tikvici od 100,0 mL otapanjem odgovarajuće količine natrijeva duodecil sulfata u ultračistoj vodi. Otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta te nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Čuvala se pri sobnoj temperaturi i bila je stabilna tijekom rada.

Otopine radnih pufera pripremljene su neposredno prije analize miješanjem odgovarajućih volumena otopine odabranog pufera određene pH vrijednosti, otopine SDS-a, organskog otapala i ultračiste vode. U ovom istraživanju ispitan je niz vrsta, pH-vrijednosti i koncentracija pufera: 20 mM acetatni pufer (pH 6,0-8,5), 20 mM boratni pufer (pH 7,5-9,5) i boratni pufer pH 9,5 (10-50 mM).

Prije primjene sve su otopine radnih pufera profiltrirane kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor SAD).

Kapilarnoelektroforetski uvjeti

Prije prve primjene kapilara je kondicionirana ispiranjem s 1M NaOH 20 minuta, 0,1 M NaOH 10 minuta, vodom 10 minuta te otopinom radnog pufera 20 minuta. Na početku svakoga radnog dana kapilara je isprana s 0,1 M NaOH 10 minuta, vodom 10 minuta te otopinom radnog pufera 10 minuta. Također, na početku svakoga radnog dana kapilara je aktivirana ispiranjem s 0,1 M NaOH 5 minuta, zatim vodom 10 minuta te otopinom radnog pufera 10 minuta. Između analiza kapilara je regenerirana ispiranjem radnim puferom tijekom 5 minuta, kako bi se osigurala ponovljivost vremena migracije.

Radni pufer u optimalnim uvjetima sastojao se od boratnog pufera u koncentraciji 25 mM, pH 9,5, 50 mM SDS-a i 20% (*v/v*) metanola. U ovom istraživanju korištene su dvije kapilare od izvučenog kvarca, ukupne duljine 48,5 cm, odnosno duljine do detektora 40,0 cm. Kapilare su se razlikovale u promjeru; prva je imala unutarnji promjer 50 μm, dok je druga bila također unutarnjeg promjera 50 μm, ali s proširenjem na mjestu detektora (engl. *Bubble cell*), odnosno optičkim putom od 150 μm. Uzorci su hidrodinamički injektirani pri tlaku od 50 mbar 4 sekunde. Temperatura kapilare održavana je konstantom na 25 °C, a analiza je provođena pri naponu 30 kV. Detekcija se odvijala primjenom DAD detektora pri valnoj duljini 214 nm.

Sva mjerenja su provedena u triplikatu.

3.3.3 ODREĐIVANJE ATORVASTATINA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA HPLC-DAD- MS^n METODOM

Priprema matičnih i radnih standardnih otopina

Matična standardna otopina atorvastatina i njegovih onečišćenja te radne standardne otopine korištene za razvoj, optimizaciju i validaciju metode, priređene su prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.2.

Priprema uzoraka aktivne farmaceutske supstancije i gotovoga ljekovitog oblika atorvastatina

Otopine uzoraka aktivne farmaceutske supstancije pripremljene su u odmjernoj tikvici od 10,0 mL otapanjem odgovarajuće količine supstancije i otapanjem u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*) u koncentraciji 1,0 mg/mL.

Otopine uzoraka gotovoga ljekovitog oblika pripremljene su tako da je 20 tableta usitnjeno u tarioniku do finog praha. Točna odvaga koja odgovara količini od 5 mg djelatne tvari kvantitativno je prenesena u odmjernu tikvicu od 5,0 mL te je dodan 1 mL smjese acetonitril:voda (50:50, *v/v*). Smjesa je stavljena u ultrazvučnu kupelj 30 minuta pri sobnoj temperaturi, a nakon toga je nadopunjena do oznake smjesom acetonitril:voda (50:50, *v/v*) kako bi se postigla konačna koncentracija atorvastatina od 1,0 mg/mL. Prije injektiranja uzorci su filtrirani kroz membranski filter Acrodisc GHP filters od 0,2 µm (Gelman, Ann Arbor SAD).

Kromatografski uvjeti analize

Razdvajanje atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja je provedeno na Symmetry C18 koloni obrnutih faza, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 µm. Pokretna faza sastojala se od smjese amonijeva formijata u koncentraciji 10 mM, pH 4,0 (pH prilagođen dodatkom mravlje kiseline):acetonitril (60:40, *v/v*) kao eluenta A i acetonitrila kao eluenta B. Koristio se binarni gradijentni program prikazan u Tablici 2. Brzina protoka pokretne faze iznosila je 0,5 mL/min. Između dviju analiza kolona je kondicionirana ispiranjem sa 100% eluenta A tijekom 5 minuta.

Sva mjerenja su provedena u triplikatu.

Tablica 2. Binarni gradijentni program HPLC-DAD-MS^n metode za analizu atorvastatina i onečišćenja

Vrijeme (min)	*Udio eluenta A (%)*	*Udio eluenta B (%)*
0	100	0
0 → 18	88	12
18 → 28	88	12
28 → 45	70	30
45 → 50	100	0

Uzorci su se prije injektiranja i analize čuvali u autoinjektoru pri stalnoj temperaturi +4 °C u tamnim bočicama za uzorkovanje. Volumen injektiranja iznosio je 5 µL. Temperatura kolone iznosila je 45 °C. Detekcija se provodila primjenom DAD detektora pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije atorvastatina 246 nm.

Uvjeti MS analize

Maseni detektor sastojao se od elektrosprej-ionizatora i analizatora stupica za ione. Cijela pokretna faza eluirana s tekućinskog kromatografa dovedena je to masenog spektrometra. MS analiza provodila se koristeći elektrosprej-ionizaciju u pozitivnom načinu snimanja. Temperatura izvora iona iznosila je 350 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Dušik se koristio kao plin za sušenje pri protoku 10,0 L/min i kao plin za raspršivanje pokretne faze pri tlaku 35,0 psi. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od *m/z* 100 – 800. Kao plin za koliziju korišten je helij, održavajući energiju kolizije na 27%. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 10 000, a zadržavani su do 200 ms.

3.3.4 ANALIZA PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM MEKC METODOM

Priprema matičnih i radnih standardnih otopina lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline, citrinina i unutarnjeg standarda pravastatina

Matična standardna otopina lovastatina pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine supstancije u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*) u koncentraciji 1,0 mg/mL. Čuvana je u hladnjaku na +4 °C i bila je stabilna tri tjedna.

Matična standardna otopina lovastatin β-hidroksi kiseline pripremljena je bazičnom hidrolizom iz laktonskog oblika lovastatina. U 5,0 mL matične standardne otopine lovastatina dodano je 5,0 mL 0,1 M otopine NaOH pripremljene u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*). Otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj 60 min pri 45 °C kako bi se pospješila hidroliza. Uspješnost hidrolize i pripreme standarda lovastatin β-hidroksi kiseline provjerena je primjenom HPLC-MS metode, prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.4. Standardna otopina lovastatin β-hidroksi kiseline čuvala se u hladnjaku na + 4 °C i bila je stabilna tri tjedna.

Matična standardna otopina citrinina pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine praha u odmjernoj tikvici od 5,0 mL u metanolu. Koncentracija matične standardne otopine citrinina je potvrđena mjerenjem UV-apsorbancije na 321 nm. Molarna apsorptivnost citrinina u metanolu pri 321 nm iznosi 5490 $mol^{-1}cm^{-1}$. Otopina se čuvala u hladnjaku na + 4 °C i bila je stabilna pet dana.

Matična otopina pravastatina, koji se koristio kao unutarnji standard, pripremljena je vaganjem odgovarajuće količine pravastatina i otapanjem u vodi do koncentracije 0,5 mg/mL. Otopina se čuvala u hladnjaku na + 4 °C i bila je stabilna tri tjedna.

Radne standardne otopine pripremane su svježe svaki dan miješanjem odgovarajućih količina matičnih standardnih otopina i otopine unutarnjeg standarda. Razrijeđene su dodatkom 15 mM SDS-a do željene koncentracije. Za razvoj i optimizaciju metode korištena je smjesa koja sadrži 25 μg/mL lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline, citrinina i pravastatina.

Priprema uzoraka s crvenom fermentiranom rižom za analizu kapilarnom elektroforezom

Zrna crvene fermentirane riže usitnjena su u tarioniku pistilom do finog praha. 20 tableta je izvagano i određena je prosječna masa jedne tablete. Tablete su usitnjene u tarioniku do finog praha koji je korišten u daljnjoj analizi. Sadržaj 10 kapsula, tvrdih kapsula punjenih uljem i mekih gel kapsula, kvantitativno je prenesen, homogeniziran i točno odvagani homogenizirani uzorak (1,0 g) svakoga pojedinačnog dodatka prehrani prebačen je u Eppendorf epruvetu volumena 25,0 mL te je dodana smjesa metanol:voda (80:20, *v/v*). Suspenzija je ekstrahirana uz snažno miješanje na vorteks-mješalici 3 minute te zatim ostavljena u ultrazvučnoj kupelji pri sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon ekstrakcije

smjesa je centrifugirana 10 minuta brzinom 3000 okretaja/min pri sobnoj temperaturi i supernatant je uzet za daljnju analizu.

Zbog slabije osjetljivosti kapilarne elektroforeze, provedeno je dodatno ukoncentriravanje uzoraka. Naime, kako bi se osigurao nizak LOQ za citrinin koji se u ovim proizvodima očekuje u tragovima, odnosno kako bi se mogle detektirati koncentracije manje od zakonom dopuštene razine od 100 ppb, bilo je potrebno dodatno ukoncentrirati ispitivane uzorke. Stoga je supernatant uparen do suha u struji dušika, a ostatak je otopljen u 1 mL metanola. Prije injektiranja u sustav za kapilarnu elektroforezu uzorci su profiltrirani kroz membranski filtar veličine pora 0,45 μm i promjera 13 mm (Chromafil, Macherey-Nagel, Njemačka). Razrijeđeni su 15 mM SDS-om do koncentracije unutar linearnog područja metode, dodan je unutarnji standard te su injektirani u sustav za kapilarnu elektroforezu.

Priprema otopina radnih pufera

Otopina fosfatnog pufera, koncentracije 100 mM, pripremljena je vaganjem odgovarajuće količine natrijeva dihidrogenfosfata u odmjernoj tikvici od 100,0 mL te otapanjem u ultračistoj vodi. Kako bi se pospješilo otapanje, tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj 5 minuta. Nakon toga pH je podešen na željenu vrijednost (5,5 – 7,5) dodatkom odgovarajućeg volumena 1,0 M NaOH ili 1 M HCl. Otopina fosfatnog pufera se čuvala u frižideru na +4 °C i bila je stabilna tjedan dana.

Otopina SDS-a, koncentracije 100 mM, pripremljena je vaganjem odgovarajuće količine natrijeva duodecil sulfata u odmjernoj tikvici od 100,0 mL, dodano je oko 80 mL ultračiste vode te je tikvica stavljena u ultrazvučnu kupelj 10 minuta kako bi se pospješilo otapanje. Nakon toga otopina je nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina SDS-a čuvala se pri sobnoj temperaturi i bila je stabilna cijelo vrijeme analize.

Otopina radnog pufera pripremana je neposredno prije analize miješanjem otopine fosfatnog pufera odgovarajućeg pH, otopine SDS-a i ultračiste vode da se postigne odgovarajuća koncentracija fosfatnog pufera i SDS-a.

Kapilarnoelektroforetski uvjeti

Prije prvog korištenja kapilara se ispirala 20 minuta s 1 M NaOH, 5 minuta vodom, 20 minuta s 1 M HCl, 5 minuta vodom, 20 minuta s 0,1 M NaOH, vodom 5 minuta i 20 minuta otopinom radnog pufera.

Kapilara je kondicionirana svaki radni dan ispiranjem s 0,1 M NaOH 15 minuta, vodom 15 minuta i potom otopinom radnog pufera 25 minuta. Kako bi se osigurala ponovljivost vremena migracije, kapilara je isprana prije svakog mjerenja 0,1 M NaOH 1 minutu i kondicionirana otopinom radnog pufera 3 minute, a kako bi se uklonili svi eventualni zaostaci ili adsorbirane tvari u kapilari, nakon svakog mjerenja otopina je isprana vodom 1 minutu. Budući da elektroliza pozadinskog pufera može promijeniti elektroosmotski tok, radni pufer je zamijenjen svježim puferom nakon pet injektiranja kako bi se postigla što veća točnost pri kvantitativnom određivanju.

Kapilarnoelektroforetska mjerenja provedena su na Agilent Sustavu za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim detektorom od niza dioda. Korištena je nepresvučena kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 32,5 cm, odnosno 24,0 cm duljine do detektora. Unutarnji promjer kapilare bio je 50 μm, s proširenim optičkim putem na mjestu detektora (150 μm).

Radni pufer pri optimiziranim uvjetima se sastojao od fosfatnog pufera u koncentraciji 20 mM, pH 7,0 i 30 mM SDS-a. Analiza se provodila pri naponu od 25 kV i stalnoj temperaturi od 25 °C. Uzorci su injektirani u sustav hidrodinamički pri tlaku od 50 mbar, primijenjenom 5 sekundi. Detekcija je vršena pomoću DAD detektora pri valnoj duljini 237 nm za lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselinu te 216 nm za određivanje citrinina.

Sva mjerenja su provedena u triplikatu.

Kromatografski i MS uvjeti za potvrdu hidrolize lovastatina

Razdvajanje lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline je provođeno na Symmetry C18 koloni obrnutih faza, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 μm, koristeći binarnu gradijentnu eluaciju. Pokretna faza sastojala se od 0,1% mravlje kiseline (eluent A) i acetonitrila (eluent B). Korišten je linearni gradijent, gdje se udio eluenta B linearno mijenjao u rasponu 30-70% kroz 35 minuta. Brzina protoka pokretne faze iznosila je 1,0 mL/min. Uzorci su čuvani u autoinjektoru pri stalnoj temperaturi +4 °C. Volumen injektiranja iznosio

je 5 μL, a temperatura kolone bila je 45 °C. DAD detekcija provođena je pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije lovastatina, 237 nm.

Dio pokretne faze eluirane s tekućinskog kromatograma doveden je do masenog spektrometra. MS analiza provodila se koristeći elektrosprej-ionizaciju u pozitivnom načinu snimanja. Dušik se koristio kao plin za sušenje pri protoku 5,0 L/min i kao plin za raspršivanje pokretne faze pri tlaku 15,0 psi. Temperatura izvora iona iznosila je 350 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za koliziju koristio se helij pri tlaku $6x10^{-6}$ mbar. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od *m/z* 100 – 500. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 10 000, a zadržavani su do 200 ms.

Uvjeti HPLC-DAD-MS^n metode za optimizaciju ekstrakcijskog postupka proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Optimizacija ekstrakcijskog postupka te ispitivanje ekstrakcijske učinkovitosti za proizvode s crvenom fermentiranom rižom provedeno je HPLC-DAD-MS^n metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.4 (Kromatografski i MS uvjeti za potvrdu hidrolize lovastatina) uz napomenu da je temperatura kromatografske kolone održavana na 25 ºC.

3.3.5 ANALIZA PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM HPLC-DAD-FLD-MS^n METODOM

Priprema matičnih i radnih standardnih otopina lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina

Matične standardne otopine lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina pripremljene su prema postupcima opisanima u poglavlju 3.3.4.

Radne standardne otopine pripremane su svježe svaki dan neposredno prije mjerenja miješanjem matičnih standardnih otopina te razrjeđenjem do željene koncentracije dodatkom pokretne faze. Radne otopine čuvale su se u autoinjektoru pri temperaturi +4 °C.

Priprema uzoraka s crvenom fermentiranom rižom za analizu tekućinskom kromatografijom

Uzorci s crvenom fermentiranom rižom za analizu su pripremljeni prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.4.

Uvjeti HPLC-DAD-FLD-MS^n metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Analiza je provedena na XBridge C18 koloni obrnutih faza, dimenzija 50 mm x 3,0 mm i veličine čestica 2,5 μm. Pokretna faza sastojala se od smjese acetonitril:voda:mravlja kiselina = 10:90:0,1 (eluent A) i smjese acetonitril:voda:mravlja kiselina = 90:10:0,05 (eluent B). Prije upotrebe mobilna faza je injektirana kroz filter od celuloza-nitrata (promjer 47 mm, veličina čestica 0,45 μm).

Koristio se binarni gradijentni program prikazan u Tablici 3. Brzina protoka pokretne faze iznosila je 1 mL/min. Kako bi se kolona kondicionirala između dvije analize, isprana je s 40% eluenta B tijekom 5 minuta.

Uzorci su se čuvali u autoinjektoru pri stalnoj temperaturi od +4 °C. Volumen injektiranja iznosio je 5 μL. Temperatura kolone bila je 25 °C. DAD detekcija provodila se pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije lovastatina, 237 nm uz snimanje spektra u rasponu od 200 – 400 nm. Valne duljine ekscitacije i emisije na fluorescencijskom detektoru za određivanje citrinina podešene su na 331 nm, odnosno 500 nm.

Sva mjerenja su provedena u triplikatu.

Tablica 3. Binarni gradijentni program HPLC-DAD-FLD-MS^n metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Vrijeme (min)	*Udio eluenta A (%)*	*Udio eluenta B (%)*
0	60	40
0 → 7	30	70
7 → 10	10	90

Maseni detektor sastojao se od elektrosprej-ionizatora i analizatora ionska stupica. Podaci su prikupljeni i obrađeni koristeći ChemStation i LC/MSD Trap računalne programe.

Dio pokretne faze eluirane s tekućinskog kromatografa doveden je do masenog spektrometra u omjeru 1:2. MS analiza provodila se koristeći elektrosprej-ionizaciju u pozitivnom načinu snimanja. Temperatura izvora iona iznosila je 350 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za sušenje i raspršivanje pokretne faze koristio se dušik te su optimalni uvjeti ionizacije postignuti pri njegovu protoku od 10,0 L/min i tlaku od 20,0 psi. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od *m/z* 100 – 600. Kao plin za koliziju koristio se helij,

održavajući energiju kolizije na 30%. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 10 000, a zadržavani su do 200 ms.

3.3.6 ANALIZA PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM MS METODOM PRIMJENOM IZRAVNOG INJEKTIRANJA

Priprema uzoraka s crvenom fermentiranom rižom za analizu kapilarnom elektroforezom

Dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom za analizu su pripremljeni prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.4.

Uvjeti MS metode primjenom izravnog injektiranja za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Maseni detektor sastojao se od elektrosprej-ionizatora i analizatora ionska stupica. Podaci su prikupljeni i obrađeni koristeći ChemStation i LC/MSD Trap računalne programe. Uzorci su injektirani izravno u maseni spektrometar primjenom vanjske injekcijske pumpe uz brzinu protoka 5 μL/min. Elektrosprej-ionizator se koristio i u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije. Temperatura izvora iona iznosila je 325 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za sušenje i raspršivanje pokretne faze koristio se dušik te su optimalni uvjeti ionizacije postignuti pri njegovu protoku od 5,0 L/min i tlaku od 15,0 psi. Kao plin za fragmentaciju korišten je helij uz energiju kolizije od 30%. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od *m/z* 15 – 600. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 10 000, a zadržavani su do 200 ms. Analiza uzoraka provođena je primjenom MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) načina snimanja.

Sva mjerenja su provedena u triplikatu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 RAZVOJ NOVE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ISTOVREMENU ANALIZU STATINA

S obzirom na nedostatak brzih i jednostavnih analitičkih metoda za analizu statina u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima, razvijena je nova kapilarnoelektroforetska metoda. Predložena metoda omogućuje istovremenu analizu šest statina, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina, pa time predstavlja jedinstvenu metodu kojom je moguće bez promjene tehnike, metode, nepokretne i pokretne faze te drugih uvjeta analize, identificirati i određivati bilo koji od šest ranije navedenih statina.

4.1.1 Optimizacija vrste i pH pufera

Tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode, prvi parametar koji se ispituje je vrsta i pH radnog pufera. pH pufera izravno utječe na elektroosmotski tok, pokretačku snagu u kapilarnoj elektroforezi. Pri različitom pH radnog pufera naboj na površini unutrašnje stijenke kapilare je različit, što direktno utječe na zeta-potencijal. Stoga je elektroosmotski tok znatno veći pri visokom pH kad su silanolne skupine većinom deprotonirane, odnosno nalaze se u ioniziranoj formi SiO^-. Cilj separacijske metode je u što kraćem vremenu razdvojiti sve analite pa je iznimno važno osigurati pravu jačinu elektroosmotskog toka. Dakle, unatoč brzoj analizi pri visokom pH, elektroosmotski tok može biti prebrz, pa će doći do eluacije analita prije nego što su uspješno razdvojeni unutar kapilare. Primjenom niske ili umjerene vrijednosti pH radnog pufera može doći do adsorpcije kationskih otopljenih tvari putem Coulombovih interakcija.

Osim na elektroosmotski tok, pH izravno utječe na elektroforetsku pokretljivost analita, jer određuje njihov stupanj ionizacije. Stoga se prilikom razvoja nove metode moraju razmotriti pK_a vrijednosti analita, kako bi odabirom odgovarajuće vrste i pH radnog pufera osigurali selektivnost metode i postigli potpuno razdvajanje, u što kraćem vremenu analize. Statini u obliku β-hidroksi kiselina imaju pKa vrijednosti između 4.2 i 4.5, pa će se već pri pH iznad 6 molekule pravastatina, fluvastatina, atorvastatina i rosuvastatina potpuno ionizirati.

Lovastatin i simvastatin dolaze u laktonskom obliku te se u organizmu hidroliziraju u aktivne oblike β-hidroksi kiselina. Budući da je laktonski oblik neutralan, njihova analiza mora se provoditi micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom. Dodatkom surfaktanta u otopinu radnog pufera, vrijeme analize bi se značajno produljilo. Kako bi se to izbjeglo,

provela se hidroliza dodatkom 0,2 M NaOH u osnovne otopine lovastatina i simvastatina koje su ostavljene stajati na sobnoj temperaturi 30 minuta prije analize. Ovom hidrolizom su otvoreni laktonski prsteni te su lovastatin i simvastatin prevedeni u odgovarajuće hidroksi kiseline. U neutralnom i lužnatom pH su sada ovi analiti negativno nabijeni te ih je moguće razdvojiti i analizirati kapilarnom zonskom elektroforezom.

Ispitani su različiti radni puferi – boratni, acetatni i fosfatni, u pH rasponu od 3,9-9,5. Najprije je isproban fosfatni pufer u koncentraciji 50 mM, pH 7,0. Primjenom ovoga radnog pufera, od šest analita, vidjela su se samo 3 pika te je struja u kapilari bila previsoka. Stoga je ionska jakost fosfatnog pufera smanjena na 25 mM fosfatni pufer, uz isti pH, 7,0. Ni pri ovim uvjetima nije postignuto razdvajanje svih analita. Nakon toga istražen je acetatni pufer u koncentraciji 25 mM, pH 6,0, acetatni pufer u koncentraciji 50 mM, pH 4,5 i acetatni pufer u koncentraciji 50 mM, pH 3,9. No pri svim ispitanim uvjetima oblik pikova bio je vrlo loš te uopće nije postignuto razdvajanje.

Najboljim radnim puferom pokazao se boratni pufer u koncentraciji 25 mM, pH 9,5, koji je omogućio najbolji oblik pikova, iako još uvijek bez potpunog razdvajanja, no prividna elektroforetska pokretljivost analita bila je najveća. Budući da su u cijelom ispitanom pH rasponu svi analiti u najvećoj mjeri ionizirani, odnosno negativno nabijeni, očito je povećanje prividne elektroforetske pokretljivosti porastom pH posljedica dominantnog učinka pH na elektroosmotski tok pufera. Pri visokom pH (9,5) silanolne skupine su deprotonirane, što za posljedicu ima snažan elektroosmotski tok. Molekule statina su također potpuno ionizirane, odnosno negativno nabijene te putuju prema pozitivno nabijenoj katodi. No zahvaljujući snažnom elektroosmotskom toku, analiti putuju prema negativno nabijenoj anodi te ih se detektiralo u svega nekoliko minuta

No bilo je potrebno osigurati razdvajanje svih šest statina. Uz boratni pufer u koncentraciji 20 mM, pH 9.5, uz injektiranje 50 mbar 4 sekunde, temperaturu 30 °C i napon 30 kV, nije bilo moguće razdvojiti pravastatin i rosuvastatin, te simvastatin i lovastatin.

4.1.2 Utjecaj surfaktanta

Kako u boratnom puferu pH 9,5 razdvajanje analita nije bilo potpuno, u otopinu radnog pufera dodan je SDS. On je anionski surfaktant koji djeluje kao pseudostacionarna faza i inače je najčešće korišteni surfaktant u micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji. Molekule SDS-a imaju dugačke hidrofobne repove koji se u koncentracijama iznad kritične micelarne koncentracije u polarnom vodenom mediju okreću jedan prema drugome, dok

prema van okreću polarne glave sa sulfatnom skupinom, tvoreći tako agregate koje nazivamo micelama, a predstavljaju pseudostacionarnu fazu. Ovako formirane micele SDS-a imaju negativan naboj, pa u korištenim uvjetima analize putuju u suprotnom smjeru u odnosu na elektroosmotski tok, odnosno prema anodi. No u bazičnom pH radnog pufera koji se koristio (pH 9,5), elektroosmotski tok je brži od micela SDS-a, pa su i one nošene prema katodi, odnosno detektorskom kraju kapilare.

U ovom slučaju svi su analiti bili negativno nabijeni i mogli su se analizirati kapilarnom zonskom elektroforezom, no dodatak anionskog surfaktanta mijenja selektivnost metode jer sada brzina kretanja ovisi i o elektroforetskoj pokretljivosti analita, ali i o konstanti raspodjele između micele i vodene otopine pufera. Zbog razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima i strukturi statina, upravo je dodatak surfaktanta u otopinu radnog pufera bio ključan za njihovo uspješno razdvajanje. Naime, pravastatin i rosuvastatin su relativno hidrofilni spojevi, što je posljedica polarne hidroksilne skupine vezane na dekalinski prsten pravastatina i metan-sulfonske skupine rosuvastatina, stoga vrlo malo stupaju u interkaciju s hidrofobnim micelama SDS-a. Ostali lijekovi iz skupine statina smatraju se lipofilnima, pa će u većoj mjeri stupati u interakciju s micelama SDS-a i dulje se zadržavati u kapilari. Simvastatin je zbog dvije metilne skupine najlipofilniji lijek iz skupine statina, pa je očekivano da će upravo simvastatin eluirati posljednji.

4.1.3 Utjecaj organskog otapala

No ni dodatak SDS-a nije bio dovoljan. Naime, razlučivanje od 1,5 uzima se kao granično razlučivanje, pri kojem su pikovi razdvojeni u baznoj liniji. Ako je razlučivanje manje od 1,5, smatra se da pikovi koeluiraju. Na temelju provedenih ispitivanja uočeno je da je dobro razlučivanje između pikova postignuto tek pri visokoj koncentraciji SDS-a (50 mM), što je za posljedicu imalo dugo vrijeme analize i visoku struju unutar kapilare te opasnost od Jouleova zagrijavanja. Kako bi se ipak osiguralo da pikovi budu potpuno razdvojeni, odnosno da razlučivanje bude veće od 1,5, u otopinu radnog pufera dodano je osim SDS-a i organsko otapalo.

Dodatak organskog otapala mijenja selektivnost i vrijeme migracije analita, mijenjajući zeta-potencijal, viskoznost i dielektričnu konstantu. Iako uglavnom smanjuje elektroosmotski tok, utjecaj organskog otapala na selektivnost je složen i najlakše ga je eksperimentalno odrediti. Acetonitril dodan u koncentraciji 20% *v/v* znatno je produžio vrijeme analize. Dodatkom metanola u radni pufer oblik i simetrija pikova bili su puno bolji,

stoga je metanol odabran kao organsko otapalo za daljnu optimizaciju metode. Već pri koncentraciji od 10% *v/v* metanol je poboljšao razdvajanje, dok daljnje povećanje udjela metanola nije značajno poboljšalo razlučivanje, a bitno je produžilo trajanje analize i proširilo pikove.

Dodatak organskog otapala u otopinu radnog pufera koja sadrži SDS pokazao se ključnim korakom u razvoju i optimizaciji nove metode. Dodatkom SDS-a i metanola u koncentraciji od 10% *v/v* postignuto je dobro razlučivanje između svih šest statina (Rs > 2), i to u kratkom vremenu analize. Iako je sada primijenjena micelarno-elektrokinetička kromatografska metoda, koja omogućuje analizu i neutralnih analita kakvi su laktonski oblici lovastatina i simvastatina, bazična hidroliza kojom se laktonski prsteni otvaraju u hidroksi kiselinski oblik lovastatina i simvastatina je i dalje provedena. Naime, negativno nabijeni statini imaju puno kraće vrijeme migracije od neutralnih laktonskih formi, pa je nakon bazične hidrolize MEKC metoda bila značajno kraća. Negativno nabijene molekule statina nisu stupale u snažnu interakciju s micelama SDS-a te su razdvojene na temelju razlike u elektroforetskim mobilnostima i lipofilnosti.

4.1.4 Optimizacija koncentracije SDS-a i boratnog pufera

Budući da je odabrana micelarno-elektrokinetička kromatografska metoda, bilo je potrebno optimizirati koncentraciju dodanog surfaktanta. Ispitan je utjecaj koncentracije SDS-a u rasponu od 10-40 mM. Više koncentracije nisu se uzele u obzir jer je vrijeme analize bilo duže od 10 minuta, a niže koncentracije nisu promatrane jer su ispod kritične micelarne koncentracije SDS-a. Kao što je prikazano na Slici 6, povećanjem koncentracije SDS-a povećalo se vrijeme migracije statina, a došlo je i do širenja pikova. To je posljedica solubilizacije statina micelama.

Osim vremena migracije statina, odnosno trajanja analize, važan čimbenik pri odabiru optimalne koncentracije SDS-a su i oblik i simetrija pika te razlučivanje između pikova koji eluiraju blizu jedan drugome. Razlučivanje između pravastatina i rosuvastatina, dva pika koja eluiraju najbliže jedan drugom, povećavalo se porastom koncentracije SDS-a (Slika 7).

Prilikom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode korisno je pogledati i ovisnost broja teorijskih tavana o različitim parametrima metode. Broj teorijskih tavana je matematički koncept koji opisuje učinkovitost kapilare ili kromatografske kolone. To je hipotetska zona, odnosno stanje u kojem se uspostavlja ravnoteža između dviju faza, u ovom slučaju nepokretne faze, kapilare, i pokretne faze, radnog pufera. Što je ovaj broj veći, kolona

odnosno kapilara se smatra učinkovitijom. U kapilarnoj elektroforezi se broj teorijskih tavana može izračunati kao:

$$N = \mu_e El/2D$$

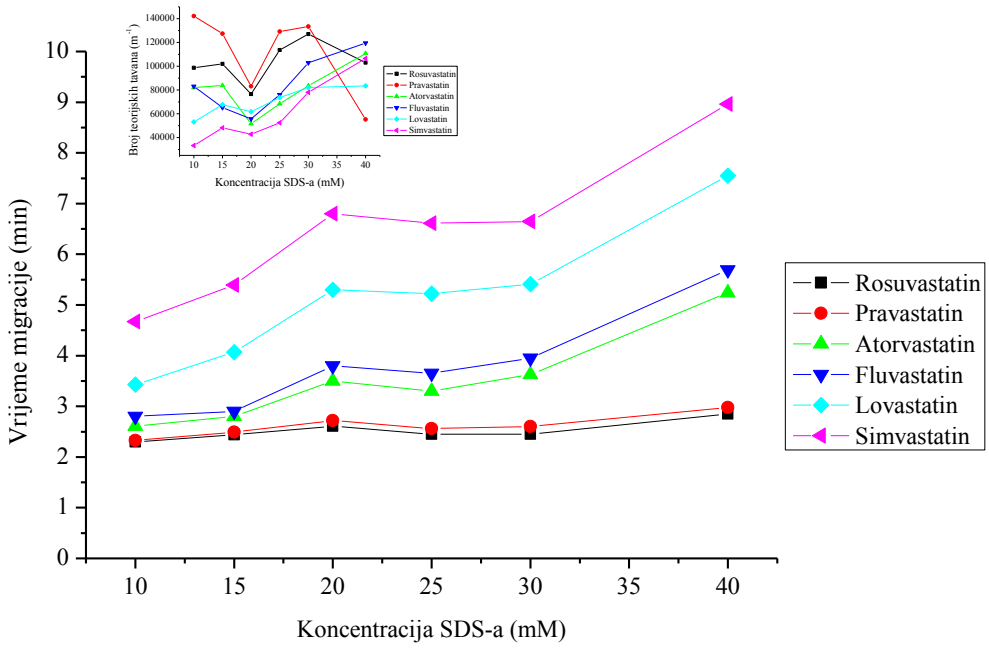
gdje je μ_e = elektroforetska pokretljivost analita, E = električno polje, l = efektivna duljina kapilare (do detektora), D = difuzijski koeficijent.

Broj teorijskih tavana može se jednostavnije odrediti izravno iz elektroferograma, koristeći jednadžbu:

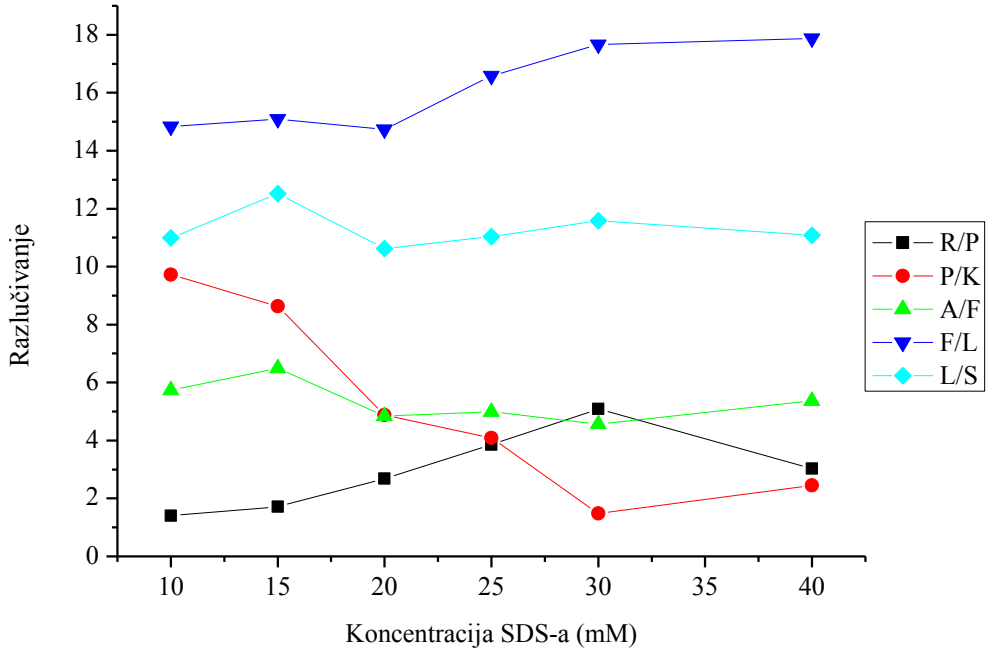
$$N = 5{,}54\ (t/w_{1/2})^2$$

gdje je t = migracijsko vrijeme, a $w_{1/2}$ = širina kromatografskog pika pri polovici visine.

Stoga je tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode ispitana ovisnost broja teorijskih tavana, odnosno učinkovitosti, o koncentraciji SDS-a (Umetak Slici 6).

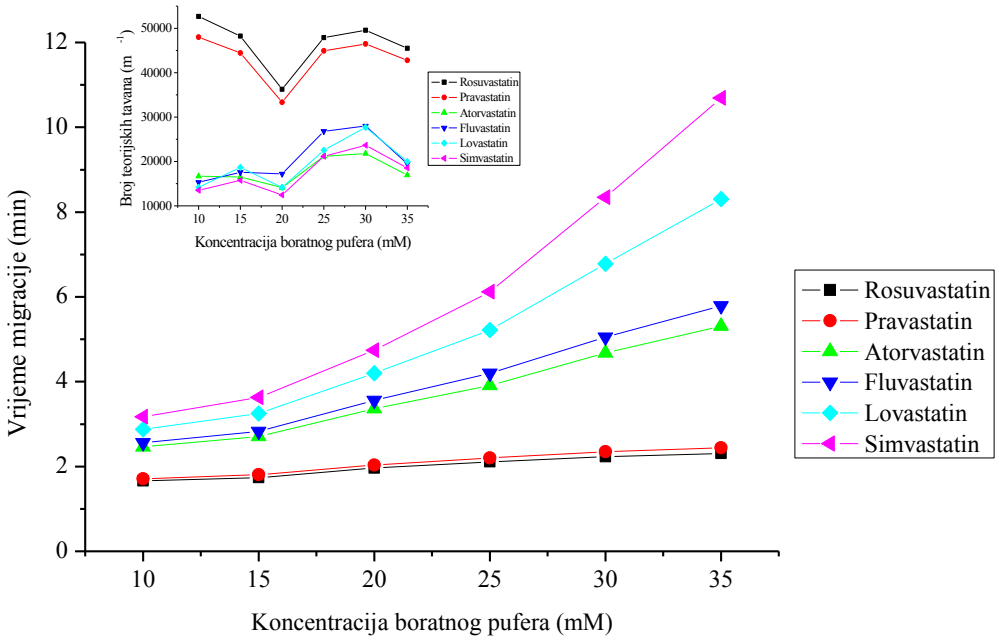


Slika 6. Ovisnost vremena migracije statina o koncentraciji SDS-a. Umetak slici: Ovisnost broja teorijskih tavana o koncentraciji SDS-a.
Uvjeti analize: 25 mM boratni pufer pH 9,5, 10% (v/v) metanol, 20 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 30 mbar, 4 s. Uzorak: 60 µg/ml rosuvastatin (R), 40 µg/ml pravastatin (P), 50 µg/ml ketoprofen (K), 70 µg/ml fluvastatin (F), 40 µg/ml lovastatin (L), 60 µg/ml simvastatin (S).

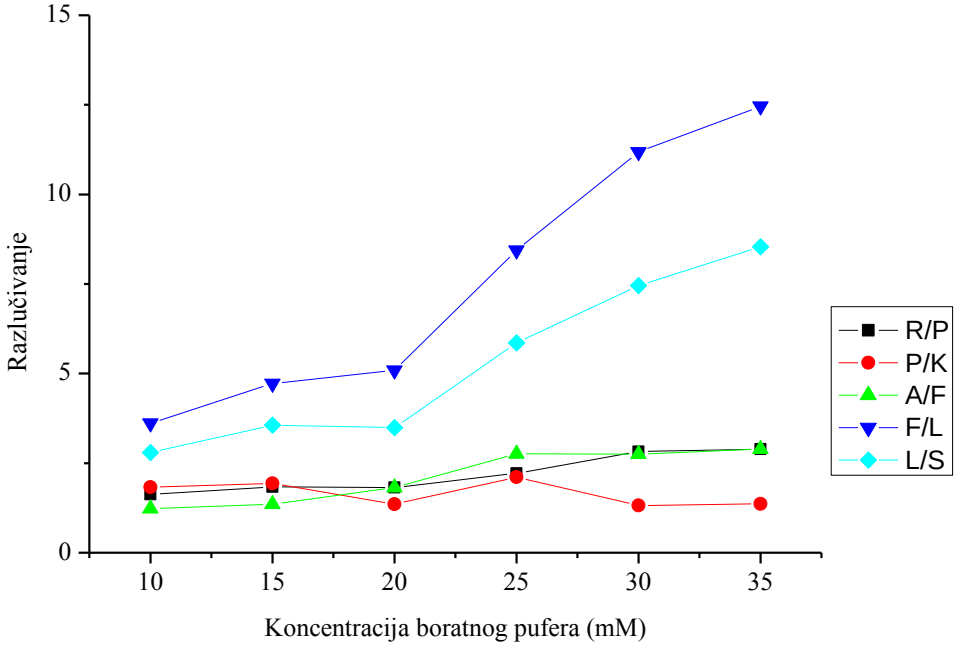


Slika 7. Ovisnost razlučivanja između analita o koncentraciji SDS-a.
Uvjeti analize: 25 mM boratni pufer pH 9,5, 10% (v/v) metanol, 20 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 30 mbar, 4 s. Uzorak: 60 µg/ml rosuvastatin (R), 40 µg/ml pravastatin (P), 50 µg/ml ketoprofen (K), 70 µg/ml fluvastatin (F), 40 µg/ml lovastatin (L), 60 µg/ml simvastatin (S).

Budući da koncentracija pufera direktno utječe na elektroosmotski tok, a time i na učinkovitost razdvajanja analita, prilikom razvoja nove metode potrebno je optimizirati i koncentraciju pufera. Ispitana je koncentracija borata u rasponu od 10-35 mM, dok se koncentracija SDS-a i metanola držala stalnom na optimiziranih 25 mM SDS-a i 10% *v/v* metanola. Povećanjem koncentracije pufera poboljšava se razlučivanje između pikova, ali se produžava i vrijeme analize. Kao što je prikazano na Slikama 8 i 9, pri koncentraciji 25 mM boratnog pufera razlučivanje između svih pikova je bilo najbolje ($Rs > 2.11$), broj teorijskih tavana visok ($N > 53\ 000$), a vrijeme analize kratko ($t_R < 5$ min), omogućujući određivanje svih šest statina unutar 5 minuta.



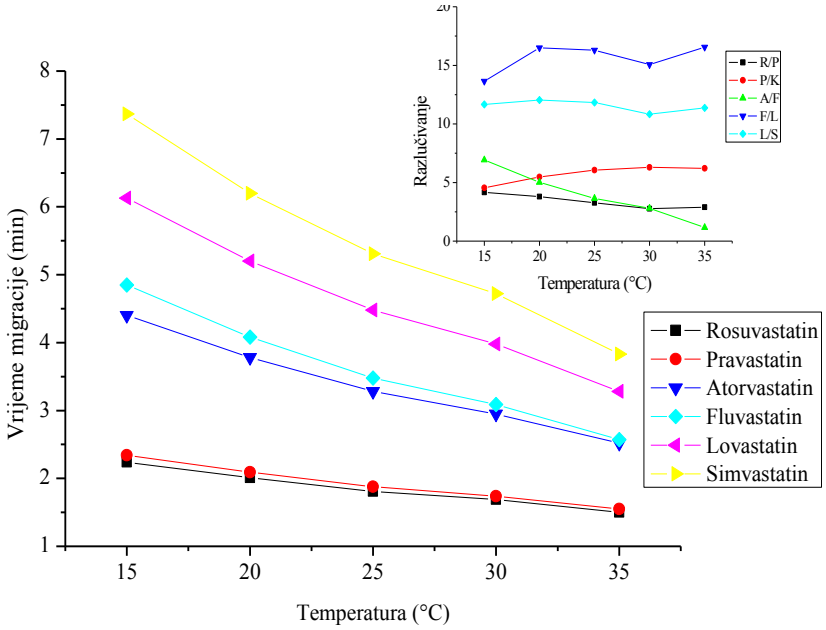
Slika 8. Ovisnost vremena migracije statina o koncentraciji boratnog pufera. Umetak slici: Ovisnost broja tavana o koncentraciji boratnog pufera.
Uvjeti analize: 25 mM SDS, 10% (v/v) metanol, 20 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 30 mbar, 4 s. Uzorak: 60 µg/ml rosuvastatin (R), 40 µg/ml pravastatin (P), 50 µg/ml ketoprofen (K), 70 µg/ml fluvastatin (F), 40 µg/ml lovastatin (L), 60 µg/ml simvastatin (S).



Slika 9. Ovisnost razlučivanja između analita o koncentraciji boratnog pufera.
Uvjeti analize: 25 mM SDS, 10% (v/v) metanol, 20 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 30 mbar, 4 s. Uzorak 60 µg/ml rosuvastatin (R), 40 µg/ml pravastatin (P), 50 µg/ml ketoprofen (K), 70 µg/ml fluvastatin (F), 40 µg/ml lovastatin (L), 60 µg/ml simvastatin (S).

4.1.5 Utjecaj temperature kapilare

Primarna svrha termostatiranja kapilare je da se njezina temperatura održi stalnom i da se izbjegne Jouelovo zagrijavanje uslijed pojačanja jakosti struje. Također je važno osigurati da temperatura u kapilari ne bude ispod Krafftove točke, odnosno temperature ispod koje je topljivost surfaktanta niža od kritične micelarne koncentracije. Osim toga, temperatura kapilare je također jedan od parametara koji se mogu optimizirati, budući da se povišenjem ili sniženjem temperature mijenja viskoznost elektrolita, EOF i vrijeme analize. Temperatura mijenja viskoznost elektrolita 2-3% za svaki Celzijev stupanj, a time mijenja i brzinu elektroosmotskog toka i elektroforetsku pokretljivost analita. Stoga je ispitan utjecaj temperature na vrijeme analize, ali i uspješnost razdvajanja, u rasponu od 15 – 35 °C. Kao što je vidljivo na Slici 10 pri temperaturi od 35 °C vrijeme analize je najkraće, no razlučivanje između atorvastatina i fluvastatina se značajno smanjuje, a broj teorijskih tavana je niži. Pri temperaturi od 30 °C vrijeme analize nije značajno dulje, dok je učinkovitost metode iznimno visoka, a razlučivanje vrlo dobro (Rs > 2,77). Iako je pri nižim temperaturama razlučivanje bolje, vrijeme analize se značajno produljuje, pa je pri 20 °C dulje od 6 minuta, dok je pri 15 °C dulje i od 7 minuta. Kako je razlučivanje od 2,77 između rosuvastatina i pravastatina, dva pika koja eluiraju najbliže jedan drugome, iznimno dobro, temperatura od 30 °C je odabrana kao optimalna jer je pri tim uvjetima moguća analiza svih šest statina za manje od 5 minuta.



Slika 10. Ovisnost vremena migracije statina o temperaturi. Umetak slici: Ovisnost razlučivanja između analita o temperaturi.
Uvjeti analize: 25 mM boratni pufer pH 9,5, 25 mM SDS, 10% (v/v) metanol, 20 kV, hidrodinamičko injektiranje 30 mbar, 4 s. Uzorak kao na Slici 8.

4.1.6 Utjecaj primijenjenog napona

Napon pri kojem će se vršiti analiza se uobičajeno, tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode, optimizira među zadnjim parametrima. To je vrlo važan čimbenik jer promjena napona snažno utječe na promjenu brzine EOF-a te brzinu analita. Iz izraza za brzinu iona u električnom polju vidljivo je da se ona povećava povećanjem električnog polja. Kako električno polje ovisi o primijenjenom naponu i duljini kapilare, povećanjem napona pri kojem će se vršiti analiza povećat će se i brzina iona.

Brzina elektroosmotskog toka može se računati prema izrazu:

$$v_{EOF} = (\varepsilon \zeta / \eta) E = (\varepsilon \zeta / \eta) V/l$$

gdje je v_{EOF} = brzina elektroosmotskog toka, ε = dielektrična konstanta, ζ = zeta-potencijal, η = viskoznost, E = primijenjeno električno polje, V = primijenjeni napon, l = duljina kapilare.

Što je veći napon koji se primjenjuje duž kapilare tijekom analize, brzina elektroosmotskog toka će biti veća, vrijeme migracije analita kraće, odnosno analiza brža. Promjenom napona se, dakle, može utjecati na vrijeme analize, separacijsku učinkovitost, ali i površinu pika, a time i osjetljivost metode. Naime, povećanjem napona površina pika se smanjuje, a time je i osjetljivost metode manja. Stoga je potrebno pronaći kompromis između brzine analize i učinkovitosti razdvajanja s jedne te veličine pikova, odnosno osjetljivosti s druge strane.

Na temelju provedenih ispitivanja, kao optimalan odabran je napon analize od 23 kV. Pri tom naponu vrijeme analize je bilo najkraće (manje od 5 minuta), razlučivanje je ostalo vrlo dobro (Rs > 2.28), a struja unutar kapilare nije prelazila granicu od 120 μA, što osigurava izbjegavanje Jouleova zagrijavanja u kapilari.

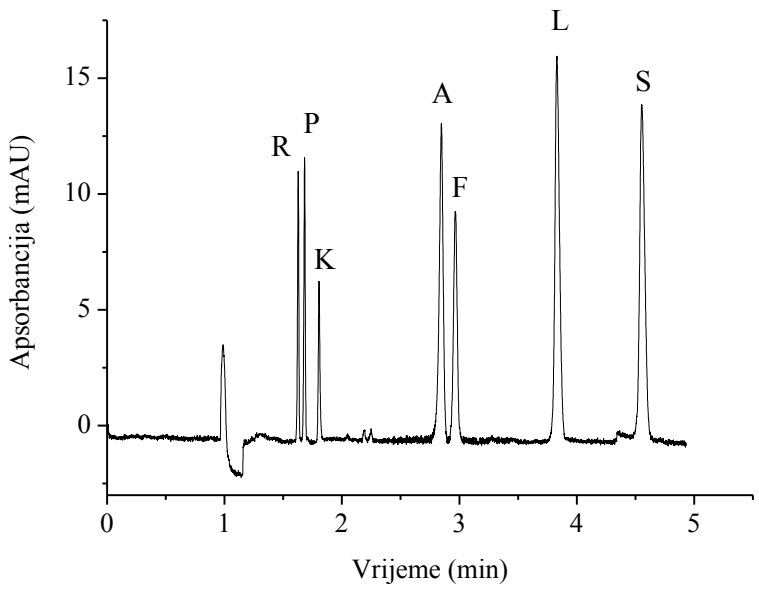
4.1.7 Valna duljina detektora

Statini imaju apsorpcijske maksimume pri različitim valnim duljinama. Kako bi se detekcija svih šest statina mogla vršiti istovremeno, a da pritom bude što osjetljivija, odabrana je valna duljina detektora pri 237 nm, gdje svi statini imaju snažnu UV-apsorbanciju te je omogućena izravna *online* detekcija u kapilari.

4.1.8 Unutarnji standard

Kako bi se izbjegle sve pogreške koje mogu nastati uslijed promjena u volumenu injektiranja, naponu i razlikama u elektroosmotskom toku, korišten je unutarnji standard. Odabran je ketoprofen, koji u svojoj strukturi ima karboksilnu skupinu i pK_a vrijednost 4,4, pa je negativno nabijen kao i ispitivane molekule statina. Unutarnji standard ketoprofen je pri optimiziranim uvjetima analize davao uski, dobro razdvojeni pik između pravastatina i atorvastatina.

Nakon što su svi uvjeti optimizirani, omogućena je analiza svih šest statina i unutarnjeg standarda ketoprofena za svega 5 minuta (Slika 11).



Slika 11. Elektroferogram smjese standardnih otopina svih šest statina uz dodatak unutarnjeg standarda pri optimiziranim uvjetima analize.
Uvjeti analize: 25 mM boratni pufer pH 9,5, 25 mM SDS, 10% MeOH, 23 kV, 30 °C, hidrodinamičko injektiranje pri 30 mbar, 4 s. Uzorak: 50 μg/ml za standardne otopine statina i unutarnjeg standarda. R = rosuvastatin, P = pravastatin, K = ketoprofen, A = atorvastatin, F = fluvastatin, L = lovastatin i S = simvastatin.

4.1.9 Validacija metode

Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu. Prema regulatornim zahtjevima Dobre proizvođačke prakse i

Dobre laboratorijske prakse, validacija analitičkog postupka je obavezna kako bi se moglo jamčiti da će u propisanim uvjetima primijenjeni analitički postupak dati valjane rezultate. Validaciju je potrebno provesti pri razvoju i uvođenju nove metode ili promjeni bilo kojeg dijela postojeće, već validirane metode. Postupak validacije i parametri koji se ispituju opisani su u ICH smjernicama [ICH Q2 (R1)]. Analitički parametri koji se određuju u postupku validacije su linearnost, točnost, preciznost, specifičnost (selektivnost), granica dokazivanja, granica određivanja te izdržljivost.

Nakon što su svi uvjeti novorazvijene micelarno-elektrokinetičke kromatografske metode optimizirani, metoda je validirana pri sljedećim uvjetima mjerenja: boratni pufer u koncentraciji 25 mM, pH 9,5, 25 mM SDS-a, 10% *v/v* metanol, primijenjeni napon 23 kV, temperatura 30 °C, hidrodinamičko injektiranje 4s pri 30 mbar.

Selektivnost

Specifičnost je sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje jedan analit od ostalih sastojnica uzorka, a selektivnost je mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih sastojnica uzorka.

Selektivnost metode ispitana je mjerenjem čistoće pika kako bi se osiguralo da nema koeluirajućih onečišćenja koja bi piku povećala površinu, odnosno davala lažno pozitivan rezultat. Procjena čistoće pika provedena je korištenjem programa Agilent ^{3D}CE/MSD ChemStation. Procjena se temelji na slaganju UV-spektara od 200 – 400 nm u različitim dijelovima pika. Vrijednosti faktora čistoće pika (engl. P*eak purity factor*) kretale su se od 996.3 – 1000.0 te pokazuju da su spektri u svim dijelovima pika identični, odnosno da su pikovi za svaki od statina homogeni.

Linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja

Linearnost je sposobnost metode da unutar određenog raspona daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Radno područje je raspon koncentracija analita unutar kojeg analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost.

Linearnost se ispitivala za svih šest statina u rasponu koncentracije od 10,0 do 100,0 μg mL^{-1}, na šest koncentracijskih razina. U svaku otopinu dodan je unutarnji standard ketoprofen u koncentraciji od 50.0 μg mL^{-1}. Kalibracijske krivulje dobivene su kao ovisnost omjera površine pojedinog statina i unutarnjeg standarda o koncentraciji statina. Jednadžba

pravca dobivena je linearnom regresijom metodom najmanjih kvadrata. Jednadžbe pravaca i koeficijenti korelacije su prikazani u Tablici 4. Metoda se pokazala linearnom za svaki od ispitivanih statina u širokom koncentracijskom rasponu.

Tablica 4. Jednadžbe pravaca, koeficijent korelacije te granica dokazivanja i određivanja

Analit	*Raspon (µg/mL)*	*Nagib ± sd*	*Odsječak ± sd*	*Koeficijent korelacije(r)*	*LOD (µg/mL)*	*LOQ (µg/mL)*
Rosuvastatin	10,0 - 100,0	0,0305 ± 0,0002	0,0469 ± 0,0139	0,9999	0,73	1,40
Pravastatin	10,0 - 100,0	0,0441 ± 0,0009	0,0146 ± 0,0542	0,9994	0,83	1,49
Atorvastatin	10,0 - 100,0	0,0766 ± 0,0019	0,0679 ± 0,1143	0,9994	1,33	1,96
Fluvastatin	10,0 - 100,0	0,0858 ± 0,0012	0,1960 ± 0,0662	0,9996	1,15	1,79
Lovastatin	10,0 - 100,0	0,1314 ± 0,0018	0,0344 ± 0,0102	0,9996	0,99	1,64
Simvastatin	10,0 - 100,0	0,1668 ± 0,0031	0,2528 ± 0,1824	0,9995	1,09	1,73

Granica dokazivanja (LOD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena pri zadanim uvjetima metode, a granica određivanja (LOQ) je najniža koncentracija analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.

LOD i LOQ vrijednosti određene su iz omjera signala i šuma, usporedbom visine signala uzorka poznate koncentracije analita i visine šuma bazne linije. LOD je najmanja koncentracija pri kojoj je signal analita tri puta veći od signala šuma, dok je LOQ najmanja koncentracija pri kojoj je signal deset puta veći od signala šuma.Dobiveni rezultati za granice dokazivanja i određivanja su prikazani u Tablici 4.

