

Frane Sršen

**Razvoj analitičke metode za identifikaciju
azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u
tabletama i plazmi pacijenata**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na stručnom vođenju, savjetima, dostupnosti i vremenu pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada. Hvala Vam na velikodušnoj pomoći i strpljenju pruženoj tijekom izrade eksperimentalnog i teorijskog dijela diplomskog rada.

Također, hvala i prof. dr. sc. Biljani Nigović što me svojim stručno vođenim predavanjima zainteresirala za tematiku i omogućila mi izradu diplomskog rada na kolegiju Analitika lijekova

Hvala mojoj obitelji, mami, tati, baki i Karli na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom svih ovih godina.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Upalne bolesti crijeva	2
1.1.1. Definicija bolesti	2
1.1.2. Epidemiologija	2
1.1.3. Etiologija	3
1.1.4. Klinička slika	4
1.1.5. Dijagnostika	4
1.1.6. Terapija	5
1.1.6.1. Aminosalicilati	5
1.1.6.2. Kortikosteroidi	6
1.1.6.3. Azatioprin i 6-tiogvanin	7
1.1.6.4. Biološka terapija	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Radni instrumenti.....	13
3.1.1. Pribor.....	13
3.1.1. Programski paketi	14
3.2. Metode	14
3.2.1. Priprema pokretne faze	14
3.2.2. Priprema standardnih otopina	14
3.2.3. Priprema ispitivanih uzoraka	14
3.2.4. Kromatografska analiza	15
3.2.5. Masena spektrometrija	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Optimizacija kromatografskih uvjeta	17
4.2. Optimizacija uvjeta za masenu spektrometriju.....	18
5. ZAKLJUČCI	25
6. LITERATURA	27
7. SAŽETAK / SUMMARY	30
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

POPIS KRATICA I SIMBOLA

5-ASA	5-amino salicilna kiselina (engl. <i>5-aminosalicylate</i>)
6-TG	6-tiogvanin (engl. <i>6-thioguanine</i>)
CB	Crohnova bolest (engl. <i>Crohn's disease</i>)
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>Diode Array Detector</i>)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EI	ekstrahirani ionski kromatogram (engl. <i>Extracted Ion Chromatogram</i>)
FDA	Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>US Food and Drug Administration</i>)
GC	plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i>)
HGPRT	hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza (engl. <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IBD	upalne bolesti crijeva (engl. <i>Inflammatory Bowel Diseases</i>)
IFX	infliksimumab (engl. <i>Infliximab</i>)
IgG	imunoglobulin G (engl. <i>Immunoglobulin G</i>)
LC	tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid Chromatography</i>)
mAB-i	monoklonsko antitijelo (engl. <i>Monoclonal antibody</i>)
MS	masena spektrometrija (engl. <i>Mass Spectrometry</i>)
MSD	detektor maseni spektrometar (engl. <i>Mass Spectrometry Detector</i>)
PPAR	engl. <i>Peroxisome proliferate-activated receptor</i>
RNK	ribonukleinska kiselina (eng. <i>Ribonucleic acid</i>)
Th1	pomoćničke T 1 stanice (engl. <i>Type 1 helper T cells</i>)
Th2	pomoćničke T 2 stanice (engl. <i>Type 2 helper T cells</i>)
TIC	kromatogram ukupnih iona (engl. <i>Total Ion Chromatogram, TIC</i>)
TPMT	tiopurin-metil-transferaza (engl. <i>Thiopurine methyltransferase</i>)
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. <i>Tumor necrosis factor</i>)

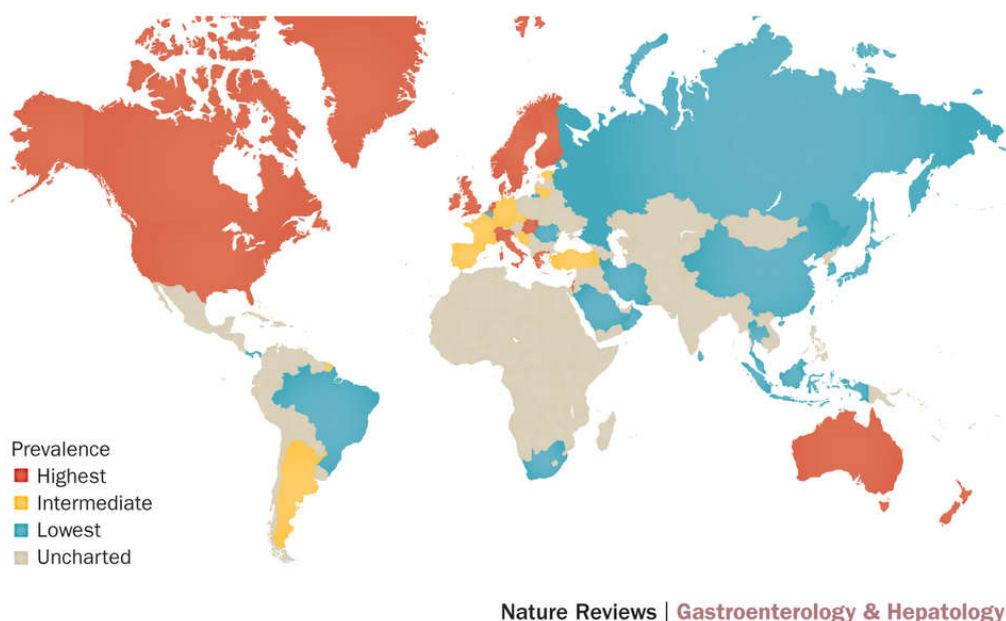
1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

1.1.1. Definicija bolesti

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) su autoimune bolesti nepoznate etiologije, karakterizirane kroničnom upalom u području probavnog trakta. Primarno mogu zahvaćati bilo koji dio probavnog trakta od usne šupljine do anusa, ali paralelno mogu imati patološke promjene (ekstraintestinalne manifestacije) na mnogim drugim organima (koža, oči, zglobovi). U skupini upalnih bolesti crijeva ubrajamo ulcerozni kolitis (UC) i Crohnovu bolest (CB), kao dva krajnja entiteta i intermedijarni oblik bolesti (indeterminirani kolitis) u koji ubrajamo 10-15% bolesnika koje ne možemo na temelju kliničkih i dijagnostičkih kriterija sa sigurnošću svrstati ni u UC ni u CB (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.2. Epidemiologija



Slika 1. Globalna prevalencija IBD-a 2015.

Incidencija i prevalencija ovih bolesti povezane su s urbanim načinom života i sa sjevernim geografskim širinama. Najčešće su u zemljama Sjeverne Europe i kod Anglosaksonaca te su

nekoliko puta češće u Židova, rjeđe u zemljama centralne i južne Europe, a relativno su rijetke u Aziji, Africi i Latinskoj Americi (Slika 1.) (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

UBC se javljaju u svim dobnim skupinama, ali su češće u osoba ispod 30 godina, uz vršnu incidenciju između 14. i 24. godine života, pri čemu je više nego dvostruko češća CB. Javljaju se podjednako u oba spola (www.msđ-prirucnici.placebo.hr).

Incidencija upalnih bolesti crijeva u svijetu zadnjih desetljeća raste, a taj podatak ilustrira i recentno istraživanje provedeno u Hrvatskoj s podatkom o incidenciji za UC koja iznosi 4,3/100.000, a za CB 7,0/100.000. Što se faktora rizika tiče, iako je popis inkriminiranih faktora dug, pušenje je jedini jasno dokazani faktor okoliša koji povećava rizik od pojave CB-a i smanjuje rizik od nastanka UC-a (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.3 Etiologija

Unatoč brojnim istraživanjima, uzrok ovih bolesti još nije do kraja razjašnjen. Prva naznake povezanosti genskih promjena i pojave ovih bolesti dale su epidemiološke studije. Zadnjih godina genetičari su značajno napredovali u pronalaženju gena odnosno više regija humanoga genoma koje su vezane uz pojavu IBD-a. Prva regija humanoga genoma koja je sigurno povezana s nastankom CB-a je IBD1 lokus 16. kromosoma. U tom lokusu identificirane su promjene gena NOD2/ CARD15 za koje je očito da su povezane s nastankom CB-a (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Ipak, mutacija ovog gena se nalazi kod svega trećine oboljelih. Još najmanje sedam podložnih gena se upravo istražuje (www.hucuk.hr).

Smatra se da su upalne bolesti crijeva posljedica poremećenog imunološkog odgovora na endogenu mikrofloru domaćina koja rezultira upalnoj reakciji u probavnom sustavu i oštećenju crijeva i pojavi simptoma. Takav poremećeni imunski odgovor nastaje u osobe s definiranom genskom promjenom odnosno mutacijom, ali u prisutnosti ili na poticaj određenih faktora okoliša-okidača te imunoloških karakteristika pojedinca, stresa, infekcija (ospica, tuberkuloze), pušenja (Lidija Bach-Rojecky, 2015; Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Jerka Dumić, 2016).

