Zelena kromatografija u analitici lijekova

Štefanac, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:773070

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Petra Štefanac

Zelena kromatografija u analitici lijekova

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Najveća zahvala ide mojoj obitelji. Hvala što ste me naučili da se upornost isplati i da nikad ne odustajem. Bez vas ne bih bila tu gdje jesam. Hvala mojim dragim prijateljima na podršci, motivaciji i pomoći, znajte da je svaki moj uspjeh dijelom i vaša zasluga. Hvala mojoj mentorici na savjetima i pomoći oko izrade diplomskog rada.

Sadržaj

1. UVOD……... 1
   a. Zelena kemija i zelena analitička kemija…… 1
   b. Primjena načela zelene kemije u tekućinskoj kromatografiji……..... 2
      1.2.1. Primjena načela zelene kemije u postupcima pripreme uzoraka..... 2
      1.2.2. Primjena načela zelene kemije u kromatografiji…….……...…… 7
   1.3. Evaluacija ekološke prihvatljivosti postupka……...…… 11
      1.3.1. NEMI (engl. *National Environmental Methods Index)*..... 11
      1.3.2. Analitička eko-ljestvica (engl. *Analytical Eco-Scale*)..... 13
      1.3.3. HPLC-EAT (engl. *Environmental Assessment Tool*)..... 14
2. OBRAZLOŽENJE TEME…….. 15
3. MATERIJALI I METODE…… 16
4. REZULTATI I RASPRAVA…….. 17
   4.1. Inovativni razvoj eko eko fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima (SFC) za određivanje polarnih sastavnica……... 17
   4.2. Primjena zelene kemije pri razvoju stabilitetno-indikativne HPLC metode za analizu klonazepama i sličnih supstanci u farmaceutskim formulacijama uz izračun nepouzdanosti…….. 23
   4.3. Razvoj zelene analitičke metode za analizu statina……...……...…..... 29
5. ZAKLJUČCI……... 35
6. LITERATURA…… 36
7. SAŽETAK/SUMMARY…… 39

1. Uvod

1.1. Zelena kemija i zelena analitička kemija

Izazov za današnje kemičare je razviti nove proizvode, procese i usluge koji odgovaraju uvjetima održivog razvoja. To zahtjeva novi pristup pri kojem su količina energije i materijala uloženih u proces svedeni na najmanju mjeru, uz najpovoljniju učinkovitost. Zelena analitička kemija podrazumijeva korištenje tehnika i metoda kod kojih je smanjena ili u potpunosti eliminirana upotreba otapala, reagensa, konzervansa i ostalih kemikalija opasnih za ljudsko zdravlje ili okoliš (www.chromatographyonline.com). Nadalje, u zelenoj kemiji primjenjuju se pouzdane tehnike i metode koje omogućuju bržu i energetski učinkovitiju analizu uzoraka. Ideja zelene kemije temelji se na održivom razvoju pri čemu centar istraživanja nije isključivo na razvoju i primjeni analitičke metode već na utjecaju kemikalija na okoliš i zdravlje ljudi. Sama ideja zelene kemije javila se 1990-ih godina u SAD-u, a osnovna definicija proširila se na 12 načela usmjerenih na energetsku učinkovitost i upotrebu obnovljivih izvora (Anastas i Eghbali, 2010; Kieth i sur., 2007) (Tablica 1).

Tablica 1. Načela zelene kemije (prevedeno i prilagođeno, Anastas i Warner, 1998)

12 načela zelene kemije	
1.	Spriječiti nastajanje otpada
2.	Ekonomija atoma - sinteza treba biti osmišljena na način da se u potpunosti iskoriste sve početne tvari
3.	Ekološki prihvatljivija sinteza - sinteza treba biti osmišljena tako da upotrjebljene i nastale tvari imaju što manju ili nikakvu toksičnost za ljudsko zdravlje i okoliš
4.	Priprema sigurnijih kemikalija – produkti kemijskih sinteza trebaju imati ciljanu funkciju uz što manju moguću toksičnost
5.	Sigurna otapala i pomoćne tvari – ukoliko je moguće izbjegavati primjenu pomoćnih tvari, a ako se koriste, trebaju biti neškodljive
6.	Energetska učinkovitost – smanjiti potrebe za energijom
7.	Korištenje obnovljivih tvari

8.	Smanjiti primjenu postupka derivatizacije – ukoliko nema izričite potrebe ne koristiti postupke derivatizacije kao dodatne korake u kemijskom postupku koji zahtjeva uporabu dodatnih kemikalija
9.	Kataliza – poželjna je primjena selektivnih katalizatora
10.	Kemijski produkti bi trebali biti nakon primjene razgradivi na neškodljive razgradne produkte koji ne zaostaju u okolišu
11.	Potrebno je razviti analitičke metode za praćenje nastanka toksičnih produkata u svrhu sprječavanja zagađenja okoliša
12.	Kemikalije korištene u postupcima trebaju biti birane tako da imaju što manji potencijal za uzrokovanje kemijskih nezgoda (npr. curenje kemikalija, eksplozije, požari)

1.2. Primjena načela zelene kemije u tekućinskoj kromatografiji

Kromatografske tehnike, posebice tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), tehnika je u kojoj se koriste opasna otapala uz nastanak značajne količine ekološki neprihvatljivog otpada. Kod ovih instrumentalnih tehnika postoji mogućnost primjene načela zelene kemije gotovo u svakom koraku analitičkog postupka. Kao veće izvore proizvodnje onečišćenja štetnih za zdravlje ljudi i okoliš potrebno je istaknuti pripremu uzoraka za analizu, ali i organska otapala koja predstavljaju otpad nakon postupka kromatografske analize (www.chromatographyonline.com).

1.2.1. Primjena načela zelene kemije u postupcima pripreme uzoraka

Priprema uzorka najveći je izazov analitičkog postupka zato što neposredno utječe na pouzdanost rezultata analize. U idealnom slučaju analiza bi se provodila na mjestu uzimanja uzorka, bez predobrade, no za većinu analitičkih metoda priprema uzorka je još uvijek neizbježan korak (Kieth i sur., 2007). Da bi uzorak bio prikladno pripremljen za analizu, bitno je osigurati visoku ekstrakcijsku učinkovitost ciljnog analita, ukloniti interferencije i omogućiti analizu uz što manji utjecaj matriksa (Armenta, 2017). Dosad najčešće korištene tehnike pripreme uzoraka za analizu su ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) i ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), no ove tehnike imaju brojne nedostatke koje ih čine potpuno neprihvatljivima u okvirima zelene analitičke kemije. Otapanje uzorka i ekstrakcija analita podrazumijevaju trošenje otapala i energije, stoga je poželjno birati

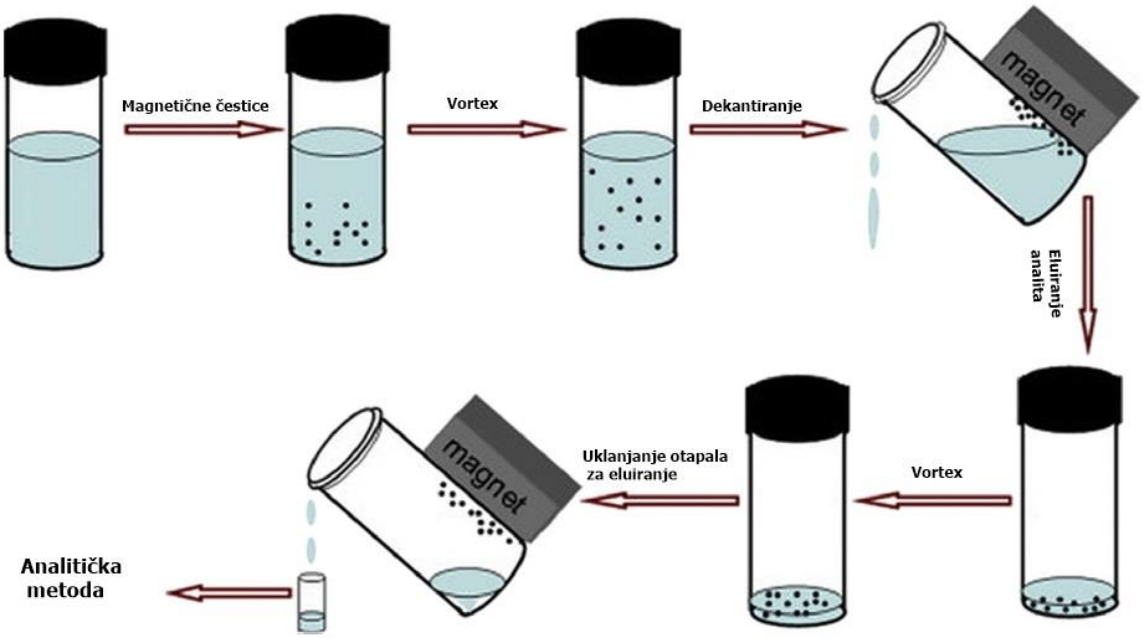
postupke s manje opasnim otapalima, pri sobnoj temperaturi kako bi se uštedila energija, sa što manjim stvaranjem otpada i što manje ljudskog rada (Armenta i sur., 2015).

Devedesetih godina prošlog stoljeća započeo je razvoj mikroekstrakcijskih tehnika, kako za krute, tako i za tekuće uzorke. Ključne prednosti ovih tehnika pred uobičajenim tehnikama pripreme uzoraka za analizu su sljedeće: smanjena upotreba organskih otapala i opasnih kemikalija, smanjeno vrijeme trajanja pripreme uzoraka, ušteda energije, veća sigurnost za okoliš i analitičara te primjenjivost za kromatografske analize (Filippou, 2017.; www.chromatographyonline.com).

Mikroekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) je jednostavna tehnika pripreme uzoraka koja ne uključuje upotrebu otapala. Moguće ju je podijeliti u dvije osnovne faze: adsorpcija analita na reaktivni sorbens i desorpcija analita sa sorbensa, odnosno prijenos analita u uređaj za analizu. Osnovni dio pribora za mikroekstrakciju čvrstom fazom je brizgalica unutar koje se nalazi vlakno obloženo sorbensom od polimernog materijala. Upravo odabrani polimer ima utjecaj na selektivnost i učinkovitost ekstrakcije, kao i osjetljivost cijelog analitičkog postupka. Danas se kao polimeri najčešće koriste polidimetilsiloksan (PDMS), divinilbenzen (DVB), karboksen (CAR), polietilenglikol (PEG) i Carbowax (CW). Mikroekstrakcija čvrstom fazom dijeli se na dva izvedbena formata s obzirom na položaj vlakna u odnosu na uzorak. Dakle, mikroekstrakcija čvrstom fazom može biti direktna (engl. *Direct Injection – Solid Phase Microextraction*, DI-SPME) ili indirektna (engl. *Headspace – Solid Phase Microextraction*, HS-SPME). Kod DI-SPME formata vlakno obloženo sorbensom neposredno je izloženo tekućem ili plinovitom uzorku pri čemu se analiti adsorbiraju na vlakno. Kod HS-SPME formata obloženo vlakno izloženo je u plinovitom prostoru iznad tekućeg ili krutog uzorka. Analiti se prenose iz uzorka u plinovitu fazu te se potom adsorbiraju na vlakno. Na ovaj način postiže se bolja selektivnost metode uz smanjenu mogućnost kontaminacije vlakna. Ovo je jednostavna i brza tehnika pripreme uzoraka, zahtjeva malu količinu samog uzorka i ne zahtjeva upotrebu otapala. Koristi se kao *off-line* tehnika, no budući da se jednostavno povezuje s instrumentalnim tehnikama poput plinske kromatografije (GC) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), često se koristi i kao *on-line* tehnika. Primjenjiva je za uzorke u plinovitom, tekućem i čvrstom stanju, a ovom tehnikom moguće je ekstrahirati i hlapljive i nehlapljive sastavnice iz različitih uzoraka. Njen glavni nedostatak odnosi se na nedovoljnu selektivnost komercijalno dostupnih vlakana, slabu kemijsku i toplinsku stabilnost, kao i preveliku mehaničku osjetljivost nekih vlakana, ali i ograničeno vrijeme uporabe (Filippou i sur, 2017; www.chromatographyonline.com).

Disperzivna ekstrakcija mikro čvrstom fazom (engl. *Dispersive Micro-Solid Phase Extraction,* DμSPE) ima mnoge prednosti pred SPE-om. Prvenstveno, nije potrebna složena analitička oprema, potrošnja otapala je značajno smanjena, kao i vrijeme trajanja postupka. U ovoj tehnici nekoliko mikrograma reaktivnog sorbensa dispergira se u tekućem uzorku pri čemu se analiti adsorbiraju na površinu sorbensa. Nakon toga, suspenzija se centrifugira ili filtrira i prikupi se sorbens. Desorpcija analita s reaktivnog sorbensa vrši se primjenom prikladnog organskog otapala (Khezeli i Daneshfar, 2017). Kao sorbens najčešće se koriste grafen i ugljikove nanočestice, a specifičnost prema analitu moguće je postići dodatnim modifikacijama reaktivnog sorbensa. Ekstrakcijska učinkovitost i brzina postupka pripreme uzoraka često su veće nego kod SPE tehnike. Nadalje, koriste se neznatne količine organskog otapala i sorbensa. Nakon ekstrakcije, analite je moguće analizirati uobičajenim kromatografskim tehnikama poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) ili plinske kromatografije (GC) (Filippou i sur., 2017).