Preciznost i točnost

Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istoga homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima, a izražava se kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom razdoblju. Srednja preciznost je odstupanje rezultata

dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom u istom laboratoriju pod različitim uvjetima, primjerice različit analitičar, različit instrument, različite otopine ili kroz duže vremensko razdoblje. Ovim parametrom se ispituje hoće li metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom uporabe u laboratoriju. Ponovljivost novorazvijene kapilarnoelektroforetske metode ispitana je uz šest uzastopnih injektiranja smjese standardnih otopina svih šest statina i unutarnjeg standarda ketoprofena u koncentraciji od 5,0 μg mL^{-1}. Srednja preciznost ispitivala se kroz tri dana. Svaki dan su pripremljene nove otopine radnog pufera i smjese standardnih otopina i unutarnjeg standarda. Rezultati su izraženi kao relativne standardne devijacije (RSD) za korigirano vrijeme migracije (vrijeme migracije pojedinog statina podijeljeno s vremenom migracije unutarnjeg standarda) i za korigiranu površinu pika (površina pika pojedinog statina podijeljena s površinom pika unutarnjeg standarda). Granice prihvatljivosti za RSD vrijednosti ovise o tipu analize i koncentraciji analita. Dobivene vrijednosti za ponovljivost i srednju preciznost, prikazane u Tablici 5, ukazuju na zaključak da je predložena metoda pouzdana.

Tablica 5. Ponovljivost i srednja preciznost vremena migracije i površine pikova

Analit	*Ponovljivost (n=6)*				*Srednja preciznost (n=6)*			
	Vrijeme migracije[a]	*RSD (%)*	*Površina pika*[b]	*RSD (%)*	*Vrijeme migracije*[a]	*RSD (%)*	*Površina pika*[b]	*RSD (%)*
Rosuvastatin	0,90	0,17	1,38	1,17	0,89	0,33	1,25	2,24
Pravastatin	0,93	0,18	1,55	1,28	0,92	0,35	1,42	1,74
Atorvastatin	1,58	0,19	4,88	1,39	1,63	0,46	4,51	3,70
Fuvastatin	1,64	0,21	3,36	1,41	1,71	0,63	3,18	3,60
Lovastatin	2,12	0,21	6,84	1,35	2,32	0,87	6,39	2,27
Simvastatin	2,52	0,24	6,79	1,86	2,85	1,48	6,27	3,59

[a] Omjer vremena migracije statina i vremena migracije unutarnjeg standarda
[b] Omjer površine pika statina i površine pika unutarnjeg standarda

Točnost metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Određena je analizom uzoraka poznate koncentracije. Mjerene su tri otopine statina na tri koncentracijske razine, 20, 50 i 100 μg mL^{-1}, unutar radnog područja metode. Određen je analitički prinos, kao omjer izmjerene i stvarne koncentracije, izražen u postotku. Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa prikazane su u Tablici 6, te pokazuju dobru točnost metode.

Tablica 6. Točnost metode izražena kao analitički prinos

Analit	*Koncentracija (μg/mL)*	*Analitički prinos (%)*	*RSD (%)*
Rosuvastatin	20	102,64	1,63
	50	100,73	1,17
	100	99,74	0,78
Pravastatin	20	97,10	0,91
	50	102,64	1,28
	100	98,61	1,08
Atorvastatin	20	101,92	1,21
	50	102,93	1,39
	100	99,39	1,95
Fluvastatin	20	103,00	0,84
	50	97,74	1,25
	100	100,17	2,18
Lovastatin	20	101,03	1,95
	50	97,03	1,24
	100	100,41	2,63
Simvastatin	20	102,76	1,08
	50	98,22	1,55
	100	99,13	2,59

Izdržljivost

Izdržljivost je mjera sposobnosti analitičkog postupka da ostane nepromijenjen pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Izdržljivost je ispitana mijenjanjem nekoliko eksperimentalnih parametara, koji najznačajnije mogu utjecati na razdvajanje analita, a ujedno su bili i optimizirani tijekom razvoja metode: koncentracija pufera (25 ± 1 mM), koncentracija surfaktanta (25 ± 1 mM), udio organskog otapala (10 ± 1%) i temperatura (30 ± 1°C). Kao kriteriji promatrane su promjene u vremenu migracije pikova (RSD = 0,10 – 3,25%), površini pikova (RSD = 0,10 – 4,34%) i razlučivanju između pikova (RSD = 1,11 – 4,59%). Uočene promjene su prihvatljive te je pokazano da je izdržljivost metode dobra.

4.1.10 Primjena novorazvijene metode za analizu gotovih ljekovitih oblika statina

Nakon što je nova micelarna elektrokinetička kromatografska metoda razvijena, optimizirana i validirana, primijenjena je na ljekovitim oblicima šest statina, komercijalno dostupnih u ljekarnama u Hrvatskoj za identifikaciju i određivanje sadržaja djelatne tvari.

Kako bi se utvrdilo je li nova metoda primjenjiva za dokazivanje i određivanje sadržaja statina u ljekovitom obliku, provjerena je njezina selektivnost. Uspoređeni su elektroferogrami standardnih otopina statina i otopina komercijalno dostupnih farmaceutskih proizvoda statina. Nije uočena nikakva interferencija između ispitivanih pikova statina i eventualnih pikova pomoćnih tvari prisutnih u tabletama. Čistoća pika otopina tableta statina iznosila je 995,9 – 998,9 bez ikakvih interferirajućih pikova. Stoga se pokazalo da je novorazvijena metoda selektivna i prikladna za primjenu na farmaceutskim proizvodima.

Uspoređene su srednje vrijednosti triju mjerenja otopina tableta s deklariranim vrijednostima sadržaja statina. Analitički prinosi iznosili su 98,94 – 100,80%. Dobiveni rezultati određene količine statina u tableti, analitičkog prinosa (engl. *Recovery*, R) i relativna standardna odstupanja provedenih mjerenja prikazani su u Tablici 7.

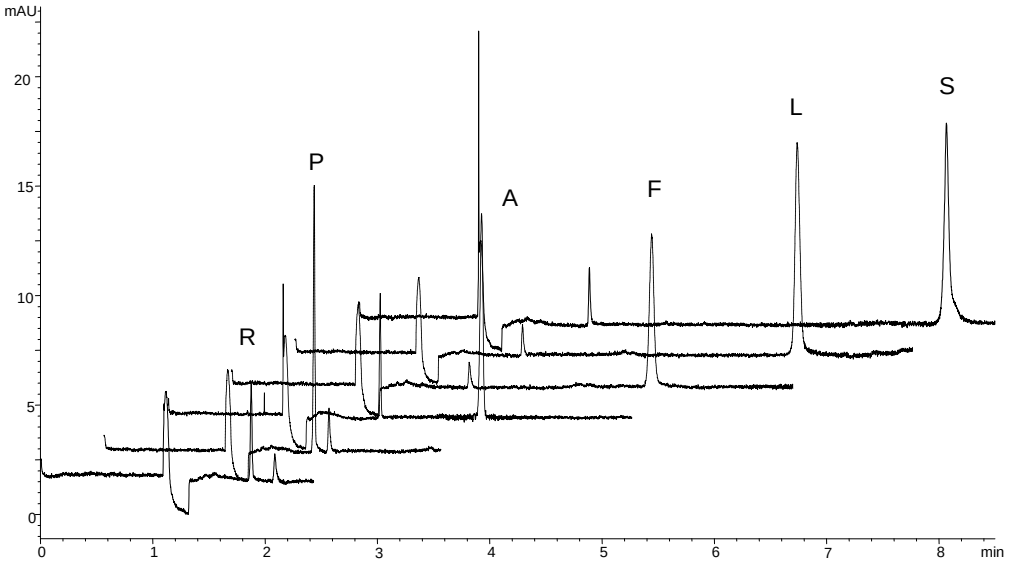
Tablica 7. Rezultati analize statina u ljekovitom obliku

Analit	*Deklarirana vrijednost (mg/tableti)*	*Pronađena vrijednost*[a] *(mg)*	*Analitički prinos (%)*	*RSD (%)*
Rosuvastatin	10	9,90	99,00	1,1
Pravastatin	20	20,16	100,80	1,9
Atorvastatin	10	9,89	98,94	1,4
Fluvastatin	80	78,43	98,04	1,4
Lovastatin	20	20,08	100,40	2,0
Simvastatin	20	19,93	99,65	0,8

[a] Srednja vrijednost pet mjerenja

Dobiveni rezultati pokazuju da je utjecaj matriksa tablete zanemariv jer je točnost metode odlična, te su kod određivanja statina u tableti dobivene vrijednosti u skladu s deklariranim sadržajem. Stoga je nova micelarno-elektrokinetička metoda primjenjiva za dokazivanje i određivanje statina u ljekovitom obliku. Time je postignut glavni cilj – jedinstvena metoda za analizu bilo kojeg od šest statina, rosuvastatina, pravastatina, atorvastatina, fluvastatina,

lovastatina i simvastatina, bez potrebe za razvijanjem nove, zasebne metode za svaki od statina. Reprezentativni elektroferogrami su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Reprezentativni elektroferogrami komercijalno dostupnih ljekovitih oblika: Crestor, Pravachol, Atoris, Lescol XL, Artein, Lipex.
R = rosuvastatin, P = pravastatin, A = atorvastatin, F = fluvastatin, L = lovastatin, S = simvastatin.

4.1.11 Usporedba novorazvijene MEKC metode za analizu statina s postojećim analitičkim metodama

U ovom doktorskom radu razvijena je MEKC metoda za istovremenu analizu šest statina: atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina, prva kapilarnoelektroforetska metoda predstavljena u svijetu za ovu primjenu. Nova predložena MEKC metoda prije analize koristi jednostavnu bazičnu hidrolizu lovastatina i simvastatina radi transformacije laktonskog prstena u otvoreni prsten hidroksi kiseline. Time molekule postaju negativno nabijene, te su zbog veće elektroforetske pokretljivosti vremena migracije analita značajno skraćena, pa je analiza svih šest statina moguća za manje od 5 minuta. Stoga je njezina najveća prednost upravo visoka separacijska učinkovitost u kratkom vremenu analize. Predložena metoda je u potpunosti validirana u skladu s ICH smjernicama, i pokazala se selektivnom, osjetljivom, preciznom, točnom i robusnom. Metoda iziskuje vrlo male količine uzoraka i troši malo otapala tijekom rada, pa je financijski povoljna i ekološki prihvatljiva. Stoga predstavlja izvrsnu alternativu postojećim analitičkim metodama za

analizu statina. Kao što je navedeno u pregledu literature u poglavlju 1.8., do sada je objavljeno dosta HPLC metoda te samo nekoliko kapilarnoelektroforetskih metoda za analizu statina. Većina predloženih metoda razvijena je zasebno za svaki pojedini statin, budući da se oni uvelike razlikuju po svojoj kemijskoj strukturi te fizikalno-kemijskim svojstvima. Službene farmakopejske monografije objavljene su za fluvastatin, lovastatin, pravastatin i simvastatin. Sve metode za određivanje sadržaja koriste HPLC tehniku uz primjenu različitih nepokretnih faza, duljine 3,3 – 25 cm, uz vrijeme zadržavanja analita 3 – 21 min. Monografija atorvastatina uvrštena je tek u posljednje izdanje Europske farmakopeje, a objavljena je nakon što je razvijena MEKC metoda predložena u ovom doktorskom radu. Farmakopejska monografija predlaže HPLC metodu s binarnim gradijentnim protokom, uz vrijeme zadržavanja atorvastatina 33 min. Pregledom literature pronađeno je nekoliko kapilarnoelektroforetskih metoda za određivanje pojedinog statina u gotovom ljekovitom obliku ili aktivnoj farmaceutskoj supstanciji. Za analizu pravastatina objavljena je jedna CZE metoda koja omogućuje samo njegovo određivanje u gotovim ljekovitim oblicima za 2,5 min (Nigović i Vegar, 2008). Autori su također predložili MEKC metodu za analizu pravastatina i njegovih razgradnih produkata. Za rutinske analize lovastatina i praćenje njegovih oksidacijskih produkata predložena je MEKC metoda, uz migracijsko vrijeme lovastatina oko 14 min (Javernik Rajh i sur., 2003). Objavljena je jedna MEKC metoda za određivanje simvastatina i lovastatina u gotovim ljekovitim oblicima (Srinivasu i sur., 2002), uz vrijeme analize od 15 min. Naime, autori su aktivne tvari analizirali u njihovu neutralnom, laktonskom obliku, zbog čega je vrijeme analize značajno duže. U MEKC metodi, razvijenoj u ovom istraživanju, laktonski oblici statina, lovastatin i simvastatin, bazičnom su hidrolizom prevedeni u svoje odgovarajuće β-hidroksi kiselinske oblike, koji su zbog svog naboja imali značajno brže elektroforetske pokretljivosti nego njihovi neutralni laktonski oblici. Za određivanje atorvastatina u gotovim ljekovitim oblicima razvijena je brza CE metoda, kasnije primijenjena na mikročipu (Guihen i sur., 2006). Pregledom literature pronađena je samo jedna CZE metoda za određivanje sadržaja rosuvastatina ($t_r < 6$ min) u gotovom ljekovitom obliku (Süslü i sur., 2007). Za analizu fluvastatina objavljena je tek jedna kapilarnoelektroforetska metoda za ispitivanje enantiomerne čistoće kao jednostavnija i jeftinija alternantiva uobičajeno korištenim LC metodama (Trung i sur., 2008).

Metode za istovremenu analizu statina su malobrojne budući da je razvoj metode zahtjevan za spojeve s toliko različitim fizikalno-kemijskim svojstvima i strukturama, a u kliničkoj praksi se statini nikada ne kombiniraju u terapiji. No upravo simultane metode nude izvrsnu zamjenu svima pojedinačnim, do sada objavljenim analitičkim ili službenim

farmakopejskim metodama. Pregledom literature pronađeno je samo nekoliko kromatografskih metoda za istovremenu analizu dvaju ili više statina.

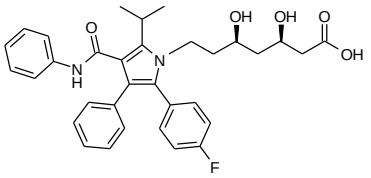
Razvijena je HPTLC metoda za određivanje simvastatina, pravastatina i rosuvastatina u gotovim ljekovitim oblicima (Chaduhari i sur., 2006). No selektivnost predložene metode ne omogućuje istovremenu analizu atorvastatina, fluvastatina i lovastatina. Budući da je vrijeme potrebno za provođenje analize dulje od 30 min, predložena MEKC metoda je značajno brža. HPLC-UV metoda razvijena je za istovremeno određivanje atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina u gotovim ljekovitim oblicima te za praćenje *in vitro* metabolizma lijeka (Pasha i sur., 2006). Predložena HPLC metoda za analizu pet statina traje čak 36 minuta, dok nova MEKC metoda, razvijena u ovom doktorskom radu, omogućuje određivanje svih šest statina za manje od pet minuta. Osim toga, nova predložena metoda je točnija od HPLC metode, jednostavnija, zahtijeva mnogo manje količine uzorka i otapala te su joj troškovi neusporedivo niži. HPLC metoda uz primjenu detektora s nabijenim aerosolom razvijena je za farmaceutsku analizu atorvastatina, simvastatina i lovastatina. Iako je metoda otprilike istog trajanja analize kao predložena MEKC metoda, zahtijeva velike količine organskog otapala, što je čini daleko skupljom i nepovoljnom za okoliš. Osim toga, ova metoda korištena je za određivanje svega triju statina te je primijenjena samo za analizu simvastatina i atorvastatina u ljekovitom obliku. LC-MS-MS metoda za istovremeno određivanje četiriju statina korištena je za analizu ovih lijekova u vodenim ekološkim uzorcima (Miao i Metcalfe, 2003). Metoda je vrlo osjetljiva, no zahtijeva primjenu sofisticirane skupe opreme, koja nije dostupna u svakom analitičkom laboratoriju. Predložena MEKC metoda ima nižu osjetljivost nego postojeće metode tekućinske kromatografije. No budući da je cilj nove metode bio analiza statina u ljekovitom obliku, gdje je deklarirani sadržaj tablete od 10 – 80 mg, dobivene granice dokazivanja (LOD = 0,73-1,33 $\mu g\ mL^{-1}$) i određivanja (LOQ = 1,40-1,96 $\mu g\ mL^{-1}$) su i više nego zadovoljavajuće.

Usporedbom s postojećim metodama može se zaključiti da je novorazvijena kapilarnoelektroforetska metoda zbog svoje jednostavnosti, brzine, selektivnosti, preciznosti, točnosti i ekološke prihvatljivosti izvrstan izbor za dokazivanje i određivanje šest statina. Predložena MEKC metoda, razvijena u ovom doktorskom radu, prva je kapilarnoelektroforetska metoda za analizu svih šest statina registriranih u Europskoj uniji te može poslužiti kao jednostavna i jeftina zamjena za postojeće farmakopejske i druge razvijene analitičke metode za identifikaciju i određivanje sadržaja bilo kojeg od šest statina u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima (Damić i Nigović, 2010).

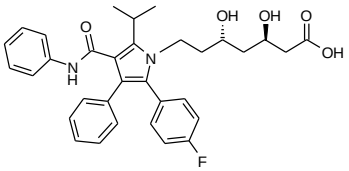
4.2 RAZVOJ NOVE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU ATORVASTATINA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA

Dokazivanje i određivanje onečišćenja u lijekovima posljednjih godina postao je ključni korak farmaceutske analize. Sve su veći zahtjevi za boljom kvalitetom proizvoda te pouzdanosti proizvodnog postupka, stabilnosti i uvjeta čuvanja lijeka. Iznimno je važno identificirati, a u određenim uvjetima i odrediti sadržaj onečišćenja u lijeku, bez obzira na to potječu li ona iz polaznih sirovina, proizvodnog postupka ili je riječ o razgradnim produktima ili pak produktima reakcije lijeka s pomoćnim tvarima ili primarnog ambalažom. Onečišćenja mogu imati neželjene farmakološke i čak toksikološke učinke, mogu izazvati nuspojave, stupati u interakcije, utjecati na stabilnost i aktivnost ljekovite tvari te bioraspoloživost i učinkovitost samog lijeka. Također mogu utjecati na rezultate analitičkih ispitivanja lijekova.

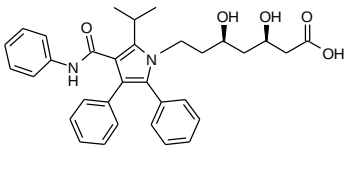
Budući da je terapija statinima svakodnevna i dugotrajna, procjena čistoće ovih lijekova od iznimne je važnosti. Atorvastatin je najčešće korišteni lijek iz ove skupine i spada u deset najčešće propisivanih i korištenih receptnih lijekova u razvijenim zemljama svijeta. Stoga je cilj ovog istraživanja bio razviti novu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu atorvastatina, identifikaciju i određivanje sadržaja atorvastatina te njegovih četiriju onečišćenja, dijastereomera atorvastatina, desfluoroatorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina (Slika 13).



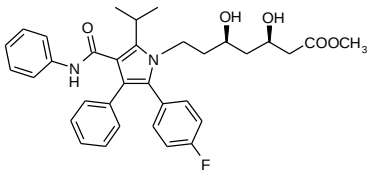
ATORVASTATIN



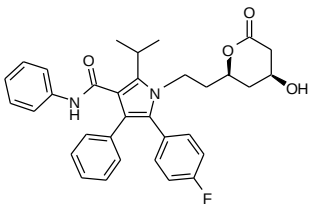
DIJASTEREOMER ATORVASTATINA



DESFLUOROATORVASTATIN



METILNI ESTER ATORVASTATINA



LAKTON ATORVASTATINA

Slika 13. Kemijske strukture atorvastatina, dijastereomera atorvastatina, desfluoroatorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina.

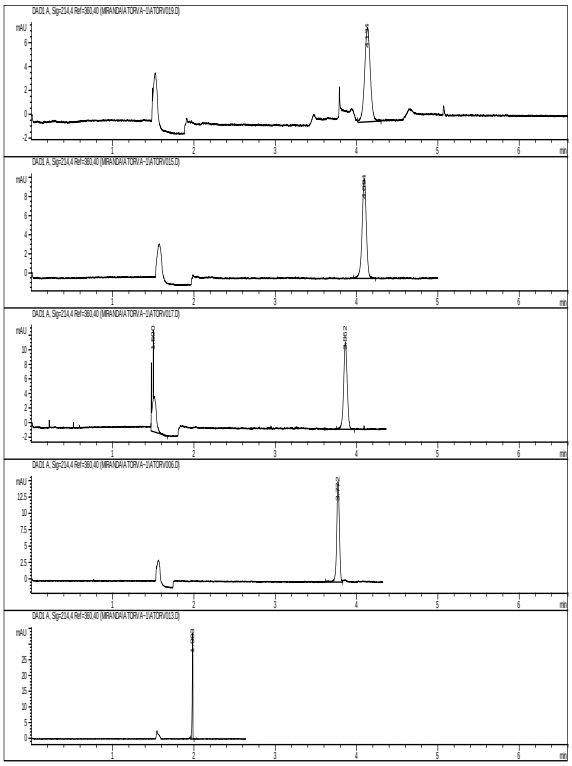
4.2.1 Optimizacija vrste i pH pufera

Prvi parametar koji je ispitan i optimiziran u razvoju nove metode za procjenu čistoće atorvastatina je vrsta i pH pufera. Kod odabira vrste radnog pufera, potrebno je voditi računa da pufer ima dobar puferski kapacitet u izabranom radnom pH-području. pH pufera je pak ključan za kontrolu EOF-a te elektroosmotsku mobilnost, stupanj ionizacije i elektroforetsku pokretljivost analita. Budući da je pK_a vrijednost atorvastatina 4,46 (Miller i sur., 2002), molekula će biti potpuno ionizirana pri vrijednostima pH iznad 6,5. Stoga bi neutralan ili alkalan pH radnog pufera omogućio da atorvastatin, dijastereomer atorvastatina i desfluoroatorvastatin budu u anionskoj formi, odnosno potpuno ionizirani. No dva onečišćenja, lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina, neutralna su, pa se kapilarna zonska elektroforeza, kao najčešća kapilarnoelektroforetska metoda, ne može primijeniti. Jedina vrsta kapilarne elektroforeze koja omogućuje istovremenu analizu i nabijenih i neutralnih čestica je micelarna elektrokinetička kromatografija. Stoga se za analizu ovih spojeva morala koristiti MEKC metoda. MEKC metoda zahtijeva pseudostacionarnu fazu, a kao surfaktant je odabran, lako dostupan i cijenom prihvatljiv, negativno nabijen SDS.

Kod kapilarne zonske elektroforeze je brzina EOF-a snažno ovisna o promjenama pH, pa se pri nižim pH-vrijednostima brzina EOF-a značajno smanji, dok je u alkalnim uvjetima brzina EOF-a puno veća. Kod MEKC metode je ova ovisnost malo drugačija, posebice pri pH 7,0-5,5. Naime, pri ovim slabo kiselim uvjetima se brzina EOF-a neznatno smanjuje sniženjem pH-vrijednosti uslijed adsorpcije molekula SDS-a na unutrašnju stijenku kapilare. Ispod pH-vrijednosti 5,5 ova je ovisnost ponovno značajna, ponajprije zbog smanjenja zeta-potencijala na unutrašnjoj stijenci, jer su silanolne skupine u kiselim uvjetima sve manje disocirane. Kako je SDS korišten za stvaranje micela pseudostacionarne faze, micele su zbog svojega negativnog naboja migrirale prema pozitivno nabijenoj elektrodi, odnosno natrag prema injektorskom dijelu kapilare. Prilikom odabira pH radnog pufera važno je osigurati uvjete u kojima će negativno nabijene micele SDS-a ipak biti nošene prema katodi, odnosno detektoru, kako bi se detekcija i analiza atorvastatina i njegovih onečišćenja uopće mogla provesti. Da bi se to postiglo, EOF mora biti dovoljno snažan, odnosno brzina EOF-a mora biti veća od brzine kojom micele putuju natrag prema anodi. Osim na EOF i putovanje micela surfaktanta, pH pufera utječe i na ionizaciju analita. Stoga je pravilan odabir i kontrola pH radnog pufera ključna kod analize lijeka i njegovih nabijenih onečišćenja. Naime, elektroforetska mobilnost analita izravno proporcionalno ovisi o naboju čestice. Stoga

mijenjanjem pH-vrijednosti pufera možemo značajno utjecati na selektivnost metode, razdvajanje, razlučivanje te trajanje analize.

Kako bi se pronašli optimalni uvjeti analize, provedena su preliminarna ispitivanja na acetatnom i boratnom puferu. Korišten je acetatni pufer u koncentraciji 20 mM, pH 6,0, uz dodatak 25 mM SDS-a, te boratni pufer u koncentraciji 20 mM u pH-rasponu od 7,5 do 9,5, također uz dodatak 25 mM SDS-a. pH-vrijednost radnog pufera niža od 6,0 nije ispitivana budući da pri njima atorvastatin ne bi bio potpuno ioniziran te bi EOF bio slabiji, što bi značajno usporilo analizu. Kako su u cijelom ispitanom pH-rasponu (pH 6,0 – 9,5) atorvastatin, desfluoroatorvastatin i dijastereomer atorvastatina potpuno ionizirani, uočeno povećanje prividne elektroforetske pokretljivosti analita očito je posljedica učinka pH na EOF. Najbolji preliminarni rezultati dobiveni su u boratnom puferu pH 9,5, gdje je EOF bio najjači. Stoga je za početne uvjete odabran boratni pufer u koncentraciji 20 mM pH 9,5, uz dodatak 25 mM SDS-a. Analiza je pri tim uvjetima bila vrlo brza te je vrijeme migracije atorvastatina iznosilo šest minuta. Dodatan razlog za odabir boratnoga radnog pufera pH 9,5 leži u činjenici da je atorvastatin puno stabilniji u alkalnim uvjetima, što je pokazano LC-MS MS analizom alkalne hidrolitičke razgradnje atorvastatina (Shaha i sur., 2007). Boratni pufer je također povoljan jer ima nisku pokretljivost, odnosno velike minimalno nabijene ione, pa struja koja se razvija u kapilari nije velika i ne dolazi do Jouleova zagrijavanja. Osim toga boratni pufer ima jako malu apsorbanciju u niskom UV-području, što je također ključno prilikom analize onečišćenja u lijekovima, koja se očekuju u vrlo malim količinama, pa je poželjno da apsorbancija samog pufera, odnosno šum bazne linije bude što manji. Primjeri elektroferograma s različitim vrstama i pH-vrijednostima radnog pufera prikazani su na Slici 14. Vidljiv je utjecaj vrste i pH vrijednosti odabranog pufera na oblik pika i trajanje analize. Što je pH bio viši, vrijeme analize bilo je kraće. Oblik i simetrija pika bolja je u boratnom puferu nego u acetatnom puferu. Najkraće vrijeme analize postignuto je u boratnom puferu koncentracije 20 mM pH 9,3 bez dodatka SDS-a, no zbog neutralnih onečišćenja koji su trebali biti analizirana, dodatak surfaktanta bio je obavezan.



Slika 14. Primjeri elektroferograma s različitim vrstama i pH-vrijednostima radnog pufera. (A) acetatni pufer pH 7,5 + 25 mM SDS-a; (B) acetatni pufer pH 8,0 + 25 mM SDS-a; (C) acetatni pufer pH 8,5 + 25 mM SDS-a; (D) boratni pufer u koncentraciji 20 mM, pH 9,3 + 25 mM SDS-a; (E) boratni pufer u koncentraciji 20 mM, pH 9,3 + 0 mM SDS-a.

4.2.2 Optimizacija koncentracije boratnog pufera i SDS-a

Nakon što je odabrana vrsta i pH radnog pufera, potrebno je optimizirati koncentraciju pufera, budući da ona direktno utječe na elektroosmotski tok, a time i na učinkovitost razdvajanja. Naime, da bi se postiglo dobro i ponovljivo razdvajanje kroz kapilaru, EOF mora biti konstantan. Što je ionska jakost pufera veća, debljina dvostrukoga električnog sloja je manja, pa je zeta-potencijal na unutrašnjoj stijenci kapilare manji. Pri takvim uvjetima će EOF biti slabiji, odnosno vrijeme analize duže. Iako je cilj svake analitičke metode da bude što kraća, dovoljno visoka koncentracija pufera je nužna kako bi se smanjile Coulombove interakcije između otopljenih tvari i stijenke kapilare smanjivanjem efektivnog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Naime, primjenom preniske koncentracije radnog pufera može doći do adsoprcije uzorka na stijenku kapilare. To za posljedicu može imati širenje pikova, netočno određivanje sadržaja te propadanje kapilare. Primjenom visokih koncentracija pufera može doći do povećanja jakosti struje, a time i Jouelova zagrijavanja kapilare.

U ovom radu ispitana je koncentracija boratnog pufera u rasponu od 10 – 50 mM, dok su pH 9,5 te koncentracija SDS-a (25 mM) držani stalnima. Rezultati pokazuju da se vrijeme migracije analita, a time i trajanje analize, produžava povećanjem koncentracije pufera. To je posljedica slabijeg EOF-a uslijed smanjena zeta-potencijala u električnom dvosloju na unutrašnjoj površini kapilare. Povećanjem koncentracije borata također dolazi do povišenja struje unutar kapilare. Stoga je odabrana 10 mM koncentracija boratnog pufera jer su pri tim uvjetima pikovi imali najbolji oblik i simetriju, razlučivanje između njih je bilo dobro, struja unutar kapilare niska te vrijeme analize kratko.

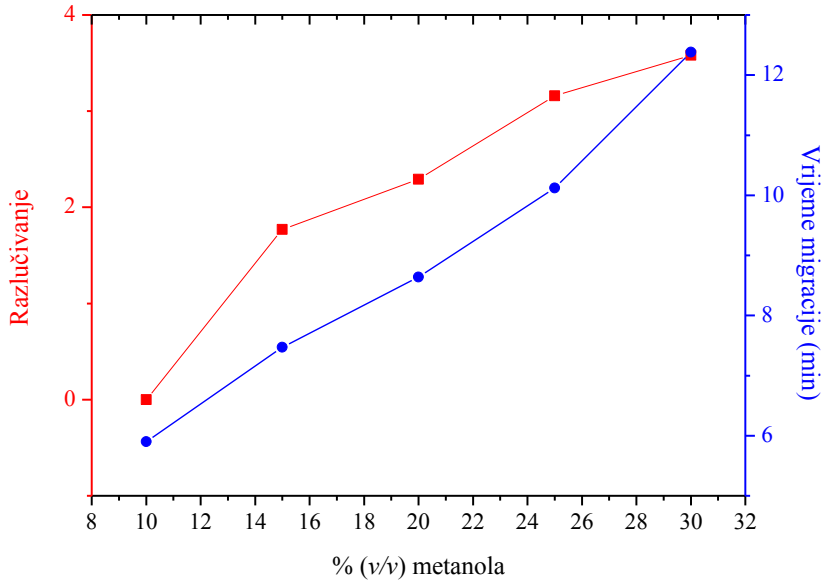
Kako je za analizu neutralnih onečišćenja atorvastatina, laktona atorvastatina i metilnog estera atorvastatina bila nužna micelarna elektrokinetička kromatorografija, odabir vrste i optimizacija koncentracije surfaktanta je ključni korak u razvoju metode. Kao što je već rečeno, SDS je najčešće korišteni surfaktant u kapilarnoj elektroforezi zbog svoje dostupnosti i niske cijene. No SDS također ima dobru ravnotežu između hidrofilnosti i lipofilnosti. Dobro je topljiv u vodi, pa je odličan izbor za vodene medije. Istovremeno je SDS jako lipofilan, pa će se dva neutralna onečišćenja, metilni ester atorvastatina i lakton atorvastatina, snažno vezati za micele SDS-a. Budući da micele SDS-a na vanjskoj površini nose negativni naboj zbog sulfatnih skupina (SO_4^{2-}), negativne su pokretljivosti. Odabirom odgovarajućeg pH i koncentracije radnog pufera (boratni pufer u koncentraciji 10 mM, pH 9,5) osigurani su uvjeti u kojima će negativno nabijene micele nošene snažnim elektroosmotskim tokom ipak eluirati na detektorskom kraju kapilare.

Da bi se postigla istovremena analiza atorvastatina i svih četiriju onečišćenja, desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, laktona atorvastatina i metilnog estera atorvastatina, bilo je iznimno važno odabrati pravu koncentraciju micela SDS-a. Dodatkom surfaktanta i mijenjanjem koncentracije snažno utječemo na selektivnost metode, upravo zbog razlika u konstanti raspodjele analita između micela SDS-a i vodenoga puferskog medija. Povećanjem koncentracije SDS-a razdvajanje analita je učinkovitije, budući da se lipofilniji spojevi (metilni ester atorvastatina i lakton atorvastatina) sve više vežu za micele i kasnije eluiraju, što omogućuje razdvajanje analita. Nedostatak primjene veće koncentracije surfaktanta uzrokuje porast struje unutar kapilare te sve duže migracijsko vrijeme analita, posebno neutralnih spojeva. Stoga je potrebno odabrati optimalnu koncentraciju surfaktanta koja će omogućiti razdvajanje atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, visoku učinkovitost metode i dobro razlučivanje, uz što kraće vrijeme analize. Koncentracija SDS-a ispitana je u rasponu od 15 – 75 mM. Koncentracije iznad 75 mM SDS-a rezultirale su prevelikom strujom u kapilari (> 120 μA). Koncentracije manje od 15 mM nisu isprobane, jer

se približavaju kritičnoj micelarnoj koncentraciji SDS-a i ne omogućuju razdvajanje analita. Najbolji oblik pika negativno nabijenih analita, atorvastatina, desfluoroatorvastatina i dijastereomera atorvastatina dobivao se pri koncentraciji SDS-a od 25 mM. No koncentracija SDS-a od 50 mM je odabrana kao optimalna, jer su pri toj koncentraciji kritični pikovi neutralnih onečišćenja, laktona atorvastatina i metilnog estera atorvastatina, imali najbolji oblik i razlučivanje ($Rs \geq 1,44$). Također, pri toj koncentraciji je šum bazne linije bio najniži (0,1 mAU). To je važno budući da je svrha metode dokazivanje prisutnosti te određivanje količine onečišćenja u tabletama atorvastatina, koja se očekuju u malim količinama. Kako je za granicu dokazivanja i granicu određivanja važan omjer visine signala i šuma, šum bazne linije je svakako još jedan od parametara koji je potrebno uzeti u obzir.

4.2.3 Utjecaj organskog otapala

Iako je dodatak SDS-a bio nužan zbog analize neutralnih analita, samo dodatak surfaktanta u otopinu radnog pufera nije bio dovoljan za uspješno razdvajanje svih analita. Naime, pikovi atorvastatina, dijastereomera atorvastatina i desfluoroatorvastatina nisu bili dobro razdvojeni. Pikovi neutralnih onečišćenja, laktona atorvastatina i metilnog estera atorvastatina, zbog sličnih hidrofobnih interakcija s micelama SDS-a također se nisu mogli uspješno razdvojiti samo primjenom surfaktanta. Stoga je upravo dodatak organskog otapala u prisutnosti micela SDS-a bio ključan korak za razdvajanje atorvastatina i njegovih onečišćenja. Isprobano je nekoliko različitih organskih otapala, metanol, etanol i acetonitril, u različitim koncentracijama, od 0 – 30% (*v/v*). Dodatkom metanola u otopinu pufera dobiveni su pikovi najbolje simetrije i oblika, pa je metanol odabran za daljnju analizu. Dodatak metanola snizio je struju unutar kapilare, što je poželjno jer ne dolazi do Jouelova zagrijavanja. Sprečavanje pretjeranog zagrijavanja unutar kapilare, odnosno temperaturnog gradijenta važno je kako ne bi dolazilo do promjena u viskoznosti radnog pufera između središta i uz stijenke kapilare. Nažalost, dodatak metanola je produžio vrijeme analize mijenjanjem viskoznosti radnog pufera i zeta-potencijala na stijenci kapilare. Kritični parametar bio je razlučivanje između desfluoratorvastatina i atorvastatina. Do poboljšanja razlučivanja između pikova ova dva analita dolazi tek dodatkom metanola u koncentracijama iznad 15% (Slika 15). Iako je najbolje razlučivanje ($Rs = 3,58$) postignuto uz dodatak 30% metanola, vrijeme analize je pri toj koncentraciji organskog otapala bilo predugo (12,38 min). Stoga je, uz kompromis između zadovoljavajućeg razlučivanja i što kraćeg vremena analize, udio metanola od 20% u radnom puferu odabran kao optimalan (Slika 15).



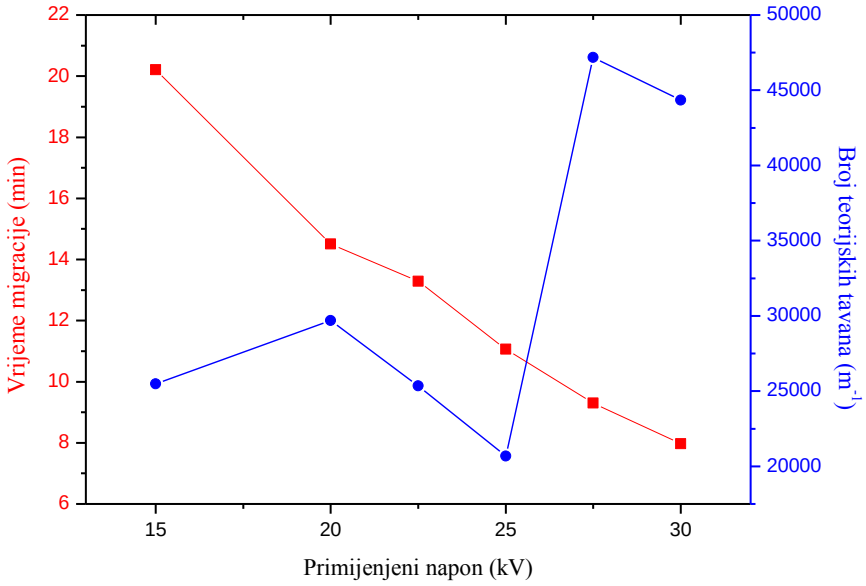
Slika 15. Utjecaj udjela organskog otapala u radnom puferu na vrijeme migracije atorvastatina (•) te na razlučivanje između desfluoroatorvastatina i atorvastatina (▪).
Uvjeti analize: 10 mM boratni pufer pH 9,5, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: 50 µg/mL atorvastatina, 20 µg/mL desfluoroatorvastatina..

4.2.4 Optimizacija primijenjenog napona

Budući da je dodatak SDS-a i metanola produljio trajanje analize, idući parametar koji se ispitivao jest napon. Napon izravno utječe na elektroforetsku pokretljivost analita, a manje na selektivnost metode. Što je jače električno polje, odnosno što je primijenjeni napon veći, vrijeme analize je kraće. Pri tome je uvijek potrebno voditi računa o Jouleovu zagrijavanju, odnosno struji koja se razvija unutar kapilare. Također je potrebno osigurati da se prilikom skraćivanja vremena analize ne izgubi postignuto razlučivanje između pikova analita. Primijenjeni napon se ispitivao u rasponu od 10-30 kV. Ovisnosti vremena migracije atorvastatina te učinkovitosti analize za atorvastatin o primijenjenom naponu prikazane su na Slici 16.

Kao što se može vidjeti na Slici 16, povećanjem primijenjenog napona elektroosmotski tok je veći, što za posljedicu ima kraće vrijeme migracije atorvastatina te uže pikove s većom učinkovitosti. Oblik pikova i razlučivanje je bilo dobro pri najvećem mogućem naponu koji instrument može primijeniti, 30 kV. Naravno, pri toj vrijednosti je trajanje analize ujedno bilo najkraće jer je pri jačem električnom polju veća elektroforetska pokretljivost analita. Zahvaljujući dodanom organskom otapalu i niskoj koncentraciji

boratnog pufera, struja u kapilari pri primijenjenom naponu od 30 kV iznosila je svega 40 µA, pa nije postojala opasnost od Jouelova zagrijavanja. Stoga je na temelju provedenih pokusa za daljnu analizu odabran napon od 30 kV.

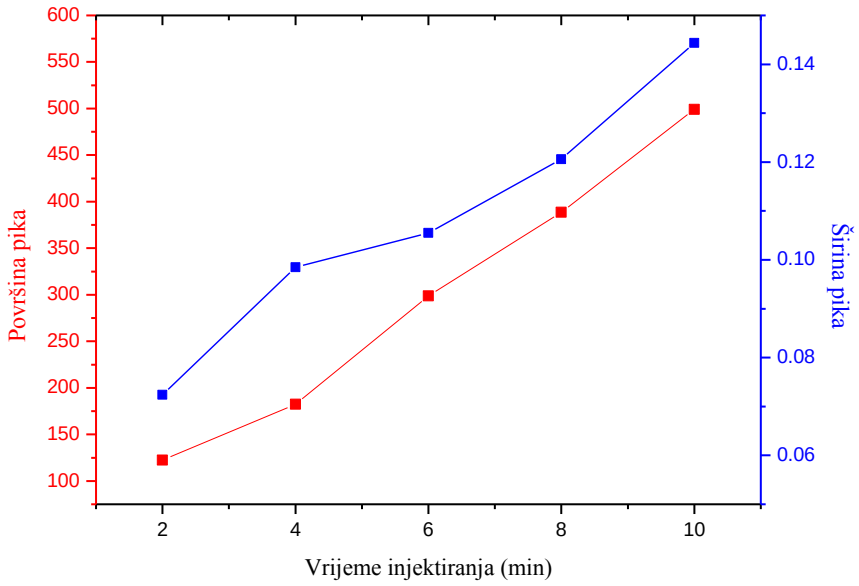


Slika 16. Utjecaj primijenjenog napona na učinkovitost metode (•) i vrijeme migracije (▪) za atorvastatin (50 µg/mL).
Uvjeti analize: 10 mM boratni pufer pH 9,5, 50 mM SDS-a, 20% (v/v) metanol, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4s.

4.2.5 Optimizacija vremena injektiranja

Cilj ove metode bio je istovremeno određivanje atorvastatina u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku te njegovih onečišćenja, koja se očekuju u vrlo malim količinama. Stoga je tijekom razvoja metode bilo potrebno osigurati uvjete koji će omogućiti što niže granice dokazivanja i određivanja onečišćenja. Visina, odnosno površina pika je svakako jedan od čimbenika koji će utjecati na LOD i LOQ. Budući da o vremenu i tlaku pri kojem se vrši hidrodinamičko injektiranje ovisi i količina uzorka koja će se unijeti u kapilaru, ispitana je ovisnost o vremenu injektiranja. Vrijeme injektiranja izravno utječe na širinu i visinu pika, a to ima učinak na razlučivanje, učinkovitost te, u ovom slučaju najvažniji čimbenik, osjetljivost metode. Kako bi se ispitao utjecaj injektiranja, uzorci su hidrodinamički injektirani u vremenu od 2 do 10 sekundi, primjenom tlaka od 50 mbar. Budući da je u daljnjoj analizi površina pika korištena kao parametar iz kojeg se određivala količina prisutnog analita u uzorku, promatrana je ovisnost površine pika o vremenu injektiranja. Kao što se može vidjeti na Slici 17, ovisnost površine pika o vremenu injektiranja je gotovo

linearna. Povećanjem vremena injektiranja povećava se i visina te površina pika, što omogućuje bolju osjetljivost metode. No povećanje vremena injektiranja za posljedicu ima i proširenje pikova (Slika 17), a najveći skok vidljiv je kod vremena injektiranja 6 s. Također, uslijed duljeg vremena injektiranja i migracijsko vrijeme analita je kraće budući da se pri injektiranju veći dio kapilare napuni otopinom uzorka, pa je put do detektora kraći. Sve to za posljedicu ima smanjenu učinkovitost metode te lošije razlučivanje između pikova. Kao kompromis između svih ovih parametara odabrano je vrijeme injektiranja od 4 s, pri kojem je širina pikova, o kojoj ovisi razlučivanje, još uvijek dovoljno dobra, a postignuta je veća visina i površina pikova, o kojima ovisi osjetljivost, odnosno LOD i LOQ metode.



Slika 17. Utjecaj vremena injektiranja na površinu pika (•) i vrijeme migracije (▪) za atorvastatin (50 µg/mL).
Uvjeti analize: 10 mM boratni pufer pH 9,5, 50 mM SDS, 20% (v/v) metanol, 30 kV, 25 °C.

4.2.6 Utjecaj tipa kapilare i valne duljine detektora

Kao što je prethodno navedeno, svrha ove novorazvijene metode jest dokazivanje i određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja u ljekovitom obliku. Budući da se onečišćenja u ljekovitom obliku nalaze u malim količinama, važno je osigurati što veću osjetljivost metode. Osjetljivost je povećana odabirom odgovarajućeg vremena injektiranja, no puno veći učinak na osjetljivost metode imao je odabir odgovarajuće kapilare. Umjesto uobičajeno korištene, unutarnjeg promjera 50 µm, primijenjena je tzv. *bubble cell* kapilara.

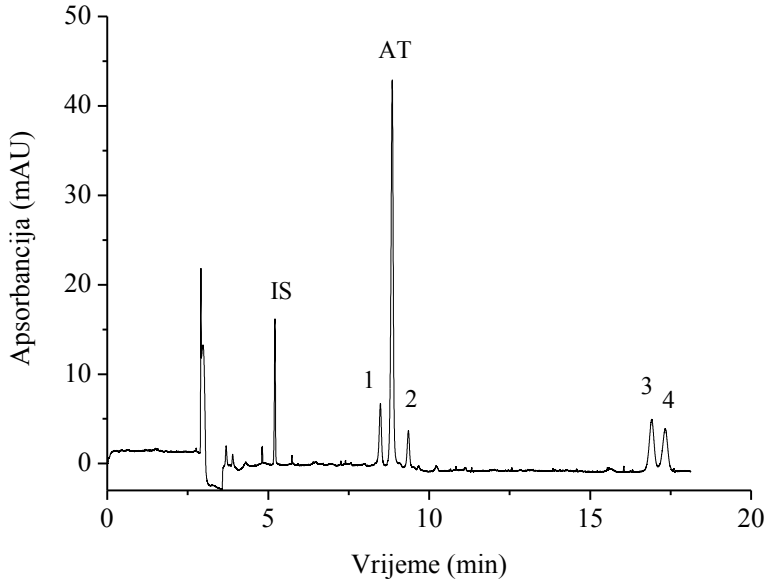
Unutarnji promjer ove kapilare je 50 μm, pa se elektroosmotski tok, odnosno vrijeme analize i razlučivanje, ne mijenja u odnosu na običnu kapilaru. No na mjestu detektora *bubble cell* kapilara ima proširenje, tzv. mjehurić (engl. *Bubble*). Proširenje povećava put prolaska zrake svjetlosti DAD detektora tri puta. Ovime je povećana osjetljivost same metode, što je ključno ako se želi osigurati granica dokazivanja i određivanja onečišćenja prisutnih u količini manjoj od 0,1%.

Odabir valne duljine pri kojoj će se vršiti analiza također je iznimno važan za selektivnost i osjetljivost metode. Iako atorvastatin ima karakterističnu apsorpcijski maksimum pri 244 nm, u metodi je za analizu atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja odabrana valna duljina detektora 214 nm. Pri ovoj valnoj duljini postignuta je veća osjetljivost metode zbog manjeg šuma bazne linije.

4.2.7 Unutarnji standard

U kapilarnoelektroforetskim metodama nepreciznosti su najčešće posljedica injektiranja nanolitarskih količina uzorka u kapilaru i isparavanja organskog otapala dodanog u uzorak. Svrha uvođenja unutarnjeg standarda je eliminacija svih pogreški koje mogu nastati uslijed promjena u volumenu injektiranja, oscilacija napona mreže, razlika u elektroosmotskom toku i svih drugih promjena koje bi mogle utjecati na rezultat analize. Kao unutarnji standard za analizu atorvastatina i njegovih onečišćenja odabran je pravastatin, u obliku natrijeve soli hidroksilne kiseline, zbog svoje kemijske strukture slične atorvastatinu. Nadalje, pKa vrijednost pravastatina je 4,2 (Nigović i Vegar, 2008), dok je pKa atorvastatina vrlo slična i iznosi 4,46 (Miller i sur., 2002). Stoga je korišteni unutarnji standard, pravastatin, u alkalnom mediju (pH 9,5) potpuno ioniziran. Pik pravastatina pri optimiziranim uvjetima analize bio je dobro odvojen od ostalih pikova, simetričan i uzak, te je migrirao prvi, pa time vrijeme analize nije produljeno.

Nakon što su svi uvjeti optimizirani, omogućena je analiza atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, laktona atorvastatina i metilnog estera atorvastatina, unutar samo 18 minuta. (Slika 18).



Slika 18. Elektroferogram smjese standardnih otopina atorvastatina i njegovih onečišćenja, uz dodatak unutarnjeg standarda, pri optimiziranim uvjetima analize.
Uvjeti analize: 10 mM boratni pufer pH 9,5, 50 mM SDS-a, 20% (v/v) metanol, 30 kV, 25 ºC, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Pikovi IS = unutarnji standard, 1 = desfluoroatorvastatin, AT = atorvastatin, 2 = dijastereomer atorvastatina, 3 = lakton atorvastatina, 4 = metilni ester atorvastatina.

4.2.8 Validacija metode

Nakon što su svi uvjeti novorazvijene MEKC metode optimizirani, metoda je validirana koristeći kao radni pufer boratni pufer u koncentraciji 10 mM, pH 9,5, 50 mM SDS-a, 20% (*v/v*) metanol, pri uvjetima mjerenja: napon 30 kV, 25 ºC, valna duljina detektora 214 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

Selektivnost

Kako bi se potvrdila selektivnost metode, provedeno je ispitivanje čistoće pika, a cilj je utvrditi da li se svakom kromatografskom piku može pripisati samo jedan analit. Ovakvo testiranje moguće je primjenom masenog spektrometra, ili detektora s nizom dioda, kakav je korišten u ovoj kapilarnoelektroforetskoj metodi. Provedenim ispitivanjem potvrđena je čistoća pika atorvastatina u otopini komercijalno dostupnoga gotovoga ljekovitog oblika, budući da su UV-spektri na različitim dijelovima kromatografskog pika bili identični. Faktor

čistoće pika atorvastatina određen je primjenom 3DCE/MSD ChemStation programa, a iznosio je 998,8, što upućuje na homogenost kromatografskog pika. Stoga je moguće zaključiti kako je predložena novorazvijena MEKC metoda selektivna.

Linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja

Budući da očekivane količine atorvastatina i njegovih onečišćenja u ljekovitom obliku nisu ni približno istog reda veličine, ispitivano radno područje je bilo različito za atorvastatin i njegova onečišćenja. Linearnost je ispitana injektiranjem serije smjese standardnih otopina atorvastatina, desfluoratorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina te unutarnjeg standarda, pri pet različitih koncentracija. Udio onečišćenja u odnosu na atorvastatin bio je u rasponu od 0,1 do 1,2%. Linearnost za atorvastatin je ispitivana u rasponu od 100,0-1200,0 μg/mL, a za onečišćenja u rasponu od 1,0-12,5 μg/mL. Kalibracijske krivulje dobivene su kao grafička ovisnost korigirane površine pikova o koncentraciji analita. Linearnom regresijom dobije se jednadžba pravca, prema kojoj je kasnije određivan sadržaj atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja u aktivnim farmaceutskim supstancijama i gotovim ljekovitim oblicima. Linearna područja, jednadžbe regresijskih pravaca s pripadajućim koeficijentima korelacije, prikazani su u Tablici 8.

U skladu s ICH smjernicama, granica dokazivanja i granica određivanja za atorvastatin i njegova četiri onečišćenja određene su iz jednadžbi kalibracijskih krivulja, prema izrazu

$$LOD = 3\ \sigma/b$$

odnosno

$$LOQ = 10\ \sigma/b,$$

gdje je σ = standardna devijacija odsječka na osi y, a b = nagib pravca kalibracijske krivulje.

Standardna devijacija odsječka na osi y dobivena je primjenom programa OriginPro 7.5 SRO (OriginLab Corporation, Northmapton, SAD). Dobivene vrijednosti granica dokazivanja i granica određivanja za atorvastatin, desfluoratorvastatin, dijastereomer atorvastatina, metilni ester atorvastatina i lakton atorvastatina prikazane su u Tablici 8.

Tablica 8. Kalibracijski parametri te granice dokazivanja i određivanja

Analit	*Linearno područje (μg/mL)*	*Jednadžba pravca*	*Koeficijent korelacije (r)*	*LOD (μg/mL)*	*LOQ (μg/mL)*
Atorvastatin	100,0-1200,0	y = 2,53 x - 76,81	0,999	18,35	61,00
Desfluoroatorvastatin	2,0-12,5	y = 1,58 x - 0,19	0,999	0,48	1,61
Dijastereomer atorvastatina	2,0-12,0	y = 0,53 x + 1,07	0,999	0,26	0,88
Lakton atorvastatina	1,0-10,0	y = 2,81 x - 0,93	0,999	0,32	1,05
Metilni ester atorvastatina	2,0-10,0	y = 4,26 x - 1,07	0,999	0,59	1,96

Preciznost i točnost

Preciznost metode ispitana je primjenom svježe pripremljenih smjesa atorvastatina koncentracije 1 000 μg/mL i njegovih četiriju onečišćenja, dijastereomera atorvastatina, desfluoratorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina koncentracije 2 μg/mL, uz dodatak unutarnjeg standarda pravastatina koncentracije 100 μg/mL. Određena je ponovljivost (*intra-day* preciznost) i srednja preciznost (*inter-day* preciznost).

Ponovljivost novorazvijene MEKC metode određena uzastopnim injektiranjem (n = 6) tri različite smjese standardnih otopina. Ponovljivost je izražena kao relativno standardno odstupanje korigirane površine pika i korigiranog vremena migracije. Niske RSD vrijednosti vremena migracije (RSD ≤ 0,98%) i površine ispod pika (RSD ≤ 2,87%) ukazuju da je ponovljivost metode prihvatljiva (Tablica 9).

Srednja preciznost predložene metode ispitana je u šest ponavljanja tijekom tri uzastopna dana (n = 18). Svaki dan pripremljene su svježe otopine radnih pufera i smjesa standardnih otopina. Dobivene relativne standardne devijacije za vrijeme migracije (RSD ≤ 1,22%) i površinu ispod pikova (RSD ≤ 3,45%) upućuju na zaključak da je srednja preciznost metode zadovoljavajuća (Tablica 9).

Točnost metode ispitana je analizom smjese otopina standardnih supstancija poznatih koncentracija te usporedbom dobivene i poznate vrijednosti koncentracije smjese standardnih otopina. Slaganje rezultata izraženo je kao analitički prinos koji je za šest mjerenja iznosio 101,0 ± 4,0% (n = 6), pa je moguće zaključiti da je metoda točna.

