

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC BERGANT

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC BERGANT

**DOLOČANJE VSEBNOSTI MEGLUMINA Z DERIVATIZACIJO Z
NATRIJEVIM NAFTOKINONSULFONATOM IN TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI**

**DETERMINATION OF MEGLUMINE BY DERIVATIZATION WITH
SODIUM NAPHTHOQUINONE SULFONATE AND HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod somentorstvom dr. Jožka Cesarja, mag.farm. in mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag.farm.

ZAHVALA

Za pomoč in nasvete pri izvajanju praktičnega dela ter usmerjanje pri pisanju naloge se zahvaljujem somentorju dr. Jožku Cesarju, mag. farm.

Hvala tudi mentorju doc. dr. Stanetu Pajku, mag.farm. za pomoč in pregled naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorstvom dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Matic Bergant

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 MEGLUMIN	1
1.1.1 Meglumin kot solubilizator.....	2
1.1.2 Meglumin kot stabilizator.....	3
1.1.3 Meglumin v zdravilih.....	4
1.1.4 Analitika meglumina.....	4
1.2 DERIVATIZACIJA	5
1.2.1 Avtomatski sistemi za injiciranje.....	7
1.2.2 Reagenti za derivatizacijo.....	8
1.2.2.1 Natrijev naftokinonsulfonat.....	9
2 NAMEN DELA	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Standardi aminosladkorjev.....	13
3.1.2 Reagenti in topila.....	13
3.1.3 Vzorci.....	14
3.1.4 Naprave in pribor.....	14
3.2 METODE	16
3.2.1. Priprava mobilne faze, pufrov, reagentov in standardov.....	16
3.2.2 UV-VIS spektrofotometrija (metoda S1).....	17
3.2.3 Derivatizacija v 10 ml viali (metoda D1).....	18
3.2.4 Derivatizacija v igli avtomatskega injektorja (metoda D2).....	19
3.2.5 Razvojna metoda HPLC (metoda K1).....	19
3.2.6 Končna metoda HPLC (metoda K2).....	20
3.2.7 Validacija metode.....	20
3.2.7.1 Selektivnost.....	21
3.2.7.2 Linearnost.....	21
3.2.7.3 Točnost in natančnost.....	22
3.2.8 Analiza vzorcev.....	24
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 RAZVOJ METODE HPLC	27
4.1.1 Razvojna metoda HPLC (metoda K1).....	27
4.1.2 Končna metoda HPLC (metoda K2).....	28
4.2 ISKANJE OPTIMALNIH POGOJEV DERIVATIZACIJE MEGLUMINA Z NQS	28

4.2.1 Spremljanje nastajanja PDM z metodo S1	28
4.2.2 Spremljanje nastajanja PDM z metodama D1 in K1	30
4.2.3 Spremljanje nastajanja PDM z metodama D2 in K1	32
4.2.4 Ponovljivost derivatizacije z metodo D1	34
4.3 STABILNOST NQS	35
4.3.1 Stabilnost NQS v odvisnosti od temperature, pH, vrste pufra in časa derivatizacije	35
4.3.2 Stabilnost NQS v vodi	37
4.4 VALIDACIJA METODE	38
4.4.1 Selektivnost	38
4.4.2 Linearnost	39
4.4.3 Točnost in ponovljivost	41
4.4.3.1 Točnost in natančnost metode pri uporabi vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda	42
4.4.3.2 Točnost in natančnost metode brez uporabe vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda	43
4.5 ANALIZA VZORCEV	43
5 SKLEP	45
6 LITERATURA	47
7 PRILOGA	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska struktura sorbitola (levo) in meglumina (desno).	1
Slika 2: Produkt Mannichove reakcije med megluminom in formaldehidom, povzeto po (2).	3
Slika 3: Reakcija med NQS ter primarnimi in sekundarnimi amini, povzeto po (20).	10
Slika 4: Kromatogram razvojne metode HPLC z označenimi vrhovi posameznih spojin.	27
Slika 5: Kromatogram končne metode HPLC z označenimi vrhovi posameznih spojin.	28
Slika 6: Vrednosti absorbance v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (100 mM boratni pufer, pH = 8).	29
Slika 7: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (25 mM boratni pufer, pH = 8).	30
Slika 8: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (50 mM karbonatni pufer, pH = 10).	31
Slika 9: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri uporabi različnih pufrov (sobna temperatura, pH = 12).	31
Slika 10: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri pH = 10 in pH = 12 (sobna temperatura, 50 mM karbonatni pufer).	32
Slika 11: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od čakalnega časa pri različnih vrednostih pH (sobna temperatura, 50 mM karbonatni pufer).	33
Slika 12: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od čakalnega časa (sobna temperatura, 50 mM fosfatni pufer, pH = 12).	34
Slika 13: Vrednosti AUC NQS v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (25 mM boratni pufer, pH = 8).	36
Slika 14: Vrednosti AUC NQS RP2 v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (25 mM boratni pufer, pH = 8).	36
Slika 15: Vrednosti AUC NQS v odvisnosti od časa derivatizacije v različnih pufrih (sobna temperatura, pH = 12).	36
Slika 16: Vrednosti AUC NQS RP2 v odvisnosti od časa derivatizacije v različnih pufrih (sobna temperatura, pH = 12).	36
Slika 17: Vrednosti AUC NQS v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih vrednostih pH (sobna temperatura, 50 mM karbonatni pufer).	37
Slika 18: Vrednosti AUC NQS RP2 v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih vrednostih pH (sobna temperatura, 50 mM karbonatni pufer).	37
Slika 19: Vrednosti AUC NQS v odvisnosti od časa pri sobni temperaturi.	37
Slika 20: Prekrivajoča se kromatograma zmesi meglumina in <i>N</i> -etil glukamina (modra barva) ter samega <i>N</i> -etil glukamina (črna barva).	38

Slika 21: Prekrivajoči se kromatogrami zmesi meglumina, glukozamina in glukamina (vijolična barva), samega glukamina (modra barva) in samega glukozamina (črna barva).....	39
Slika 22: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od standardnih koncentracij meglumina.	40
Slika 23: Vrednosti AUC NQS RP1 v odvisnosti od standardnih koncentracij meglumina.	41
Slika 24: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od AUC NQS RP1.....	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Fizikalno kemijske lastnosti meglumina.	1
Preglednica II: Prednosti in slabosti posameznih vrst reakcij derivatizacije.	6
Preglednica III: Prednosti derivatizacij “offline” in “online”	7
Preglednica IV: Fizikalno kemijske lastnosti NQS.....	9
Preglednica V: Seznam vzorcev in njihova sestava.....	14
Preglednica VI: Parametri metode S1, uporabljeni pri merjenju kinetike reakcije.....	18
Preglednica VII: Gradientni program razvojne metode HPLC.....	20
Preglednica VIII: Gradientni program končne metode HPLC.	20
Preglednica IX: Metode in pogoji derivatizacije uporabljene pri validaciji metode.	21
Preglednica X: Predpisane natehte meglumina za posamezno koncentracijsko območje.	22
Preglednica XI: Faktorji redčenja za izračun mase meglumina v vzorcih posameznih zdravil.....	25
Preglednica XII: Ponovljivost derivatizacije izvedene z metodo D1.....	34
Preglednica XIII: Točnost metode pri uporabi vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda.	42
Preglednica XIV: Točnost metode brez uporabe vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda.	43
Preglednica XV: Izračunane vsebnosti meglumina na odmerno enoto v treh analiziranih zdravilih.	43
Preglednica XVI: Protokol uporabniškega programa za derivatizacijo (UDP).	51

POVZETEK

Meglumin je aminosladkor, ki se v farmaciji uporablja za tvorbo soli s kislimi učinkovinami in kot pomožna snov. Pomemben je zlasti zato, ker lahko močno poveča vodotopnost nekaterih učinkovin in s tem vpliva na njihovo sproščanje in biološko uporabnost. Kljub temu, da ima monografijo v vseh pomembnejših farmakopejah, v literaturi srečamo malo metod za določanje njegove vsebnosti v farmacevtskih formulacijah.

V okviru magistrskega dela smo zato razvili novo metodo, ki temelji na avtomatski predkolonski derivatizaciji meglumina z natrijevim 1,2-naftokinon-4-sulfonatom ter nadaljni ločbi in detekciji nastalega derivata s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Kromatografsko metodo smo razvili na koloni Accucore 2,6 μm C18 100 \times 4,6 mm, ki smo jo termostatirali na 30 $^{\circ}\text{C}$. Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,05 % vodne raztopine trifluoroocetne kisline in acetonitrila v razmerju 94:6, v/v. Pretok mobilne faze je bil 1,0 ml/min, voden z gradientnim programom elucije. Volumen injiciranja je bil 10 μL . Analite smo detektirali pri 278 nm z detektorjem na diodni niz. Čas izvedbe celotne metode, vključno z avtomatsko derivatizacijo in ekvibracijo kolone, je 22 minut. Med optimizacijo pogojev derivatizacije smo proučevali vpliv vrste in pH pufru ter temperature in časa reakcije na njeno hitrost, izkoristek in ponovljivost. Derivatizacijo smo izvajali v igli injektorja po programu, ki ga določi uporabnik, pri sobni temperaturi, s čakalnim časom 120 sekund, v fosfatnem pufru s pH = 12,0.

Med razvojem metode smo imeli občasno težave z neponovljivostjo reakcije derivatizacije zaradi uporabe avtomatskega sistema za injiciranje. Da bi kompenzirali napako sistema, smo uporabili odziv razpadnega produkta naftokinonsulfonata kot internega standarda. Predlagamo, da naj se metoda uporablja na predhodno kvalificiranem sistemu.

Z validacijo smo pokazali, da je metoda selektivna, linearna v območju 25 - 200 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,996$), natančna (RSD = 3,4 %) in točna (93,7 - 98,4 %). Uspešno smo jo uporabili za določitev vsebnosti meglumina v treh registriranih zdravilih.

Ključne besede: meglumin, natrijev 1,2-naftokinon-4-sulfonat, avtomatska predkolonska derivatizacija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

ABSTRACT

Meglumine is an amino sugar that is used as a counterion and excipient in pharmaceutical formulations. It increases solubility, dissolution and bioavailability of some active ingredients. Despite the presence of its monograph in all major pharmacopoeias there is a lack of analytical methods for determination of meglumine in pharmaceutical formulations. In the master thesis, we have developed a new method based on automatic pre-column derivatization of meglumine with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate which is followed by separation and detection of derivatization product with high performance liquid chromatography.

The separation was achieved on Accucore 2,6 μm C18 100 \times 4,6 mm column at 30 °C using a mobile phase with 0,05 % aqueous solution of trifluoroacetic acid and acetonitrile in 94:6 (v/v) ratio. The flow rate was set to 1,0 ml/min with gradient elution. Injection volume was 10 μL . Diode array detector was set to 278 nm. Run time, including pre-column derivatization and column equilibration, was 22 minutes. During optimization of reaction conditions we studied the influence of temperature, buffer, pH and time on reaction speed, yield and repeatability. Automated in needle derivatization was applied using user defined program at room temperature in phosphate buffer with pH = 12,0. Wait time was set to 120 seconds.

During method development we had occasional problems with reaction repeatability because of the autosampler. To compensate for the error, we used signal response of degradation product of naphthoquinone sulfonate as internal standard. We suggest that the method is applied only on a prequalified system.

During validation studies, we have shown that the method is selective, linear in concentration range 25 - 200 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,996$), precise (RSD = 3,4 %) and accurate (93,7 - 98,4 %). The method was successfully used for determination of meglumine in three commercially available pharmaceutical formulations.

Key words: meglumine, sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, automatic pre-column derivatization, high performance liquid chromatography

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC - odziv, oz. površina pod krivuljo kromatografskega vrha (ang. *Area Under Curve*)

DSC - diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. *Differential Scanning Calorimetry*)

FMOC - 9-fluorenilmetiloksikarbonil klorid

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)

NQS - natrijev 1,2-naftokinon-4-sulfonat

NQS RP1 - razpadni produkt NQS št. 1

NQS RP2 - razpadni produkt NQS št. 2

NQS RP3 - razpadni produkt NQS št. 3

OPA - ortoftalaldehid

PDM - produkt derivatizacije meglumina

RSD - relativni standardni odklon

TFA - trifluoroocetna kislina

UDP - s strani uporabnika določen injekcijski program avtomatskega vzorčevalnika (ang. *User Defined Program*)

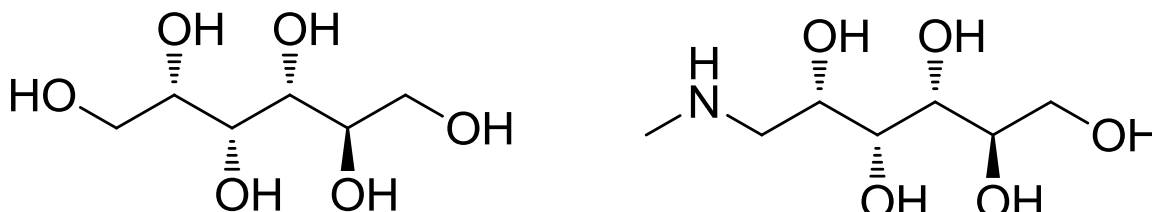
UV-VIS - ultravijolični in vidni del spektra elektromagnetnega valovanja

XRPD - rentgenska praškovna difrakcija (ang. *X-ray Powder Diffraction*)

1 UVOD

1.1 MEGLUMIN

Meglumin (*N*-metil glukamin) je aminosladkor, derivat sorbitola, pri katerem je glede na sorbitol hidroksilna skupina na mestu 1 zamenjana z metilaminsko (Slika 1).



Slika 1: Kemijska struktura sorbitola (levo) in meglumina (desno).

Meglumin pridobivajo iz glukoze, pri čemer najprej tvorijo imin med alhidno skupino glukoze in metilaminom, temu pa sledi redukcija do meglumina s katalitskim hidrogeniranjem. V farmaciji se uporablja kot proti-ion kislih učinkovin, ki z njim tvorijo soli, in kot pomožna snov. V večini primerov ga v formulacije dodajajo zaradi njegove sposobnosti izboljšanja topnosti in sproščanja kislih učinkovin (1). V literaturi ga omenjajo tudi kot stabilizator, pufer in katalizator (2, 3, 4, 5, 6) . V preglednici I je predstavljen pregled njegovih osnovnih značilnosti (1).

Preglednica I: Fizikalno kemijske lastnosti meglumina.

IUPAC ime	(2R,3R,4R,5S)-6-metilaminoheksan-1,2,3,4,5-pentol
Molska masa	195,21 g/mol
Videz	bel kristalinični prah
pKa	9,52 (25 °C)
Tališče	128-132 °C
Topnost	zelo lahko topen v vodi, topen v nižjih alkoholih, praktično netopen v nepolarnih topilih
Varnost	ni toksičen (LD50: 1,68 g/kg)

1.1.1 Meglumin kot solubilizator

Meglumin se v farmaciji v prvi vrsti uporablja za izboljšanje vodotopnosti in hitrosti sproščanja slabo topnih kislih učinkovin. To omogoča njegova polarna struktura in bazični amski center. Na ta način lahko povečamo biološko uporabnost učinkovine in izboljšamo njen terapevtski učinek.

Tako so Zhu in sod. z dodatkom meglumina izboljšali sproščanje repaglinida *in vitro*. Ta se uporablja za peroralno zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Z raziskavami topnosti so pokazali, da se je s povečevanjem koncentracije meglumina v raztopini povečevala tudi vodotopnost repaglinida. Prav tako sta bila obseg in hitrost sproščanja repaglinida v različne medije iz formulacij z megluminom statistično značilno višja kot iz tistih brez meglumina. Molarno razmerje med repaglinidom in megluminom v formulaciji je bilo 1:2. Z metodami infrardeče spektroskopije (IR), rentgenske praškovne difrakcije (XRPD) in diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) so v koprecipitatih repaglinida in meglumina potrdili nastanek molekularnega kompleksa med obema spojinama. Glede na njuni strukturi so sklepali, da se vzpostavi elektrostatska interakcija med karbonilnim kisikom v repaglinidu in pozitivno nabito amsko skupino v megluminu. Tega molekularnega kompleksa pa niso zaznali v praškovnih zmesih repaglinida in meglumina (7).

Podobno so Villiers in sod. razvili metodo za izboljšanje sproščanja ibuprofena in ketoprofena *in vitro*. Rezultati topnosti in testov sproščanja so pokazali, da meglumin poveča topnost obeh, prav tako pa zviša tudi njune hitrosti sproščanja. To velja tako za praškovne zmesi meglumina z obema kislina učinkovinama, kot tudi za koprecipitate. Do zanimivih ugotovitev so prišli v študiji koprecipitativ s tehnikama DSC in XRPD. Ugotovili so, da pride do tvorbe kompleksa med ibuprofenom in megluminom, ne pa med ketoprofenom in megluminom. Kompleksa niso zaznali v praškovnih zmesih. Sklepali so, da nastanek molekularnega kompleksa ni edini mehanizem, preko katerega meglumin poveča vodotopnost učinkovin. Verjetna razlaga je, da pride do tvorbe vodotopnih soli meglumina s kislimi učinkovinami. Te bi lahko delovale tudi kot površinsko aktivne snovi (8).

