

Arh.farm. 2015;65: 178 – 190

Pregledni rad/ Review article

Primena koncepta razvoja ekološki prihvatljivih metoda tečne hromatografije u analitici lekova

Biljana Otašević*, Ana Protić, Jelena Golubović, Mira Zečević

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, 11 152 Beograd

*e-mail: biljana.otasevic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Tečna hromatografija predstavlja najčešće korišćenu analitičku tehniku tokom istraživanja i razvoja, kao i u rutinskom ispitivanju i kontroli kvaliteta farmaceutskih proizvoda. Imajući u vidu značajnu količinu otpada koji potiče od upotrebljenih organskih rastvarača, naročito kod reverzno-fazne tečne hromatografije, zabeleženi su novi koncepti razvoja ekološki prihvatljive hromatografske metode. Pravilo 3 R (eng. *Reduce – Replace – Recycle*) podrazumeva smanjenu upotrebu toksičnih rastvarača, njihovu zamenu manje toksičnim rastvaračima, kao i rastvaračima koji se mogu prerađivati. U ovom radu su predstavljena različita rešenja koja zadovoljavaju 3 R pravila i često se primenjuju u analitici lekova.

Ključne reči: analitika lekova, tečna hromatografija, upotreba organskih rastvarača, ekološki prihvatljiva rešenja

Uvod

Savremene metode u analitici lekova uglavnom su zasnovane na primeni hromatografskih tehnika, među kojima se najčešće koristi tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *high performance liquid chromatography* – HPLC). Hromatografske metode se koriste tokom istraživanja i razvoja, kao i u rutinskom ispitivanju i kontroli kvaliteta farmaceutskih proizvoda. Bez obzira na namenu, tokom razvoja metode vrši se optimizacija kritičnih analitičkih parametara razdvajanja i validacionih parametara kao što su osetljivost, tačnost određivanja, ponovljivost merenja, jednostavnost i brzina izvođenja ispitivanja, cena analitičkog postupka. Međutim, iako su ove karakteristike analitičkih metoda veoma bitne, neophodno je obratiti pažnju na aspekte koji se tiču bezbednosti analitičara, kao i uticaja na životnu sredinu [1-3].

Smatra se da je izbor rastvarača najmanje razmatran parametar tokom razvoja hromatografskih metoda. U novije vreme, imajući u vidu značajnu količinu otpada koji potiče od upotrebljenih organskih rastvarača, koji ulaze u sastav mobilne faze kod reverzno-fazne tečne hromatografije, intenzivno se razmišlja o pronalazenju manje štetnih rešenja. Naime, procenjeno je da tokom svog uobičajenog rada, jedan tečni hromatograf opremljen sa klasičnom kolonom dužine 15-25 cm, unutrašnjeg prečnika 4,6 mm i veličine čestica 5 μm , pri protoku mobilne faze od 1 mL min^{-1} , može stvoriti dnevno do 1,5 L otpada. Ovo dalje podrazumeva stvaranje oko 500 L tečnog otpada godišnje [4]. Iako je ovo mala količina u poređenju sa otpadom koji stvara tipično industrijsko postrojenje, neke velike farmaceutske kompanije u svetu imaju stotine tečnih hromatografa u svojim istraživačkim i kontrolnim laboratorijama, što samim tim vodi do stvaranja hiljada litara toksičnog otpada dnevno. Iz ovog razloga je veoma poželjno smanjiti količinu upotrebljenih organskih rastvarača, odnosno razmotriti načine za uvođenje ekološki prihvatljivih rešenja u analitičke laboratorije.

Koncept *zelene* hemije sa 12 opštih principa sažeto objašnjenih u Tabeli I, prvi put su predstavili Anastas P. i Warner J. još davne 1998. godine u svojoj knjizi *Zelena hemija: teorija i praksa*. Međutim, ovi principi se tek u novije vreme primenjuju kao obavezni vodič za istraživače koji se bave dizajnom novih lekova, tehnoloških postupaka i analitičkih procedura [4].

Kada je reč o metodama za farmaceutsku analizu, takozvano pravilo 3 R (eng. *Reduce – Replace – Recycle*) je najšire upotrebljavano. To podrazumeva razvoj hromatografskih metoda kod kojih je upotreba toksičnih rastvarača smanjena ili su oni zamenjeni manje toksičnim, kao i upotreba rastvarača koji se mogu prerađivati [1-3]. Međutim, pretragom literature se mogu pronaći različiti načini za postizanje ekološki prihvatljivije, *zelene* tečne hromatografije.

Tabela I Principi zelene hemije**Table I** Green chemistry principles

| R. br. | Princip | Značenje principa |
|--------|---|--|
| 1 | Prevenција | Bolje je sprečiti stvaranje otpada nego naknadno čistiti ili zbrinjavati otpad |
| 2 | <i>Atom economy</i> | Osmisliti sintetski postupak tako da se upotrebljeni materijali potpuno ugrade u krajnji proizvod |
| 3 | Manje opasne hemijske sinteze | Postupak u kome se koriste ili proizvode supstance manje toksične po ljude ili životnu sredinu |
| 4 | Dizajn bezbednijih hemikalija | Dizajn hemijskih proizvoda kod kojih je željena funkcija postignuta uz minimalnu toksičnost |
| 5 | Bezbedniji rastvarači i ostale pomoćne hemikalije | Izbegavanje upotrebe pomoćnih hemikalija kad god je to moguće |
| 6 | Energetska efikasnost | Smanjiti utrošak energije tokom hemijskih procesa, po mogućstvu raditi na sobnoj temperaturi i pritisku |
| 7 | Upotreba obnovljivih materijala | Upotrebiti obnovljive sirovine i materijale kad god je to moguće |
| 8 | Smanjenje upotrebe derivata | Smanjiti ili zaobići suvišnu derivatizaciju budući da ona podrazumeva upotrebu dodatnih reagenasa |
| 9 | Kataliza | Katalitički reagensi su bolji od stehiometrijskih |
| 10 | Razgradnja | Dizajn hemijskih proizvoda koji se raspadaju do neškodljivih proizvoda koji ne zaostaju u prirodi |
| 11 | <i>Real-time</i> analiza sa ciljem prevencije zagađenja | Analitičke procedure koje omogućavaju <i>real-time, in-process</i> ispitivanja pre nastanka štetnih materija |
| 12 | Bezbedna hemija sa ciljem prevencije nezgoda | Hemikalije sa smanjenim potencijalom dešavanja nezgoda (izlivanje u okolinu, eksplozije, požari...) |