Tablica 9. Ponovljivost i srednja preciznost vremena migracije i površine pika atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja na koncentracijskoj razini 0,1% (m/m)

Analit	*Ponovljivost (n=6)*				*Srednja preciznost (n=18)*			
	Vrijeme migracije (min)	*RSD (%)*	*Površina pika*	*RSD (%)*	*Vrijeme migracije (min)*	*RSD (%)*	*Površina pika*	*RSD (%)*
Atorvastatin	9,65	0,59	2608,00	1,28	9,53	1,11	2534,00	2,00
Desfluoro-atorvastatin	9,17	0,46	5,72	2,28	9,14	1,19	5,36	3,73
Dijastereomer atorvastatina	10,20	0,62	30,58	2,19	10,05	1,22	31,75	2,66
Lakton atorvastatina	20,49	0,96	12,03	1,53	20,54	1,02	12,96	2,39
Metilni ester atorvastatina	21,00	0,98	8,26	2,87	21,05	1,02	8,21	3,45

Izdržljivost

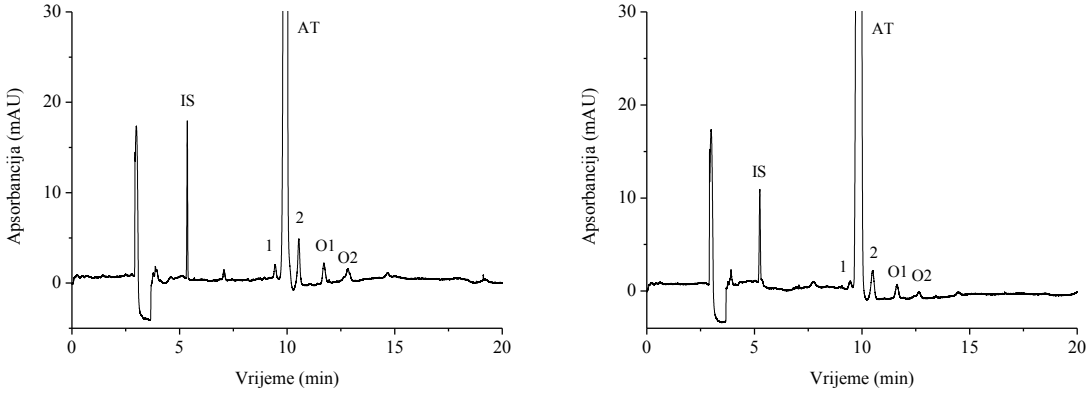
Izdržljivost predložene MEKC metode, ispitivana je promjenom sljedećih parametara: koncentracija pufera (10 ± 1 mM), udio organskog otapala (20 ± 1%), koncentracija surfaktanta (50 ± 1 mM), temperatura (25 ± 1 °C), primijenjeni napon (30 ± 1 kV) i vrijeme injektiranja (4 ± 1 s). Pri tome je korišten tzv. OVAT pristup (engl. *One-variable-at-a-time*), koji podrazumijeva mijenjanje jednog po jednog parametra. U ispitivanju izdržljivosti metode korištena je smjesa atorvastatina koncentracije 1 000 μg/mL i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoratorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina, koncentracije 2 μg/mL, uz dodatak unutarnjeg standarda pravastatina koncentracije 100 μg/mL. Kao ključni čimbenici za promatranje utjecaja izmjene pojedinih parametara na otpornost metode odabrani su razlučivanje između najbliže eluirajućih pikova, desfluoroatorvastatina i atorvastatina te metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina, kao i općenito promjena vremena migracije analita i površine ispod pikova. Vrijeme migracije i površina ispod pikova u ispitivanim uvjetima nisu se značajno razlikovali od vrijednosti dobivenih pri optimiziranim uvjetima (RSD ≤ 1,5%). Veća odstupanja (RSD ≤ 4,7%) zabilježena su kod razlučivanja metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina prilikom promjene koncentracije surfaktanta, što je očekivano, budući da je riječ o dva neutralna analita čije vrijeme migracije te širina pika jako ovise o koncentraciji surfaktanta u radnom

puferu. Također je značajnije odstupanje zabilježeno kod razlučivanja desfluroatorvastatina i atorvastatina prilikom promjene koncentracije organskog otapala. Ovakav rezultat je očekivan budući da je riječ o dva pika koja eluiraju jako blizu te su predstavljala izazov za razdvajanje tijekom razvoja i optimizacije metode. No i pri ovim uvjetima ispitivanja odstupanje razlučivanja između pikova iznosilo je manje od 5,0%, pa se može zaključiti da je metoda izdržljiva.

4.2.9 Primjena novorazvijene metode za analizu aktivne ljekovite supstancije i gotovoga ljekovitog oblika atorvastatina

Prije primjene novorazvijene i validirane MEKC metode za istovremeno određivanje sadržaja atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoratorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku, potrebno je provjeriti njezinu selektivnost i točnost. To se posebice odnosi na gotovi ljekoviti oblik gdje pomoćne tvari mogu interferirati s pikovima analita te utjecati na rezultat analize. Stoga je prvo određen sadržaj atorvastatina u gotovom ljekovitom obliku i aktivnoj farmaceutskoj supstanciji te je izražen analitički prinos uspoređivanjem korigirane površine pika atorvastatina s površinom pika standardne otopine atorvastatina pripremljene u očekivanoj koncentraciji, odnosno u skladu s deklariranim sadržajem. Analitički prinos u ispitivanim uzorcima gotovoga ljekovitog oblika iznosio je 99,8% uz RSD 2,6%, dok je u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji analitički prinos sadržaja atorvastatina iznosio 100,2% ± 2,0%. Može se zaključiti da matriks tablete nema nikakav značajan utjecaj na rezultate analize, odnosno da je točnost metode dobra. Selektivnost metode ispitana je usporedbom elektroferograma dobivenih analizom standardne otopine analita i otopine komercijalno dostupnih ljekovitih oblika koji su sadržavali jednake količine atorvastatina. Nisu uočene nikakve interferencije u ljekovitom obliku niti su pomoćne tvari utjecale na rezultat analize. Prema tome predložena MEKC metoda je prikladna za analizu atorvastatina u ljekovitom obliku, odnosno određivanje sadržaja te procjenu čistoće. Primjeri dobivenih elektroferograma prikazani su na Slici 19. U ovom radu novorazvijenom MEKC metodom određen je sadržaj atorvastatina u prisutnosti njegovih onečišćenja u dvije aktivne farmaceutske supstancije različitih proizvođača, kao i dva gotova ljekovita oblika, komercijalno dostupna na hrvatskom tržištu. Ispitivani uzorci gotovog lijeka sadržavali su atorvastatin u različitim količinama (10 i 20 mg). Istovremeno je provedena procjena čistoće te kvantitativno određivanje četiriju onečišćenja atorvastatina – desfluoroatorvastatina,

dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina, u analiziranim uzorcima. U obje analizirane serije aktivne farmaceutske supstancije te oba uzorka gotovoga ljekovitog oblika uočena su onečišćenja u malim količinama. U aktivnoj farmaceutskoj supstanciji pronađen je dijastereomer atorvastatina u količini manjoj od 0,1% (m/m) te desfluoroatorvastatin u količini 0,2% (m/m). Metilni ester atorvastatina i lakton atorvastatina nisu uočeni. U gotovim ljekovitim oblicima najveće prisutno onečišćenje bio je dijastereomer atorvastatina (0,1%). Također je uočen desfluorotorvastatin u količini nižoj od granice određivanja, dok metilni ester atorvastatina i lakton atorvastatina nisu pronađeni. Na elektroferogramu obje ispitane serije aktivne farmaceutske supstancije moguće je uočiti dodatne pikove, koji po vremenu migracije ne odgovaraju nijednom od četiri poznata onečišćenja. Prvi pik izlazio je u 11,8 minuti, a drugi u 12,8 minuti. Kako bi se ova nepoznata onečišćenja mogla identificirati te predložiti njihova struktura, potrebno je provesti daljnja ispitivanja pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije.



Slika 19. Elektroferogram atorvastatina u (A) aktivnoj ljekovitoj tvari (1 000 μg/mL) i (B) gotovom ljekovitom obliku.
Uvjeti analize: 10 mM boratni pufer pH 9,5, 50 mM SDS-a, 20% (v/v) metanol, 30 kV, 25 ºC, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Pikovi IS = unutarnji standard, 1 = desfluoroatorvastatin, AT = atorvastatin, 2 = dijastereomer atorvastatina, O1 i O2 = nepoznata onečišćenja.

Usporedba novorazvijene MEKC metode s potojećim metodama za analizu atorvastatina i njegovih onečišćenja opisana je u poglavlju 4.3.10.

4.3 RAZVOJ NOVE HPLC-DAD-MS^n METODE ZA ANALIZU ATORVASTATINA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA

S obzirom na očite nedostatke farmakopejske metode te općenito manji broj prikladnih metoda za određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja, razvoj novih analitičkih metoda za analizu atorvastatina, određivanje sadržaja te njegovih onečišćenja u gotovom ljekovitom obliku je iznimno važan.

Novorazvijena MEKC metoda je uspješno primijenjena za simultanu analizu i određivanje atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku. Predloženom metodom pronađena su dva onečišćenja u ispitanim uzorcima, desfluoroatorvastatin i dijastereomer atorvastatina. U nekim uzorcima je količina onečišćenja bila niža od granice određivanja (LOQ = 0,88 μg/mL za dijastereomer atorvastatina i 1,61 μg/mL za desfluoroatorvastatin). Metilni ester atorvastatina i lakton atorvastatina nisu pronađeni u analiziranim uzorcima. No, također su uočeni pikovi nepoznatih onečišćenja (t_1 = 11,8 min i t_2 = 12,8 min), za koje standardi nisu bili dostupni. Stoga se željelo razviti metodu koja bi bila osjetljivija i pomoću koje bi se mogla identificirati nepoznata onečišćenja uočena na elektroferogramu. Maseni detektor ima veću osjetljivost od uobičajeno korištenog detektora s nizom dioda i omogućuje strukturnu karakterizaciju nepoznatih spojeva. Stoga je cilj bio razviti novu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane s masenom spektrometrijom u svrhu određivanja atorvastatina i njegovih poznatih i nepoznatih onečišćenja u ljekovitom obliku. Ovakva vezana tehnika pruža istovremenu dobru separaciju koju pruža HPLC i osjetljivu i specifičnu detekciju analita koju omogućuje maseni spektrometar.

4.3.1 Optimizacija uvjeta HPLC-DAD-MS^n metode

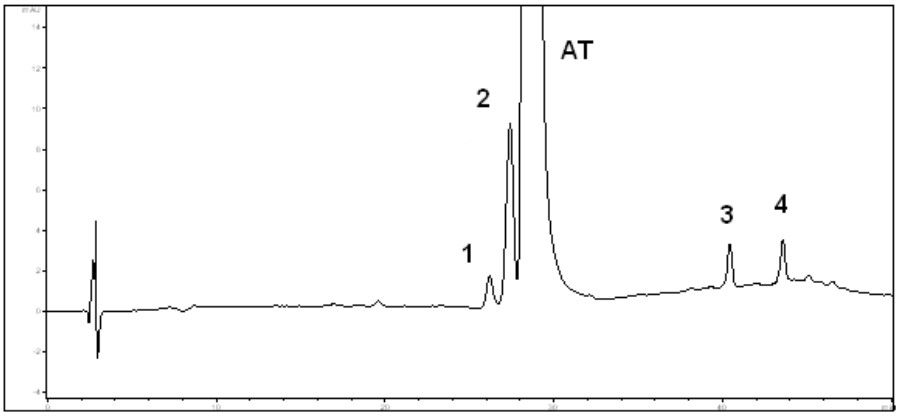
Razdvajanje atorvastatina i njegovih onečišćenja je otežano zbog sličnosti u fizikalno-kemijskim svojstvima i afinitetima za nepokretnu fazu. Odabirom odgovarajuće vrste, sastava i pH pokretne faze moguće je osigurati razdvajanje ispitivanih analita. U ovom radu ispitane su tri kolone: Zorbax SB-C18, dimenzija 250 x 4,6 mm, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka); Hypersil C18, dimenzija 150 x 4,6 mm, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) te Symmetry C18 kolona, dimenzija 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm (Waters, Milford, MA, SAD). Svaka ispitana

kolona imala je drugačiju hidrofobnost, silanolnu aktivnost, hidrolitičku stabilnost i interakciju s analitima, pa su omogućile različitu selektivnost, razlučivanje i vrijeme zadržavanja analita. Preliminarnim ispitivanjem najboljom se pokazala Symmetry C18 kolona, stoga je odabrana za daljnje analize. Budući da je cilj bio razviti HPLC-MS metodu, bilo je potrebno odabrati pokretnu fazu koja sadrži lakohlapljiva otapala i pufere te je prikladna za analizu masenim spektrometrom. Za preliminarna ispitivanja koristio se amonijačni pufer i acetonitril u različitim omjerima. Odabir pH pokretne faze ključan je kod HPLC analize jer utječe na stupanj ionizacije analita, a time i na njihovo razdjeljenje između pokretne i nepokretne faze, odnosno na razdvajanje analita i vrijeme analize. Statini općenito podliježu laktonizaciji i/ili hidrolizi u jako kiselim, odnosno jako bazičnim uvjetima. Kearney i suradnici (1993) su ispitivali utjecaj pH na interkonverziju laktonskog i β-hidroksi kiselinskog oblika atorvastatina u puferskim otopinama. Hidroliza laktonskog oblika, odnosno laktonizacija farmakološki aktivnoga β-hidroksi kiselinskog oblika je smanjena ako se koristi pH pufera u rasponu 4-6. Atorvastatin i njegova dva onečišćenja, desfluoroatorvastatin i dijastereomer atorvastatina su kiseline, pa je njihovo vrijeme zadržavanja i uspješno razdvajanje izrazito ovisno o pH pokretne faze. p*Ka* vrijednost atorvastatina iznosi 4,5 (Miller i sur., 2002), pa će karboksilna skupina atorvastatina i njegovih dvaju onečišćenja u β-hidroksi kiselinskom obliku pri pH 4 biti ionizirana otprilike 25%. Pri pH vrijednostima pokretne faze iznad 4,0, vrijednosti vremena zadržavanja atorvastatina, desfluoroatorvastatina i dijastereomer atorvastatina su očekivano bile kraće. No, uz kraće vrijeme zadržavanja pikovi nisu bili razdvojeni, a i oblik te simetrija pika su bili značajno lošiji. Stoga je na temelju preliminarnih pokusa za daljnju analizu odabran pufer amonijeva formijata pH 4.

Uspješno razdvajanje između strukturno sličnih atorvastatina i njegova dijastereomera pokazalo se kritičnim parametrom tijekom razvoja metode. Kako bi se razlučivanje povećalo, ispitao se utjecaj nekoliko mobilnih faza različitog sastava, s udjelom organskog otapala od 60% do 40% u odnosu na pufer. No izokratnom eluacijom se nije uspjelo postići zadovoljavajuće razdvajanje, uz prihvatljivo vrijeme analize i dobar oblik pikova. Stoga je ispitana gradijentna eluacija. Koristila se pokretna faza sljedećeg sastava: eluent A sastojao se od amonijačnog pufera u koncentraciji 10 mM, pH 4,0 i acetonitrila (60:40, v/v), dok je eluent B bio acetonitril. Gradijentnom metodom osigurano je dobro razlučivanje između kritičnih analita, dijastereomera atorvastatina i atorvastatina. Također je postignuto kraće vrijeme zadržavanja za lipofilnije neutralne analite, lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina. Najbolje razlučivanje uz najkraće vrijeme analize dobiveno je uz sljedeći gradijentni program: tijekom 18 min od 0% do 12% eluenta B, do 28 min eluacija ide pri stalnim uvjetima 12%

eluenta B, slijedi daljnje povećanje udjela eluenta B do 30% tijekom 17 min, a potom se kroz 5 min udio eluenta B vraća na 0%. Sustav je uravnotežen ispiranjem s početnim sastavom pokretne faze tijekom 5 min.

Nakon što je odabrana vrsta i pH pokretne faze te gradijentni tip eluacije, ispitao se utjecaj temperature kolone na vrijeme zadržavanja analita i razlučivanje između desfluoroatorvastatina i dijastereomera atorvastatina te dijastereomera atorvastatina i atorvastatina, kao kritičnih parametara separacije. Utjecaj temperature kolone ispitan je u rasponu od 25 °C do 50 °C. Povišenje temperature je smanjilo vrijeme zadržavanja analita, odnosno skratilo vrijeme analize. No pri 50 °C je razvlačenje pikova bilo nešto veće, pa je razlučivanje bilo lošije. Stoga je za daljnju analizu odabrana temperatura kolone od 45°C jer je pri toj temperaturi vrijeme zadržavanja analita bilo kraće, a oblik pikova dobar, što je poboljšalo razlučivanje između kritičnih sastavnica smjese.



Slika 20. UV/Vis kromatogram smjese standarda: (1) desfluoroatorvastatin, (2) dijastereomer atorvastatina, (AT) atorvastatin, (3) lakton atorvastatina, (4) metilni ester atorvastatina.

Nakon što su HPLC uvjeti optimizirani, bilo je potrebno povezati razdvajanje postignuto na HPLC koloni s masenim spektrometrom. Protok pokretne faze 1,0 mL/min se ne može dovesti na elektrosprej-ionizator. Najveći dopušteni protok pokretne faze iznosi 0,5 mL/min, a ovisi o njezinu sastavu, pa je ponekad nužan i manji protok. Kod vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije moguće je koristiti *split mode*, odnosno unijeti u maseni spektrometar samo dio pokretne faze. Na taj način se i kod velikih protoka pokretne faze kroz tekućinski kromatograf na maseni spektrometar dovodi samo manji dio pokretne faze. No ovime bi se značajno izgubilo na osjetljivosti metode. Kako je cilj metode bio određivanje onečišćenja atorvastatina, koja se u aktivnoj ljekovitoj supstanciji i gotovom

ljekovitom obliku očekuju u malim količinama, osjetljivost metode bio je ključan parametar tijekom njezina razvoja. Kako bi se osigurala osjetljivost metode, odlučeno je u maseni spektrometar donijeti cjelokupnu pokretnu fazu. Stoga je protok pokretne faze s 1,0 mL/min smanjen na 0,5 mL/min. Ovo je, naravno, produljilo vrijeme analize, ali je osjetljivost metode zadržana.

Kako bi se osigurale što niže granice dokazivanja i određivanja onečišćenja atorvastatina, bolje razlučivanje te informativni maseni spektri, bilo je potrebno optimizirati uvjete elektrosprej-ionizatora i MS analizatora. Uvjeti su ispitivani direktnim injektiranjem smjese standarda atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja. Ovisno o sastavu i brzini protoka pokretne faze te vrsti i količini uzorka, odabiru se optimalni uvjeti elektrosprej-ionizatora. Naime, uz odgovarajuće uvjete brzine protoka i tlaka plina za sušenje i raspršivanje te odgovarajući napon na kapilari i temperaturu izvora iona plina, postiže se optimalna brzina isparavanja pokretne faze, što povećava učinkovitost ionizacije analize, a time i osjetljivost metode. Brzina protoka dušika kao plina za sušenje ispitana je u rasponu od 3 – 15 L/min, tlak dušika kao plina za raspršivanje pokretne faze u rasponu 5 – 20 psi. Najveći intenzitet signala molekulskih iona dobiven je pri brzini protoka dušika 10,0 L/min i tlaku 35,0 psi. Napon na kapilari ključan je parametar kod elektrosprej-ionizacije jer utječe na uklanjanje kapljica otapala i naboj iona analita te stupanj fragmentacije, što je posebno važno kod nepoznatih onečišćenja, gdje se na temelju dobivenih fragmentacijskih iona nastoji predložiti struktura spoja. Najboljim se pokazao napon na kapilari 3,5 kV te temperatura izvora iona 350 °C. Kao plin za fragmentaciju korišten je helij, pri čemu je energija kolizije držana na 30%.

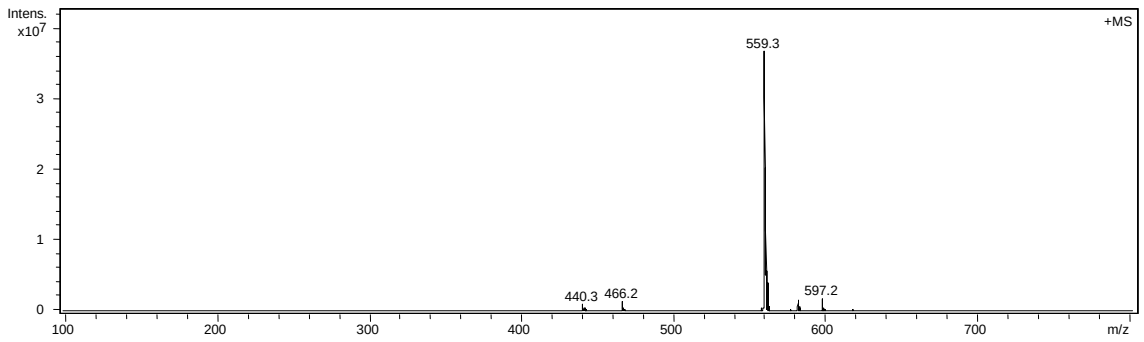
Nakon toga optimizirani su uvjeti analizatora stupice za ione. Ispitano je vrijeme zadržavanja iona u analizatoru u rasponu od 100 – 300 ms te broj iona zadržanih u analizatoru u rasponu 8 000 – 100 000. Odabirom odgovarajućeg broja iona i vremena zadržavanja u analizatoru također se utječe na intenzitet signala. Za daljnju analizu odabrano je vrijeme zadržavanja iona 200 ms te broj iona od 80 000. Raspon spektara sniman je od 100 – 800 *m/z*.

4.3.2 ESI-MS^n analiza atorvastatina

Analizom aktivnih farmaceutskih supstancija i gotovih ljekovitih oblika kapilarnoelektroforetskom metodom dobiveni su elektroferogrami na kojima su vidljivi pikovi nepoznatih tvari, odnosno onečišćenja koja nisu odgovarala nijednoj od korištenih standardnih supstancija. Stoga je cilj HPLC-MS metode bio pomoću masene spektrometrije dobiti uvid u

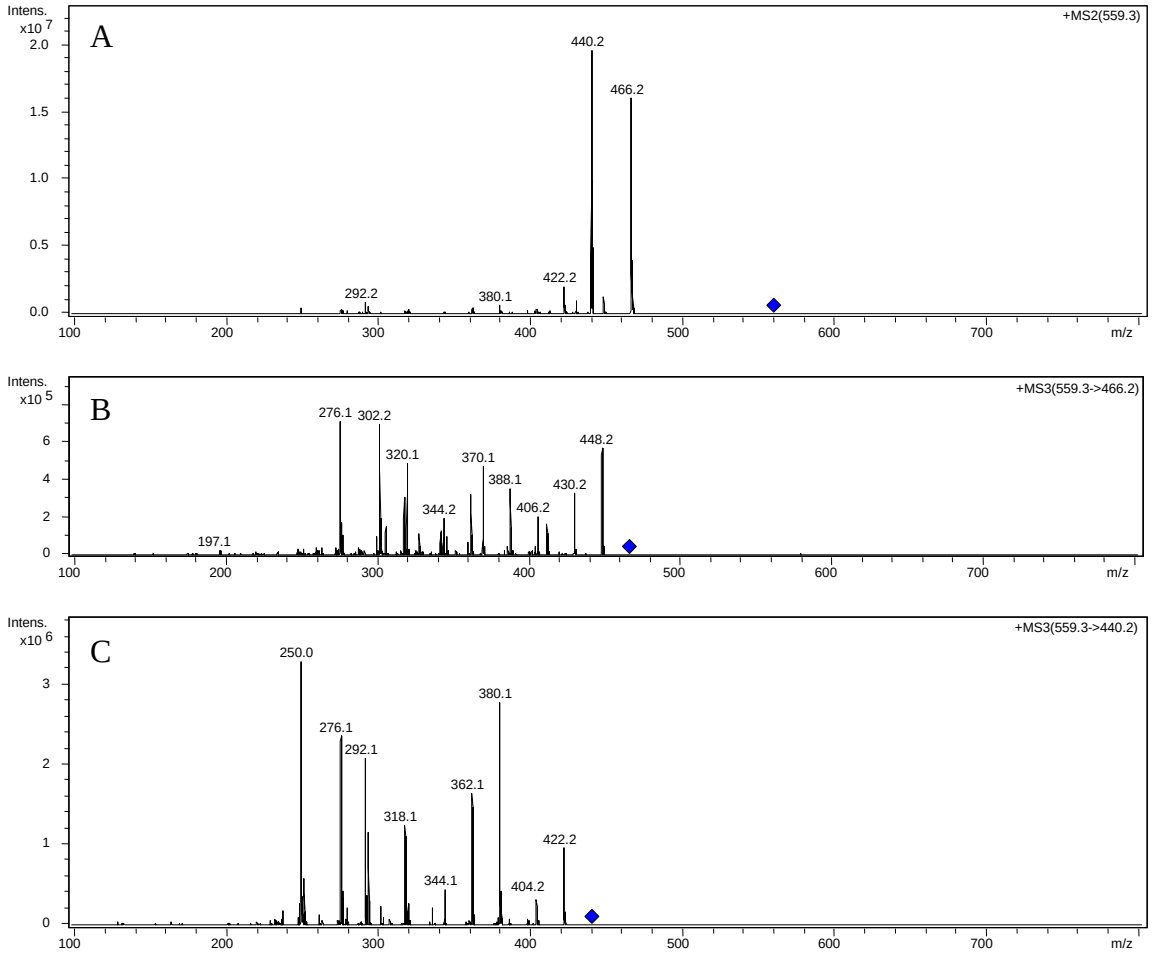
strukturu nepoznatih tvari. Kako bi se na temelju masenih spektara mogla predložiti struktura nepoznatih onečišćenja, potrebno je prethodno provesti detaljnu analizu atorvastatina i poznatih onečišćenja masenim spektrometrom. Iz dobivenih masenih spektara moguće je predložiti fragmentacijske putove za poznate spojeve. Na temelju njih moguće je potom, prateći slične fragmentacijske mehanizme, provesti strukturnu karakterizaciju nepoznatih onečišćenja, odnosno pretpostaviti njihovu strukturu i identificirati ih.

Najprije se optimiziranom HPLC-ESI-MS^n metodom analizirao atorvastatin. Molekulski ion atorvastatina dobivao se i u pozitivnom i u negativnom načinu snimanja, ali je intenzivniji signal dobiven u pozitivnom načinu elektrosprej-ionizacije. Dobivanje pozitivno nabijenoga $[M+H]^+$ molekulskog iona je očekivano, budući da atorvastatin u strukturi ima dva atoma dušika koja se mogu protonirati. Na Slici 21. prikazan je MS spektar atorvastatina. Vidljiv je molekulski ion pri *m/z* 559 te aduktor s kalijem pri *m/z* 597, kao i dva manja fragmentna iona pri *m/z* 440 i 466.



Slika 21. MS spektar atorvastatina.

ESI-MS^2 spektar molekulskog iona atorvastatina pri *m/z* 559 prikazan je na Slici 22. Vidljiva su dva dominantna fragmentna iona pri *m/z* 466 i 440 te manji ioni pri *m/z* 422, 380 i 292. Dakle, dva glavna fragmentna iona dobivena fragmentacijom protoniranoga molekulskog iona su identična kao i na ESI-MS spektru atorvastatina. Očito je ovakva fragmentacija dominantni proces. Ioni *m/z* 466 i 440 dobiveni su pucanjem veze s obiju strana karbonilne skupine na fenilaminokarbonilnom lancu, odvajanjem fenilamino ($Ph\text{-}NH_2$), odnosno fenilaminokarbonilnog (Ph-N=C=O) dijela molekule.

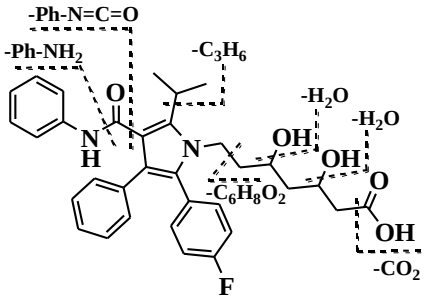


Slika 22. ESI-MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 559 atorvastatina (A) te ESI-MS^3 spektri fragmentnih iona *m/z* 559 → 466 (B) i *m/z* 559 → 440 (C) atorvastatina.

Na Slici 22 prikazani su ESI-MS^3 spektri glavnih fragmentnih iona atorvastatina pri *m/z* 466 i 440. Fragmentni ioni omogućuju detaljnu strukturnu karakterizaciju i pružaju uvid u fragmentacijsku shemu atorvastatina. Kako bi se dobio što detaljniji i kvalitetniji uvid u fragmentaciju atorvastatina, provedena je i ESI-MS^4 analiza, tako što je za početni ion odabran jedan od glavnih fragmenata vidljiv na MS spektru atorvastatina, a ne sami molekulski ion. Na ovaj način se izbjegava jedan potrebni korak fragmentacije, odnosno može se postići i ESI-MS^4 ili čak ESI-MS^5 analiza spoja. Ovime su dobiveni još detaljniji ESI-MS^n spektri pojedinih fragmenata na temelju kojih se moglo predložiti fragmentacijsku shemu atorvastatina (Slika 23), a kasnije i njegovih poznatih i nepoznatih onečišćenja. Fragmentacijom iona pri *m/z* 466 dobiveni su produktni ioni *m/z* 448, 430, 406, 388, 370, 362, 344, 320, 302 i 276. Dobiveni ioni, produkti fragmentacije, slažu se s prethodno objavljenom studijom fragmentacije atorvastatina (Miao i Metcalfe, 2003). Ion pri *m/z* 448 produkt je gubitka molekule vode, a zatim može uslijediti ili daljnja dehidratacija, pri čemu nastaje

fragmentni ion *m/z* 430, ili eliminacija C_3H_6 dijela molekule, odnosno izopropilnog lanca na pirolskom prstenu uz formiranje iona *m/z* 406. Proces dehidratacije je dominantan i kod drugoga glavnog fragmenta, iona *m/z* 440, jer se njegovom MS^3 fragmentacijom dobivaju ioni pri *m/z* 422 i 404 koji nastaju gubitkom molekule vode iz strukture. Pucanjem veze između atoma C6 i C7 na karboksilnom lancu odvaja se veliki fragment $C_6H_8O_2$ te nastaje produktni fragmentni ion pri *m/z* 292. I ovim fragmentacijskim putem slijedi zatim neutralni gubitak izopropilnog lanca C_3H_6 te nastaje ion pri *m/z* 276. Nakon što se MS^3 fragmentacijom protoniranoga molekulskog iona *m/z* 559 → 440 izgubila molekula vode iz strukture i dobio ion pri *m/z* 422, može prvo uslijediti gubitak izopropilnog lanca (C_3H_6), pa nastaje dominantni fragmentni ion *m/z* 380. Iz fragmentnog iona *m/z* 404, dobivenoga gubitkom dvije molekule vode, fragmentacija također može ići drugim putem. Odnosno, umjesto da dolazi do pucanja veze na bočnom karboksilnom lancu, može prvo uslijediti gubitak izopropilnog lanca na pirolskom prstenu (*m/z* 362), nakon čega dolazi do dekarboksilacije na samom kraju karboksilnog lanca, što za produkt daje ion *m/z* 318.

Shah i suradnici su u svom istraživanju fragmentacije atorvastatina dobili nešto drugačije fragmentne ione (Shah i sur., 2008). Dapače, oni u svom radu predlažu čak četiri moguća fragmentacijska puta atorvastatina. Prvi započinje gubitkom fenilamino skupine, drugi gubitkom fenilaminokarbonilne skupine, treći gubitkom molekule vode, a četvrti gubitkom karboksilnog lanca. Na temelju fragmentnih iona dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti da se u ovom radu odvijaju dva fragmentacijska puta, identična onima koje su predložili Shah i suradnici: onaj koji započinje gubitkom fenilamino skupine, odnosno fenilaminokarbonilne skupine. Ova razlika u dobivenim fragmentnim ionima, a time i predloženim fragmentacijskim shemama, vjerojatno proizlazi iz činjenice da su Shah i suradnici u svom istraživanju koristili kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku kao izvor iona analiziranih masenom spektrometrijom. Budući da je APCI drugačiji tip ionizacije od elektrosprej-ionizacije korištene u ovom istraživanju, razlike u dobivenim fragmentnim ionima, odnosno u mehanizmima fragmentacije atorvastatina nisu neočekivane.

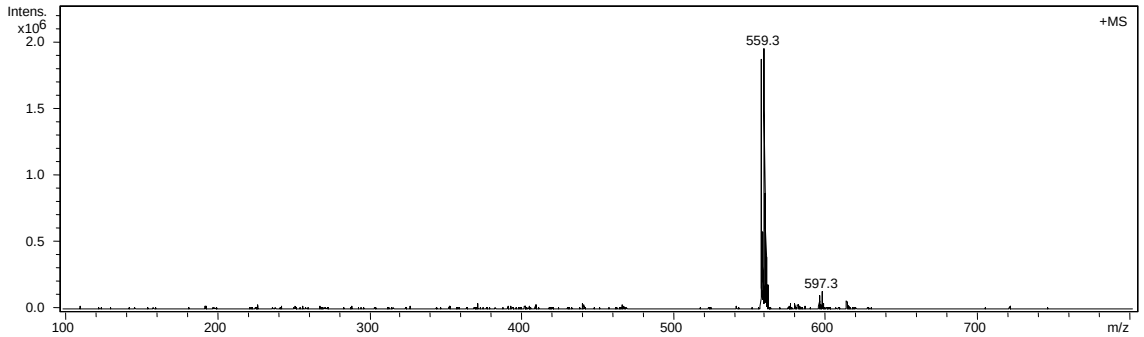


Slika 23. Shematski prikaz fragmentacije atorvastatina.

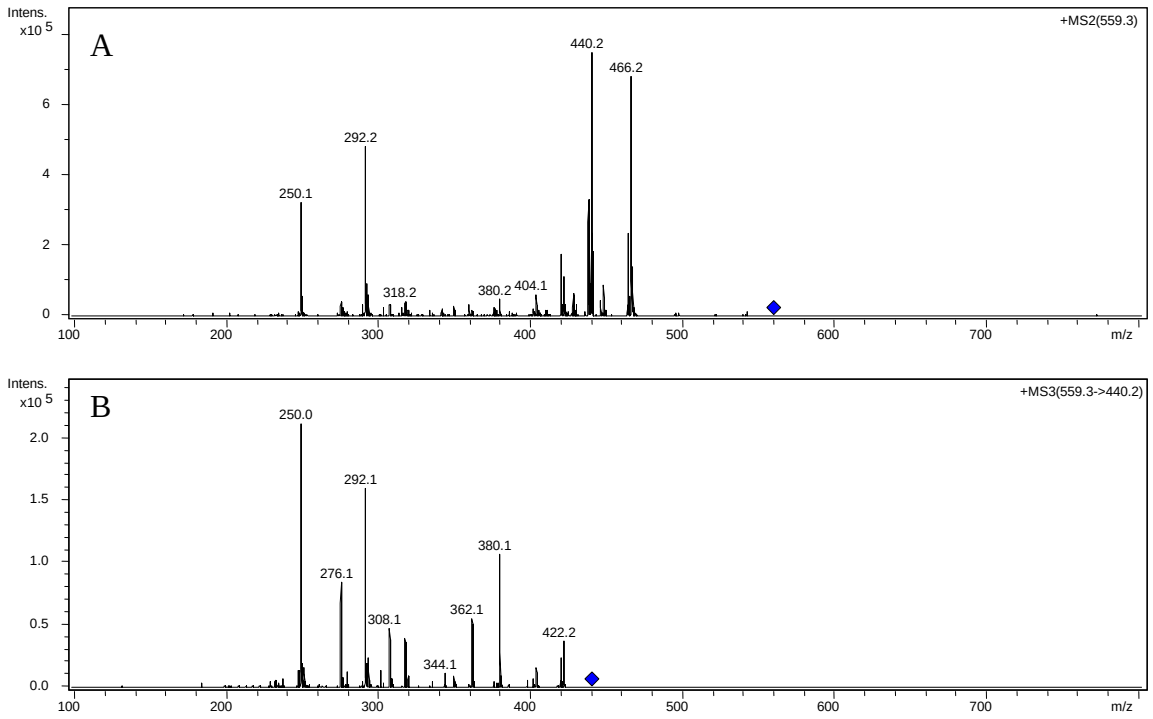
Nakon što je provedena detaljna karakterizacija fragmentacijskog mehanizma atorvastatina, proučena je fragmentacija njegovih četiriju onečišćenja. Desfluoroatorvastatin, dijastereomer atorvastatin, lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina su također dali intenzivnije signale molekulskih iona u pozitivnom načinu elektrosprej-ionizacije. Kod svih ispitanih analita glavni fragmentni ioni nastajali su neutralnim gubitkom fenilamino, odnosno fenilaminokarbonilne skupine iz strukture.

4.3.3 ESI-MS^n analiza dijastereomera atorvastatina

Dijastereomer atorvastatina se od atorvastatina razlikuje samo po konfiguraciji hidroksilne skupine na C5 atomu bočnog lanca. Prema tome, MS^2 i MS^3 analizom ovog onečišćenja dobiveni su identični karakteristični fragmentni ioni kao i fragmentacijom atorvastatina. Na Slici 24 i 25 prikazani su dobiveni MS te ESI-MS^2 i ESI-MS^3 spektri dijastereomera atorvastatina.



Slika 24. MS spektar dijastereomera atorvastatina.



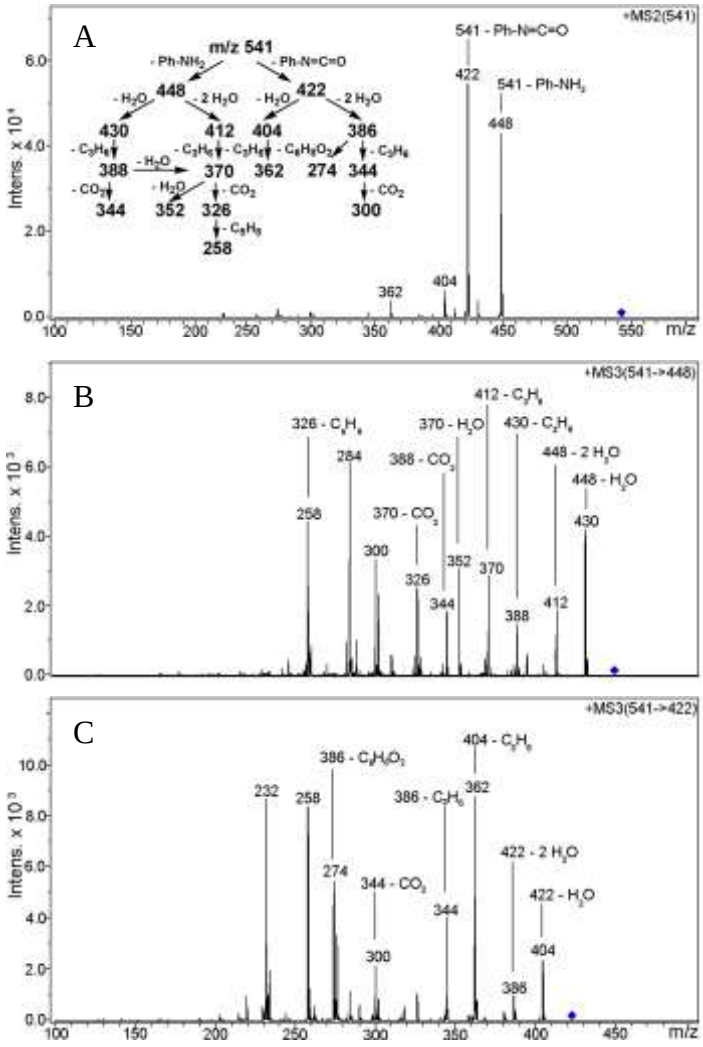
Slika 25. ESI-MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 559 dijastereomera atorvastatina (A) i ESI-MS^3 spektar fragmentnog iona *m/z* 559 → 440 dijastereomera atorvastatina (B).

4.3.4 ESI-MS^n analiza desfluoroatorvastatina

Sljedeći korak bilo je istraživanje fragmentacije desfluoroatorvastatina, a dobiveni MS, MS^2 i MS^3 spektri prikazani su na Slici 26. Vidljivo je da desfluoroatorvastatin daje dominatni molekulski ion pri *m/z* 541. Aduktori s amonijem (*m/z* 557) i kalijem (*m/z* 579) su također vidljivi na MS spektru. MS^2 analizom molekulskog iona dobivena su dva velika fragmentna iona pri *m/z* 448 i 422. Fragment *m/z* 448 nastaje cijepanjem fenilamino skupine, dok fragment *m/z* 422 nastaje odvajanjem fenilaminokarbonilne skupine uz dvostruku protonaciju. Dakle, ovo je isti mehanizam fragmentacije kao i kod atorvastatina. MS^3 analizom fragmentnog iona *m/z* 448 dobiven je dominantni fragmentni ion *m/z* 430, koji nastaje dehidratacijom, odnosno eliminacijom hidroksilne skupine na bočnom karboksilnom lancu vezanom na pirolski prsten. Fragmentni ion *m/z* 388 dobiva se eliminacijom izopropilnog lanca (C_3H_6, 42 Da) s pirolskog prstena, nakon čega slijedi gubitak CO_2 skupine na bočnom lancu, pri čemu se formira ion *m/z* 344. Iz dominantnoga fragmentnog iona *m/z* 448 može uslijediti i drugačiji fragmentni put, pa se prvo formira produktni ion *m/z* 412 koji nastaje gubitkom obje hidroksilne skupine s bočnog lanca, odnosno gubitkom dvije molekule vode. Nakon toga slijedi odvajanje izopropilnog lanca, pri čemu nastaje fragmentni ion *m/z* 370. Iz dobivenog iona može uslijediti eliminacija još jedne molekule vode i formiranje iona

m/z 352 ili može uslijediti dekarboksilacija (*m/z* 326) te zatim gubitak fenilnog prstena na pirolskom prstenu, pri čemu se dobiva fragmentni ion *m/z* 258.

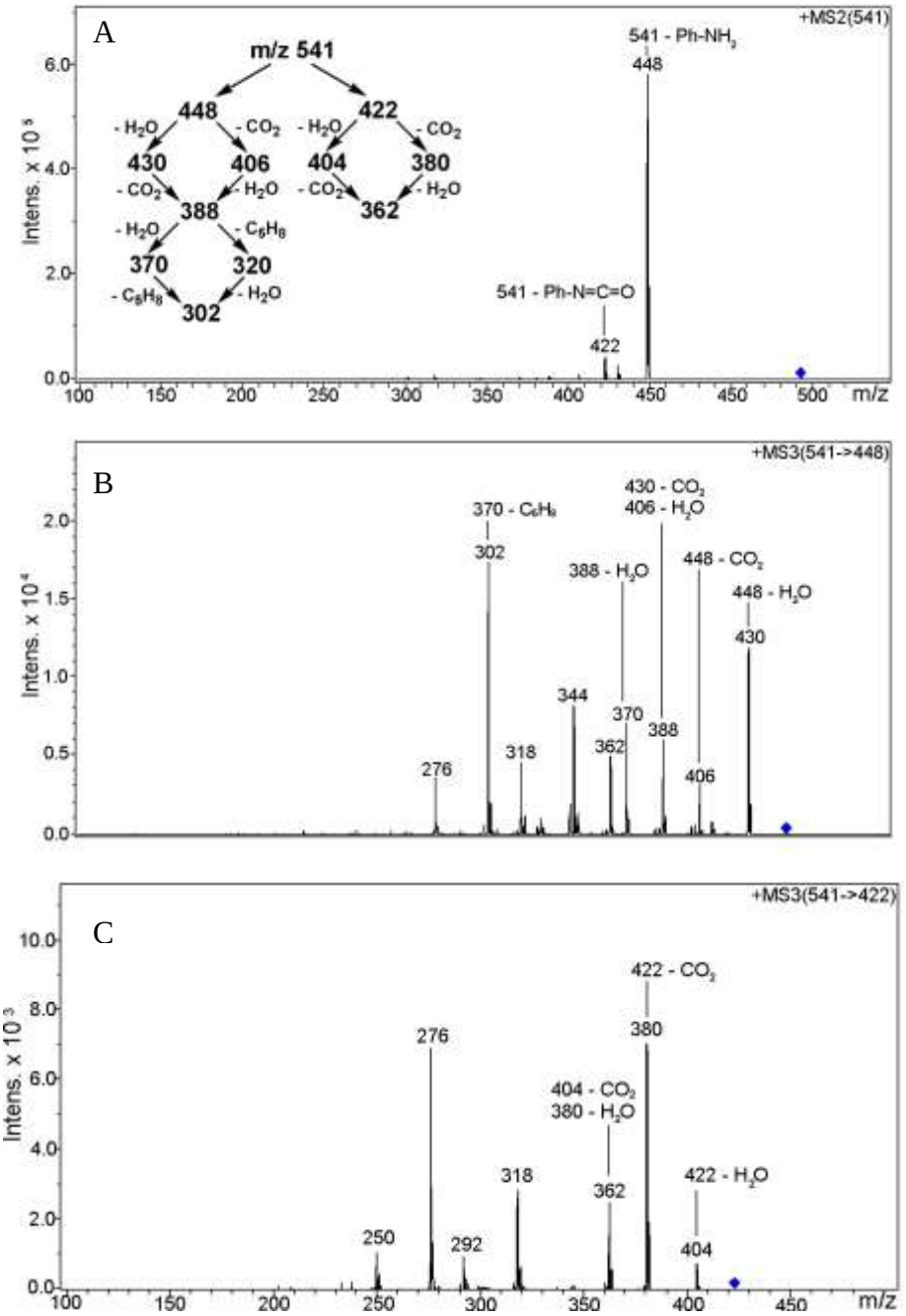
MS^3 analizom fragmentnog iona *m/z* 422 dobiveni su fragmentni ioni pri *m/z* 404 i 386, koji nastaju dehidratacijom, odnosno eliminacijom jedne, a zatim i druge hidroksilne skupine na bočnom karboksilnom lancu vezanom na pirolski prsten. Iz fragmentnog iona *m/z* 404 dobiva se produktni ion *m/z* 362 eliminacijom ostatka bočnog lanca, tj. pucanjem veze između C6 i C7 i odvajanjem fragmenta $C_6H_8O_2$ (112 Da). Iz fragmentnog iona *m/z* 386, osim odvajanja cijeloga bočnog lanca, može uslijediti i gubitak izopropilnog lanca na pirolskom prstenu te formiranje produktnog iona *m/z* 344, nakon čega slijedi dekarboksilacija, pri čemu nastaje fragmentni ion *m/z* 300. MS, MS^2 i MS^3 spektri desfluoroatorvastatina te predložena shema fragmentacije prikazana je na Slici 26.



Slika 26. ESI-MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 541 desfluoroatorvastatina (A), ESI-MS^3 spektri fragmentnih iona *m/z* 541 → 448 (B) i *m/z* 541 → 422 (C) desfluoroatorvastatina te predložena fragmentacijska shema.

4.3.5 ESI-MS^n analiza laktona atorvastatina

MS analizom laktona atorvastatina dobiven je protonirani molekulski ion pri *m/z* 541, dakle isti kao i kod desfluoroatorvastatina. Također su vidljivi i aduktori s natrijem (*m/z* 563) i kalijem (*m/z* 579) (Slika 27). Budući da je korištena vezana tehnika tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom, iz različitih vremena zadržavanja (tr = 25,1 min za desfluoroatorvastatin, odnosno 42 min za lakton atorvastatina) na kromatografskoj koloni moglo se zaključiti da je riječ o dva spoja drugačije lipofilnosti, odnosno kemijske strukture. No čak je ESI-MS^2 spektar ukazivao na isti mehanizam fragmentacije kao kod desfluoroatorvastatina i laktona atorvastatina. Naime, na Slici 27. prikazan je ESI-MS^2 spektar laktona atorvastatina gdje su vidljivi glavni fragmentni ioni *m/z* 448 i 422, kao i kod desfluoroatorvastatina (Slika 26). Dva glavna fragmentna iona očito se dobivaju istim fragmentacijskim mehanizmom, neutralnim gubitkom fenilamino i fenilaminokarbonilne skupine. ESI-MS^3 analiza je ipak pokazala drugačije fragmentne ione laktona atorvastatina i desfluoroatorvastatina. Na Slici 27. prikazan je i ESI-MS^3 spektar molekulskog iona *m/z* 541 → 448 laktona atorvastatina gdje su vidljivi produktni ioni *m/z* 430, 406, 388, 370, 302 i 276. Fragmentni ion *m/z* 430 dobiva se nakon neutralnoga gubitka molekule vode iz iona *m/z* 448, i to iz laktonskog prstena spoja. Zatim slijedi dekarboksilacija, pri čemu nastaje fragment *m/z* 388. Ovaj produktni ion moguće je dobiti iz glavnoga fragmentnog ion *m/z* 448 tako da prvo uslijedi dekarboksilacija, pri čemu nastaju fragmentni ioni *m/z* 406, a zatim dolazi do neutralnoga gubitka molekule vode, uz formiranje iona *m/z* 388. Bez obzira na to je li se prvo zbila dekarboksilacija ili izdvajanje molekule vode, iz fragmentnog iona *m/z* 388 slijedi izdvajanje još jedne molekule vode uz formiranje iona *m/z* 370, da bi zatim uslijedilo cijepanje bočnog lanca i izdvajanje fragmenta C_5H_8 (68 Da), pri čemu nastaje fragmentni ion *m/z* 302. Fragmentni ion *m/z* 276 nastaje istovremenim pucanjem fenilaminokarbonilnog dijela molekule te bočnog lanca s laktonskim prstenom iz molekulskog iona laktona atorvastatina. Iz glavnoga fragmentnog iona *m/z* 422 ponovno slijedi karakteristični fragmentacijski uslijed dekarboksilacije (*m/z* 380), a zatim gubitka molekule vode (*m/z* 362), odnosno prvotnim izdvajanjem molekule vode (*m/z* 404), nakon čega slijedi dekarboksilacija, uz stvaranje zajedničkoga produktnog iona *m/z* 362 (Slika 27). Ostali fragmentacijski ioni vidljivi na ESI-MS^3 spektrima ne mogu se objasniti i prikazati pojednostavljenim fragmentacijskim shemama jer najvjerojatnije uključuju molekularno pregrađivanje.

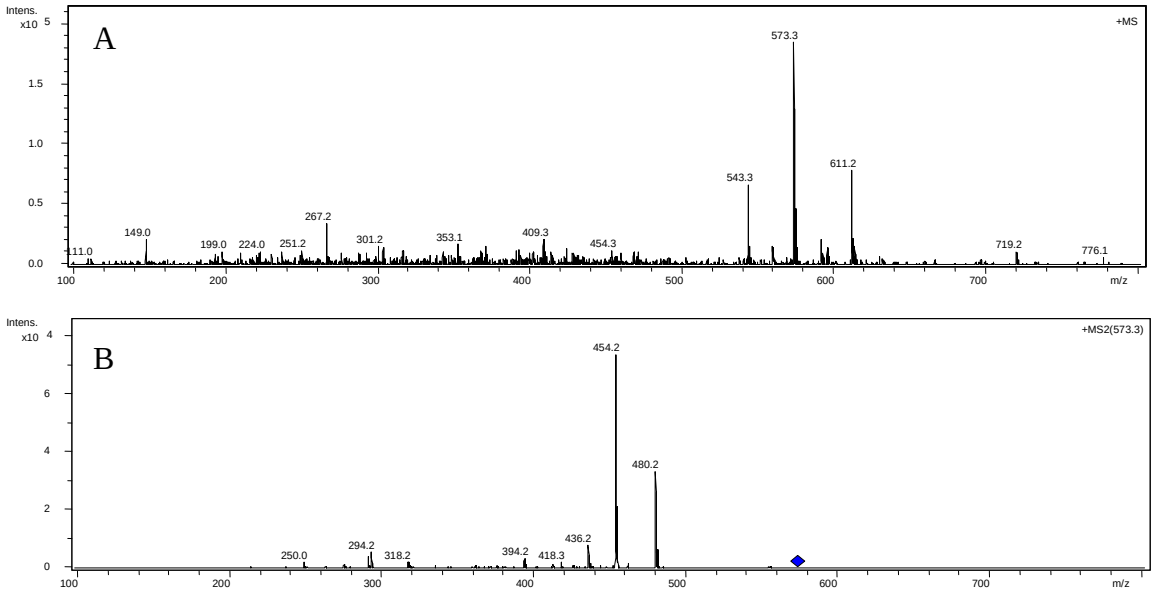


Slika 27. ESI-MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 541 laktona atorvastatina (A), ESI-MS^3 spektri fragmentnih iona *m/z* 541 → 448 (B) i *m/z* 541 → 422 (C) desfluoroatorvastatina te predložena fragmentacijska shema.

4.3.6 ESI-MS^n analiza metilnog estera atorvastatina

Posljednje poznato onečišćenje atorvastatina, za koje je u ovom istraživanju na raspolaganju bio standard na temelju kojeg se mogla provesti detaljna ESI-MS^n analiza u svrhu utvrđivanja fragmentacijske sheme, bio je metilni ester atorvastatina. ESI-MS spektar metilnog estera atorvastatina prikazan je na Slici 27, na kojoj je vidljiv molekulski ion

$[M+H]^+$ *m/z* 573 te aduktor s kalijem $[M+K]^+$ pri *m/z* 611. ESI-MS^2 analiza molekulskog iona rezultirala je dvama karakterističnim fragmentima pri *m/z* 480 i 454, koji odgovaraju paralelnom neutralnom gubitku fenilamino i fenilaminokarbonilne skupine (Slika 28). ESI-MS^3 analizom molekulskog iona dobiveni su fragmenti pri *m/z* 462, 430, 388, 320, 302 i 276, odnosno 436, 418, 394, 376, 292 i 250. Ovakvi fragmenti sugeriraju istu fragmentacijsku shemu dobivenu za atorvastatin.



Slika 28. MS spektar metilnog estera atorvastatina (A) i ESI-MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 573 metilnog estera atorvastatina (B).

4.3.7 Validacija metode

Nakon što je razvijena i optimizirana HPLC-DAD-MS^n metoda za analizu atorvastatina i njegovih onečišćenja te nakon što je provedena detaljna analiza fragmentacije standardnih supstancija atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, metodu je prije primjene na uzorcima aktivne ljekovite tvari i tablete potrebno validirati. Validacijom se potvrđuje prikladnost metode, u ovom slučaju za određivanje sadržaja atorvastatina u aktivnoj ljekovitoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku te dokazivanje onečišćenja i određivanje sadržaja desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, laktona atorvastatina i metilnog estera atorvastatina.

Prije početka određivanja značajki validacije, ispitan je utjecaj primjene unutarnjeg standarda, rosuvastatina, kao spoja s relativno sličnom strukturom i fizikalno-kemijskim parametrima, koji bi se ponašao slično u korištenim uvjetima analize. Primjenom unutarnjeg

standarda nastojalo se poboljšati preciznost i točnost metode tijekom određivanja parametara validacije, odnosno tijekom primjene metode na ispitivanim uzorcima. No primjenom unutarnjeg standarda nisu dobiveni značajno bolji rezultati, pa on nije korišten tijekom validacije metode i kvantifikacije djelatne tvari atorvastatina i njegovih onečišćenja u ispitivanim uzorcima aktivne ljekovite supstancije i gotovih ljekovitih oblika. Validacijski parametri određivani su primjenom oba korištena detektora, DAD i MS.

Linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja

Kod DAD detektora je prilikom određivanja linearnosti kalibracijska krivulja dobivena kao ovisnost površine pika o koncentraciji odgovarajuće standardne supstancije. Prilikom validacije i kvantifikacije koristio se DAD detektor pri valnoj duljini 246 nm. Maseni spektrometar je uveden kako bi se upravo pomoću njega osigurala bolja selektivnost i osjetljivost metode. Za kvantitativnu analizu koristio se maseni spektrometar u tzv. MRM načinu rada (engl. *Multiple reaction monitoring*) koji omogućuje praćenje višestrukih reakcija. U njemu je istovremeno moguće za deset iona provoditi SRM (engl. *Selected reaction monitorin*g) način snimanja MS spektara, odnosno moguće je tijekom jedne analize izolirati do deset iona određene *m/z* vrijednosti, a potom ih je moguće i fragmentirati. Kako bi se postigla bolja osjetljivost i selektivnost metode, kvantifikacija je provedena na najintenzivnijem fragmentnom ionu analita, pa je za desfluoroatorvastatin praćen fragmentni ion 541 → 422, dijastereomer atorvastatina 559 → 440, lakton atorvastatina 541 → 448, metilni ester atorvastatina 573 → 454, a za atorvastatin 559 → 440. Odabir najintenzivnijeg prijelaza, odnosno fragmentnog iona koji se dobiva primjenom odgovarajuće energije kolizije, ključan je kod određivanja sadržaja onečišćenja u lijekovima, koja se očekuju u iznimno malim količinama. I kod MS detektora je kalibracijska krivulja metode dobivena korelacijom površine pika najintenzivnijega fragmentnog iona naspram koncentracije analita.