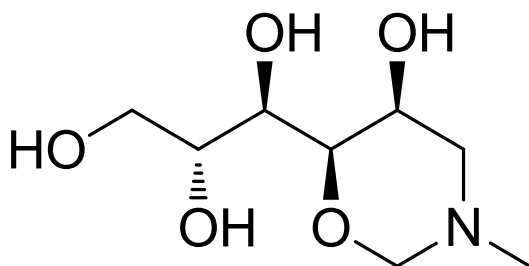
Basavaraj in sod. so proučevali vpliv meglumina na kompleksacijo šibko kisle in slabo topne zdravilne učinkovine DRF-4367 z 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Trojni kompleks in koprecipitat zdravilne učinkovine s ciklodekstrinom in megluminom je imel bistveno višjo hitrost in obseg sproščanja v primerjavi z učinkovino samo in z binarnim kompleksom zdravilne učinkovine s ciklodekstrinom. Nadalje se pri trojnem kompleksu ni

več pojavljala težava zaradi reprecipitacije med testom sproščanja, ki je bila prisotna v binarnem sistemu. Raziskovalci so zato sklepali, da meglumin poveča vodotopnost proučevane zdravilne učinkovine preko več mehanizmov. V nastalem kompleksu prihaja do specifičnih interakcij med megluminom in sulfonamidno skupino zdravilne učinkovine, obenem pa meglumin tvori vodikove vezi s ciklodekstrinom preko svojih OH skupin, kar še dodatno stabilizira nastali kompleks. Meglumin naj bi prispeval tudi k boljši prostorski umestitvi zdravilne učinkovine znotraj ciklodekstrina (9).

Vidimo torej, da lahko meglumin izboljša vodotopnost in sproščanje nekaterih kislih učinkovin. Interakcije, ki jih tvori znotraj proučevanega sistema, pa se lahko od primera do primera razlikujejo, zato je treba njegov vpliv na sproščanje učinkovine proučiti v vsakem sistemu posebej.

1.1.2 Meglumin kot stabilizator

Formaldehid se lahko pojavlja kot nečistota v pomožnih snoveh in učinkovinah. Nastaja med shranjevanjem ali proizvodnjo in lahko reagira z učinkovinami ter tako prispeva k njihovi nestabilnosti. Da bi to preprečili, so Fujita in sod. (2) proučili zmožnost nekaterih aminov, da prisotni formaldehid vežejo nase ter tako preprečijo oziroma zmanjšajo razgradnjo učinkovin. Med testiranimi amini se je le meglumin izkazal za učinkovitega, saj je v raztopini s formaldehidom edini statistično značilno zmanjšal njegovo količino. Z jedrsko magnetno resonanco in masno spektroskopijo so dokazali, da aminska skupina meglumina reagira s formaldehidom v t.i. Mannichovi reakciji. Strukturo nastalega produkta prikazuje Slika 2.



Slika 2: Produkt Mannichove reakcije med megluminom in formaldehidom, povzeto po (2).

V naslednji raziskavi so isti avtorji predstavili uporabo meglumina kot stabilizatorja razvojne učinkovine AJ-9677 v formulaciji (3). Z izvedbo stabilnostne študije so dokazali, da prihaja do razpada učinkovine v tabletah in da je za to odgovoren formaldehid, obenem

pa dodatek meglumina raztopini zdravilne učinkovine s formaldehidom zmanjša nastajanje razpadnega produkta. Na koncu so tabletam z učinkovino dodali različne količine meglumina. Izkazalo se je, da je pri višji dodani količini meglumina nastalo manj razpadnega produkta, zato so sklepali, da je meglumin odgovoren za stabilizacijo učinkovine, saj nase veže nastali formaldehid. Meglumin lahko torej v nekaterih primerih uporabimo za izboljšanje stabilnosti farmacevtskih oblik.

1.1.3 Meglumin v zdravilih

Meglumin se kot proti-ion nahaja v kontrastnih sredstvih, v katerih tvori vodotopne soli s kislinami, kot sta npr. gadoterna in diatrizojska kislina (13, 14).

V zdravilni učinkovini za zdravljenje visceralne lišmanioze tvori kompleks z antimonom (12). V zdravilih ga najdemo v obliki soli tudi s kislimi učinkovinami, kot so fluniksini, fosaprepitant in tafamidis (15, 16, 17).

Kot pomožna snov je dodan najrazličnejšim zdravilom, ki vsebujejo kisle učinkovine, med katere sodijo telmisartan, meloksikam, repaglinid, indometacin, lansoprazol, omeprazol, pravastatin in ramipril (10, 11).

1.1.4 Analitika meglumina

Kljub razširjeni uporabi meglumina v farmaciji zaradi njegovega vpliva na vodotopnost in sproščanje zdravilnih učinkovin, je v strokovni literaturi navedenih malo metod za določanje njegove vsebnosti v farmacevtskih oblikah. Jasprica in sod. so vsebnost meglumina določali z ionsko-parno kromatografijo (18). Meglumin se zaradi svoje polarne in bazične narave ni zadrževal na reverzno fazni koloni. Težavo so rešili tako, da so v mobilno fazo dodali oktan-1-sulfonsko kislino, ki je ionsko-parni reagent. Ta s svojim nepolarnim delom tvori interakcije z nepolarno stacionarno fazo, meglumin pa zadržuje na koloni preko interakcij s svojim polarnim delom. Meglumin v UV-VIS spektru šibko absorbira svetlobo, zato so za validacijo metode uporabili dva detektorja, in sicer detektor na diodni niz (DAD) ter detektor, ki meri refraktivni indeks (RID). Z validacijo metode so dokazali, da je ta selektivna, linearna, natančna in točna. Ionsko-parna kromatografija ima nekaj pomembnih pomanjkljivosti, zaradi katerih je ne uporabljajo pogosto. Za ekvilibracijo kolone je potreben večji volumen mobilne faze in posledično daljši čas, kar otežuje uporabo gradientne elucije. Druga slabost je ta, da lahko že majhne spremembe v

temperaturi kolone in deležu organske faze vplivajo na koncentracijo ionsko-parnega reagenta v stacionarni fazi. To ima vpliv na retencijske čase analitov, zato imamo lahko težave s selektivnostjo metode. Ionsko-parnega reagenta ne moremo popolnoma sprati s kolone, zato moramo uporabiti tako, ki je namenjena izključno za ionsko-parno kromatografijo (22).

Zaradi omenjenih slabosti opisane metode za določanje vsebnosti meglumina je jasno, da potrebujemo novo, ki teh pomanjkljivosti ne bo imela. V literaturi smo zasledili veliko analitskih metod za določanje ogljikohidratov in aminosladkorjev, še posebej glukozamina (19, 20, 21). Na tem področju se je najbolj uveljavila tehnika predkolonske derivatizacije sladkorjev ter nadaljna analiza produktov s tekočinsko kromatografijo. Enak pristop bi bilo smiselno uporabiti tudi pri razvoju nove metode za določanje vsebnosti meglumina, saj je ta strukturno soroden glukozaminu.

1.2 DERIVATIZACIJA

Kemijska derivatizacija je postopek, s katerim proučevano spojino pretvorimo v njen derivat, ki ima podobno strukturo. V reakciji derivatizacije sodeluje specifična funkcionalna skupina znotraj analizirane spojine. Nastali derivat ima spremenjene lastnosti glede na izhodno spojino, npr. reaktivnost, topnost, temperaturi vrelišča in tališča ter agregatno stanje. Spremenjene kemijske lastnosti derivata lahko izkoristimo za kvantifikacijo in ločbo proučevane spojine. Za reakcijo derivatizacije želimo, da je zanesljiva in poteče v celoti ali pa vsaj na ponovljiv način. Nastali derivati morajo biti stabilni v času analiznega postopka. Reakcija mora biti splošna, kar pomeni, da deluje na širok izbor substratov, vendar specifična za določeno funkcionalno skupino, tako, da se izognemo neželenim interferencam (23). V nadaljevanju se bomo osredotočili na metode derivatizacije v povezavi s tekočinsko kromatografijo, saj smo se s tem ukvarjali tudi v naši nalogi.

Glede na fazo analitskega postopka, v kateri poteka derivatizacija, ločimo predkolonsko, kolonsko in pokolonsko derivatizacijo. Vsaka ima svoje prednosti in slabosti, ki so navedene v Preglednici II. Izberemo tisto, ki je za dani analit in reakcijo derivatizacije najprimernejša (24, 25).

Preglednica II: Prednosti in slabosti posameznih vrst reakcij derivatizacije.

	Prednosti	Slabosti
<p>Predkolonska derivatizacija: uporablja se pri metodah, pri katerih je potrebna visoka občutljivost in je primerna za ozek nabor vzorcev, ki so si med seboj podobni.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • manjša poraba in širši izbor derivatizacijskih reagentov; • enostavnejša konfiguracija kromatografskega sistema; • višja občutljivost metode; • izboljšano zadrževanje na koloni; • prebitek reagenta načeloma ne moti detekcije. 	<ul style="list-style-type: none"> • ostale komponente vzorca lahko vplivajo na reakcijo; • derivati so pogosto nestabilni, kar lahko vpliva na kvantitativnost metode.
<p>Kolonska derivatizacija: uporablja se, ko imamo na voljo majhne količine vzorca.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • minimalna poraba vzorca in reagentov. 	<ul style="list-style-type: none"> • reakcija mora poteči v celoti znotraj časa analize.
<p>Pokolonska derivatizacija: primerna je za širši nabor vzorcev, pri katerih ni potrebna visoka občutljivost metode.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • zelo dobra ponovljivost in kvantitativnost metode; • ostale komponente vzorca ne vplivajo na reakcijo. 	<ul style="list-style-type: none"> • nižja občutljivost metode; • večja poraba in ožji izbor derivatizacijskih reagentov; • prebitek reagenta lahko moti detekcijo.

Predkolonsko in pokolonsko metodo derivatizacije nato ločimo še na t.i. izvedbi “offline” in “online”. Pri derivatizaciji “offline” ta poteka ločeno od kromatografskega sistema, pri izvedbi “online” pa je reakcija derivatizacije vključena v kromatografski sistem. V Preglednici III so predstavljene prednosti obeh vrst izvedb (25).

Preglednica III: Prednosti derivatizacij “offline” in “online”.

Derivatizacija “Offline”	Derivatizacija “Online”
<ul style="list-style-type: none"> • boljša optimizacija pogojev reakcije, saj nismo omejeni s temperaturo in časom; • nismo omejeni z izbiro topila. 	<ul style="list-style-type: none"> • avtomatiziran sistem; • manjša časovna obremenjenost operaterja; • boljša reproducibilnost; • manjša poraba reagentov in topil.

V literaturi so opisane različne izvedbe sistemov “online” predkolonskih in pokolonskih derivatizacij. Nekatere izmed njih temeljijo na dodatnih elementih kromatografskih sistemov, kot so dodatne črpalke in reaktorske celice (26). Take konfiguracije pa zaradi povečane kompleksnosti omejujejo širšo uporabo teh metod. Zelo dobro rešitev na področju predkolonske derivatizacije “online” pa ponujajo sistemi za avtomatsko injiciranje (27, 28).

1.2.1 Avtomatski sistemi za injiciranje

Večina novejših kromatografskih sistemov je opremljena z avtomatskim sistemom za injiciranje vzorcev, ki omogoča izvajanje predkolonske derivatizacije “online”. Tak sistem zagotavlja vse v Preglednici III navedene prednosti derivatizacije “online”, obenem pa je dovolj razširjen in enostaven za uporabo, da so metode, razvite z njim širše uporabne. S pomočjo injekcijskega programa, ki ga določi uporabnik (UDP), nam sistem omogoča avtomatsko pripravo derivatizacijske zmesi. Primer UDP in natančen opis posameznih korakov v njem je predstavljen v Prilogi. Reakcijo derivatizacije lahko izvajamo znotraj igle injektorja ali pa v posebej določeni, t.i. reaktorski viali. Sistem v igli ali viali med seboj zmeša vzorec, bazični pufer in derivatizacijski reagent. Nato čaka predpisan čas, da reakcija poteče, potem pa reakcijski zmesi doda kisli pufer za nevtralizacijo pH. Ta korak je potreben zato, ker bi injiciranje alkalne raztopine skrajšalo življensko dobo kolone.

Nevtralno končno zmes se nato vodi na kolono, kjer se derivati ločijo, potem pa jih detektiramo z ustreznim detektorjem. Slabost te tehnike je predvsem v tem, da mora reakcija derivatizacije poteči v nekaj minutah pri sobni temperaturi. Zaradi tega smo omejeni z izborom reagentov, saj jih večina ni sposobna reagirati pri tako milih pogojih. Prav tako med reakcijo ne sme priti do obarjanja, zato moramo s predhodnimi poskusi zunaj sistema preveriti, da temu ni tako.

Na osnovi sistemov za avtomatsko injiciranje so uspešno razvili metode za določanje aminokislin in aminov v najrazličnejših vzorcih. Tako so Bruckner in sod. razvili postopek za določanje biogenih aminov v vodnem izvlečku čaja, in sicer z uporabo reagenta 9-fluorenilmetilkloroformata (FMOC) (29). Derivatizacijo so izvedli v reaktorski viali. Buha in sod. pa so razvili metodo za določanje aminokislin v bioloških vzorcih (30). Za derivatizacijo aminokislin s primarno amino skupino so izbrali ortoftalaldehid (OPA), za derivatizacijo aminokislin s sekundarno amino skupino pa FMOC. Reakcije so izvedli v igli injektorja in metodo uspešno validirali.

1.2.2 Reagenti za derivatizacijo

Reagente za derivatizacijo lahko, glede na vpeljano funkcionalno skupino, razdelimo v štiri skupine, in sicer (25):

- kromofore, ki absorbirajo v UV-VIS spektru in to lastnost prenesejo na derivate;
- fluorofore, ki fluorescirajo in to lastnost prenesejo na derivate;
- fluorogene, ki ne fluorescirajo, tvorijo pa fluorescirajoče derivate;
- redoks reagente, ki reducirajo ali oksidirajo analite, ki jih lahko nato lažje detektiramo.

Za detekcijo v UV-VIS območju uporabljamo reagente kot so: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB), 2,4,6-trinitrobenzensulfonska kislina (TNBS), ninhidrin, dabsil klorid (DABS-Cl) in benzoil klorid. Za fluorometrično detekcijo pa so v uporabi reagenti: OPA, kloridi sulfonske kisline (npr. dansil klorid), FMOC, 4-kloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) in 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F). Naštete spojine predstavljajo le del številnih reagentov, ki se uporabljajo za derivatizacijo (25).

Pri predkolonski derivatizaciji je izbira reagenta ključna. Odvisna je tudi od preiskovanega analita. Reagent mora biti specifičen zanj, še posebej kadar imamo opraviti z vzorci s kompleksno sestavo, v katerih bi lahko prišlo do neželenih reakcij in interferenc. Reagent

mora biti stabilen znotraj časa analize in pri različnih pogojih reakcije (temperatura, pH, ionska moč raztopine). Zaželeno je, da je njegova priprava enostavna in varna. Ponavadi reagent za derivatizacijo dodajamo v prebitku, z namenom, da reakcija poteče v celoti. Zato moramo zagotoviti način, da prebitni reagent ne moti detekcije nastalega derivata. To lahko dosežemo bodisi z njuno ustrezno ločbo na koloni ali pa s selektivno detekcijo derivata pri ustrezni valovni dolžini. Izbira reagenta pa vpliva tudi na hitrost in izkoristek reakcije ter na stabilnost nastalih derivatov. Vsi omenjeni dejavniki imajo lahko velik vpliv na natančnost in točnost analizne metode (31, 32).

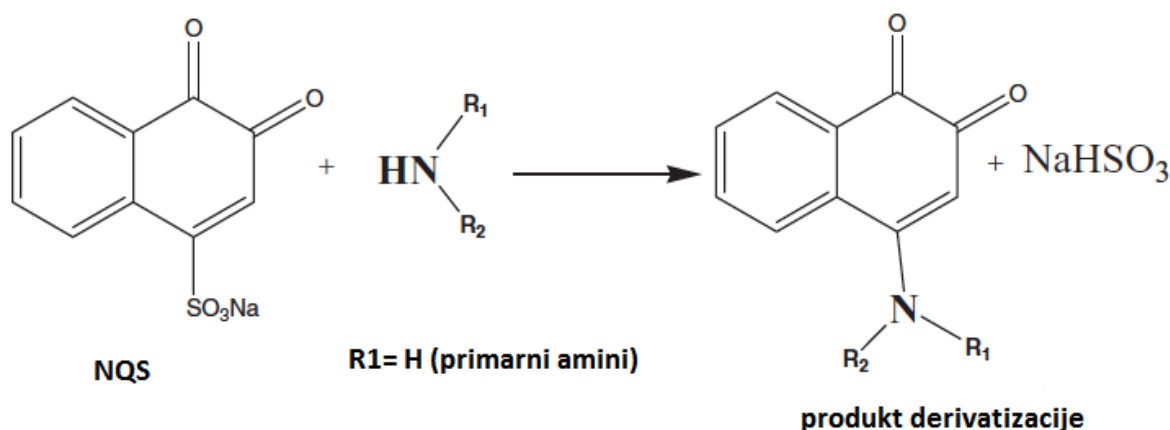
1.2.2.1 Natrijev naftokinonsulfonat

Natrijev 1,2-naftokinon-4-sulfonat (NQS) je reagent za derivatizacijo aminov in aminokislin (33). V Preglednici IV je so predstavljene nekatere njegove lastnosti (34).