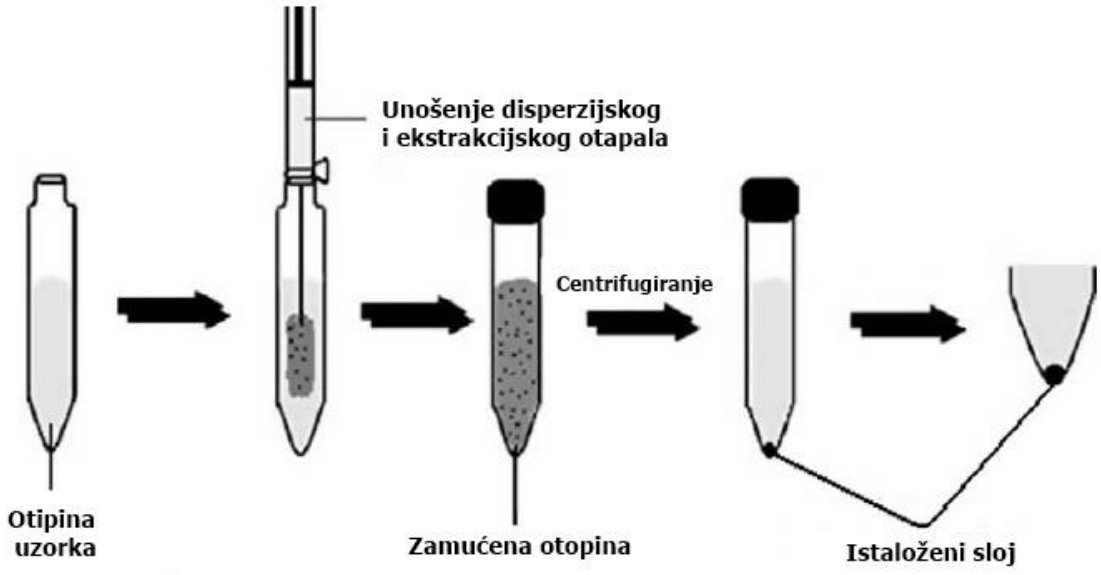
Magnetska ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Magnetic Solid Phase Extraction*, MSPE) koristi čestice od nano do mikro veličina. Jezgra čestice obično sadrži željezo, nikal, kobalt ili neki od njihovih oksida, a vanjski omotač čine materijali poput silikata, aluminija, grafena, kitozana, surfaktanata i slično. Reaktivni sorbens nanesen je na čestice magneta koje se dispergiraju u otopini uzorka pomoću ultrazvuka ili vortexa pri čemu se ciljni analit adsorbira na površinu sorbensa. Čestice sorbensa odvoje se od otopine primjenom vanjskog magneta, stoga nisu potrebni postupci centifugiranja i filtracije. Analit se eluira s reaktivnog sorbensa primjenom prikladnog organskog otapala (Slika 1). Ovo je brza metoda ekstrakcije analita iz uzoraka koja ne zahtjeva upotrebu velike količine organskog otapala. Reaktivni sorbens ima veliku selektivnost prema analitu i moguće ga je ponovno koristiti u sljedećem ekstrakcijskom postupku. Dijamagnetičnost većine onečišćenja u uzorku smanjuje mogućnosti interferencija (Filippou i sur., 2017; Vasconcelos i Fernandes, 2017).



Slika 1. Postupak pripreme uzoraka magnetskom ekstrakcijom čvrstom fazom (preuzeto i prilagođeno iz Vasconcelos i Fernandes, 2017).

Ekstrakcija miješanjem štapića s reaktivnim sorbensom (engl. *Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE) je ekstrakcijska tehnika koja se prvenstveno primjenjuje u ukoncentriravanju hlapljivih i poluhlapljivih tvari iz vodenog uzorka. Štapić za miješanje obložen je polidimetilsiloksanom, nepolarnim sorbensom koji stupa u hidrofobne interakcije s ciljnim molekulama. Ovisno o strukturi analita, nastaju vodikove i/ili Van der Waalsove veze. Postupak ekstrakcije sastoji se od nekoliko koraka. Prvo se štapić unese u otopinu uzorka ili se smjesti u plinovitu fazu iznad uzorka (engl. *HeadSpace Stir Bar Sorptive Extraction* - HS-SBSE) pri čemu se analit adsorbira na reaktivni sorbens. Zatim se štapić ispere ultračistom vodom i osuši. Desorpciju analita s reaktivnog sorbensa moguće je provesti ili termalnom desorpcijom ukoliko se uzorak analizira primjenom GC ili tekućinskom desorpcijom ukoliko se uzorak analizira pomoću HPLC, CE ili GC. Ova ekstrakcijska tehnika, visoke učinkovitosti i reproduktivnosti, omogućava nisku osjetljivost analitičke metode uz malu potrošnju organskih otapala. Osim što je moguća istovremena ekstrakcija nekoliko različitih analita, često se primjenjuje i uzastopna ekstrakcija pojedinih analita. Pored navedenih prednosti potrebno je istaknuti i neizbježne nedostatke tehnike poput velikog utjecaja matriksa na ekstrakcijsku učinkovitost, kao i nedostatak komercijalno dostupnih sorbensa primjerenih za ekstrakciju polarnih analita (Filippou i sur., 2017; Baltussen i sur., 1999).

Tehnika pripreme uzoraka mikroekstrakcija tekućom fazom (engl. *Liquid Phase Microextraction*, LPME) razvila se iz LLE zbog potrebe za ekonomičnijim i ekološki prihvatljivijim predanalitičkim postupkom. Analiti se ekstrahiraju iz vodenog uzorka (tzv. donorske faze) te se prenose u malu količinu (nekoliko mikrolitara) otapala (tzv. akceptorsku fazu) koja se ne miješa s vodom. LPME tehnika kompatibilna je s kapilarnom GC, kapilarnom elektroforezom i HPLC-om. Tri su podvrste LPME tehnike: mikroekstrakcija u jednoj kapi (engl. *Single-Drop Microextraction,* SDME), mikroekstrakcija tekućom fazom u udubljenom vlaknu (engl. *HollowFiber Liquid-Phase Mixroectraction*, HF-LPME) i disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) (Slika 2) (Filippou i sur., 2017; Sarafraz-Yazdi i Amiri, 2010; Psillakis i Kalogerakis, 2003).

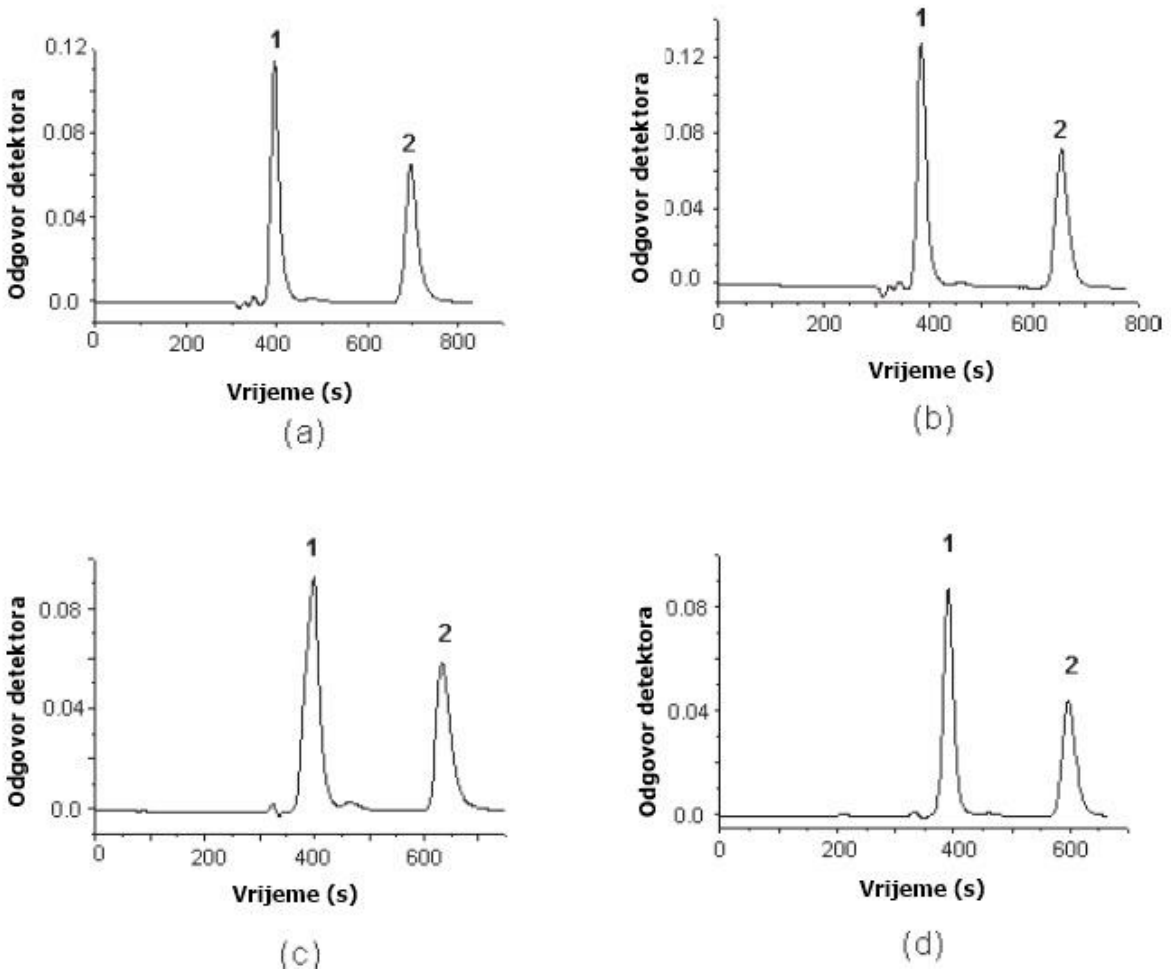


Slika 2. Shematski prikaz DLLME tehnike. U vodeni uzorak unese se mali volumen ekstrakcijskog i disperzijskog otapala pri čemu nastaje zamućena otopina. Nakon centrifugiranja istaloženi sloj se prikupi i analizira (preuzeto i prilagođeno iz Sarafraz-Yazdi i Amiri, 2010)

1.2.2. Primjena načela zelene kemije u kromatografiji

HPLC tehnika je zasigurno najčešće korištena separacijska tehnika u analitici lijekova pri čemu je potrebno istaknuti kako se najčešće primjenjuju obrnuto fazne kromatografske kolone. Posljedično tome, najčešće se koriste pokretne faze koje se sastoje od acetonitrila, odnosno metanola i vode ili pufera. Premda štetna za okoliš i zdravlje ljudi, ova otapala se često koriste budući da se lako miješaju s vodom, niske su viskoznosti, ne reagiraju s najvećim brojem analita i komercijalno su široko dostupna visokog stupnja čistoće. Nadalje, prikladna su ukoliko se detekcija analita provodi široko korištenim UV/VIS detektorom zbog niskog tzv. UV-*cut off*-a. Unatoč navedenim prednostima, ova otapala neprihvatljiva su prema načelima zelene kemije. Acetonitril je zapaljiv, lako hlapi, otrovan je i sav otpad nakon analize tekućinskim kromatografom, koji između ostalog sadrži i acetonitril, mora se odlagati kao kemijski otpad što donosi dodatni trošak (Ribeiro, 2004).

Kao zamijena acetonitrilu preporuča se primjena etanola kao sastavnice pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji. Etanol ima svojstva koja značajno više odgovaraju načelima zelene kemije, poput manje isparljivosti koja osigurava veću stabilnost pokretne faze, manje je toksičan i biorazgradiv je. Kao dio mobilne faze, ima svojstva slična metanolu i acetonitrilu, osim veće viskoznosti pri istoj elutropskoj snazi. Veća viskoznost pokretne faze kao posljedicu ima povećanje tlaka u kromatografskom sustavu. Ribeiro i sur. (Ribeiro i sur, 2004) u svojoj studiji usporedili su svojstva ovih triju otapala (acetronitril, metanol i etanol) u RP-HPLC-u na C8 i C18 kolonama. Pokazalo se da je učinkovitost analize jednaka ukoliko se koristi etanol kao sastavnica pokretne faze pri 25 ºC. Povećanjem temperature na 40 ºC smanjila se viskoznost etanola, pri čemu se donekle smanjila učinkovitost metode, ali je i dalje usporediva s onom kada se kao pokretna faza koristila otopina acetonitrila i vode. Faktori zadržavanja bili su slični za sve tri pokretne faze pri istoj elutropskoj snazi, isto vrijedi i za faktore simetrije pikova. Provedeno istraživanje upućuje kako ispitana organska otapala kao sastavnice pokretne faze imaju slična svojstva i, kada je to moguće, preporuča se koristiti etanol zbog prihvatljivijeg utjecaja na okoliš (Slika 3).