Tip imunskog odgovora različit je u CB-u i UC-u, što potvrđuju i patohistološke promjene poput granuloma u CB-u i neutrofilne infiltracije s epitelnom destrukcijom u ulceroznom kolitisu. U CB-u javlja se stanično posredovani Th1-tip imunskog odgovora, a u UC-u Th2-tip imunskog odgovora koji uglavnom generira humoralni imunski odgovor. Ipak, oštra

podjela na dva tipa imunskog odgovora nije uvijek prisutna te se mogu uočiti preklapanja (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.4 Klinička slika

Klinička slika ovisi o lokalizaciji i proširenosti upale, a tijekom bolesti se sastoji od razdoblja remisije i relapse (www.hucuk.hr).

Općenito možemo simptome podijeliti u dvije grupe: gastrointestinalne i izvan-intestinalne. CB, s obzirom na to da može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, mnogo je raznolikije kliničke slike od ulceroznog kolitisa (Jerka Dumić, 2016).

Najčešći simptomi su gastrointestinalni kao što su: proljev, bol u trbuhu, krvarenja te izvan-intestinalni kao npr. gubitak na težini ili pak tromboza dubokih vena, erythema nodosum, reumatološki simptomi. Specifična je značajka CB zahvaćenost cijele širine stijenke crijeva upalnim promjenama (transmuralnost) za razliku od UC kod kojeg je upala ograničena na sluznicu kolona i rektuma. Upravo transmuralnost upale koja dovodi do suženja crijeva, fistuliranja i perforiranja kroz stijenku crijeva odgovorna je i za karakteristične grčevite boli u trbuhu bolesnika s CB-om i pojavu intraabdominalnih upalnih kolekcija.

Ulcerozni kolitis je bolest vezana isključivo za sluznicu kolona i rectuma, njome dominiraju probavni simptomi kao što su: učestale, kašaste do proljevaste stolice s primjesom sluzi i/ili krvi praćene bolovima u donjem dijelu trbuha neposredno prije defekacije. Opći simptomi kao npr. febrilitet, gubitak tjelesne mase, manjak apetita, nespecifični abdominalni bolovi, zakašnjeni pubertet i zaostatak rasta kod djece su manje zastupljeni za razliku od Chronove bolesti (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Jerka Dumić, 2016).

Zbog kronične upale i znatnijeg obnavljanja sluznice, kod obje bolesti nalazimo povećan rizik od nastanka adenokarcinoma, no kod ulceroznog kolitisa rizik je veći (www.hindawi.com).

1.2. Dijagnostika

Osim osobne i obiteljske anamneze, simptoma i kliničkih znakova zabilježenih pri kliničkom pregledu, u dijagnostici koristimo još i laboratorijske, endoskopske, patohistološke i radiološke pretrage. Navedene pretrage nadopunjavaju moderne scintigrafske metode nuklearne medicine

za procjenu upalne aktivnosti bolesti ili komplikacija tipa abdominalnog apscesa (scintigrafija crijeva obilježenim leukocitima ili antileukocitnim protutijelima) (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.6 Terapija

Klasični lijekovi koje upotrebljavamo u liječenju upalnih bolesti crijeva jesu aminosalicilati, kortikosteroidi, imunomodulatori (azatioprin, 6-merkaptopurin (6-MP), metotreksat, ciklosporin) i antibiotici (metronidazol, ciprofloksacin).

U novije vrijeme biološka terapija zauzima sve važnije mjesto u liječenju ovih bolesti (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.6.1. Aminosalicilati

Mesalazin (5-ASA) predstavlja aktivnu supstanciju koja djeluje protuupalno, mehanizam djelovanja nije u potpunosti poznat. Može djelovati vežući slobodne radikale, inhibirajući stvaranje prostaglandina i leukotriena i/ili smanjujući kemotaksiju neutrofila i stvaranje superoksida inhibicijom produkcije citokina i inflamatornih medijatora (farmakologija), ali tek recentno je otkriveno da je podloga djelovanja lijeka pojačana ekspresija PPAR nuklearnih receptora (peroxisome proliferate-activated receptor-gamma) koji kontroliraju staničnu proliferaciju i apoptozu u epitelnim stanicama crijeva (H.P.Rang i sur., 2006).

Aminosalicilati djeluju topički na bolesno crijevo. Oralno dan nezaštićeni mesalazin resorbirat će se brzo u proksimalnom dijelu tankoga crijeva i neće doseći distalnije bolesne segmente crijeva. Stoga je ključno omogućiti mesalazinu da stigne u željeni segment crijeva (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Postoje tri načina da se to postigne. Prvi je način uporaba azo-konjugata koji intaktni dolaze u kolon gdje bakterijske azo-reduktaze cijepanjem azo-veze oslobađaju slobodni 5-ASA. Drugi je način oblaganje mesalazina želučano otpornom polimernom ovojnicom koja se otapa kod pH > 7 (tableta s odgođenim oslobađanjem) ili u obliku etilceluloznih mikrogranula koje postepeno oslobađaju 5-ASA ovisno o vremenu prolazeći kroz probavni trakt (tableta s postepenim oslobađanjem). Treći je način dati lijek lokalno u obliku supozitorija i klizmi. Lijekovi koji sadržavaju 5-ASA kao azo-konjugat jesu sulfasalazin (5-ASA vezana azo vezom sa

sulfapiridinom), olsalazin (dvije molekule 5-ASA vezane azo vezom) i balsalazid (5-ASA vazana azo vezom za aminobenzoil-alanin) (Lidija Bach-Rojecky, 2015). Nuspojave sulfasalazina ovisne su o dozi lijeka i javljaju se u 10-45% bolesnika. Sulfapiridinski dio se resorbira pa su njegovi nepoželjni učinci povezani s onim tipičnim za sulfonamide. Lijek može izazvati oligospermiju i deficit folata. Ostale češće nuspojave sulfasalazina su glavobolja, mučnina, povraćanje, bol u epigastriju i proljev. Ozbiljne idiosinkratičke reakcije (pankreatitis, agranulocitoza, alveolitis, Stevens-Johnsonov sindrom, hemolitička anemija) srećom su rijetke. Nuspojave na mesalazin su rijetke i javljaju se u manje od 2% bolesnika. Najčešće su to proljev, glavobolja, mučnina i alergijski osip. Sulfasalazin nije koristan pri upalnoj bolesti crijeva, ali je djelotvoran u sprječavanju recidiva u bolesnika koji su u remisiji. Sulfasalzin se također upotrebljava u terapiji artritisa (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

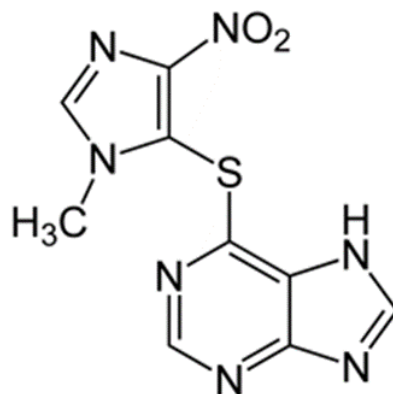
Kod srednjih i teških oblika bolesti za indukciju remisije se koriste kortikosteroidi i biološka terapija, a za održavanje remisije imunomodulatori i biološka terapija (Lidija Bach-Rojecky, 2015).

1.1.6.2. Kortikosteroidi

Akutne egzacerbacije takvih oblika bolesti obično dobro reagiraju na oralnu kortikosteroidnu terapiju (prednizon). Liječenje traje minimalno 8 tjedana s učinkom koji se vidi tek nakon 2-4 tjedana terapije uz postepeno smanjenje doze. Kortikosteroidi se koristi samo za indukciju, a ne za održavanje remisije, zbog brojnih nuspojava vezanih za dugotrajnu primjenu (infekcija, hipertenzija, osteoporoza, glaukom...). Budenozid je moguće primjenjivati u obliku klizme kod blagog do srednjeg oblika s čime se dodatno smanjuje učestalost sistemskih nuspojava.

Iduća linija terapije, za pacijente s teškim oblikom bolesti otpornim na kortikosteroide s čestim relapsima (2-3 puta godišnje) ili intolerancijom 5-ASA, su imunomodulatori (Lidija Bach-Rojecky, 2015; Vucelić, Čuković-Čavka, 2006).

1.1.6.3. Azatioprin i 6-tiogvanin



Slika 1. Strukturna formula azatioprina.