Preglednica IV: Fizikalno kemijske lastnosti NQS.

IUPAC ime	Natrijev 3,4-diokso-3,4-dihidronaftalen-1-sulfonat
Molska masa	260,2 g/mol
Tališče	289 °C
Topnost	topen v vodi (50 mg/ml), rahlo topen v alkoholu, netopen v organskih topilih
Videz	oranžen prah

NQS je dobro topen v vodi, zato lahko z njim derivatizacijo izvajamo v vodnih raztopinah. V bazičnih pogojih reagira s primarnimi in sekundarnimi amini, pri čemer poteče nukleofilna aromatska substitucija sulfonata z amino skupino (Slika 3) (26). Nastali derivati močno absorbirajo v UV-VIS območju.



Slika 3: Reakcija med NQS ter primarnimi in sekundarnimi amini, povzeto po (20).

Prva omemba NQS sega v leto 1922, ko ga je uporabil Folin za kolorimetrično določanje aminokislin (35). Uporabili so ga tudi za določanje aminokislin v prehranskih dopolnilih in krmih za živali ter za določanje biogenih aminov v vinu (26, 36, 37). V zadnjih letih je zelo priljubljen za določanje zdravilnih učinkovin v zdravilih (38). Med metodami, pri katerih so uporabili NQS kot derivatizacijski reagent, prevladujejo spektrofotometrične, objavljenih pa je tudi nekaj kromatografskih, s predkolonsko in pokolonsko derivatizacijo (26, 38, 39). V literaturi je opisana tudi derivatizacija z NQS pri kapilarni elektroforezi (36, 37).

Islas in sod. so razvili postopek za določanje glifosata in njegovega glavnega metabolita aminometilfosfonske kisline v vzorcih prsti (39). Odločili so se za predkolonsko derivatizacijo "offline". Reakcija je potekla v 5 minutah, pri 60 °C, v boratnem pufri s pH = 9,4. Nastale derivate so injicirali na reverznofazno kolono in jih detektirali pri valovni dolžini 254 nm. Tekom optimizacije pogojev derivatizacije so proučevali vplive temperature in koncentracije NQS na izkoristek reakcije. Izkazalo se je, da ima temperatura bistveno večji vpliv kot koncentracija NQS. Najboljši kompromis med množino nastalega derivata glifosata in stabilnostjo derivata aminometilfosfonske kisline so dosegli pri 60 °C.

Garcia in sod. so razvili metodo za določanje biogenih aminov v vzorcih vina, ki temelji na predkolonski derivatizaciji "offline" z NQS, nadaljni ekstrakciji nastalih derivatov s kloroformom in njihovi ločbi na reverznofazni koloni (40). Derivate so detektirali pri valovni dolžini 270 nm. Med optimizacijo pogojev derivatizacije so proučevali vplive temperature, časa, pH in molarosti pufru ter koncentracije NQS. Z izjemo molarosti pufru so vsi ostali parametri statistično značilno vplivali na izkoristek derivatizacije. Vplivi

pogojev na različne vrste aminov, ki so jih določali, niso bili enaki, zato so morali izbrati najugodnejši kompromis. Na koncu so se odločili za petminutno derivatizacijo pri 65 °C v boratnem pufri s pH = 9,2.

Darwish in sod. so razvili spektrofotometrično metodo za določanje fluoksetina v farmacevtskih formulacijah (41). Fluoksetin je sekundarni amin in se uporablja v terapiji depresivnih motenj. Derivatizacijo so izvajali 10 minut pri 25 °C, v boratnem pufri s pH = 11,0, nastale derivate pa detektirali pri valovni dolžini 490 nm. Pri optimizaciji pogojev derivatizacije so proučevali vpliv koncentracije NQS, temperature in časa derivatizacije ter pH pufru. Ugotovili so, da temperatura in čas nista vplivala bistveno na izkoristek reakcije, saj nad 25 °C in trajanju derivatizacije nad 5 minut niso opazili sprememb v absorbancah nastalega derivata. Vrednost pH pufru je imela velik vpliv na potek reakcije, saj v kislem reakcija ni potekla, največje izkoristke pa so izmerili v območju pH od 8 do 12.

Vidimo torej, da se lahko optimalni pogoji derivatizacije z NQS od primera do primera precej razlikujejo. Velike razlike lahko opazimo predvsem pri različnih temperaturah derivatizacije. Za ugoden potek reakcije sta potrebna alkalen pH in pa zadosten prebitek NQS. Predstavljeni primeri so samo nekateri izmed številnih opisanih v literaturi, kjer poročajo o še večjih razlikah glede pogojev derivatizacije (38). Jasno je, da je uspešnost derivatizacije odvisna tudi od proučevanega analita, zato moramo za vsakega posebej določiti optimalne pogoje. Kot smo že omenili, si želimo hitro in ponovljivo reakcijo z visokim izkoristkom, ki bo potekala pri čim milejših pogojih, ter stabilnost nastalih derivatov.

2 NAMEN DELA

Meglumin je aminosladkor, ki ga v farmaciji uporabljajo kot proti-ion kislih učinkovin in kot pomožno snov. Količina meglumina v formulaciji lahko bistveno vpliva na vodotopnost in sproščanje nekaterih zdravilnih učinkovin. Kljub temu primanjkuje ustreznih analitskih metod za določanje njegove vsebnosti v farmacevtskih formulacijah. Zato je cilj magistrske naloge razviti novo metodo za njegovo določanje, ki bo enostavna in hitra, hkrati pa selektivna, občutljiva, natančna in točna.

Meglumin se zaradi svoje polarne strukture in bazičnega centra, ki ga vsebuje, ne zadržuje na reverznofazni koloni. Ker v svoji strukturi nima kromofora, je njegova detekcija otežena. Zato ga bomo najprej derivatizirali z natrijevim naftokinonsulfonatom (NQS), ki je reagent za derivatizacijo primarnih in sekundarnih aminov. Na ta način bomo povečali lipofilnost meglumina ter tako omogočili njegovo zadrževanje na reverznofazni koloni, hkrati pa tudi povečali občutljivost metode, saj nastali derivat močno absorbira v UV-VIS spektru.

V prvem delu naloge se bomo posvetili razvoju kromatografske metode, s katero bomo detektirali derivatiziran meglumin in ga na reverznofazni koloni ločili od prebitnega NQS, njegovih razpadnih produktov in derivatov sorodnih aminosladkorjev.

V drugem delu naloge bomo optimizirali pogoje derivatizacije, pri čemer bomo proučevali vpliv vrste uporabljenega bazičnega pufra in njegovega pH ter temperature in časa reakcije na njeno hitrost, izkoristek in ponovljivost. Pri tem bomo ovrednotili tudi stabilnost reagenta NQS. Optimizacijo pogojev derivatizacije bomo izvajali s poskusi v kivetih ali v 10 ml vialih. V kolikor bodo optimizirani pogoji reakcije to dopuščali, bomo derivatizacijo izvajali z avtomatskim sistemom za injiciranje "online".

V sklopu validacijskega postopka bomo ovrednotili selektivnost, območje linearnosti, točnost in natančnost metode ter ocenili njeno primernost za uporabo v analizi zdravil.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Standardi aminosladkorjev

N-metil glukamin, > 99,0 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

N-etil glukamain, > 98,0 % (TCI, Tokio, Japonska)

Glukamin, > 97,0 % (TCI, Tokio, Japonska)

Glukozamin, > 99,0 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

3.1.2 Reagenti in topila

Natrijev 1,2-naftokinon-4-sulfonat, > 97,0 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4), > 99,0 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Natrijev hidrogenfosfat dihidrat ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 98,5-101,0 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3), 99,7-100,3 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Dinatrijev tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), 99,5-103,0 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Trifluoroocetna kislina (CF_3COOH), 99 % (Acros organics, Geel, Belgija)

Ortofosforna kislina (H_3PO_4), > 85 % (Fisher chemical, Leicestershire, Združeno Kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske)

Natrijev hidroksid (NaOH), > 99% (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Metanol za HPLC (CH_3OH), 99,9 % (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)

Acetonitril za HPLC (CH_3CN), 99,9 % (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)

Ultračista voda, pridobljena na Fakulteti za farmacijo z Mili-Q- Advantage A 10 (Milipore corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA)

Pufrska raztopina Cetripur s pH = 7,00 (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Pufrska raztopina Cetripur s pH = 10,00 (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.1.3 Vzorci

Preglednica V: Seznam vzorcev in njihova sestava.

Vzorec	Zdravilna učinkovina	Pomožne snovi	Proizvajalec
Zmes placebo	/	Laktoza, mikrokristalna celuloza, povidon	Lek, Ljubljana, Slovenija
Tolura 80 mg, tablete	Telmisartan	Povidon, meglumin, NaOH, laktoza monohidrat, sorbitol, magnezijev stearat	Krka, Novo mesto, Slovenija
NovoNorm 2 mg, tablete	Repaglinid	Mikrokristalna celuloza, brezvodni kalcijev hidrogenfosfat, koruzni škrob, polakrilin kalij, povidon, 85 % glicerol, magnezijev stearat, meglumin, poloksamer, rdeči železov oksid	Novo nordisk, Bagsværd, Danska
Movalis 15 mg/1,5 ml, raztopina za injiciranje	Meloksikam	meglumin, glikofurol, poloksamer 188, NaCl, glicin, NaOH, voda za injicije	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Nemčija

3.1.4 Naprave in pribor

Kromatografski sistem (HPLC):

Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA). Omogoča delo pri visokem tlaku, do 600 bar. Opremljen je z binarno črpalko za mešanje pri visokem tlaku, termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom, termostatiranim prostorom za kolono ter z detektorjem na diodni niz. Uporabljali smo programsko opremo Dionex Chromeleon 7.1.

Kromatografske kolone:

Kinetex 2,6 µm C18 100×4,6 mm (Phenomenex, Kalifornija, ZDA)

Accucore 2,6 µm C18 100×4,6 mm (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA)

UV-VIS spektrofotometer: Varian Cary 50 UV-VIS spectrophotometer (Varian, Kalifornija, ZDA). Opremljen je s črpalko za termostatiranje vzorcev in omogoča merjenje absorbance pri povišani temperaturi.

pH meter: MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)

Analitska tehtnica: AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)

Ultrazvočna kad: Sonis 4 GT (Iskra PIO d.o.o., Slovenija)

Sušilnik: UFE 500 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)

Hladilnik in zamrzovalnik: HZS156 RF3183 (Gorenje, Slovenija)

Magnetno mešalo z grelcem in sondo za merjenje temperature: IKA RET CV (IKA, Staufen, Nemčija)

Ročni stiskač za vialo z 20 mm pokrovom (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA)

Ročni odpiralnik za vialo z 20 mm pokrovom (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA)

Viale "headspace" 10 ml za stiskanje (Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA)

Aluminijasti pokrovi za stiskanje, 20 mm (Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA)

Polavtomatske pipete: 100-1000 μ L in 1-5 ml (Brand, Westheim, Nemčija)

Viale z navojem 2 ml (Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA)

Modri pokrovi z navojem, 11 mm, PTFE/s (Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA)

Filtri za vzorce: MiniSart RC25 17765, 0,45 μ m (Sartorius, Goettingen, Nemčija)

Igle: 0,90·40 mm, 20G·1,5 (B. Braun, Melsungen, Nemčija)

Plastične brizge: Braun injekt 5 ml Luer solo (B. Braun, Melsungen, Nemčija)

Steklovina: merilne bučke, merilni valji, lij, čaše, brizga, kiveta

Ostalo: nastavki za pipete, spatule, žlice, grob filter papir, terilnica, pestilo, tehtalni čolnici

3.2 METODE

3.2.1. Priprava mobilne faze, pufrov, reagentov in standardov

Mobilna faza A

Za pripravo 1 l 0,05 % raztopine TFA smo 500 µl trifluoroocetne kisline odpipetirali v 1 l ultračiste vode ter dobro premešali.

Osnovna raztopina standardov različnih aminosladkorjev (meglumin, *N*-etil glukamin, glukamin, glukozamin)

Za pripravo 20 ml osnovne raztopine s koncentracijo 2 mg/ml smo natehtali 40 mg meglumina, ga kvantitativno prenesli v 20 ml bučko in dopolnili do oznake z ultračisto vodo. Pripravljeno raztopino smo shranjevali v hladilniku.

Enak postopek smo uporabili tudi za pripravo raztopin *N*-etil glukamina, glukamina in glukozamina.

Delovne raztopine standardov različnih aminosladkorjev (meglumin, *N*-etil glukamin, glukamin, glukozamin)

Za pripravo 20 ml delovne raztopine s koncentracijo 0,1 mg/ml smo 1 ml osnovne raztopine standarda meglumina odpipetirali v 20 ml bučko in dopolnili do oznake z ultračisto vodo.

Na enak način smo pripravili tudi raztopine *N*-etil glukamina, glukamina in glukozamina.

Delovna raztopina NQS

Za pripravo 10 ml delovne raztopine s koncentracijo 3 mg/ml smo natehtali 30 mg NQS, ga kvantitativno prenesli v 10 ml bučko in dopolnili do oznake bodisi z MeOH ali ultračisto vodo*. Pripravljeno raztopino smo postavili v ultrazvočno kad za 5 minut.

* Opomba: Za poskuse derivatizacije pri povišani temperaturi smo NQS raztopili v MeOH, za reakcije pri sobni temperaturi pa v ultračisti vodi.

Boratni pufer (25 in 100 mM, pH 8, 10, 12)

Za pripravo 50 ml 25 mM boratnega pufra smo natehtali 0,475 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, ga kvantitativno prenesli v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z ultračisto vodo. Pripravljeno raztopino smo umerili na pH = 8,0 s postopnim dodajanjem 10 % vodne raztopine H_3PO_4 .

Za pripravo pufra z vrednostima pH = 10,0 in pH = 12,0 smo uporabili enak postopek priprave, le da smo pH umerili s postopnim dodajanjem 1 M raztopine NaOH.

Za pripravo 50 ml 100 mM boratnega pufra s pH = 8,0 smo natehtali 1,90 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, nadalje pa smo postopali tako kot prej.

Karbonatni pufer (50 mM, pH 9, 10, 12)

Za pripravo 100 ml 50 mM karbonatnega pufra smo natehtali 0,420 g NaHCO_3 , ga kvantitativno prenesli v 100 ml bučko in dopolnili do oznake z ultračisto vodo. Pripravljeno raztopino smo nato umerili na pH vrednosti 9,0, 10,0 in 12,0 s postopnim dodajanjem 1M raztopine NaOH.

Fosfatni pufer (50 mM, pH 12)

Za pripravo 50 ml 50 mM fosfatnega pufra smo natehtali 0,445 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ga kvantitativno prenesli v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z ultračisto vodo. Raztopino smo postavili v ultrazvočno kad za 5 minut, nato pa ji s postopnim dodajanjem 1 M NaOH umerili pH na vrednost 12,0.

Fosfatni pufer (50 in 100 mM, pH 3)

Za pripravo 50 ml 50 mM fosfatnega pufra smo natehtali 0,300 g NaH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z ultračisto vodo. Pripravljeno raztopino smo umerili na pH = 3,0 s postopnim dodajanjem 10 % vodne raztopine H_3PO_4 .

Za pripravo 50 ml 100 mM fosfatnega pufra pa smo natehtali 0,600 g NaH_2PO_4 , v nadaljevanju pa postopali tako, kot je opisano zgoraj.

Vse delovne raztopine in pufre smo pripravljali dnevno sveže.

3.2.2 UV-VIS spektrofotometrija (metoda S1)

Priprava reakcijske zmesi

V 10 ml vialo smo odpipetirali 1 ml delovne raztopine meglumina, 4 ml 100 mM boratnega pufra s pH = 8,0 in 1 ml delovne raztopine NQS. Nato smo alikvot te zmesi iz vialo pretočili v kiveto in jo vstavili v UV-VIS spektrofotometer.

Sistem za ogrevanje kivete

V dvolitrsko čašo smo natočili prečiščeno vodo in jo na grelniku segreti na predpisano temperaturo. V čašo smo potopili črpalko, ki je preko gumijaste cevke črpala ogrevano vodo v neposredno okolico kivete.