Slika 3. Kromatogrami standardne otopine anilin (1) i N,N-dimetilanailina (2). Analize provedene na C18 kromatografskoj koloni pri protoku pokretne faze 0,2 $mLmin^{-1}$ te izokratnoj eluaciji s 70:30 *v/v* EtOH:H_2O pri 25 ºC (a), 70:30 *v/v* EtOH:H_2O pri 40 ºC (b), 85:15 *v/v* MeOH:H_2O pri 25 ºC (c) i 80:20 *v/v* ACN:H_2O pri 25 ºC (d) (preuzeto i prilagođeno iz Ribeiro, 2004).

Istraživanje je pokazalo kako je acetonitril također moguće zamijeniti acetonom budući da se jednako miješa s vodom, slične su viskoznosti i sličnih svojstava kao otapala. Glavni nedostatak acetona je visoka tzv. *cut-off* valna duljina (330 nm), što ograničava uporabu UV detektora. Ipak, aceton je moguće uspješno koristiti kao sastavnicu pokretne faze ukoliko se UV detektor zamijeni MS detektorom (Funari i sur., 2015).

Posebno zanimljiva je upotreba vode kao pokretne faze. Posljednjih godina velik broj istraživanja usmjeren je na razvoj tekućinske kromatografije s vodom pri visokoj temperaturi kao pokretnom fazom (engl. *SuperHeated Water Liquid Chromatography,* SHWLC) pri čemu se koristi čista voda kao pokretna faza, a svojstva vode kao otapala za razdvajanje analita se ne

poboljšavaju dodatkom organskih otapala, već povećanjem temperature. U ovu svrhu primjenjuje se voda najveće čistoće i preporučljivo je tretirati je intertnim plinom ili ultrazvučnom kupelji kako bi se uklonili mjehurići zraka. Tlak potreban da bi se voda zadržala u tekućem stanju pri 250 ºC je 40 bara. Ukoliko je analizu potrebno provesti pri definiranim pH uvjetima, u pokretnu fazu, odnosno vodu moguće je dodati pufere od kojih se najčešće koristi fosfatni pufer. Kao pokretna faza ponekad se koristi i deuterirana voda čija glavna prednost je što omogućava detekciju NMR tehnikom (Shen, 2015; Hartonen i Riekkola, 2008).

Ionske tekućine je također moguće u malim količinama dodavati u pokretnu fazu. U tekućinskoj kromatografiji dosad su korištene za poboljšanje razdvajanja bazičnih analita, budući da anioni i kationi prisutni u pokretnoj fazi utječu na vrijeme zadržavanja i razlučivanje analita (Vian i sur., 2017; Wang, 2009).

Najčešće korišteni tekućinski kromatograf sa standardnim kolonama (duljine od 15 do 25 cm te unutarnjeg promjera od 4,6 mm i česticama nepokretne faze veličine 5 μm) pumpa pokretnu fazu brzinom od 1 mL/min te na taj način proizvede oko 1 litru otpadnih otapala dnevno (Welch i sur., 2010). Dakle, kako bi tehnika bila ekološki prihvatljivija potrebno je uz primjenu ekološki prihvatljivijih otapala smanjiti njihovu potrošnju te u konačnici smanjiti stvaranje otpadnih otapala.

Jedan od mogućih načina smanjenja potrošnje organskih otapala je smanjenje unutarnjeg promjera kromatografske kolone. Osim što se primjenom užih kolona smanjuje potrošnja otapala, često se povećava osjetljivost analitičke metode što je izravna posljedica smanjenog razrjeđenja analita u pokretnoj fazi.

Odnos polumjera kolone i brzine protoka prikazan je jednadžbom 1.

$$F_2 = F_1 \left(\frac{r_2}{r_1}\right)^2 \qquad (1)$$

Gdje je

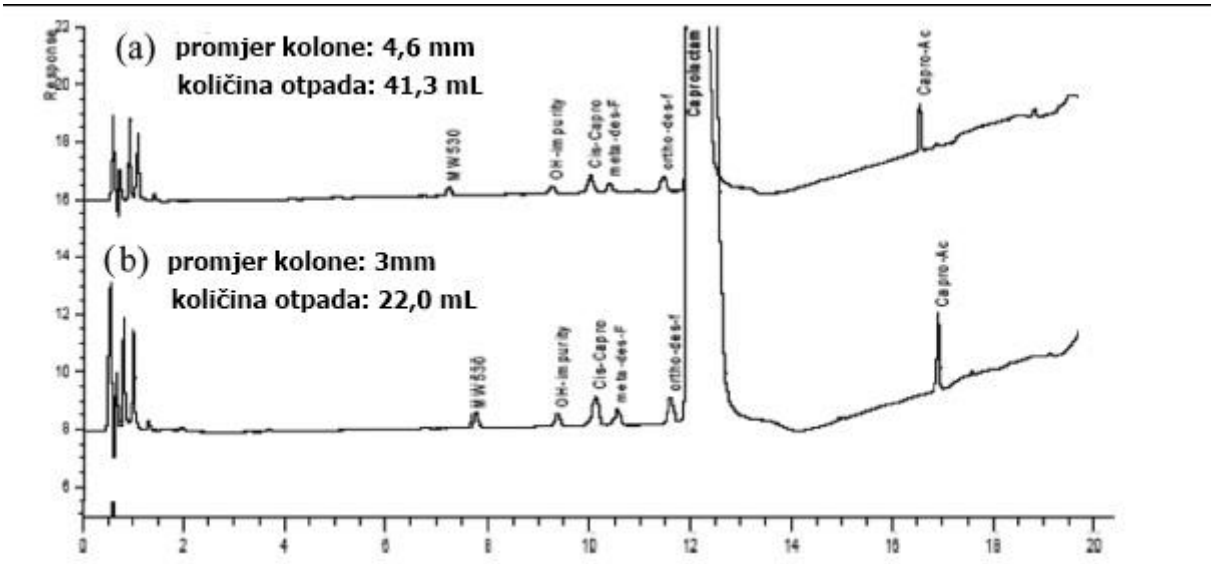
F_1 i r_1 brzina protoka i radijus veće kolone,

F_2 i r_2 brzina protoka i radijus manje kolone.

Prema jednadžbi 1 moguće je utvrditi kako, da bi se zadržala konstantna brzina kromatografske analize pri smanjenom promjeru, potrebno je smanjiti brzinu protoka proporcionalno kvadratu kvocijenta dvaju polumjera.

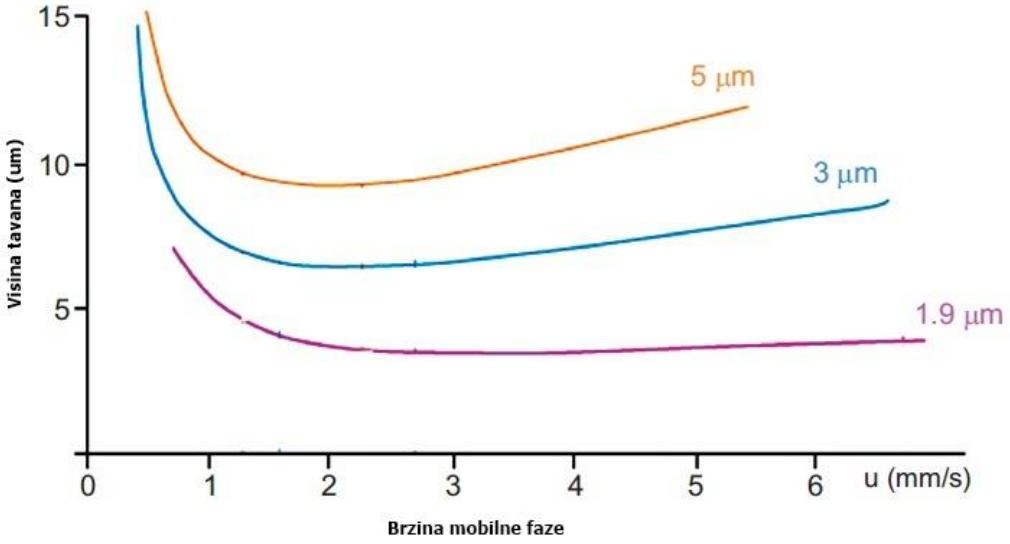
Dakle, ukoliko se primjenjuje kolona manjeg promjera potrebno je smanjiti brzinu protoka pokretne faze kako bi se zadržala ista učinkovitost kromatografske analize. Na Slici 4. prikazan

je primjer kako se značajno smanjuje proizvodnja otpadnih otapala uz jednaku učinkovitost uz primjenu kolone manjeg promjera (Welch i sur., 2010).



Slika 4. Utjecaj promjera kromatografske kolone na proizvodnju otpadnih otapala (preuzeto i prilagođeno iz Welch i sur., 2010).

Nadalje, smanjenje potrošnje organskih otapala i stvaranje otpadnih otapala moguće je postići primjenom nepokretne faze s malim česticama (veličine manje od 2 μm). Relativno kratke kromatografske kolone napunjene sitnim česticama omogućuju veliku brzinu i učinkovitost analize (Wu i Clausen, 2007). U ovom slučaju radi se o tekućinskoj kromatografiji ultra velike djelotvornosti (engl. *ultrahigh pressure* ili *ultrahigh performance liquid chromatography*, UHPLC). Tako male čestice uzrokuju stvaranje visokog tlaka (do 1000 bara) u kromatografu, no značajno je smanjen injekcijski volumen, vrijeme analize, a u konačnici i potrošnja otapala. Prema Van Deemterovoj jednadžbi, potrebno je smanjiti visinu teorijskog tavana kako bi se poboljšala učinkovitost kolone (Slika 5).



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti visine teorijskih tavana o brzini protoka pokretne faze (preuzeto i prilagođeno iz Chawla i Ranjan, 2016).

Učinkovitost je proporcionalna duljini kolone, a obrnuto proporcionalna veličini čestica nepokretne faze, stoga za isti faktor treba smanjiti duljinu kolone i veličinu čestica da bi razlučivanje ostalo isto. Tako male čestice zahtijevaju veću brzinu protoka, a za postizanje veće brzine, stvara se veći tlak (Chawla i Ranjan, 2016). Zbog velike brzine protoka može se javiti zagrijavanje kolone. Povećanje temperature može utjecati na razdvajanje analita, stoga kolonu treba ohladiti što dovodi u pitanje energetsku efikasnost ove tehnike.

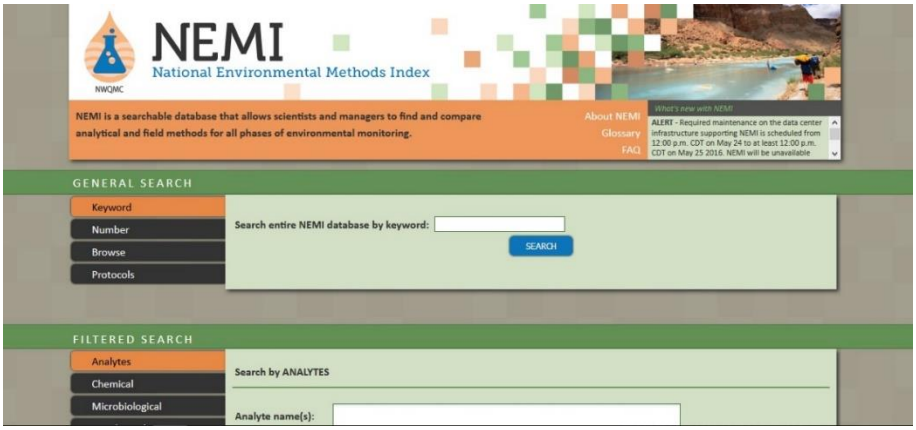
1.3. Evaluacija ekološke prihvatljivosti postupka

Pojam zelene kemije je relativno nov i potrebno je svaki postupak evaluirati kako bi se uvidjelo odgovara li načelima zelene kemije. Evaluacija analitičkih metoda vrlo je zahtjevan proces zbog velikog broja različitih analita i analitičkih metoda, kompleksnosti matriksa uzorka i analitičkih kriterija koje treba uzeti u obzir. Postoji nekoliko sustava kojima se ocjenjuje utjecaj postupka na okoliš i međusobno se uspoređuju različiti postupci (www.chromatographyonline.com).