Linearnost metode za atorvastatin ispitana je u rasponu od 10 – 1500 μg/mL, dok je za njegova četiri onečišćenja linearnost ispitivana u području od 0,01 – 10,0 μg/mL. Matične standardne otopine atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja razrjeđivane su dodatkom smjese acetonitril:voda (50:50, *v/v*) neposredno prije mjerenja, a čuvane su u autoinjektoru pri 4 °C. Za izradu svake kalibracijske krivulje korišteno je barem pet koncentracijskih razina. Za određivanje koncentracije atorvastatina, djelatne tvari u ispitivanim aktivnim ljekovitim susptancijama i gotovim ljekovitim oblicima, šire linearno područje u odabranom koncentracijskom rasponu pokazao je DAD detektor. DAD detektor je bio linearan u rasponu

od 100 – 1200 μg/mL, a jednadžba pravca kalibracijske krivulje glasila je y = 22,31x + 148,1, uz koeficijent korelacije r = 0,9995. Budući da je količina atorvastatina u ispitivanim uzorcima značajno veća u odnosu na onečišćenja, osjetljivost metode za određivanje sadržaja atorvastatina nije bila upitna, pa je u daljnjim analizama DAD detektor korišten za kvantifikaciju atorvastatina. Naravno, MS detektor je imao daleko bolju osjetljivost te niže LOD i LOQ vrijednosti nego DAD detektor, pa su ranije navedeni fragmentni ioni najvećeg intenziteta korišteni za kvantifikaciju onečišćenja atorvastatina. Dobiveni rasponi linearnog područja i jednadžbe kalibracijskih krivulja s pripadajućim koeficijentima korelacije prikazani su u Tablici 10. Vidljivo je da su svi koeficijenti korelacije visoki ($r \geq 0,9995$), što ukazuje na zadovoljavajuću linearnost metode. LOD i LOQ vrijednosti određene su kao koncentracija pri kojoj je omjer visine signala i šuma iznosio 3, odnosno 10 (Tablica 10).

Tablica 10. Kalibracijski parametri te granice dokazivanja i određivanja onečišćenja atorvastatina HPLC-DAD-MS^n metodom

Analit	*Linearno područje (μg/mL)*	*Jednadžba pravca*	*Koeficijent korelacije (r)*	*LOD (ng/mL)*	*LOQ (ng/mL)*
Desfluoro-atorvastatin	0,1 – 4,0	y = 1,040 x – 0,072	0,9994	9,8	21,5
Dijastereomer atorvastatina	0,1 – 10,0	y = 0,971 x – 0,041	0,9990	9,7	49,4
Lakton atorvastatina	0,1 – 4,0	y = 1,541 x – 0,240	0,9990	50,0	70,8
Metilni ester atorvastatina	0,05 – 4,0	y = 2,081 x – 0,162	0,9993	28,5	37,7

Preciznost i točnost

Kako bi se provjerilo da predložena HPLC-DAD-MSn metoda daje točne i ponovljive rezultate, ispitane su njezina točnost i preciznost.

Preciznost metode ispitana je na razini ponovljivosti i na razini srednje preciznosti, injektiranjem smjese standardnih otopina atorvastatina (1000 μg/mL) i njegovih četiriju onečišćenja (1 μg/mL). Ponovljivost metode provedena je uzastopnim injektiranjem (n = 5) tri različite smjese standardnih otopina. Rezultati su iskazani kao relativna standardna devijacija odstupanja površine pika (RSD < 0,36%) i vremena zadržavanja (RSD < 0,18%). Srednja

preciznost određivala se tijekom tri uzastopna dana, pri čemu je svakog dana korištena svježe pripremljena smjesa standardnih otopina, koja je injektirana pet puta. RSD vrijednosti odstupanja vremena zadržavanja atorvastatina i njegovih onečišćenja bile su manje od 0,79%, dok je za odstupanje površine pika RSD bio manji od 2,39%. Ove niske RSD vrijednosti odstupanja vremena zadržavanja i površine pika upućuju na zaključak da je metoda precizna.

Točnost metode određena je analizom standardnih otopina onečišćenja poznate koncentracije na tri koncentracijske razine unutar linearnog raspona metode (0,5, 1 i 2 μg/mL) te usporedbom dobivenih i poznatih vrijednosti koncentracije. Analitički prinosi su za dijastereomer atorvastatina, desfluoroatorvastatin, lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina iznosili redom 103,27 ± 4,05%, 101,56 ± 2,39%, 102,33 ± 4,12% i 99,83 ± 2,86% (n = 5). Na temelju dobivenih vrijednosti moguće je zaključiti da je točnost predložene metode zadovoljavajuća.

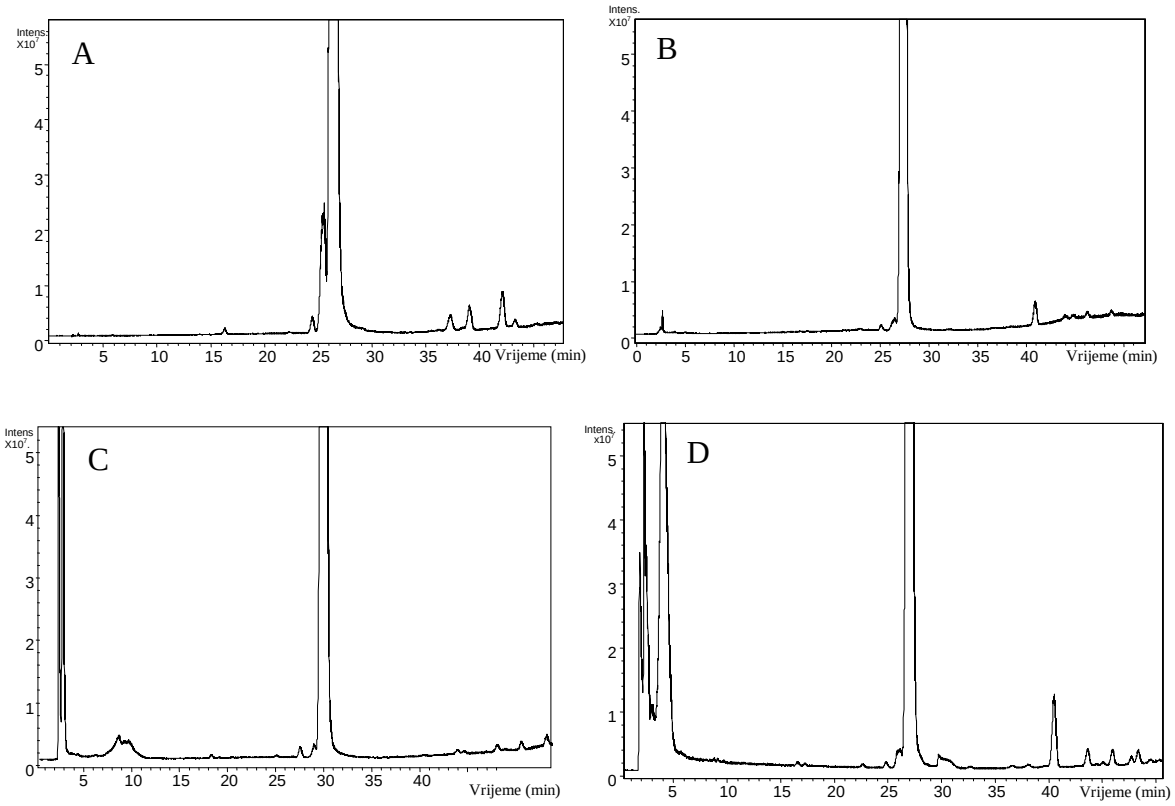
Stabilnost

Stabilnost analita ispitala se korištenjem standardnih otopina atorvastatina (1 mg/mL) i njegovih onečišćenja (0,1 mg/mL). Promatrao se utjecaj temperature i vremena na stabilnost ispitivanih analita. Kratkoročna stabilnost (*short-term*) ispitivala se pri sobnoj temperaturi tijekom šest sati, kako bi se osigurala stabilnost analita tijekom jednoga radnog dana. Također je provjerena stabilnost uzoraka u autoinjektoru pri 4 °C tijekom 24 sata. Dugoročna stabilnost uzoraka ispitala se nakon dva tjedna čuvanja u hladnjaku pri 4 °C. Stabilnost je izražena analitičkim prinosom, a izračunata kao omjer koncentracije analita prilikom prvog mjerenja i koncentracije analita nakon drugog mjerenja. Otopine su se pokazale stabilnima tijekom jednoga radnog dana, čuvane i na sobnoj temperaturi i u autoinjektoru pri 4 °C. Nakon čuvanja u hladnjaku na 4 °C dva tjedna, površine pikova razlikovale su se manje od 1,2%, što pokazuje da su analizirane standardne otopine bile stabilne tijekom dva tjedna.

4.3.8 Primjena novorazvijene metode za analizu aktivne ljekovite supstancije i gotovoga ljekovitog oblika atorvastatina

Nakon što je HPLC-DAD-MS^n metoda razvijena, optimizirana i validirana, primijenjena je za razdvajanje sastavnica i istovremeno određivanje sadržaja djelatne tvari atorvastatina te njegovih onečišćenja u dvije različite aktivne ljekovite supstancije i dva gotova ljekovita oblika različitih proizvođača. Onečišćenja su određivana u koncentracijskom

rasponu 0,01 – 1,0% u odnosu na glavnu djelatnu tvar atorvastatin. Dokazivanje je provedeno uspoređivanjem vremena zadržavanja analita na kromatografskoj koloni pri optimiziranim uvjetima analize. Potvrda identiteta osigurana je primjenom masene spektrometrije, gdje je dobivena točna molekulska masa analita, a pomoću ESI-MS^n fragmentacije provedena je strukturna karakterizacija prisutnih onečišćenja, što je pružilo dodatni korak sigurnosti u utvrđivanju identiteta spoja. Dobiveni kromatogrami ukupne struje iona (engl. *Total ion current chromatogram,* TIC) analiziranih uzoraka prikazani su Slici 29.



Slika 29. TIC kromatogrami aktivnih ljekovitih tvari (1 000 µg/mL), Uzorak 1 (A) i Uzorak 2 (B) te gotovih ljekovitih oblika atorvastatina, Uzorak 1 (C) i Uzorak 2 (D).

Određivanje sadržaja atorvastatina provedeno je uvrštavanjem površine pika u jednadžbu pravca, dobivenu pri izradi kalibracijske krivulje za DAD detektor, y = 22,31 x + 148,1. Određeni sadržaj odgovara deklariranoj vrijednosti atorvastatina u ispitivanim aktivnim ljekovitim supstancijama, gdje je analitički prinos iznosio 99,2 ± 0,1%, dok je u gotovim ljekovitim oblicima analitički prinos iznosio 102,6 ± 0,3%.

Kvantifikacija pojedinog onečišćenja provedena je korištenjem dobivenih jednadžbi pravaca kalibracijskih krivulja (Tablica 11). Dobivena površina pika najintenzivnijega fragmentnog iona (za desfluoroatorvastatin 541 → 422, dijastereomer atorvastatina 559 →

440, lakton atorvastatina 541 → 448, metilni ester atorvastatina 573 → 454) uvrštena je u jednadžbu pravca te je izračunata odgovarajuća koncentracija. Pronađena i kvantificirana onečišćenja u ispitivanim uzorcima prikazana su u Tablici 11.

Tablica 11. Kvantitativna analiza onečišćenja atorvastatina u aktivnoj ljekovitoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku

Analit		*API 1*[a]	*API 2*[a]	*Tableta 1*[b]	*Tableta 2*[b]
desfluoroatorvastatin	w/w (%)	0,04	0,02	0,05	0,02
	konc. (μg/mL)	0,41	0,22	0,5	0,17
	RSD (%)	2,18	1,12	3,64	1,57
dijastereomer atorvastatina	w/w (%)	0,89	0,21	0,13	0,26
	konc. (μg/mL)	8,86	2,11	1,29	2,6
	RSD (%)	2,95	3,91	4,78	4,87
lakton atorvastatina	w/w (%)	0,1	0,07	0,01	0,12
	konc. (μg/mL)	0,97	0,65	0,05	1,21
	RSD (%)	1,8	3,21	4,17	4,38
metilni ester atorvastatina	w/w (%)	0,09	0,08	-	-
	konc. (μg/mL)	0,89	0,77	-	-
	RSD (%)	1,39	2,26	-	-

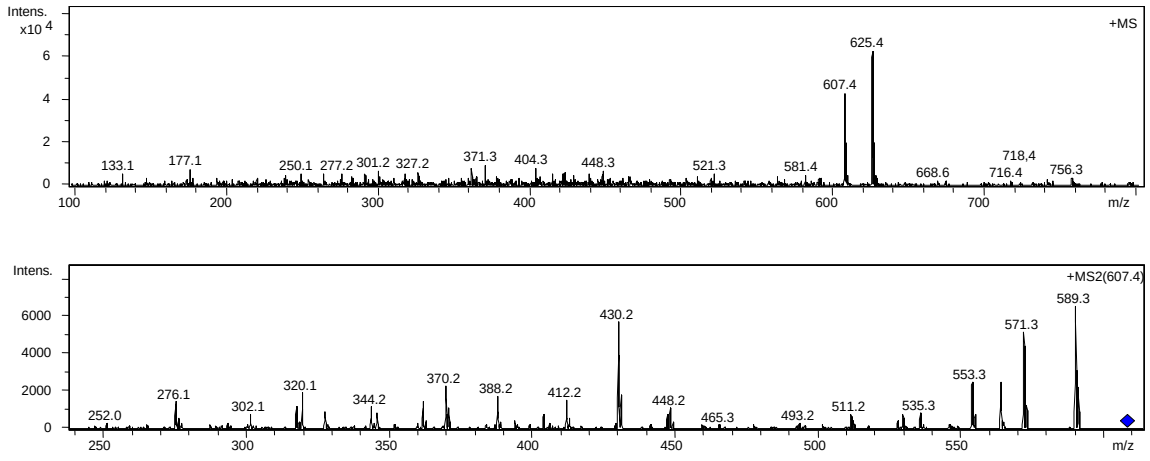
[a] API – aktivna ljekovita supstancija
[b] Tableta – gotovi ljekoviti oblik

Iz Tablice 11. je vidljivo da su u obje analizirane aktivne ljekovite supstancije pronađena sva četiri onečišćenja atorvastatina, desfluoroatorvastatin, dijastereomer atorvastatina, lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina. Provedeno ispitivanje pokazalo je da analizirani uzorci aktivne ljekovite supstancije sadrže dijastereomer atorvastatina kao glavno i najveće onečišćenje (0,89% i 0,21%, odnosno 8,86 μg/mL i 2,11 μg/mL). Lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina pronađeni su u približno sličnim koncentracijama, dok je u analiziranim aktivnim ljekovitim supstancijama najmanje bilo desfluoroatorvastatina. U oba ispitivana gotova ljekovita oblika najveće prisutno onečišćenje također je bio dijastereomer atrovastatina (0,13% i 0,26%, odnosno 1,29 μg/mL i 2,90 μg/mL). U gotovim ljekovitim oblicima pronađen je i desfluoroatorvastatin te laktona atorvastatina, dok metilni ester atorvastatina nije pronađen ni u jednom analiziranom gotovom ljekovitom obliku.

4.3.9 Identifikacija ostalih prisutnih onečišćenja atorvastatina

Na TIC kromatogramima svih analiziranih uzoraka vidljivi su i drugi pikovi koji po vremenu zadržavanja ne odgovaraju nijednom od određivanih onečišćenja, a označeni su brojevima 1-8 na Slici 29. Kako bi se utvrdio identitet ovih dodatnih prisutnih onečišćenja, provedena je opsežna ESI-MS^n analiza. Na temelju dobivenih fragmenata vidljivih na ESI-MS, ESI-MS^2, ESI-MS^3, pa čak i ESI-MS^4 spektrima pokušalo se predložiti strukturu prisutnih onečišćenja. U tome je uvelike korištena fragmentacijska shema dobivena za atorvastatin te desfluoroatorvastatin, dijastereomer atorvastatina, lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina, jer je moguće pretpostaviti da su onečišćenja atorvastatina relativno slične kemijske strukture, pa će imati i slične fragmentacijske putove.

Na TIC kromatogramima oba API-ja i oba ljekovita oblika vidljivo je nepoznato **Onečišćenje 1**, značajno kraćeg vremena zadržavanja (16,4 min) u odnosu na atorvastatin i ostala onečišćenja. MS spektar ovog pika pokazuje molekulski ion $[M+H]^+$ pri *m/z* 718, a vidljiv je i aduktor s kalijem $[M+K]^+$ pri *m/z* 756 (Slika 30). Najintenzivniji signal daje ion pri *m/z* 625, a dominantan je i fragmentni ion pri *m/z* 607. Ovaj očito predominantan učinak, jer se fragmentni ioni vide kao najintenzivniji signali već i na MS spektru, posljedica je eliminacije fenilamino skupine (92 Da), što se uočilo i u prethodno provedenom ispitivanju fragmentacije atorvastatina te njegovih onečišćenja, gdje je upravo gubitak fenilamino skupine bio prvi fragmentacijski korak. Fragmentni ion *m/z* 607 dobiva se eliminacijom molekule vode (18 Da) iz iona *m/z* 625.

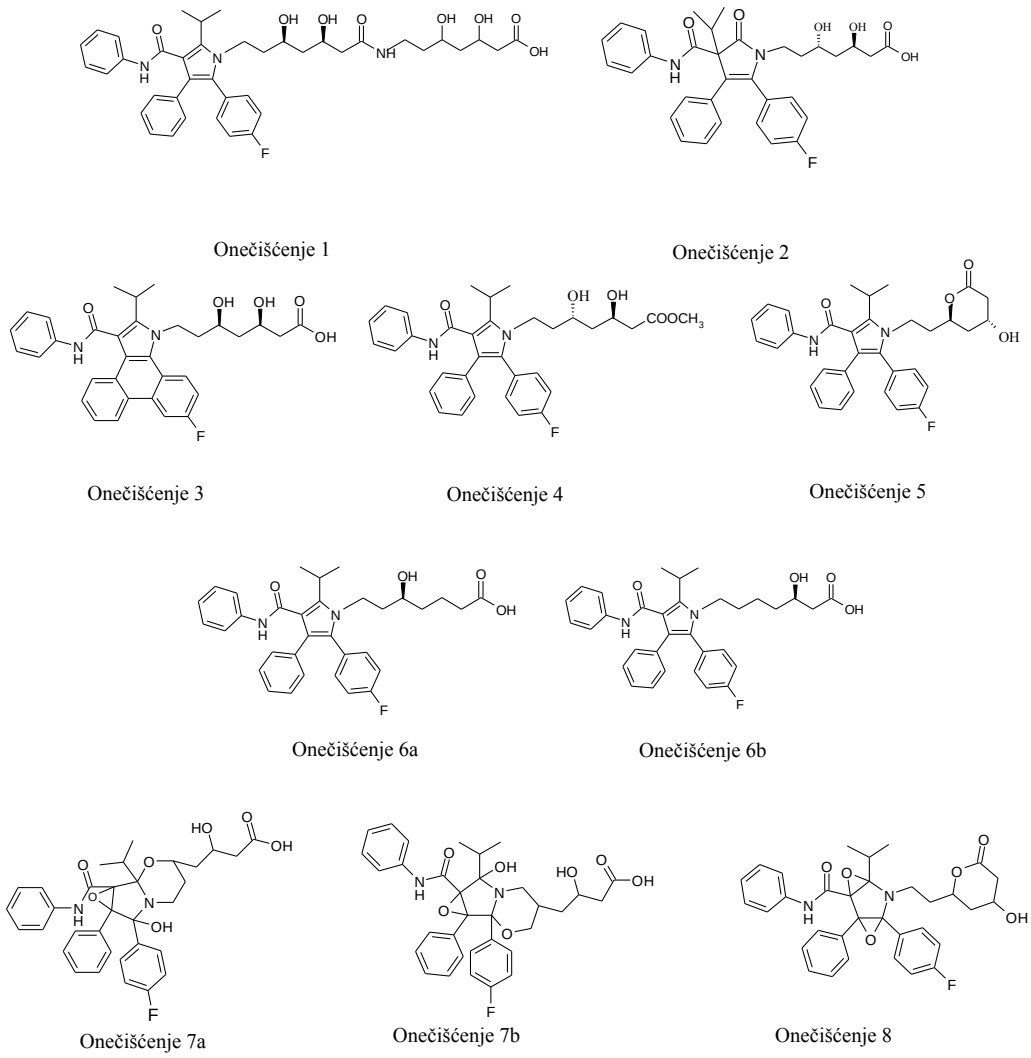


Slika 30. MS spektar Onečišćenja 1 i ESI-MS^2 spektar njegovog molekulskog iona *m/z* 607.

Slika 30 prikazuje MS^2 spektar iona *m/z* 607, vidljivog već na MS spektru nepoznatog Onečišćenja 1. Budući da je već i ion *m/z* 607 fragment molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 718, zapravo je riječ o MS^3 spektru, koji je otkrio niz fragmentnih iona: *m/z* 589, 571 i 553.

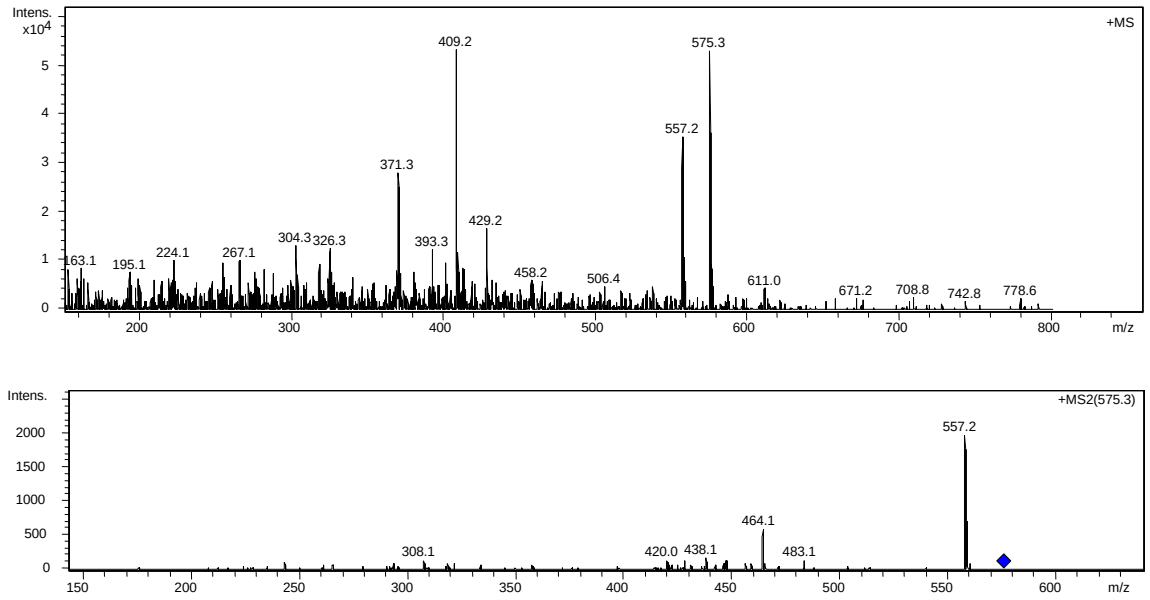
Dobiveni fragmentni ioni odgovaraju uzastopnim eliminacijama hidroksilne skupine iz strukture, odnosno gubitku mase od 18 Da. Najintenzivniji signal na ovom spektru ima fragmentni ion *m/z* 430, koji bi odgovarao gubitku bočnog lanca s amidnom vezom ($C_7O_4H_{11}$, 159 Da) iz fragmenta *m/z* 589.

Na temelju dobivene molekulske mase Onečišćenja 1, fragmentacijske sheme te pregledom literature, pretpostavljeno je da je prvo onečišćenje diaminoatorvastatin (Slika 31). To je potencijalno procesno onečišćenje prisutno u atorvastatinu, koji ima molekulsku masu 717 g/mol. Budući da je riječ o procesnom onečišćenju, iznenađuje činjenica da je Onečišćenje 1, odnosno diaminoatorvastatin, pronađeno u svim analiziranim uzorcima.



Slika 31. Kemijske strukture onečišćenja atorvastatina.
Onečišćenje 1 = diaminoatorvastatin, Onečišćenje 2 = fotolitički okso-produkt atorvastatina, Onečišćenje 3 = fotolitički razgradni produkt atorvastatina, Onečišćenje 4 = dijastereomer metilnog estera atorvastatina, Onečišćenje 5 = dijastereomer laktona atorvastatina, Onečišćenje 6 = deshidroksiatorvastatin, Onečišćenje 7 = oksidativni razgradni produkt atorvastatina, Onečišćenje 8 = diepoksid lakton atorvastatina.

Onečišćenje 2, koje izlazi u 22,7 minuti, s molekulskim ionom $[M+H]^+$ *m/z* 575 (Slika 32), također je pronađeno u oba analizirana uzorka API-ja i oba gotova ljekovita oblika.

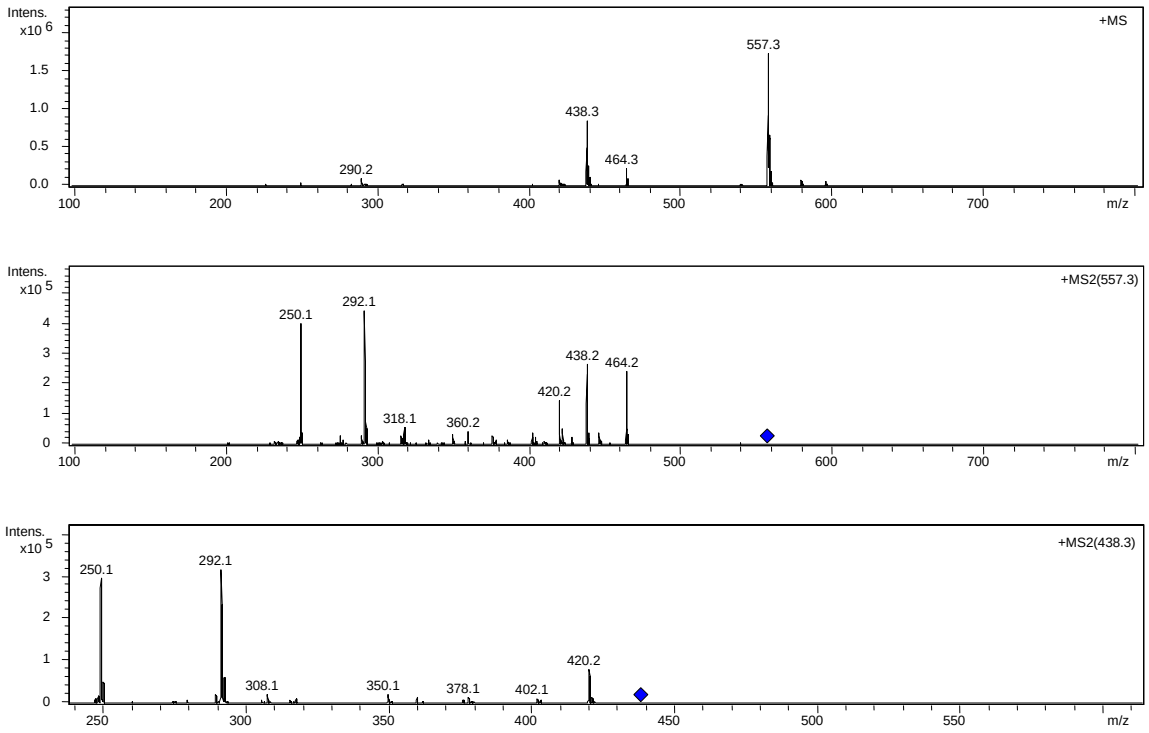


Slika 32. MS spektar Onečišćenja 2 i ESI-MS^2 spektar njegovog molekulskog iona *m/z* 575.

ESI-MS^2 analizom molekulskog iona *m/z* 575 dobiven je glavni fragmentni ion pri *m/z* 557 te manji ioni pri *m/z* 464 i 438 (Slika 32). Glavni fragmentni ion *m/z* 557 odgovara gubitku mase 18 Da, odnosno gubitku molekule vode, dok fragmenti *m/z* 464 i 438 odgovaraju karakterističnom gubitku fenilamino i fenilaminokarbonilne skupine, koji je uočen kod svih standardnih supstancija. Pregledom literature i na temelju dobivene *m/z* vrijednosti i fragmentnih iona ESI-MS^n analizom moguće je zaključiti da je Onečišćenje 2 fotolitički okso-produkt. Navedeno onečišćenje opisali au Shah i suradnici (2008), koji su proveli detaljnu strukturnu karakterizaciju atorvastatina i njegovih razgradnih produkata dobivenih u stresnim uvjetima. Produkt s istom molekulskom masom te istim fragmentima Shah i suradnici su dobili u procesu fotolize, pri čemu dolazi do oksidacije pirolskog prstena i formiranja β-laktamskog prstena u strukturi. Na Slici 31. prikazana je predložena kemijska struktura Onečišćenja 2, potencijalnoga fotolitičkog okso-produkta razgradnje atorvastatina.

Onečišćenje 3 eluira iznimno blizu dijastereomeru atorvastatina te ih je bilo gotovo nemoguće u potpunosti razdvojiti pri danim uvjetima analize. No prednost primjene MS detektora je da može analizirati sastavnice smjese koje nisu kromatografski razdvojene. MS

spektar (Slika 33) otkriva da je molekulski ion Onečišćenja 3 $[M+H]^+$ *m/z* 557, pa se od aktivne djelatne tvari atorvastatina ovo onečišćenje po molekulskoj masi razlikuje za 2 Da.

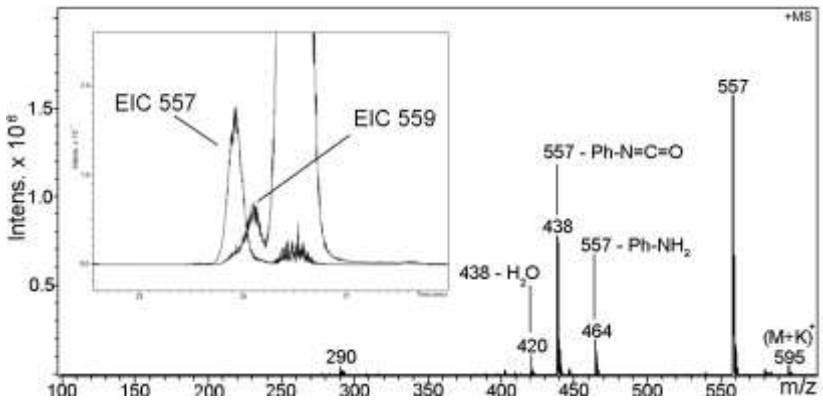


Slika 33. MS spektar Onečišćenja 3 te ESI-MS^2 spektri njegovog molekulskog *m/z* 557 i fragmentnog iona *m/z* 438.

ESI-MS^2 spektar (Slika 33) prikazuje dva fragmentna iona, *m/z* 464 i 438, koja su vidljiva već i na MS spektru. Kao i kod atorvastatina, dominantan je fragmentacijski put koji uključuje istovremenu eliminaciju fragmenta mase 93 Da i 119 Da, što odgovara gubitku fenilamino (*m/z* 557 → *m/z* 464) i fenilaminokarbonilne skupine (*m/z* 557 → *m/z* 438). Dobiveni fragmenti se, kao i molekulski ion, kod Onečišćenja 3 i atorvastatina razlikuju u masi za 2 Da. Iz ESI-MS^2 iona *m/z* 557 i ESI-MS^3 spektara iona *m/z* 557 → *m/z* 438 vidljiv je gubitak mase od 18 Da, budući da su dobiveni fragmenti *m/z* 438 → 420 i *m/z* 438 → 402, što odgovara uzastopnim neutralnim gubicima molekula vode iz strukture, pa proizlazi da Onečišćenje 3 u svojoj strukturi ima hidroksilne skupine. Na temelju dobivene fragmentacijske sheme i pretraživanjem literature može se zaključiti da je Onečišćenje 3 fotolitički razgradni produkt atorvastatina (Slika 31). Shah i suradnici su u svom istraživanju predložili kemijsku strukturu fotolitičkoga razgradnog produkta atorvastatina s fenantrenskim prstenom u strukturi. Predloženi produkt razgradnje imao je molekulsku masu 556 g/mol, što odgovara molekulskom ionu Onečišćenja 3 $[M+H]^+$ *m/z* 557. Može se zaključiti da fragmenti

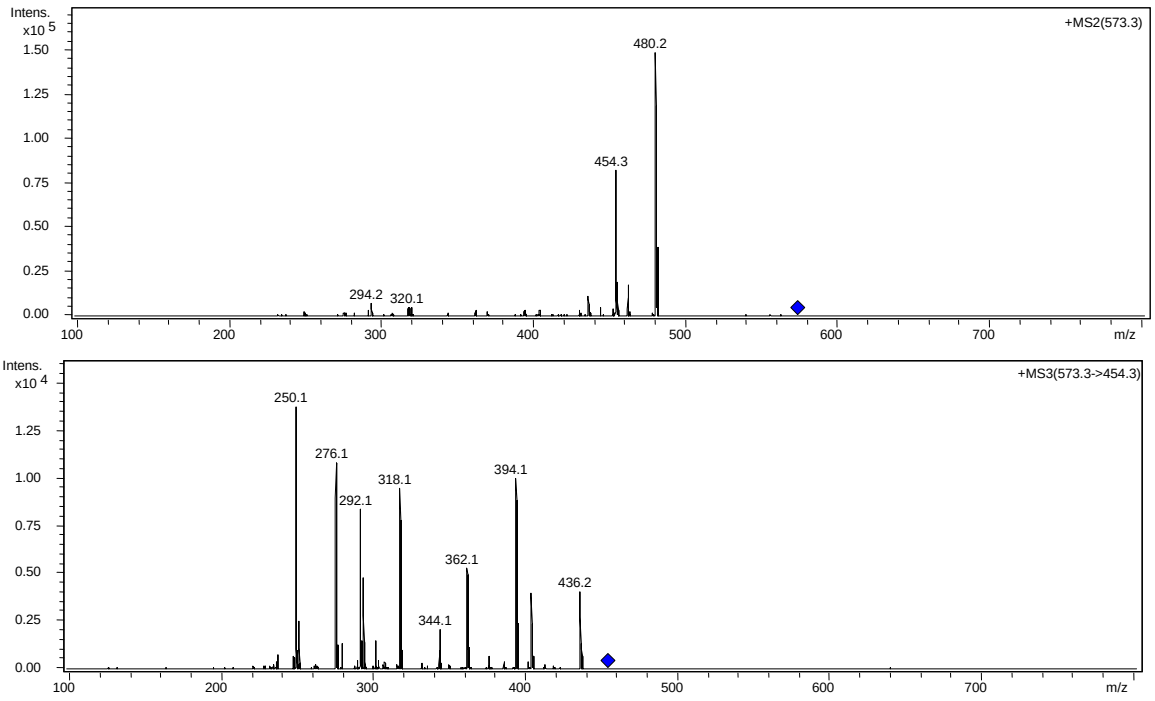
dobiveni MS^n analizom u ovom istraživanju doista odgovaraju predloženoj strukturi fotolitičkoga razgradnog produkta atorvastatina prikazanoj na Slici 31.

Potencijalni problem je bilo slabo razlučivanje između Onečišćenja 3 i dijastereomera atorvastatina, jer pri danim uvjetima kromatografske analize nije postignuta bazna separacija pikova. No problem slabog razlučivanja je uspješno riješen izoliranjem iona, odnosno izdvajanjem MS spektara zasebno za ion *m/z* 557 i zasebno za ion *m/z* 559. Kromatografsko preklapanje ovih dvaju pikova vidljivo je na Slici 34, a prikazani su i kromatogrami izoliranih iona (engl. *Extracted ion chromatogram,* EIC). To je, osim puno bolje specifičnosti i osjetljivosti, još jedna prednost primjene masenog detektora u analizi složenih uzoraka, jer je moguća i strukturna karakterizacija, i kvantifikacija analita koji nisu razdvojeni. Prema tome, dijastereomer atorvastatina je primjenom selektivnog MS detektora uspješno kvantificiran primjenom MS kromatograma izoliranog iona. Fotoličko razgradno Onečišćenje 3 je samo strukturno karakterizirano te identificirano, dok kvantifikacija nije napravljena jer u provedenom istraživanju standardna supstancija ovog onečišćenja nije bila dostupna.



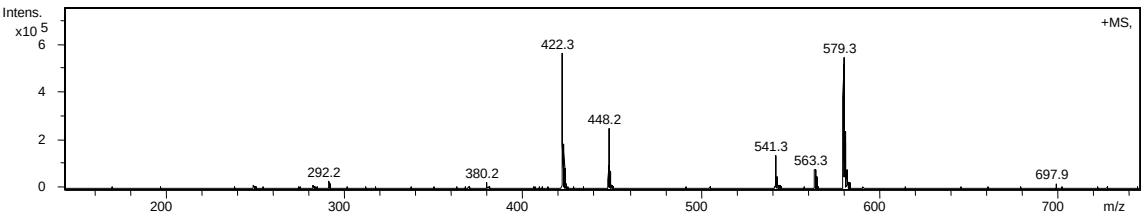
Slika 34. MS spektar Onečišćenja 3 s oznakama fragmentacije. Umetak slici: Kromatogram izoliranih iona *m/z* 557 i *m/z* 559.

U oba ispitana uzorka API-ja i gotovoga ljekovitog oblika na TIC kromatogramima vidljivo je **Onečišćenje 4** s vremenom zadržavanja 37,7 min. MS spektar ovog onečišćenja dao je molekulski ion $[M+H]^+$ *m/z* 573. MS^2 analizom ovog spoja dobiven je jednostavan, ali informativan MS spektar, s fragmentnim ionima *m/z* 480 i 454 (Slika 35). MS^3 spektar iona 573 → 454 pokazao je ione pri *m/z* 436, 394, 362, 344, 318, 292, 276, 250 (Slika 35). Ovakva fragmentacija u potpunosti odgovara fragmentacijskoj shemi metilnog estera atorvastatina, koji također ima molekulski ion $[M+H]^+$ *m/z* 573. Moglo bi se pretpostaviti da je Onečišćenje 4 dijastereomer metilnog estera atorvastatina.

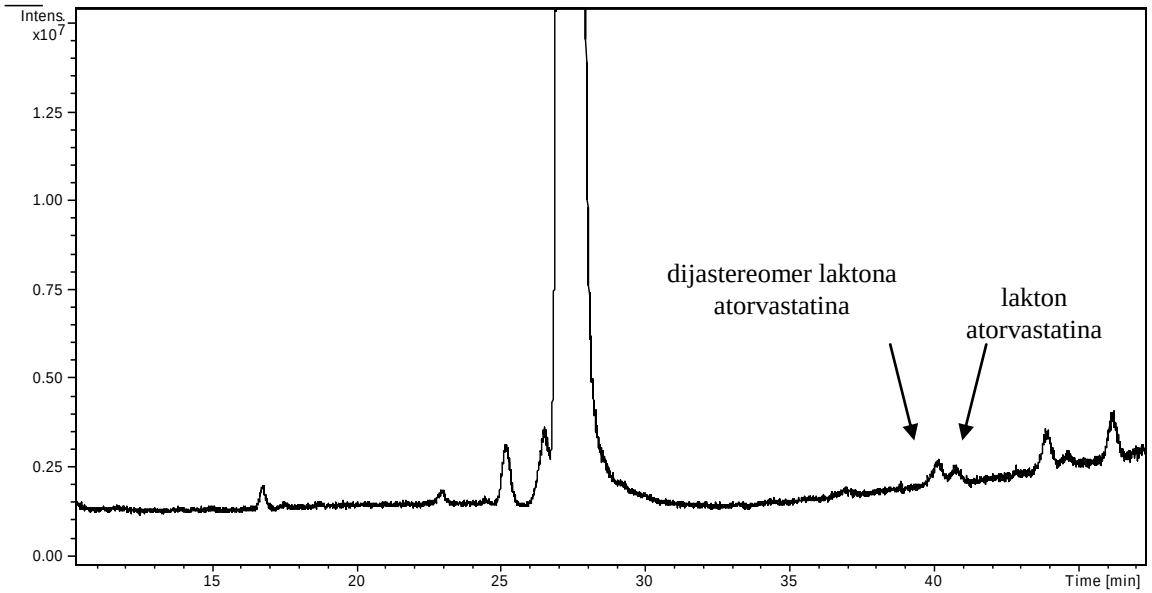


Slika 35. ESI-MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 573 Onečišćenja 4 te ESI-MS^3 spektar njegovog fragmentnog iona *m/z* 573 → 454.

U jednom gotovom ljekovitom obliku uočeno je **Onečišćenje 5**, s vremenom zadržavanja 40,1 min. MS analiza pokazala je molekulski ion $[M+H]^+$ *m/z* 541 te aduktore s ionom natrija (*m/z* 563) i ionom kalija (*m/z* 579) (Slika 36). Već su na MS spektru vidljivi glavni fragmentni ioni pri *m/z* 422 i 448, koji odgovaraju gubitku mase od 119 Da i 93 Da. Molekulski ion *m/z* 541 ima i lakton atorvastatina, a njegovom fragmentacijom također se dobivaju glavni fragmentni ioni pri *m/z* 448 i 422, što odgovara karakterističnom gubitku fenilamino, odnosno fenilaminokarbonilne skupine. Daljnja MS2 i MS3 fragmentacija Onečišćenja 5 pokazala je identične daljnje fragmentacijske putove kao i lakton atorvastatina. Budući da je i vrijeme zadržavanja pika Onečišćenja 5 iznimno blizu pika laktona atorvastatina (Slika 37), i na temelju istih fragmentacijskih putova, moguće je pretpostaviti da Onečišćenje 5 odgovara dijastereomeru laktona atorvastatina (Slika 31).



Slika 36. MS spektar Onečišćenja 5.

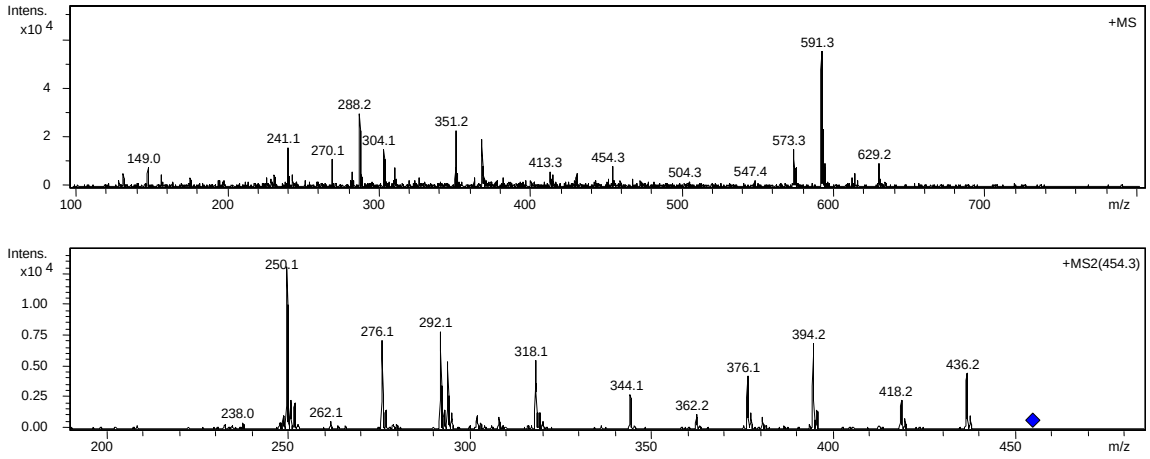


Slika 37. TIC kromatogram gotovoga ljekovitog oblika 1.

U jednoj od analiziranih aktivnih ljekovitih supstancija u 42,0 min uočeno je **Onečišćenje 6** s molekulskim ionom pri *m/z* 543 te aduktor s kalijem pri *m/z* 581. MS^2 analiza molekulskog iona dala je vrlo jednostavan, ali informativan spektar s dva glavna fragmentna iona pri *m/z* 450 i 424, što odgovara gubitku mase od 93 Da i 119 Da, odnosno odvajanju fenilamino skupine te fenilaminokarbonilnog dijela molekule. MS^3 analiza molekulskog iona *m/z* 543 → 424 dala je fragmentne ione pri *m/z* 406, 382, 364, 346, 304 i 250. Prvi fragment *m/z* 406 dobije se nakon neutralnoga gubitka molekule vode, dok se ion *m/z* 382 dobije nakon gubitka mase od 42 Da, što odgovara izopropilnom lancu na pirolskom prstenu. Pregledom literature utvrđeno je da je jedno od mogućih onečišćenja atorvastatina 3'-deshidroksiatorvastatin, odnosno 5'-deshidroksiatorvastatin (patent EP 1 659 110 A1, 2006), koji imaju vrijeme zadržavanja nešto kraće od metilnog estera atorvastatina, što je u skladu i s vremenima zadržavanja dobivenima u ovom istraživanju. Stoga je pretpostavljena struktura Onečišćenja 6 deshidroksiatorvastatin (Slika 31).

U jednoj analiziranoj aktivnoj ljekovitoj tvari te u oba gotova ljekovita oblika u 43,7 minuti vidljivo je **Onečišćenje 7** s molekulskim ionom $[M+H]^+$ *m/z* 591, uz aduktor s kalijem $[M+K]^+$ *m/z* 629 (Slika 38). MS^2 analiza molekulskog iona rezultirala je jednim istaknutim pikom pri *m/z* 573, što odgovara neutralnom gubitku molekule vode iz strukture. MS^3 analizom iona *m/z* 591 → 573 dobiveni su sljedeći fragmentni ioni: 480, 454, 436, 418, 382, 3643, 306 i 252. Može se zaključiti da se prva dva fragmentna iona podudaraju s gubitkom mase od 93 Da, odnosno 119 Da, što odgovara cijepanju fenilamino i fenilaminokarbonilne skupine, karakterističnom za spojeve strukturno slične atorvastatinu. MS^4 analiza iona 591 →

573 → 480 dala je ione malog intenziteta pri *m/z* 444, 426, 370, 318, 302 i 276, dok je MS^4 analiza iona 591 → 573 → 454 dala vrlo informativne i karakteristične fragmentne ione pri *m/z* 436, 418, 394, 376, 362, 344, 318, 292, 276 i 250 (Slika 38). Ioni *m/z* 436, 418, 394, 376 odgovaraju istom fragmentacijskom slijedu koji je dobiven za atorvastatin, osim što se dobiveni fragmentni ioni razlikuju u masi za 14 Da. Preostali fragmentni ioni *m/z* 344, 318, 292, 276 i 250 zajednički su i Onečišćenju 7 i atorvastatinu.



Slika 38. MS spektar Onečišćenja 7 te MS^4 spektar fragmentnog iona *m/z* 591 → 573 → 454.

Shah i suradnici su u svom radu, između ostalog, pronašli oksidativno razgradno onečišćenje s istim molekulskim ionom $[M+H]^+$ pri *m/z* 591, a predložena struktura prikazana je na Slici 31 (Onečišćenje 7a). No fragmentni ioni *m/z* 441, 410, 383, 371, koje su dobili u svom istraživanju, razlikuju se od fragmentnih iona dobivenih u ovom radu. Razlike u fragmentacijskim putovima vjerojatno proizlaze iz činjenice da su korišteni drugačiji tipovi ionizatora spektrometra masa. U ovom radu korišten je ESI način ionizacije, dok su Shah i suradnici koristili APCI tip ionizatora. Za razliku od ESI ionizatora, gdje se ionizacija događa u tekućoj fazi, kod APCI načina ionizacija se odvija u plinovitoj fazi. APCI se smatra manje „blagom" tehnikom od ESI ionizacije jer stvara puno više fragmentnih iona (Zaikin i sur., 2006). Kračun i suradnici su u svom radu proveli detaljno istraživanje izolacije i strukturne karakterizacije četiriju oksidativnih razgradnih produkata atorvastatina (Kračun i sur., 2009). Prethodna istraživanja su pokazala da je oksidacija lokalizirana upravo na pirolskom prstenu, gdje najprije dolazi do formiranja epoksidnih i laktamskih prstena, ciklizacijom između 3,5-dihidroksiheptanilnog lanca i pirolskog prstena, nakon čega slijedi otvaranje pirolskog lanca te odcjepljenje bočnog lanca. MS karakterizacijom te 2D NMR ispitivanjima predložene su strukture izoliranih onečišćenja. Jedno onečišćenje ima istu kemijsku strukturu kakvu su predložili Shah i suradnici u svom istraživanju. Drugo onečišćenje je strukturni izomer s

kemijskom strukturom prikazanom na Slici 31 (Onečišćenje 7b). Na temelju MS^n analiza dobivenih u ovom istraživanju te pregledom postojeće literature, može se zaključiti da je Onečišćenje 7 jedan od dva moguća strukturna izomera oksidativnoga razgradnog produkta atorvastatina.

U 46,0 minuti u oba gotova ljekovita oblika te u jednoj analiziranoj aktivnoj ljekovitoj supstanciji pronađeno je **Onečišćenje 8** s molekulskim ionom $[M+H]^+$ *m/z* 573. MS^2 spektar molekulskog iona dao je fragmentne ione pri *m/z* 555, 480, 454 i 427. Fragment *m/z* 555 odgovara neutralnom gubitku molekule vode, dok fragmentni ioni *m/z* 480 i 454 odgovaraju već opisanom karakterističnom gubitku mase 93 Da, odnosno 119 Da, a nastaju odvajanjem fenilamino skupine, odnosno fenilaminokarbonilnog dijela molekule. Shah i suradnici su u svom istraživanju razgradnih produkata atorvastatina kao jedno od sedam fotorazgradnih produkata dobili i spoj s molekulskim ionom *m/z* 573. MS^2 analizom dobili su fragmentne *m/z* 513, 472, 394 i 323, što nije u skladu s fragmentnim ionima dobivenima u ovom istraživanju. No na primjeru Onečišćenja 7, te uostalom same fragmentacijske sheme atorvastatina, moguće je zaključiti da Shah i suradnici nemaju iste fragmentne ione kakvi su dobiveni u ovom istraživanju. Kao što je ranije navedeno, razlike u fragmentaciji najvjerojatnije proizlaze iz činjenice da su korišteni različiti tipovi ionizatora. Nažalost, Shah i suradnici nisu uspjeli predložiti kemijsku strukturu ovoga razgradnog produkta atorvastatina. Daljnjim pregledom literature utvrđeno je da postoji onečišćenje diepoksid lakton atorvastatina s molekulskom masom 572 (/www.tlcpharmachem.com/tlc_item.php?upc=A-139&li=&sub=). Riječ je o spoju kod kojeg se bočni 3,5-dihidroksiheptanilni lanac laktonizirao, dok se na pirolskom dijelu molekule nalaze dva epoksidna prstena (Slika 31). Diepoksid lakton atorvastatina bi mogao biti Onečišćenje 8, jer odgovara molekulska masa te dobiveni fragmentni ioni, a upravo je epoksidna struktura karakteristična i za fotorazgradne produkte koje su u svom istraživanju dobivali Shah i suradnici.

Daljnja istraživanja bila bi usmjerena prema potvrdi identiteta svih pronađenih onečišćenja u analiziranim uzorcima API-ja i gotovoga ljekovitog oblika atorvastatina, za koja u ovom istraživanju nisu bile dostupne standardne supstancije. Moguća su dva pristupa: prvi bi uključivao primjenu preparativne HPLC metode koja bi omogućila razdvajanje i izolaciju svakoga pojedinog onečišćenja te zatim strukturnu karakterizaciju primjenom NMR spektroskopije. Drugi pristup bio bi sintetizirati pronađena onečišćenja atorvastatina te provesti njihovu MS karakterizaciju predloženom HPLC-MS metodom kako bi se potvrdilo vrijeme zadržavanja te MS spektri, odnosno kako bi se provjerilo dobivaju li se iste fragmentacijske sheme za ispitivana onečišćenja.

4.3.10 Usporedba novorazvijene MEKC i HPLC-DAD-MS^n metode za određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja s postojećim analitičkim metodama

Nova predložena MEKC metoda za razdvajanje i istovremeno određivanje sadržaja atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina, prva je kapilarnoelektroforetska metoda za određivanje onečišćenja atorvastatina (Nigović i sur., 2010).

Postoje dvije HPLC metode za određivanje onečišćenja atorvastatina. Ertürk i suradnici su objavili HPLC metodu za određivanje atorvastatina i njegovih dvaju onečišćenja, desfluoroatorvastatina i dijastereomera atorvastatina (Ertürk i sur., 2003), dok nova predložena MEKC metoda, razvijena u ovom istraživanju, ispituje prisutnost još dvaju onečišćenja, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina. Predložena HPLC metoda je iznimno spora, traje 60 minuta, nakon čega slijedi kondicioniranje kolone u trajanju dodatnih 60 minuta. Stoga je prednost novorazvijene MEKC metode znatno kraće vrijeme analize – 17 minuta. Jedina prednost predložene HPLC metode je veća osjetljivost, odnosno niža granica dokazivanja (LOD ≥ 0,01 μg/mL) u odnosu na granicu dokazivanja MEKC metode (LOD ≥ 0,26 μg/mL). Objavljena je još jedna HPLC metoda za određivanje atorvastatina i njegovih sedam onečišćenja (Petkovska i sur., 2008). Za optimizaciju metode i ispitivanje robusnosti autori su koristili eksperimentalni dizajn, odnosno kemometriju. Predložena metoda je relativno brza jer postiže razdvajanje analita za 11 minuta. Nažalost, autori svoju metodu nisu ispitali na stvarnom uzorku, odnosno nisu je primijenili na gotovom ljekovitom obliku kako bi odredili sadržaj atorvastatina i njegovih onečišćenja. Nadalje, kao svaka HPLC metoda, i ova predložena koristi velike količine organskog otapala, što je čini značajno skupljom te ekološki manje prihvatljivom u odnosu na kapilarnoelektroforetsku metodu.

Postoji niz metoda za ispitivanje stabilnosti atorvastatina (Caudhari i sur., 2007c, Kadav i Vora, 2008, Mohammadi i sur., 2007, Mustafa i sur., 2010). Chaudhari i suradnici objavili su HPLC metodu za istovremeno određivanje atorvastatina i amlodipina u kombiniranom ljekovitom obliku (2007c). Autori ispituju uobičajene uvjete ubrzane razgradnje na stabilnost lijeka te primjenjuju svoju metodu za *in vitro* testove otpuštanja djelatne tvari i određivanje sadržaja djelatnih tvari u ljekovitom obliku, atorvastatina i amlodipina, a ne i njihovih onečišćenja. Kako sami autori navode, nije se pokušalo identificirati dobivene razgradne produkte, odnosno potencijalna onečišćenja atorvastatina. Isti pristup imali su Mohammadi i suradnici, koji su predložili drugu HPLC metodu za

istovremeno određivanje atorvastatina i amlodipina u ljekovitom obliku te proveli stabilitetnu studiju. Mustafa i suradnici su također proveli stabilitetnu studiju te razvili brzu HPLC metodu za analizu atorvastatina (4 minute) u ljekovitom obliku. No dobiveni razgradni produkti nisu identificirani niti im je određen sadržaj, pa se metoda ne može koristiti za određivanje onečišćenja atrovastatina u gotovom lijeku. Kadav i Vora objavili su brzu UPLC metodu za istovremenu analizu atorvastatina i fenofibrata te njihovih razgradnih produkata. Međutim, ispitivan je samo lakton atorvastatina, pa je jedino za njega određeno linearno područje i granice dokazivanja i određivanja te još tri razgradna produkta fenofibrata. Autori ističu da su pri uvjetima analize uočili još tri nepoznata onečišćenja. No kao i kod svih gore navedenih metoda za stabilitetne studije, ove metode nisu primijenjene na gotovom ljekovitom obliku u svrhu određivanja onečišćenja atorvastatina.