Azatioprin je imunosupresiv, spada u skupinu tiopurina. On je prolijek, tj. imidazolski derivat lijeka 6-merkaptopurina koji aktivnošću enzima HGPRT -a (hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza) dalje prelazi u citotoksični, aktivni oblik lijeka, odnosno 6-tiogvaninske nukleotide. Njegov mehanizam djelovanja jest kompetitivna inhibicija biosinteze nukleotida, zbog strukturne sličnosti purinskoj bazi gvaninu, koja izgrađuje deoksiribonukleinsku (DNK) i ribonukleinsku kiselinu (RNK) te ugradnja u strukturu nukleinske kiseline i terminacija replikacije iste (Aberra i Lichtenstein, 2005). Za vrijeme metabolizma u eritrocitima prelazi u inaktivni 6-metilmerkaptopurin djelovanjem enzima tiopurin metiltransferaze (TPMT) (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006). Enzim XO (ksantin oksidaza) izlučuje azatioprin u obliku tiourične kiseline, neaktivnog metabolita, a pokazano je da se čak 84% merkaptopurina metabolizira preko ksantin oksidaze, a preostalih 16% kataboliziraju enzimi TPMT i HGPRT (Aberra i Lichtenstein, 2005). Otprilike 11 % populacije ima sniženu razinu aktivnosti TPMT-a, dok je kod 0,3% ljudi primijećen nedostatak ekspresije tog enzima. Kod takvih pacijenata dolazi do nakupljanja aktivnog 6-merkaptopurina, što je povezano s povećanom koncentracijom citotoksičnog 6-tiogvanina (www.medscape.com). Genski polimorfizam enzima tiopurinmetiltransferaze (TPMT) klinički je važan radi prepoznavanja moguće predisponiranosti za razvoj nuspojava. Najčešći razlozi intolerancije azatioprina su simptomi poput gripe (“*flu-like symptoms*”) kao što su mialgija, glavobolja, povišena temperatura i proljevi koji se javljaju nakon 2-3 tjedna terapije i nestaju postupno nakon ukidanja terapije. Teška leukopenija srećom je rijetka i javlja se u 3% bolesnika, a ni pankreatitis i

hepatotoksičnost nisu česti. Ipak, nažalost, iako su ovi lijekovi najbolja opcija za bolesnike ovisne o steroidima ili bolesnike rezistentne na steroide, registrirano je da se u 28% bolesnika razvija neka od nuspojava pa je potrebno bolesnike monitorirati, klinički i laboratorijski (krvna slika, jetreni enzimi, amilaze) (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006). Identificirano je 28 različitih alelnih varijanti gena za TPMT. Kod većine je ustanovljena smanjena aktivnost enzima in vitro. Međutim, samo kod nekih je taj efekt i klinički izražen. Kod bijelaca najčešće je izražena varijanta TPMT*3A. Potom, alelna varijanta TPMT*3C primijećena je u 2% azijske populacije, dok kod afričke populacije u također 2% slučajeva prednjači TPMT*8. Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) preporučuje, ali ne zahtijeva genotipizaciju za TPMT (www.medscape.com). Kao što je navedeno na uputi lijeka od azatipurina i 6-merkaptopurina potrebno je pratiti aktivnost TPMT enzima, kako bi se primijenila adekvatna doza lijeka. Kod njegove normalne aktivnosti doziranje je moguće započeti s 1 mg/kg tjelesne težine. Nakon primjene lijeka njegova koncentracija u plazmi redovito se provjerava zbog prevencije štetnog djelovanja, tj. supresije koštane srži. Pacijenti s viskom aktivnošću enzima (većom od 15 U/mL) dobro odgovaraju na veće doze azatioprina (veće od 2 mg/kg tjelesne mase) (Cuffari, 2006).

Pacijentima heterozigotima za nefunkcionalnu TPMT alelnu varijantu preporučuju se niže doze azatioprina. Pacijentima homozigotima za nefunkcionalne TPMT alelne varijante preporučuje se drastično smanjenje doze ili izbjegavanje imunosupresivne terapije (www.medscape.com). Osim u liječenju IBD-a lijek se koristi i u liječenju različitih bolesti kojima se nastoji suprimirati imunosni odgovor pacijenta, kao što su primjerice reumatoidni artritis, sistemski eritemski lupus, autoimuni kronični aktivni hepatitis, nodozni poliarteritis, autoimuna hemolitička anemija, kronična refrakturna idiopatska trombocitopenična purpura. Nadalje, azatioprin je svoju primjenu našao i u prevenciji odbacivanja transplantiranih organa, najčešće bubrega.

Lijek je kontraindiciran je kod bolesnika s poznatom preosjetljivošću na azatioprin i pri primjeni živih cjepiva, a potreban je oprez s istovremenom primjenom drugih lijekova koji inhibiraju TPMT enzim, poput olsalazina, mesalazina ili sulfasalazina. Kada se azatioprin istodobno primjenjuje s alopurinolom, oksipurinolom ili tiopurinolom dozu azatioprina treba smanjiti na jednu četvrtinu početne doze. Naime, ovi lijekovi djeluju kao inhibitori ksantin oksidaze – enzima važnog za metabolizam azatioprina. Potrebno je istaknuti da su pacijenti na terapiji azatioprinom imaju veću vjerojatnost za razvoja karcinoma kože zbog veće osjetljivosti na UV A zračenje. Stoga se pacijentima savjetuje ograničeno izlaganje suncu uz korištenje krema za sunčanje s visokim zaštitnim faktorom i primjerene zaštitne odjeće. Zbog

citotoksičnog učinka, lijek nije primjeren za upotrebu kod trudnica (www.mediatelly.co.hr; www.halmed.hr).

6-tiogvanin (6-TG) je pokazao dobru kliničku učinkovitost kao treća linija imunosupresiva u liječenju IBD-a, ali trombocitopenija i povezana hepatotoksičnost ograničavaju njegovu upotrebu (www.ncbi.nlm.nih.gov). Riječ je o antineoplastičnom lijeku indiciranom za liječenje nekoliko oblika leukemije uključujući akutnu nelimfocitnu leukemiju. 6-tiogvanin je ušao u klinička ispitivanja prije više od trideset godina (www.drugbank.ca).

1.1.6.4. Biološka terapija

Monoklonska antitijela (mAB-i), genetskim inženjeringom dobiveni imunoglobulini (IgG-i) reagiraju na razne molekule koje sudjeluju u inflamatornom procesu u crijevima. Mogu biti podrijetla dijelom mišjeg, dijelom humanog (nazvani humanizirani) ili su potpuno humanog. U kimeričnom mAB-ima, dio mišjeg antitijela koji prepoznaje antigen vezan je na okosnicu humanog IgG-a molecule (H.P.Rang, 2006).

Biološku terapiju u liječenju kronične upalne bolesti crijeva predstavljaju monoklonska TNF- α protutijela (infliksimab i adalimumab, trenutno registrirani u Hrvatskoj) primijenjena parenteralno kao otopine za i.v. infuziju ili s.c. injekcije. Koriste se samo kod refraktornih, teških oblika Chronove bolesti rezistentnih na prethodnu terapiju ili zbog razvoja nuspojava na prethodnu terapiju (Lidija Bach-Rojecky, 2015).

U Hrvatskoj su za sada registrirani i klinički primjenjivi infliksimab i adalimumab (www.mediatelly.co.hr).

Infliksimab (IFX) kimeričko je monoklonsko anti-TNF-antitijelo koje ima snažan antiinflamatorni potencijal koji se temelji na apoptozi inflamatornih stanica. Učinkovit je u liječenju aktivnog CB-a. Problemi koji se mogu pojaviti tijekom terapije jesu razvoj antitijela na infliksimab (dovode do infuzijske reakcije, gubitka djelotvornosti lijeka i odgođene reakcije tipa serumske bolesti) i razvoj oportunističkih infekcija (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Imunosupresivi su jedna od skupina lijekova koji se koriste u liječenju IBD-a. Među njima se najčešće koristi azatioprin i 6-tiogvanin. To su lijekovi koji smanjuju upalnu reakciju, suprimirajući pretjerani imunološki odgovor. Uzimanje azatioprina zahtjeva redovito nadziranje krvne slike zbog razvoja potencijalno teških nuspojava. Nadalje, praćenje razine folne kiseline u plazmi pacijenata iznimno je bitno budući da IBD i neki od lijekova kao npr. metotreksat imaju dokazan rizik za razvoj deficita folne kiseline u organizmu. U pozadini same bolesti deficit se može razviti zbog malnutricije, malapsorpcije i povećanog iskorištavanja skladišta folne kiseline u organizmu zbog upalnog procesa. Uporabom metotreksata inhibiraju se pojedini enzimi potrebni za sintezu folne kiseline (www.progressivehealth.com). Dokazano je da niska razina folne kiseline povećava rizik za razvoj karcinoma crijeva, posebno kolorektalnog. Tako da se smanjuje intracelularna razina S-adenozilmetionina, posljedično i metilacija citozina u DNA molekuli. Kao rezultat toga dolazi do neodgovarajuće aktivacije proto-onkogeni i indukcije maligne transformacije. Drugi pak mehanizam, uzima u obzir važnost folne kiseline u sintezi i popravku DNA (www.pubmed.com).