1.3.1. NEMI (engl. *National Environmental Methods Index*)

NEMI je najopsežniji sustav evaluacije analitičke metode s obzirom na njen učinak na okoliš. To je *on-line* dostupna internetska baza koju je moguće pretraživati na adresi http://www.nemi.gov (Slika 6). Za javnost je dostupna od 2002. godine, a osmislili su je stručnjaci iz *Methods and Data Comparability Board* (MDCB) koji se bave kvalitetom vode i

očuvanjem okoliša. Korisnicima su dostupni sažeci metoda ili cjelokupni opisi, a metode se mogu lako pretraživati, grupirati i uspoređivati. Pretraživanje je moguće provoditi na osnovu vrste analita, tipa medija, instrumenta i detektora, potkategorije metode (organska, anorganska, biokemijska, mikrobiološka, radiokemijska) i izvora metode.

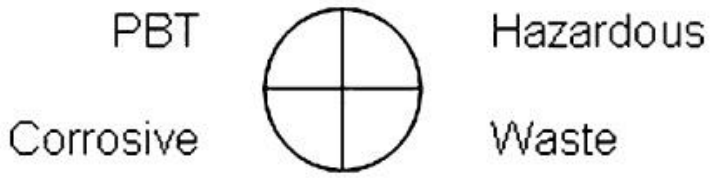


Slika 6. http://www.nemi.gov.

Postojeća metoda ocjenjuje se na osnovu 4 kriterija koji se odnose na reagense ili otpadnu tvar:

a. PBT (engl. *persistent, bioaccumulative, toxic*) – tvar se dugo zadržava u okolišu, akumulira se i toksična je. Nalazi se na TRI (*Toxic Release Inventory*) listi Agencije za zaštitu okoliša.
b. Opasnost (engl. *Hazardous*) – tvar se nalazi na TRI listi ili RCRA (*Resource Conservation and Recovery Act*) listi (D, F, P ili U lista).
c. Korozivnost (engl. *Corrosive*)– ako je pH tijekom analize <2 ili >12.
d. Količina otpada (engl. *Waste*) – više od 50 grama otpada.

Navedeni kriteriji odabrani su u skladu s ranije navedenim načelima zelene kemije (Armenta i sur., 2017.). Za vizualno prikazivanje ovih kriterija, nastao je prikaz na Slici 7. Ako je metoda po određenom kriteriju ″zelenija″, tada će taj kvadrant biti obojan u zeleno. Ako metoda nije prihvatljivija, taj će kvadrant ostati neobojen. Dakle, pri usporedbi dviju metoda, ona s više ispunjenih polja bit će "zelenija" (Keith i sur., 2007).



Slika 7. Kriteriji za evaluaciju ekološke prihvatljivosti analitičke metode (preuzeto iz Keith i sur., 2007).

1.3.2. Analitička eko-ljestvica (engl. *Analytical Eco-Scale*)

Analitička eko-ljestvica (engl. *Analytical Eco-Scale*) metoda je evaluacije ekološke prihvatljivosti analitičkog postupka koja se temelji na usporedbi danog postupka s idealnim. Idealan zeleni analitički postupak ima ukupan rezultat od 100 bodova. Takva analiza ima sljedeće karakteristike:

a. Kemikalije nisu opasne (za okoliš ili ljude),
b. Potrošnja energije manja je od 0,1 kWh po uzorku,
c. Nema proizvodnje otpada.

Za svaku sastavnicu evaluiranog postupka koja nije u skladu s parametrima idealnog zelenog analitičkog postupka, dodjeljuju se kazneni bodovi koji umanjuju rezultat na eko-ljestvici. S obzirom na rezultat, postupci se svrstavaju u kategorije:
>75 odlična ekološka analiza,
>50 prihvatljiva ekološka analiza i
<50 neprihvatljiva analiza.
Reagensi koji se koriste u analizi ocjenjuju se prema *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS) s obzirom na opasnost za zdravlje i okoliš. Svaka kemikalija može biti označena jednim ili više piktograma koji označavaju različite opasnosti, a za svaki piktogram dodaju se kazneni bodovi na analitičkoj eko-ljestvici. Kazneni bodovi dodaju se i za metode koje imaju veliku potrošnju energije, npr. nuklearna magnetska rezonancija (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), plinska kromatografija i masena spektrometrija (engl. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, GC-MS), tekućinska kromatografija i masena spektrometrija (engl. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, LC-MS) i rendgenska difrakcija (Gałuszka i sur., 2012)

1.3.3. HPLC-EAT (engl. *Environmental Assessment Tool*)

HPLC-EAT je jednostavan i učinkovit pristup za evaluaciju ekološke prihvatljivosti HPLC metode. Dostupan je u obliku besplatnog programa na adresi http://www.biotek.lu.se/hplc-eat/. Kako bi se evaluirala ekološka prihvatljivost metode, uzimaju se u obzir okolišni, zdravstveni i sigurnosni čimbenici za sva otapala koja se koriste u metodi. Konačni zbroj pokazuje koliko je metoda zelena, s obzirom na otapala koja se koriste. Što je zbroj niži, metoda je zelenija, a na taj način se mogu uspoređivati različite metode.

Zbroj se izračunava prema jednadžbi 2:

$$\text{HPLC-EAT} = S_1m_1+H_1m_1+E_1m_1+ S_2m_2+H_2m_2+E_2m_2+\dots S_nm_n+H_nm_n+E_nm_n \quad (2)$$

gdje je

S,*H* i *E* predstavljaju sigurnosni, zdravstveni i okolišni faktor (prema Kolleru), *m* je masa otapala, a *n* je broj otapala.

S - sigurnosni čimbenik (prema Kolleru),

H - zdravstveni čimbenik (prema Kolleru),

E - okolišni čimbenik (prema Kolleru),

m - masa otapala i

n - broj otapala.

HPLC-EAT pristupom moguće je izračunati volumene različitih sastavnica pokretne faze, čak i kada se radi o smjesi triju otapala, bilo kod izokratnog ili gradijentnog eluiranja. Na taj način moguće je izračunati količinu pokretne faze potrebne za analizu određenog broja uzoraka (Gaber i sur., 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Uslijed nestašice i velikog porasta cijene acetonitrila bilo je nužno osmisliti kromatografske metode u kojima će se ovo otapalo zamijeniti, ali na način da ostale karakteristike metode budu očuvane. Iako je pokret zelene kemije bio aktivan i ranije, ova situacija na tržištu dovela je do pravog procvata. Toksična i opasna otapala predstavljaju opasnost za okoliš i zdravlje, zahtijevaju posebno odlaganje i time povećavaju troškove analize. Osim korištenja ekološki prihvatljivijih otapala, moguće je i smanjiti količinu potrebnog otapala. Načela zelene kemije mogu se primijeniti u svakom koraku analize i predstavljaju nit vodilju u razvoju novih kromatografskih metoda.

3. MATERIJALI I METODE

Za izradu diplomskog rada koristi se relevantna znanstvena i stručna literatura koja obrađuje problematiku primjene ekoloških načela u tekućinskoj kromatografiji u analitici lijekova. Pritom će se pretraživati sljedeće baze podataka: Science Direct, Web of Science i Scopus. Ključne riječi koje će se koristiti pri pretraživanju literature su sljedeće: green chromatography, green chemistry, green analytical chemistry, sample preparation. Dodatno, pretražit će se knjige i mrežne stranice koje obrađuju navedenu problematiku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U daljnjem tekstu bit će prezentirana tri istraživanja u kojima se primjenjuju načela zelene kemije u analitici lijekova

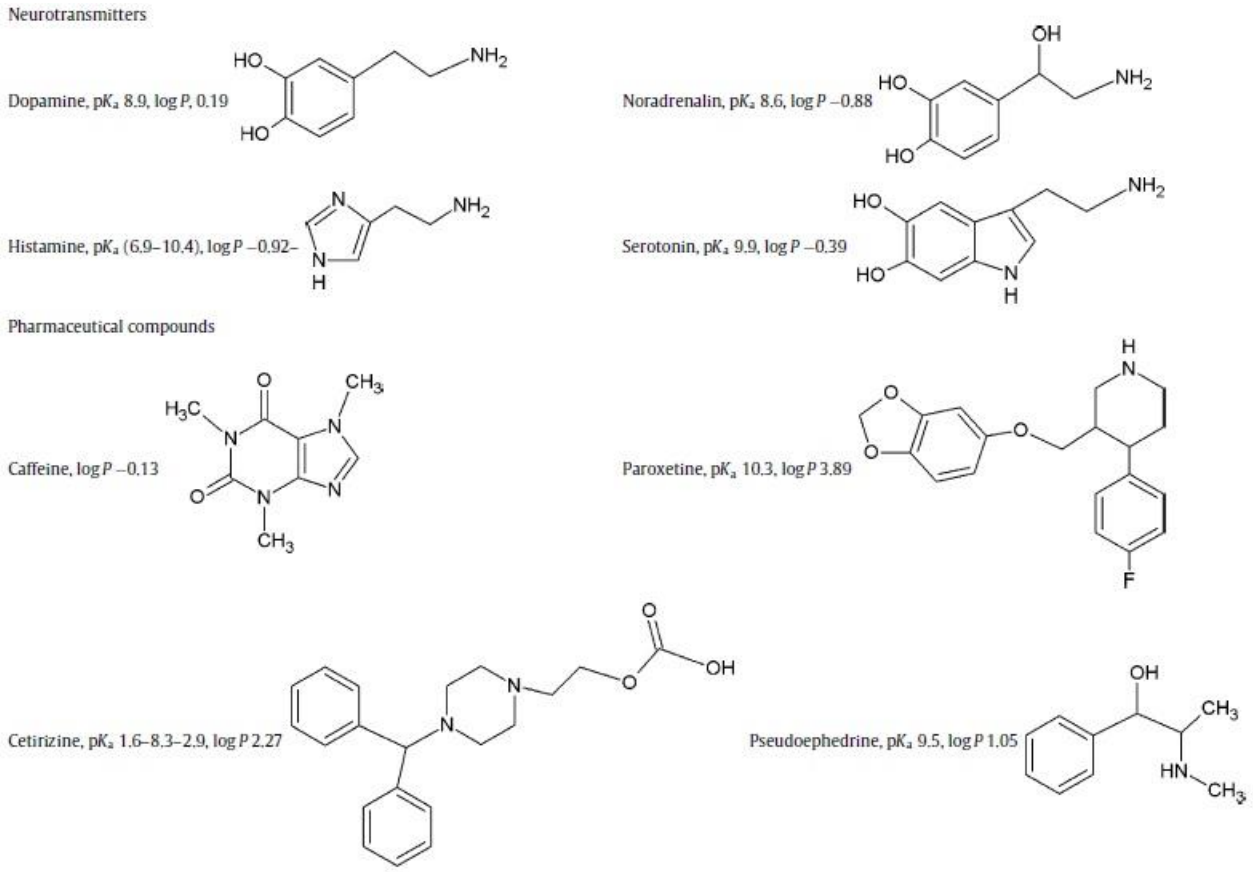
4.1. Inovativni razvoj eko fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima (SFC) za određivanje polarnih sastavnica

Uvod

Danas postoje mnoge napredne separacijske tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, *fused-core* tehnologije, tekućinske kromatografije pri visokim temperaturama i fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima. Među navedenim tehnikama upravo ova posljednja se smatra najzelenijom. Kako bi se dokazao potencijal ove tehnike, Dispas i sur. (Dispas i sur., 2012) odlučili su napraviti separaciju nekoliko vrlo polarnih sastavnica.

Budući da je ovo izazovan kromatografski pothvat, trebalo ga je dobro osmisliti i isplanirati. Prema ICH Q8 smjernicama preporuča se sistematični pristup poznat kao *quality by design*. Dio planiranja eksperimenta kojim se dokazuje osiguravanje kvalitete je tzv. *design space.* U ovom slučaju su to kromatografski uvjeti koji će osigurati uspješno razdvajanje analita. Još jedan parametar kvalitete su tzv. *critical quality attributes* (CQAs) ili kritične osobine kvalitete. To mogu biti npr. rezolucija, razdvajanje kritičnog para pikova (S_{crit}), vrijeme trajanja analize (t_{tot}). Minimalnu očekivanu kvalitetu moguće je opisati kao kriterije prihvatljivosti koji se odnose na neke kritične osobine kvalitete, npr. $S_{crit}>0$ ili $t_{tot}<45$min. Prema tome, ako su dobivene vrijednosti unutar navedenih kriterija, osigurana je kvaliteta. Također, metode razvijene pristupom *design space* su robusne jer namjerne promjene analitičkih uvjeta unutar predviđenih kriterija ne bi trebale utjecati na razdvajanje analita.

U ovom radu prezentiran je razvoj ekološki prihvatljive analitičke metode za određivanje polarnih molekula metodom SFC koristeći optimizaciju temeljenu na *design space* strategiji. Kao modelne molekule odabrani su: noradrenalin, serotonin, dopamin, histamin te pseudoeferdin, kofein, paroksetin i cetirizin (Slika 8).



Slika 8. Kemijske strukture, pK_a i log *P* vrijednosti polarnih sastavnica.