U međuvremenu je objavljena farmakopejska metoda za određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja, uvrštena u posljednjem izdanju Europske farmakopeje (Ph. Eur. 7. izdanje). Predložena je HPLC metoda koja traje dugačkih 85 minuta, pa je novorazvijena MEKC metoda daleko brža, jednostavnija, jeftinija i ekološki prihvatljivija opcija.

Prednosti predložene MEKC metode, pogotovo u odnosu na postojeće HPLC, jesu relativno kratko vrijeme analize i značajno niži troškovi te iznimno male količine radnih pufera (μL) i uzoraka (nL). HPLC metoda koristi velike količine organskog otapala koje je potrebno najprije nabaviti, a potom i zbrinuti. Budući da se danas velika pozornost posvećuje zaštiti okoliša, nedostatak HPLC tehnike općenito je velika količina otapala koji se koriste za analizu. Stoga se novorazvijena MEKC metoda, prva razvijena kapilarnoelektroforetska metoda u svijetu, može koristiti za istovremenu analizu atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina u aktivnoj ljekovitoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku, kao jeftina i ekološki povoljna alternativa uobičajeno korištenim HPLC metodama.

Glavni nedostatak MEKC metode predložene u ovom radu je slabija osjetljivost u odnosu na HPLC metode zbog uske kapilare u kojoj se odvija razdvajanje i detekcija analita, odnosno iznimno kratak put zrake svjetlosti detektora (d < 150 μm) te posljedično mala količina onečišćenja koju je moguće detektirati. Zbog relativno niske osjetljivosti metode, neka onečišćenja nađena su u količinama nižima od granice određivanja. Također su vidljiva neka nepoznata onečišćenja. Stoga je cilj daljnjih ispitivanja bio razviti novu metodu tekućinske kromatografije vezane s masenom spektrometrijom koja bi osigurala nižu osjetljivost metode te omogućila identifikaciju i strukturnu karakterizaciju nepoznatih onečišćenja.

Novorazvijena HPLC-DAD-MS^n metoda osigurala je niže granice dokazivanja i određivanja (Mornar i sur., 2010). Primjena masene spektrometrije omogućila je strukturnu karakterizaciju i identifikaciju osam nepoznatih onečišćenja pronađenih u analiziranim uzorcima aktivne ljekovite supstancije i gotovoga ljekovitog oblika. Predložena HPLC metoda traje duže nego MEKC metoda (50 naspram 17 minuta), budući da je brzina protoka pokretne faze usporena zbog povezivanja s masenim spektrometrom. U odnosu na već objavljene HPLC metode za analizu atorvastatina i njegovih razgradnih produkata i onečišćenja, metoda je sveobuhvatnija, budući da se određuje sadržaj četiriju onečišćenja, dok je primjerice u metodi koju su predložili Kadav i Vora, linearnost te granica identifikacije i određivanja utvrđena samo za lakton atorvastatina (Kadav i Vora, 2008).

Objavljene su dvije HPLC metode za provođenje indikativnih stabilitetnih studija, u kojima se istovremeno određivao atorvastatin i amlodipin u prisutstvu dijastereomera atorvastatina i laktona atorvastatina te razgradnih produkata amlodipina (Chaudhari i sur., 2007c; Mohammadi i sur., 2007). No predložene metode su primijenjene samo za analizu djelatnih sastavnica u kombiniranim farmaceutskim pripravcima, a nisu korištene za određivanje sadržaja onečišćenja atorvastatina. Stoga je prednost HPLC metode, razvijene u ovom doktorskom radu, što je primijenjena za identifikaciju i određivanje sadržaja atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, desfluoroatorvastatina, dijastereomera atorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina u aktivnoj ljekovitoj supstanciji i gotovom ljekovitom obliku. Primjena masene spektrometrije omogućila je strukturnu karakterizaciju i identifikaciju drugih prisutnih onečišćenja, diaminoatorvastatina, fotolitičkog okso-produkta razgradnje atorvastatina, fotolitičkoga razgradnog produkta atorvastatina, dijastereomera metilnog estera atorvastatina, dijastereomera laktona atorvastatina, dehidroksi atorvastatina, oksidativnoga razgradnog produkta atorvastatina te diepoksida laktona atorvastatina.

4.4 RAZVOJ NOVE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM

Crvena fermentirana riža koristi se kao prirodni hipolipemik, a na tržištu se nalazi kao prehrambeni proizvod ili registrirana kao dodatak prehrani. U svom sastavu može imati 14 monakolina te druge prirodne spojeve s hipolipemičkim učinkom, poput niacina, kampasterola, β-sitosterola, izoflavona, nezasićenih masnih kiselina i dr. Najzastupljeniji i najzaslužniji za hipolipemički učinak su monakolin K, odnosno lovastatin i njegov β-hidroksi kiselinski oblik. Nažalost, do sada provedena istraživanja ukazala su na mogućnost da se na tržištu nalaze dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom, čiji sadržaj ne odgovara deklaraciji. Dodatan problem s ovim proizvodima je njihova sigurnost, budući da se u njima može, kao sekundarni produkt fermentacije, naći nefrotoksin citrinin.

Do sada nije razvijena nijedna kapilarnoelektroforetska metoda za istovremenu analizu lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom, stoga je cilj ovog istraživanja bio predložiti novu, brzu i jednostavnu, kapilarnoelektroforetsku metodu za identifikaciju i određivanje sadržaja gore navedenih djelatnih i toksičnih sastavnica u crvenoj fermentiranoj riži.

4.4.1 Optimizacija postupka pripreme standarda lovastatin β-hidroksi kiseline

Budući da se u fermentiranoj crvenoj riži proizvedenoj pomoću gljivice *Monascus purpureus* lovastatin može naći u oba oblika, laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku, bilo je potrebno pripremiti standardnu otopinu lovastatin β-hidroksi kiseline iz standarda lovastatina. Poznato je da se laktonski oblik lovastatina može potpuno hidrolizirati u svoj β-hidroksi kiselinski oblik u uvjetima pH iznad 7,7 (Fruedrich i sur., 1995). Stoga je provedena bazična hidroliza. U prethodno provedenim istraživanjima pokazano je da je bazična hidroliza lovastatina pri pH 8-9 jako brza (Nigović i Pavković, 2009). Brown i sur. (1997) predložili su konverziju pomoću 0,1 M NaOH uz zagrijavanje pri 50 °C sat vremena. Nakon toga je pH otopine podešen na 7,7 pomoću otopine klorovodične kiseline. Shen i sur. (1996) pokazali su da se hidroliza laktonskog oblika lovastatina u kalijevu sol hidroksi kiseline odvija dodatkom ekvimolarne količine 0,05 M KOH u vodenoj otopini metanola uz inkubaciju pri 45 °C tijekom 60 min. No dodatak metanola u otopinu omogućuje daljnju metilaciju dobivene kiseline. Yang i Hwang (2006) su dokazali da će se 98% konverzija laktonskog u kiselinski oblik odvijati uz dodatak 0,1 M NaOH ili 0,05 M KOH pripremljenih u acetonitrilu

koncentracije 25% ili 50% (*v/v*). Budući da je cilj u ovom radu bio postići potpunu konverziju laktonskog oblika lovastatina u β-hidroksi kiselinu te osigurati stabilnost dobivene otopine, ispitani su različiti uvjeti hidrolize pomoću otopine natrijeva hidroksida. Kako bi se izbjegla eventualna daljnja metilacija dobivenoga kiselinskog oblika, u pokusima nije korišten metanol već acetonitril. Isprobana je priprema lovastatin β-hidroksi kiseline otapanjem lovastatina u smjesi voda:acetonitril (50:50, *v/v*), nakon čega je uslijedila bazična hidroliza dodatkom 0,1 M NaOH, pripremljenog u smjesi voda:acetonitril (50:50, *v/v*) u jednakoj količini. Drugi način pripreme standarda lovastatin β-hidroksi kiseline, ispitan u ovom radu, bio je direktno otapanje lovastatina u 0,1 M NaOH, pripremljenog u smjesi voda:acetonitril (50:50, *v/v*). Iako je u oba slučaja HPLC-MS analizom dokazana lovastatin hidroksi kiselina, drugim načinom priprave, otapanjem lovastatina izravno u natrijevu hidroksidu, dobila se nestabilnija otopina, pa se od ovog načina pripreme standarda lovastatin kiseline odustalo. Stoga je lovastatin otopljen u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*) te mu je dodana, u jednakoj količini, 0,1 M otopina NaOH, pripremljena u smjesi acetonitril:voda (50:50, *v/v*). Da bi se osigurala potpuna hidroliza laktona u hidroksi kiselinu, otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj 60 min pri 45 °C. Kako bi se potvrdila potpuna konverzija laktona u kiselinski oblik, provedena je HPLC-MS analiza, metodom opisanom u poglavlju 3.3.4 Na dobivenom kromatogramu je vidljiv pik pri 24,678 min, dok je prethodna analiza lovastatina rezultirala kromatografskim pikom pri 30,875 min. To znači da je hidroliza laktona uspješno provedena. Nadalje, omjer površina pika lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline iznosi približno 0,001, što znači da je konverzija lovastatina u kiselinski oblik uspješno provedena. Za dodatnu potvrdu identiteta produkta dobivenog bazičnm hidrolizoma provedena je strukturna karakterizacija masenom spektrometrijom. Na dobivenom masenom spektru lovastatin β-hidroksi kiseline moguće je uočiti glavne ione pri *m/z* 461,445,423 i 405. Ion pri *m/z* 423 je molekulski ion lovastatin β-hidroksi kiseline $(M + H)^+$, ioni pri *m/z* 445 i 461 predstavljaju aduktore s ionom natrija $(M + Na)^+$ odnosno kalija $(M + K)^+$, dok je ion pri *m/z* 405 dobiven gubitkom molekule vode. Na ovaj način, HPLC-MS analizom, potvrđena je potpuna konverzija lovastatina u β-hidroksi kiselinski oblik.

Preliminarni pokusi provedeni kapilarnom elektroforezom jasno su pokazivali pik laktona i pik kiseline kada su zasebno injektirani, s različitim migracijskim vremenima. No kada su otopine standarda lovastatina u laktonskom i kiselinskom obliku pomiješane u bočici za uzorkovanje te onda injektirane u instrument i analizirane, dobiven je samo jedan pik. Ponovno je provedena HPLC-MS analiza tako pomiješanih otopina standarda i na kromatogramu je bio vidljiv samo laktonski pik, a masena spektrometrija je također pokazala

da u otopini nema lovastatin β-hidroksi kiseline. Ključnim korakom pokazala se neutralizacija otopine lovastatin β-hidroksi kiseline prije miješanja dviju standardnih otopina laktona i kiseline. Na ovaj način spriječila se konverzija kiselinskog u laktonski oblik za vrijeme analize unutar same kapilare. Stoga je nakon bazične hidrolize lovastatina u kiselinski oblik provedena neutralizacija dodatkom 0,1 M HCl do pH 7,0. Ovako pripremljena otopina standarda lovastatin β-hidroksi kiseline pokazala je konverziju od 99,9% iz laktonskog u kiselinski oblik. Također je provjerena stabilnost dobivene otopine standarda lovastatin β-hidroksi kiseline nakon čuvanja na sobnoj temperaturi te u hladnjaku na + 4 °C nakon 1, 8 i 15 dana. Otopina se pokazala stabilnom unutar jednoga radnog dana pri sobnoj temperaturi, dok je čuvanjem u hladnjaku na + 4 °C otopina bila stabilna tri tjedna, te se mogla koristiti kao standard u daljnjim pokusima.

4.4.2 Optimizacija postupka pripreme smjese standarda za analizu kapilarnom elektroforezom

Prije nego se krenulo u razvoj i optimizaciju nove kapilarnoelektroforetske metode, provedena su preliminarna ispitivanja kako bi se pronašlo odgovarajuće otapalo u kojem će se standardne otopine lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina pripremiti i razrijediti. Najčešće postoje dva pristupa: priprema uzorka razrjeđivanjem s otopinom radnog pufera ili razrjeđivanjem s istim otapalom u kojem su otopljene standardne otopine. U oba slučaja pik citrinina bio je uzak i oštar, no oblik i simetrija pikova lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline nisu bili zadovoljavajući. Ključnim korakom pokazao se dodatak 15 mM SDS-a u otopinu uzorka. Dobiveni su pikovi značajno boljeg oblika i simetrije, pa je u daljnjim analizama umjesto smjese acetonitril:voda (50:50, *v/v*) za pripremu i razrjeđivanje otopina standardnih supstancija korištena otopina 15 mM SDS-a.

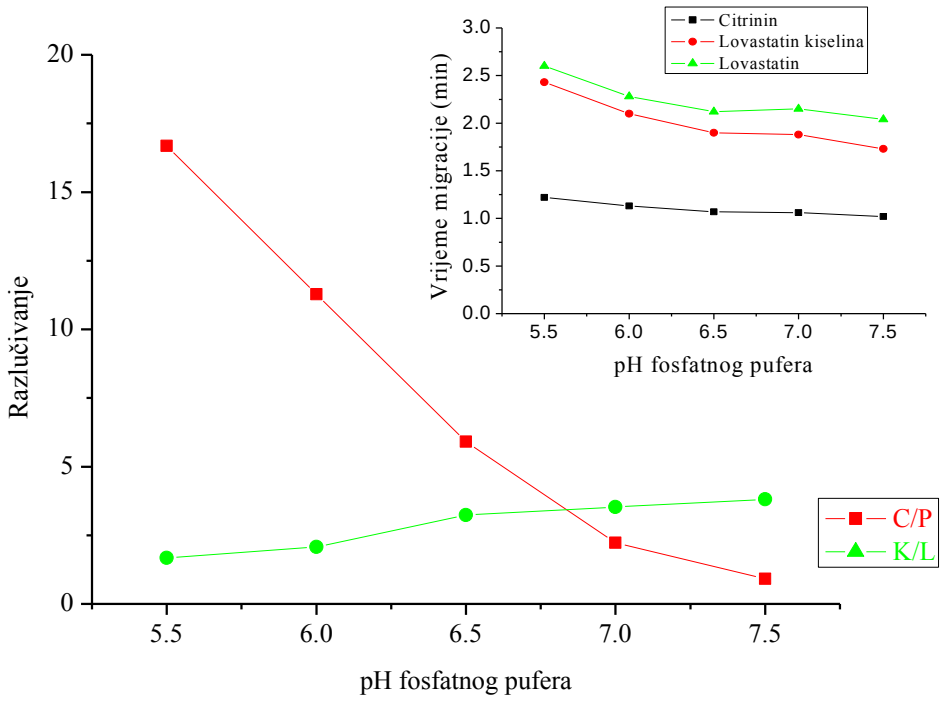
4.4.3 Optimizacija pH pufera

Kao što je već ranije navedeno, prilikom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode prvi i ključni korak bio je odabir vrste i pH te ionske jakosti pufera zbog utjecaja pH na EOF, postotak ionizacije analita i njihovu elektroforetsku pokretljivost. Prilikom razvoja nove metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom cilj je bio omogućiti analizu oba oblika u kojima se lovastatin može naći u crvenoj fermentiranoj riži, laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku. Budući da je lovastatin neutralan, uobičajen i najčešće korišten

tip kapilarnoelektroforetske analize, kapilarna zonska elektroforeza se nije mogla primijeniti. Upotrijebljena je micelarna elektrokinetička kromatografija, koja omogućuje istovremenu analizu nabijenih i neutralnih analita, pa je za preliminarne pokuse u otopinu pufera dodan SDS u koncentraciji 20 mM. Prilikom odabira vrste i pH pufera vodilo se računa o interkonverziji lovastatina u odgovarajući β-hidroksi kiselinski oblik. Naime, u kiselim uvjetima lovastatin postepeno prelazi u svoj kiselinski oblik (Huang i sur., 2010), a ta interkonverzija je ovisna o pH vrijednosti. Održavajući pH otopine između 4 i 5, interkonverzija lovastatina u odgovarajuću β-hidroksi kiselinu može biti smanjena. No s druge strane, što je veći pH pufera, jači je elektroosmotski tok, a time je pokretljivost negativno nabijenih analita veća, što značajno skraćuje vrijeme analize. Kako bi elektroforetska pokretljivost analita bila što veća, odnosno vrijeme analize što kraće, a istovremeno vodeći računa o opasnosti interkonverzije lovastatina, pH pufera koji će se koristiti za daljnju analizu je pažljivo odabran. Kako bi se izbjegla interkonverzija tijekom same analize, ispitan je utjecaj pH, u rasponu od 5,5 do 7,5, na elektroforetsku pokretljivost, vrijeme analize, razlučivanje, oblik i simetriju pika te stabilnost analita. Osim toga, željelo se osigurati da lovastatin kiselina bude potpuno ionizirana prilikom analize kako bi se što uspješnije razdvojila od neutralnog laktona koristeći MEKC metodu. Budući da je pKa vrijednost lovastatin kiseline 4,3, pri pH-vrijednosti pufera 5,5 kiselina će biti 94% ionizirana (Damić i Nigović, 2010a). Za preliminarna ispitivanja korišten je fosfatni pufer u koncentraciji 20 mM (pH 5,5-7,5), uz dodatak 20 mM SDS-a. Analiza je provedena pri naponu od 25 kV i temperaturi 25 °C. Otopine su injektirane hidrodinamski pri tlaku 50 mbar 5 s. Ispitivanja su pokazala očekivano smanjenje migracijskog vremena porastom pH pufera (Umetak Slici 39). Ovakva ovisnost, odnosno povećanje prividne elektroforetske pokretljivost porastom pH pufera je najvećim dijelom posljedica utjecaja pH na elektroosmotski tok.

Molekula lovastatin β-hidroksi kiseline je u cijelom ispitivanom pH-rasponu negativno nabijena. Citrinin, koji ima pKa vrijednost 2,3, također je potpuno ioniziran u ovom pH-rasponu, pa su i citrinin i lovastatin β-hidroksi kiselina kao anioni putovali prema pozitivno nabijenoj anodi, odnosno natrag prema mjestu injektiranja. Zahvaljujući snažnom elektroosmotskom toku, oba analita su putovala prema negativno nabijenoj anodi, odnosno detektoru. Lovastatin je neutralan, pa je upravo zbog njega morala biti korištena micelarna elektrokinetička kromatografija. Kao pseudostacionarna faza korišten je SDS. Nakon provedenog istraživanja moglo se zaključiti da je analiza najbrža pri pH fosfatnog pufera 7,5. No pri pH fosfatnog pufera 7,0 postignut je najbolji oblik i simetrija pika te najveće razlučivanje između analita (Rs > 2,33) (Slika 39). Stoga je pH 7,0 predstavljao dobar

kompromis između želje za što bržom analizom, dobrim razdvajanjem svih analita, odnosno razlučivanjem te oblikom i simetrijom pika s jedne, te s osiguranjem stabilnosti molekule laktona za vrijeme same analize s druge strane.



Slika 39. Ovisnost razlučivanja između analita o pH fosfatnog pufera. Umetak slici: Ovisnost vremena migracije analita o pH fosfatnog pufera.
Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer, 20 mM SDS, 27 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 5 s, detekcija pri 237 nm. Uzorak: 25 µg/mL lovastatin (L), lovastatin β-hidroksi kiselina (K), citrinin (C) i unutarnji standard (P).

4.4.4 Optimizacija koncentracije pufera

Nakon odabira vrste i pH pufera, potrebno je ispitati utjecaj koncentracije, odnosno ionske jakosti pufera na razdvajanje analita. Ispitan je raspon od 10 do 30 mM fosfatnog pufera pH 7,0 pri stalnoj koncentraciji SDS-a od 20 mM. Na temelju provedenih analiza moglo se zaključiti da je porastom molarnosti pufera migracijsko vrijeme analita sve duže. Ovakva ovisnost posljedica je utjecaja ionske jakosti pufera na smanjenje zeta-potencijala na unutrašnjoj stijenci kapilare, a time i izravno smanjenje elektroosmotskog toka. Budući da je prividna elektroforetska pokretljivost izravno ovisna o vrijednosti elektroosmotske

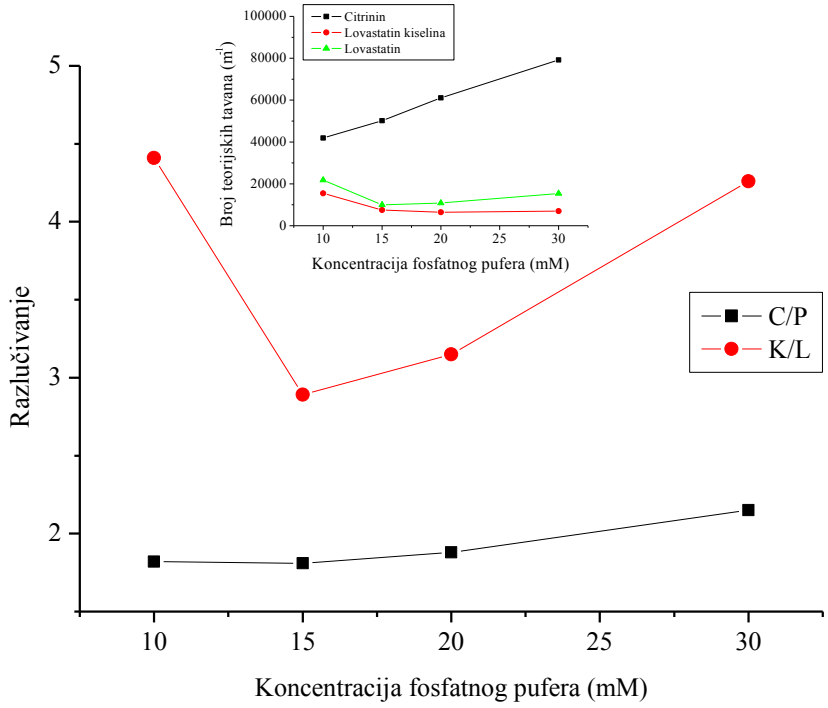
pokretljivosti, povećanjem koncentracije pufera smanjuje se elektroforetska pokretljivost analita, a time se vrijeme migracije odnosno analize produljuje.

Tijekom razvoja nove metode i optimizacije uvjeta analize, promatran je utjecaj koncentracije fosfatnog pufera na učinkovitost, odnosno broj teorijskih tavana (Slika 40). Vidljivo je da za citrinin, prvi eluirajući analit, učinkovitost kapilare raste porastom koncentracije fosfatnog pufera. S druge strane, za lovastatin β-hidroksi kiselinu broj teorijskih tavana ima padajući trend. Za lovastatin, posljednji eluirajući analit, broj teorijskih tavana je najveći pri najnižoj koncentraciji fosfatnog pufera (10 mM); nakon toga slijedi nagli pad, da bi daljnjim porastom koncentracije pufera učinkovitost kapilare ipak rasla.

Kako bi se odabrala optimalna koncentracija fosfatnog pufera, osim broja teorijskih tavana promatrano je i razlučivanje pikova. Ovisnost razlučivanja između pojedinih analita o koncentraciji fosfatnog pufera prikazana je na Slici 40.

Iz grafa ovisnosti razlučivanja o koncentraciji fosfatnog pufera, vidljivo je da je razlučivanje veće od potrebnih 1,5, odnosno da su pikovi potpuno odvojeni (Slika 40). Razlučivanje između unutarnjeg standarda i lovastatin β-hidroksi kiseline je najveće (Rs = 17,58) kada je korišten fosfatni pufer u koncentraciji 10 mM. Nakon toga vrijednost pada, i najmanja je (Rs = 12,51) pri koncentraciji 20 mM. Daljnjim povećanjem ionske jakosti fosfatnog pufera, razlučivanje između unutarnjeg standarda i lovastatin β-hidroksi kiseline se ponovno povećava. No sve su ove vrijednosti vrlo velike, tako da ne predstavljaju odlučujući faktor u odabiru optimalne koncentracije pufera. Trend ovisnosti razlučivanja između lovastatin β-hidroksi kiseline i lovastatina o koncentraciji fosfatnog pufera vrlo je sličan ovisnosti razlučivanja između unutarnjeg standarda i lovastatin β-hidroksi kiseline: razlučivanje je najveće (Rs = 4,41) pri koncentraciji fosfatnog pufera od 10 mM, a najmanje (Rs = 2,89) pri koncentraciji fosfatnog pufera od 15 mM. Nakon toga slijedi povećanje razlučivanja povećanjem koncentracije pufera. Dakle, razlučivanje između ovih dvaju analita je također zadovoljavajuće u cijelom ispitivanom rasponu. U ovom istraživanju ključni čimbenik za odabir optimalne koncentracije radnog pufera bila su prva dva pika, najbliže eluirajući pikovi, citrinin i unutarnji standard. Ispitivanjem je pokazano da razlučivanje između citrinina i unutarnjeg standarda raste povećanjem koncentracije fosfatnog pufera. Ovo je posljedica prvenstveno utjecaja porasta koncentracije pufera na povećanje vremena migracije analita, čime izravno proporcionalno raste i razlučivanje. Budući da ova dva pika eluiraju na početku i vrijeme migracije je jako kratko, pikovi su oštri i uski, pa povećanje koncentracije fosfatnog pufera nije znatno utjecalo na povećanje širine pikova, a time posljedično na smanjenje razlučivanja. Iako je najbolje razlučivanje (Rs = 2,15) bilo pri

koncentraciji fosfatnog pufera od 30 mM, pri ovako visokoj ionskoj jakosti struja u kapilari je bila jako visoka (> 133 μA), što dovodi do Jouleova zagrijavanja. Ovaj se efekt želi izbjeći kako ne bi došlo do razvijanja nejednolikoga temperaturnog gradijenta, promjena u viskoznosti, laminarnog protoka pufera kroz kapilaru te posljedično širenja zona analita. Budući da je pri koncentraciji fosfatnog pufera od 20 mM razlučivanje bilo zadovoljavajuće (Rs = 1,88), struja u kapilari značajno niža, a oblik i simetrija pikova vrlo dobra, ova koncentracija je odabrana za daljnja ispitivanja.



Slika 40. Ovisnost razlučivanja između analita o koncentraciji fosfatnog pufera. Umetak slici: Ovisnost broja teorijskih tavana o koncentraciji fosfatnog pufera.
Uvjeti analize: fosfatni pufer pH 7,0, 20 mM SDS, 27 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 5 s, detekcija pri 237 nm. Uzorak: 25 μg/mL lovastatin (L), lovastatin β-hidroksi kiselina (K), citrinin (C) i unutarnji standard (P).

4.4.5 Optimizacija koncentracije SDS-a

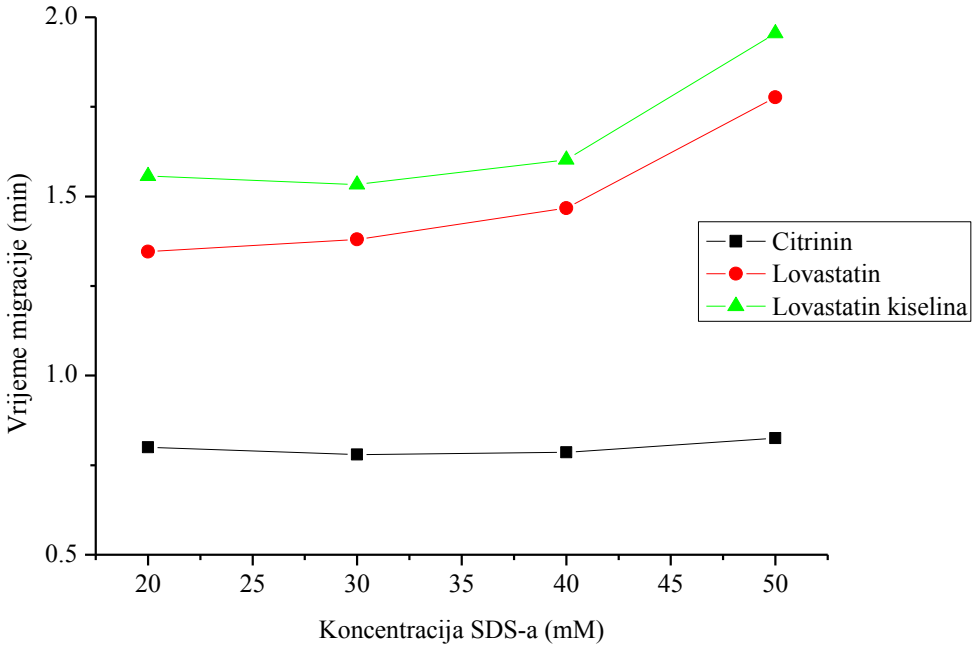
Kako je lovastatin neutralan, već u preliminarnim ispitivanjima je korišten SDS. U razvoju MEKC metode ključan korak je odabir vrste i zatim koncentracije micela koje se dodaju u otopinu pufera. Kao surfaktant za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom MEKC metodom odabran je SDS, ponajprije zbog svoje dostupnosti i prihvatljive cijene. SDS ima malu kritičnu micelarnu koncentraciju, 8,1 mM u vodi pri 25 °C (Deeb i sur., 2001).

Osim toga, SDS pruža jako dobru selektivnost i učinkovitost u MEKC metodama. Dodatkom SDS-a u otopinu pufera i injektiranjem uzorka u kapilaru, neutralno nabijeni lovastatin se raspodjeljuje između micela i okolne vodene faze prema svojoj konstanti raspodjele, pa brzina njegova kretanja ovisi isključivo konstanti raspodjele. Ovime se osiguralo da neutralna molekula lovastatina više ne eluira zajedno s EOF-om, što omogućuje njegovu izravnu detekciju. Lovastatin β-hidroksi kiselina je u ispitivanom pH-području negativno nabijena (pKa = 4,3). Citrinin ima pKa vrijednost 2,3, što znači da je potpuno ioniziran u cijelom pH-rasponu koji se koristio. Pri pH 7,0 oba analita su dakle bila ionizirana i u anionskoj formi. No dodatak SDS-a može utjecati na selektivnost, vrijeme migracije te razlučivanje ne samo neutralnih već i nabijenih analita, lovastatin kiseline i citrinina. Stoga se ispitao utjecaj SDS-a u rasponu od 20-50 mM. Više koncentracije nisu se uzele u obzir jer je vrijeme analize bilo predugo te struja u kapilari previsoka, a niže koncentracije nisu se promatrale zbog približavanja kritičnoj micelarnoj koncentraciji SDS-a.

Na Slici 41 prikazana je ovisnost vremena migracije o koncentraciji SDS-a dodanog u pufer. Redoslijed eluacije analita je citrinin, pravastatin, lovastatin β-hidroksi kiselina, dok zadnji eluira lovastatin. Da laktonski oblik lovastatina eluira poslijedni je predvidljivo, budući da je riječ o neutralnoj molekuli koja se veže za formirane micele nošene prema pozitivno nabijenoj katodi, i tek zahvaljujući djelovanju elektroosmotskog toka migriraju prema anodi, odnosno detektoru. Lovastatin je relativno lipofilna molekula (log P = 4,11) (Mornar i sur., 2011), pa se snažno veže za micele. Stoga je dulje vrijeme migracije pri višim koncentracijama SDS-a očekivano. Vrlo je zanimljivo da je ovisnost vremena migracije lovastatin β-hidroksi kiseline o koncentraciji SDS-a vrlo slična onoj lovastatina, iako je riječ o negativno nabijenoj molekuli. Naime, kod nabijenih analita brzina kretanja ovisi o dva čimbenika, o elektroforetskoj pokretljivosti čestice i konstanti raspodjele između micele i vodene otopine, odnosno lipofilnosti. Ovako snažna ovisnost vremena migracije lovastatin β-hidroksi kiseline o dodatku SDS-a u otopinu pufera ukazuje na veći afinitet za hidrofobnu unutrašnjost micela te nepolarne karakteristike analita (log P = 3,74, izračunato programom ALOGPS v2.1).

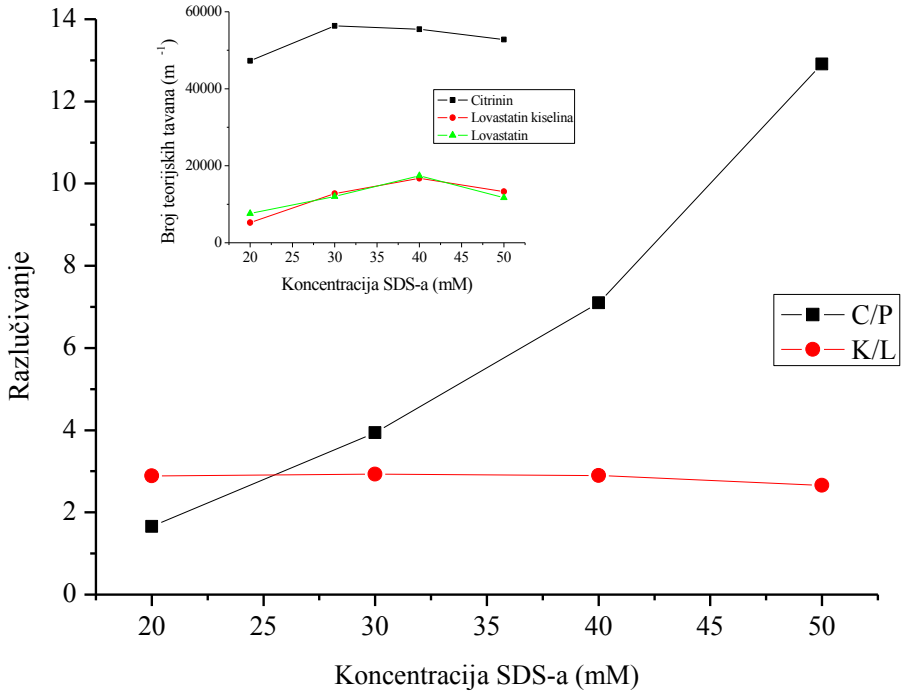
Citrinin je mala, negativno nabijena molekula, pa bi prema teoriji kapilarne elektroforeze trebala eluirati posljednja. No citrinin je hidrofilniji (log P = 1,23, izračunato programom ALOGPS v2.1) od lovastatin β-hidroksi kiseline (log P = 3,74). To znači da se vrlo malo vezao za dodane micele SDS-a, pa je eluirao prije lovastatin β-hidroksi kiseline, čije je vrijeme migracije jako ovisilo o koncentraciji SDS-a u puferu. Mali stupanj interakcije citrinina i SDS micela vidljiv je i iz Slike 41, gdje se vrijeme migracije citrinina uslijed

promjene koncentracije SDS-a od 20-50 mM kreće u iznimno malom rasponu od 0,79-0,83 minute.



Slika 41. Ovisnost vremena migracije analita o koncentraciji SDS-a.
Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 27 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 5 s, detekcija pri 237 nm. Uzorak: 25 µg/mL lovastatin, lovastatin β-hidroksi kiselina i citrinin.

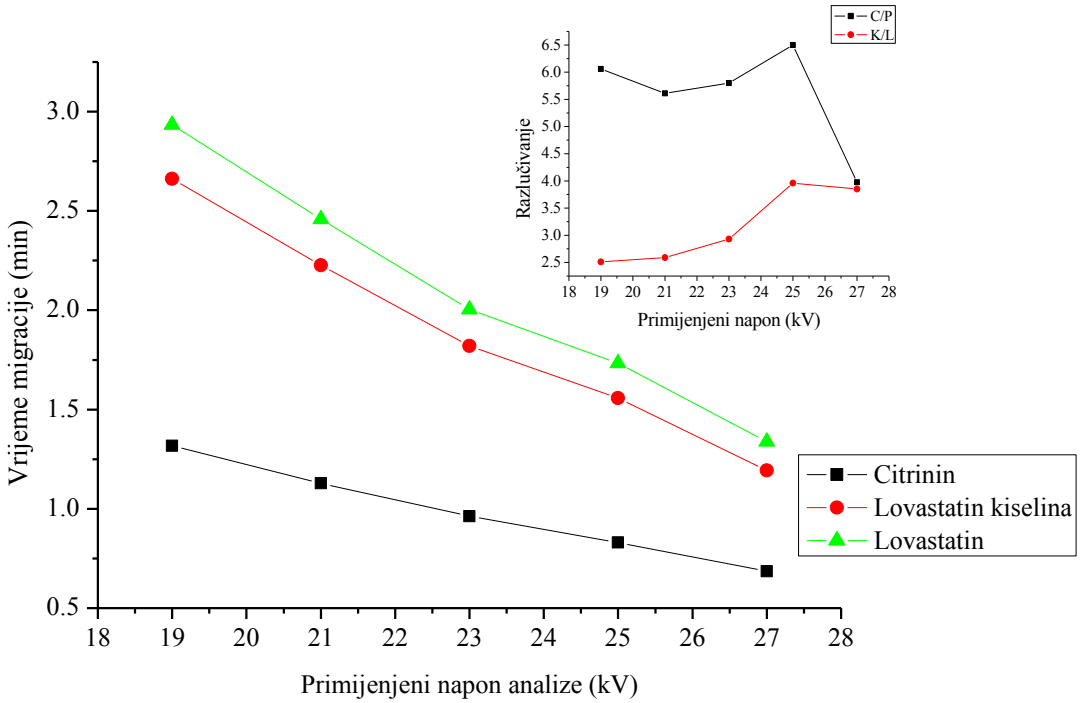
Osim vremena migracije, prilikom optimizacije koncentracije SDS-a vodilo se računa o razlučivanju između pikova (Slika 42), učinkovitosti (Umetak Slici 42,) te obliku i simetriji pika. Koncentracije SDS-a 30 i 40 mM pokazale su se dobrima. No u želji da vrijeme analize bude što kraće te da se u kapilari razvija što manja struja, kao optimalna je odabrana koncentracija SDS-a od 30 mM, pri kojoj je učinkovitost bila visoka ($N > 12021$), razlučivanje dobro ($Rs > 2,93$), a pikovi uski i simetrični.



Slika 42. Ovisnost razlučivanja između analita o koncentraciji SDS-a. Umetak slici: Ovisnost broja teorijskih tavana o koncentraciji SDS-a.
Uvjeti analize: 20 fosfatni pufer pH 7,0, 27 kV, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 5 s, detekcija pri 237 nm. Uzorak: 25 μg/mL lovastatin (L), lovastatin β-hidroksi kiselina (K), citrinin (C) i unutarnji standard (P).

4.4.6 Utjecaj primijenjenog napona

U ovom istraživanju ispitao se napon pri kojem se odvija analiza, u rasponu od 19-29 kV, dok su ostali eksperimentalni uvjeti držani stalnima pri optimiziranim uvjetima, opisanima gore. Na Slici 43. vidljivo je da se povećanjem napona vrijeme migracije svih analita smanjuje, što je u skladu s prethodno opisanom teorijom kapilarne elektroforeze. Napon od 29 kV razvijao je u kapilari preveliku struju (> 150 μA), pa se nije uzeo u obzir. Kako bi se izbjeglo Jouleovo zagrijavanje, za analizu je odabran napon od 25 kV. Pri toj vrijednosti primijenjenog napona vrlo je visok broj teorijskih tavana (N ≥ 17753 za lovastatin β-hidroksi kiselinu). Pri ovim uvjetima također je postignuto najbolje razlučivanje između analita (Rs ≥ 3,93 između lovastatina i β-hidroksi kiseline) (Umetak Slici 43), a vrijeme analize je bilo ispod dvije minute.



Slika 43. Ovisnost vremena migracije o primijenjenom naponu analize. Umetak slici: Ovisnost razlučivanja između analita o primijenjenom naponu analize.
Uvjeti analize: 20 fosfatni pufer pH 7,0, 30 mM SDS, 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 5 s, detekcija pri 237 nm. Uzorak: 25 µg/mL lovastatin (L), lovastatin β-hidroksi kiselina (K), citrinin (C) i unutarnji standard (P).

4.4.7 Valna duljina detektora

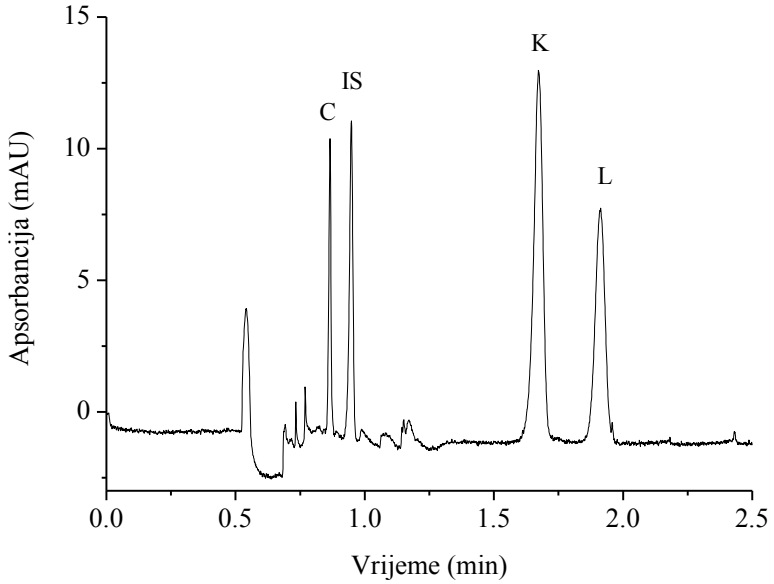
Lovastatin ima apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 237 nm. Kako bi se osigurala optimalna osjetljivost metode, lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiselina praćeni su na valnoj duljini od 237 nm. Citrinin ima apsorpcijske maksimume pri 216, 260 i 334 nm. Za analizu citrinina je odabrana valna duljina od 216 nm kako bi osjetljivost metode bila što bolja. Budući da je očekivana vrijednost citrinina u uzorku vrlo niska, reda veličine ppb, da bi se poboljšala osjetljivost, odabrana je kapilara s produljenim optičkim putom na mjestu detektora. Tako je promjer umjesto uobičajenih 50 µm na mjestu prolaska zrake svjetlosti DAD detektora bio 150 µm. Ovime se postiglo povećanje površine pika citrinina oko 3,5 puta, što je značajno poboljšalo osjetljivost metode i omogućilo detekciju citrinina u uzorku na razini ppb-a.

4.4.8 Unutarnji standard

Kako unutarnji standard mora biti tvar s fizikalno-kemijskim parametrima što sličnijima svojstvima analita koji treba identificirati, u preliminarnim ispitivanjima su korišteni ketoprofen, atorvastatin i pravastatin zbog karboksilne skupine u svojoj strukturi. Pravastatin je odabran kao najbolji. To je natrijeva sol hidroksi kiseline s pKa vrijednosti iznosi 4,2 (Ishihama i sur., 2002; Nigović i Vegar, 2008), što znači da je pri pH 7,0 u potpunosti ioniziran te nosi negativan naboj, odnosno trebao bi putovati prema pozitivno nabijenoj anodi te eluirati puno kasnije. No pravastatin je relativno hidrofilna molekula zbog polarne hidroksilne skupine na heksahidronaftalenskom prstenu (Damić i Nigović, 2010), pa također ne stupa značajno u interakciju s micelama SDS-a i njegova migracija je prvenstveno pod utjecajem EOF-a. Stoga nije iznenađujuće da pravastatin, koji ima log P vrijednosti 2,23, eluira puni prije nego lipofilniji lovastatin. Također je iz Slike 42 vidljivo da je ovisnost pravastatina o koncentraciji SDS-a veća nego za citrinin, budući da se dodatkom micela značajno povećava razlučivanje između citrinina i pravastatina. Dodatkom pravastatina kao unutarnjeg standarda u standardne otopine i otopine uzorka, mogu se izbjeći pogreške uslijed promjena u volumenu injektiranja, eventualnom padu napona u gradskoj mreži i razlikama u elektroosmotskom toku.

Budući da temperatura nije ključan čimbenik koji će utjecati na separaciju u MEKC metodi, prilikom optimizacije metode ovaj parametar se nije posebno ispitivano. Bilo je potrebno jedino osigurati ponovljive rezultate, što je postignuto održavanjem temperature u kapilari na stalnoj vrijednosti od 25 °C pomoću cirkulirajuće struje zraka/rashladnog sustava.

Nakon što su svi uvjeti optimizirani, omogućena je po prvi put istovremena analiza lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina kapilarnoelektroforetskom metodom uz vrijeme analize kraće od 2 minute (Slika 44).



Slika 44. Elektroferogram smjese standardnih otopina lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina (25 μg/mL), uz dodatak unutarnjeg standarda, pri optimiziranim uvjetima analize.
Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 30 mM SDS, 35 kV, 25 ºC, valna duljina detektora 237 nm, *hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Pikovi* C = citrinin, IS = unutarnji standard, K = lovastatin β-hidroksi kiselina, L = lovastatin.

4.4.9 Validacija metode

Metoda je validirana u skladu s ICH smjernicama pri sljedećim uvjetima mjerenja: fosfatni pufer u koncentraciji 20 mM, pH 7,0, 30 mM SDS-a, primijenjeni napon 25 kV, temperatura 25 °C, hidrodinamičko injektiranje 5 s pri 50 mbar.

Selektivnost

Selektivnost metode ispitana je procjenom čistoće pika pomoću DAD detektora, koristeći smjesu standardnih otopina lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina te pravastatina kao unutarnjeg standarda. Za obradu spektara korišten je Agilent ^{3D}CE/MSD ChemStation software. Faktor slaganja spektara bio je u rasponu od 994,8 do 997,1, pa je test čistoće pika pokazao da su UV-spektri različitih dijelova pika bili identični, što upućuje na homogenost ispitivanih pikova, odnosno nepostojanje koeluirajućih sastavnica.

Budući da su proizvodi s crvenom fermentiranom rižom vrlo složeni uzorci, ispitana je selektivnost metode na stvarnim uzorcima dodatkom otopina standarda u uzorke dodataka

prehrani koji su analizirani u ovom radu. Promatran je porast površine pika odgovarajuće sastavnice koja je dodana u pojedini uzorak. Za potvrdu identiteta mjereni su i spremani DAD spektri u rasponu od 200 – 400 nm tijekom cijele analize.

Linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja

Kako bi se utvrdilo linearno područje novorazvijene kapilarnoelektroforetske metode za istovremeno određivanje lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina u proizvodima crvene fermentirane riže, injektirana je serija standardnih otopina na pet različitih koncentracija uz dodatak unutarnjeg standarda, s tri injektiranja po koncentracijskoj razini. Kalibracijske krivulje dobivene su kao ovisnost omjera površine pika analita i unutarnjeg standarda o koncentraciji analita. Jednadžba pravca izračunala se linearnom regresijom, metodom najmanjih kvadrata. U Tablici 12. prikazani su rasponi linearnih područja za ispitivane analite, jednadžbe pravaca i koeficijent korelacije.

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) određene su, u skladu s ICH smjernicama, kao najmanja koncentracija analita pri kojoj je pik tri, odnosno deset puta viši od šuma bazne linije. Dobiveni rezultati za granice dokazivanja i određivanja su prikazani u Tablici 12.

Tablica 12. Kalibracijski parametri te granice dokazivanja i određivanja predložene MEKC metode

Analit	*Linearno područje ($\mu g\ mL^{-1}$)*	*Jednadžba pravca*	*Koeficijent korelacije (r)*	*LOD (μg/mL)*	*LOQ (μg/mL)*
Lovastatin	2 – 400	y = 2,1899 x – 5,9801	0,999	0,2	0,5
Lovastatin β-hidroksi kiselina	2 – 400	y = 1,3065 x – 9,7515	0,996	0,1	0,4
Citrinin	0,08-10,0	y = 0,6948 x + 0,0496	0,997	0,03	0,08

Preciznost i točnost

Preciznost metode ispitana je mjerenjem ponovljivosti te srednje preciznosti. Ponovljivost metode ispitana je injektiranjem triju različitih koncentracija (niske, srednje i

visoke koncentracije), unutar linearnog raspona metode, smjesa otopina standarda lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina. Rezultati su izraženi kao relativne standardne devijacije za korigirano vrijeme migracije (vrijeme migracije pojedinog statina podijeljeno s vremenom migracije unutarnjeg standarda) i za korigiranu površinu pika (površina pika pojedinog statina podijeljena s površinom pika unutarnjeg standarda). U Tablici 13. nalaze se srednje i RSD vrijednosti korigiranih vremena migracije i površine pika za svaki analit na tri ispitivane koncentracije.

Srednja preciznost metode određivala se trima mjerenjima kroz tri uzastopna dana, koristeći svježe pripremljene otopine radnog pufera i smjese standardnih otopina i unutarnjeg standarda. Rezultati su izraženi kao RSD vrijednosti za korigirano vrijeme migracije i za korigiranu površinu pika. U Tablici 14. nalaze se srednje i RSD vrijednosti korigiranih vremena migracije i površine pika za lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiselinu i citrinin.

Točnost predložene MEKC metode ispitana je određivanjem analitičkog prinosa, tako što su u uzorak dodavane poznate količine analita. Procjena je vršena mjerenjem u triplikatu dodatkom triju različitih koncentracija analita, kako bi se pokrio cijeli linearni raspon. Za citrinin mjerenje je vršeno pri koncentracijama 1, 5, 10 μg/mL, dok je za lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselinu analitički prinos određivan pri koncentracijama 5, 25 i 150 μg/mL. Analitički prinos bio je u rasponu 98,3 – 102,7% za citrinin, 99,2 – 101,0% za lovastatin te 100,03 – 103,8% za lovastatin β-hidroksi kiselinu, iz čega se može zaključiti da je metoda točna.

Tablica 13. Ponovljivost metode

Analit	*Koncentracija (μg/mL)*	*Vrijeme migracije (min)*[a,]*	*RSD (%)*	*Površina pika*[b,]*	*RSD (%)*
Lovastatin	5,0	2,012	1,90	0,979	6,86
	25,0	2,012	0,76	3,485	0,80
	150,0	1,860	0,39	20,981	0,89
Lovastatin β-hidroksi kiselina	5,0	1,790	1,30	1,000	2,40
	25,0	1,785	0,49	2,440	1,10
	150,0	1,681	0,27	15,535	0,56
Citrinin	1,0	0,904	0,07	0,010	3,43
	5,0	0,615	0,55	0,056	2,11
	25,0	0,902	0,19	0,460	1,38

*Srednja vrijednost triju mjerenja
[a] Omjer vremena migracije analita i unutarnjeg standarda
[b] Omjer površine pika analita i unutarnjeg standarda

Tablica 14. Srednja preciznost metode

Analit	*Vrijeme migracije (min)* [a]	*RSD (%)*	*Površina pika* [b]	*RSD (%)*
Lovastatin	1,992	1,64	3,446	2,36
Lovastatin β-hidroksi kiselina	1,773	1,24	2,434	3,23
Citrinin	0,899	0,42	0,462	1,64

[a] Omjer vremena migracije analita i unutarnjeg standarda
[b] Omjer površine pika analita i unutarnjeg standarda

Izdržljivost

Izdržljivost je određena mijenjanjem nekoliko eksperimentalnih parametara koji mogu utjecati na razdvajanje analita, a to su: koncentracija pufera (20 ± 1 mM), primijenjeni napon (25 ± 1 kV) i temperatura (25 ± 1 °C). Svaki parametar se mijenjao zasebno. Kao kriteriji, promatrane su promjene u vremenu migracije i površini pikova. RSD vrijednosti za korigirano vrijeme migracije i korigiranu površinu pika prikazane su u Tablici 15. Uočene su manje, prihvatljive promjene te se pokazalo da je izdržljivost novorazvijene MEKC metode dobra.

Tablica 15. Izdržljivost predložene MEKC metode

Parametar	*Lovastatin*		*Lovastatin β-hidroksi kiselina*		*Citrinin*	
	RSD(t)	*RSD(A)*	*RSD(t)*	*RSD(A)*	*RSD(t)*	*RSD(A)*
± 1 mM pufer	1,22	1.24	0,28	0,97	0,78	1,21
± 1 kV	1,73	1,71	0,69	2,35	1,65	3,90
± 1 °C	0,39	0,87	0,37	1,90	0,13	1,37

4.4.10 Primjena novorazvijene metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Uzorci proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Istraživanja u ovom doktoratu su provedena na šest dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom te dva prehrambena proizvoda s crvenom fermentiranom rižom (Tablica 16). Dodaci prehrani su komercijalno dostupni u ljekarnama i biljnim trgovinama, a prehrambeni proizvodi u trgovinama zdravom hranom u Republici Hrvatskoj. Kako bi se osigurao reprezentativan uzorak s tržišta, odabrani su proizvodi različitih proizvođača. Analizirani dodaci prehrani obuhvaćaju široki raspon ljekovitih oblika (tablete, kapsule, meke gel kapsule i tvrde kapsule punjene uljem), odnosno drugačije sastave i različite utjecaje matriksa. Neki proizvodi u svom sastavu sadrže samo crvenu fermentiranu rižu, dok su neki ispitani dodaci prehrani složenijeg sastava.

Ekstrakcijski postupak i učinkovitost

Prije analize uzoraka crvene fermentirane riže, zbog njihova vrlo složenog sastava, bilo je potrebno pronaći optimalne ekstrakcijske uvjete te utvrditi ekstrakcijsku učinkovitost. Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta praćena je pomoću HPLC-DAD-MS metode, opisane u poglavlju 3.3.4. Budući da ispitivani dodaci prehrani dolaze u različitim formulacijskim oblicima, kako bi se ispitao utjecaj ostalih sastavnica uzorka te samoga formulacijskog oblika, optimizacija ekstrakcijskog postupka provođena je na različitim ljekovitim oblicima, tabletama, kapsulama i mekim gel kapsulama. Budući da je bilo potrebno postići kvantitativnu ekstrakciju neutralnog lovastatina i ionizirane lovastatin β-hidroksi kiseline, oba relativno lipofilna spoja, istovremeno s ekstrakcijom značajno hidrofilnijeg citrinina ispitana su ekstrakcijska otapala različite polarnosti: etanol, metanol i acetonitril. Najveću ekstrakcijsku učinkovitost, gledano za sva tri analita, pokazao je metanol. Zatim su isprobane različite koncentracije metanola, pa se u metanol kao ekstrakcijsko otapalo dodavalo 0, 10, 20, 30, 40 i 50% ultračiste vode. Smjesa metanol:voda (80:20, *v/v*) omogućila je najbolju ekstrakciju za sva tri analita. Kako se željelo osigurati najveći ekstrakcijski prinos u najkraćem vremenu, ispitao se utjecaj vremena ekstrakcije u rasponu od 15-90 min. Najbolja ekstrakcija dobivena je nakon 60 min, dok daljnje povećanje vremena ekstrakcije nije rezultiralo većom ekstrakcijskom učinkovitosti.