Merjenje kinetike reakcije

Kinetiko reakcije smo merili s programsko opremo Kinetics 3.0. V Preglednici VI so prikazani parametri metode S1.

Preglednica VI: Parametri metode S1, uporabljeni pri merjenju kinetike reakcije.

Valovna dolžina	484 nm
Povprečni interval merjenja absorbance	0,100 s

3.2.3 Derivatizacija v 10 ml viali (metoda D1)

Priprava reakcijske zmesi

Glede na število načrtovanih vzorcev v danem poskusu smo v bučko ustrezne velikosti odpipetirali ustrezne volumne delovne raztopine meglumina, bazičnega pufru in delovne raztopine NQS v volumskem razmerju 1:4:1. Po kratkem mešanju v bučki smo v vsako od 10 ml vial odpipetirali po 6 ml tako pripravljene raztopine. Viale smo zaprli z aluminijastimi pokrovi s pomočjo ročnega stiskača.

Derivatizacija pri povišani temperaturi

Viale z reakcijskimi zmesmi smo prenesli v sušilnik, segret na predpisano temperaturo za vsak uporabljeni čas derivatizacije. Ob predpisanih časovnih intervalih smo jih vzeli iz sušilnika in jih ohladili v vodni kopeli do sobne temperature. Nato smo jim s stekleno brizgo dodali 4 ml fosfatnega pufru** s pH = 3,0. Viale smo nato spravili v hladilnik. Ko so se ohladile, smo jih odprli z ročnim odpiranjem, s plastičnimi brizgami odvzeli alikvotne reakcijskih zmesi, jih filtrirali skozi 0,45 µm filter in prenesli v 2 ml vial z navojem. Na kolono smo injicirali po 10 µL vsakega vzorca.

****Opomba:** 100 mM fosfatni pufer s pH = 3,0 smo uporabljali za nakisanje reakcijskih zmesi, pri katerih smo kot bazični pufer uporabili 25 mM boratni pufer. V ostalih primerih pa smo v ta namen uporabili 50 mM fosfatni pufer s pH = 3,0.

Derivatizacija pri sobni temperaturi

Pri izvajanju reakcij pri sobni temperaturi vial nismo dajali v sušilnik, zato jih ni bilo potrebno ohlajati v vodni kopeli. Ob predpisanih časovnih intervalih smo reakcijskim zmesem dodali kisli pufer. Postopek je bil v nadaljevanju enak kot v prejšnjem primeru.

3.2.4 Derivatizacija v igli avtomatskega injektorja (metoda D2)

Priprava raztopin

Z brizgo smo iz bučke odvzeli alikvot delovne raztopine standarda aminosladkorja ali ustreznega vzorca, ga filtrirali skozi 0,45 μ m filter in prenesli v 2 ml vialo z navojem.

Enak postopek smo uporabili tudi za delovno raztopino NQS, bazični pufer in 50 mM fosfatni pufer s pH = 3,0.

Derivatizacija

Dvomililitrske viale delovne raztopine standarda aminosladkorja ali ustreznega vzorca, delovne raztopine NQS ter bazičnega in kislega pufra smo postavili na ustrezna mesta za injiciranje. Derivatizacijo v igli injektorja smo izvedli po protokolu UDP. Najprej avtomatski sistem zmeša vzorec ali standard aminosladkorja, NQS in bazični pufer. Zatem v igli steče reakcija derivatizacije, ki poteka predpisan čas (čakalni čas). Ko ta poteče, avtomat reakcijski zmesi doda kisli pufer, s katerim nevtraliziramo pH reakcijske zmesi, ki se nato injicira na kolono. UDP, ki smo ga uporabljali pri naši metodi, je natančno opisan v Prilogi. Derivatizacija je potekala pri sobni temperaturi.

3.2.5 Razvojna metoda HPLC (metoda K1)

Za merjenje odzivov smo uporabili sistem HPLC z detektorjem na diodni niz. Ločevanje analitov smo izvedli na koloni Kinetex 2,6 μ m C18 100 \times 4,6 mm, pri temperaturi 30 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz raztopine A (0,05 % TFA) in raztopine D (100 % MeCN). Pretok mobilne faze je bil 1,0 ml/min. Uporabili smo gradientni program elucije, ki je predstavljen v Preglednici VII. Analite smo detektirali pri valovni dolžini 278 nm.

Volumen injiciranja reakcijske zmesi je bil 10 μL , volumen vzorca pa 1 μL . Za spiranje injektorja smo uporabili 20 % raztopino MeCN v ultračisti vodi.

Preglednica VII: Gradientni program razvojne metode HPLC.

Čas (min)	% D (MeCN)
-4,0	7,5
0,0	7,5
5,0	7,5
14,0	90,0
14,5	100
16,5	100
17,0	7,5
20,0	7,5

3.2.6 Končna metoda HPLC (metoda K2)

Pri končni metodi HPLC je ločevanje analitov potekalo na koloni Accucore 2,6 μm C18 100 \times 4,6 mm. Uporabili smo gradientni program elucije, ki ga v celoti predstavljamo v Preglednici VIII. Vsi ostali parametri so bili enaki kot pri razvojni metodi HPLC.

Preglednica VIII: Gradientni program končne metode HPLC.

Čas (min)	% D (MeCN)
-4,0	6,0
0,0	6,0
5,0	6,0
7,0	100
9,0	100
9,5	6,0
10,0	6,0

3.2.7 Validacija metode

Postopki in pogoji derivatizacije, ki smo jih uporabili pri validaciji metode, so navedeni v Preglednici IX.

Preglednica IX: Metode in pogoji derivatizacije uporabljene pri validaciji metode.

Temperatura derivatizacije	sobna
Bazični pufer	fosfatni (50 mM, pH = 12,0)
Kisli pufer	fosfatni (50 mM, pH = 3,0)
Čas derivatizacije (čakalni čas v UDP)	120 s
Metoda derivatizacije	D2
Kromatografska metoda	K2

3.2.7.1 Selektivnost

Priprava zmesi meglumina, glukamina in glukozamina

V 20 ml bučko smo odpipetirali po 1 ml osnovne raztopine meglumina, glukamina in glukozamina ter dopolnili do oznake z ultračisto vodo.

Priprava zmesi meglumina in *N*-etil glukamina

V 20 ml bučko smo odpipetirali po 1 ml osnovne raztopine meglumina in *N*-etil glukamina ter dopolnili do oznake z ultračisto vodo.

Vrednotenje selektivnosti

Selektivnost metode je njena zmožnost določanja preiskovanega analita ob prisotnosti drugih spojin v vzorcu. Selektivnost naše metode smo vrednotili tako, da smo zaporedno posamično injicirali raztopino sorodnega aminosladkorja, nato pa še zmes sorodnega aminosladkorja in meglumina. Metodo smo vrednotili kot selektivno, če se kromatograma sorodnega aminosladkorja in zmesi sorodnega aminosladkorja ter meglumina nista prekrivala v območju elucije produkta derivatizacije meglumina (PDM).

3.2.7.2 Linearnost

Priprava raztopin standarda meglumina s koncentracijami 25 - 200 µg/ml

Delovne raztopine z ustreznimi koncentracijami meglumina smo pripravili tako, da smo ustrezne volumne njegove osnovne raztopine odpipetirali v 10 ml bučke in jih dopolnili do oznak z ultračisto vodo.

Vrednotenje linearnosti

Linearnost metode je njena sposobnost, da v določenem območju daje odzive, ki so (premo)sorazmerni koncentraciji proučevanega analita.

Linearnost naše metode smo ovrednotili tako, da smo injicirali raztopine meglumina s koncentracijami od 25 - 200 µg/ml in izmerili odzive. Izmerjene vrednosti smo nanegli na graf odvisnosti odzivov od koncentracije meglumina. S pomočjo linearne regresije smo v programu Microsoft Excel določili enačbo premice $odziv = kc+n$. Korelacijo med koncentracijo meglumina in odzivom smo podali v obliki determinacijskega koeficienta (R^2).

Vsako koncentracijo meglumina smo injicirali trikrat. Vrednosti RSD odzivov za vsako posamezno koncentracijo smo izračunali z Enačbo 1.

$$RSD(\%) = \frac{SD}{povprečna\ vrednost} * 100$$

Enačba 1

3.2.7.3 Točnost in natančnost

Priprava standardov meglumina z zmesjo placebo

Točno smo natehtali približno predpisano količino meglumina (Preglednica X) in 500 mg zmesi placebo ter ju kvantitativno prenesli v 25 ml bučko. Dodali smo 20 ml 0,05 % raztopine TFA in bučko za 10 minut postavili v ultrazvočno kad. Nato smo vsebino bučke ohladili na sobno temperaturo, jo dopolnili z 0,05 % raztopino TFA do oznake in dobro premešali. Vsebino smo prefiltrirali skozi grob filter papir. En ml prefiltrirane raztopine smo odpipetirali v 10 ml bučko in dopolnili do oznake z mobilno fazo. Za vsako koncentracijsko območje smo pripravili po 3 vzorce, torej skupno 9. Deseti placebo vzorec smo pripravili na enak način, le da ni vseboval meglumina.

Preglednica X: Predpisane natehte meglumina za posamezno koncentracijsko območje.

	Koncentracijsko območje meglumina		
Vzorec	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml
	Zahtevana natehta meglumina (mg)		

1, 2, 3	12,5	25	37,5
---------	------	----	------

Priprava umeritvenega in kontrolnega standarda meglumina

Točno smo natehtali približno 25 mg meglumina, ga kvantitativno prenesli v 25 ml bučko in dopolnili do oznake z 0,05 % raztopino TFA. En ml te raztopine smo nato odpipetirali v 10 ml bučko in dopolnili do oznake z mobilno fazo.

Vrednotenje točnosti

Točnost metode je stopnja ustreznosti merjene ali izračunane količine glede na njeno dejansko vrednost. Točnost naše metode smo ovrednotili tako, da smo jo izračunali na dva načina za vseh devet vzorcev. V prvem primeru smo uporabili odzive razpadnega produkta naftokinonsulfonata št. 1 (AUC NQS RP1) za interni standard in koncentracije meglumina v vzorcih izračunali z Enačbo 2, v drugem primeru pa smo to storili z Enačbo 3 (brez uporabe AUC NQS RP1). Izračunano koncentracijo meglumina smo nato uporabili v Enačbi 4 za izračun točnosti. Na koncu smo povprečili izračunane točnosti za vsako posamezno koncentracijsko območje.

$$C_{izrač1} = \frac{C_{kal. st.} * \frac{AUC PDM vzorec}{AUC NQS RP1 vzorec}}{\frac{AUC PDM kal. st. povpr.}{AUC NQS RP1 kal. st. povpr.}}$$

Enačba 2

$$C_{izrač2} = \frac{C_{kal. st.} * AUC PDM vzorec}{AUC PDM kal. st. povpr.}$$

Enačba 3

$$Točnost (\%) = \frac{C_{izrač1,2}}{C_{teoretična}} * 100$$

Enačba 4

Vrednotenje natančnosti

Natančnost metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijami analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Natančnost naše metode smo ovrednotili tako, da smo uporabili izračunane točnosti vseh devetih vzorcev za izračun RSD z Enačbo 1.

3.2.8 Analiza vzorcev

Za analizo vzorcev zdravil smo uporabili enake postopke in pogoje derivatizacije kot pri validaciji metode (Preglednica IX).

Postopek priprave umeritvenega in kontrolnega standarda meglumina je bil enak kot pri vrednotenju točnosti in ponovljivosti metode.

Priprava vzorcev

Tolura 80 mg, tablete

V terilnici smo s pestilom zdrobili 10 tablet do homogenega prahu, ki smo ga nato točno zatehtali približno 460 mg, ga kvantitativno prenesli v 25 ml bučko, mu dodali 20 ml 0,05 % raztopine TFA in bučko postavili za 10 minut v ultrazvočno kad. Vsebino bučko smo ohladili, jo dopolnili z 0,05 % raztopino TFA do oznake in dobro premešali. Zmes smo prefiltrirali skozi grob filter papir, 1 ml prefiltrirane raztopine odpipetirali v 10 ml bučko ter jo dopolnili do oznake z mobilno fazo. Za meritve smo pripravili šest paralelek.

Novonorm 2 mg, tablete

Zatehtali smo tri tablete ter jih prenesli v 25 ml bučko. Dodali smo jim 20 ml mobilne faze in bučko postavili za 10 minut v ultrazvočno kad. Vsebino bučke smo ohladili, jo dopolnili z mobilno fazo do oznake in dobro premešali. Na koncu smo raztopino prefiltrirali skozi grob filter papir. Za meritve smo pripravili dve paralelki.

Movalis 15 mg/1,5 ml, raztopina za injiciranje

Iz ampule smo odpipetirali 1 ml raztopine zdravila v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z mobilno fazo. Pripravili smo dve paralelki.

Izračun vsebnosti meglumina v vzorcu zdravila

Maso meglumina v posameznem vzorcu smo izračunali z Enačbo 5, pri čemer smo upoštevali faktor redčenja za vsako posamezno zdravilo (Preglednica XI).

$$m_{meg. \text{ izrač.}} = \frac{m_{kal. \text{ st.}} * \frac{AUC \text{ PDM}_{\text{ vzorec}}}{AUC \text{ NQS RP1}_{\text{ vzorec}}}}{\frac{AUC \text{ PDM}_{\text{ kal. st. povpr.}}}{AUC \text{ NQS RP1}_{\text{ kal. st. povpr.}}} * \text{faktor redčenja}}$$

Enačba 5

Preglednica XI: Faktorji redčenja za izračun mase meglumina v vzorcih posameznih zdravil.

Zdravilo	Faktor redčenja
Tolura 80 mg, tablete	1
Novonorm 2 mg, tablete	10
Movalis 15 mg/1,5 ml, raztopina za injiciranje	5

Izračun vsebnosti meglumina na odmerno enoto

Vsebnosti meglumina na odmerno enoto smo za zdravila Tolura in Novonorm izračunali s pomočjo Enačbe 6, za zdravilo Movalis pa z Enačbo 7. Za maso odmerne enote v enačbi 6 smo upoštevali povprečno maso desetih zatehtanih tablet. Volumen odmerne enote, ki smo ga uporabili v Enačbi 7 pa je bil 1,5 ml. Vrednost RSD izračunanih vsebnosti meglumina za zdravilo Tolura smo izračunali z Enačbo 1.

$$Vsebnost(mg) = \frac{m_{\text{ meg.izrač.}} * m_{\text{ odmerne enote}}}{m_{\text{ natehte}}}$$

Enačba 6

$$Vsebnost(mg) = \frac{m_{\text{ meg.izrač.}} * V_{\text{ odmerne enote}}}{V_{\text{ odvzet}}}$$

Enačba 7

Izračun molarne razmerja med učinkovino in megluminom

Molarno razmerje med učinkovino in megluminom v posameznem zdravilu smo izračunali z Enačbo 8. Za maso zdravilne učinkovine smo upoštevali njeno deklarirano maso v zdravilu, za maso meglumina pa smo upoštevali povprečje izračunane vsebnosti meglumina iz Enačbe 6 oziroma 7.

$$\text{Molarno razmerje: } \frac{m_{ZU} * M_{meglumin}}{M_{ZU} * m_{meglumin}}$$