Materijali i metode

Prema UV spektrima analiti su podijeljeni u tri skupine. Njihove standardne otopine pripremljene su na sljedeći način: u prvoj grupi su kofein i serotonin dobiveni otapanjem 10 mg tvari u metanolu u odmjernoj tikvici od 10,0 ml, u drugoj grupi su histamin, dopamin, noradrenalin i paroksetin čije otopine su pripravljene otapanjem 50 mg tvari u odmjernoj tikvici od 10,0 ml, a u trećoj skupini je pseudoefedrin pripravljen otapanjem 100 mg tvari u istom volumenu. Radne otopine dobivene su razrjeđivanjem standardnih otopina s metanolom neposredno prije analize i to u koncentracijama (redom): 100 μg/ml, 500 μg/ml i 1 mg/ml. Konačna otopina načinjena je dodavanjem 1 ml svake standardne otopine u odmjernu tikvicu od 10,0 ml.

Kromatografska analiza provedena je na instrumentu Agilent Technologies HPLC 1100 series u modulu Fusion^{TM} A5 SFC. Za detekciju analita korišten je UV detektor na valnoj duljini od 220 nm. Pumpa i injektor instrumenta prilagođeni su za upotrebu u SFC-u prema Bergeru (Berger, 2011). Za kontrolu temperature kolone dodana je Croco-cil® pećnica.

Kako bi se izabrali najbolji kvalitativni parametri prije optimizacije metode, provedena su preliminarna istraživanja. Ispitane su nepokretne faze: silika nepokretna faza (zbog svog mehanizma zadržavanja analita koji bi mogao biti koristan u SFC-u), diol nepokretna faza (da bi se preveniralo prejako zadržavanje i/ili razvlačenje analita na koloni zbog većeg broja slobodnih silanolnih skupina prisutnih na površini nepokretne faze), silica-C nepokretna faza i etilpiridin kolona (da bi se izbjegao dodatak piridina u pokretnu fazu).

Modifikatori pokretne faze uključeni u preliminarna istraživanja bili su metanol, acetonitril i izopropanol, a aditivi trifluoroctena kiselina (TFA), diizopropilamin i etilenglikol. Aditivi su dodani u pokretnu fazu u svrhu poboljšanja njene polarnosti, mehanizma zadržavanja ili simetrije pikova. Brzina protoka pokretne faze bila je 2 ml/min u svim eksperimentima, osim onih provedenih primjenom kolone sa sub-2μm nepokretnom fazom (silika nepokretna faza) gdje je protok bio 1 ml/min. Primijenjeno je gradijentno eluiranje tijekom 20 min i zatim izokratno tijekom 5 minuta. Tlak u sustavu iznosio je 200 bara, a temperatura kolone bila je 40 ºC. Ova preliminarna istraživanja služila su za odabir početnih uvjeta pri optimizaciji metode.

Za optimizaciju kromatografske metode odabran je centralni kompozitni dizajn. Pritom su definirana četiri čimbenika: promjena gradijenta (S_G) koji se mijenjao promjenama vremena potrebnog za promjenu udjela metanola od 5 do 40%, koncentracija TFA u metanolu (TFA, mM), vrijeme izokratnog eluiranja (t_{iso}) i temperatura kolone (T). Pri optimizaciji su korištene dvije kolone različitih serija proizvodnje.

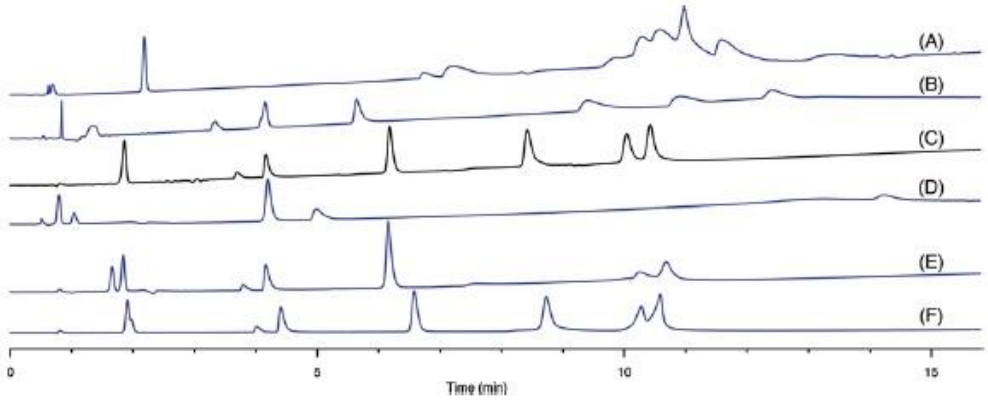
Kao najprikladnija odabrana je kolona s 2-etilpiridin nepokretnom fazom, metanolom kao modifikatorom i dodatkom TFA. Protok pokretne faze sastava CO_2/metanol/TFA bio je 2 ml/min. Tlak na kraju kolone iznosio je 200 bara, a injekcijski volumen je bio 5 μL.

Rezultati i rasprava

Glavni cilj ove studije bio je naći kromatografske uvjete koji će omogućiti razdvajanje svih sastavnica unutar 15 minuta trajanja analize. Za svaki skup uvjeta (nepokretna faza, modifikator, dodatak) analizirana je miješana otopina, bez identifikacije pojedinog pika.

Silika-C stacionarna faza nije se pokazala pogodnom za analizu ovih sastavnica. Vjerojatno zbog svoje smanjene polarnosti u usporedbi s uobičajenim silika fazama nije bilo dovoljno interakcija s polarnim analitima. BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) kolona, zajedno s metanolom kao modifikatorom pokretne faze, omogućila je razdvajanje 7 analita, ali uz razvlačenje pikova. Vjerojatno amino skupine prisutne u strukturi većine analita stupaju u jake interakcije sa silanolnim grupama nepokretne faze što uzrokuje razvlačenje analita po koloni. Prema tome, BEH kolona nije pokazala dovoljnu selektivnost za analizu ovih molekula. Diol nepokretna

faza ima manje slobodnih silanolnih skupina na površini što bi trebalo smanjiti jakost interakcija s analitima te posljedično razvlačenje pikova. U kombinaciji s propan-2-olom i TFA u pokretnoj fazi, razdvojeni su svi analiti, ali zadnja tri pika su bila široka. Kada se uz isti sastav pokretne faze (propan-2-ol i TFA) primijenila etilpiridin nepokretna faza, nekoliko pikova je bilo široko te je odnos signala i šuma je bio neprikladan. Kada se umjesto propan-2-ola primijenio metanol, pikovi su bili puno oštriji te je dobiveno prikladno razdvajanje analita. Kromatogrami dobiveni preliminarnim istraživanje prikazani su na Slici 9.

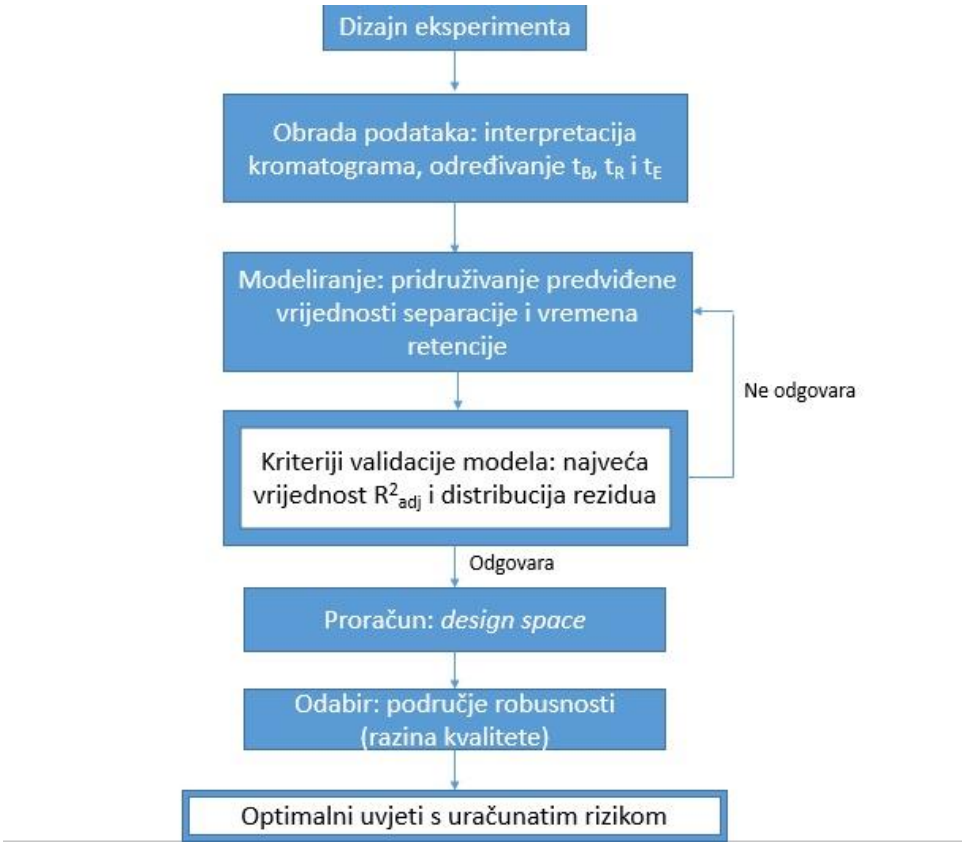


Slika 9. Kromatogrami dobiveni preliminarnim istraživanjem; (A) BEH HILIC, metanol, TFA; (B) diol, propan-2-ol, TFA; (C) etilpiridin, metanol, TFA; (D) diol, metanol, diizopropilamin; (E) etilpiridin, propan-2-ol, TFA; (F) etilpiridin, metanol, etilenglikol.

Evaluacijom ovih kromatograma, odabrani su uvjeti kromatografske analize: 2-etilpiridin nepokretna faza, metanol kao modifikator i TFA kao aditiv u pokretnoj fazi. Ovi kromatografski uvjeti omogućili su razdvajanje svih analita, osim dva koja su se djelomično preklapali, uz vrijeme analize od 12 minuta. Odabrani uvjeti korišteni su kao početna točka u razvoju metode za određivanje vrlo polarnih analita.

Nakon preliminarnih istraživanja, pristupilo se optimizaciji analitičke metode. Metodologija za robusnu optimizaciju sastoji se od 7 koraka koji su prikazani na Slici 10.

Kao modelna molekula odabran je noradrenalin budući da se najčešće najduže zadržavao na kolonama. Stoga je i najznačajnije utjecao na vrijeme kromatografske analize.



Slika 10. Shematski prikaz postupka optimizacije (preuzeto i prilagođeno iz Dispas i sur., 2012).

Optimizacijskim postupkom utvrđeni su optimalni uvjeti kromatografske analize: S_G 3,8 %/min, t_{iso} 3 min, TFA 25 mM i T 60,5 ºC s minimalnom razinom kvalitete π 0,41. Razlika između teorijskih i eksperimentalnih vrijednosti moguće je objasniti kratkim vremenom trajanja etilpiridin kolone te je u daljnjim istraživanjima primijenjena nova kromatografska kolona.

Za ispitivanje ponovljivosti analitičke metode, snimljena su po tri kromatograma pri optimiranim uvjetima pri čemu je dobivena zadovoljavajuća ponovljivost (Tablica 2).

Tablica 2. Rezultati ispitivanja ponovljivosti metode.

Tvar	RSD vremena zadržavanja (%)	RSD AUC* (%)	RSD normaliziranog AUC (%)
Kofein	0,4	3,37	2,24
Pseudoefedrin	0,3	5,16	3,41
Paroksetin	0,66	2,59	1,72
Cetirizin	0,2	1,51	Unutarnji standard
Histamin	0,33	9,22	6,1
Dopamin	0,3	3,27	2,17
Noradrenalin	0,16	4,68	3,1
Serotonin	0,37	9,03	5,98

*površina ispod krivulje

Nadalje, ispitivanja su pokazala da se metoda može smatrati otpornom budući da promjene gradijenta, vremena izokratnog eluiranja i koncentracija TFA nisu utjecale značajno na razlučivanje pikova.

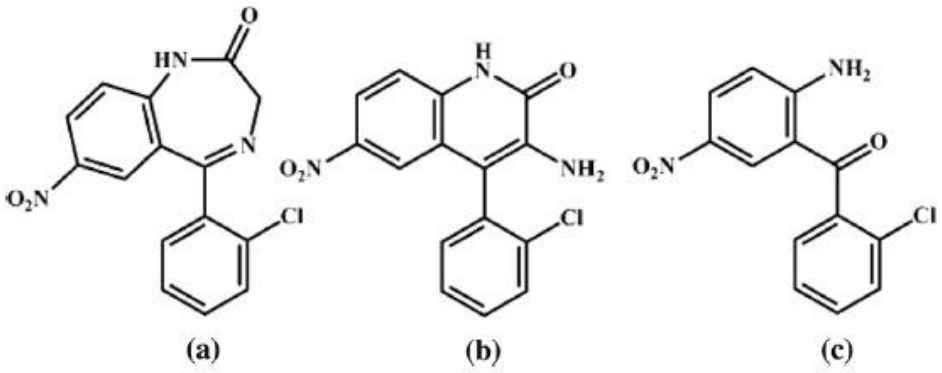
Zaključak

U ovom radu prvi put je korišten SFC za analizu katekolamina bez derivatizacije. Ovo je svakako ekološki prihvatljivija tehnika od HPLC tehnike kod koje se koriste velike količine acetonitrila. Sistematičnim i planiranim pristupom uz praćenje kritičnih osobina kvalitete uspješno je razvijena metoda za razdvajanje vrlo polarnih analita SFC tehnikom što predstavlja veliki analitički izazov. Razvijena metoda je otporna i to je utvrđeno već tijekom razvoja analitičke metode, a ne tijekom postupka validacije metode, što je inače uobičajena analitička praksa.