Tablica 16. Uzorci analiziranih prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom

Naziv proizvoda	***Proizvođač***	***Sastav***	***Formulacijski oblik***
Read yeast rice[a]	Dutch organic, Thailand	organski uzgojena crvena fermentirana riža	zrno
Thailand red jasmine rice[a]	Ecor, Thailand	organski uzgojena crvena fermentirana riža	zrno
Red rice[b]	Encian, Donji Stupnik, Croatia	crvena fermentirana riža koja sadrži barem 1,5% monakolina K	kapsula
Cholesterol maintenance[b]	KAL, Park City, SAD	0,6 g crvene fermentirane riže, ekstrakt gume balzamova drveta (*Commiphora muku),* ekstrakt lista artičoke (*Cynara scolymus*), L-arginin HCl, ne-GMO soja, gama orizanol, ekstrakt crnog papra, ekstrakt korijena đumbira, ekstrakt lista ružmarina, ekstrakt korijena kurkume i paprike, dijetetska vlakna, vitamin B3, vitamin B6, vitamin B12 i folna kiselina	tableta
No-Colest Omegasol[b]	Specchiasol, Bussolengo, Italy	200 mg crvene fermentirane riže (standardizirane na 1,5% monakolina), ulje morskih mikroalgi bogatih DHA, želatina, koncentrirani sok bergamot naranče (*Citrus bergamia*), glicerol, mono i digliceridi masnih kiselina, lecitin ne-GMO* soje i klorofil	meka gel kapsula
Rizolip[b]	Aktival, Ludbreg, Croatia	crvena fermentirana riža standardizirana na 1% monakolina K	kapsula
Omelip[b]	Aktival, Ludbreg, Croatia	200 mg suhog ekstrakta crvene fermentirane riže koja sadrži 1,5% monakolina, 1000 mg ribljeg ulja s omega-3 masnim kiselinama (18% EPA*, 12% DHA*), vitamin C i vitamin E	tvrda kapsula punjena uljem
Normolip 5[b]	ESI, Albissola Marina, Italy	100 mg suhog ekstrakta crvene fermentirane riže standardiziranog na 3% monakolina (3 mg), 150 mg gama orizanola, 120 mg fitosterola, polikozanole standardizirane na 60% oktakonazola (5 mg) i 200 mg kroma	kapsula

[a] Prehrambeni proizvod
[b] Dodatak prehrani

Huang i suradnici (2010) su pokazali da lovastatin β-hidroksi kiselina nakon ekstrakcije metanolom može reagirati s metanolom, te kao produkt dati metilni ester hidroksi kiseline. Njihovi rezultati upućuju da stupanj metilacije ovisi o koncentraciji metanola koji se koristi u ekstrakcijskom postupku te o vremenu ekstrakcije. Kako se željelo osigurati najbolju moguću ekstrakciju, a istovremeno izbjeći moguću esterifikaciju lovastatin β-hidroksi kiseline, u ovom istraživanju dodatno je provedena je LC-MS analiza, opisana u poglavlju *3.3.2.5.*. Njome se provela identifikacija ekstrahiranih analita uz pomoć vodene otopine metanola iz proizvoda s crvenom fermentiranom rižom. Rezultati su pokazali da nije došlo do metilacije lovastatin β-hidroksi kiseline.

Iako je uobičajeno provoditi ekstrakciju pri povišenoj temperaturi kako bi se ubrzao ekstrakcijski postupak i postigle veće količine ekstrahiranih analita, pri povišenoj temperaturi dolazi do termalne razgradnje citrinina (Xu i sur., 2006). On se u uzorcima očekivao u vrlo malim količinama, pa se htjelo izbjeći moguću razgradnju spoja. Stoga se ekstrakcija provodila pri sobnoj temperaturi.

Nakon što je optimiziran ekstrakcijski postupak, bilo je potrebno ispitati ekstrakcijsku učinkovitost. Ekstrakcijska učinkovitost izražena je postotkom, a izračunata je kao omjer dobivenih koncentracija analita određenih u uzorku u koji su standardi dodani prije ekstrakcijskog postupka i koncentracija analita dobivenih analizom uzoraka u koje su standardi dodani nakon ekstrakcijskog postupka. Zbog različitih matriksa uzoraka te složenog sastava proizvoda s crvenom fermentiranom rižom, ekstrakcijska učinkovitost se određivala na tableti, kapsuli i mekoj gel kapsuli. U svaki uzorak je dodana poznata količina standarda (5 μg/mL lovastatina i β-hidroksi kiseline te 1 μg/mL citrinina) prije, odnosno poslije ekstrakcijskog postupka te su uzorci analizirani novorazvijenom i validiranom metodom. Ekstrakcijska učinkovitost predložene MEKC metode izračunata je prema izrazu

$$R = A_{prije}/A_{poslije} \times 100\%$$

gdje je R = postotak učinkovitosti, A_{prije} = površina pika u uzorku u koji je standard dodan prije ekstrakcije, $A_{poslije}$ = površina pika u uzorku u koji je standard dodan nakon ekstrakcije.

U Tablici 17. navedena je ekstrakcijska učinkovitost novorazvijene MEKC metode. Vidljivo je da je ekstrakcijska učinkovitost vrlo visoka što se može objasniti jednostavnim ekstrakcijskim postupkom. Unatoč različitim tipovima matriksa i sastava ispitivanih uzoraka, osigurana je vrlo dobra ekstrakcija svih analita.

Tablica 17. Ekstrakcijska učinkovitost MEKC metode

Analit	*Postotak učinkovitosti (%)*		
	Tablete	Kapsule	Meke gel kapsule
Lovastatin β-hidroksi kiselina	101,11	101,93	81,93
Lovastatin	101,76	96,25	101,07
Citrinin	102,37	99,08	101,91

Analiza proizvoda s crvenom fermentiranom rižom MEKC metodom

Predložena MEKC metoda, razvijena u ovom radu, prva je kapilarnoelektroforetska metoda koja omogućuje razdvajanje i istovremeno određivanje sadržaja djelatne tvari u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom, prisutne u dva oblika: obliku lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline te toksičnoga fermentacijskog nusprodukta citrinina. Nakon što je metoda uspješno validirana, primijenjena je za analizu nekoliko proizvoda s crvenom fermentiranom rižom različitih proizvođača u različitim dozirnim oblicima. Ispitano je šest različitih dodataka prehrani koji uključuju široki raspon ljekovitih oblika (tablete, kapsule, tvrde kapsule punjenje uljem i meke gel kapsule), odnosno drugačije sastave i različite utjecaje matriksa. Također je ispitan jedan uzorak crvene fermentirane riže u obliku zrna, odnosno fino usitnjenog praha. Uzorci su pripremljeni prema optimiziranom ekstrakcijskom postupku opisanom u poglavlju 3.3.4 te su analizirani predloženom MEKC metodom.

U Tablici 18. prikazani su rezultati analize uzoraka crvene fermentirane riže novom predloženom MEKC metodom. Vidljivo je da je sadržaj djelatnih tvari u dodacima prehrani koji se koriste za snižavanje razine kolesterola i triglicerida u plazmi značajno različit (0,03 – 1,97%). U dva ispitana proizvoda (Uzorak 4 i 6) pronađena količina obaju oblika lovastatina je vrlo niska (0,05% i 0,03%). U četiri uzorka (Uzorak 1, 3, 5 i 7) kao dominantni sastojak identificiran je lovastatin, odnosno njegov udio u ukupnim monakolinima (lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselina) iznosi 40,00 – 90,86%. Lovastatin β-hidroksi kiselina je dominantni djelatni aktivni sastojak u samo jednom analiziranom proizvodu (Uzorak 2), dok je u Uzorku 4 također prisutna u većoj količini nego lovastatin u laktonskom obliku. U Uzorku 6 lovastatin β-hidroksi kiselina uopće nije pronađena.

Tablica 18. Sadržaj lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina u proizvodima crvene fermentirane riže, analizirani MEKC metodom

Uzorak	*Lovastatin (μg/mL)*[a]	*Lovastatin β-hidroksi kiselina (μg/mL)*[a]	*Citrinin (ppb)*[a]	*Lovastatin (%)*[c]	*Lovastatin β-hidroksi kiselina (%)*[c]	*Monakolini (%)*[c, d]	*Nađeno/ deklarirano (%)*[e]
1	391	183	ND[b]	0,74	0,34	1,08	178,3
2	486	1376	< LOQ	0,49	1,38	1,87	124,1
3	630	50	ND	0,63	0,04	0,67	113,4
4	15	32	ND	0,02	0,03	0,05	NL[f]
5	465	64	ND	0,46	0,06	0,52	NL[f]
6	17	-	ND	0,03	-	0,03	11,0
7	1788	183	98	1,79	0,18	1,97	157,7

[a] srednja vrijednost triju mjerenja
[b] ND – nije pronađeno
[c] pronađeno u ljekovitom obliku
[d] ukupna količina lovastatina u obliku laktona i β-hidroksi kiseline
[e] nađena količina monakolina/deklarirana vrijednost (%)
[f] NL – sadržaj nije naveden na proizvodu

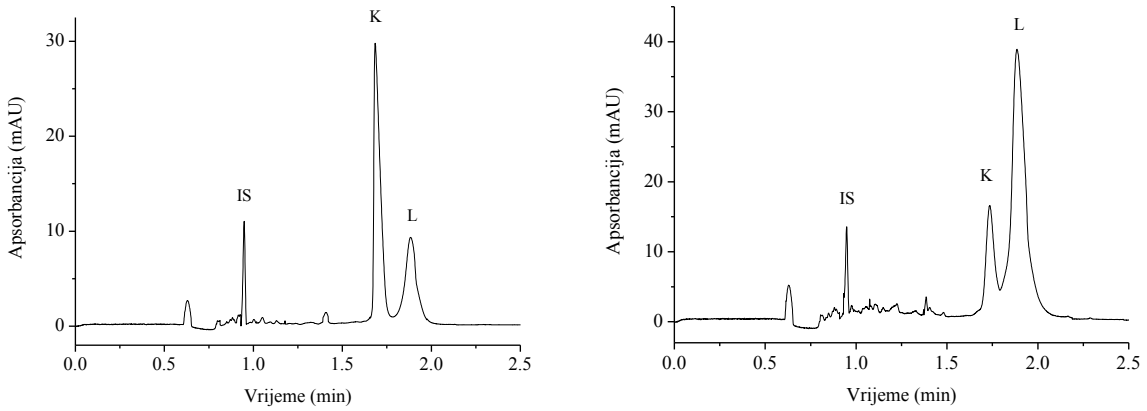
Osim sadržaja pojedinog oblika lovastatina u ispitivanim proizvodima, željela su se ispitati eventualna odstupanja od deklariranih vrijednosti na proizvodima. Kako bi se izračunao postotak pronađenog u odnosu na deklarirani sadržaj, izražene su ukupne vrijednosti monakolina, odnosno sadržaj lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline zajedno (Tablica 18).

Za Uzorke 4 i 5 postotak pronađenog u odnosu na deklarirani sadržaj nije se mogao izraziti, jer na proizvodu sadržaj monakolina, odnosno lovastatina nije bio naveden. Ovo je jedan od već spomenutih problema proizvoda s crvenom rižom. Naime, kako bi se izbjegli problemi s FDA-om, koja zabranjuje prodaju proizvoda koji sadrže ljekovitu djelatnu tvar u svom sastavu kao dodatak prehrani, neki proizvođači na svojim proizvodima naprosto ne navode da sadrži monakoline, odnosno lovastatin. Na taj način u pojedinim zemljama, ovisno o zakonodavstvu, ovi proizvodi nisu pod nadležnošću regulatornih tijela. No, kako je vidljivo iz rezultata dobivenih u ovom radu, samo zato što na proizvodu nije navedeno da sadrži lovastatin, ne znači da ga nema u svom sastavu. Dapače, u Uzorku 5 pronađena je relativno velika količina lovastatina (0,46%), odnosno ukupnih monakolina (0,52%). Pacijenti koji uzimaju ovaj dodatak prehrani te ljekarnici koji proizvod preporučuju i prodaju, uopće nisu obaviješteni da u organizam unose i lovastatin. Stoga se ne može niti dati odgovarajuća

preporuka (od strane ljekarnika), odnosno voditi računa (od strane pacijenta) o mogućim nuspojavama i interakcijama statina, a moguće je i multipliciranje terapije u slučaju kada je pacijent već na terapiji statinima. Kod tri proizvoda pronađena su značajna odstupanja od deklarirane vrijednosti lovastatina, odnosno monakolina. Uzorak 1 i 7 imaju 178,8%, odnosno 157,7% pronađenog u odnosu na deklarirani sadržaj, tj. bitno veću količinu lovastatina. S druge strane, Uzorak 6 ima samo 11% deklariranog sadržaja monakolina.

Citotoksični nusprodukt fermentacijskog postupka, citrinin, pronađen je u dva ispitana proizvoda s crvenom fermentiranom rižom (Uzorak 2 i 7). U Uzorku 7 izmjerena je koncentracija od 98 ppb, što znači da je pronađena količina neposredno ispod maksimalne prepručene vrijednosti za citrinin propisane u EU-u (100 ppb). U Uzorku 2 pronađena količina je ispod LOQ-a (0,08 μg/mL), što znači da je citrinin prisutan u koncentraciji manjoj od 80 ppb.

Na Slici 45, kao primjeri analize, prikazani su elektroferogrami Uzoraka 2 i 7.



Slika 45. Elektroferogram Uzorka 2 (A) i Uzorka 7 (B).
Uvjeti analize: fosfatni pufer u koncentraciji 20 mM, pH 7.0, 30 mM SDS-a, napon 25 kV, 25 °C, valna duljina detektora 237 nm, hidrodinamičko injektiranje pri 50 mbar, 5 s. Pikovi: IS = unutarnji standard, K = lovastatin β-hidroksi kiselina, L = lovastatin.

Usporedba novorazvijene MEKC metode s potojećim metodama za analizu atorvastatina i njegovih onečišćenja opisana je u poglavlju 4.3.10.

4.5 RAZVOJ NOVE HPLC-DAD-FLD-MS^n METODE ZA ANALIZU PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM

Nakon što su se proizvodi s crvenom fermentiranom rižom analizirali novorazvijenom MEKC metodom te nakon što su proučeni dobiveni rezultati, nametnulo se pitanje imaju li analizirani proizvodi u svom sastavu neke od drugih monakolina, za koje nisu bili dostupni standardi u ovom istraživanju. Kako se identifikacija nepoznatih spojeva može provesti primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije, cilj daljnjeg istraživanja u ovom radu bio je razviti novu HPLC-MS metodu, kojom bi se u hrani i dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom odredio sadržaj lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline, za koje su bili raspoloživi standardi, ali kojom bi se u analiziranim uzorcima moglo identificirati prisutnost ostalih monakolina. Sadržaj citrinina u jednom od uzoraka nije bilo moguće odrediti MEKC metodom zbog koncentracije ispod LOQ razine, stoga je cilj nove HPLC metode bio je osigurati niže granice dokazivanja i određivanja. MS detektor ima veću osjetljivost od DAD detektora, pa se pretpostavilo da će upravo razvoj HPLC-MS metode osigurati potrebne granice kvantifikacije. Pregledom literature utvrđeno je da citrinin posjeduje fluorescenciju (Xu i sur., 2006; Zhou i sur., 2012). Primjenom vrlo specifičnog i osjetljivog fluorescencijskog detektora moguće je osigurati još niže granice osjetljivosti za citrinin. Stoga je cilj daljnjeg istraživanja u ovom radu bio razviti HPLC-DAD-FLD-MS^n metodu za određivanje sadržaja lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom te ispitivanje sastava, odnosno određivanje drugih monakolina eventualno prisutnih u analiziranim spojevima.

4.5.1 Optimizacija uvjeta HPLC-DAD-FLD-MS^n metode

Relativno različita fizikalno-kemijska svojstva analita predstavljala su izazov u razvoju kromatografske metode. Na temelju strukture pretpostavljeno je da će analiti imati različite lipofilnosti, što je potvrđeno ALOGPS v 2.1 programom te se izračunalo da je log *P* 4,11 za lovastatin, 3,74 za lovastatin β-hidroksi kiselinu te 1,23 za citrinin (Mornar i sur., 2011, Tetko i sur., 2002). Osim ovih triju analita, koristeći maseni detektor, željelo se identificirati i druge monakoline prisutne u uzorcima. Iako svi do sada poznati monakolini imaju isti farmakološki učinak, odnosno inhibiraju enzim HMG-CoA reduktazu, imaju i bitno drugačije kemijske strukture, a time i različita fizikalno-kemijska svojstva te kromatografsko ponašanje. Nadalje, u ovom radu ispitani su različiti formulirani oblici (tablete, kapsule, tvrde

kapsule punjene uljem i meke gel kapsule) te uzorci različitih matriksa i složenih sastava (drugi prirodni hipolemici dodani crvenoj fermentiranoj riži).

Optimizacija kromatografskih uvjeta analize započela je testiranjem različitih kolona i različitih sastava pokretne faze kako bi se pronašli optimalni uvjeti razdvajanja. Ispitane su četiri kolone: Zorbax SB-C18, dimenzija 250 mm x 4,6, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka); Hypersil C18, dimenzija 150 mm x 4,6, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka); Symmetry C18 kolona, dimenzija 150 mm x 4,6, veličina čestica 3,5 μm (Waters, Milford, SAD) te XBridge C18 kolona, dimenzija 50 mm x 3,0, veličina čestica 2,5 μm (Waters, Milford, SAD). Svaka ispitana kolona imala je različitu hidrofobnost, silanolnu aktivnost, hidrolitičku stabilnost i interakciju s analitima, pa su omogućile različitu selektivnost. Kako je cilj svake analitičke metode osigurati točne i pouzdane rezultate u što kraćem vremenu, odabrana je XBridge C18 kolona, koja je omogućila razdvajanje analita s dobrim razlučivanjem i oblikom pikova uz najkraće vrijeme analize.

Odabir pH pokretne faze je među prvim koracima u razvoju nove HPLC metode. Pri analizi proizvoda s crvenom rižom pH medija je iznimno važan zbog interkonverzije između lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiseline. Taj se proces tijekom analize želi izbjeći kako ne bi došlo do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata, odnosno do značajnih odstupanja u točnosti i ponovljivosti metode. Proces interkonverzije je najmanji pri pH 4-5. Pri odabranim uvjetima analize ispitan je proces interkonverzije, te se pokazalo da je interkonverzija lovastatin u lovastatin β-hidroksi kiselinu, i obrnuto, manja od 1,4‰.

Nadalje, ispitan je različit sastav pokretne faze. Kao organsko otapalo odabran je acetonitril, jedno od najčešće upotrebljavanih otapala za tekućinsku kromatografiju. Prednost je dana acetonitrilu, naspram jednako često korištenog metanola, zbog nekoliko razloga. Prvi je već spomenuta mogućnost metilacije lovastatin β-hidroksi kiseline u metanolu tijekom analize, što se svakako htjelo izbjeći. Drugi razlog je manja polarnost acetonitrila u odnosu na metanol. Odabirom manje polarnog otapala, poput acetonitrila, lipofilniji monakolini se neće predugo zadržavati na koloni, dok bi korištenjem metanola kao organskog otapala, vrijeme analize sigurno bilo značajno duže. Osim toga, acetonitril ima najmanju UV-apsorbanciju, pa je najpogodniji za analize kod kojih je potrebna velika osjetljivost pri niskim valnim duljinama. Upravo je to bio slučaj u ovom istraživanju, jer se eventualno prisutni citrinin nalazi u iznimno malim količinama (ppb red veličine), a analiza se provodila pri valnoj duljini DAD detektora 237 nm. Nadalje, tlak koji se stvara u koloni je niži ako se koristi acetonitril,

nego ako se koristi metanol, a niži tlak omogućuje potencijalno brže protoke, što omogućuje bržu analizu.

Zatim su isprobane različite izokratne metode. Primjenom metoda različitog sastava u izokratnoj eluaciji je vrijeme zadržavanja lovastatina bilo predugo ili je citrinin izlazio prerano. Stoga se odlučilo koristiti gradijentnu metodu. Kao eluent A odabrana je voda u koju je dodano 10% acetonitrila, a kao eluent B koristio se acetonitril u koji je dodano 10% vode. Kako bi se postiglo željeno pH-područje te poboljšao oblik pikova, u oba otapala dodana je mravlja kiselina. Optimalnim se pokazao dodatak 0,05% mravlje kiseline u eluent B, dok je u eluent A dodano 0,1% mravlje kiseline. Isprobani su različiti gradijenti, koji su počinjali s 10, 20, 30 ili 40% eluenta A. Tijekom 20 minuta udio eluenta A povećavao se do 60, 70, 80 odnosno 90% eluenta A. Optimalnim se pokazao sljedeći binarni gradijentni program: udio eluenta B se linearno povećava od 40-70% od 0. do 7. minute, a zatim se od 7. do 10. minute udio eluenta B linearno povećava od 70-90%.

Nakon toga ispitane su različite brzine protoka pokretne faze. Pri ovom gradijentnom programu brzina protoka mogla je biti ubrzana od 0,5 do 1,0 mL/min. Pri protoku brzine 1,0 mL/min razlučivanje između analita je bilo zadovoljavajuće, a analiza najbrža. Ova brzina protoka bila bi prevelika za maseni spektrometar, pa je samo dio pokretne faze eluirane s tekućinskog kromatograma doveden do masenog spektrometra, i to u omjeru 1:2.

Utjecaj temperature kolone na razdvajanje analita ispitan je u rasponu od 20-35 °C. No povećanjem temperature iznad 25 °C citrinin je eluirao prebrzo i preblizu hidrofilnim sastavnicama crvene fermentirane riže.

Iako je osjetljivost DAD detektora u HPLC metodi za citrinin bila puno veća nego kod kapilarnoelektroforetske metode (zbog maloga optičkog puta u kapilari), postignute granice dokazivanja i određivanja nisu bile dovoljno niske za određivanje citrinina u količinama ispod dopuštene (100 ppb). Stoga je u analizu uključen i fluorescencijski detektor, koji zbog svoje selektivnosti ima vrlo nizak šum bazne linije, a time puno veću osjetljivost, čak i od masenog detektora. Valna duljina ekscitacije podešena je na 331 nm, a emisije na 500 nm (Reinhard i Zimmerli, 1999).

Maseni detektor je upotrijebljen za identifikaciju nepoznatih prisutnih monakolina u ispitivanim uzorcima crvene riže strukturnom karakterizacijom pomoću analize spektara i fragmentacijskih putova. Direktnim injektiranjem smjese standarda svih triju analita (γ = 0,2 μg/mL) u maseni spektrometar, brzinom 5 μl/min, optimizirani su uvjeti analize. Ispitana je brzina protoka dušika kao plina za sušenje (3 – 15 L/min), tlak dušika kao plina za raspršivanje pokretne faze u rasponu (5 – 20 psi), broj iona zadržanih u analizatoru (8 000 –

20 000), vrijeme zadržavanja iona u analizatoru (100 – 300 ms) te pozitivna i negativna ionizacija.

Kako bi se dobila što bolja osjetljivost, razlučivanje te informativni maseni spektri, optimizirani su uvjeti elektrosprej-ionizacije. Uvjeti ionizatora se odabiru s obzirom na sastav pokretne faze, brzinu protoka te vrstu i količinu uzorka. Pravilnim odabirom ionizacijskih uvjeta postižemo optimalnu brzinu isparavanja, što povećava učinkovitost ionizacije, a time i osjetljivost metode. Tlak plina za raspršivanje, brzina protoka i temperatura plina za sušenje ovise ponajprije o sastavu i brzini protoka pokretne faze. Što je brzina protoka veća, potreban je veći tlak plina za raspršivanje kako bi se smanjio volumen kapljica. Također, važna je temperatura te brzina protoka plina za sušenje. Što je brzina protoka pokretne faze veća, potrebna je i viša temperatura, no što je udio organskog otapala u mobilnoj fazi veći, učinkovito sušenje će se postići i pri nižoj temperaturi. Temperatura ionizatora ispitana je u rasponu od 300 – 350 °C. Najboljim se pokazala upravo temperatura od 350 °C, te je korištena u daljnjim analizama. Brzina protoka plina za sušenje ovisi o količini vode u pokretnoj fazi, pa veći udio vode zahtijeva brži protok plina za sušenje. Formirane kapljice će također uzrokovati značajniji šum u masenom spektru, pa se odabirom dovoljno visoke temperature i brzine protoka plina za sušenje može postići ravnija bazna linija. Nizom preliminarnih pokusa dobiveni su optimalni ionizacijski uvjeti, pa je za daljnja ispitivanja korišten dušik kao plin za sušenje i raspršivanje, pri protoku 10 L/min i tlaku 20 psi te temperaturi 350 °C.

Fragmentacija analita je provođena primjenom plina helija, održavajući energiju kolizije na 30%. Fragmentacija iona je ključna za stjecanje uvida u strukturu nepoznatih monakolina prisutnih u uzorcima s crvenom fermentiranom rižom, a time i njihovu identifikaciju, stoga je bilo važno ispitati utjecaj različitog napona na kapilari na fragmentaciju analita. Napon na kapilari utječe na naboj iona, desolvataciju i stupanj fragmentacije ispitivanih iona. Preliminarna istraživanja su pokazala da je optimalan napon na kapilari 3,5 kV. Nakon optimizacije uvjeta ionizatora, provedene su pozitivna i negativna ionizacija. Bolji signal i veća osjetljivost postignuti su pozitivnom ionizacijom, pa se ona koristila u daljnjim analizama.

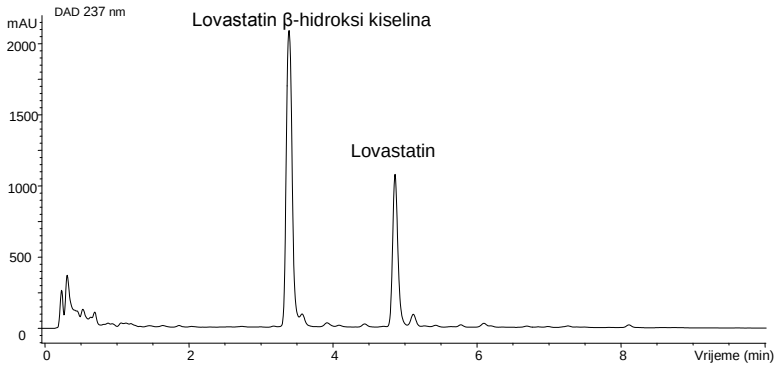
Kod optimiziranja uvjeta analizatora važno je osigurati da svaki pik ima barem 15 snimljenih točki. U skladu s tim odabire se i maksimalno vrijeme akumulacije, srednja vrijednost te kontrola naboja iona (engl. *Ion charge control*, ICC). Vrijeme akumulacije iona u zamci za ione je važan čimbenik u optimizaciji uvjeta analizatora. Elektrosprej-ionizator stvara veliki broj nabijenih čestica koje dolaze u analizator, a zamka za ione može zadržati

samo određeni broj iona prilikom analize zbog ograničenja koje određuju naboj i prostor. Ako se u analizatoru nađe prevelik broj iona, doći će do smanjenja razlučivanja, linearnoga dinamičkog raspona i točnosti molekulske mase analita. Kada se kontrola naboja iona provodi tijekom analize, onda se vrijeme akumulacije automatski prilagođava. Primjerice, dok je intenzitet signala analita slab, vrijeme akumulacije je dulje, a kako intenzitet signala raste, odnosno iona ima više, vrijeme akumulacije se automatski skraćuje, da bi se nakon eluacije analita ponovno produljilo.

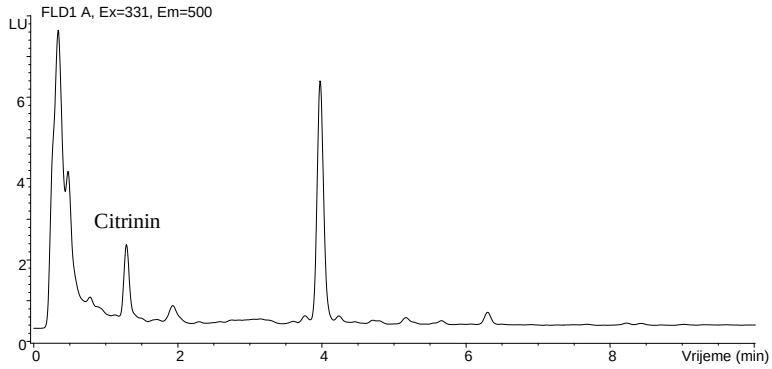
Ovo je nužno ako se prilikom analize mijenja koncentracija iona, što je zapravo slučaj kod prethodnoga kromatografskog razdvajanja, kakvo se provelo kod analize proizvoda s crvenom fermentiranom rižom. Stoga su kao optimalni odabrani uvjeti spektra snimanja *m/z* 100 – 600, broj zadržanih iona 10 000, vrijeme zadržavanja 200 ms.

Kromatogram smjese standarda lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina pri optimiziranim uvjetima HPLC-DAD-FLD-MS^n metode prikazan je na Slici 46. Vidljivo je da je postignuto i dobro razlučivanje među analitima u kratkom vremenu analize (< 10 minuta) te da su oblik i simetrija pika zadovoljavajući.

A



B



Slika 46. Kromatogram smjese standarda lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina pri optimiziranim uvjetima HPLC-DAD-FLD-MS^n metode. (A) DAD detektor, (B) FLD detektor

4.5.2 Validacija metode

Linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja

Linearnost metode za lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselinu ispitana je u rasponu od 1 – 500 μg/mL. Matične standardne otopine lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline razrjeđivane su dodatkom pokretne faze neposredno prije mjerenja te čuvane u autoinjektoru pri +4 °C. Linearnost za citrinin ispitana je u rasponu od 0,001 – 10 μg/mL. Matična standardna otopina citrinina nije razrjeđivana pokretnom fazom jer se uočilo da dolazi do raspadanja citrinina u kiselom mediju pokretne faze – tijekom 24 sata sadržaj citrinina smanjio se za oko 10%. Stoga je matična standardna otopina citrinina razrjeđivana metanolom. Za izradu svake kalibracijske krivulje koristilo se barem šest koncentracijskih razina. Linearno područje za citrinin je, naravno, različito za svaki od tri korištena detektora, pa su dobiveni rasponi linearnog područja te jednadžbe kalibracijskih krivulja s pripadajućim koeficijentima korelacije prikazani u Tablici 19. Vidljivo je da su svi koeficijenti korelacije visoki (r = 0,999), što ukazuje na zadovoljavajuću linearnost metode.

Granice dokazivanja i granice određivanja su dobivene injektiranjem serije razrijeđenih otopina analita poznatih koncentracija. LOD i LOQ određeni su kao koncentracija pri kojoj je omjer visine signala i šuma iznosio 3, odnosno 10. Vidljivo je da je linearno područje fluorescencijskog detektora najšire, te je ujedno i najosjetljiviji detektor s najnižom vrijednosti LOQ = 0,001 μg/mL. Stoga je fluorescencijski detektor korišten za određivanje citrinina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom, gdje su njegove očekivane količine iznimno niske (razine ppb). Za lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselinu DAD detektor je imao široko linearno područje te dovoljno niske vrijednosti LOD i LOQ, pa je korišten za određivanje ovih analita u ispitivanim proizvodima (Tablica 19), a pomoću masenog detektora je dodatno potvrđen identitet svih analita.

Tablica 19. Kalibracijski parametri lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina

Analit	*Linearno područje (μg/mL)*	*Jednadžba pravca*	*Koeficijent korelacije (r)*	*LOD (μg/mL)*	*LOQ (μg/mL)*
Lovastatin	1 – 500	y = 14,461 x – 35,047	0,999	0,10	0,30
Lovastatin β-hidroksi kiselina	1 – 500	y = 15,56 1x – 46,504	0,999	0,05	0,20
Citrinin – DAD detektor	0,1 – 10	y = 5,5496x + 0,0051	0,999	0,0300	0,1000
Citrinin – fluorescencijski detektor	0,001 – 10	y = 10,933x – 0,035	0,999	0,0005	0,0010
Citrinin – maseni detektor	0,005 – 10	y = 1098894,1 x + 245008,4	0,998	0,0016	0,0050

Preciznost i točnost

Kako bi se provjerilo daje li predložena HPLC-DAD-FLD-MS^n metoda točne i ponovljive rezultate, ispitane su točnost i preciznost metode.

Preciznost metode ispitana je tako da se u svaki reprezentativni tip uzorka (tableta, kapsula i meka gel kapsula) dodala smjesa poznatih količina standarda (5 μg/mL lovastatin, 5 μg/mL lovastatin β-hidroksi kiseline i 1 μg/mL citrinina). Cijeli ekstrakcijski postupak te HPLC-DAD-FLD-MS^n analiza provedeni su šest puta unutar istog dana kako bi se izrazila ponovljivost metode (Tablica 20). Srednja preciznost ispitana je trima mjerenjima kroz tri uzastopna dana. Rezultati su iskazani kao relativne standardne devijacije i prikazani u Tablici 21. Vidljivo je da su RSD vrijednosti za ponovljivost metode niže od 1,63%, dok je za srednju preciznost RSD manji od 3,77%. Stoga je moguće zaključiti da je novorazvijena HPLC-DAD-FLD-MS^n metoda za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom precizna.

Tablica 20. Ponovljivost HPLC-DAD-FLD-MS^n metode

Analit	*Ponovljivost RSD (%)*		
	Kapsule	Tablete	Meke gel kapsule
Lovastatin	0,15	0,24	1,37
Lovastatin β-hidroksi kiselina	0,70	0,56	0,70
Citrinin	1,63	0,65	1,02

Tablica 21. Srednja preciznost HPLC-DAD-FLD-MS^n metode

Analit	*Srednja preciznost RSD (%)*		
	Kapsule	Tablete	Meke gel kapsule
Lovastatin	0,28	1,34	3,42
Lovastatin β-hidroksi kiselina	1,11	1,42	1,33
Citrinin	3,77	3,76	1,80

Točnost metode ispitana je tako da je u svaki reprezentativni tip uzorka (tableta, kapsula i meka gel kapsula) dodana smjesa poznatih količina standarda. Točnost metode ispitana je na tri koncentracijske razine, niskoj (0,1 μg/mL za citrinin i 5 μg/mL za lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselinu), srednoj (1 μg/mL za citrinin i 25 μg/mL za lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselinu) i visokoj (5 μg/mL za citrinin i 150 μg/mL za lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselinu) koncentraciji analita. Sva su mjerenja provedena u triplikatu. Dobiveni rezultati iskazani su kao analitički prinos izmjerene koncentracije i poznate dodane koncentracije za svaki analit te su prikazani u Tablici 22. Moguće je uočiti da su nešto bolje vrijednosti dobivene pri višim koncentracijama analita nego nižim, no točnost metode je zadovoljavajuća budući da su analitički prinosi za sva tri analita, na svim ispitanim koncentracijskim razinama, u rasponu od 98 – 104 %.

Tablica 22. Točnost HPLC-DAD-FLD-MS^n metode

Analit	*Dodana koncentracija (μg/mL)*	*Analitički prinos (%)*		
		Kapsule	*Tablete*	*Meke gel kapsule*
Lovastatin	5	103,23	103,08	98,81
	25	99,05	100,58	98,98
	150	100,62	100,53	99,63
Lovastatin β-hidroksi kiselina	5	103,96	103,99	97,98
	25	98,21	98,24	98,20
	150	100,54	100,68	99,66
Citrinin	0,1	101,83	103,32	99,87
	1	100,03	98,40	99,22
	5	101,32	100,99	99,69

Stabilnost

Budući da je citrinin osjetljiv na temperaturu i kiseli medij pokretne faze, a lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselina mogu prolaziti kroz proces interkonverzije, provjerila se stabilnost uzoraka tijekom analize. Provjeren je utjecaj temperature i vremena, pa je ispitana kratkoročna (engl. *short-term*) i dugoročna (engl. *long-term*) stabilnost te stabilnost uzoraka u autoinjektoru. Provedena je analiza stabilnosti analita u standardnim otopinama i u reprezentativnim tipovima uzoraka (tableta, kapsula i meka gel kapsula), u koje je dodana smjesa poznatih količina standarda (5 μg/mL lovastatina, 5 μg/mL lovastatin β-hidroksi kiseline i 1 μg/mL citrinina). Kratkoročna stabilnost ispitana je pri sobnoj temperaturi tijekom šest sati, kako bi se osigurala stabilnost analita tijekom jednoga radnog dana. Dugoročna stabilnost uzoraka ispitana je nakon 10 dana čuvanja u zamrzivaču pri -20 °C. Također, ispitana je stabilnost uzoraka nakon stajanja u autoinjektoru pri +4 °C nakon 24 sata. Stabilnost je izražena analitičkim prinosom, a izračunata kao omjer koncentracije analita prilikom prvog mjerenja i koncentracije analita nakon drugog mjerenja. Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa su u rasponu 98,28% – 99,39%, što upućuje na zaključak da su u realnim radnim uvjetima mjerenja analiti stabilni, odnosno da ne dolazi do značajnog raspadanja lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina pri odabranim i optimiziranim uvjetima analize.

4.5.3 Primjena novorazvijene metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Nakon razvoja, optimizacije i validacije, HPLC-DAD-FLD-MS^n metoda je uspješno primijenjena za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom. Ispitana su dva različita uzorka crvene fermentirane riže te šest dodataka prehrani, a svi su komercijalno dostupni u trgovinama zdravom hranom i ljekarnama u Republici Hrvatskoj. Uzorci su pripremljeni prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.5, a ekstrakcijska učinkovitost postupka je provjerena kao što je navedeno u poglavlju 4.4.10. te prikazana u Tablici 23.

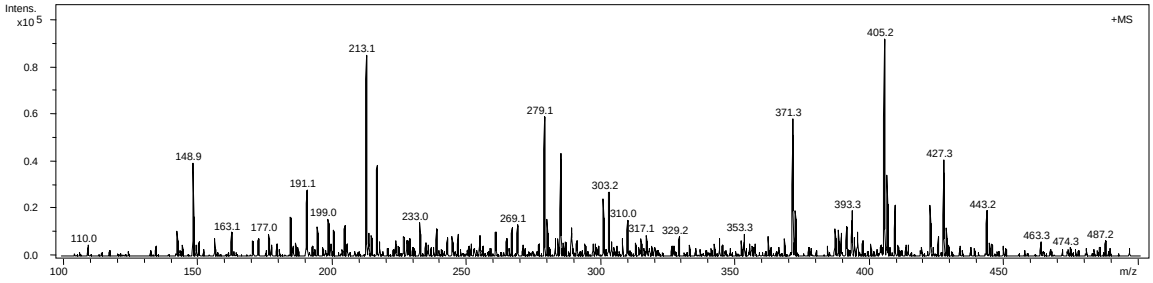
Tablica 23. Ekstrakcijska učinkovitost HPLC-DAD-FLD-MS^n metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Analit	*Postotak učinkovitosti (%)*		
	Kapsule	Tablete	Meke gel kapsule
Lovastatin	101,55	101,94	101,79
Lovastatin β-hidroksi kiselina	101,32	102,81	102,95
Citrinin	101,56	98,74	98,57

Osim što se htjelo kvantitativno odrediti sadržaj lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline, željelo se ispitati jesu li u analiziranim proizvodima prisutni i drugi monakolini, identificirati ih i odrediti im sadržaj. Da bi se odredila prisutnost nepoznatih monakolina, za koje u ovom istraživanju nisu bili dostupni standardi, provedena je analiza vezanim sustavom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Kako bi se dobio uvid i predložio fragmentacijski put monakolina, provedena je detaljna analiza i fragmentacija standarda lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline.

4.5.3.1 Mehanizam fragmentacije lovastatina

Ionizacijom lovastatina nastao je protonirani molekulski ion $(M+H)^+$ pri *m/z* 405. Na istom MS spektru mogu se uočiti i aduktori s ionom natrija $(M+Na)^+$ pri *m/z* 427 te aduktor s ionom kalija $(M+K)^+$ pri *m/z* 443 (Slika 47).



Slika 47. MS spektar lovastatina aduktora s natrijem (*m/z* 427).

U većini slučajeva najintenzivniji signal bio je signal aduktora s ionom natrija $(M+Na)^+$ pri *m/z* 427, pa je prvo snimljen njegov MS^2 spektar. Fragmentacijom iona pri *m/z* 427 dobiven je glavni fragment pri *m/z* 325, koji odgovora gubitku esterskog lanca (427 → 325), a vidljiva su i dva manja fragmenta pri *m/z* 310 i 295.

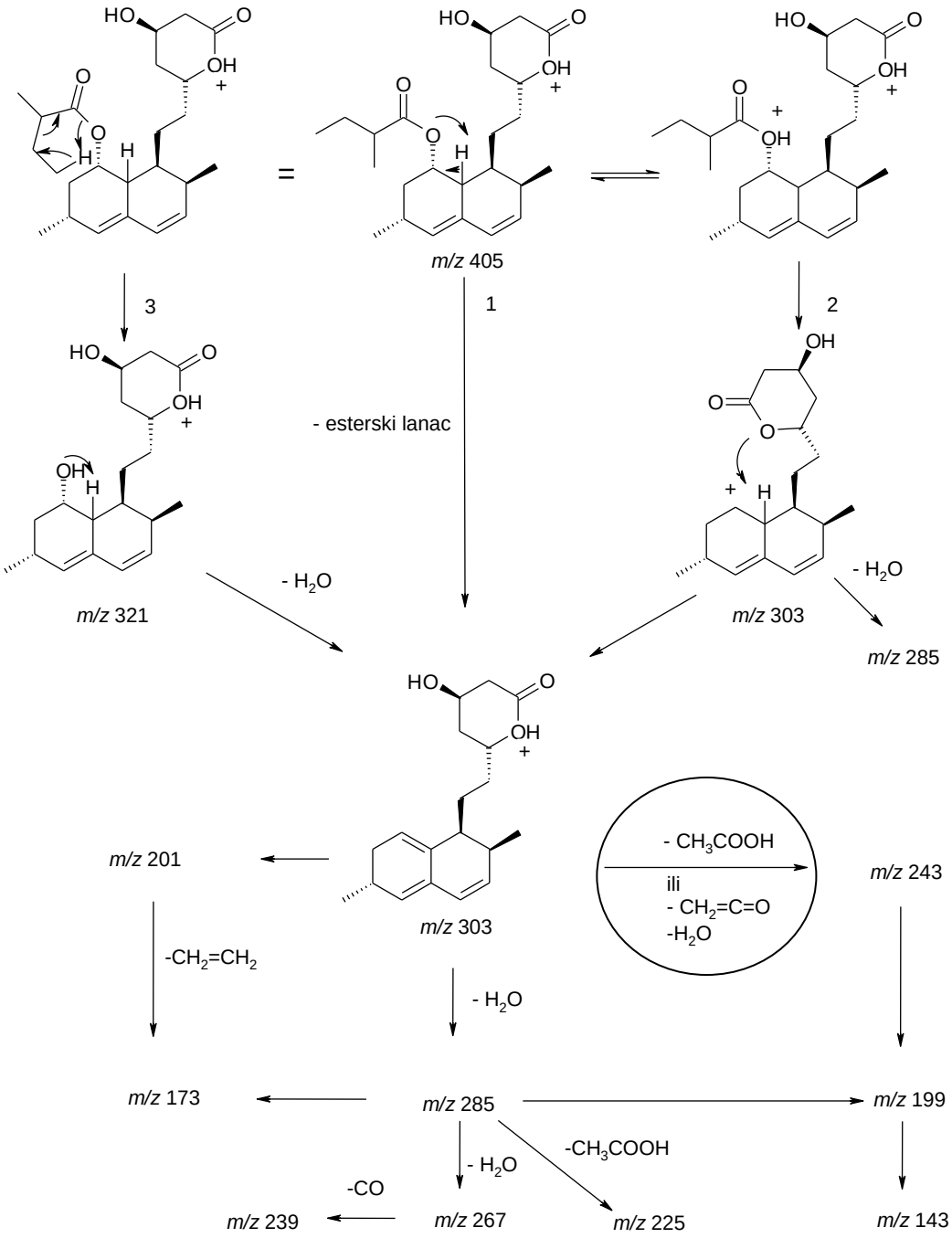
Zatim je snimljen MS^2 spektar molekulskog iona $(M+H)^+$ pri *m/z* 405. Dobiven je složeni MS spektar uz formiranje brojnih fragmentnih iona pri *m/z* 303, 285, 243 i 199. Uočeni su i manji fragmentacijski ioni, primjerice pri *m/z* 267 i 225. Gubitak mase od 102, koji je uočen kod lovastatina (405 → 303), odgovara gubitku esterskog lanca na β-naftalenskom prstenu. Kako isti ion pri *m/z* 303 nastaje fragmentacijom i molekulskog iona i aduktora s natrijem, očito je pucanje C-O veze i odvajanje esterskog lanca lagan i dominantan proces.

Postoji nekoliko načina kako dolazi do odvajanja esterskog lanca iz molekule lovastatina. Eliminacija esterskog lanca se najvjerojatnije odvija uslijed fragmentacije uzrokovane udaljenim nabojem (Hsu i Turk, 2000; Murphy i Harrison, 1994; Wang i sur., 2001). Drugi predloženi fragmentacijski put je direktno cijepanje C-O veze na C8 atomu prstena uz neutralni gubitak $CH_3CH_3CH(CH_3)COOH$ dijela (Wang i sur., 2001). Fragment nastao direktnim cijepanjem može zatim izgubiti molekulu vode i dati produkt *m/z* 285, ili može uslijediti unutarnja preraspodjela naboja s laktonskog na β-naftalenski prsten, pri čemu nastaje isti ion pri *m/z* 303 koji nastaje i fragmentacijom uzrokovanom udaljenim nabojem. Još jedan mogući, ali manje vjerojatan fragmentacijski put je preraspodjela u šesteročlanom

međuproduktu esterskog lanca, nakon čega se lanac odvaja, ali ostaje jedna hidroksilna skupina na položaju C8 β-naftalenskog prstena te se dobiva fragmentni ion pri *m/z* 321 (Wang i sur., 2001). Nakon toga slijedi gubitak molekule vode i nastaje isti fragmentni ion pri *m/z* 303, koji može nastati i prethodno spomenutim fragmentacijskim putovima. Ion *m/z* 321 dobili su Jemal i suradnici, koji su proučavali simvastatin u laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku (Jemal i sur., 2000). Budući da se simvastatin i lovastatin razlikuju samo u dodatnoj metilnoj skupini na esterskom, pretpostavka je da nakon odvajanja tog lanca fragmentacijski put za obje molekule ide istom shemom. Jemal i suradnici su predložili drugačiju fragmentacijsku shemu. Njihov fragmentni ion pri *m/z* 321 nastao je uz gubitak - esterskog lanca te uz otvaranje laktonskog prstena adicijom molekule vode. Nakon toga se fragmentni ion *m/z* 303 dobiva dehidracijom na dijelu molekule koji je nekad bio u laktonskom prstenu, a potom ponovno dolazi do laktonizacije uz gubitak metilne skupine na položaju C6. Isti autori su ipak predložili i drugi fragmentacijski put koji odgovara onom koji su predložili i Wang i suradnici. U istraživanjima provedenima u ovom radu fragmentni ion pri *m/z* 321 nije uočen, što je u skladu s ispitivanjima koje su proveli Wang i suradnici, koji su pokazali da je ovaj ion jako teško dobiti, pa je takav predloženi fragmentacijski put malo vjerojatan.

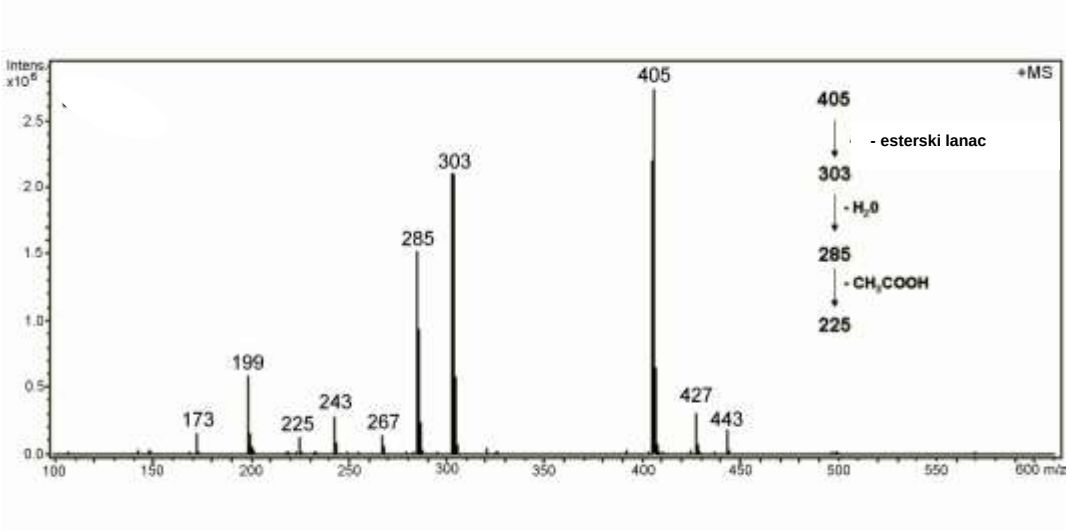
Zatim je provedena daljnja analiza iona *m/z* 303, čime je dobiven MS^3 spektar. Fragmentacijski ion pri *m/z* 285 odgovara gubitku molekule vode (18 Da) nakon što se odvoji esterski lanac (303 → 285). Nakon neutralnog gubitka vode iz fragmenta *m/z* 303, može nastati nekoliko produkata, pa je strukturu fragmentacijskog iona *m/z* 285 moguće samo predložiti (Wang i sur., 2001). Nakon toga vjerojatno slijedi gubitak molekule CH_3COOH uz otvaranje laktonskog prstena, čime nastaje fragmentni ion pri *m/z* 225.

Fragmentni ion pri *m/z* 243 dobiva se drugim pretpostavljenim fragmentacijskim putem iz iona *m/z* 303, pri čemu se odmah odvaja molekula CH_3COOH. Alternativni prijedlog dobivanja iona *m/z* 243 prikazan je na Slici 48 (zaokruženo) (Wang i sur., 2001). Cjelokupna shema predloženih mogućih fragmentacijskih putova lovastatina prikazana je na Slici 48.



Slika 48. Predloženi fragmentacijski putovi lovastatina.

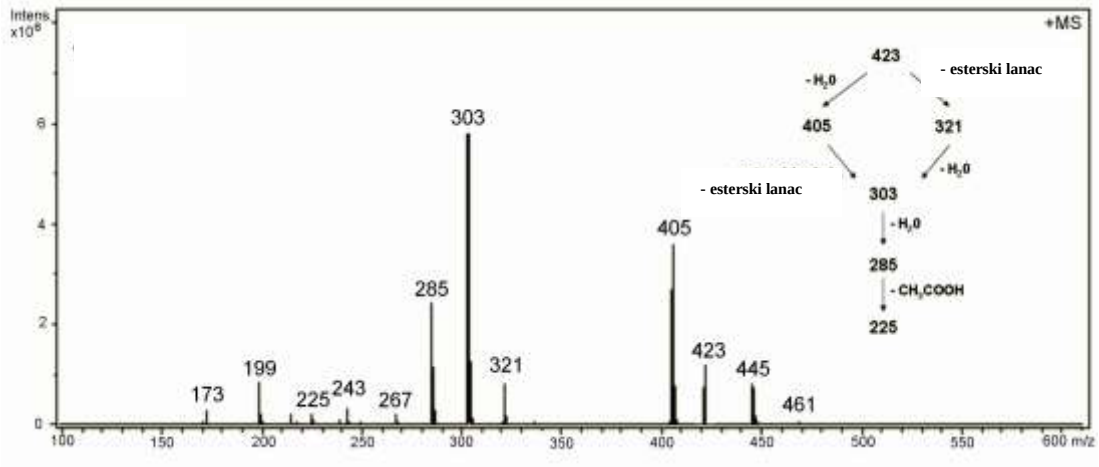
U istraživanju provedenom u ovom radu MS analizom dobiveni su glavni fragmentni ioni pri *m/z* 303, 285 i 225, pa je najvjerojatniji mehanizam fragmentacije lovastatina odvajanje esterskog lanca putem fragmentacije uslijed djelovanja udaljenog naboja ili direktnog cijepanja na položaju C8. Dobiveni fragment *m/z* 303 gubi molekulu vode uz formiranje fragmentnog iona *m/z* 285, nakon čega slijedi otvaranje laktonskog prstena i eliminacija molekule CH_3COOH (Slika 49).



Slika 49. MS spektar lovastatina i predložena shema fragmentacije.

4.5.3.2 Mehanizam fragmentacije lovastatin β-hidroksi kiseline

LC-MS analizom lovastatin β-hidroksi kiseline dobiveni su ioni pri *m/z* 423, što odgovara molekulskom ionu $(M+H)^+$, te ioni pri *m/z* 445 i 461, što odgovara aduktorima s ionom natrija $(M+Na)^+$ i ionom kalija $(M+K)^+$ (Slika 50).



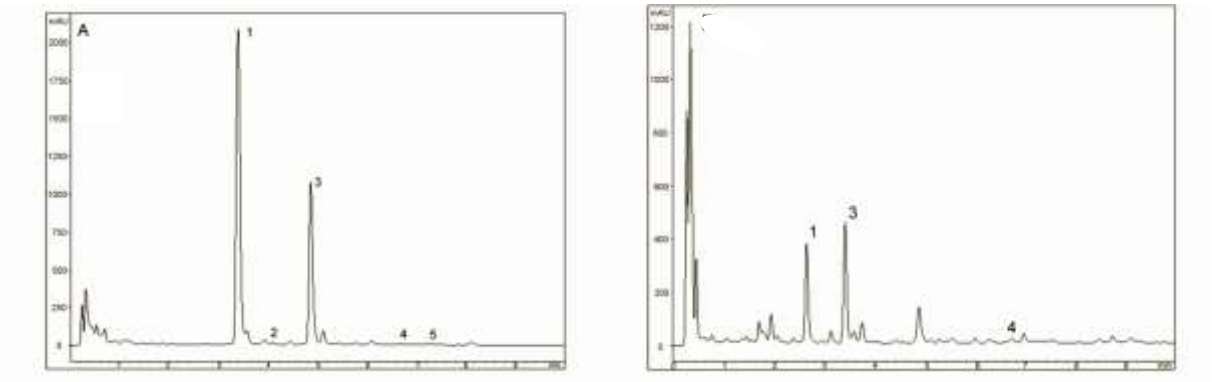
Slika 50. MS spektar lovastatin β-hidroksi kiseline i predložena shema fragmentacije.

Signal pri *m/z* 405 je vrlo dominantan, nastaje uslijed gubitka vode iz molekule lovastatin β-hidroksi kiseline, čime se umjesto molekulskog iona pri *m/z* 423 već pri snimanju MS spektra dobivao fragmentni ion. Kako bi se dobio uvid u fragmentacijsku shemu lovastatin β-hidroksi kiseline, provedena je fragmentacija iona pri *m/z* 423 i dobiven je složeni MS^2 spektar s fragmentnim ionima pri *m/z* 405, 321, 303, 285, 264, 243, 225 te 199.

Očito je da je fragmentacijski put lovastatin β-hidroksi kiseline sličan onome lovastatina, jer se najprije dobiva fragmentni ion gubitkom esterskog lanca (423 → 321). Signal je pri *m/z* 321 vrlo slab, za razliku od fragmentnog iona pri *m/z* 303. Moguća su dva fragmentacijska puta: gubitak esterskog lanca te potom molekule vode, i obrnuto, da se prvo izdvoji molekula vode, a zatim eliminira esterski lanac (Slika 49). U oba slučaja iz nastalog iona izdvaja se još jedna molekula vode, što generira produkt *m/z* 285. Fragmentni ion pri *m/z* 225 dobiven je ponovno gubitkom molekule CH_3COOH iz fragmenta *m/z* 285.