Stoga se pacijentima oboljelima od CB preporučuje redovito uzimanje nadomjestka folne kiseline i to u dozi od 1 mg dnevno (www.webmd.com). Međutim, u praksi često dolazi do namjernog i nenamjernog izostavljanja folne kiseline iz terapije. U cilju postizanja veće suradljivosti i adherencije pacijenata, predlažemo razvoj jedinstvene analitičke metode za istovremenu indentifikaciju azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u uzorcima tableta i plazmi pacijenata primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Novo predložena metoda mogla bi predstavljati temelj za prijedlog nove fiksne kombinacije koja bi sadržavala azatioprin i folnu kiselinu ili 6-tiogvanin i folnu kiselinu u istoj formulaciji tzv. *fixed dose formulation*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- 6-tiogvanin, čistoće za kromatografiju (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Amonijak, otopina min. 25 %, čistoća: p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Azatioprin, čistoće za kromatografiju (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Folacin, 5 mg (JGL, Rijeka, Hrvatska)
- Folna kiselina, čistoće za kromatografiju (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Imuran, 50 mg (Aspen, St Leonards, Australija)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mravlja kiselina, 98-100%, čistoća: p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Umjetna plazma PreciControl ClinChem Multi 2 (Roche, Basel, Švicarska)
- Tabloid, 40 mg (Aspen Global, Dublin, Irska)

3.1.2. Radni instrumenti

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

3.1.3. Pribor

- Celulozni nitratni filteri za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji, veličina pora 0,45 μm (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Injekcijski filteri Acrodise GHP, veličina pora 0,20 μm , promjer 26 mm (Gelman, Ann Arbor, SAD)

- Kromatografska kolona Symmetry C18, dimenzije: 150 mm x 4,6 mm; veličina čestica: 3,5 μm (Waters, Milford, MA, SAD)
- Stakleni sustav za filtriranje (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Tamne bočice za uzorkovanje, 2 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.1.4. Programski paketi

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

3.2. Metode

Razvoj analitičke metode za identifikaciju azatioprina, folne kiseline i 6-tiogvanina u farmaceutskom obliku i smjesi sastojaka ljudske plazme (tzv. umjetna plazma) primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije te binarne gradijentne metode.

3.2.1. Priprema pokretne faze

Kao pokretna faza A primijenjena je 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu, dok pokretnu fazu B čini 0,1% otopina mravlje kiseline u ultračistoj vodi.

Pokretna faza profiltrirana je pomoću sustava za filtriranje pokretnih faza te celuloznog nitratnog filtera (veličine pore 0,45 μm).

3.2.2. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline pripreme se otapanjem 50 mg supstancije u 25 ml otapala koje se dobije dodatkom 1 ml otopine amonijaka u 24 ml metanola.

3.2.3. Priprema ispitivanih uzorka

1 tableta Imurana odvaže se na analitičkoj vagi i potom se usitni u tarioniku. Sadržaj se prenese u odmjernu tikvicu od 25 ml te se nadopuni do oznake otapalom (24 ml metanola i 1 ml otopine

amonijaka). Ekstrakcija analita iz farmaceutskog oblika potakne se držanjem uzorka 1 min na Mini-Vortex uređaju te u ultrazvučnoj kupelji na sobnoj temperaturi tijekom 5 min. Nakon ekstrakcije uzorak se centrifugira 1 min, a potom se profiltrira koristeći injekcijski filter Acrodise GHP. Na isti način pripreme se i tablete Folacina i Tabloida.

Priprema uzorka plazme uključivala je tehniku taloženja proteina umjetne plazme s organskim otapalom, odnosno 50% metanolom (omjer plazme i organskog otapala iznosio je 1:3). U tako pripremljen uzorak dodano je po 50 μ L svake standardne otopine.

3.2.4. Kromatografska analiza

Analiza je provedena na uređaju Agilent 1100 s obrnuto faznom kolonom Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm te veličine čestica 3,5 μ m. Za identifikaciju azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline korištena je binarna gradijentna metoda čija se pokretna faza sastojala od 0,1% otopine mravlje kiseline u metanolu (otapalo A) i 0,1 % otopine mravlje kiseline u ultračistoj vodi; gradijentni program prikazan je u Tablici 1. Protok pokretne faze iznosio je 1 ml/min, a temperatura kolone bila je 25 °C. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 5 μ l. Tijekom analize uzorci su čuvani u autoinjektoru čija je temperatura iznosila 4 °C. Kromatogrami su snimani pri $\lambda = 254$ i 270 nm.

Tablica 1. Gradijentni program za analizu azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline.

Vrijeme (min)	0	15	20
Udio otapala	0	15	20
%A	5	80	5
%B	95	20	95

3.2.5. Masena spektrometrija

Detekcija analita provedena je na instrumentu Agilent 6300 Series Ion Trap. Provedena je pozitivna ionizacija elektroraspršenjem, dok je broj iona zadržanih u stupici iona iznosio 30 000. Vrijeme zadržavanja iona u stupici bio je 200 ms. Za raspršivanje primijenjen je dušik protoka 10 l/min, uz primjenu tlaka od 50,0 psi. Temperatura ionizatora bila je 350 °C. Za fragmentaciju iona primijenjen je plin helij čiji tlak je bio 6×10^{-6} mbar. Spektar snimanja masa iona bio je postavljen u rasponu od m/z 50-500.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija kromatografskih uvjeta

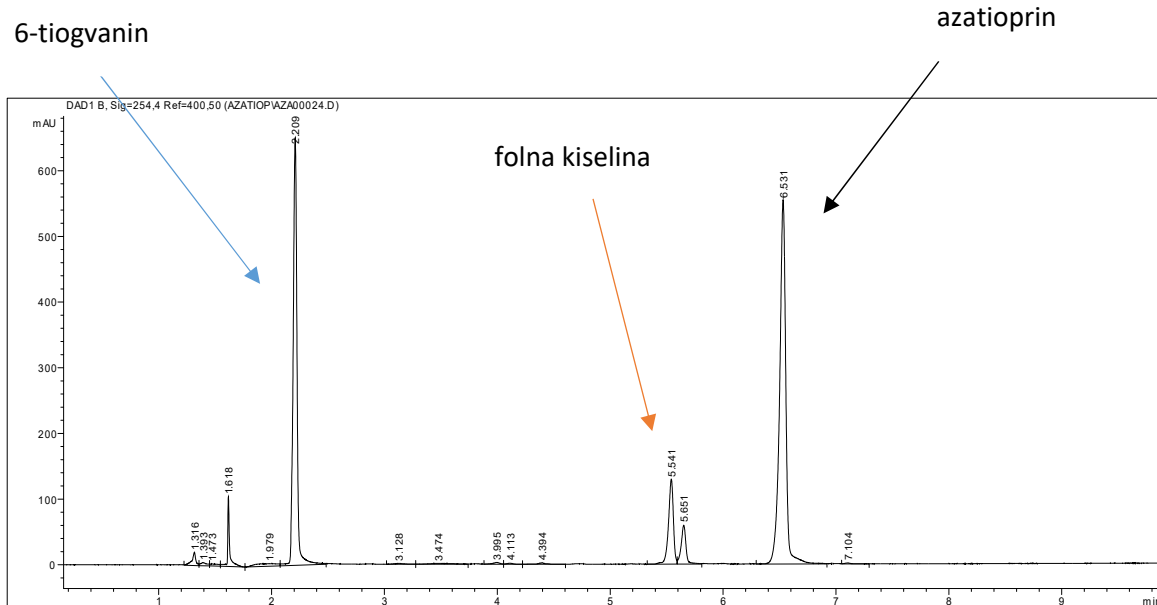
U svrhu razvoja analitičke metode za istovremenu identifikaciju azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Elucija sastavnica s kromatografske kolone praćena je primjenom detektora s nizom fotosenzitivnih dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) i masenog detektora (engl. *Mass Spectrometry Detector*). Cilj ovih preliminarnih istraživanja bio je postići zadovoljavajuće razdvajanje sva tri analita u prihvatljivijem vremenu.

Stoga je ispitan utjecaj sljedećih analitičkih uvjeta:

- kromatografske kolone C18,
- sastav i brzina protoka pokretne faze,
- temperatura kolone,
- izokratna / gradijentna elucija,
- pH pokretne faze i
- dimenzije kromatografske kolone.

Ekperimentalnim uvjetima opisanim u poglavlju 3.2.4. postignuto je najbolje razdvajanje sva tri analita.

Na Slici 3. prikazan je kromatogram uzorka "umjetne plazme" u koju su dodane standardne otopine. Vrijeme zadržavanja 6-tiogvanina na primijenjenoj obrnuto faznoj kromatografskoj koloni iznosi 2,21 min, folne kiseline 5,54 min, a azatioprina 6,53 min. Možemo, iz dobivenog kromatograma utvrditi kako su dobiveni simetrični pikovi ispitivanih tvari te kako je postignuto i dobro razdvajanje sastavnica unutar 7 svega minuta. Također je moguće utvrditi da je 6-tiogvanin najpolarniji analit, dok je najmanje polaran azatioprin s najdužim vremenom zadržavanja.