4.2. Primjena zelene kemije pri razvoju stabilitetno-indikativne HPLC metode za analizu klonazepama i sličnih supstanci u farmaceutskim formulacijama uz izračun nepouzdanosti

Uvod

Antiepileptik klonazepam u strukturi ima jedan benzodiazepinski prsten što ga čini podložnim razgradnji. U Američkoj farmakopeji toksična otapala metanol i tetrahidrofuran se primjenjuju kao sastavnica pokretne faze i procesa ekstrakcije klonazepama. Zbog izražene toksičnosti primjena ovih otapala nije u skladu s praksom zelene kromatografije. U ovom radu prikazan je razvoj brze, točne i precizne metode za određivanje klonazepama i srodnih tvari bez korištenja štetnih otapala (Eldin i sur., 2014) (Slika 11).



Slika 11. Strukture klonazepama i srodnih tvari:
klonazepam (a), supstanca A (b) i supstanca B (c).

Materijali i metode

Korištene su standardne otopine klonazepama (99,88%), srodne tvari A i B koje odgovaraju propisima Američke farmakopeje. Komercijalno dostupni uzorak tablete klonazepama proizvela je Sigma Pharmaceutical Industries (Quesna, Egipat). Za analizu je korišten Shimadzu HPLC sustav (Shimadzu, Kyoto, Japan) s UV/VIS detektorom, model SPD-M20A.

a) Referentna metoda: u USP-36 (USP, 2013) korištena je BDS C_8 Hypersil kolona (veličina čestica 5 μm, 150 mm × 4,6 mm). Analiza je provedena na sobnoj temperaturi, pri izokratnim uvjetima, s pokretnom fazom sastava: pufer amonijevog fosfata pH 8,0, metanol, tetrahidrofuran (omjer 60:52:13), pri brzini protoka 1,5 mL/min. UV detekcija provedena je pri 254 nm. Otapalo sastava voda, metanol, tetrahidrofuran (60:52:13) korišteno je za pripremu standardnih otopina i otopina uzorka.

b) Predložena metoda: standardne otopine klonazepama, srodne tvari A i srodne tvari B otopljene su u pokretnoj fazi u koncentraciji od 0,2 mg/mL. Radne otopine napravljene su iz standardnih otopina razrijeđenih potrebnom količinom pokretne faze (4 – 140 μg/mL. Tablete klonazepama su usitnjene i otopljene u pokretnoj fazi kako bi se dobila konačna koncentracija od 0,04 mg/mL. Nakon otapanja uzorak je filtriran kroz najlonski filtar veličine pora 0,22 μm.

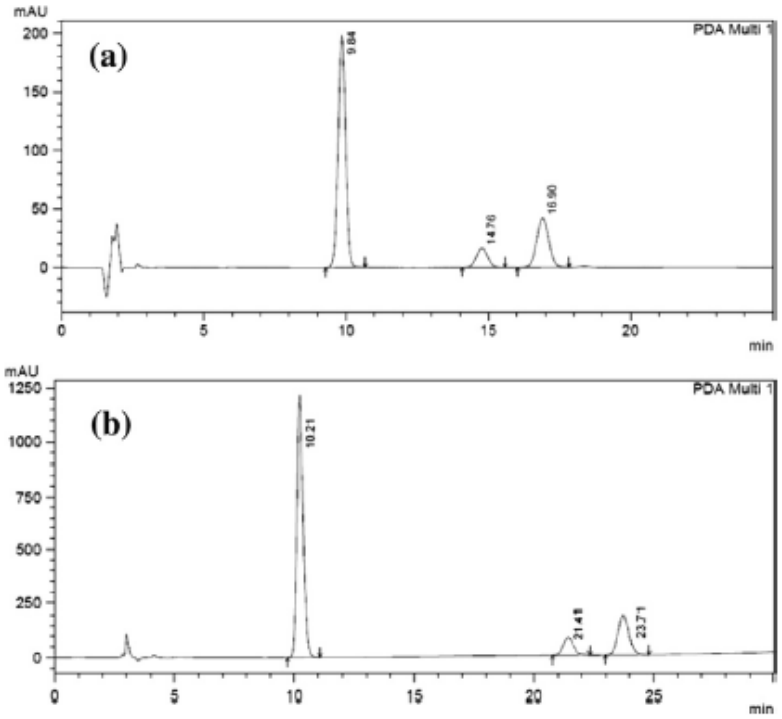
Niz pokretnih faza je ispitan tijekom razvoja predložene metode, a najprikladnija je izabrana na temelju kriterija zelene kemije, selektivnosti, osjetljivosti i stabilnosti analitičke metode. Korištena je kolona BSD C_8 Hypersil (250 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 μm). Analiza je izvedena na sobnoj temperaturi pri izokratnim uvjetima s pokretnom fazom sastava: izopropanol, 2% natrijev dodecilsulfat (SDS), 0,05M acetatni pufer (pH 3,5 ± 0,5) u omjeru 20:25:55 (v/v/v). Brzina protoka pokretne faze iznosila je 1,5 mL/min, a kromatogrami su snimani pri valnoj duljini od 254 nm.

Prikladnost metode za stabilitetno-indikativnu studiju određena je mogućnošću da razdvoji ljekovitu tvar (klonazepam) od razgradnih produkata. Otopina klonazepama (40 μg/mL) izložena je kiselim, bazičnim, oksidativnim i fotolitičkim uvjetima razgradnje, odnosno provedeno je tzv. stres-ispitivanje. U tu svrhu korišteni su: klorovodična kiselina, natrijev hidroksid, vodikov peroksid i svjetlost. Predložena metoda je validirana te su ispitani: linearnost, preciznost, točnost, granica određivanja, otpornost, i selektivnost metode.

Rezultati i rasprava

a) Optimizacija kromatografskih uvjeta

Preliminarna istraživanja su pokazala kako se oštri i simetrični pikovi dobivaju primjenom pokretne faze koja se sastoji od izopropanola, 2% SDS-a i 0,05M natrij acetatnog pufera (pH 3,5±0,5) u omjeru 20:25:55 (v/v/v) (Slika 12).



Slika 12. Kromatogrami: predložena metoda (a) USP-36 metoda (b).

b) Validacija metode

Linearnost. Kalibracijske krivulje klonazepama, srodne tvari A i srodne tvari B dobivene su metodom najmanjeg kvadrata. Korelacijski koeficijenti kalibracijskih krivulja iznosili su $R^2 >$ 0,999 te je linearno područje za klonazepam između 4 i 140 μg/mL, a od 4 do 64 μg/mL za srodne tvari A i B.

Točnost. Određena je metodom standardnog dodatka. U tri placebo uzorka dodane su standardne otopine kako bi konačne otopine iznosile 32, 40 i 48 μg/mL klonazepama i srodnih tvari. Tako pripremljene otopine analizirane su tri puta predloženom metodom. Uočen je dobar prinos (*recovery*) (101,33 - 99,40%) pri svim koncentracijama, uz nisku relativnu standardnu devijaciju (0,97 - 0,11%).

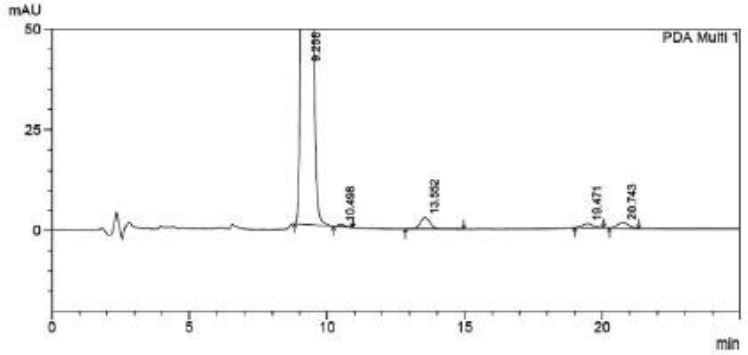
Preciznost. Ponovljivost rezultata evaluirana je analizom 6 uzoraka (Tablica 3).

Srednja preciznost metode određivana je mjerenjem na različitim instrumentima, u različitim laboratorijima, na drugi dan.

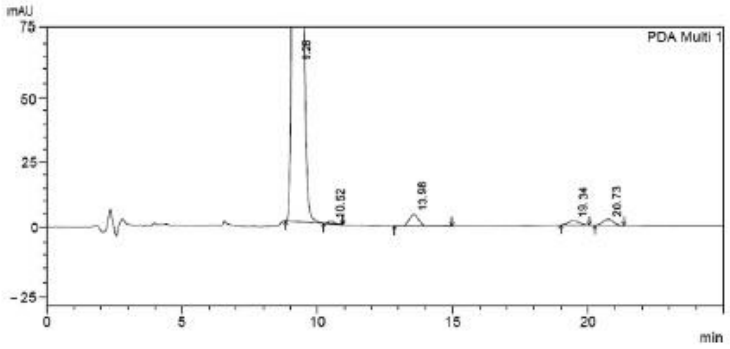
Tablica 3. Ponovljivost i srednja preciznost.

Broj uzorka	Ponovljivost unutar istog dana (%)			Ponovljivost unutar dva dana (%)		
	Klonazepam	Tvar A	Tvar B	Klonazepam	Tvar A	Tvar B
1	99,90	100,06	100,92	100,00	100,16	101,02
2	99,93	100,33	101,16	100,23	100,63	101,46
3	99,96	100,30	100,99	100,16	100,50	101,19
4	99,97	100,30	101,76	100,37	100,70	102,17
5	99,79	100,27	101,91	99,89	100,37	102,01
6	99,93	100,94	101,65	100,13	100,14	101,86
Srednja vrijednost	99,91	100,37	101,40	100,13	100,58	101,62
SD	0,064	0,298	0,427	0,168	0,334	0,464
RSD (%)	0,064	0,297	0,421	0,168	0,332	0,456

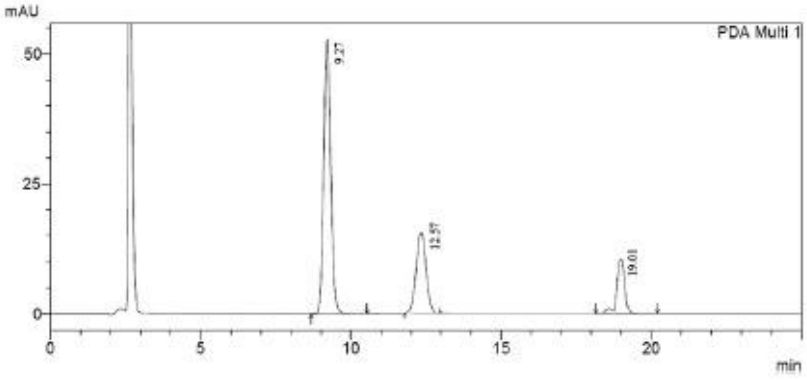
Specifičnost. Specifičnost se pokazuje kroz sposobnost metode da razlikuje pikove ishodnog lijeka i povezanih tvari A i B. Pri prisilnoj razgradnji klonazepama, njegova standardna otopina izložena je različitim stresnim uvjetima. Pri izlaganju 5M NaOH tijekom jednog sata došlo je do opsežne razgradnje, a pri izlaganju 1M NaOH smanjena je površina glavnog pika, što znači da je smanjena koncentracija klonazepama, i pojavila su se četiri nova pika produkata razgradnje (Slika 13). Nakon izlaganja uzorka 1M HCl, H_2O_2 i svjetlosti također dolazi do razgradnje klonazepama (Slike 14-16).



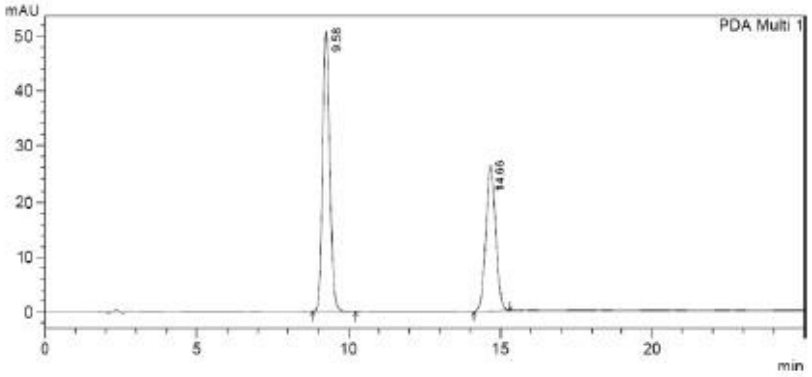
Slika 13. Kromatogram dobiven nakon bazične razgradnje uzorka.