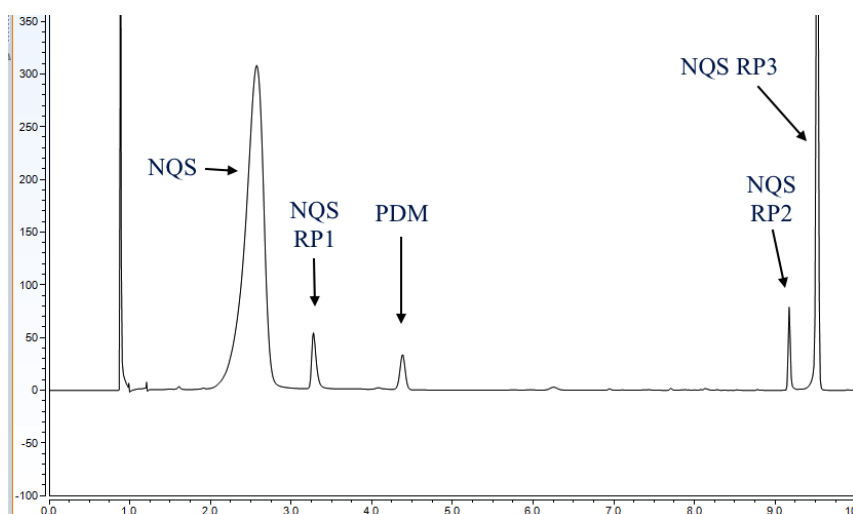
Enačba 8

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAZVOJ METODE HPLC

4.1.1 Razvojna metoda HPLC (metoda K1)

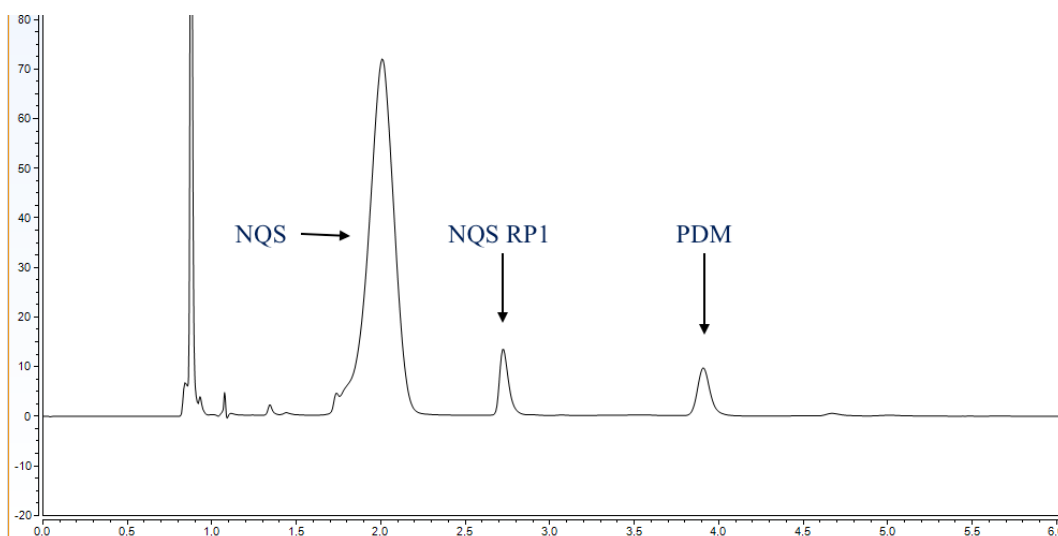
Za vodno komponento mobilne faze smo izbrali 0,05 % raztopino TFA, ki nam je zagotavljala kisel pH in ozke vrhove na kromatogramu. NQS je namreč kislina, meglumin pa po derivatizaciji izgubi svoj bazičen značaj, zato sta v kislem okolju obe spojini v neionizirani obliki in se tako bolje zadržujeta na reverznofazni koloni. Dodatna prednost TFA je v tem, da je pri sobni temperaturi v tekočem stanju, zato mobilne faze ni potrebno filtrirati. Pri izbiri organske komponente mobilne faze smo preskusili MeOH in MeCN. Sprva smo uporabili 10 % MeCN v začetnem izokraskem delu metode, kjer smo dobili ločene vrhove NQS, NQS RP1 in PDM, vendar pa so bili ti v teh pogojih razmeroma blizu skupaj. Zato smo se odločili, da zmanjšamo delež MeCN na 7,5 %, s čimer smo ločbo še izboljšali, obenem pa se čas izvedbe kromatografske metode ni bistveno podaljšal. Nato smo preskusili še 10 % MeOH, prav tako v začetnem izokraskem delu metode, vendar pa je bila ločba v teh pogojih zelo slaba, saj so se skoraj vse komponente eluirale z vrhom topila. Zato smo se odločili, da bomo za organsko komponento mobilne faze uporabili MeCN, s 7,5 % deležem v izokraskem delu metode. Za spremljanje stabilnosti NQS in nastajanja njegovih razpadnih produktov smo po eluciji PDM uporabili gradient s postopnim naraščanjem deleža acetonitrila. Slika 4 prikazuje primer kromatograma razvojne metode HPLC.



Slika 4: Kromatogram razvojne metode HPLC z označenimi vrhovi posameznih spojin.

4.1.2 Končna metoda HPLC (metoda K2)

Pred končnim vrednotenjem metode smo morali zamenjati kolono zaradi kontaminacije. Zaradi krajšega zadrževanja analitov na novi koloni, smo zmanjšali delež MeCN v izokratskem delu metode na 6 %. Hkrati smo v gradientnem delu povečali naklon gradienta MeCN in na ta način skrajšali čas metode, saj nas nastajanje razpadnih produktov NQS ni več zanimalo, ker smo imeli v tej fazi že določene vse pogoje derivatizacije. Slika 5 prikazuje primer kromatograma dobljenega s končno metodo HPLC.

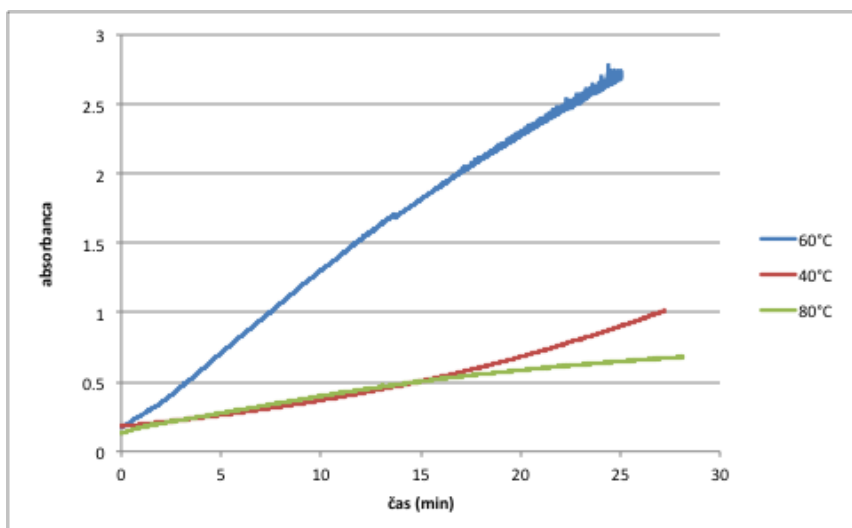


Slika 5: Kromatogram končne metode HPLC z označenimi vrhovi posameznih spojin.

4.2 ISKANJE OPTIMALNIH POGOJEV DERIVATIZACIJE MEGLUMINA Z NQS

4.2.1 Spremljanje nastajanja PDM z metodo S1

Z neprekinjenim merjenjem absorbance skozi čas pri valovni dolžini 484 nm, kjer ima PDM enega izmed absorpcijskih vrhov, smo želeli spremljati njegovo nastajanje ter tako oceniti, kateri pogoji so najprimernejši za derivatizacijo meglumina. Poskuse smo izvajali z metodo S1 pri temperaturah 40, 60 in 80 °C.



Slika 6: Vrednosti absorbance v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (100 mM boratni pufer, pH = 8).

Kot vidimo na Sliki 6, smo po 25 minutah najvišjo absorbanco izmerili pri temperaturi 60 °C, najnižjo pa pri 80 °C. Različni obliki krivulj pri 40 in 80 °C in nepričakovane vrednosti izmerjenih absorbanc kažejo na to, da pri valovni dolžini 484 nm ne absorbira samo PDM, temveč tudi nekatere druge spojine, prisotne v reakcijski zmesi, katerih koncentracija pa se s časom derivatizacije spreminja. Sprva smo sumili, da gre za stranske produkte derivatizacije meglumina, s pomočjo kasnejših poskusih pa ugotovili, da gre za NQS in njegov razpadni produkt št. 3 (NQS RP3). Zaradi tega je bilo spremljanje kinetike derivatizacije z UV-VIS spektrofotometrijo oteženo, saj ni ustrezne valovne dolžine, pri kateri bi lahko selektivno spremljali le nastajanje PDM .

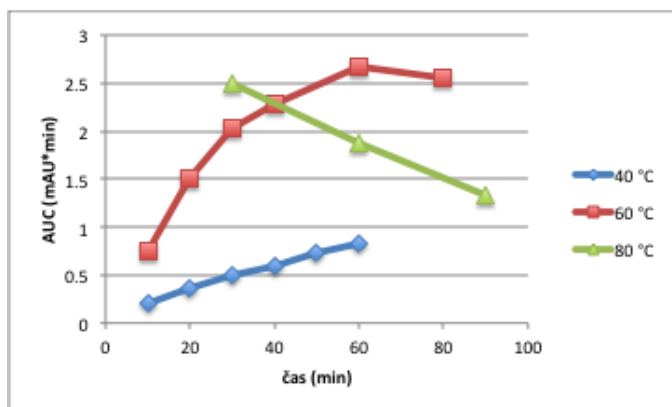
Zato smo se odločili, da bomo nastajanje PDM spremljali s kromatografijo. Poskus smo ponovili z metodama D1 in K1, da bi ugotovili, kaj se dogaja med derivatizacijo pri teh pogojih. Pri 80 °C sta tako PDM kot predvsem NQS nestabilna (Sliki 7 in 13) zato hitro razpadeta. NQS razpade v NQS RP1, NQS RP2 in NQS RP3, pri čemer za razliko od NQS RP3, NQS RP1 in NQS RP2 ne absorbirata pri 484 nm, zaradi česar smo z metodo S1 izmerili nižje vrednosti absorbanc pri 80 °C. Pri 60 °C je bil PDM v boratnem pufru s pH = 8 dokaj stabilen, zato je s časom njegova koncentracija naraščala (Slika 7), obenem pa je NQS zaradi nižje temperature razpadal počasneje (Slika 13). Ker torej obe spojini absorbirata pri valovni dolžini 484 nm, so bile vrednosti izmerjenih absorbanc občutno višje. Pri 40 °C PDM nastaja počasneje (Slika 7), zato je bila absorbanca izmerjena v teh pogojih nizka. NQS pri tej temperaturi v boratnem pufru s pH = 8 razpada zanemarljivo počasi (Slika 13). Zavedati pa se moramo, da je bil v reakcijski zmesi NQS v 22-kratnem

množinskem prebitku glede na meglumin, zato je bilo spremljanje nastajanja PDM z metodo S1 tudi v tem primeru oteženo. Res je sicer, da je nastalo malo NQS RP3, pa vendarle dovolj, da je motil selektivno detekcijo PDM.

4.2.2 Spremljanje nastajanja PDM z metodama D1 in K1

Z metodo D1 smo izvedli serijo poskusov derivatizacije meglumina z NQS pri različnih temperaturah, časih ter prisotnostih različnih vrst pufov z različnimi vrednostmi pH. PDM smo detektirali s pomočjo metode K1. Cilj teh poskusov je bil najti pogoje reakcije, pri katerih bi PDM nastal hitro, obenem pa bi reakcija dosegla t.i. "plato", kar pomeni, da se po določenem času AUC PDM ne bi več bistveno spreminjal. V idealnem primeru si želimo, da bi reakcija potekla pri sobni temperaturi, saj bi lahko potem uporabili metodo D2, s katero derivatizacijo izvedemo avtomatsko v igli injektorja.

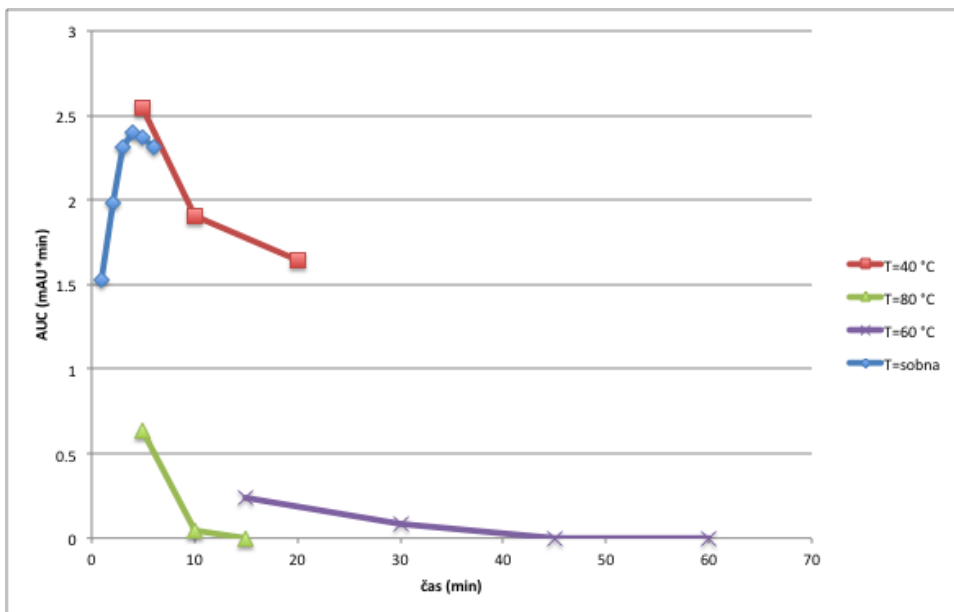
Sprva smo proučevali vpliv temperature na nastajanje PDM v boratnem pufru. Na Sliki 7 vidimo, da je bila najbolj optimalna temperatura 60 °C, saj je samo v tem primeru reakcija približno dosegla "plato", vendar šele po 60 minutah. Pri 80 °C je bil produkt že nestabilen, saj je začela s časom njegova koncentracija hitro upadati.



Slika 7: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (25 mM boratni pufer, pH = 8).

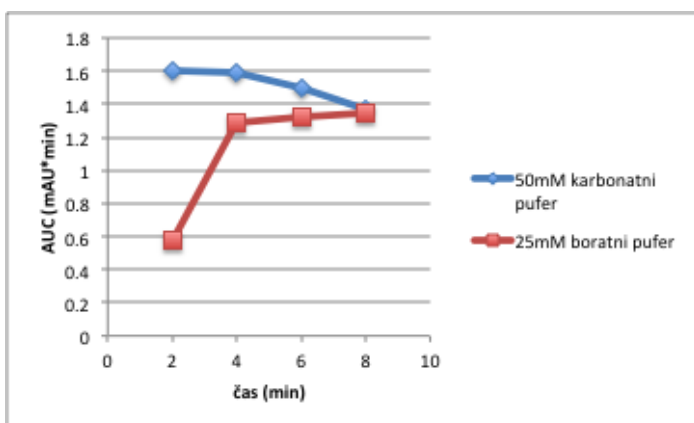
Drugačne rezultate smo dobili pri uporabi karbonatnega pufru (Slika 8). Reakcija je hitro potekla že pri sobni temperaturi. Z zviševanjem temperature pa se je povečevala nestabilnost PDM, saj je začela njegova koncentracija s časom hitro upadati. Za nadaljno optimizacijo postopka smo izbrali sobno temperaturo, ki nam omogoča izvajanje

derivatizacije z metodo D2, obenem pa v teh pogojih reakcija poteče hitro in doseže “plato”.



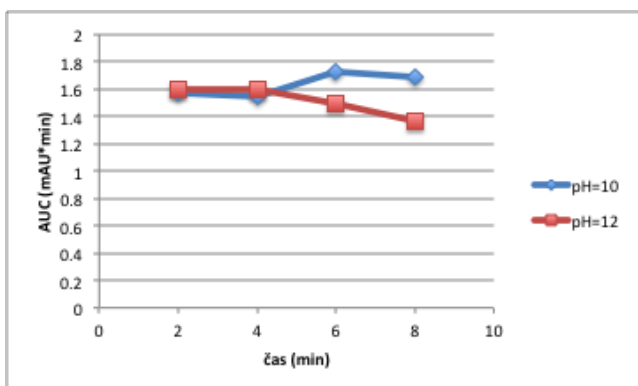
Slika 8: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (50 mM karbonatni pufer, pH = 10).

Nadalje smo želeli preveriti vpliv vrste uporabljenega pufera pri enakih pogojih. Derivatizacijo smo še naprej izvajali pri sobni temperaturi, pH vrednost obeh izbranih puferov pa smo uravnali na 12. Slika 9 kaže, da je PDM nastajal hitreje v karbonatnem pufru, zato smo ga izbrali za nadaljno optimizacijo.



Slika 9: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri uporabi različnih puferov (sobna temperatura, pH = 12).

Nazadnje smo preverili še vpliv pH vrednosti karbonatnega pufru. V začetnih minutah ni bilo bistvenih razlik v nastajanju PDM (Slika 10), zato smo se odločili, da bomo vpliv pH kasneje še enkrat proučili z metodama D2 in K1.



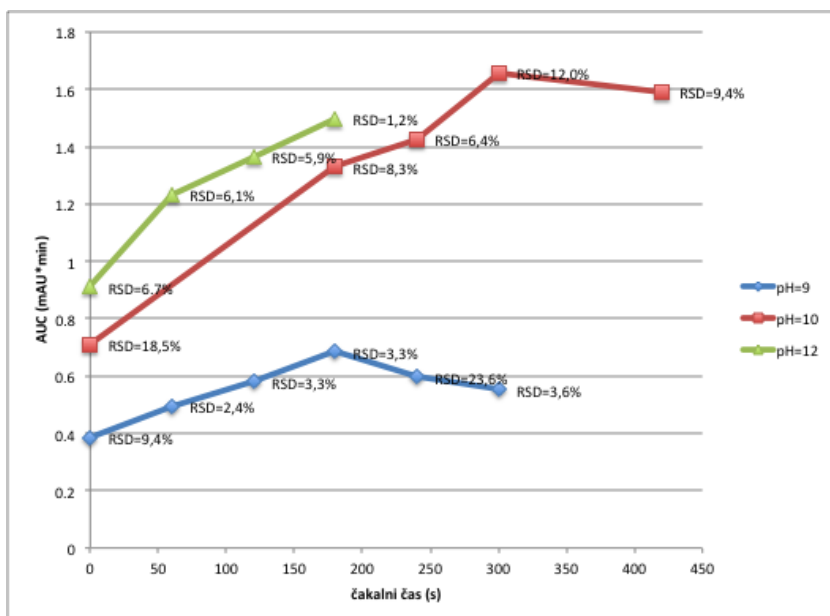
Slika 10: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od časa derivatizacije pri pH = 10 in pH = 12 (sobna temperatura, 50 mM karbonatni pufer).