Slika 3. Kromatogram uzorka "umjetne plazme" u koju su dodane standardne otopine standarda: azatioprin, folna kiselina i 6-tiogvanin (6-TG).

4.2. Optimizacija uvjeta za masenu spektrometriju

Masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je instrumentalna analitička tehnika koja se koristi za potvrdu identiteta ili otkrivanje kemijske strukture analita. Analiza masenim spektrometrom započinje ionizacijom molekula u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska uzorka u visoki vakuum u ionizacijskoj komori. Ioni se stvaraju u plinovitoj fazi različitim metodama npr. bombardiranjem elektronima ili elektroraspšenjem. To može uzrokovati pucanje odnosno fragmentiranje nekih od molekula uzorka. U dijelu instrumenta koji se zove analizator ovi se ioni primjenom električnog ili magnetskog polja razdvajaju prema omjeru mase i naboja. Nakon analizatora ioni odlaze na detektor gdje se proizvodi električni signal koji se na kraju registrira. Spektar prikazuje na y-osi intenzitet a na x-osi omjer mase i naboja ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta molekule nastalog njezinim cijepanjem. Atomi ili molekule u uzorku mogu se identificirati usporedbom poznatih masa s identificiranim masama ili pomoću karakterističnog fragmentacijskog uzorka (www.wikipedia.org).

Primijenjena s kromatografskim tehnikama primjerice s tekućinskom (engl. *Liquid Chromatography*, LC) i plinskom kromatografijom (engl. *Gas Chromatography*, GC), MS je vrlo osjetljiva i specifična metoda za određivanje lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i tkivima. Često se koristi za složene uzorke, kao i za identifikaciju i određivanje sastavnica prisutnih u malim koncentracijama (Nigović, 2015; Mornar, 2015)

Nakon što je postignuto zadovoljavajuće kromatografsko razdvajanje azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline bilo je potrebno optimirati uvjete snimanja na masenom spektrometru.

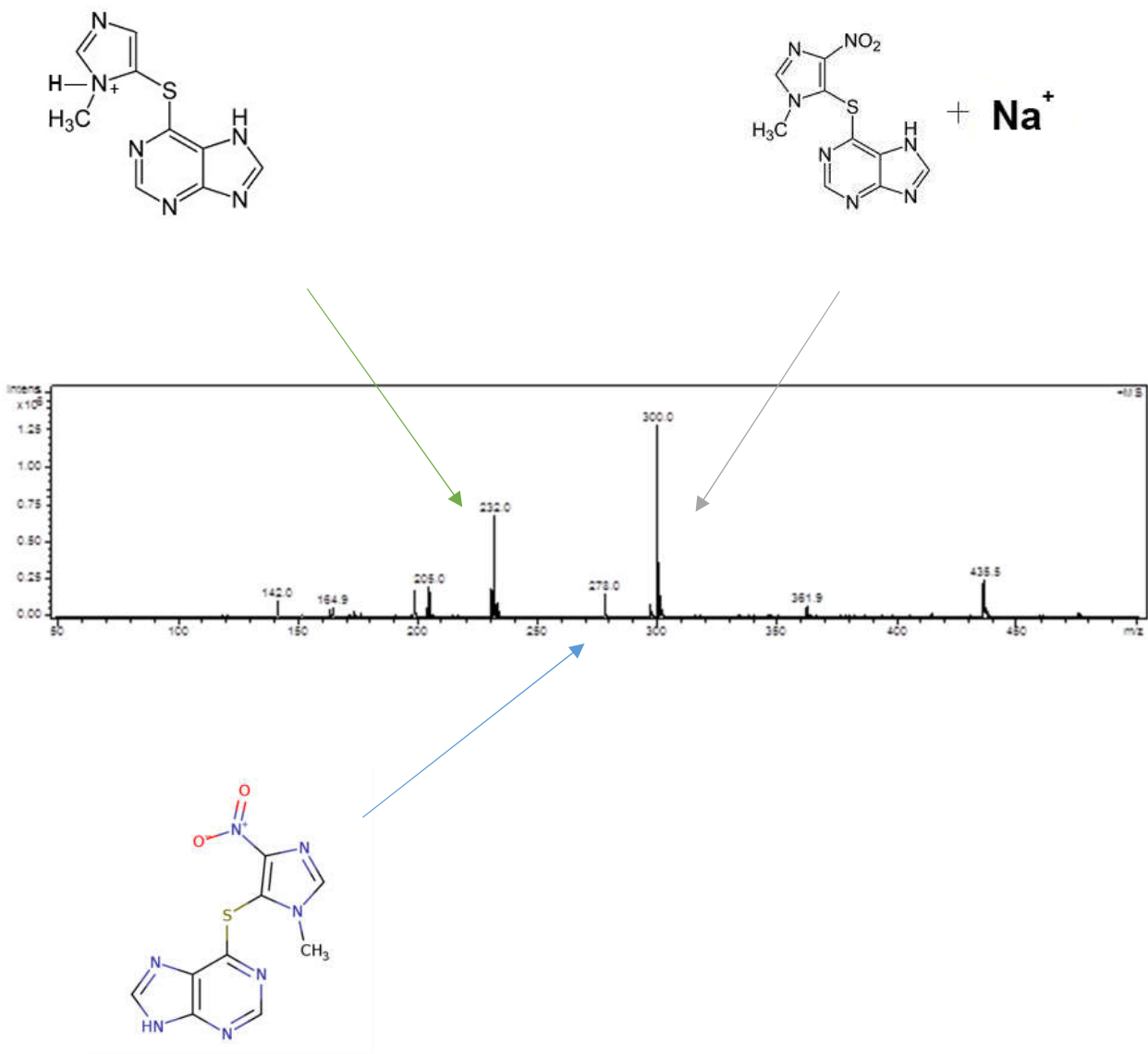
Stoga su prilikom razvoja HPLC/DAD/MS/MS metode za određivanje pojedinih sastavnica ispitani utjecaji sljedećih parametara na intenzitet signala na masenom spektrometru:

- brzina protoka tlaka i dušika,
- temperatura ionizatora,
- broj i vrijeme zadržavanja iona u stupici,
- širina spektra snimanja te
- vrsta ionizacije.

Na masenom spektrometru izabrani su optimalni uvjeti opisani u poglavlju 3.2.5.

Spektar masa prikazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta kao funkciju omjera mase i pozitivnog ili negativnog naboja iona (m/z). Za objašnjenje strukture nastalih fragmenata kao i fragmentacijskih puteva korištena je baza podataka (www.hmdb.ca).

Na slikama 4. – 6. prikazani su dobiveni MS spektri azatioprina, folne kiseline i 6-tiogvanina. Moguće je uočiti da svi ispitani spojevi dobro ioniziraju pri pozitivnoj ionizaciji zbog amino skupina prisutnih u strukturi te nastaju pseudomolekulski ioni $[M+H]^+$ (azatioprin) = 278, $[M+H]^+$ (folna kiselina) = 442, $[M+H]^+$ (6-tiogvanin) = 168,0. Međutim, u MS spektru azatioprina uočeni su i ioni aduktora azatioprina s natrijem. Nadalje, primjenom gore opisanih uvjeta na masenom spektrometru osim molekulskih iona nastanu i fragmentni ioni azatioprina, folne kiseline i 6-tiogvanina.

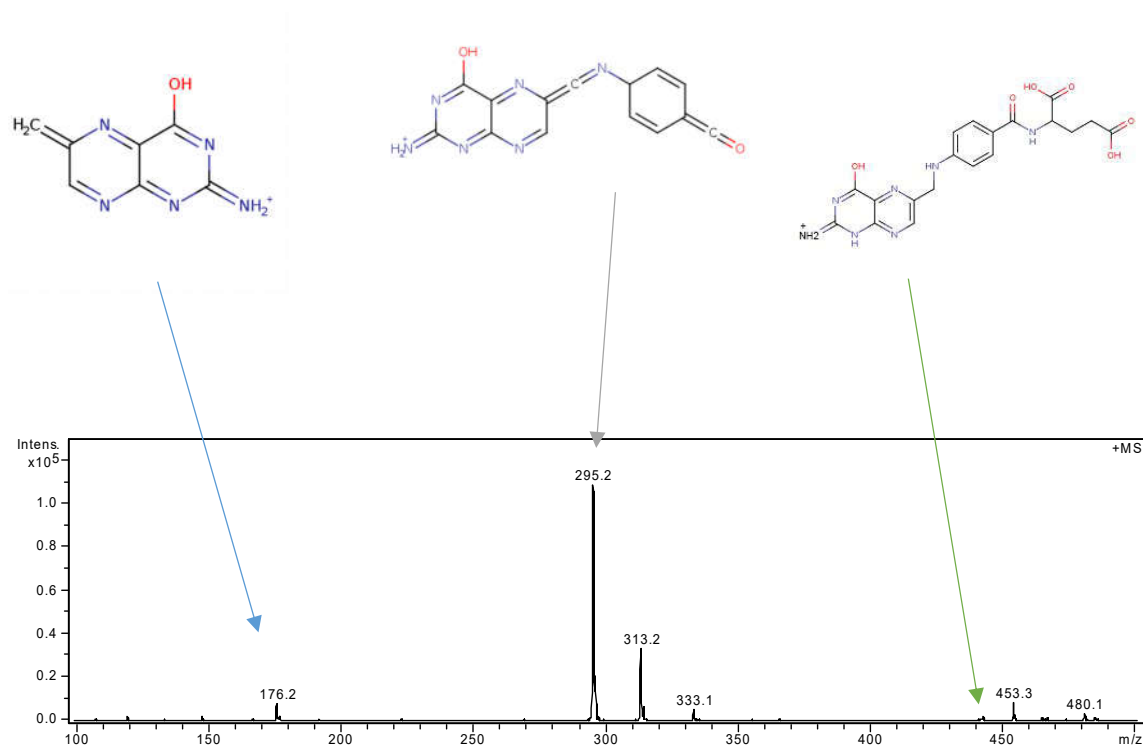


Slika 4: Maseni spektar azatioprina.