Slika 14. Kromatogram nakon kisele razgradnje.



Slika 15. Kromatogram nakon oksidativne razgradnje.



Slika 16. Kromatogram nakon izlaganja svjetlu.

Svi prikazani rezultati dokazuju da metoda može biti stabilitetno-indikativna zato što su pikovi glavnog analita i razgradnih produkata jasno razdvojeni.

LOD, LOQ i prikladnost sustava. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 4. Prema dobivenim rezultatima moguće je zaključiti da se metoda može koristiti za identifikaciju tragova klonazepama i povezanih tvari. Dobivene vrijednosti odgovaraju USP-36 monografiji.

Tablica 4. Osjetljivost metode i prikladnost sustava.

Parametar	Klonazepam	Tvar A	Tvar B
LOD (µg/mL)	0,024	0,386	0,357
LOQ (µg/mL)	0,0799	1,2875	1,1893
Teorijski tavani	18625,64	8854,82	9570,59
Tailing faktor (T)	1,104	0,988	1,032
Rezolucija	-	6,865	2,815

Otpornost. Dokazano je da male promjene pH pufera ne mijenjaju značajno vrijednosti vremena zadržavanja tvari, broja teorijskih tavana i faktora simetrije.

Zaključak

Predstavljena RP-HPLC metoda može se koristiti za analizu tableta pri provjeri stabilnosti, a može se koristiti i za analize polaznih tvari. Validacijom je dokazano da je metoda jednostavna, selektivna, brza, točna, reproducibilna, otporna, osjetljiva i stabilitetno-indikativna. Za razliku od referentne metode, korištena su manje opasna otapala u pokretnoj fazi, proces pripreme uzorka je jednostavan, kraće je vrijeme analize i nije potreban unutarnji standard.

4.3. Razvoj zelene analitičke metode za analizu statina

Uvod

Osnovni pristup pri razvoju ove metode bio je smanjiti potrošnju otapala prilagodbama kolone – smanjenjem unutarnjeg promjera, manjim česticama nepokretne faze i skraćivanjem kolone. Smanjenjem promjera kolone smanjila se brzina protoka, a time i potrošnja otapala. Smanjenjem veličine čestica nepokretne faze poboljšana je učinkovitost kolone, a to omogućuje skraćivanje kolone bez gubitka na rezoluciji. Analiza će se tako ubrzati, no to će povećati tlak u kromatografskom sustavu. To zahtjeva ili primjenu UPLC tehnologije ili analizu na povišenoj temperaturi. Ako se analiza odvija na povišenoj temperaturi, smanjit će se viskoznost otapala, a time i potreban tlak.

Assassi i suradnici (Assassi i sur., 2015) imali su za cilj razviti zelenu analitičku metodu za određivanje statina (prvenstveno atorvastatina, fluvastatina i pravastatina) tijekom pre-formulacijskog koraka razvoja lijeka i ispitati njihovu topljivost. Kao pokretna faza korištena je voda uz dodatak etanola kao organskog modifikatora. Etanol ima dobra svojstva kao eluens, ali ima i veliki UV *cut-off*. Nova formulacija pri kojoj se ova metoda primjenjivala sastoji se od molekule statina u hidro-alkoholnoj otopini koja se zove Buccal Per-Mucous® (BPM®), a omogućuje brzu mukoznu apsorpciju statina neposredno u arterijski krvotok.

Materijali i metode

Korišten je UPLC ACCELA 1250 sustav (Thermo SCIENTIFIC, SAD), s 1250 pumpom, DAD detektorom i autosamplerom. Injektirano je po 5 μL uzorka. Sve ispitane kolone bile su duljine 50 mm i promjera 4,6 mm: XBridge BEH Shield RP18 2,5 μm, SpeedROD RP18 Macroporous 2 μm, YMC-Pack ODS-AQ 3 μm i Hypersil GOLD 1,9 μm.

Na svakoj koloni ispitano je devet različitih brzina protoka. Kao modifikatori korišteni su etanol i acetonitril (38-40%) uz vodenu otopinu mravlje kiseline pri pH 2,55. Injektirani uzorak mješavina je triju statina (atorvastatin kalcij trihidrat AV-C, atorvastatin AV, pravastatin PV, fluvastatin FV), svaki u koncentraciji 0,5 mg/mL, otopljen u otopini istog sastava kao pokretna faza, s vodom umjesto formijatnog pufera.

Validacija. Za svaki analit provedena je validaciji metode pri istim kromatografskim uvjetima: YMC-Pack ODS-AQ kolona s pokretnom fazom sastava etanol/mravlja kiselina (pH 2,55, 25mM) u omjeru 50:50 (v/v), pri brzini protoka 1 mL/min, temperaturi od 40 ºC i detekcijom

na 238 nm. Stres-testovi izvođeni su pomoću otopina 0,5M HCl (kiselinska razgradnja), 0,5M NaOH (bazična razgradnja), 1,5% H_2O_2 (oksidativna razgradnja) i UV zračenje od 250 nm.
Topljivost. Izrađene su otopine ispitivanih statina u otopini etanola i vode. Sve otopine su miješane na magnetnoj miješalici i filtrirane kroz najlonski filtar. Napravljeno je nekoliko razrjeđenja koja su injektirana u HPLC kako bi se odredila najviša moguća koncentracija pogodna za BPM® formulaciju.

Rezultati i rasprava

Topljivost. Prvi cilj ovog istraživanja bio je odrediti topljivost soli ispitivanih statina u hidro-alkoholnom mediju. Rezultati su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja topljivosti.

	Topljivost – literaturni podaci (mg/mL)		Topljivost mjerena u različitim udjelima etanola u vodi (mg/mL)			
Udio etanola (%)	0	100	55	50	45	35
AV-C	0,3	30,4	2,4	2,0	2,0	1,5
AV	-	-	>100	>100	>100	>100
FV	86,8	>100	>100	>100	>100	>100
PV	>100	51,6	>100	>100	>100	>100
Rosuvastatin	5,3	10	-	-	-	-
Simvastatin	$7{,}3\times10^{-5}$	>100	-	-	-	-

Većina statina ima slabu topljivost u vodi, osim pravastatina koji se bolje otapa u vodi nego u alkoholu. Dodatkom etanola u vodu u različitim postocima (35-55%) poboljšava se topljivost svih statina i mogu se dobiti otopine koncentracija viših od 100 mg/mL. Topljivost soli AV-C bila je najveća s 55% etanola u vodi i smanjivala se smanjenjem udjela alkohola. Atorvastatin bez kalcija imao je puno bolju topljivost što ga čini pogodnijim kandidatom za BPM® oblik. Lipofilniji oblik statina ima bolju bukalnu apsorpciju.
Kromatografska kolona. Primjenom kratkih kolona skraćeno je vrijeme analize, a time i potrošnja otapala. Kako većina statina ima karboksilnu skupinu, bilo je bitno prilagoditi pH

vrijednost pokretne faze da bi se izbjegao *tailing* pikova. Za tu svrhu dodana je 25 mM mravlja kiselina te je pH iznosio 2,5.

Vrijeme zadržavanja. Korištena je pokretna faza s 50% etanola, pri 40 ºC i brzini protoka od 1 mL/min na različitim kolonama. Dobivena vremena zadržavanja prikazana su u Tablici 6.

Tablica 6. Vremena zadržavanja ispitane skupine statina.

Uvjeti	50% etanola u mobilnoj fazi								
Parametri	Faktor retencije			Tailing faktor			R_s		Vrijeme analize (min)
	PV	AV-C	FV	PV	AV-C	FV	$Rs_{(PV/AV-C)}$	$Rs_{(AV-C/FV)}$	
YMC	0,86	5,07	6,72	1,26	1,06	1,07	16,06	4,24	5
Xbridge	0,56	3,63	4,55	1,20	1,11	1,12	13,29	3,49	3,5
Hypersil	0,45	3,05	4,44	1,61	1,24	1,35	15,01	5,85	4
Chromolith	0,29	1,08	2,60	1,56	1,32	1,36	10,45	3,70	3

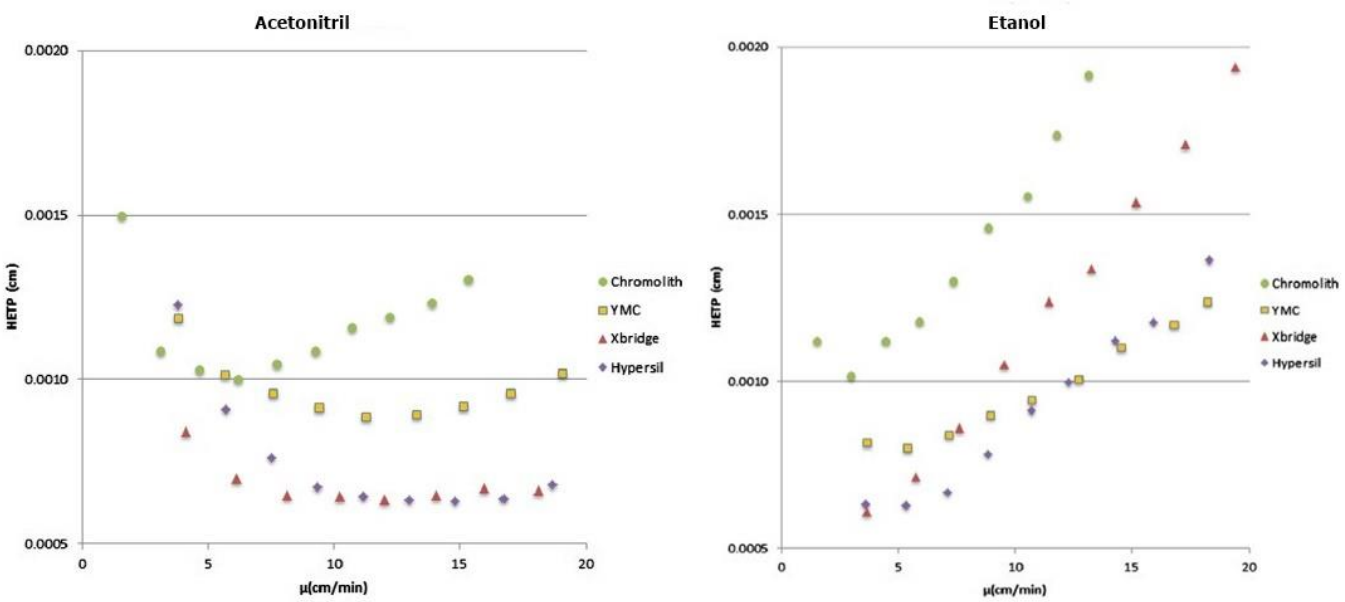
	Izoelutropna pokretna faza pri X% etanola								
X	Faktor zadržavanja			Tailing faktor			Rezolucija		Vrijeme analize (min)
	PV	AV-C	FV	PV	AV-C	FV	$Rs_{(PV/AV-C)}$	$Rs_{(AV-C/FV)}$	
40	2,64	24,81	27,76	1,21	1,03	1,06	27,27	2,06	18
38	2,20	24,46	26,59	1,14	1,09	1,08	26,28	1,39	17
38	1,77	21,57	27,12	1,46	1,54	1,63	30,53	4,32	18
35	1,63	23,88	26,96	1,37	1,31	1,33	24,09	1,77	23

Pravastatin ima najmanji faktor retencije na svim kolonama. Slično je sa svim analiziranim statinima: najveći faktor retencije je na YMC koloni, a najmanji na Chromolith koloni. Vrijednosti su slične za ostale dvije kolone. Faktor simetrije bio je blizu 1 na kolonama YMC i Xbridge, a na Hypersil i Chromolith bio je viši, što i dalje spada u prihvatljive vrijednosti. Pik

PV-a bio je najmanje simetričan u odnosu na ostale, a to se može objasniti slabom zadržavanjem. Sve vrijednosti rezolucije su veće od 2 što zadovoljava kriterije prihvatljivosti. Također, postignuto je kratko vrijeme analize – najkraće na Chromolith koloni (3 minute).