Na Slikah 7-10 vidimo, da začnejo skoraj pri vseh krivuljah vrednosti AUC PDM upadati. Zato lahko sklepamo, da je PDM nagnjen k razpadu. Tako v prvi fazi reakcije nastane več produkta kot ga razpade, zato takrat vrednosti AUC PDM naraščajo. V drugi fazi, ko se skoraj ves meglumin že porabi, pa prevladuje razpad PDM, zato začnejo njegove vrednosti AUC počasi upadati. Pojav je bil še posebej opazen pri višjih temperaturah in v karbonatnem pufru. V idealnem primeru bi si želeli, da do tega ne bi prišlo, vendar pa smo morali sprejeti kompromis med hitrostjo nastajanja PDM in njegovo stabilnostjo.

Glede na predstavljene rezultate, smo se odločili, da bomo nadaljevali z optimizacijo derivatizacije v karbonatnem pufru pri sobni temperaturi z metodama D2 in K1.

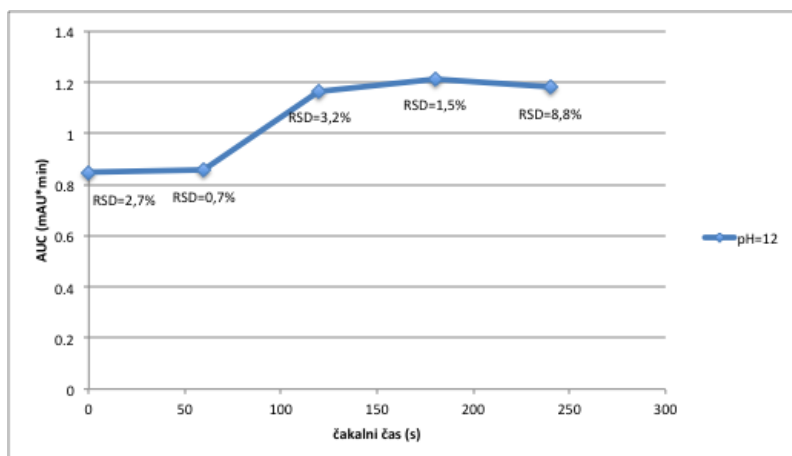
4.2.3 Spremljanje nastajanja PDM z metodama D2 in K1

Derivatizacijo smo izvajali v igli avtomatskega injektorja z metodo D2, PDM pa smo detektirali z metodo K1. Namen poskusov je bil proučitev vplivov različnih vrednosti pH karbonatnega pufru in čakalnega časa na vrednosti AUC PDM pri sobni temperaturi.



Slika 11: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od čakalnega časa pri različnih vrednostih pH (sobna temperatura, 50 mM karbonatni pufer).

Vidimo (Slika 11), da je PDM nastajal hitreje pri višjih pH vrednostih karbonatnega pufera. Pri vsakem pogoju (določena vrednost pH karbonatnega pufera z določenim čakalnim časom) smo trikrat zapored injicirali standard meglumina, saj smo želeli oceniti ponovljivost določanja AUC PDM. Na Sliki 11 je za vsak posamezen pogoj v obliki točk predstavljena povprečna vrednost AUC PDM, poleg te pa še RSD. Glede na visoke vrednosti RSD v nekaterih primerih, smo se odločili, da preskusimo še drugi bazični pufer. Izbrali smo fosfatnega, saj ima primerno pufrsko območje ($pK_a(\text{HPO}_4^{2-}) = 12,3$). Slika 12 prikazuje povprečne vrednosti AUC PDM pri enakih čakalnih časih in $\text{pH} = 12$ fosfatnega pufera, ki so približno za 10 % nižje kot pri uporabi karbonatnega, pri čemer pa so vrednosti RSD bistveno nižje. Zaradi tega smo ocenili, da je fosfatni pufer s $\text{pH} = 12$ primernejši za izvedbo derivatizacije, zato smo ga uporabili za vse nadaljne poskuse in validacijo metode. Za čakalni čas smo izbrali 120 sekund, kar je bil najboljši kompromis med izkoristkom reakcije ter hitrostjo metode.



Slika 12: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od čakalnega časa (sobna temperatura, 50 mM fosfatni pufer, pH = 12).

Na osnovi rezultatov poskusov smo sprva sklepali, da je ponovljivost določitve AUC PDM odvisna od vrste in vrednosti pH pufru ter čakalnega časa. Kasneje se je izkazalo, da so bile visoke vrednosti RSD pri izračunanih povprečjih AUC PDM predvsem posledica neponovljivosti avtomatskega injektorskega sistema, njihove razlike pri uporabi karbonatnega in fosfatnega pufru pa zgolj slučajne.

4.2.4 Ponovljivost derivatizacije z metodo D1

Zaradi težav s ponovljivostjo določanja AUC PDM z metodo D2, smo se odločili ponovljivost derivatizacije preveriti še z metodo D1, pri kateri smo derivatizacijo izvedli ročno s pipeto. Tako smo lahko ovrednotili vpliv avtomatskega injektorskega sistema na njeno ponovljivost. Derivatizacijo smo izvedli v treh paralelkah s karbonatnim in v petih paralelkah s fosfatnim pufrom pri sobni temperaturi. Odzive smo merili z metodo K1. Rezultati so predstavljeni v Preglednici XII.

Preglednica XII: Ponovljivost derivatizacije izvedene z metodo D1.

Pogoji derivatizacije			
50 mM karbonatni pufer, pH = 10, čas = 5 min		50 mM fosfatni pufer, pH = 12, čas = 3 min	
AUC PDM (mAU*min)	AUC NQS RP1 (mAU*min)	AUC PDM (mAU*min)	AUC NQS RP1 (mAU*min)
1,241	1,001	1,369	0,915

	1,262	0,988	1,412	0,933
	1,292	0,989	1,343	0,906
			1,391	0,925
			1,389	0,926
Povprečje	1,265	0,992	1,3808	0,921
RSD (%)	2,0	0,8	1,9	1,2

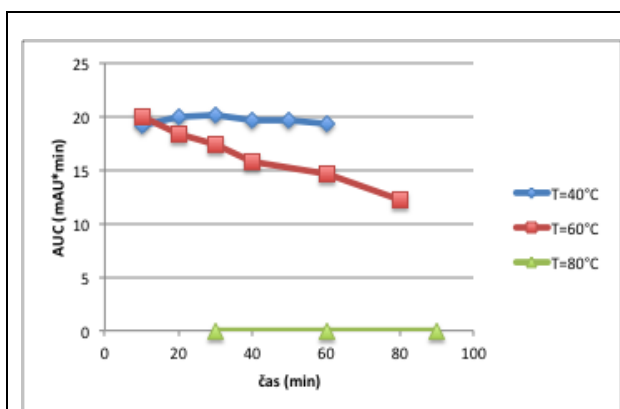
Vrednosti RSD za AUC PDM in NQS RP1 sta bili pri obeh pufrih nizki, zato sklepamo, da so bile visoke vrednosti RSD v prejšnjih poskusih, ki smo jih izvedli z metodo D2, posledica neponovljivosti avtomatskega injektorskega sistema. Na to nakazujeta tudi dva pojavi, ki smo ju opazili v kasnejših poskusih. Prvič, pri vrednotenju točnosti in natančnosti metode smo opazili, da vrednost AUC PDM močno korelira z AUC NQS RP1. Drugič, pri vrednotenju linearnosti metode, kjer so bile vrednosti RSD za povprečje AUC PDM pri posameznih koncentracijah standarda meglumina nizki, smo opazili, da so bile vrednosti RSD nizke tudi za AUC NQS RP1. Ponovljivost injektorskega sistema lahko torej posredno spremljamo s pomočjo vrednosti RSD za AUC NQS RP1. Moramo pa se zavedati, da lahko prihaja do neponovljivosti v kateremkoli koraku injekcijskega programa. Najbolj kritična za določanje AUC PDM sta odmerjanje in vmešanje meglumina in NQS v reakcijsko zmes, saj imata kot reaktanta največji vpliv na količino nastalega PDM. Problematična sta lahko tudi mešanje po dodatku kislega puфра in injiciranje zmesi na kolono. Teoretično lahko pride do neponovljivosti samo pri odmerjanju in vmešanju meglumina, kar seveda vpliva na vrednosti AUC PDM, napak v tej stopnji pa ne moremo nadzirati, saj meglumina ne moremo zaznati na detektorju. To težavo bi sicer lahko rešili z dodatkom internega standarda, vendar bi to terjalo ponovno optimizacijo metode HPLC, zato se za ta korak nismo odločili. Vsako večje odstopanje (RSD >3 %) pri vrednostih AUC PDM po več zaporednih injiciranjih standarda je torej najverjetneje posledica neponovljivosti injektorskega sistema.

4.3 STABILNOST NQS

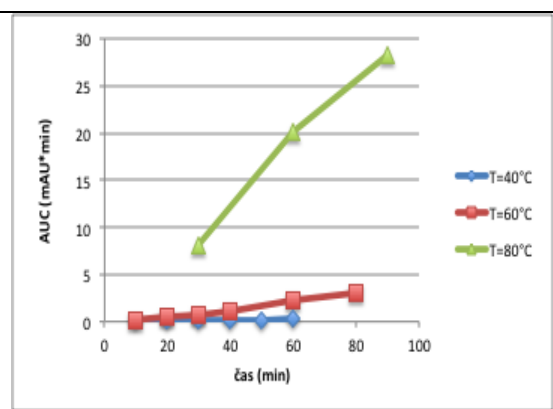
4.3.1 Stabilnost NQS v odvisnosti od temperature, pH, vrste puфра in časa derivatizacije

Z metodama D1 in K1 smo lahko poleg selektivnega spremljanja nastajanja PDM opazovali tudi stabilnost NQS ter nastajanje njegovih razpadnih produktov med derivatizacijo. Slike 13-18 prikazujejo rezultate tovrstnih poskusov.

Najprej smo proučili vpliv temperature na stabilnost NQS. Kot vidimo na Sliki 13, je bil ta pri 40 °C še stabilen, z višanjem temperature pa se je njegova nestabilnost povečevala. Obenem vidimo (Slika 14), da se je z višanjem temperature povečevala hitrost nastajanja NQS RP2.

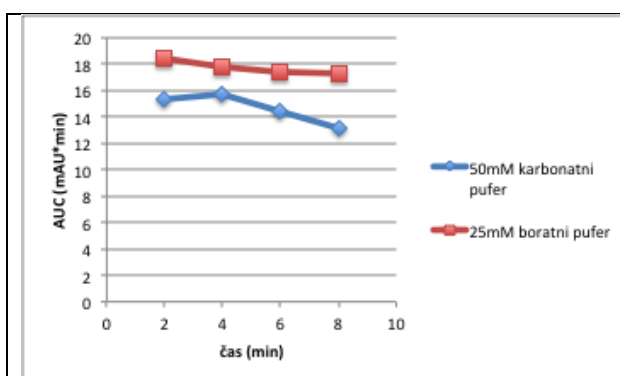


Slika 13: Vrednosti AUC NQS v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (25 mM boratni pufer, pH = 8).

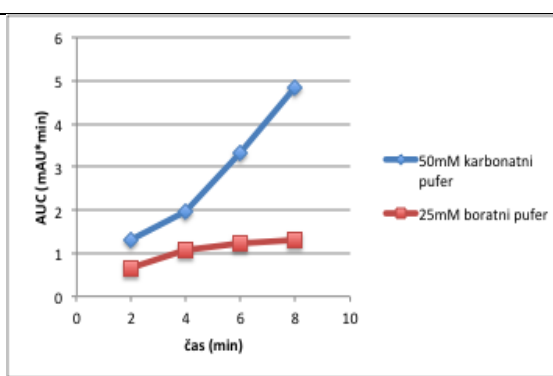


Slika 14: Vrednosti AUC NQS RP2 v odvisnosti od časa derivatizacije pri različnih temperaturah (25 mM boratni pufer, pH = 8).

Nato smo ocenili še vpliv vrste uporabljenega pufera na stabilnost NQS. Na Sliki 15 vidimo, da je bil NQS bolj stabilen v boratnem pufru, hitrost nastajanja NQS RP2 pa bistveno večja v karbonatnem pufru (Slika 16).

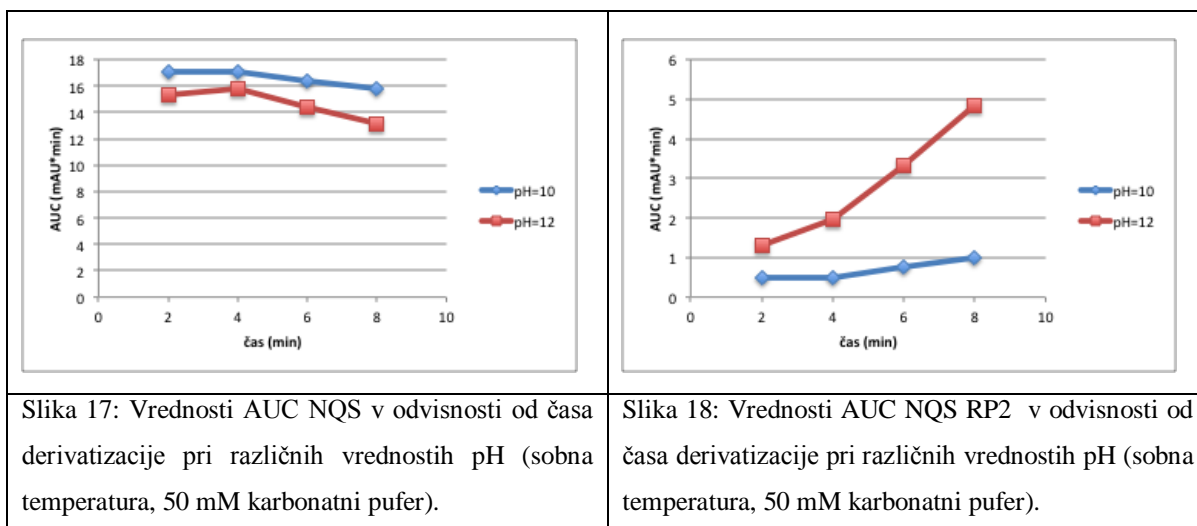


Slika 15: Vrednosti AUC NQS v odvisnosti od časa derivatizacije v različnih pufrih (sobna temperatura, pH = 12).



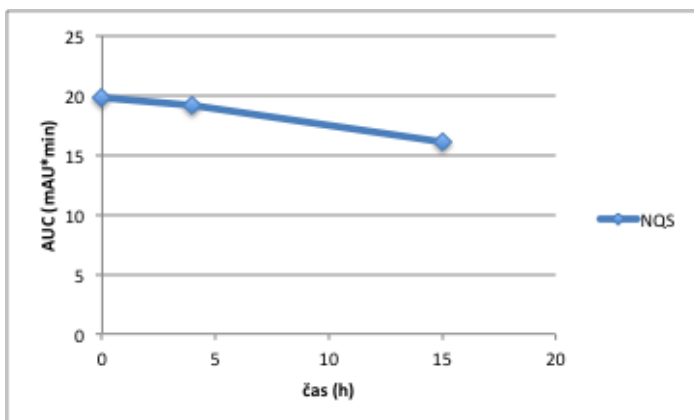
Slika 16: Vrednosti AUC NQS RP2 v odvisnosti od časa derivatizacije v različnih pufrih (sobna temperatura, pH = 12).

Na koncu smo preverili tudi vpliv različnih vrednosti pH na stabilnost NQS v karbonatnem pufru. Vidimo, da je bil NQS pri višjem pH bolj nestabilen, vendar pa so bile razlike minimalne (Slika 17). Obenem je pri višjem pH NQS RP2 nastajal hitreje (Slika 18).



4.3.2 Stabilnost NQS v vodi

Glede na to, da je zadosten prebitek NQS pomemben za potek derivatizacije, smo preverili njegovo stabilnost v vodi pri sobni temperaturi. Na ta način smo želeli ovrednotiti, koliko časa lahko uporabljamo delovno raztopino NQS, preden jo nadomestimo s sveže pripravljeno. Na kolono smo injicirali po 1 μ L delovne raztopine NQS, in sicer ob času 0, 4 in 15 h, od njene priprave. Odzive smo izmerili z metodo K1. Slika 19 prikazuje, da po štirih urah razpade 5 % NQS, po 15 urah pa 20 %. Zato smo sklenili, da bomo NQS pripravljali dnevno sveže pred vsako analizo.