4.5.3.3 Identifikacija ostalih monakolina i njihov mehanizam fragmentacije

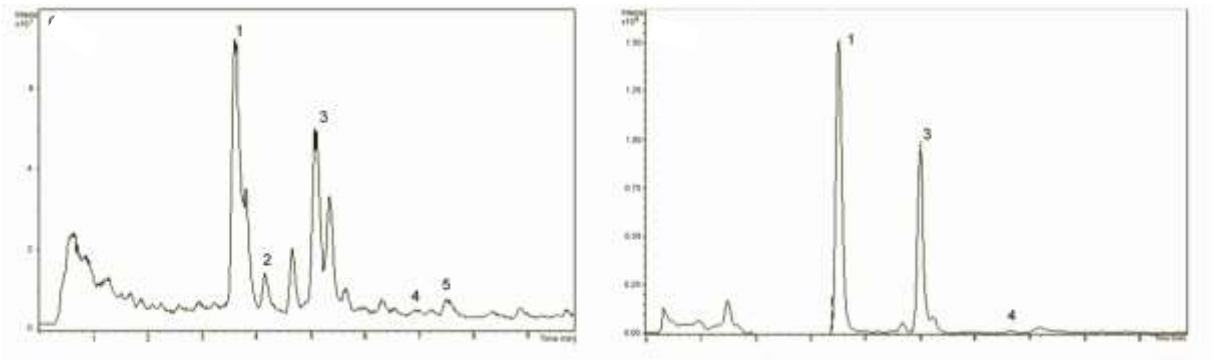
Već je na kromatogramu dobivenom DAD detektorom uočeno da su uzorci crvene fermentirane riže, analizirani u ovom radu, složeni s velikim brojem sastavnica, odnosno kromatografskih pikova. Kod nekoliko uzoraka je uočeno da četiri pika pokazuju slične UV apsorpcijske spektre kao i lovastatin, s apsorpcijskim maksimumom pri 237 nm. Na Slici 51. prikazani su reprezentativni kromatogrami.



Slika 51. Reprezentativni HPLC-DAD kromatogrami Uzoraka 1 i 4.
Pikovi: 1 = lovastatin β-hidroksi kiselina, 2 = monakolin L, 3 = lovastatin, 4 = monakolin M, 5 = dehidromonakolin K.

Kako bi se utvrdilo spadaju li ovi spojevi zaista u skupinu monakolina, provedena je njihova detaljna strukturna karakterizacija vezanim sustavom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Korištena je ista HPLC metoda koja je razvijena za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom.

Prvo se provelo potpuno skeniranje koje daje karakterističnu kromatogram toka ukupnih iona (Slika 52). Na temelju ovog kromatograma dobiva se opća slika svih iona, odnosno analita u uzorku.



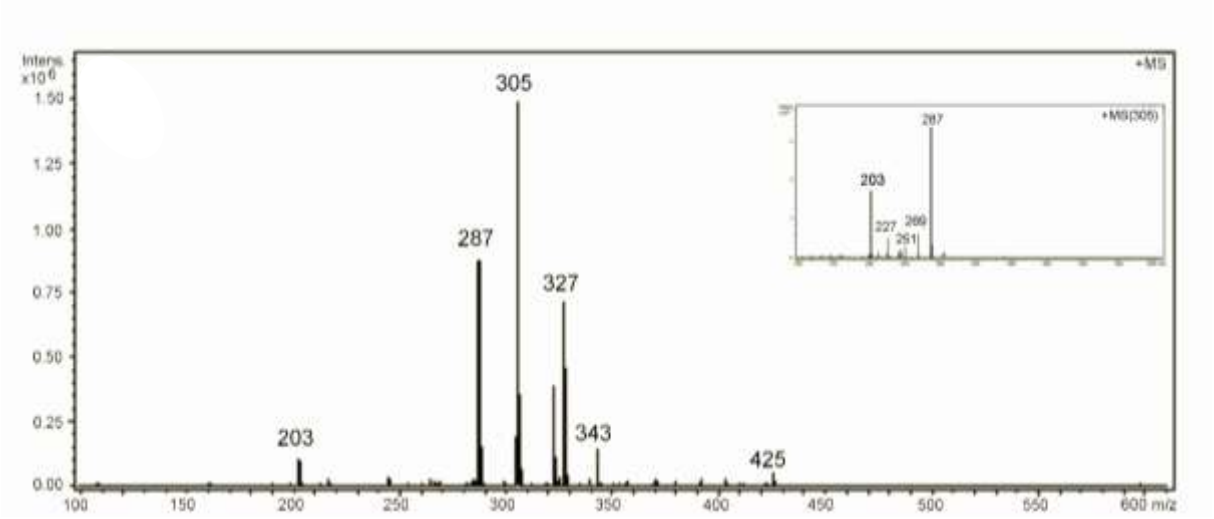
Slika 52. Reprezentativni kromatogram toka ukupnih iona (TIC) uzoraka 1 i 4.
Pikovi: 1 = lovastatin β-hidroksi kiselina, 2 = monakolin L, 3 = lovastatin, 4 = monakolin M, 5 = dehidromonakolin K.

Kako bi se prikupili preliminarni rezultati, na temelju kojih bi se moglo zaključiti koji pikovi odgovaraju spojevima iz skupine monakolina, provedena je fragmentacija praćenjem višestruke reakcije, odnosno u MRM načinu snimanja koji omogućuje istovremeno praćenje deset različitih iona i njihove fragmentacije. Na ovaj način se u kratkom vremenu, odnosno kroz nekoliko analiza, dobiva uvid u fragmentacijski put za nekoliko iona istovremeno. U ovom istraživanju tako je bilo moguće nakon nekoliko provedenih HPLC-MS analiza dobiti uvid u potencijalne fragmentacijske putove analita te razlučiti koji ioni odgovaraju monakolinima.

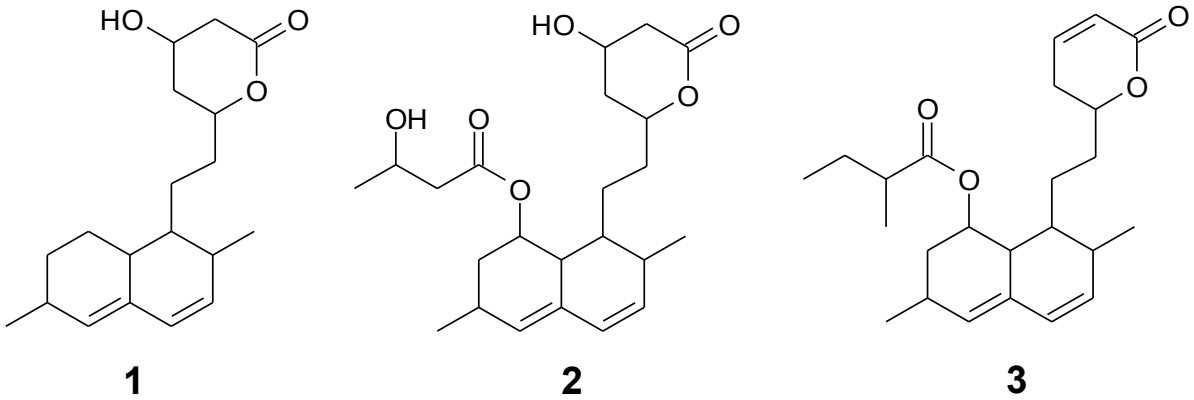
Na temelju podataka dobivenih na kromatogramu toka ukupnih iona i onih dobivenih fragmentacijom iona praćenjem višestruke reakcije, za detaljniju i precizniju analizu promatra se pojedinačni ion (engl. *Selected Reaction Monitoring*, SRM). Pri MS analizi zadaju se vremenski fragmenti, pri čemu se u svakom pojedinom fragmentu odabere ion koji će se fragmentirati [engl. *Manual* MS(n)]. Moguće je zadati dva prijelaza, pa se pri prvoj analizi dobije MS^n (n = 3) spektar svakog iona. Svakom daljnjom analizom moguće je za svaki vremenski fragment odabrati ionizaciju ne samo molekulskog iona već i njegovih fragmenata dobivenih prvom analizom. Na taj način mogu se dobiti MS^n spektri, pri čemu je n = 4, n = 5 ili čak i više. U većini slučajeva koristili su se MS^2, MS^3 i MS^4 spektri, dok su podaci dobiveni daljnjim fragmentacijama davali iznimno male i općenite fragmente, koji nisu doprinosili uvidu u strukturu sastavnice. Na temelju MS spektara i fragmentacijskih shema dobivenih analizom poznatih standardnih otopina lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline mogla se pretpostaviti struktura te se moglo identificirati nepoznate monakoline prisutne u ispitivanim proizvodima.

Na Slici 53. prikazan je MS spektar kromatografskog pika čije vrijeme zadržavanja iznosi 4,10 minuta. Ovaj analit davao je molekulski ion pri *m/z* 305, a vidljivi su i aduktori s

natrijem i kalijem pri *m/z* 327, odnosno 343. Umetak Slici 53. prikazuje MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 305, gdje su vidljivi fragmenti *m/z* 287, 269, 251, 227 i 203. Fragment *m/z* 287 predstavlja gubitak mase od 18 Da, što odgovara neutralnom gubitku vode. Uspoređivanjem s podacima iz literature (Li i sur., 2004) moguće je zaključiti da pik koji ima vrijeme zadržavanja 4,10 minuta i molekulski ion *m/z* 305 te dobivenu fragmentacijsku shemu odgovara monakolinu L (Slika 54).

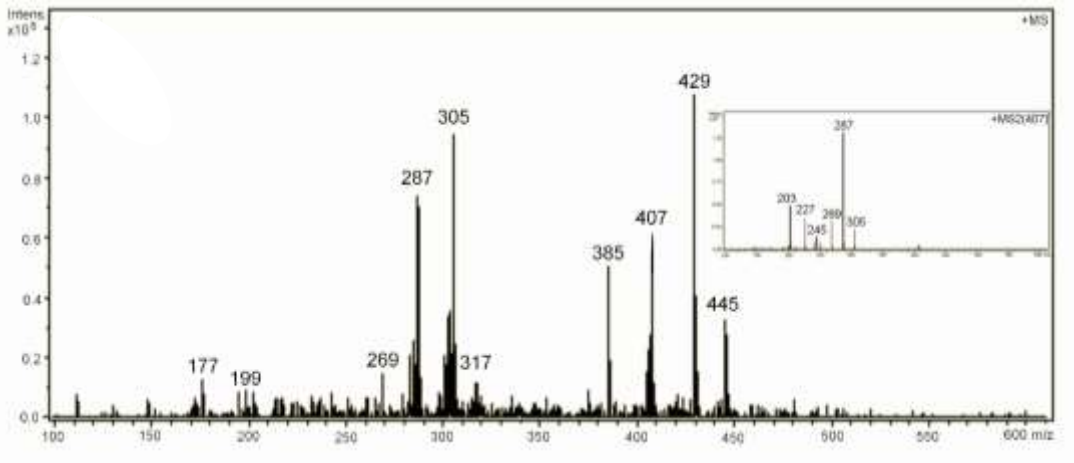


Slika 53. Maseni spektar monakolina L. Umetak slici: ESI-MS^2 spektar molekulskog iona *m/z* 305.



Slika 54. Struktura monakolina L (1), monakolina M (2) i dehidromonakolina K (3).

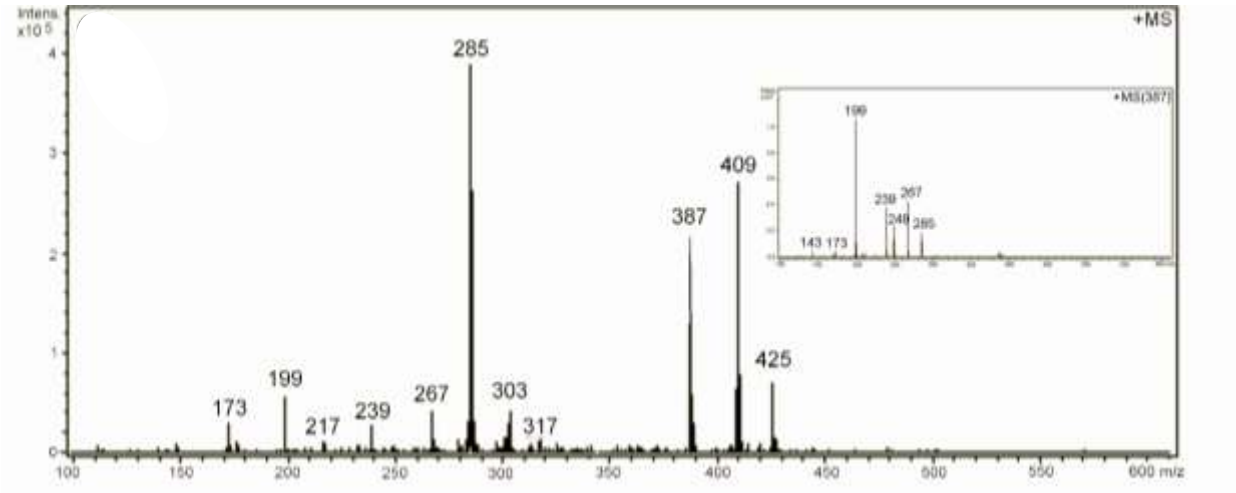
Idući kromatografski pik koji je pokazivao sličan UV apsorpcijski spektar kao i lovastatin eluirao je u 6,62 min. Masenom spektrometrijom dobiven je spektar koji je pokazao molekulski ion pri *m/z* 407. Ponovno su bili vidljivi aduktori s natrijem i kalijem pri *m/z* 429, odnosno 445 (Slika 55).



Slika 55. Maseni spektar monakolina M. Umetak slici: ESI-MS² spektar molekulskog iona *m/z* 407.

MS² spektar molekulskog iona *m/z* 407 pokazao je fragmentne ione pr *m/z* 305, 287, 269, 245, 227 i 203 (Umetak Slici 55). Prijelaz 407 → 305 odgovara gubitku esterskog lanca na položaju C8, pri čemu nije došlo do formiranja dvostruke veze na položaju C8 uz gubitak atoma vodika, kao kod lovastatina. Dominantni ion *m/z* 287 dobiven je neutralnim gubitkom vode nakon što se iz molekule odvojio esterski lanac. Daljnja fragmetacija se odvija sličnim putem kao i kod lovastatina. Na temelju dobivenih MS i MS^2 spektara i pretraživanjem literature moguće je zaključiti da je riječ o monakolinu M (Slika 54).

Pik s vremenom zadržavanja t_R = 7,29 min također je pokazivao isti UV apsorpcijski spektar kao i lovastatin. Stoga je provedena njegova detaljna MS karakterizacija. Dobiveni MS spektar (Slika 56) pokazao je molekulski ion pri *m/z* 387 te aduktore s natrijem i kalijem pri *m/z* 409 i 425.



Slika 56. Maseni spektar dehidromonakolina K. Umetak slici: ESI-MS² spektar molekulskog iona *m/z* 387.

Već je na MS spektru vidljiv dominatni ion *m/z* 285, što se podudara s jednim od većih iona u MS spektru lovastatina. Prijelaz 387 → 285 odgovara gubitku esterskog lanca na položaju C8, dobivenog MS^2 analizom (Umetak slici 56). Fragmentni ion *m/z* 267 dobiven je neutralnim gubitkom molekule vode nakon što se iz strukture odcijepio esterski lanac.

Razmatrajući gore opisanu fragmentacijsku shemu, moguće je zaključiti da pik s vremenom zadržavanja tr = 7,29 min odgovara monakolinu koji ima relativnu molekulsku masu 386, dehidromonakolinu K (Slika 54).

4.5.3.4 Određivanje sadržaja monakolina

Nakon što su, primjenom tehnike tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane s masenom spektrometrijom, identificirani i drugi prisutni monakolini u nekim od ispitivanih uzoraka, pristupilo se određivanju sadržaja lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i drugih monakolina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom. Za određivanje sadržaja lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline korištene su kalibracijske krivulje dobivene primjenom standardne otopine analita koristeći DAD detektor. Za ostale pronađene i identificirane monakoline, monakolin L, monakolin M i dehidromonakolin K, standardne otopine nisu bile dostupne. Budući da se željelo odrediti sadržaj ukupnih monakolina prisutnih u ispitivanim proizvodima s crvenom fermentiranom rižom, za kvantifikaciju ova tri monakolina korištena je jednadžba dobivena prilikom izrade kalibracijske krivulje za lovastatin.

U Tablici 24. prikazan je sadržaj lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i ostalih monakolina u svim ispitanim proizvodima s crvenom fermentiranom rižom. Iz rezultata je vidljivo da je u prehrambenim proizvodima količina lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiseline značajno niža nego u dodacima prehrani.

Rezultati analize dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom upućuju na značajne razlike u sadržaju među proizvodima, kao i velika odstupanja od vrijednosti navedenih na deklaraciji. U Uzorcima 2, 3 i 5 dominantno je prisutan lovastatin, dok je u Uzorcima 1 i 4 pronađeno značajno više lovastatin β-hidroksi kiseline. Štoviše, u Uzorku 6 prisutna je jedino lovastatin β-hidroksi kiselina.

Ostali monakolini nisu pronađeni u svim analiziranim uzorcima. Monakolin L prisutan je Uzorcima 2, 3 i 5. Monakolin M pronađen je u pet ispitanih dodataka prehrani, Uzorcima 1, 2, 3, 4 i 5, pri čemu je količina monakolina M u Uzorku 5 ispod granice određivanja. Dehidromonakolin K pronađen je u Uzorcima 1, 2, 3 i 5. Pronađene količine ostalih

monakolina uglavnom su značajno manje nego lovastatina, odnosno lovastatin β-hidroksi kiseline. Značajnija količina ostalih monakolina pronađena je jedino u Uzorku 2, gdje je količina monakolina L, monakolina M i dehidromonakolina K iznosila ukupno 3277 μg/g.

Tablica 24. Sadržaj lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina u prehrambenim proizvodima i dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom analiziranima HPLC-DAD-FLD-MS^n metodom

Uzorak	*Prehrambeni proizvodi*		*Dodaci prehrani*					
	P1	**P2**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Lovastatin (μg/g)[a,b]	<LOQ	4,4	3760	8056	6276	510	6950	ND
Lovastatin kiselina (μg/g)[a,b]	25,1	15,8	7644	513	228	1351	2236	47
Citrinin (ppb)[a,]	ND[f]	ND	95	98	ND	ND	ND	ND
Monakolin L (μg/g)[b,c]	ND	ND	ND	239	21	ND	85	ND
Monakolin M (μg/g)[b,c]	ND	ND	6	246	24	12	<LOQ	ND
Dehidromonakolin K (μg/g)[b,c]	ND	ND	13	2792	414	ND	25	ND
Ukupni monakolini (μg/g)[c, d]	25,1	20,2	11423	11846	6963	1873	9296	47
Količina monakolina u dnevnoj dozi (mg)	2,01	1,62	11,42	11,85	3,48	6,37	4,65	0,05
Nađeno/deklarirano (%)[e]	NL[g]	NL	76,2	118,7	116,1	NL	154,9	2,0

[a] srednja vrijednost triju mjerenja
[b] pronađeno u gotovom proizvodu
[c] sadržaj monakolina L, monakolina M i dehidromonakolina K je izračunat koristeći jednadžbu pravca dobivenu za kalibracijsku krivulju lovastatin
[d] sadržaj ukupnih monakolina
[e] nađena količina monakolina/deklarirana vrijednost (%)
[f] ND – nije pronađeno
[g] NL – sadržaj nije naveden na proizvodu

U proizvodima koji u svom sastavu sadrže nekoliko prirodnih hipolipemika (poput fitosterola, polifenola ili omega-3 masnih kiselina), sadržaj lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline u prosjeku je niži nego u proizvodima koji sadrže samo crvenu fermentiranu rižu. To je farmakološki opravdano, budući da u navedenim uzorcima ukupnom hipolipemičkom učinku pridonose i druge sastavnice. Nažalost, u tim proizvodima se javlja i zabrinjavajuće veliko odstupanje od deklariranog sadržaja (2,0 – 154,9%).

Jedan od proizvoda, Uzorak 4, nije bio standardiziran, pa na deklaraciji nije naveden ni udio lovastatina (monakolina K) ni ukupnih monakolina, već je samo navedeno da proizvod sadrži 0,6 g ekstrakta crvene riže. Kod proizvoda koji su imali deklarirani sadržaj, neki su navodili udio lovastatina, a neki ukupnih monakolina. Nažalost, pronađeni sadržaj u odnosu na deklarirani kretao se u rasponu od iznimno niskih 2,0% kod Uzorka 6, do jako visokih 154,9% kod Uzorka 5. Pri tome niti jedan proizvod nije imao pronađeni sadržaj u odnosu na deklarirani u rasponu 100 ± 10%.

U Tablici 24. također su preračunate i izražene dnevne doze monakolina koje pacijent uzima koristeći pojedini ispitani proizvod, pridržavajući se uputa o količini dnevnog unosa. Iz ovih podataka je vidljivo da postoje značajne razlike u dnevnom unosu ukupnih monakolina ovisno o tome koji se dodatak prehrani s crvenom fermentiranom rižom koristi. Naime, raspon se kreće od 0,05 mg ukupnih monakolina u Uzorku 6, što nema gotovo nikakav farmakološki učinak, do visokih 11,85 mg u Uzorku 2. Ukupni monakolini u Uzorcima 1 i 2 od 11,42 mg odnosno 11,85 mg su već u razini terapijskih doza (terapijske doze lovastatina su u rasponu 10 – 80 mg/dan).

4.5.3.5 Određivanje sadržaja citrinina

Citrinin, kao sekundarni produkt metabolizma gljivica roda *Monascus*, *Aspergillus* i *Penicillium*, također se može naći u crvenoj fermentiranoj riži. Postoje brojna istraživanja provedena na hrani, posebice žitaricama, koja su pokazala da se citrinin može naći u hrani u velikim količinama, pa i do 2000 μg/kg (Harwig i sur., 1979; Hokby i sur., 1979; Janardhana i sur., Martinis i sur., 2002; Sishijima, 1984; Tanaka i sur., 2007; Vella i sur., 1995). Ispitivanja provedena na dodacima prehrani su rjeđa, ali su također ukazala na mogućnost i opasnost da se na tržištu nalaze dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom koji sadrže i nefrotoksični citrinin (Blanc i sur., 2005; Wang i sur., 2005). Primjenom novorazvijene HPLC-DAD-FLD-MS^n metode na ispitivane uzorke prozvoda s crvenom fermentiranom rižom, upravo je iznimno specifični i osjetljivi fluorescencijski detektor (LOD = 0,0005 μg/mL) omogućio identifikaciju i određivanje sadržaja citrinina u ovim proizvodima. U crvenoj fermentiranoj riži citrinin nije nađen. No u dva ispitana dodatka prehrani s crvenom fermentiranom rižom je pronađen. U Uzorku 1 određena je količina citrinina 95 ppb, dok je u Uzorku 2 nađeno 98 ppb citrinina. Obje koncentracije ne prelaze preporučenu koncentraciju onečišćenja citrininom Europske komisije od 100 ppb. Stoga je na temelju ovih rezultata

moguće zaključiti da su analizirani proizvodi s crvenom fermentiranom rižom sigurni za ljudsku primjenu s obzirom na sadržaj citrinina.

4.5.3.6 Ispitivanje ujednačenosti sadržaja između serija proizvoda s crvenom fermentiranom rižom

Budući da su uočene razlike između sadržaja lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline u analiziranim proizvodima dvjema novorazvijenim metodama, kapilarnoelektroforetskom i HPLC-DAD-FLD-MS^n metodom, nametnulo se pitanje postoje li razlike u sadržaju djelatnih tvari između različitih ispitanih serija proizvoda.

Kako bi se provjerila ujednačenost sadržaja između pojedinih serija proizvoda s crvenom fermentiranom rižom, HPLC-DAD-FLD-MS^n metodom su analizirani proizvodi različitih LOT brojeva, odnosno različitih serija proizvodnje. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da je kod većine proizvoda dobivena zadovoljavajuća ujednačenost sadržaja (RSD $\leq$ 2,16%). No neki ispitani proizvodi pokazali su značajne razlike u sadržaju lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline između pojedinih serija proizvodnje, pa je primjerice za jedan proizvod razlika bila značajna (RSD = 14,8%).

4.5.4 Usporedba novorazvijene MEKC i HPLC-DAD-FLD-MS^n metode za analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom s postojećim analitičkim metodama

Postoji nekoliko HPLC metoda za određivanje lovastatina i citrinina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom, ali u pravilu to nisu bile simultane metode za istovremeno određivanje obaju analita. Chen i Hu (2005) su koristili UV-detektor za određivanje lovastatina, dok su za citrinin koristilu ELISA test. Drugo istraživanje koristilo je dvije potpuno različite metode, HPLC-DAD za određivanje sadržaja lovastatina, dok je citrinin određen HPLC-MS metodom (Pattanagul i sur., 2008). Becker i suradnici (2009) su objavili rad u kojem su lovastatin i ostale monakoline određivali HPLC metodom, no citrinin je kao potencijalni toksični nusprodukt detektiran isključivo primjenom TLC metode. Pregledom literature pronađene su samo dvije HPLC metode, istih autora, s vrlo malom promjenom u sastavu pokretne faze, za istovremenu analizu lovastatina i citrinina (Lee i sur., 2006; Wu i sur., 2011). Kao detektor za lovastatin korišten je detektor s nizom fotodioda (PDA), dok je za citrinin korišten fluorescencijski detektor. Ostali monakolini nisu određivani tim metodama, a vrijeme analize iznosilo je u obje metode oko 20 minuta.

Do sada je objavljena samo jedna CE metoda za određivanje lovastatina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom (Li i sur., 2007b). Nedostatak predložene metode je što je lovastatin preveden u lovastatin β-hidroksi kiselinu, pa se analizirao i određivao samo kiselinski oblik kapilarnom zonskom elektroforezom. Kao što je ranije navedeno, u crvenoj fermentiranoj riži nalaze se i lovastatin i lovastatin β-hidroksi kiselina, dok se na deklaraciji na proizvodu najčešće govori samo o standardizaciji na monakolin K, odnosno lovastatin. Prema tome, ovom metodom ne može se dobiti uvid u zasebni sadržaj lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline u ovim proizvodima.

Stoga je u ovom doktorskom radu razvijena i validirana nova kapilarnoelektroforetska metoda za istovremenu analizu lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i nefrotoksičnog citrinina (Nigović i sur., 2013). Umjesto uobičajenih HPLC metoda, micelarno elektrokinetičko kromatografska metoda je značajno jeftinija i ekološki prihvatljivija zbog iznimno malih volumena uzorka i otapala koji su potrebni tijekom analiza. Metoda je prikladna za određivanje sadržaja lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline u različitim dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom. Osim toga, dovoljno je osjetljiva da otkrije citrinin prisutan u tragovima (razina ppb) u proizvodima različitog sastava, matriksa i ljekovitog oblika. MEKC metoda je brza, potpuno automatizirana i primjenjiva za kontrolu kvalitete dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom. Postignuto je dobro razdvajanje uz visoku učinkovitost u kratkom vremenu analize. Vrijeme analize je kraće od dvije minute, što je iznimno brzo, pogotovo u usporedbi s dugačkim vremenom analize postojećih HPLC metoda od 20 minuta i više. Nedostatak kapilarne elektroforeze u odnosu na HPLC metode je najčešće slabija osjetljivost i manja izdržljivost metode. Problem osjetljivosti, pogotovo za određivanje citrinina koji se očekivao u vrlo malim koncentracijama, riješen je jednostavnim korakom prilikom obrade uzoraka za analizu, uparavanjem do suha u struji dušika. Na taj način je ponovno otopljeni suhi ostatak bio deset puta koncentriraniji, odnosno LOD i LOQ metode su sniženi za otprilike red veličine. Nadalje, primjena kapilare s proširenjem na mjestu detektora omogućila je dodatno povećanje osjetljivosti za oko tri puta. Problem robusnosti metode, odnosno slabija preciznost i točnost CE u odnosu na HPLC metode, riješena je primjenom unutarnjeg standarda, pravastatina. Tako je preciznost metode bila dobra (RSD < 3,23%), dok je ispitivanjem robusnosti odstupanje bilo prihvatljivo (RSD < 3,90%).

Budući da se željelo odrediti i eventualno prisutne druge monakoline, razvijena je HPLC metoda koja je koristila tri detektora (Mornar i sur., 2013). DAD detektor se koristio za identifikaciju i određivanje sadržaja lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline, dok se fluorescencijski detektor koristio za određivanje citrinina. Primjenom masene spektrometrije

uspješno su identificirana tri druga monakolina prisutna u nekima od proizvoda. Njihov sadržaj, budući da standardi za sve monakoline nisu bili na raspolaganju, određen je primjenom DAD detektora prema kalibracijskoj krivulji lovastatina. Kao što je ranije navedeno, do sada je objavljeno nekoliko HPLC metoda, uz primjenu DAD i MS detektora, samo za određivanje monakolina u dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom (Chairote i sur., 2008; Gordon i sur., 2010; Heber i sur., 1999; Huang i sur.; Li i sur., 2005; 2006). No vrijeme analize u ovim metodama je dugačkih 20 – 40 minuta. Nedavno je objavljena brza metoda direktnog injektiranja u maseni spektrometar, bez prethodnog razdvajanja na koloni. No unatoč vremenu analize od jedne minute, metoda je primjenjiva samo za polu-kvantitativna mjerenja lovastatina. Do sada su razvijene samo dvije HPLC metode za istovremenu analizu lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina (Lee i sur., 2006; Wu i sur., 2011). No u predloženim metodama sadržaj ostalih monakolina prisutnih u dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom nije se određivao. Stoga je novorazvijena HPLC-DAD-FLD-MS^n metoda prva metoda koja omogućuje istovremeno određivanje sadržaja lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline, ostalih monakolina te citrinina u prehrambenim proizvodima te dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom. Kraće vrijeme analize (10 min) nego u postojećim HPLC metodama omogućuje primjenu novorazvijene metode u rutinskoj analizi ovih proizvoda. Priprema uzorka je vrlo jednostavna, brza i ne zahtijeva dodatne tehnike i postupke obrade. Stoga se predložena metoda može koristiti za kontrolu kvalitete u svrhu procjene učinkovitosti i sigurnosti dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom.

4.6 RAZVOJ NOVE BRZE METODE MASENE SPEKTROMETRIJE PRIMJENOM IZRAVNOG INJEKTIRANJA ZA ANALIZU MONAKOLINA

Budući da se na tržištu nalazi veliki broj dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom, potrebna je brza, jednostavna i učinkovita metoda koja bi mogla otkriti krivotvorene proizvode. Masena spektrometrija primjenom izravnog injektiranja je najbrži mogući način pouzdane identifikacije, koji će odmah dati kvalitativne rezultate ima li u ispitanom proizvodu tražene djelatne tvari ili nema.

Za složene matrikse, kakve imaju analizirani dodaci prehrani, uobičajeni analitički pristup obuhvaća kromatografsko razdvajanje kako bi se željeni analit izolirao. Ovakav pristup pretpostavlja strogu kontrolu kromatografskog procesa kako bi se osigurali točni, precizni i ponovljivi rezultati. Kod velikog broja uzoraka trošenje kromatografske kolone je neizbježno, uslijed čega dolazi do značajnih promjena u dobivenim rezultatima; ponajprije se narušava simetrija kromatografskog pika, dolazi do njegova razvlačenja i krivljenja. Za laboratorije koji se bave rutinskim analizama velikog broja uzoraka potrebne su što jednostavnije metode, koje veliki broj uzoraka mogu analizirati u kratkom vremenu.

Masena spektrometrija primjenom izravnog injektiranja postala je dobra alternativa uobičajenim analitičkim protokolima, koji u pravilu uključuju kromatografsko razdvajanje, a zatim identifikaciju primjenom MS detektora. Primjenom izravnog injektiranja u MS analizator moguće je izbjeći zahtjevnu i dugotrajnu predobradu uzoraka. Smanjenjem koraka u njihovoj pripremi izbjegavaju se moguće pogreške poput kontaminacije uzorka, pogrešaka u razrjeđivanju, gubitaka tijekom ukoncentriravanja i slično. Prije MS analize primjenom izravnog injektiranja nužno je optimizirati MS parametre kako bi se postigla željena selektivnost i osjetljivost metode, razlučivanje te informativni maseni spektri. U ovom istraživanju ispitan je utjecaj sljedećih parametara: napon na kapilari, tlak plina za raspršivanje, brzina protoka plina za sušenje, temperatura ionizatora. Optimizacija MS parametara je provođena primjenom smjese svih ispitivanih uzoraka, brzinom protoka 5 μL/min.

Napon na kapilari utječe na učinkovitost provođenja iona kroz otvor kapilare i ionizacijsku djelotvornost, tako što stvara željene kapljice nabijenog aerosola. Naime, napon na kapilari utječe na naboj iona, desolvataciju i stupanj fragmentacije ispitivanih iona. Promjene u naponu utječu na brzinu iona i njihovu kinetičku energiju, što poslije uzrokuje razliku u energiji kolizije, a to za posljedicu ima različite fragmentacijske mehanizme. Kako

bi se pronašao optimalan napon na kapilari, ispitan je raspon od 2,5 – 4,0 kV, uz povećanja od 0,5 kV. Najveći intenzitet signala za ispitivane analite postignut je primjenom napona od 3,5 kV. Pravilnim odabirom ionizacijskih uvjeta postižemo optimalnu brzinu isparavanja, što povećava učinkovitost ionizacije, a time i osjetljivost metode. Što je brzina protoka kojom se uzorak unosi u maseni spektrometar veća, potreban je veći tlak plina za raspršivanje kako bi se smanjio volumen kapljica. Ako je brzina protoka plina za sušenje premala, zbog formiranih kapljica pojavit će se šiljci u masenom spektru, odnosno uzrokovat će značajniji šum. S druge strane, previsoka temperatura plina za sušenje može uzrokovati značajnije stvaranje aduktora molekulskog iona s natrijem. Prvo je ispitan utjecaj temperature plina za sušenje u rasponu od 250 – 350 °C, uz promjene od 25 °C. Također je važna brzina protoka plina za sušenje. Što je brzina protoka injektiranja uzorka u maseni spektrometar veća, potrebna je i viša temperatura, no što je udio organskog veći, učinkovito sušenje će se postići i pri nižoj temperaturi. Najintenzivniji signali dobiveni su pri temperaturama 325 °C i 350 °C. Kako bi se izbjegao mogući raspad analita pri visokim temperaturama, za daljnje analize odabrana je temperatura plina za sušenje od 325 °C. Pri ovoj stalnoj temperaturi ispitana je brzina protoka plina za sušenje u rasponu od 1 – 12 L/min. Rezultati provedenih pokusa pokazali su da su signali najvećih intenziteta dobiveni pri protoku 5 L/min. Tlak plina za raspršivanje utječe na učinkovitost raspršivanja tako što razbija tok otapala u aerosolnu maglicu s kapljicama različite veličine, dok uzorci nošeni otapalom dolaze prema ulazu u MS. Tlak plina za raspršivanje ispitan je u rasponu 10 – 60 psi, uz povećanja tlaka od 5 psi. Pri tlaku od 15 psi dobivena je fina maglica bez prekidanja na vrhu igle za raspršivanje te je osigurana najbolja osjetljivost ispitivanih analita. Na temelju provedenih pokusa dobiveni su optimalni ionizacijski uvjeti, pa je za daljnja ispitivanja korišten dušik kao plin za sušenje i raspršivanje, pri protoku 5 L/min i tlaku 15 psi te temperaturi 325 °C.

Kako se najbolja osjetljivost elektrosprej-ionizacije postiže za analite koji su već u otopini bili ionizirani, pH uzoraka je prilagođen dodatkom odgovarajućih pufera, kiseline ili lužine. Nehlapljivi puferi i aditivi nisu se koristili budući da mogu uzrokovati porast šuma, supresiju signala i kontaminaciju izvora iona, što smanjuje osjetljivost metode. Na temelju provedenih pokusa može se zaključiti da su signali najvećeg intenziteta dobiveni dodatkom 0,1% mravlje kiseline.

Kako bi se omogućilo učinkovito hvatanje iona u analizatorskom dijelu stupice za ione, unutar sustava dovodi se plin helij. Naime helij nabijenim iona oduzima dio energije i na taj način osigurava da se barem dio iona zadrži i akumulira unutar analizatora. Helij je istovremeno korišten i kao plin za fragmentaciju iona uz energiju kolizije od 30%. Tijekom

fragmentacije iona u masenom analizatoru koji sadrži stupicu za ione, za razliku od ostalih MS/MS detektora, samo su prekursorski ioni izloženi koliziji s helijom, pa dobiveni produktni ioni sadrže malu količinu energije i ne prolaze daljnu fragmentaciju. Ovo je vrlo važno kod strukturne karakterizacije nepoznatih spojeva, gdje je potreban jasan uvid u svaki korak fragmentacije. Na taj način se može pretpostaviti da su dobiveni fragmentni ioni rezultat samo jednog koraka fragmentacije. Budući da je stupica za ione tip analizatora u kojemu se ioni tijekom analize pohranjuju, kako bi se poboljšao omjer signala i šuma, odnosno osjetljivost metode i omogućila identifikacija analita prisutnih u nekom uzorku u tragovima, moguće je akumulirati mali broj iona, tijekom dužeg vremena. Ioni su unutar analizatora stoga zadržavani 200 ms. Spektar snimanja masa iona korišten u ovom istraživanju bio je u rasponu od *m/z* 15 – 600. Korišten je relativno uski raspon omjera m/z kako bi se smanjilo potrebno vrijeme skeniranja masenog spektrometra, a time i vrijeme analize. Na ovaj način se omogućuje veći broj snimanja točki u pojedinom piku, što će rezultirati boljim signalom te manjim šumom. Korištenjem užeg *m/z* raspona akumulira se više ciljanih iona u kraćem vremenu. Osim toga, bilo je potrebno ponovno optimizirati uvjete kontrole naboja iona. Ispitan je broj iona zadržanih u analizatoru u rasponu od 10 000 – 50 000. Povećanjem broja iona smanjivalo se razlučivanje mase i točnost uslijed proširenja pikova u MS spektru. To je posljedica ograničenja analizatora stupice za ione, koja u određenom prostoru može pohraniti samo određeni broj iona, odnosno naboja. Stoga je za daljnju analizu proizvoda s crvenom fermentiranom rižom unutar analizatora zadržavano 10 000 iona.

Nakon što je metoda optimizirana, provedena je validacija. Budući da je riječ o kvalitativnoj metodi, od validacijskih parametara potrebno je ispitati jedino selektivnost. Selektivnost je ispitana praćenjem molekulskog iona analita, kao i fragmentacijom za dodatnu potvrdu. Ostale sastavnice ispitanih uzoraka nisu utjecale na identifikaciju lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i ostalih monakolina primjenom masenog spektrometra, pa je metoda selektivna.

Analiza uzoraka provodila se primjenom MRM načina snimanja. Kako bi se odabrao najintenzivniji roditeljski i fragmentni ion koji bi se koristili u identifikaciji primjenom MRM načina snimanja, provedena je detaljna fragmentacija ispitivanih analita. U crvenoj fermentiranoj riži moguće je naći 14 monakolina, no više od 90% ukupnih monakolina otpada na lovastatin (monakolin K) i lovastatin β-hidroksi kiselinu (monakolin K kiselinu). Na temelju detaljne analize fragmentacijskog mehanizma lovastatina i lovastatina β-hidroksi kiseline, opisanih u poglavljima 4.5.3.2 i 4.5.3.3 te ostalih monakolina, opisanih u poglavlju

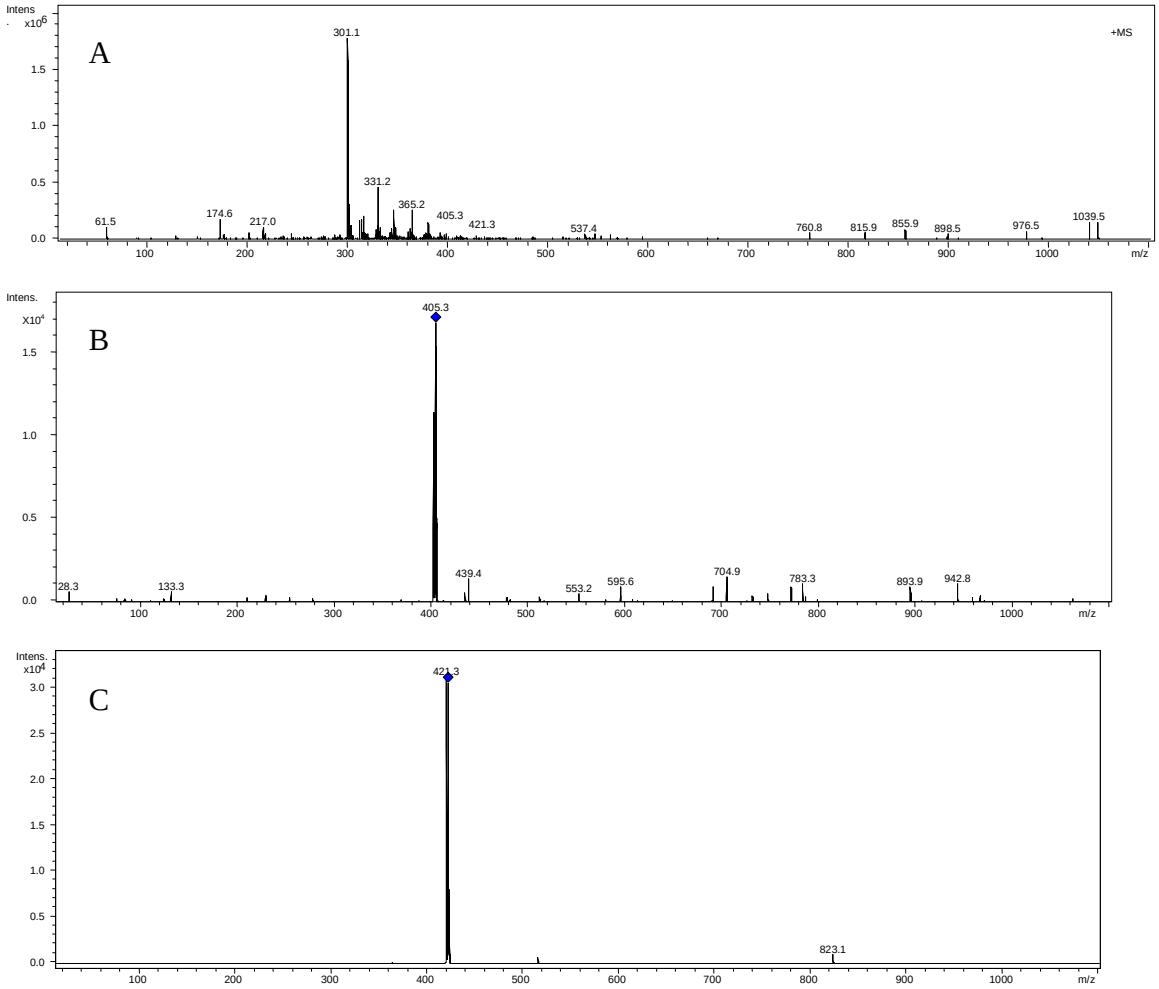
4.5.3.4, pristupilo se identifikaciji djelatnih sastavnica u analiziranim proizvodima s crvenom fermentiranom rižom. Svi uzorci snimani su u triplikatu.

U oba analizirana uzorka crvene fermentirane riže pronađena je lovastatin β-hidroksi kiselina, dok je lovastatin pronađen samo u jednom ispitivanom proizvodu. U crvenoj fermentiranoj riži nisu identificirani ostali spojevi iz skupine monakolina. Lovastatin je davao signal najvećeg intenziteta za ion *m/z* 405, koji odgovara protoniranoj molekuli lovastatatina $[M+H]^+$. Molekulski ion je fragmentacijom davao kompleksan ESI-MS^2 spektar uz formiranje nekoliko fragmentnih iona pri *m/z* 303, 285, 243 i 199. Formiranje iona *m/z* 303, nastalog fragmentacijom molekulskog iona, posljedica je gubitka bočnoga esterskog lanca, nakon čega slijedi neutralni gubitak molekule vode, pri čemu nastaje ion *m/z* 285. Na MS spektru lovastatin β-hidroksi kiseline vidljiv je karakterističan molekulski ion $[M+H]^+$ pri *m/z* 423. ESI-MS^2 analiza molekulskog iona *m/z* 423 dala je fragmentne ione pri *m/z* 405, 321, 303, 285, 264, 243, 225 i 199. Lovastatin (monakolin K) je nađen u ispitanim uzorcima dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom, osim u jednom analiziranom proizvodu, u kojem je primjenom predložene ESI-MS^n metode identificirana samo lovastatin β-hidroksi kiselina (monakolin K kiselina). U jednom ispitanom dodatku prehrani s crvenom fermentiranom rižom pomoću razvijene ESI-MS^n metode identificirani su i spojevi iz skupine monakolina: monakolin L, monakolin M i dehidromonakolin K.

Nedostatak predložene ESI-MS^n metode je nedovoljna osjetljivost za određivanje mikotoksina citrinina u uzorcima s crvenom fermentiranom rižom. Nadalje, metoda nije u potpunosti automatizirana budući da se radi izravno injektiranje svakoga pojedinačnog uzorka primjenom vanjske injekcijske pumpe. Ako su potrebne analize velikog broja uzoraka, gdje je automatizacija nužna, metodu je moguće modificirati, pa umjesto izravnog injektiranja koristiti *flow injection* metodu vezanu s masenom spektrometrijom, u kojoj se uzorci, također bez prethodnoga kromatografskog razdvajanja, nošeni pokretnom fazom HPLC sustava, unose u maseni spektrometar. Naravno, nedostatak predložene metode je što se može primijeniti samo u kvalitativnoj i polukvantitativnoj analizi.

Prednosti novorazvijene ESI-MS^n metode su brojne, no svakako je najveća jednostavnost i brzina. Primjenom izravnog injektiranja izbjegnuto je skupo, vremenski zahtjevno i neekološko kromatografsko razdvajanje. Općenito su analitičke metode poput ove predložene sve popularnije u istraživanjima zbog svoje jednostavnosti jer ne traže složenu pripremu uzorka, prethodno razdvajanje sastavnica te potvrdu identiteta pomoću standardnih supstancija. Predložena ESI-MS^n metoda može poslužiti kao tehnika izbora za analizu crvene fermentirane riže. Selektivnost i osjetljivost metode omogućuju identifikaciju lovastatina,

lovastatin β-hidroksi kiseline i ostalih monakolina, prisutnih u tragovima u ispitivanim proizvodima. Na ovaj način moguće je izdvojiti lažne ili krivotvorene proizvode s crvenom fermentiranom rižom. ESI-MS^n metoda razvijena u ovom radu omogućuje brzo određivanje kemijskog profila dajući detaljnu informaciju o prisutnim karakterističnim sastavnicama.



Slika 57. MS spektar dodatka prehrani koji sadrži nekoliko različitih prirodnih hipolipemika (A), kromatogrami izoliranih iona EIC (405) (B) i EIC (421) (C).

Predloženom metodom moguće je identificirati i druge spojeve, pa će predmet daljnjih istraživanja biti analiza ostalih djelatnih hipolipemičkih sastavnica u uzorcima koji, osim crvene fermentirane riže, u svom sastavu imaju i druge prirodne hipolipemike, poput artičoke, niacina, L-arginina, soje, gama-orizanola, polikonazola, fitosterola i drugih spojeva s hipolipemičkim učinkom (Slika 57).

Općenito, ovakav tip analize bi se mogao, zbog svoje jednostavnosti i brzine, koristiti u rutinskoj analizi velikog broja uzoraka u laboratorijima regulatornih agencija, posebice u ispitivanju lažnih lijekova i dodataka prehrani.

4.7 OSVRT NA DOBIVENE REZULTATE ANALIZE PROIZVODA S CRVENOM FERMENTIRANOM RIŽOM

Dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom su proizvodi koji se sve više koriste. Najčešće ih upotrebljavaju ljudi koji ne žele provoditi medikamentozno liječenje statinima ili drugim hipolipemicima, već su skloniji koristiti „prirodne“ proizvode. Također ih često koriste pacijenti kod kojih su se javile nuspojave na terapiju statinima, pa su se odlučili za korištenje „prirodnih“ hipolipemika. Ponekad i liječnici preporučuju liječenje prirodnim hipolipemicima pacijentima s granično povišenim razinama kolesterola.

Veliki problem je što većina pacijenata, a nažalost i neki zdravstveni radnici, nisu svjesni činjenice da crvena fermentirana riža sadrži brojne spojeve s hipolipemičkim učinkom, a najvažniji, monakolin K, odnosno lovastatin, registriran je kao lijek. Naime, proizvodi s crvenom fermentiranom rižom na deklaraciji najčešće navode sadržaj monakolina K, a tek upućeni korisnik će znati da je taj spoj istovjetan lovastatinu. Stoga je jako važno da liječnik i ljekarnik kod preporuke i izdavanja ovih proizvoda naglase pacijentu da proizvod sadrži lovastatin. U skladu s tim će proizvodi imati isti mehanizam djelovanja kao i statini, inhibiciju enzima HMG-Co A reduktaze, ali i moguće nuspojave, interakcije i kontraindikacije. Moguće nuspojave primjene crvene fermentirane riže su glavobolja, nadutost, mučnina, proljev, konstipacija, bol u abdomenu, dispepsija, mialgija i grčevi u mišićima. Kao i svi statini, i ovi proizvodi mogu biti miotoksični i hepatotoksični. Interakcije statina, pa tako i proizvoda s crvenom fermentiranom rižom, s drugim lijekovima su brojne. Kao primjer može se istaknuti makrolide (eritromicin, klaritromicin), zatim ciklosporin, blokatore kalcijevih kanala (diltiazem, verapamil), amiodaron te derivate fibrične kiseline, ezetimib i niacin. Proizvodi s crvenom fermentiranom rižom ne smiju se koristiti s lijekovima iz skupine statina, a pacijenti to nažalost rade jer nisu upoznati s činjenicom da se u ovim proizvodima već nalazi lovastatin. Nadalje, ovi proizvodi su kontraindicirani u trudnoći (zbog teratogenosti statina) i tijekom dojenja, kod starijih osoba, osoba s oštećenom funkcijom jetre i bubrega te u nekim drugim stanjima i oboljenjima.

No osim problema interakcija, nuspojava i duple terapije prilikom korištenja dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom, postoji i problem kvalitete ovih proizvoda. Istraživanja provedena na njima ukazala su na problem standardizacije i odstupanja sadržaja lovastatina od deklarirane vrijednosti (Gordon i sur., 2010; Heber i sur., 2001). Stoga je i glavni cilj ovog dijela istraživanja bio razviti nove analitičke metode koje bi omogućile istovremenu analizu, identifikaciju i određivanje sadržaja lovastatina, lovastatin β-hidroksi

kiseline i citrinina, toksičnog nusprodukta fermentacije, a zatim ih primijeniti za analizu komercijalno dostupnih prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom.

Problem standardizacije je vrlo složen i obuhvaća nekoliko aspekata. Prvi je već spomenuto iskazivanje sastava glavne djelatne sastavnice nazivom monakolin, a ne lovastatin. Nadalje, proizvođači dodataka prehrani standardizaciju ponekad potpuno krivo upotrebljavaju, jer se izraz „standardizirano na 1% monakolina K“ može odnositi na sadržaj monakolina, ali i na standardizirani postupak uzgoja i proizvodnje crvene fermentirane riže za koji se očekuje da će imati 1% monakolina K. Osim toga, izražavanje sadržaja, a time i djelotvornosti crvene fermentirane riže samo količinom monakolina K (lovastatina) nije dostatno. Naime, deklariranjem sadržaja samo lovastatina ne dobiva se potpuna i točna slika nekoga prirodnog hipolipemika. Kao što je pokazano u ovom istraživanju, na tržištu se nalaze proizvodi koji u svom sastavu imaju prisutan isključivo β-hidroksi kiselinski oblik lovastatina. Farmakološki to možda i ne predstavlja veliku razliku, jer će oba oblika, kiselina kao aktivni oblik, a lakton kao pro-lijek, iskazati hipolipemički učinak, inhibirajući enzim HMG-CoA reduktazu. No ako se ispituje kvaliteta proizvoda koja, između ostalog, uključuje upravo ispitivanje deklariranog sadržaja, onda je potrebno puno preciznije iskazivanje sadržaja proizvoda s crvenom fermentiranom rižom, odnosno razviti analitičke metode koje će moći pratiti sadržaj lovastatina u oba oblika, laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku. Osim lovastatina u laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku, proizvodi s crvenom fermentiranom rižom mogu u svom sastavu imati i druge monakoline (u ovom istraživanju drugi monakolini pronađeni su u Uzorcima 1, 2, 3, 4 i 5). To svakako upućuje na potrebu za detaljnijom deklaracijom ovih proizvoda, jer je očito da standardizacija sadržaja samo na količinu lovastatina ne odražava nužno i pravi sadržaj ukupnih monakolina koji će iskazati farmakološki učinak, ali i moguće interakcije te nuspojave.

U prehrambenim proizvodima s crvenom fermentiranom rižom mala količina lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline određena analizama provedenim u ovom radu je očekivana, budući da se konzumiraju velike količine riže. Primjerice, u azijskim zemljama, koje tradicionalno jedu crvenu fermentiranu rižu kao sastojak normalne svakodnevne prehrane, moguć je unos i do 55 grama crvene fermentirane riže dnevno (Heber i sur., 1999). Prehrambeni proizvodi s crvenom fermentiranom rižom se nalaze u slobodnoj prodaji u trgovinama hranom, gdje nisu popraćeni savjetom zdravstvenog djelatnika. Mnoge osobe se odlučuju za redovitu primjenu crvene fermentirane riže u svojoj prehrani zbog njezina specifičnog okusa i arome. Potrebno je istaknuti da osobe koje konzumiraju crvenu

fermentiranu rižu kao uobičajenu dnevnu prehranu unose oko 1 mg lovastatina dnevno. Nažalost, deklaracije na ovim proizvodima ni sa čime ne upućuju korisnika da ovaj proizvod u sebi sadrži registrirani lijek te njegove moguće interakcije i nuspojave.

Rezultati dobiveni u ovom radu, u kojem je provedeno ispitivanje sadržaja lovastatina, njegove β-hidroksi kiseline i ostalih monakolina u dodacima prehrani s crvenom fermentiranom rižom, zabrinjavajući su i porazni. Sadržaj monakolina u odnosu na deklarirani sadržaj na proizvodu bio je u rasponu od 11 – 178% kod proizvoda analiziranih CE metodom, odnosno 2 – 155% kod proizvoda analiziranih HPLC metodom. Pronađene su čak i velike neujednačenosti sadržaja između pojedinih serija proizvoda (RSD ≤ 15%). Značajna odstupanja od deklarirane vrijednosti i između pojedinih serija proizvoda zahtijevaju strožu i češću kontrolu kvalitete proizvoda.

Uzme li se u obzir da kod Uzoraka 3 i 4 količina monakolina koja se unese u organizam dnevnom dozom odgovara vrijednosti od oko 11 mg lovastatina, znači da ovi proizvodi sadrže terapijske količine lovastatina. Stoga je još jednom potrebno naglasiti važnost kontrole kvalitete dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom. Nadalje, rezultati analiza provedenih u ovom radu upućuju na potrebu za strožom i detaljnijom standardizacijom dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom. Na taj način bi se zajamčila ista biološka aktivnost ovih prirodnih hipolipemika, dakle isti terapijski, odnosno farmakološki učinak svih dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom na tržištu, a sve u svrhu osiguranja učinkovitog, sigurnog i kvalitetnog proizvoda koji će pacijenti koristiti.

5. ZAKLJUČAK

U ovom doktorskom radu razvijeno je i validirano, u skladu s ICH smjernicama, šest novih analitičkih metoda:

1. CE metoda za istovremenu analizu statina atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina i simvastatina.
Tijekom razvoja metode ispitan je utjecaj vrste i pH pufera, koncentracije SDS surfaktanta, vrste i volumnog udjela organskog otapala, vrste kapilare, temperature, vremena i tlaka injektiranja te napona pri kojem se analiza odvija, na razlučivanje, učinkovitost metode, vrijeme analize, površinu i oblik pika te osjetljivost predložene metode. Predložena metoda je brza (5 min) i omogućava identifikaciju i određivanje sadržaja bilo kojeg od šest statina registriranih u Europskoj uniji te je prva CE metoda u svijetu razvijena za ovu primjenu.