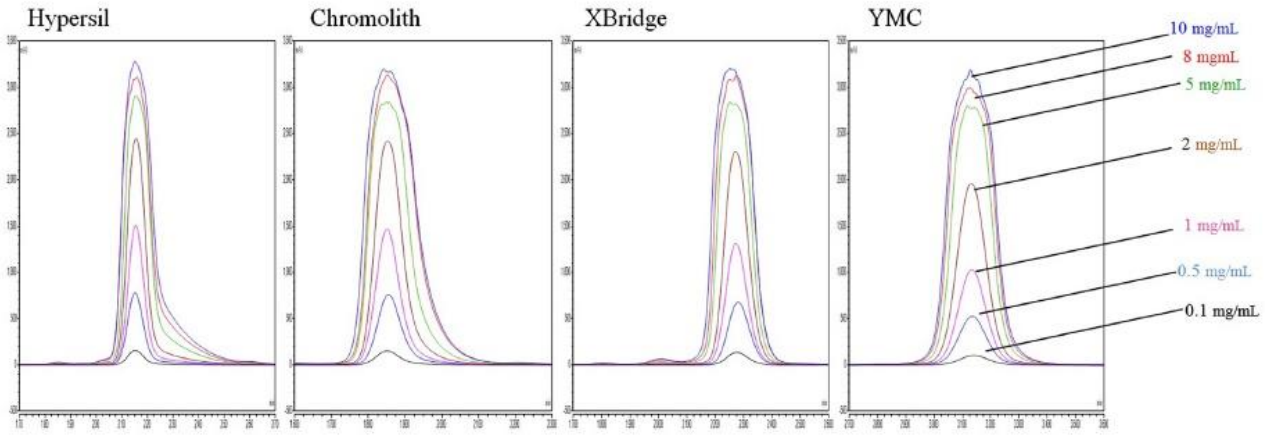
Drugi dio tablice pokazuje vrijednosti kromatografskih parametara s obzirom na postotak etanola u pokretnoj fazi. YMC kolona ima najjače svojstvo zadržavanja budući da je bio potreban najviši postotak etanola (polarnog otapala) da bi se postigao isti faktor zadržavanja. Kolona Chromolith ima najslabije svojstvo zadržavanja te je bilo potrebno dodati samo 35% etanola.

Učinkovitost. Učinkovitost kolona uspoređena je pomoću van Deemterovih krivulja. Poznato je da smanjenjem veličine čestica (ispod 3 μm) raste učinkovitost kolone. Rezultati su prikazani van Deemterovim krivuljama. Na ordinati je prikazana vrijednost HETP (engl. *High Equivalent to a Teoretical Plate,* visina teorijskog tavana), a na apscisi μ (cm/min) – linearna brzina. Na različitim kolonama korišteni su različiti postoci etanola kako bi se osiguralo zadržavanje PV-a. Na Slici 17. prikazane su krivulje za atorvastatin.



Slika 17. Ovisnost HETP vrijednosti o linearnoj brzini.

Detector overload study. Cilj je bio pronaći najvišu koncentraciju pri razrjeđivanju uzorka pri kojoj je moguće odrediti koncentraciju analita na osnovu površine pika. Za svaki statin (PV, FV i AV, zbog dobre topljivosti) uzete su koncentracije od 0,1 do 10 mg/mL za određivanje koncentracije pri kojoj će doći do overloada detektora. Pri injektiranom volumenu od 5 µL overload je počeo pri 2 mg/mL za AV i FV, a za PV pri 1 mg/mL. Rezultati su bili isti na sve četiri kolone. Oblici pikova za AV prikazani su na Slici 18. *Tailing* pikova prije je primijećen na Hypersil i Chromolith kolonama.



Slika 18. Rezultati *overload* studije.

Iz svega navedenog moguće je tvrditi kako je kolona YMC najprikladnija za analizu statina.

Validacija. Metoda je validirana prema ICH Q2 smjernicama kako bi se osigurala pouzdanost predložene zelene metode.

U ovoj studiji proučavana je topljivost statina u vodeno-alkoholnom mediju kao farmaceutskom obliku, stoga su granice prihvatljivosti bile 80 - 120% koncentracije (± 5%). Zamjena toksičnih otapala i upotreba obnovljivih reagenasa donijela je poboljšanje u kontekstu ekološke prihvatljivosti, no smanjena je točnost i preciznost metode u usporedbi s konvencionalnom. Ipak, ova metoda udovoljava regulativama farmaceutske industrije i ICH smjernicama.

Zaključak

Cilj ovog istraživanja bio je razviti zelenu HPLC metodu promjenom različitih eksperimentalnih parametara. Ispitane su različite kolone s različitim veličinama čestica i brzinama protoka. U pokretnu fazu dodan je etanol kao modifikator. Kako bi se smanjila potrošnja otapala, postavljen je *overload* detektora što znači da je koncentracija pri kvantitativnom određivanju bila pomaknuta toliko visoko koliko je razrjeđenje uzorka.

Ova studija je dokaz da zelena metoda može postići performanse usporedive s farmaceutskim metodama što je vidljivo određivanjem točnosti i preciznosti metode. Razvijena metoda korištena je za određivanje topljivosti statina. Topljivost PV i FV bila je dovoljno visoka u vodeno-alkoholnom mediju kako bi osigurala terapijsku dozu lijeku u malom volumenu predviđenom formulacijom BPM®.

5. ZAKLJUČCI

HPLC je vrlo važna i učinkovita analitička tehnika bez koje nije moguće zamisliti niti jedan analitički laboratorij u farmaceutskoj industriji. Zbog velikog broja HPLC uređaja u industriji, nastat će i velika količina otpada koja predstavlja opasnost za okoliš i ljude, ali i donosi velike troškove zbrinjavanja. Kako bi se to spriječilo, bitno je implementirati osnovne principe zelene kemije u razvoju svake nove metode i prilagoditi stare.

U ovom diplomskom radu prikazane su osnovne činjenice o zelenoj kemiji i njezinoj primjeni u HPLC-u. Prikazani su načini smanjenja otpada u fazama pripreme uzorka i kromatografije te metode evaluacije ekološke prihvatljivosti analitičke metode. Prikazano je i nekoliko radova u kojima su uspješno primijenjena načela zelene kemije u analizi polarnih tvari SFC tehnikom, pri razvoju stabilitetno-indikativne metode za analizu klonazepama i za analizu statina pri razvoju nove farmaceutske formulacije za bukalnu primjenu.

Pregledom literature da se zaključiti kako zelena kromatografija ima budućnost u analitici lijekova zbog sve veće osviještenosti farmaceutske industrije o zaštiti okoliša.

6. LITERATURA

Advances in Sample Preparation for Biological Fluids, 2016., http://www.chromatographyonline.com/advances-sample-preparation-biological-fluids, pristupljeno 20.2.2017.

Armenta S, Esteve-Turrillas FA, Garrigues S, de la Guardia M. Green Analytical Chemistry: The Role of Green Extraction Techniques. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2017, u tisku

Anastas P, Eghbali N. Green Chemistry: Principles and Practice, *Chem Soc Rev*, 2010, 39, 301-312

Anastas, PT, Warner JC. Green Chemistry: Theory and Practice. New York, Oxford University Press, 1998, str. 30

Assassi AL, Roy CE, Perovitch P, Auzerie J, Hamon T, Gaudin K.. Green analytical method development for statin analysis, *J Chromatogr A*, 2015, 1380, 104-111

Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, J Micro Sep, 1999, 11, 737-747

Berger TA. Characterization of a 2.6 μm Kinetex porous shell hydrophilic interaction liquid chromatography column in supercritical fluid chromatography with a comparison to 3 μm totally porous silica, *J Chromatogr A*, 2011, 1218, 4559-4568

Chawla G, Ranjan C. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography, *Open Chem J*, 2016, 3, 1-16

Developments in Green Chromatography, 2014., http://www.chromatographyonline.com/developments-green-chromatography, pristupljeno 20.2.2017.

Dispas A, Lebrun P, Sassiat P, Ziemons E, Thiébaut D, Vial J, Hubert P. Innovative green supercritical fluid chromatography development for the determination of polar compounds, *J Chromatogr A*, 2012, 1256, 253-260

Eldin AB, Shalaby A, Abdallah MS, Shaldam MA, Abdallah MA. Applying green analytical chemistry (GAC) for development of stability indicating HPLC method for determining clonazepam and its related substances in pharmaceutical formulations and calculating uncertainty, *Arabian J Chem*, 2014, http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214002925, pristupljeno 3.5.2017.

Filippou O, Bitas D, Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis, *J Chromatogr B*, 2017, 1043, 44-62

Funari CS, Carneiro RL, Khandagale MM, Cavalheiro AJ, Hilder EF. Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting: Liquid Chromatography, *J Sep Sci*, 2015, 38, 1458-1465

Gaber Y, Törnvall U, Kumar MA, Amine MA, Hatti-Kaula R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods, *Green Chem*, 2011, 13, 2021-2025

Gałuszka A, Konieczka P, Migaszewski ZM, Namies´nik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *TrAC*, 2012, 37, 61-72

Green Chemistry Perspectives on Analytical Extractions, 2013, http://www.chromatographyonline.com/green-chemistry-perspectives-analytical-extractions, pristupljeno 24.3.2017.

Green Chromatography (Part 1): Introduction and Liquid Chromatography, 2010, http://www.chromatographyonline.com/green-chromatography-part-1-introduction-and-liquid-chromatography, pristupljeno 1.3.2017.

Green Chromatography (Part 3): Sample Preparation Techniques, 2011, http://www.chromatographyonline.com/green-chromatography-part-3-sample-preparation-techniques, pristupljeno 1.3.2017.

Hartonen K, Riekkola M. Liquid chromatography at elevated temperatures with pure water as the mobile phase, *TrAC*, 2008, 27, 1-14

Keith LH, Gron LU, Young JL. Green Analytical Methodologies, *Chem Rev*, 2007, 107, 2695-2708

Khezeli T, Daneshfar A. Development of dispersive micro-solid phase extraction based on micro and nano sorbents, *TrAC*, 2017, 89, 99-118

National Environmental Methods Index, www.nemi.gov, pristupljeno 15.04.2017.

Psillakis E, Kalogerakis N. Developments in liquid-phase microextraction, *TrAC*, 2003, 22, 565-574

Ribeiro RLV, Bottoli CBG, Collins KE, Collins CH. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLS-RP mobile phases. *J Braz Chem Soc*, 2004, 15, 300-306

Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction, TrAC, 2010, 29, 1-14

Shen Y, Chen B, van Beek T. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener, *Green Chem*, 2015, 17, 4073-4081

The Greening Of Chromatography Laboratory, 2011, http://www.chromatographyonline.com/greening-chromatography-laboratory-0, pristupljeno 1.3.2017.

Vasconcelos I, Fernandes C. Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices, *TrAC*, 2017, 89, 41-52

Vian M, Breil C, Vernes L, Chaabani E, Chemad F. Green solvents for sample preparation in analytical chemistry, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2017, 5, 44-48

Wang Y, Tian M, Bi W, Row KH, Application of Ionic Liquids in High Performance Reversed-Phase Chromatography, *Int J Mol Sci*, 2009, 10, 2591-2610

Welch CJ, Wu N, Biba M, Hartman R, Brkovic T, Gong X, Helmy R, Schafer W, Cuff J, Pirzada Z, Zhou L. Greening analytical chromatography, *TrAC*, 2010, 29, 667-680

Wu N, Clausen AM. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations, *J Sep Sci*, 2007, 30, 1167-1182

7. SAŽETAK

Razvojem farmaceutske industrije jedan od glavnih problema postala je proizvodnja velike količine otpada. 90-ih godina prošlog stoljeća javila se ideja zelene kemije s ciljem smanjenja proizvodnje otpada i zaštite okoliša. U ovom radu prikazana su načela zelene kemije i objašnjena je njihova primjena u ključnim fazama kromatografske analize. Prikazani su primjeri zamjene štetnih otapala ekološki prihvatljivijima i prilagodbe same tehnike kojima je moguće smanjiti proizvodnju otpada.

8. SUMMARY

With the development of the pharmaceutical industry, waste production became a great concern. During the 1990s the idea of green chemistry was born with the goal of reducing waste and protecting the environment. This thesis presents the main principles of green chemistry applied during crucial steps of chromatographic analysis, as well as examples of greener replacements for solvents and analytical technique adjustments for waste reduction.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ZELENA KROMATOGRAFIJA U ANALITICI LIJEKOVA

Petra Štefanac

SAŽETAK

Razvojem farmaceutske industrije jedan od glavnih problema postala je proizvodnja velike količine otpada. 90-ih godina prošlog stoljeća javila se ideja zelene kemije s ciljem smanjenja proizvodnje otpada i zaštite okoliša. U ovom radu prikazana su načela zelene kemije i objašnjena je njihova primjena u ključnim fazama kromatografske analize. Prikazani su primjeri zamjene štetnih otapala ekološki prihvatljivijima i prilagodbe same tehnike kojima je moguće smanjiti proizvodnju otpada.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 18 grafičkih prikaza, 6 tablica i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: zelena kemija, zelena kromatografija, HPLC, acetonitril

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Zrinka Rajić Džolić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

GREEN CHROMATOGRAPHY IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

Petra Štefanac

SUMMARY

With the development of the pharmaceutical industry, waste production became a great concern. During the 1990s the idea of green chemistry was born with the goal of reducing waste and protecting the environment. This thesis presents the main principles of green chemistry applied during crucial steps of chromatographic analysis, as well as examples of greener replacements for solvents and analytical technique adjustments for waste reduction.

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

Thesis includes: 43 pages, 18 figures, 6 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: green chemistry, green chromatography, HPLC, acetonitrile

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

Reviewers: **Ana Mornar Turk**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Zrinka Rajić Džolić, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.