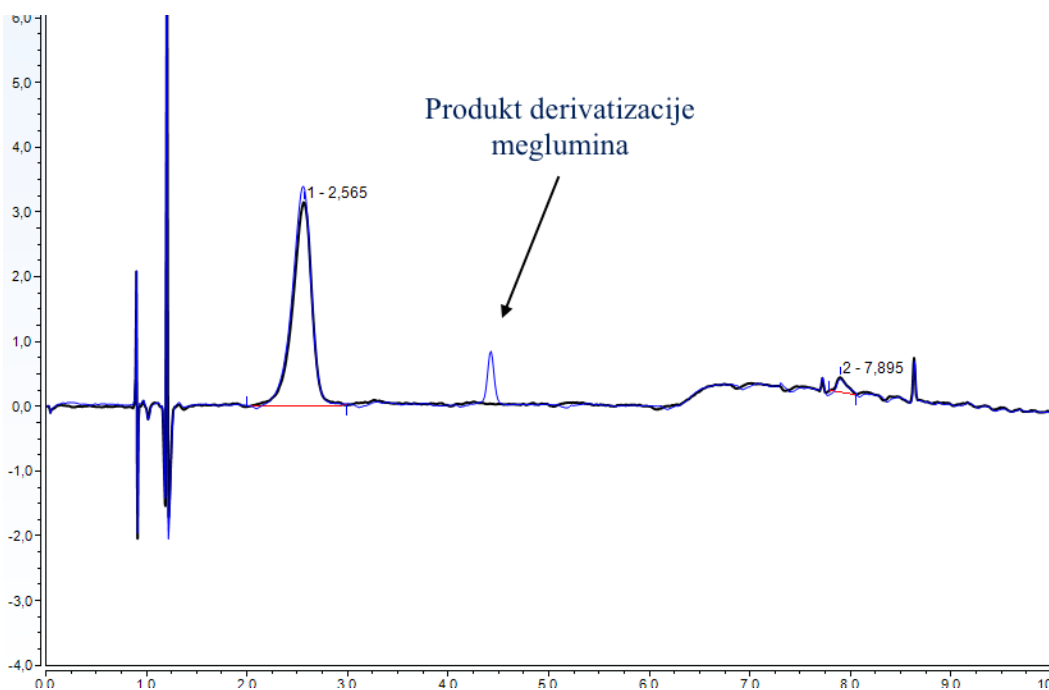


Slika 19: Vrednosti AUC NQS v odvisnosti od časa pri sobni temperaturi.

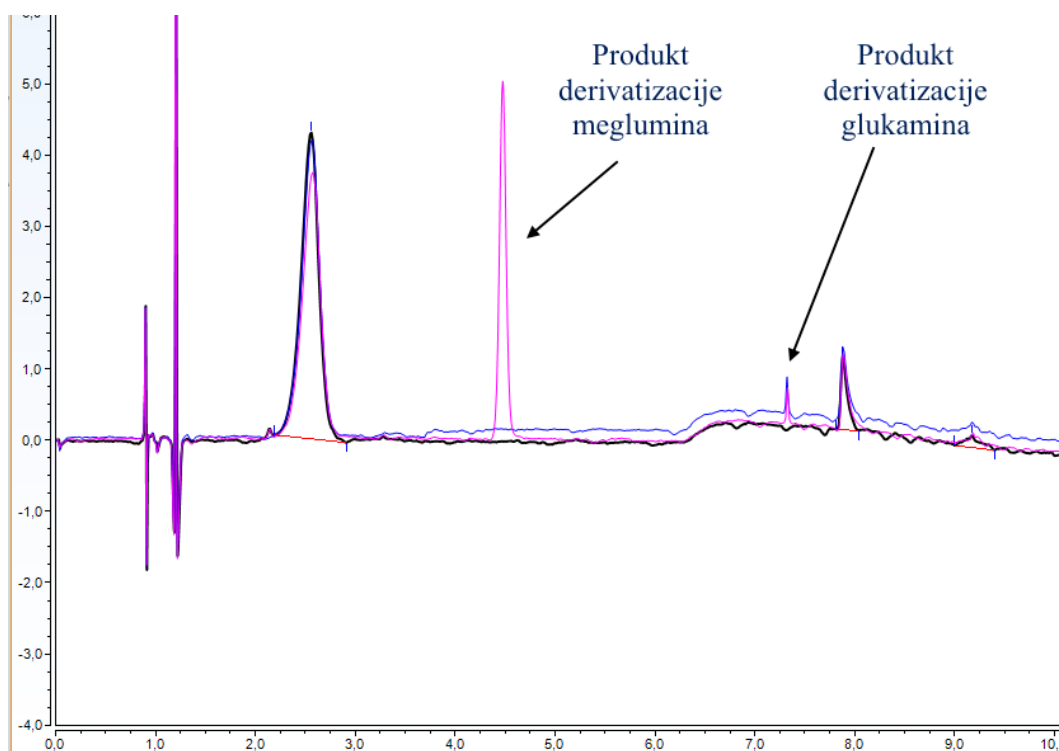
4.4 VALIDACIJA METODE

4.4.1 Selektivnost

Za vrednotenje selektivnosti metode smo izbrali tri aminosladkorje, ki so po svoji strukturi sorodni megluminu in bi zato lahko potencialno motili detekcijo PDM. Zanimalo nas je, ali reagirajo z NQS in kolikšni so retencijski časi njihovih derivatizacijskih produktov. Testirali smo glukozamin, glukamin ter *N*-etil glukamin. Na obeh kromatogramih, predstavljenih na Slikah 20 in 21 vidimo, da lahko z našo metodo selektivno določamo meglumin v prisotnosti vseh omenjenih aminosladkorjev. Glukozamin in *N*-etil glukamin nista reagirala z NQS v uporabljenih pogojih, medtem ko je glukamin reagiral, vendar pa v zelo majhnem obsegu. Obenem je bil retencijski čas njegovega produkta z NQS daljši. Pričakovali smo, da bo *N*-etil glukamin reagiral z NQS v podobnem obsegu kot meglumin, saj sta oba sekundarna amina, vendar pa temu ni bilo tako.



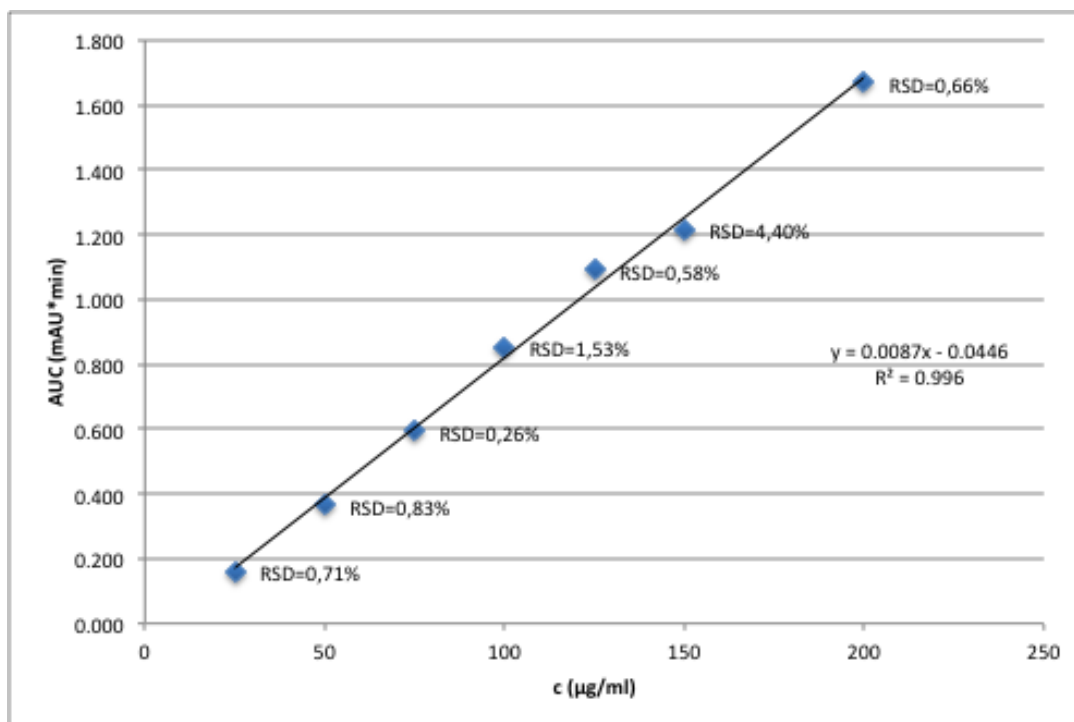
Slika 20: Prekrivajoča se kromatograma zmesi meglumina in *N*-etil glukamina (modra barva) ter samega *N*-etil glukamina (črna barva).



Slika 21: Prekrivajoči se kromatogrami zmesi meglumina, glukozamina in glukamina (vijolična barva), samega glukamina (modra barva) in samega glukozamina (črna barva).

4.4.2 Linearnost

Glede na namen uporabe naše metode, potrebnih količin reagentov in pufrov ter odzivov sistema HPLC smo se med njenim razvojem odločili, da bomo uporabljali tarčno koncentracijo meglumina 100 µg/ml. Linearnost metode smo zato preverjali v območju od 25 - 200 µg meglumina/ml. Pri koncentraciji 200 µg/ml je bila količina NQS še v zadostnem (11-kratnem) prebitku, da to ni vplivalo na potek reakcije. Kot vidimo na Sliki 22, je bila metoda linearna v celotnem testiranem območju ($R^2 = 0,996$). Vsako koncentracijo standarda meglumina smo injicirali trikrat, saj nas je zanimala ponovljivost izmerjenih vrednosti AUC PDM. Na Sliki 22 so predstavljene povprečne vrednosti AUC PDM, poleg teh pa tudi pripadajoče vrednosti RSD. Vidimo, da so bile vrednosti RSD pri posameznih koncentracijah standarda nizke, z izjemo pri 150 µg /ml, kjer je bila vrednost $RSD = 4,40 \%$.



Slika 22: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od standardnih koncentracij meglumina.

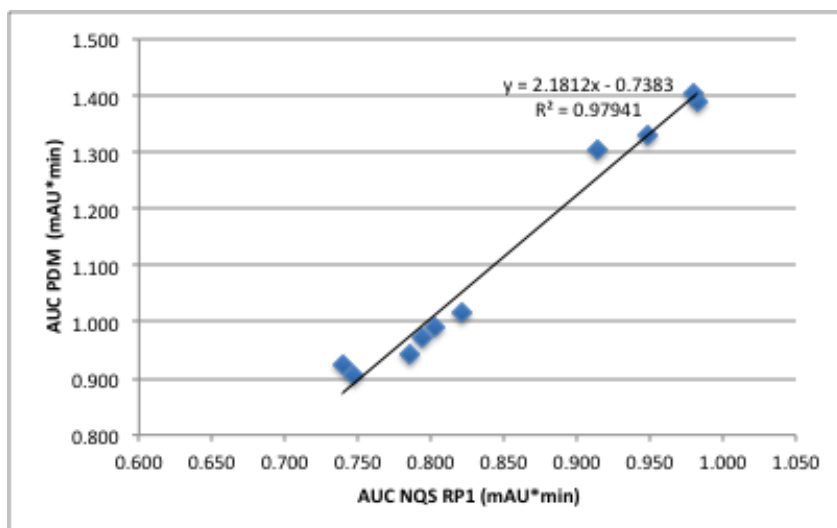
Kot smo že omenili, smo imeli tekom razvoja metode težave s ponovljivostjo avtomatskega injektorskega sistema. Pri vrednotenju linearnosti smo ugotovili, da lahko to težavo posredno nadziramo preko vrednosti AUC NQS RP1, saj je bilo njegovo nastajanje pri določenih pogojih derivatizacije konstantno in neodvisno od koncentracije meglumina. To lahko vidimo tudi na Sliki 23. Vrednost RSD za povprečje vrednosti AUC NQS RP1 28 zaporednih injiciranj je bila 1,8 %. V primeru neponovljivosti avtomatskega injektorskega sistema, bi se to najverjetneje odrazilo tudi v večji variabilnosti vrednosti AUC NQS RP1.

c (µg/ml)	AUC NQS RP1 (mAU*min)
slepa	0,876
25	0,877
25	0,862
25	0,856
slepa	0,864
50	0,861
50	0,852
50	0,845
slepa	0,853
75	0,850
75	0,847
75	0,815
slepa	0,835
100	0,838
100	0,839
100	0,835
slepa	0,839
125	0,835
125	0,837
125	0,834
slepa	0,817
150	0,841
150	0,841
150	0,835
slepa	0,846
200	0,828
200	0,830
200	0,825
	0,843 povprečje
	1,8 RSD (%)

Slika 23: Vrednosti AUC NQS RP1 v odvisnosti od standardnih koncentracij meglumina.

4.4.3 Točnost in ponovljivost

Pri vrednotenju točnosti in ponovljivosti metode smo se zopet srečali s težavami, povezanimi s ponovljivostjo sistema. Ker so se spreminjale površine vseh vrhov v kromatogramu, ne pa samo tista, ki je pripadala našemu produktu, smo sklepali, da težava ni v sami reakciji derivatizacije, pač pa v ponovljivosti volumna injiciranja. To smo potrdili z dejstvom, da so se poleg vrednosti RSD za AUC PDM pri večkratnem zaporednem injiciranju standardnih raztopin meglumina povečale tudi vrednosti RSD za AUC NQS RP1. Ker prisotnost in koncentracija meglumina v prejšnjih poskusih nista vplivala na vrednosti AUC NQS RP1 (Slika 23), je bilo povečanje vrednosti RSD za AUC NQS RP1 posledica večjih razlik v količinah vzorca, ki smo ga nanegli na kolono ob posameznih injiciranjih. Hkrati s tem smo namreč očitno injicirali tudi različne količine PDM. To lahko potrdimo s tem, da so bile vrednosti AUC PDM močno povezane z vrednostmi AUC NQS RP1 ($R^2 = 0,979$) (Slika 24).



Slika 24: Vrednosti AUC PDM v odvisnosti od AUC NQS RP1.

Zaradi omenjenih razlogov smo se odločili, da bomo uporabili vrednosti AUC NQS RP1 kot interni standard za izračun vsebnosti meglumina. Tako smo lahko delno kompenzirali napako zaradi slabe ponovljivosti injiciranja in izboljšali točnost in natančnost metode, saj bi sicer sam sistem bistveno preveč vplival na rezultate. Rezultati izračunov točnosti in natančnosti metode brez in z uporabo AUC NQS RP1 kot internega standarda, so prikazani v Preglednicah XIII in XIV.

4.4.3.1 Točnost in natančnost metode pri uporabi vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda

Kot vidimo v Preglednici XIII, je bila v tem primeru točnost metode med 93,7 % in 98,4 %, vrednost RSD vseh devetih analiziranih vzorcev pa 3,4 %.

Preglednica XIII: Točnost metode pri uporabi vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda.

Vzorec	Koncentracijsko območje meglumina		
	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml
	Točnost (%)		
1	98,0	90,7	96,0
2	99,2	97,1	90,7
3	98,1	99,0	94,5
Povprečje	98,4	95,6	93,7

4.4.3.2 Točnost in natančnost metode brez uporabe vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda

Podatki v Preglednici XIV kažejo, da je bila v tem primeru točnost metode med 85,9 % in 92,6 %, vrednost RSD za vseh devet analiziranih vzorcev pa 6,4 %.

Preglednica XIV: Točnost metode brez uporabe vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda.

	Koncentracijsko območje meglumina		
Vzorec	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml
	Točnost (%)		
1	90,4	83,9	90,5
2	91,7	93,4	80,7
3	88,3	100,5	86,7
Povprečje	90,2	92,6	85,9

Vidimo, da izračun vsebnosti meglumina z uporabo vrednosti AUC NQS RP1 kot internega standarda daje bolj točne in ponovljive rezultate, zato smo ta pristop uporabili tudi pri računanju vsebnosti meglumina v vzorcih zdravil.

4.5 ANALIZA VZORCEV

Na koncu smo novo analitsko metodo preskusili na treh zdravilih, ki imajo med pomožnimi snovmi naveden meglumin. Vzorce zdravila Tolura smo pripravili v šestih paralelkah, Novonorm in Movalis pa v dveh. Izračunane vsebnosti meglumina na odmerno enoto v posameznih vzorcih so prikazane v Preglednici XV.

Preglednica XV: Izračunane vsebnosti meglumina na odmerno enoto v treh analiziranih zdravilih.