Budući da relativna molekulska masa (M_r) azatioprina iznosi 277, signal omjera mase i naboja $m/z = 278$ odgovara pseudomolekulskom ionu odnosno protoniranom molekulskom ionu, što je i očekivano jer je uzorak sniman pri pozitivnoj ionizaciji. Nadalje, najintenzivniji signal dobiven je za omjer mase i naboja $m/z = 300$, odnosno ion dobiven adicijom atoma natrija na molekulu azatioprina. Od fragmentnih iona najveći intenzitet je dobiven za $m/z = 232$, odnosno za fragmentni ion dobiven nakon gubitka nitro skupine (Slika 4.).

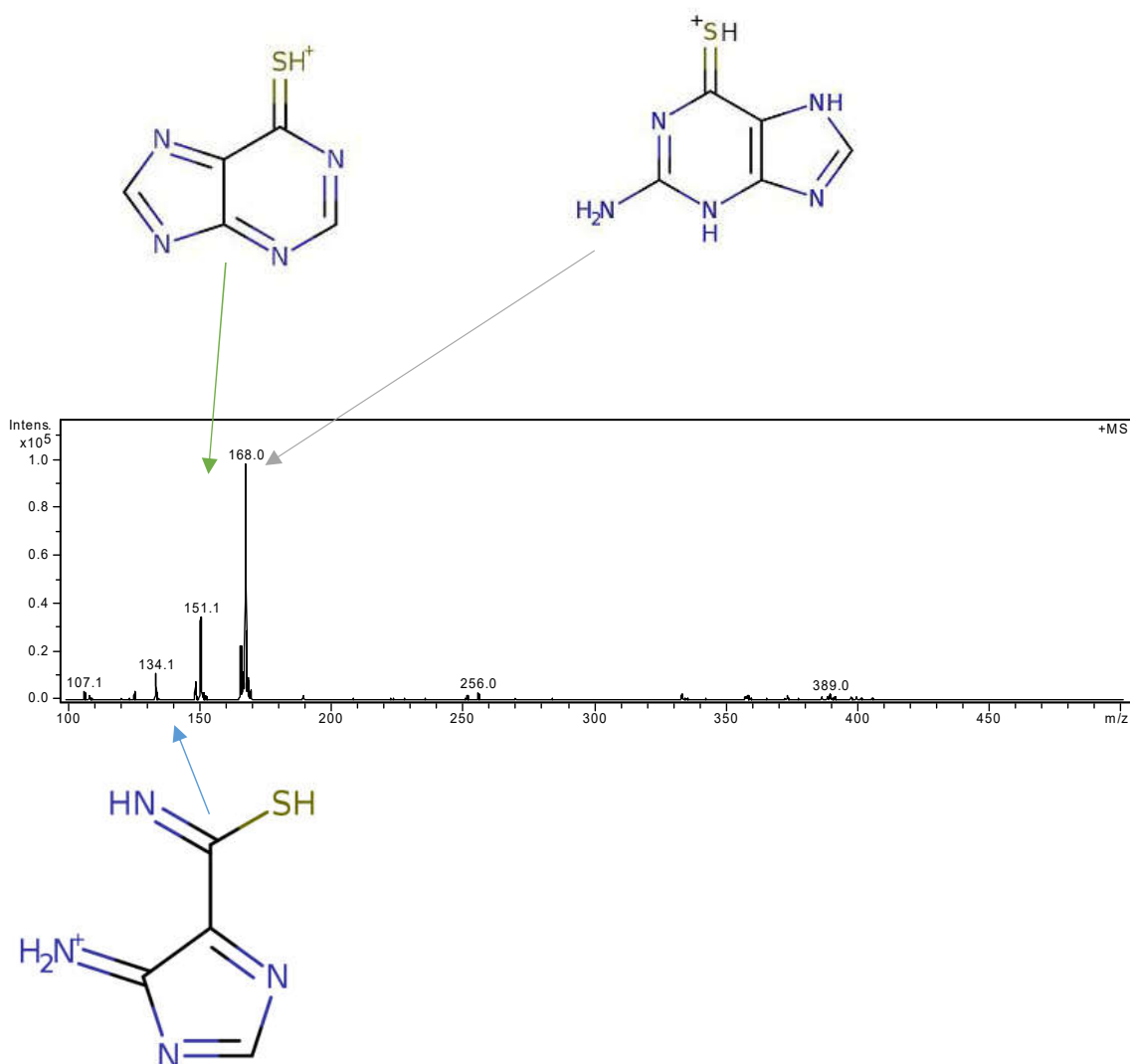
Dok folna kiselina ima relativnu molekulska masu koja iznosi 441, signal omjera mase i naboja $m/z = 442$ odgovara protoniranom molekulskom ionu. Od fragmentnih iona najveći intenzitet je dobiven za $m/z = 295$, odnosno za fragmentni ion dobiven nakon gubitka L-glutamata. Signal

omjera mase i naboja $m/z = 176$ odgovara fragmentu, dobivenom nakon gubitka L-glutamata i p-aminobenzojeve kiseline (Slika 5.).



Slika 5. Maseni spektar folne kiseline.

Posljednji spoj 6-tiogvanina ima relativnu molekulsku masu 167, signal omjera mase i naboja $m/z = 168$ odgovara protoniranom molekulskom ionu. Od fragmentnih iona najveći intenzitet je dobiven za $m/z = 151$, za ion dobiven nakon gubitka amino skupine. Daljnom fragmentacijom puca šesterčlani prsten te nastane fragment čiji omjera mase i naboja m/z iznosi 134 (Slika 6.).



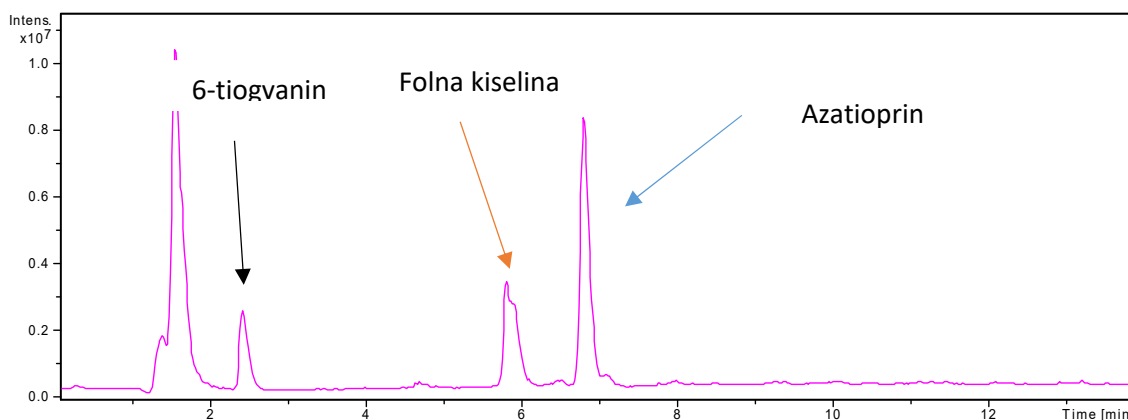
Slika 6. Maseni spektar 6-tiogvanina.

Kromatogram ukupnih iona (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC) je kromatogram dobiven zbrajanjem intenziteta svih iona. Pri čemu uključuje ione i šuma i sastavnica ispitivanog uzorka (www.shimadzu.com). Ova vrsta kromatograma se vrlo često prikazuje kao rezultat HPLC/DAD/MS/MS analize.