2. MEKC metoda za analizu atorvastatina i njegovih četiriju onečišćenja, dijastereomera atorvastatina, desfluoroatorvastatina, metilnog estera atorvastatina i laktona atorvastatina.
Za praćenje onečišćenja atorvastatina, prisutnih u iznimno malim količinama, veća osjetljivost metode osigurana je korištenjem *bubble cell* kapilare koja na mjestu detektora ima proširenje koje povećava put prolaska zrake svjetlosti u DAD detektoru tri puta. U aktivnoj ljekovitoj supstanciji pronađen je dijastereomer atorvastatina u količini manjoj od 1,0% (m/m) te desfluoroatorvastatin u količini 0,2% (m/m). U gotovim ljekovitim oblicima najveće prisutno onečišćenje bio je dijastereomer atorvastatina (0,1%, m/m). Predložena metoda je brža, jeftinija, jednostavnija i ekološki prihvatljivija od postojećih HPLC metoda te prva CE metoda za određivanje atorvastatina i njegovih onečišćenja.

3. HPLC-DAD-MS^n metoda za analizu atorvastatina i njegova četiri prethodno navedena onečišćenja te strukturnu karakterizaciju i identifikaciju ostalih prisutnih onečišćenja.
Aktivne ljekovite supstancije sadrže dijastereomer atorvastatina kao glavno i najveće onečišćenje (0,89% i 0,21%, m/m). Lakton atorvastatina i metilni ester atorvastatina pronađeni su u približno sličnim koncentracijama, najmanje je bilo desfluoroatorvastatina. U oba ispitivana gotova ljekovita oblika najveće prisutno onečišćenje također je bio dijastereomer atrovastatina (0,13% i 0,26%, m/m), a pronađen je i desfluoroatorvastatin (0,05% i 0,02%) te lakton atorvastatina (0,01% i 0,12%). Primjena masene spektrometrije omogućila je strukturnu karakterizaciju i identifikaciju drugih prisutnih onečišćenja u analiziranim uzorcima aktivnih ljekovitih tvari i gotovih ljekovitih oblika. Na temelju fragmentacijskih putova identificirana su slijedeća onečišćenja: diaminoatorvastatin,

fotolitički okso-produkt razgradnje atorvastatina, fotolitički razgradni produkta atorvastatina, dijastereomer metilnog estera atorvastatina, dijastereomer laktona atorvastatina, deshidroksiatorvastatin, oksidativni razgradni produkt atorvastatina te diepoksid laktona atorvastatina.

4. MEKC metoda za istovremenu analizu lovastatina u laktonskom i β-hidroksi kiselinskom obliku te nefrotoksičnog citrinina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom.

Novorazvijena CE metoda osigurala je dobro razdvajanje uz visoku učinkovitost u kratkom vremenu analize (2 min) te je značajno jeftinija i ekološki prihvatljivija zbog iznimno malih volumena uzorka i otapala potrebnih tijekom analiza u odnosu na postojeće analitičke metode koje najčešće koriste HPLC tehniku uz primjenu različitog detektora ili čak različitu analitičku tehniku za određivanje citrinina. Dovoljno je osjetljiva da otkrije citrinin prisutan u tragovima (razina ppb) u proizvodima različitog sastava, matriksa i formulacijskog oblika. Predložena metoda je prva CE metoda za istovremenu analizu lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina.

5. HPLC-DAD-FLD-MS^n metoda za istovremenu analizu lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline i citrinina, te strukturnu karakterizaciju i identifikaciju ostalih monakolina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom.

Novorazvijena metoda za analizu crvene fermentirane riže koristi tri detektora: DAD detektor za identifikaciju i određivanje sadržaja lovastatina i lovastatin β-hidroksi kiseline, fluorescencijski detektor za određivanje citrinina, a primjenom masene spektrometrije uspješno su identificirana tri druga monakolina prisutna u nekima od analiziranih proizvoda. To je prva metoda koja omogućuje istovremeno određivanje lovastatina, lovastatin β-hidroksi kiseline, citrinina, kao i ostalih monakolina, primjenom jedne analitičke metode. Usporedbom s postojećim HPLC metodama, predložena metoda, razvijena u ovom doktorskom radu, je čak 2-4 puta kraća. Priprema uzorka je vrlo jednostavna, brza i ne zahtjeva dodatne tehnike i postupke obrade.

6. Brza ESI-MS/MS za pouzdanu identifikaciju monakolina u proizvodima s crvenom fermentiranom rižom.

Predložena metoda omogućuje jednostavno i brzo ispitivanje velikog broja uzoraka crvene fermentirane riže u rutinskim analizama kako bi se utvrdilo sadrže li analizirani proizvodi glavne djelatne sastavnice i u kojim relativnim količinama. Proizvođači dodataka prehrani

mogu na jednostavan i brz način kontrolirati ulazne sirovine te završne formulirane proizvode. Također ju mogu koristiti regulatorna tijela za brzu provjeru i kontrolu lažnih proizvoda s crvenom fermentiranom rižom.

7. Analizom proizvoda s crvenom fermentiranom rižom novorazvijenim CE i HPLC-DAD-FLD-MS^n metodama dobiveno je veliko odstupanje između stvarnog i deklariranog sadržaja monakolina K, odnosno lovastatina (2-178%). Mikotoksin citrinin je također nađen u dva ispitana uzorka (95 i 98 ppb). U nekim uzorcima pronađen je lovastatin β-hidroksi kiselina kao najzastupljenija djelatna sastavnica, dok je u nekim uzorcima sadržaj ostalih monakolina bio značajan. Budući da svi monakolini imaju farmakološki hipolipemički učinak, standardizacija proizvoda samo na sadržaj monakolina K, odnosno lovastatina nije dovoljna.

Na temelju provedenog ispitivanja ujednačenosti sadržaja između pojedinih proizvodnih serija dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom i dobivenih rezultata, moguće je zaključiti da se između pojedinih šarži proizvoda istog proizvođača javlja veliko odstupanje (do čak 15%).

Potrebno je naglasiti da u nekim analiziranim proizvodima pronađena količina ukupnih monakolina odgovara vrijednosti od oko 11 mg lovastatina, što je u rasponu terapijske doze lovastatina.

Rezultati analiza provedenih u ovom doktorskom radu i uočena značajna odstupanja od deklarirane vrijednosti te između pojedinih serija proizvodnje zahtijevaju strožu, detaljniju i češću kontrolu kvalitete dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom kao i detaljniju standardizaciju kako bi se osigurala ista biološka aktivnost ovih prirodnih hipolipemika, odnosno farmakološki učinak svih dodataka prehrani s crvenom fermentiranom rižom na tržištu, a sve u svrhu osiguranja učinkovitog, sigurnog i kvalitetnog proizvoda s crvenom fermentiranom rižom koji će pacijenti koristiti.

8. Iako postoje mnoge analitičke metode objavljene za analizu statina, a za neke statine već postoje službene farmakopejske monografije, metode razvijene u ovom doktorskom radu su osjetljivije, selektivnije, namijenjene za određivanje većeg broja analita, brže, jednostavnije, jeftinije ili ekološki prihvatljivije od postojećih. Predložene metode mogu koristiti, s jedne strane farmaceutska industrija i proizvođači dodataka prehrani, a s druge strane regulatorna tijela, kako bi se zajamčila kvaliteta, odnosno djelotvornost i sigurnost primjene statina, jednih od najčešće korištenih lijekova.

6. LITERATURA

1. Al Azzam, K. M., Saad, B., Tat, C. Y., Mat, I., Aboul-Enein, H. Y. (2011) Stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method for the analysis of sumatriptan succinate in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56: 937–943.
2. Ali, H., Nazzal, S. (2009) Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for the Simultaneous Analysis of Simvastatin and Tocotrienols in Combined Dosage Forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49: 950–956.
3. Almansob, M.A., Xu, B., Zhou, L., Hu, X.X., Chen, W., Chang, F.J., Ci, H.B., Yao, J.P., Xu, Y.Q., Yao, F.J., Liu, D.H., Zhang, W.B., Tang, B.Y., Wang, Z.P., Ou, J.S. (2012) Simvastatin reduces myocardial injury undergoing noncoronary artery cardiac surgery: a randomized controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32: 2304–13.
4. Altria, K.D. Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* (1996) 735: 43–56.
5. Ashour, S., Bahbouh, M., Khateeb, M. (2011) A novel use of oxidative coupling reactions for determination of some statins (cholesterol-lowering drugs) in pharmaceutical formulations. *Spectrochim. Acta, Part A* 78: 913–917.
6. Becker, D.J., Gordon, R.Y., Halbert, S.C., French, B., Morris, P.B., Rader, D.J. (2009) Red yeast rice for dyslipidemia in statin-intolerant patients. *Ann. Intern. Med.* 150: 830–839.
7. Bertacche, V., Milanese, A., Nava, D., Pini, E., Stradi, R. (2007) Structural Elucidation of an Unknown Simvastatin By-product in Industrial Synthesis Starting from Lovastatin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45: 642–647.
8. Bhatia, M.S., Jadhav, S.D., Bhatia, N.M., Choudhari, P.B., Ingale, K.B. (2011) Synthesis, Characterization and Quantification of Simvastatin Metabolites and Impurities. *Sci. Pharm.* 79: 601–614.
9. Bianchini, R.M., Castellano, P.M., Kaufman, T.S. (2009) Development and validation of an HPLC method for the determination of process-related impurities in pridinol mesylate, employing experimental designs. *Anal. Chim. Acta*. 654: 141–147.
10. Blanc, P.J., Loret, M.O., Goma, G. (2005) Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol Lett* 17: 291-294.
11. Boone, C.M., Waterval, J.C.M., Lingeman, H., Ensing, K., Underberg, W.J.M. (1999) Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanaliysis of drugs – a review. *J Pharmaceut Biomed* 20: 831–863.

12. Brain-Isasi, Requena, C., Alvarez-Lueje, A. (2008) Stability study of Pravastatin Under Hydrolity Conditions Assessed by HPLC. *J. Chil. Chem. Soc.* 52: 1684–1688.
13. Bulat M., Greber J., Lacković Z. (2001) Medicinska farmakologija. Medicinska naklada, Zagreb.
14. Bybee, K.A., Lee, J.H., O'Keefe, J.H. (2008) Cumulative clinical trial data on atorvastatin for reducing cardiovascular events: the clinical impact of atorvastatin. *Curr Med Res Opin.* Apr, 24(4): 1217–29.
15. Campos-Lara, M., Mendoza-Espinoza, J. (2008) Development of a Selective Extraction Method for Pravastatin Qantification in Tablets using HPLC with Ultraviolet Detection. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 31: 619–623.
16. Chairote, E., Chairote, G., Niamsup, H., Lumyong, S. (2008) The presence and the content of monacolins in red yeast rice prepared from Thai glutinous rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 3039–3047.
17. Chaudhari, B.G., Patel, N.M., Shah, P.B. (2007a) Determination of Simvastatin, Pravastatin Sodium and Rosuvastatin Calcium in Tablet Dosage Forms by HPTLC. *Indian J Pharm Sci* 69: 130–132.
18. Chaudhari, B.G., Patel, N.M., Shah, P.B. (2007b) Stability-Indicating Reversed-Phase Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Simvastatin and Ezetimibe from their Combination Drug Products. *J. AOAC Int.* 90: 1242–1249.
19. Chaudhari, B. G., Patel, N. M., Shah, P. B. (2007c) Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine from their combination drug products. *Chem. Pharm. Bull.* 55: 241–246.
20. Chen, G., Pramanik B.N. (2009) Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. *Drug Discovery Today* 14: 465–471.
21. Chen, F., Hu, X. (2005) Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 331–337.
22. Cheng, X., Wang, L., Yang, G., Cheng, J., Zhang, Y. (2010) Chiral Separation of Pitavastatin Calcium Enantiomers by Capillary Zone Electrophoresis. *Chin. J. Chrom.* 28: 1089–1093.
23. Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A. (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina* 42: 218–232.
24. Damić, M., Nigović, B. (2010a) Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farmaceutski glasnik* 66: 195–207.

25. Damić, M., Nigović, B., (2010b) Fast Analysis of Statins in Pharmaceuticals by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Chromatographia* 71: 23-240.
26. Damle, M.S., Patole, S.M., Potale, L.V., Khodke, A.S. (2010) A validated HPLC method for Analysis of Atorvastatin Calcium, Ramipril and Aspirin as the Bulk Drug and in Combined Capsule Dosage Forms. *Pharm. Globale* 1: 1–5.
27. Dawod, M., Breadmore, M.C., Guijt, R.M., Haddad, P.R. (2010) Strategies for the On-line Preconcentration and Separation of Hypolipidaemic Drugs Using Micellar Electrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217: 386–393.
28. Dogan, B., Tuncel, S., Uslu, B., Özkan S. A. (2007) Selective electrochemical behavior of highly conductive boron-doped diamond electrodes for fluvastatin sodium oxidation. *Diamond Relat. Mater.* 16: 1695–1704.
29. Dogan-Topal, B., Uslu, B., Ozkan S. A. (2007) Investigation of Electrochemical Behavior of Lipid Lowering Agent Atorvastatin Calcium in Aqueous Media and its Determination from Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Fluids Using Boron-Doped Diamond and Glassy Carbon Electrodes. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 10: 571–582.
30. Dong, Y., Chen, Y., Chen, X., Hu, Z. (2006) Method for derivatization of ephedrine and pseudoephedrine in nonaqueous media and determination by nonaqueous capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 20: 1150-1156.
31. El Deeb, S., Abu Iriban M., Gust, R. (2001) MEKC as a powerful growing analytical technique. *Electrophoresis* 32: 166–183.
32. Erk, N., (2003) Extractive Spectrophotometric Determination of Atorvastatin in Bulk and Pharmaceutical Formulations. *Anal.Lett.* 36: 2699–2711.
33. Erk, N., (2004) Development of Electrochemical Methods for Determination of Atorvastatin and Analytical Application to Pharmaceutical Products and Spiked Human Plasma. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34: 1–7.
34. Ertürk, S., Önal, A., Çetin, S.M. (2003) Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaril coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J. Chromatogr. B.* 793: 193–205.
35. European Pharmacopoeia 4. izdanje (2002) Strasbourg, Council of Europe.
36. European Pharmacopoeia 6. izdanje (2008) Strasbourg, Council of Europe.
37. European Pharmacopoeia 7. izdanje (2010) Strasbourg, Council of Europe.
38. Furberg C.D. (1999) Natural Statins and Stroke Risk. *Circulation* 99: 185–188.

39. Gajjar, A.K., Shah, V.D. (2010) Development and Validation of a Stability-Indicating Reversed-Phase HPLC Method for Simultaneous Estimation of Rosuvastatin and Ezetimibe from their Combination Dosage Forms. *Eurasian J. Anal. Chem.* 5: 265–283.
40. Glowka, F. K. (2002) Determination of ketoprofen enantiomers in human serum by capillary zone electrophoresis: man pharmacokinetic studies after administration of rac-ketoprofen tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30: 1035–1045.
41. Gomas, A.R., Ram, P.R., Srinivas, N., Sriramulu, J. (2010) Degradation Pathway for Pitavastatin Calcium by Validated Stability Indicating UPLC Method. *Am. J. Anal. Chem.* 2: 83–90.
42. Gomes, F.P., Garcia, P.L., Alves, J.M.P., Singh, A.K., Kedor-Hackmamm, E.R.M., Santoro, M.I.R.M. (2009) Development and Validation of Stability-Indicating HPLC Methods for Quantitaive Determination of Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin and Rosuvastatin in Pharmaceuticals. *Anal. Lett.* 42: 1784–1804.
43. Gordon, R. Y., Cooperman, T., Obermeyer, W., Becker, D. J. (2010) Marked variability of monacolin levels in commercial red yeast rice products. *Arch. Intern. Med.* 170: 1722–1727.
44. Grobleny, P., Viola G., Vedaldi, D., Dall'Acqua, F., Gliszczynska-Swiglo, A., Mielcarek, J. (2009) Photostability of Pitavastatin – A Novel HMG-CoA Reductase Inhibitor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50: 597–601.
45. Guihen, E., Sisk, G.D., Scully, N.M., Glennon, J.D. (2006) Rapid Analysis of Atorvastatin Calcium Using Capillary Electrophoresis and Microchip Electrophoresis. *Electrophoresis* 27: 2338–2347.
46. Harwig, H., Scott, P., Stoltz, D.R., Blanchfield, B.J. (1979) Toxins of molds from decaying tomato fruit. *Appl Environ Microbiol* 38: 267–274.
47. Heart Protection Study Collaborative Group (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 360: 7-22.
48. Heber, D., Lembertas, A., Lu, Q. Y., Bowerman, S., Go, V. L. (2001) An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents. *J. Alt. Compl. Med.* 7: 133–139.
49. Heber, D., Yip, I., Ashley, J.M., Elashoff, D.A., Elashoff, R.M., Go, V.L. (1999) Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 231–236.

50. Hefnawy, M., Al-Omar, M., Julkhuf, S. (2009) Rapid and Sensitive Simultaneous Determination of Ezetimibe and Simvastatin from their Combination Drug Products by Monolithic Silica High-Performance Liquid Chromatographic Column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50: 527–534.
51. Hefnawy, M.M., Sultan, M., Al-Johar, H. (2009) Development of Capillary Electrophoresis Technique for Simultaneous Measurement of Amlodipine and Atorvastatin from Their Combination Drug Formulations. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32: 2923–2942.
52. Hill, S.W., Varker, A.S., Karlage, K., Myrdal, P.B. (2009) Analysis of Drug Content and Weight Uniformity for Half-Tablets of 6 Commonly Split Medications. *J. Manag. Care Pharm.* 15: 253–261.
53. Hokby, F., Hult, K., Gatenbeck, S., Rutquist, H. (1979) Ochratoxin A and citrinin in 1976 crop of barley stored on farms in Sweden, *Acta Agric Scand* 29: 174–178.
54. Holčapek, M., Jirasko, R., Lisa, M. (2012) Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* 1259: 3–15.
55. Hsu, F., Turk, J. (2000) Charge-remote and charge-driven fragmentation processes in diacyl glycerophosphoethanolamine upon low-energy collisional activation: a mechanistic proposal. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 11:892-899.
56. Huang, H., Hua, Y., Bao, G., Xie, L. (2006) The Quantification of monacolin K in some red yeast rice from Fujian province and the comparison of the other product. *Chem. Pharm. Bull*. 54: 687–689.
57. Ingale, S.J., Sahu, C.M., Paliwal, R.T., Vaidya, S., Singhai, A.K. (2011) Advance approaches for the impurity profiling of pharmaceutical drugs: A review. *Int. J. Pharm. Life Sci*. 2: 955–962.
58. International Conference on Harmonization (ICH) Impurities in new drug substances Q3A (R2), Geneva, 2006.
59. International Conference on Harmonization (ICH) Impurities in new drug products Q3B (R2), Geneva, 2006.
60. International Conference on Harmonization (ICH) Impurities Guideline for residual solvents, Q3C (R5), Geneva, 2011.
61. International Conference on Harmonization (ICH) Impurities Guideline for metal impurities Q3D, Geneva, 2009.

62. International Conference on Harmonization (ICH) Validation of analytical Procedures: Text and methodology Q2 (R1), Geneva, 2005.
63. Ishihama, J., Nakamura, M., Miwa, T., Kajima, T., Asakawa, N. (2002) A rapid method for p*Ka* determination of drugs using pressure-assisted capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug discovery. *J. Pharm. Sci.* 91: 933–942.
64. Janardhana, G.R., Raveesha, K.A., Shetty, H.S. (1999) Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). *Food Chem Toxicol* 37: 863–868.
65. Javernik Rajh, S., Kreft, S., Štrukelj, B., Vrečer, F. (2003) Comparison of CE and HPLC Methods for Determining Lovastatin and Its Oxidation Products after Exposure to an Oxidative Atmosphere. *Croat. Chem. Acta* 76: 263–268.
66. Jemal, M., Ouyang, Z., Powell, M.L. (2000) Direct-injection LC–MS–MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23: 323–340.
67. Kadav, A.A., Vora, D.N. (2008) Stability Indicating UPLC Method for Simultaneous Determination of Atorvastatin, Fenofibrate and their Degradation Products in Tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48: 120–126.
68. Kaufmann, D.W., Kelly, J.P., Rosenberg, L., Anderson, T.E., Michell, A.A. (2002) *J. Am. Med. Assoc.* 287:337–344.
69. Khedr, A. (2008) Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Atorvastatin with Fluorescence Detection, *J. AOAC Int.* 90: 1547–1553.
70. Kittell, J., Borup, B., Voladari, R., Zahn, K. (2005) Parallel Capillary Electrophoresis for the Quantitative Screening of Fermentation Broths Containing Natural Products. *Metab. Eng.* 7: 53–58.
71. Kocijan, A., Grahek, R., Bastrada, A., Zupancic-Kralj, L. (2005) Fast Analysis of Pravastatin in Production Media. *J. Chromatogr. B* 822: 311–315.
72. Kocijan, A., Grahek, R., Zupančić-Kralj, L. (2006) Identification of an Impurity in Pravastatin by Application of Collision-Activated Decomposition Mass Spectra. *Acta Chim. Slov.* 53: 464–468.
73. Komorsky-Lovrić, Š., Nigović, B. (2006) Electrochemical characterization of simvastatin by abrasive stripping and square-wave voltammetry. *J. Electroanal. Chem*. 593: 125–130.

74. Kračun, M., Kocijan, A., Bastarda, A., Grahek, R., Plavec, J., Kocjan, D. (2009) Isolation and Structure Determination of Oxidative Degradation Products of Atorvastatin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50: 729–736.
75. Kublin, E., Kaczmarska-Graczyk, B., Mazurek, A.P. (2006) Determination by chromatographic methods of selected medicines reducing the level of cholesterol. *Acta Pol. Pharm.* 63: 404–7.
76. Kublin, E., Malanowicz, E., Kaczmarska-Graczyk, B., Mazurek, A.P. (2012) Development of Chromatographic Method for Determination of Drugs Reducing Cholesterol Level. *Acta Pol. Pharm.* 69: 139–143.
77. Kuhn, K. D., Weber, C., Kreis, S., Holzgrabe, U. (2008) Evaluation of the stability of gentamicin in different antibiotic carriers using a validated MEKC method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48: 612–618.
78. Kumar, N.S., Baghyalakshmi, J. (2007) Determination and Quantification of Pitavastatin Calcium in Tablet Dosage Formulation by HPTLC Method. *Anal. Lett.* 40: 2625–2632.
79. Kumar, N.S., Nisha, N., Nirmal J., Sonali, N., Bagyalakshmi, J. (2011) HPLC determination of pitavastatin calcium in pharmaceutical dosage forms. *Pharm. Anal. Acta* 2: 119 doi:10.4172/2153-2435.1000119
80. Lee, C.L., Wang, J.J., Pan, T.M. (2006) Synchronous analysis method for detection of citrinin and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *J. AOAC Int.* 89: 669–677.
81. Li M, Fan LY, Zhang W, Cao CX (2007a) Stacking and Quantitative Analysis of Lovastatin in Urine Samples by the Transient Moving Chemical Reaction Boundary Method in Capillary Electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 2719–2725.
82. Li, M., Fan, L.Y., Zhang, W., Sun, J., Cao, C.X. (2007b) Quantitative Analysis of Lovastatin in Capsule of Chinese Medicine Monascus by Capillary Zone Electrophoresis with UV–vis Detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43: 387–392.
83. Li, Y., Liu, H., Wang, Z. (2005) A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monascus purpureus* fermented rice, red yeast rice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39: 82–90.
84. Li, Y., Zhang, F., Wang, Z., Hu, Z. (2004) Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35: 1101–1112.

85. Lincy, J., Mathew, G., Venkata, R.R. (2008) Simultaneous Estimation of Atorvastatin and Ramipril by RP-HPLC and Spectroscopy. *Pak. J. Pharm. Sci.* 21: 282–284.
86. Liu, D.Q., Wu, L., Sun, M., MacGregor, P. A. (2007) On Line H/D exchange LC-MS strategy for structural elucidation of pharmaceutical impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44: 320–329.
87. Londhe, S.V., Deshmukh, R.S., Mulgund, S.V., Jain, K.S. (2011) Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Simultaneous Determination of Aspirin, Atorvastatin Calcium and Clopidogrel Bisulphate in Capsules. *Indian J. Pharm. Sci.* 73: 23–29.
88. Luterotti, S. (2012) Uvod u kemijsku analizu. http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CDCDEQFj&url=http%3A%2F%2Fwww.pharma.unizg.hr%2Fdownload.aspx%3Ffile%3D%2FFUploa%2FANALIT_KEM%2Fuvod_u_kemijsku_analizu.pdf&ei=n5o0UeSqL8nLhAfh5IHIHo&usg=AFQjCNHluZMamb_bs7sSA0XJBl6FCVozzg&bvm=bv.43148975,d.ZG4, pristupljeno 14. prosinca 2012.
89. Malenovic, A., Jancic-Stojanovic, B., Kostic, N., Ivanovic, D., Medenica, M. (2011) Impurities Retention in Micelaar Liquid Chromatography. *Chromatography* 73: 993–998.
90. Markopoulou, C.K., Koundourelllis J.E. (2003) Two derivative spectrophotometric methods for the simultaneous determination of lovastatin combined with three antioxidants. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33: 1163–1173.
91. Martin, J., Buchberger, W., Alonso, E., Himmelsbach, M., Aparicio, I. (2011) Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Statin Drugs in Wastewater and River Water by HPLC/Q-TOF-MS. *Talanta* 85: 607–615.
92. Martinis, M.L., Gimeno, A., Martinis, H.M., Bernardo, F. (2002) Cooccurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit. Contam.* 19: 568–574.
93. Mehta, T.N., Patel, A.K., Kulkarni, G.M., Suubbaiah, G (2005) Determination of Rosuvastatin in the Presence of its degradation Products by a Stability-Indicating LC Method. *J.AOAC Int.* 88: 1142–1147.
94. Miao, X.S., Metcalfe C.D. (2003) Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 998: 133–141.

95. Mielcarek, J., Grobelny, P., Osmalek, T. (2009) Identification of Photoproducts of Fluvastatin in Solutions. *J. Plan. Chromatogr*. 22: 137–140.
96. Mohammadi, A., Rezanour, N., Ansari Dogaheh, M., Ghorbani Bidkorbeh, F., Hashem, M., Walker, R.B. (2007) A Stabiliy-Indicating High Performance Liquid Chromatographic (JPLC) Assay for the Simultaneous Determination of Atorvastatin and Amlodipine in Commercial Tablets. *J. Chromatogr B* 46: 215–221.
97. Mornar, A., Damić, M., Nigović, B. (2010) Separation, Characterization and Quantification of Atorvastatin and Related Impurities by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* 43: 2859-2871.
98. Mornar, A., Sertić, M., Nigović, B. (2011) Pharmacokinetic Parameters of Statin Drugs Characterized by Reversed Phase High-performance Liquid Chromatography. *Anal. Lett*. 44: 1009-1020.
99. Mornar, A., Sertić, M., Nigović, B. (2013a) Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb.
100. Mornar, A., Sertić, M., Nigović, B. (2013b) Development of a Rapid LC/DAD/FLD/MSn method for the Simultaneous Determination of Monacolins and Citrinin in Red Fermented Rice Products. *J. Agr. Food Chem.* 61: 1072-1080.
101. Mornar, A., Sertić, M., Nigović, B. (2013c) Quality assessment of liquid pharmaceutical preparations by HSS-GC-FID. *J. Anal. Chem.* (prihvaćen za objavljivanje).
102. Morris, M.J., Gilbert, J.D., Hsieh, J. Y-K., Matuszewski, B.K., Ramjit, H.G., Bayne, W.F. (1993) Determination of the HMG–CoA reductase inhibitors simvastatin, lovastatin, and pravastatin in plasma by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 22: 1–8.
103. Mukhtar, R.Y., Reid, J., Reckless, J.P. (2005) Pitavastatin. *Int. J. Clin. Pract*. 59: 239-52.
104. Mulvana, D., Jemal, M., Pulver, S.C. (2000) Quantitative Determination of Pravastatin and its Biotransformation Products in Human Serum by Turbo Ion Spray LC/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23: 851–866.
105. Murphy, R.C., Harrison, K.A. (1994) Fast atom bombardment mass spectrometry of phospholipids.*Mass Spectrom. Rev.* 13: 57-75.
106. Mustafa, G., Azeem, A, Ahmad, F.J., Khan, Z.I., Shakeel, F., Talegaonkar, S. (2010) Stability-Indicating RP-HPLC Method for Analysis of Atorvastatin in Bulk Drug, Marketed Tablet and Nanoemulsion Formulation. *J. Chil. Chem. Soc.* 55: 184–188.

107. Nageswara Rao, R., Nagaraju, V. (2003) An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33: 335–377.
108. Nakarani, N.V., Bhatt, K.K., Patel, R.D., Bhatt, H.S. (2007) Estimation of Atorvastatin Calcium and Fenofibrate in Tablets by Derivate Spectrophotometry and Liquid Chromatography. *J. AOAC Int.* 90: 700–705.
109. Nigović, B. (2006) Electrochemical properties and square-wave voltammetric determination of pravastatin. *Anal. Bioanal. Chem.* 384: 431–437.
110. Nigović, B. (2010) Analitika lijekova, http://www.pharma.unizg.hr, pristupljeno: 03. rujna 2012.
111. Nigović, B., Damić, M., Injac R., Kočevar Glavač, N., Štrukelj, B. (2009) Analysis of Atorvastatin and Related Substances by MEKC. *Chromatographia* 69: 1299-1305.
112. Nigović, B., Fabijanić, P., Bačić-Vrca, V. (2007) Statini. *Farmaceutski glasnik* 63: 315-331.
113. Nigović, B., Komorsky-Lovrić, Š., Devčić, D. (2008) Rapid voltammetric identification and determination of simvastatin at trace levels in pharmaceuticals and biological fluid. *Croat. Chem. Acta* 81: 453–459.
114. Nigović, B., Mornar, A., Sertić, M. (2012) A review of current trends and advances in analytical methods for determination of statins: Chromatography and capillary electrophoresis. Chromatography – The most Versatile Method of Chemical Analysis. Rijeka, In Tech, 385–428.
115. Nigović, B., Pavković, I. (2009) Preconcentration of the lipid-lowering drug lovastatin at a hanging mercury drop electrode surface. *J. Anal. Chem.* 64: 304–309.
116. Nigović, B., Sertić, M. (2012) Onečišćenja u lijekovima. *Farmaceutski glasnik.* 68: 77-88.
117. Nigović, B., Sertić, M., Mornar, A. (2013) Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem.* 138: 531-538.
118. Nigović, B., Vegar, I. (2008) Capillary Electrophoresis Determination of Pravastatin and Separation of Its Degradation Products. *Croat. Chem. Acta* 81: 615–622.
119. Nirogi, R., Mudigonda, K., Kandikere, V. (2007) Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44: 379–387.

120. Nissen, S., Nicholls, S., Sipahi, I., Libby, P., Raichlen, J., Ballantyne, C., Davignon, J., Erbel, R., Fruchart, J., Tardif, J., Schoenhagen, P., Crowe, T., Cain, V., Wolski, K., Goormastic, M., Tuzcu, E. (2006). Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *J. Am. Med. Assoc.* 295: 1556–65.
121. Novakova, L., Lopez Sofia Arnal, Solichova, D., Šatinsky, D., Kulichova, B., Horna, A., Solich, P. (2009a) Comparison of UV and Charged Aerosol Detection approach in Pharmaceutical Analysis of Statins. *Talanta* 78: 834–839.
122. Novakova, L., Šatinsky, D., Solich, P. (2008) HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. *Trends Anal. Chem.* 27: 352–367.
123. Novakova, L., Vlčkova, H., Šatinsky, D., Sadilek, P., Solichova, D., Blaha, M., Blaha, V., Solich, P. (2009b) Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Detection in Clinical Analysis of Simvastatin and Atorvastatin. *J. Chromatogr. B* 877: 2093–2103.
124. Oliveira, P.R., Barth, T., Todeschni, V., Dalmora, S.L. (2007) Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Ezetimibe and Simvastatin in Pharmaceutical Products. *J. AOAC Int.* 90: 1566–1572.
125. Onal, A., Sagirli, O. (2006) Development of a Selective LC Method for the Determination of Pravastatin Sodium. *Chromatographia* 64: 157–162.
126. Ortega Markman, B.E., Pires Rosa, P.C., Walter Koschtchak, M.R. (2010) Assessment of the Quality of Simvastatin Capsules from Compounding Pharmacies. *Rev. Saude Publica* 44: 1055–1062.
127. Ozaltin, N., Ucakturk, E. (2007) Simultaneous Determination of Ezetimibe and Simvastatin in Pharmaceutical Formulation by Dual-Mode Gradient LC. *Chromatographia* 66: 87–91.
128. Panchal, H.J., Suhagia, B.N. (2010) Simultaneous Determination of Atorvastatin Calcium and Ramipril in Capsule Dosage Forms by High-Performance Liquid Chomatography and High-Performance Thin Layer Chromatography. *J. AOAC Int.* 93: 1450–1457.
129. Panchal, H., Suhagia, B.N. (2011a) Simultaneous Determination and Validation of Pitavastatin Calcium and Ezetimibe in Binary Mixture by Liquid Chromatography. *Int. J. Pharm. Tech. Research.* 3: 2155–2161.

130. Panchal, H.J., Suhagia, B.N. (2011b) Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for Analysis of Pitavastatin Calcium in Tablet Dosage Forms. *Acta Chromatogr.* 23: 81–64.
131. Panchal, H.J., Suhagia, B.N., Patel, M.M., Patel, B.H. (2009) Estimation of Pitavastatin Calcium in Tablet Dosage Forms by Column Liquid Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometry. *J. AOAC Int.* 92: 158–165.
132. Panchal, H.J., Suhagia, B.N., Patel, N.J., Patel, B.H. (2008) A Simple and Sensitive HPTLC Method for Quantitative Analysis of Pitavastatin Calcium in Tablets. *J. Planar Chromatogr.* 21: 267–270.
133. Pasha, K., Muzeeb, S., Basha, S.J.S., Shashikumar, D., Mullangi, R., Srinivas, N. (2006) Analysis of Five HMG-CoA Reductase Inhibitors – Atorvastatin, Lovastatin, Pravastatin, Rosuvastatin and Simvastatin: Pharmacological, Pharmacokinetic and Analytical Overview and Development of a New Method for use in Pharmaceutical Formulations Analysis and *in vitro* Metabolism Studies. *Biomed. Chromatogr*. 20: 282–293.
134. patent EP 1 659 110 A1 (2006)
135. Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A., Tharatha, S. (2008) Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by Monascus sp. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 20–23.
136. Petkovska, R., Cornett, C., Dimitrovska, A. (2008) Development and Validation of Rapid Resolution RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Atorvastatin and Related Compounds by Use of Chemometrics. *Anal. Lett.* 41: 992–1009.
137. Pilaniya, K., Chandrawanshi, H. K.,1 Pilaniya, U.,1 Manchandani, P.,2 Jain, P. 3 and Singh3 N. (2010) Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1: 302–310.
138. Piljac, I. (2006) Elektroforeza, Media Print, Zagreb.
139. Plumb, R.S., Jones, M.D., Rainville, P., Castro-Perez, J.M. (2007) The Rapid Detection and Identification of the Impurities of Simvastatin Using High Resolution sub 2 microm Particle LC Coupled to Hybrid Quadrupole Time of Flight MS Operating with Alternating High-low Collision Energy. *J. Sep. Sci.* 30: 2666–2675.
140. Plumb, R.S., Jones, M.D., Rainville, P.D., Nicholson, J.K. (2008) A Rapid Simple Approach to Screening Pharmaceutical Products Using Ultra-Performance LC Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry and Pattern Recognition. *J. Chromatogr. Sci.* 46: 193–198.

141. Poole, C.F. (2003) The essence of chromatography. Elsevier, Amsterdam.
142. Prabu, S.L., Suriyaprakash, T.N.K. (2010) Impurities and its importance in pharmacy. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 3: 66–71.
143. Raja Rajeswai, K., Sankar, G.G., Rao, A.L., Seshagiriraio, J.V.L.N. (2006) RP-HPLC method for the Simultaneous Determination of Atorvastatin and Amlodipine in Tablet Dosage Form. *Indian J. Pharm. Sci.* 68: 275–277.
144. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. (2003) Pharmacology. Churchill Livingstone, Edinburgh.
145. Reddy, G.V., Kumar, A.P., Reddy, B.V., Sreeramulu, J. (2009) Application of Ion-Trap Mass Spectrometry for Identification and Structural Determination of an Unknown Impurity in Simvastatin. *Pharmazie* 64: 638–641.
146. Reinhard, H., Zimmerli, B. (1999) Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *J. Chromatogr. A* 862: 147–159.
147. Sacks, F.M, Pfeffer, M.A, Moye, L.A., i sur. (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N. Engl. J. Med.* 335: 1001–1009.
148. Sane, R.T., Kamat, S.S., Menon, S.N., Inamdar, S.R., Mote, M.R. (2005) Determination of Rosuvastatin Calcium in its Bulk Drug and Pharmaceutical Preparations by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J. Planar Chromatogr.* 18: 194–198.
149. Sechachalam, U., Kothapally, C.B. (2008) HPLC analysis for simultaneous determination of atorvastatin and ezetimibe in pharmaceutical formulations. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 31: 714–721.
150. Shah, R.P., Kumar, V., Singh, S. (2008) Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Studies on Atorvastatin and its Stress Degradation Products. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 613–622.
151. Shah, Y., Iqbal, Z., Ahmad, L., Khan, A., Khan, M.I., Nazir, S., Nasir, F. (2011) Simultaneous Determination of Rosuvastatin and Atorvastatin in Human Serum using RP-HPLC/UV Detection: Method Development, Validation and Optimization of Various Experimental Parameters. *J. Chromatogr. B.* 879: 557–563.
152. Sharaf El-Din, M.M.K., Salama, F.M.M., Nassar, M.W.I., Attia, K.A.M., Kaddah. M.M.Y. (2012) Validated spectrofluorimetric method for the determination of atorvastatin in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical Analysis*., 2: 200–205.

153. Sheldon, E.M. (2003) Development of a LC-LC-MS complete heart-cut approach for the characterizatio of pharmaceutical compounds using standard instrumentation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31: 1153–1166.
154. Shintani, H., Polonsky, J. (1997) Handbook of Capillary Electrophoresis Applications. Blackie Academic and Professional, London.
155. Singh, S., Nahda, T., Narayanam, M., Sahu, A., Junwal, M., Shah., R.P. (2012) A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36: 148–173.
156. Sishijima, M. (1984) Survey for mycotoxins in commerical foods. *Dev Food Sci* 7: 172–181.
157. Sivakumar, T., Manavalan, R., Muralidharan, C., Valliappan, K. (2007) An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocol: Simultaneous Analysis of Amlodipine and Atorvastatin in Pharmaceutical Formulations. *J. Sep. Sci.* 30: 3143–3153.
158. Skirkhedkar, A.A., Surana, S.J. (2009) Simultaneous Densitometric TLC Analysis of Atorvastatin Calcium and Fenofibrate in the Bulk Drug and in Pharmaceutical Formulations. *J. Planar Chromatogr.* 22: 355–358.
159. Shirkhedkar, A.A., Surana, S.J. (2010) Development and Validation of a Reversed-Phase High-Performance Thin-Layer Chromatography-Densitometric Method for Determination of Atorvastatin Calcium in Bulk Drug and Tablets, *J. AOAC, Int.* 93: 798–803.
160. Smyth, W.F. (2005) Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electropsray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 824: 1–20.
161. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J. L. (1997) Practical HPLC method development. Wiley, New York.
162. Song, F., El-Demerdash, A., Lee, S.S.H., Smith, R.E. (2012) Fast screening of lovastatin in red yeast rice products by flow injection tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 57: 76–81.
163. Srinivasu, M. K., Narasa Raju, A., Om Reddy, G. (2002) Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 715–721.

164. Sultana, N., Arayne, M.S., Iftikhar, B. (2008) Simultaneous Determination of Atenolol, Rosuvastatin, Spironolactone, Glibenclamide and Naproxen Sodium in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma by RP-HPLC. *J. of the Chin. Chem. Soc.* 55: 1022–1029.
165. Sultana, N., Arayne, M.S., Shahzad, W. (2010) Simultaneous Determination of Ceftriaxone Sodium and Statin Drugs in Pharmaceutical Formulations and Human Serum by RP-HPLC. *J. Chil. Chem. Soc.* 55: 193–198.
166. Sun, C., Wu, J., Wang, D., Pan, Y. (2010) Characterization of a novel impurity in bulk drug eprosartan by ESI/MSn and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 778–783.
167. Süslü, İ., Çelebier, M., Altinöz, S. (2007) Determination of Rosuvastatin in Pharmaceutical Formulations by Capillary Zone Electrophoresis. *Chromatographia* 66: 65–72.
168. Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H., Kushiro, M. (2007) Mycotoxins in rice. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 59–66.
169. Theurillat, R., Zimmerli, S., Thormann, W. (2010) Determination of voriconazole in human serum and plasma by micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53: 1313–1318.
170. Trung, T.Q., Dung, P.T., Hoan, N.N., Kim, D.J., Lee, J.H. and Kim, K.H. (2008) Chiral Separation of Fluvastatin Enantiomers by Capillary Electrophoresis. *Arch. Pharm. Res.* 31: 1066–1072.
171. Varghese, S.J., Ravi, T.K. (2010) Determination of Rosuvastatin and Ezetimibe in a Combined Tablet Dosage form using High-Performance Column Liquid Chromatography and High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J. AOAC Int.* 93: 1222–1227.
172. Vella, F., Kpodo, Sorensen, A.K., Jakobsen, M. (1995) The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. *Food Chem.* 56: 147–153.
173. Vora, D.N., Kadav, A.A. (2008) Validated Ultra HPLC Method for the Simultaneous Determination of Atorvastatin, Acetylsalicylic Acid and their Degradation Products in Capsules. *J. L. Chromatogr. R. T.* 31: 2821–2837.
174. Vrhovac, B. i suradnici. (2003) Farmakoterapijski priručnik. Medicinska naklada, Zagreb.
175. Vuletić, M., Cindrić, M., Koružnjak, J. D. (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37: 715–721.

176. Wang, Y., Ju, X., Zhou, Y. (2005) The variability of citrinin production in Monascus type cultures. *Food Microbiol.* 22: 145–148.
177. Watson, D.G. (2005) Pharmaceutical Analysis. Churchile Livingstone, Elsevier Limited, Edinburgh.
178. World health organization, (2008), The 10 leading causes of death by broad income group, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html), pristupljeno 21. prosinca 2012.
179. Wu, C. L., Kuo, Y. H., Lee, C. L., Hsu, Y. W., Pan, T. M. (2011) Synchronous high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector and mass spectrometry for the determination of citrinin, monascin, ankaflavin, and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *J. AOAC Int.* 94: 179–190.
180. www.beckmancoulter.com, pristupljeno 03. siječnja 2013.
181. www.tlcpharmachem.com/tlc_item.php?upc=A-139&li=&sub=, pristupljeno 17. studenoga 2012.
182. Xu, B-J., Jia, X-Q., Gu, L-J., Sung, C-K. (2006) Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Chem.* 17: 271–285.
183. Zaikin, V.G., Halket, J.M. (2006) Derivatization in mass spectrometry--8. Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *Eur. J. Mass Spectrom.* 12: 79–115.
184. Zhang, H.J., Hu, C.G., Lan, W., Hu, S.S. (2004) Development of an acetylene black-dihexadecyl hydrogen phosphate composite-modified glassy-carbon electrode, and its application in the determination of lovastatin in dosage drug forms. *Anal. Bioanal. Chem.* 380: 303–309.
185. Zhao, X., Guofei, L., Zhang, L., Tao, X., Guan, T., Hong, M., Tang, X. (2010) Preparation and evaluation of nicotinic acid sustained-release pellets combined with immediate release simvastatin. *Int. J. Pharm.* 400: 42–48.
186. Zhou, Y.,Chen, J., Dong L., Lu, L., Chen, F., Hu, D., Wang, X. (2012) A study of fluorescence properties of citrinin in β-cyclodextrin aqueous solution and different solvents. *J. Lumin.* 132: 1437–1445.

7. PRILOG

Prilog sadrži pet znanstvenih radova objavljenih u časopisima zastupljenima u bazi Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom radu:

1. Nigović, B., **Damić, M.**, Injac, R., Kočevar Glavač, N., Štrukelj B. (2009) Analysis of Atorvastatin and Related Substances by MEKC, *Chromatographia*, 69: 1299-1305.
2. Mornar, A., **Damić, M.**, Nigović, B. (2010) Separation, Characterization, and Quantification of Atorvastatin and Related Impurities by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* 43: 1-13.
3. **Damić, M.**, Nigović B. (2010) Fast analysis of statins in pharmaceuticals by MEKC, *Chromatographia*, 71: 233-240.
4. Nigović, B., **Sertić, M.**, Mornar, A. (2013) Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem.* 138: 531-538
5. Mornar, A., **Sertić, M.**, Nigović, B. (2013) Development of a Rapid LC/DAD/FLD/MS^n Method for the Simultaneous Determination of Monacolins and Citrinin in Red Fermented Rice Products. *J. Agr. Food Chem.* 61: 1072-1080.

8. ŽIVOTOPIS

Miranda Sertić rođena je 15. rujna 1982. u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 2001. godine. Tijekom studiranja prima stipendiju Ministarstva znanosti i tehnologije RH zbog izvrsnog uspjeha na studiju. Diplomirala je 2006. godine među deset najboljih studenata. Odradila je staž u ljekarni te 2007. g. položila stručni ispit za magistre farmacije pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi RH.

Od 2007. godine radi na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta kao asistentica – znanstvena novakinja na projektu „*Istraživanje novih metoda u analitici ljekovitih i bioaktivnih tvari*“ voditeljice prof. dr. sc. Biljane Nigović. Uz znanstveni rad sudjeluje u izvođenju nastave na kolegijima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova te Centra za primijenjenu farmaciju.

Poslijediplomski doktorski studij „*Farmaceutske znanosti*“ na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 2008. g. Poslijediplomski specijalistički studij „*Razvoj lijekova*“ upisuje 2010. g.

Stručno se usavršavala na stranim znanstvenim ustanovama. U sklopu stipendije CEEPUS programa boravila je na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija. Kao dobitnik stipendije za doktorande Nacionalne zaklade za znanost RH provela je istraživanje na Institutu za kemijsku metodologiju u Rimu, Italija.

U svom znanstvenom radu bavi se analitičkim tehnikama: kapilarnom elektroforezom, tekućinskom i plinskom kromatografijom te masenom spektrometrijom.

Do sada je u koatorstvu objavila 10 znanstvenih radova, od čega 8 u časopisima citiranima u bazi Current Contents, poglavlje u znanstvenoj knjizi, 2 znanstveno-popularizacijska članka, 5 stručnih radova te jednu nastavnu skriptu. Aktivno je sudjelovala na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima s 20 posterskih i usmenih priopćenja. Održala je 2 pozvana predavanja te 11 javnih nastupa.

Član je Hrvatske ljekarničke komore te Hrvatskoga farmaceutskog društva, gdje je član izvršnog odbora Sekcije juniora.

Udana je i majka jednog dječaka.

Objavljeni znanstveni radovi citirani u bazi Current Contents:

1. Nigović, B., **Damić, M.**, Injac, R., Kočevar Glavač, N., Štrukelj B. (2009) Analysis of Atorvastatin and Related Substances by MEKC, *Chromatographia*, 69: 1299-1305.
2. Mornar, A., **Damić, M.**, Nigović B. (2010) Pharmacokinetic Parameters of Statin Drugs Characterized by Reversed Phase High-performance Liquid Chromatography, *Anal. Lett.* 6: 1009-1020.
3. **Damić, M.**, Nigović B. (2010) Fast analysis of statins in pharmaceuticals by MEKC, *Chromatographia*, 71: 233-240.
4. Mornar, A., **Damić, M.**, Nigović, B. (2010) Separation, Characterization, and Quantification of Atorvastatin and Related Impurities by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* 43: 1-13.
5. Mornar, A., **Sertić, M.**, Turk, N., Nigović, B., Koršić, M. (2012) Simultaneous analysis of mitotane and its main metabolites in human blood and urine samples by SPE-HPLC technique. *Biomed. Chromatogr*. 26: 1308-1314.
6. Nigović, B., **Sertić, M.**, Mornar, A. (2013) Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem.* 138: 531-538.
7. Mornar, A., **Sertić, M.**, Nigović, B. (2013) Development of a Rapid LC/DAD/FLD/MSn Method for the Simultaneous Determination of Monacolins and Citrinin in Red Fermented Rice Products. *J. Agr. Food Chem.* 61: 1072-1080.
8. Mornar, A., **Sertić, M.**, Nigović, B. (2013) Quality assessment of liquid pharmaceutical preparations by HSS-GC-FID. *J. Anal. Chem.* u tisku

Ostali znanstveni i stručni radovi:

1. **Damić, M.**, Nigović, B. (2010) Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm. glasnik.* 66: 195-207.
2. **Sertić, M.**, Nigović, B., Jug, M., (2010) Analiza kiralnih lijekova kapilarnom elektroforezom. *Farm. glasnik.* 66: 467-476.
3. **Sertić, M.**, Buhač, T., Gašpar. K. (2012) Prehlada i gripa – simptomi, prevencija i liječenje. *Farm. glasnik.* 68: 17-30.
4. Nigović, B., **Sertić, M.**, (2012) Onečišćenja u lijekovima. *Farm. glasnik.* 68: 77-88.
5. **Sertić, M.**, Buhač, T., Gašpar. K. (2012) Peludne alergije. *Farm. glasnik.* 68: 467-482.
6. Mornar, A., Nigović, B., **Sertić, M.** (2013) Identifikacija monakolina i citrinina u crvenoj fermentiranoj riži primjenom LC/MS/MS tehnike. *Farm. glasnik.* 68: 243-253.
7. Mornar, A., **Sertić, M.**, Nigović, B., Lepan, B., Zovko Končić, M. (2013) Razvoj i validacija HSS-GC-FID metode za određivanje sadržaja lako hlapljivih sastavnica sirupa za iskašljavanje za djecu. *Farm. glasnik.* 69: 155-227.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Doktorski rad

NOVE KAPILARNO ELEKTROFORETSKE I KROMATOGRAFSKE METODE U ANALITICI STATINA

Miranda Sertić

SAŽETAK

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, a jednim od glavnih rizičnih čimbenika za njihov razvoj smatra se hiperlipidemija. Postoji nekoliko skupina hipolipemika, a najvažniji su statini, jedni od najčešće propisivanih lijekova uopće. Oni djeluju kao reverzibilni kompetitivni inhibitori HMG-CoA reduktaze, enzima koji katalizira limitirajući korak u biosintezi kolesterola. Svi statini još uvijek nemaju službene farmakopejske monografije, pa postoji velika potreba za razvojem analitičkih metoda za njihovu identifikaciju i određivanje sadržaja u aktivnim ljekovitim tvarima i gotovim ljekovitim oblicima. Terapija statinima je svakodnevna i dugoročna, pa je procjena njihove čistoće od velikog značaja, odnosno razvoj selektivnih i osjetljivih metoda za karakterizaciju, identifikaciju i određivanje sadržaja onečišćenja je neophodan.

Crvena fermentirana riža sadrži 14 monakolina koji imaju hipolipemički učinak, a najvažniji je monakolin K, poznat kao lovastatin. Na tržištu se nalaze brojni dodaci prehrani s crvenom fermentiranom rižom. Nažalost, nadležne nacionalne agencije diljem svijeta upozoravaju na lošu kvalitetu dodataka prehrani te potrebu za njihovim pojačanim nadzorom i redovitom kontrolom.

Cilj ovog istraživanja stoga je bio razviti nove, brze, selektivne, osjetljive, precizne i točne analitičke metode za identifikaciju i određivanje sadržaja statina, karakterizaciju i kvantifikaciju onečišćenja atorvastatina, najčešće korištenog lijeka iz skupine statina, te određivanje aktivnih i toksičnih sastavnica crvene fermentirane riže. U radu su korištene sofisticirane analitičke tehnike: kapilarna elektroforeza (CE), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i masena spektrometrija (MS). Ukupno je razvijeno, validirano i uspješno primijenjeno 6 novih analitičkih metoda. Predložena CE metoda predstavlja jedinstvenu brzu analitičku metodu za analizu bilo kojeg od šest statina registriranih u Europskoj uniji. Određen je sadržaj četiriju onečišćenja atorvastatina te je strukturno karakterizirano i identificirano još osam prisutnih onečišćenja primjenom HPLC-DAD-MS^n metode. Rezultati provedene analize proizvoda s crvenom fermentiranom rižom pokazuju značajna odstupanja u sadržaju lovastatina od deklariranih vrijednosti te između pojedinih serija proizvodnje, što upućuje na potrebu za strožom, detaljnijom i češćom kontrolom, u svrhu osiguranja djelotvornog, sigurnog i kvalitetnog proizvoda.

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

Rad sadrži: 247 stranica, 57 grafičkih prikaza, 24 tablice i 186 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: statini, crvena fermentirana riža, kapilarna elektroforeza, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, masena spektrometrija

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, *redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Irena Vedrina Dragojević**, *redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta Zagrebu*

Dr. sc. Vlasta Drevenkar, *znanstvena savjetnica, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada*

Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, *znanstvena savjetnica, Pliva Hrvatska d.o.o – Istraživanje i razvoj, Zagreb*

Rad prihvaćen: 17. travnja 2013.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Analytics and Controle of Medicines
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

h.D. thesis

NEW CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND CHROMATOGRAPHY METHODS FOR ANALYSIS OF STATINS

Miranda Sertić

SUMMARY

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world and one of the major risk factors for their development is considered hyperlipidemia. Statins are most commonly used drugs in the treatment of hyperlipidemia, and are one of the most often prescribed drugs in general. Statins act by competitively inhibiting HMG-CoA reductase, the rate limiting enzyme in the cholesterol biosynthesis. Not all statins have official pharmacopoeia monographs, so new analytical methods for their identification and determination in active pharmaceutical ingredients and finished drug products are highly required. Statin therapy is long-term and they are used on daily basis, so their purity assessment is of great importance. Hence, development of selective and sensitive methods for characterization, identification and determination of their impurities is indispensable.

Red fermented rice contatins 14 monacolins with hypolipemic effect, and the most important one is monacolin K, also known as lovastatin. There are numerous dietary supplements containing red fermented rice on the market. Unfortunately the relevant national agencies around the world warn of dietary supplements' poor quality and the need for their increased supervision and regular inspection.

Therefore, the aim of this research was to develop new, fast, selective, sensitive, precise and accurate analytical methods for the identification and determination of statins, characterization and quantification of atorvastatins impurities, which is the most commonly used statin drug, and determination of active and toxic ingredients in red fermented rice. Highly sophisticated analytical techniques were used: capillary electrophoresis (CE), high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). In total 6 new analytical methods were developed, validated and successfully applied. The proposed CE method represents a universal fast analytical method for the analysis of any of the six statins registered in the European Union. The content of four atorvastatin impurities was determined and eight other impurities were structurally characterized and identified by HPLC-DAD-MS^n method. The results of the red fermented rice products analysis indicated significant deviations in lovastatin content from declared values and among different batches. This suggests the need for tighter, more detailed and more frequent control in order to ensure effectiveness, safety and quality of these products.

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

Thesis includes: 247 pages, 57 figures, 24 tables and 186 references. Original is in Croatian language.

Keywords: statins, red fermented rice, capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography, mass spectrometry

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

Reviewers: **Irena Vedrina Dragojević**, **Ph.D.** *Full Professor,* Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

Vlasta Drevenkar, **Ph.D.** *Senior Scientist, Institute for Medical Research and Occupational Health*

Biserka Cetina-Čižmek, **Ph.D.** *Senior Scientist, Pliva Croatia Ltd. - Research and Development, Zagreb*

The thesis was accepted: 17 April, 2013