	Masa meglumina na odmerno enoto zdravila (mg)		
Vzorec	Tolura	Novonorm	Movalis
1	20,19	0,87	6,02
2	24,62	0,85	6,22

3	19,61	/	/
4	23,12	/	/
5	22,81	/	/
6	19,71	/	/
Povprečje	21,68	/	/
RSD (%)	9,8	/	/

Pri zdravilu Tolura je bila vrednost RSD vsebnosti meglumina nekoliko višja (9,8 %). Vzrok za to lahko zopet pripišemo predvsem neponovljivosti injektorskega sistema. Vidimo tudi, da se je vsebnost meglumina na odmerno enoto med posameznimi zdravili precej razlikovala. Take rezultate smo pričakovali, saj so odmerki učinkovin v testiranih zdravilih, s katerimi meglumin tvori soli oziroma komplekse, prav tako različni. Večjo enotnost v rezultatih smo zato dobili pri molarnih razmerjih med posamezno učinkovino in megluminom. V zdravilu Tolura in Movalis je bilo to razmerje približno 4:3, pri zdravilu Novonorm pa 1:1.

5 SKLEP

V magistrski nalogi smo uspešno razvili novo metodo za določanje vsebnosti meglumina v farmacevtskih formulacijah.

Metoda temelji na predkolonski avtomatski derivatizaciji meglumina z NQS ter nadaljni ločbi in detekciji nastalega derivata s HPLC.

V prvem delu naloge smo razvili kromatografsko metodo na koloni Accucore 2,6 μm C18 100 \times 4,6 mm, ki smo jo termostatirali na 30 °C. Uporabili smo mobilno fazo, sestavljeno iz 0,05 % raztopine TFA in MeCN v razmerju 94:6 (v/v). Pretok mobilne faze je bil 1,0 ml/min, voden z gradientnim programom elucije. Volumen injiciranja je bil 10 μL . Analite smo detektirali pri 278 nm z detektorjem na diodni niz. Čas trajanja celotne metode, vključno z avtomatsko derivatizacijo in ekvilibracijo kolone, je bil 22 minut.

V drugem delu naloge smo optimizirali pogoje derivatizacije meglumina z NQS. Proučevali smo vplive temperatur in časov reakcij ter uporabljenih pufrov in njihovih vrednosti na hitrost, izkoristek in ponovljivost reakcije. Ugotovili smo, da je UV-VIS spektrofotometrija neprimerna za študij vplivov tovrstnih parametrov, saj ni valovne dolžine, pri kateri bi lahko selektivno spremljali nastajanje produkta derivatizacije meglumina. Zato smo v nadaljnjih poskusih uporabili tekočinsko kromatografijo. Reakcija derivatizacije pri sobni temperaturi je potekala hitreje v karbonatnem in fosfatnem, počasneje pa v boratnem pufri. Ugotovili smo, da je za hitrost in izkoristek reakcije ugodnejši višji pH. Z višanjem temperature se je povečevala nestabilnost NQS in produkta derivatizacije meglumina. Za končno metodo smo zato izbrali derivatizacijo v igli avtomatskega injektorja pri sobni temperaturi, s čakalnim časom 120 sekund, v fosfatnem pufri s pH = 12,0.

Med razvojem in validacijo nove metode smo imeli občasno težave z neponovljivostjo derivatizacije. Ugotovili smo, da razlog za to ni bil v sami naravi reakcije med megluminom in NQS, temveč v neponovljivosti avtomatskega sistema za injiciranje. To težavo smo deloma rešili tako, da smo za izračun vsebnosti meglumina uporabili vrh razpadnega produkta NQS kot interni standard, saj njegova površina ni bila odvisna od vsebnosti meglumina in je bila ob ponovljivem injiciranju konstantna. Zaradi omenjenih težav predlagamo, da naj se metoda izvaja izključno na predhodno kvalificiranem sistemu.

Alternativno bi lahko derivatizacijo namesto v igli injektorja izvajali tudi v reaktorski viali, s čimer bi zmanjšali vpliv aparata, saj bi se izognili mešanju v igli injektorja, kar je verjetno delno prispevalo k neponovljivosti reakcij.

Z validacijo smo dokazali, da je naša analitska metoda selektivna, linearna v območju 25 - 200 µg/ml ($R^2 = 0,996$), natančna (RSD = 3,4 %) ter točna (93,7 - 98,4 %) in zato primerna za določanje vsebnosti meglumina v zdravilih, kar smo potrdili tudi z analizo vzorcev treh zdravil, ki so na voljo na slovenskem trgu.

6 LITERATURA

1. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition, Pharmaceutical Press, London, 2009: 431-433.
2. Fujita M, Ueda T, Handa T: Generation of Formaldehyde by Pharmaceutical Excipients and Its Absorption by Meglumine. *Chem. Pharm. Bull.* 2009; 57: 1096—1099.
3. Fujita M, Ueda T, Iwata M: Stabilization by meglumine of an amine compound degraded by formaldehyde in tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 386: 195–200.
4. V Chromy V, Kulhanek V, Fischer J: N-methyl-D-glucamine buffer for pH 8.5-10.5. *Clin. Chem.* 1978; 24/2: 379-381.
5. Chromy V, Zahrandniček L, Vozmiček J: Use of N-methyl-D-glucamine as buffer in the determination of serum alkaline phosphatase activity. *Clin. Chem.* 1981; 27: 1729-1732.
6. Guo RY, An ZM, Mo LP, Wang RZ, Liu HX, Wang SX, Zhang ZH: Meglumine: A Novel and Efficient Catalyst for One-Pot, Three-Component Combinatorial Synthesis of Functionalized 2-Amino-4H-pyrans. *ACS Comb. Sci.* 2013;15: 557–563.
7. Zhu Z, Yang T, Zhao Y, Gao N, Leng D, Ding P: A simple method to improve the dissolution of repaglinide and exploration of its mechanism. *Asian journal of pharmaceutical sciences* 2014; 9: 218-225.
8. De Villiers M, Liebenberg W, Malan S, Gerber J: The Dissolution and Complexing Properties of Ibuprofen and Ketoprofen when Mixed with N-Methylglucamine. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1999; 25(8): 967–972.
9. Basavaraj S, Sihorkar V, Shantha Kumar TR, Sundaramurthi P, Srinivas NR, Venkatesh P, Ramesh M, Kumar Singh S: Bioavailability enhancement of poorly water soluble and weakly acidic new chemical entity with 2-hydroxy propyl-beta-cyclodextrin: selection of meglumine, a polyhydroxy base, as a novel ternary component. *Pharm Dev Technol* 2006; 11: 443–51.
10. Boehringer Ingelheim International GmbH: Povzetek glavnih značilnosti zdravila, dostopno preko: http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000209/WC500027641.pdf (dostop: 15.8.2016).
11. Drugs.com: Meglumine (Inactive ingredient), dostopno preko: <https://www.drugs.com/inactive/meglumine-141.html> (dostop: 15.8.2016).
12. Roberts W, McMurray W, Rainey P: Characterization of the Antimonial

Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). Antimicrobial agents and chemotherapy 1998; 42(5): 1076-1082.

13. Drugs.com: Meglumine diatrizoate definition, dostopno preko: <https://www.drugs.com/dict/meglumine-diatrizoate.html> (dostop: 15.8.2016).

14. Drugs.com: Dotarem information, dostopno preko: <https://www.drugs.com/dotarem.html> (dostop: 15.8. 2016).

15. Drugs.com: Flunixin Meglumine Injection for Animal Use, dostopno preko: <https://www.drugs.com/vet/flunixin-meglumine-injection.html> (dostop: 15.8.2016).

16. Pfizer Limited: Summary of product characteristics, dostopno preko: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002294/WC500117862.pdf (dostop: 7.9.2016)

17. Merck Sharp & Dohme Ltd: Summary of product characteristics, dostopno preko: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000743/WC500037153.pdf (dostop: 15.8.2016)

18. Jasprica I, Mršić N, Dragić T, Cetina-Čižmek B: Determination of meglumine in pharmaceutical formulations using high performance liquid chromatography. Pharmazie 2011; 66: 916–919.

19. Ziqi Zhou J, Waszkuc T, Mohammed F: Determination of Glucosamine in Raw Materials and Dietary Supplements Containing Glucosamine Sulfate and/or Glucosamine Hydrochloride by High-Performance Liquid Chromatography with FMOC-Su Derivatization: Collaborative Study. J AOAC Int. 2005; 88(4): 1048-1058.

20. Aghazadeh-Habashi A, Sattari S, Pasutto F, Jamali F: High Performance Liquid Chromatographic Determination of Glucosamine in Rat Plasma. J Pharm Pharmaceut Sci 2002; 5(2):176-180.

21. Miyagi M, Yokoyama H, Hibi T: Sugar microanalysis by HPLC with benzylation: Improvement via introduction of a C-8 cartridge and a high efficiency ODS column. Journal of Chromatography B 2007; 854: 286–290.

22. John W. Dolan: Ion pairing - Blessing or curse, dostopno preko: <http://www.chromatographyonline.com/ion-pairing-blessing-or-curse> (dostop: 8.8. 2016).

23. Sigma Aldrich: Derivatization reagents for selective response and detection in complex matrices, dostopno preko: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatizatio>

n%20Rgts%20brochure.pdf (dostop: 15.9.2016)

24. Shimadzu: Analytical methods for amino acids, dostopno preko: <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lectalk/53/53intro.html> (dostop: 9.8. 2016).

25. Płotka-Wasyłka JM, Morrison C, Biziuk M, Namiesnik J: Chemical Derivatization Processes Applied to Amine Determination in Samples of Different Matrix Composition. *Chem. Rev.* 2015; 115 (11): 4693-4718.

26. Hernández-Cassou S, Saurina J: Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques. *Journal of Chromatography B* 2011; 879: 1270-1281.

27. Technical Note 107. Automated In-Needle Derivatization Applying a User-Defined Program for the Thermo Scientific Dionex WPS-3000 Split-Loop Autosampler. Dionex, Thermo Fischer Scientific; 2011.

28. Technical Note 707. Injection Routines Explained: Effectively Using a User Defined Program. Dionex, Thermo Fischer Scientific; 2011.

29. Bruckner H, Flassig S, Kirschbaum J: Determination of biogenic amines in infusions of tea (*Camellia sinensis*) by HPLC after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl). *Amino Acids* 2012; 42: 877-885.

30. Buha SM, Panchal A, Panchal H, Chambhare R, Kumar S, Jain M, Patel PR: HPLC–FLD for the Simultaneous Determination of Primary and Secondary Amino Acids from Complex Biological Sample by Pre-column Derivatization. *Journal of Chromatographic Science* 2011; 49: 118-123.

31. Adegoke O: An overview of applications of pre-column derivatization reactions for the liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals and other compounds. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* 2012; 6(14): 129-140.

32. Danielson N, Gallagher P, Bao J: Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 2008; 7042-7076.

33. Saurina J, Hernández-Cassou S: Determination of amino acids by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Chromatography A* 1994; 676(2): 311-319.

34. Sigma-Aldrich: 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt 97%, dostopno preko: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/226017?lang=en®ion=SI> (dostop: 10.8. 2016).

35. Folin O: A system of blood analysis: Supplement III. A new colorimetric method for

- determination of the amino-acid nitrogen in blood. *J. Biol. Chem* 1922; 51: 377-391.
36. Latorre R, Saurina J, Hernandez-Cassou S: Continuous flow derivatization system coupled to capillary electrophoresis for the determination of amino acids. *Journal of Chromatography A* 2002; 976: 55-64.
37. Latorre R, Hernandez-Cassou S, Saurina J: Strategies for in-capillary derivatization of amino acids in capillary electrophoresis using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate as a labeling reagent. *Journal of Chromatography A* 2011; 934: 105-112.
38. Elbashir AA, Ahmed AA, Ali Ahmed S, Aboul-Enein H: 1,2-Naphthoquinone-4-Sulphonic Acid Sodium Salt (NQS) as an Analytical Reagent for the Determination of Pharmaceutical Amine by Spectrophotometry. *Applied Spectroscopy Reviews* 2012; 47: 219-232.
39. Islas G, Rodriguez J, Mendoza-Huizar L, Perez-Moreno F, Gabriela Carrillo E: Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils by hplc with pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2015; 37: 1298-1309.
40. García-Villar N, Hernández-Cassou S, Saurina J: Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 6387-6393.
41. Darwish I, Amer S, Abdine H, Al-Rayes L: New Spectrophotometric and Fluorimetric Methods for Determination of Fluoxetine in Pharmaceutical Formulations. *International Journal of Analytical Chemistry* 2009; 257(3): 1-9.

7 PRILOGA

V Preglednici XVI je predstavljen uporabljeni protokol za izvedbo derivatizacije. Korak za korakom so opisani vsi ukazi in njihovi parametri, ki so potrebni za uspešno derivatizacijo v igli avtomatskega injektorja. UDP, ki je prikazan, v celoti temelji na literaturnem viru (27).

Preglednica XVI: Protokol uporabniškega programa za derivatizacijo (UDP).

Namen ukaza	Ukaz	Parametri ukaza
Vsakemu reagentu v programu določimo mesto injiciranja.	Reagent A = RA1 Reagent B = RA2 Reagent C = RA3	Mesto bazičnega pufra Mesto NQS Mesto kislega pufra
Injektor povleče zrak, s katerim fizično ločimo reakcijsko zmes v zanki za vzorec in mobilno fazo.	UDP povleci	Zrak: 1,000 μL ; hitrost brizge: 1,000 $\mu\text{L/s}$
Injektor povleče bazični pufer.	UDP povleci	Reagent A: 4,000 μL ; hitrost brizge: 1,000 $\mu\text{L/s}$
Injektor povleče vzorec.	UDP povleci	Vzorec: 1,000 μL ; hitrost brizge: 1,000 $\mu\text{L/s}$
Injektor trikrat zapored povleče zrak in ga spusti. Na ta način dobro premeša med seboj bazični pufer in vzorec.	UDP povleci	Zrak: 5,000 μL ; hitrost brizge: 1,000 $\mu\text{L/s}$
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 5,000 μL ; hitrost brizge: 33,000 $\mu\text{L/s}$
	UDP premik brizge	Obrat: 5,000 μL ; hitrost brizge: 33,000 $\mu\text{L/s}$
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 5,000 μL ; hitrost brizge: 33,000 $\mu\text{L/s}$
	UDP premik brizge	Obrat: 5,000 μL ; hitrost brizge: 33,000 $\mu\text{L/s}$
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 5,000 μL ; hitrost brizge: 33,000 $\mu\text{L/s}$
Čas za ekvilibracijo zmesi.	UDP čakaj	15 s
Zunanja površina igle se	UDP spiranje igle	100,000 μL

očisti s 100 μ L tekočine za spiranje igle.		
Injektor povleče reagent za derivatizacijo.	UDP povleci	Reagent B: 1,000 μ L; hitrost brizge: 1,000 μ L/s
Injektor šestkrat zapored povleče zrak in ga spusti. Na ta način dobro premeša med seboj bazični pufer, vzorec in reagent za derivatizacijo.	UDP povleci	Zrak: 6,000 μ L; hitrost brizge: 1,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 6,000 μ L; hitrost brizge: 33,000 μ L/s
Predpisan čas (čakalni čas), znotraj katerega poteka reakcija derivatizacije med analitom v vzorcu in	UDP čakaj	120 s

reagentom za derivatizacijo.		
Zunanja površina igle se očisti s 100 µL tekočine za spiranje igle.	UDP spiranje igle	100,000 µL
Injektor povleče kisli pufer. Na ta način znižamo pH reakcijske zmesi do nevtralnega območja.	UDP povleci	Reagent C: 4,000 µL; hitrost brizge: 5,000 µL/s
Injektor štirikrat zapored povleče zrak in ga spusti. Na ta način dobro premeša med seboj bazični pufer, vzorec, reagent za derivatizacijo (NQS) ter kisli pufer.	UDP povleci	Zrak: 10,000 µL; hitrost brizge: 5,000 µL/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 10,000 µL; hitrost brizge: 33,000 µL/s
	UDP premik brizge	Obrat: 10,000 µL; hitrost brizge: 33,000 µL/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 10,000 µL; hitrost brizge: 33,000 µL/s
	UDP premik brizge	Obrat: 10,000 µL; hitrost brizge: 33,000 µL/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 10,000 µL; hitrost brizge: 33,000 µL/s
	UDP premik brizge	Obrat: 10,000 µL; hitrost brizge: 33,000 µL/s
	UDP premik brizge	Obrat nazaj: 10,000 µL; hitrost brizge: 33,000 µL/s
Injiciranje končne zmesi na kolono.	UDP označba injiciranja	t = 0
	UDP premik vijaka za injiciranje	Injiciranje
Resetiranje brizge.	UDP premik vijaka	Odpad
	UDP premik vijaka na začetek	Splošna hitrost
Čiščenje sistema.	UDP povleci	Topilo za čiščenje: 100,000 µL; hitrost brizge: 10,000

		$\mu\text{L/s}$
	UDP odpad	V odpad: 100,000 μL ; hitrost brizge: 10,000 $\mu\text{L/s}$