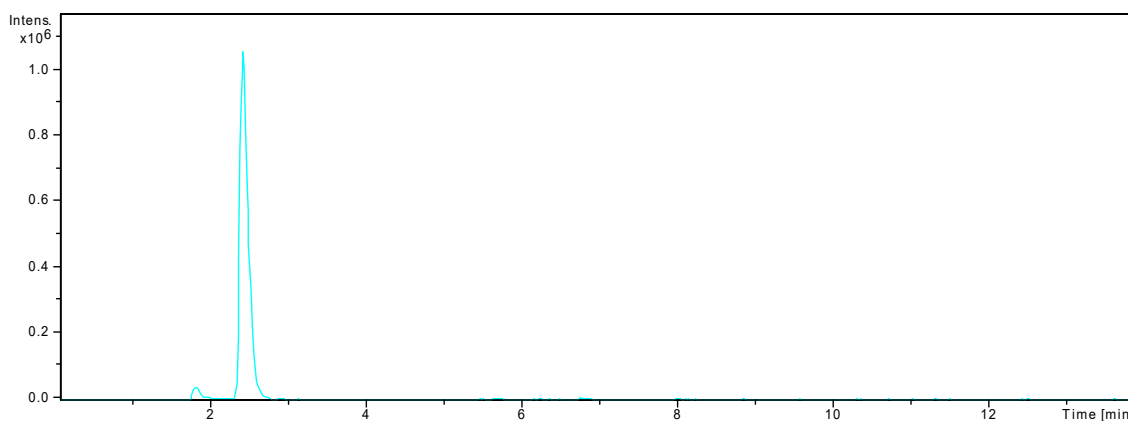
U složenim uzorcima, TIC kromatogram često daje ograničene informacije, budući da se višestruki analiti eluiraju istovremeno i tako zamagljuju pojedine. U ekstrahiranom ionskom kromatogramu (engl. *Extracted Ion Chromatogram*, EI) jedna ili više m/z vrijednosti koje

predstavljaju jedan ili više analita od interesa se “ekstrahira” iz cijelog skupa kromatografskih podataka. Ukupni intenzitet unutar prozora tolerancije mase oko određenog omjera mase i naboja određenog analita prikazan je na svakoj točki analize. Veličina prozora tolerancije mase obično ovisi o točnosti mase i masenoj rezoluciji instrumenta koji prikuplja podatke. To je korisno za otkrivanje prethodno neočekivanih analita, za isticanje potencijalnih izomera, otkrivanje tvari koje istodobno eluiraju ili za dobivanje čistih kromatograma spojeva od interesa. Ekstrahirani ionski kromatogrami stvaraju se procesom obrade ili analizom podataka (www.wikipedia.org).

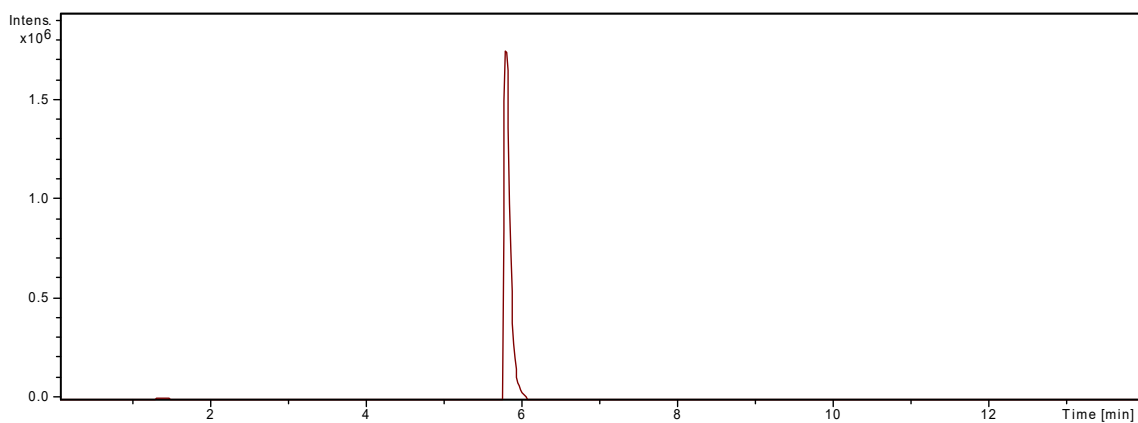
Na slikama 7. - 10. prikazani su dobiveni TIC i EIC kromatogrami azatioprina, folne kiseline i 6-tiogvanina.



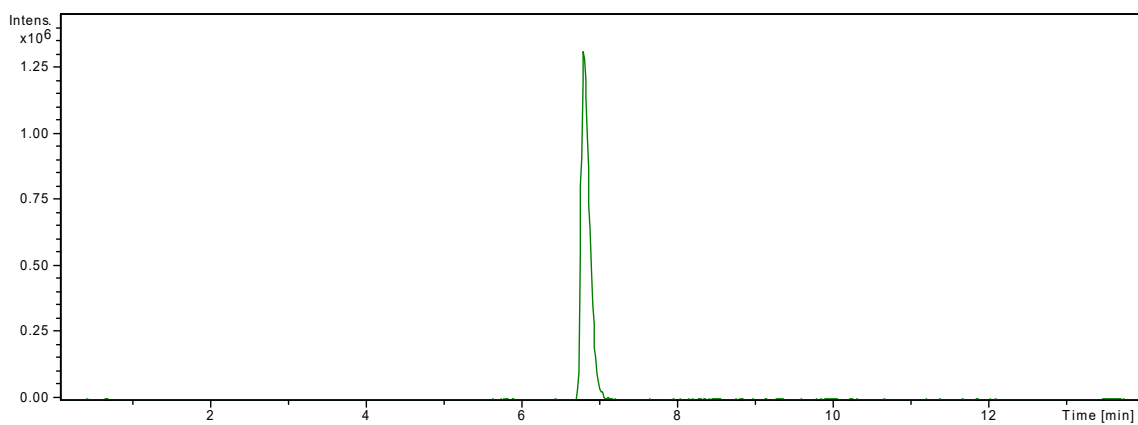
Slika 7. TIC kromatogram ukupnih iona uzorka plazme u koji su dodane standardne otopine: azatioprina, folne kiseline i 6-tiogvanina.



Slika 8. EIC₁₆₈ kromatogram: vrijeme zadržavanja 6-tiogvanina iznosi 2,21 min.



Slika 9. EIC₂₉₅ kromatogram: vrijeme zadržavanja folne kiseline iznosi 5,54 min.



Slika 10. EIC₂₇₈ kromatogram: vrijeme zadržavanja azatioprina 6,53 min.

5. ZAKLJUČCI

- U ovom diplomskom radu predložena je jedinstvena analitička metoda za identifikaciju azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline primjenom LC/DAD/MS/MS tehnike.
- Optimizirani kromatografski uvjeti omogućili su razdvajanje sva tri analita unutar 7 minuta.
- Optimizirani su uvjeti snimanja masenih spektara azatioprina, folne kiseline i 6-tiogvanina.
- Iz dobivenih rezultata evaluirani su putevi fragmentacije azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline.
- Novo predložena metoda primijenjena je za identifikaciju navedenih analita u tabletama dostupnim u ljekarnama u EU i umjetnoj plazmi.
- Predloženom metodom uspješno su odvojeni pikovi pomoćnih tvari prisutnih u tabletama od pikova analita.
- Predloženom metodom postignuto je razdvajanje sastavnica plazme od ispitanih lijekova i vitamina B9.
- Daljnja istraživanja bit će usmjerena na validaciju predložene analitičke metode.
- Predložena metoda mogla bi predstavljati temelj za analitičku podršku u razvoju nove fiksne kombinacije lijekova koja bi sadržavala azatioprin i folnu kiselinu ili 6-tiogvanin i folnu kiselinu u istoj formulaciji tzv. *fixed dose formulation*.

6. LITERATURA

Aberra FN, Lichtenstein GR. Monitoring of Immunomodulators in Inflammatory Bowel Disease, *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 21(4), 307-319.

Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2017., www.halmed.hr, pristupljeno 10.06.2017.

Amgevita, 2017., <https://mediately.co/hr>, pristupljeno 10.7.2017.

Azathioprine Metabolism and TPMT, 2015., <http://emedicine.medscape.com>, pristupljeno 8.06.2017.

Bach-Rojecky L. Predavanja iz kolegija Farmakologija 2015./2016.

Chronic Inflammation and Malignancy in Ulcerative Colitis, 2011., www.hindawi.com, pristupljeno 10.6.2017.

Cronhova bolest, 2015., <https://hucuk.hr>, pristupljeno 12.6.2017.

Crohn's Disease as a Deficiency State, 2010., www.progressivehealth.com, 2017., pristupljeno 12.6.2017

Cuffari C. A physician's guide to azathioprine metabolite testing. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 58-63.

Dumić J. Predavanja iz kolegija Imunologija 2015./2016.

Efficacy and safety of 6-thioguanine in the management of inflammatory bowel disease, 2007., www.ncbi.nlm.nih.gov, pristupljeno 11.7.2017.

Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability, 1999., www.ncbi.nlm.nih.gov, pristupljeno 13.6.2017.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing, 2006, str. 241, 377.

Imuran 50 mg tablete, 2017., <https://mediately.co/hr>, pristupljeno 8.6.2017.

Mass spectrometry, 2013., <https://en.wikipedia.org/>, pristupljeno 17.06.2017.

Mornar. A. Predavanja iz kolegija Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda 2015./2016.

Nigović B. Predavanja iz kolegija Analitika lijekova 2015./2016.

Tiouganine, 2005., www.drugbank.ca, pristupljeno 11.7.2017.

The Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/>, pristupljeno 21.06.2017.

Total Ion Chromatogram, 2010., www.shimadzu.com/, pristupljeno 19.06.2017.

Total ion current (TIC) chromatogram, 2013., <https://en.wikipedia.org/>, pristupljeno 19.06.2017.

Upalne bolesti crijeva, 2014., www.msd-prirucnici.placebo.hr, pristupljeno 7.6.2017.

Vitamins for Crohn's Disease, 2017., www.webmd.com, pristupljeno 13.6.2017.

Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. *Medicus*, 2006, 15, 53-62.

7. SAŽETAK /SUMMARY

Upalne bolesti crijeva, u koje spadaju Chronova bolest i ulcerozni kolitis, su autoimune bolesti nepoznate etiologije, karakterizirane kroničnom upalom u području probavnog trakta. Imunosupresivi su uz aminosalicilate, kortikosteroide, biološku terapiju jedna od glavnih skupina lijekova koji se koriste u liječenju IBD-a. Među njima se najčešće koristi azatioprin i 6-tiogvanin. To su lijekovi koji smanjuju upalnu reakciju, suprimirajući pretjerani imunološki odgovor. Upalne bolesti crijeva dokazano uzrokuju deficit folne kiseline u organizmu oboljelih, koji se povezuje s povećanim rizikom od razvoja kolorektalnog karcinoma. Stoga pacijenti trebaju uzimati nadomjestke folne kiseline.

U cilju postizanja veće suradljivosti i adherencije pacijenata, u radu je predložen razvoj jedinstvene analitičke metode za istovremenu identifikaciju azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u uzorcima tableta i plazmi pacijenata primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Korištena je binarna gradijentna metoda elucije budući da su ispitani analiti bili strukturno različiti spojevi. Mjerenja su provedena primjenom instrumenta Agilent 1100 Series LC/MSD Trap. Korištena je C18 analitička kolona Symmetry. Mobilna faza sastojala se od 0,1% mravlje kiseline u metanolu (otapalo A) i 0,1% mravlje kiseline u pročišćenoj vodi (otapalo B). Za snimanje masenih spektara korištena je ionizacija elektroraspršenjem te je dušik korišten kao plin za sušenje i raspršivanje mobilne faze. Zbog veće količine vode u pokretnoj fazi pojačan je protok plina nebulizatora.

Na kraju smo dobili relativno kratku metodu za određivanje sva tri analita i ispitana je primjenjivost metode za identifikaciju analita u lijekovima i "umjetnoj plazmi". Daljnja istraživanja bit će usmjerena na validaciju predložene analitičke metode.

Inflammatory bowel diseases, including Chron disease and ulcerative colitis, are autoimmune diseases of unknown etiology characterized by chronic inflammation in digestive tract. Immunosuppressant's are with amino salicylate, corticosteroids and biological therapy one of the major groups of medicines used in the treatment of IBD. Azathioprine and 6-thioguanine are most frequently used by immunosuppressant. These are drugs that reduce the inflammatory reaction, suppressing an over-immune response. Inflammatory bowel disease can cause folate deficiency. Low folate status may increase the risk of developing cancer, especially cancer of the colorectal. Therefore, patients should take folic acid supplement daily. We proposed the development of a new analytical method for identification of azathioprine, 6-thioguanine and folic acid in tablets and plasma control samples.

The aim of this work was to develop a unique method for the determination these drugs using high-performance liquid chromatography with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry. A binary gradient elution method was used as investigated compounds are structurally different compounds. All experiments were performed using Agilent Series LC/MSD Trap system. A Symmetry C18 analytical column and the mobile phase consisted of 0.1% Formic acid in methanol (eluent A) and of 0.1% Formic acid in purified water were used. The MS system was operated with electrospray ionization source in the positive ion mode. Nitrogen is used both as drying and nebulizing gas. The flow of nebulizer gas was increased because of the higher amount of water in the mobile phase.

Finally, a relatively short method for determining all three analytes was proposed and the applicability of the analytical drug identification method was tested. Further studies will be focuses on the validation of the proposed method

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

RAZVOJ ANALITIČKE METODE ZA IDENTIFIKACIJU AZATIOPRINA, 6-TIOGVANINA I FOLNE KISELINE U TABLETAMA I PLAZMI PACIJENATA

Frane Sršen

SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva, u koje spadaju Chronova bolest i ulcerozni kolitis, su autoimune bolesti nepoznate etiologije, karakterizirane kroničnom upalom u području probavnog trakta. Imunosupresivi su uz aminosalicilate, kortikosteroide, biološku terapiju jedna od glavnih skupina lijekova koji se koriste u liječenju IBD-a. Među njima se najčešće koristi azatioprin i 6-tiogvanin. To su lijekovi koji smanjuju upalnu reakciju, suprimirajući pretjerani imunološki odgovor. Upalne bolesti crijeva dokazano uzrokuju deficit folne kiseline u organizmu oboljelih, koji se povezuje s povećanim rizikom od razvoja kolorektalnog karcinoma. Stoga pacijenti trebaju uzimati nadomjestke folne kiseline. U cilju postizanja veće suradljivosti i adherencije pacijenata, u radu je predložen razvoj jedinstvene analitičke metode za istovremenu identifikaciju azatioprina, 6-tiogvanina i folne kiseline u uzorcima tableta i plazmi pacijenata primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Korištena je binarna gradijentna metoda elucije budući da su ispitani analiti bili strukturno različiti spojevi. Mjerenja su provedena primjenom instrumenta Agilent 1100 Series LC/MSD Trap. Korištena je C18 analitička kolona Symmetry. Mobilna faza sastojala se od 0,1% mravlje kiseline u metanolu (otapalo A) i 0,1% mravlje kiseline u pročišćenju vodi (otapalo B). Za snimanje masenih spektara korištena je ionizacija elektroraspršenjem te je dušik korišten kao plin za sušenje i raspršivanje mobilne faze. Zbog veće količine vode u pokretnoj fazi pojačan je protok plina nebulizatora. Na kraju smo dobili relativno kratku metodu za određivanje sva tri analita i ispitana je primjenjivost metode za identifikaciju analita u lijekovima i "umjetnoj plazmi". Daljnja istraživanja bit će usmjerena na validaciju predložene analitičke metode.

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

Rad sadrži: 32 stranica, 10 grafičkih prikaza, 1 tablica i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: azatioprin, 6-tiogvanin, folna kiselina, analitička metoda, identifikacija

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

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

Dr. sc. Miranda Sertić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR IDENTIFICATION OF AZATHIOPRINE, 6-THIOGUANINE AND FOLIC ACID IN TABLETS AND PLASMA OF PATIENTS

Frane Sršen

SUMMARY

Inflammatory bowel diseases, including Chron disease and ulcerative colitis, are autoimmune diseases of unknown etiology characterized by chronic inflammation in digestive tract. Immunosuppressant's are with amino salicylate, corticosteroids and biological therapy one of the major groups of medicines used in the treatment of IBD. Azathioprine and 6-thioguanine are most frequently used by immunosuppressant. These are drugs that reduce the inflammatory reaction, suppressing an over-immune response. Inflammatory bowel disease can cause folate deficiency. Low folate status may increase the risk of developing cancer, especially cancer of the colorectal. Therefore, patients should take folic acid supplement daily. We proposed the development of a new analytical method for identification of azathioprine, 6-thioguanine and folic acid in tablets and plasma control samples. The aim of this work was to develop a unique method for the determination these drugs using high-performance liquid chromatography with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry. A binary gradient elution method was used as investigated compounds are structurally different compounds. All experiments were performed using Agilent Series LC/MSD Trap system. A Symmetry C18 analytical column and the mobile phase consisted of 0.1% Formic acid in methanol (eluent A) and of 0.1% Formic acid in purified water were used. The MS system was operated with electrospray ionization source in the positive ion mode. Nitrogen is used both as drying and nebulizing gas. The flow of nebulizer gas was increased because of the higher amount of water in the mobile phase. Finally, a relatively short method for determining all three analytes was proposed and the applicability of the analytical drug identification method was tested. Further studies will be focuses on the validation of the proposed method.

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

Thesis includes: 32 pages, 10 figures, 1 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: azathioprine, 6-thioguanine, folic acid, analytical method, identification

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

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

Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.