Mogućnosti za smanjenje utroška organskih rastvarača

Utrošak organskih rastvarača je moguće smanjiti modifikovanjem parametara metode koji su vezani za hromatografsku kolonu. Tako na primer smanjenje unutrašnjeg prečnika kolone dovodi do smanjenja količine mobilne faze koja protekne kroz sistem. Kolone koje se sreću na tržištu su unutrašnjeg dijametara 0,5-1,0 mm, 100-500 μm i 10-100 μm i označavaju se redom kao mikro, kapilarne i nano kolone. Osim

minijaturizacije analitičke opreme (eng. *nano-liquid chromatography*) i uštede u količini utrošenih organskih rastvarača, odnosno proizvedenog otpada, upotreba ovih kolona omogućava i druge prednosti, kao što su veća efikasnost i osetljivost, pogotovo kada su dostupne male zapremine uzorka za analizu [4, 5]. Napredak ka ekološki prihvatljivijoj tečnoj hromatografiji takođe se postiže i upotrebom monolitnih stacionarnih faza [4]. Njihova stacionarna faza je sastavljena od visoko porozne neprekidne silika mreže, sa porama bimodalne strukture među kojima se razlikuju velike i male pore. Velike pore, koje se označavaju kao makropore, karakteriše veličina od 2 μm , i one su odgovorne za mali otpor pri proticanju mobilne faze, te se kolone sa monolitnim pakovanjem mogu koristiti pri protocima do 9 mL min^{-1} uz stvaranje niskog pritiska u sistemu, što za posledicu ima smanjenje ukupnog trajanja analitičkog postupka. Sa druge strane, mezopore monolitnih kolona su male, veličine oko 12 nm i one su odgovorne za stvaranje velike aktivne površine, oko 300 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, što omogućava efikasno hromatografsko razdvajanje. Dakle, efikasnost monolitnih kolona je očuvana uprkos povećanju protoka, budući da je smanjen put difuzije analita i uticaj transfera mase [6-8]. Dodatno, još značajnije smanjenje utroška rastvarača primenom monolitnih kolona moguće je ostvariti uz smanjenje prečnika kolone. Sa druge strane, upotreba monolitnih kolona omogućava primenu mobilnih faza većeg viskoziteta, kao što su one koje sadrže smešu etanola i vode. Ovakva mobilna faza je ekološki prihvatljivija od tipičnih smeša korišćenih u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji sastavljenih od acetonitrila i vode ili metanola i vode [4].

Smanjenje ukupnog trajanja analize sa posledičnim smanjenjem utroška rastvarača, može se postići skraćivanjem dužine kolone na 5-10 cm, unutrašnjeg prečnika kolone na 1,0-2,1 mm i veličine čestica pakovanja na 2 μm i manje. Istovremeno, efikasnost hromatografskog razdvajanja ostaje ista ili se čak i povećava. Pokazano je da se isti broj teorijskih platoa može postići korišćenjem kolone dužine 15 cm i veličine čestica 5 μm , kao i kolonom od 5 cm i veličine čestica 2 μm [3, 4]. Međutim, ovakvo približavanje tečne hromatografije konceptu *zelene* hemije, nije moguće ostvariti bez pratećih instrumentalnih modifikacija. Navedene promene u karakteristikama kolone su obavezno praćene povećanjem radnog pritiska u sistemu (do 1000 bara) što zahteva pojačanu otpornost svih operativnih delova tečnog hromatografa. Dalje, unapređen je rad najpre pumpi i injektora, jer se maksimalna reproduktivnost i kontinuitet njihove funkcije očekuje pri velikim brzinama uzorkovanja veoma malih zapremina uzoraka (ispod 5 μL). Od detektora se očekuje da precizno i kontinuirano registruje signale pri ekstremno kratkim ciklusima injektovanja (često manjim od 1 minuta), kako bi se postigla pouzdana definicija izrazito uskih hromatografskih pikova. Iz tog razloga, konstruisana je posebna vrsta UHPLC (eng. *ultra high pressure liquid chromatography*) tečnih hromatografa [3, 4, 9-11]. Transfer HPLC na UHPLC metodu nije jednostavan, zahteva procenu vrednosti definisanih hromatografskih parametara koji su dobijeni HPLC i UHPLC metodom i samim tim ukazuje na potrebu za revalidacijom [3, 11].

Pošto je od svih parametra metode najlakše promeniti temperaturu, ovo je veoma često primenjivana strategija za postizanje ekološki prihvatljivije tečne hromatografije. Povećana temperatura smanjuje viskozitet mobilne faze, kao i pritisak u sistemu, što dalje olakšava povećanje protoka mobilne faze i skraćuje trajanja analize. Međutim, ovo podrazumeva termostatiranje kolone, ali i zagrevanje mobilne faze pre nego što uđe u kolonu. Zbog uticaja na rad detektora, nakon izlaska iz kolone, mobilna faza se rashlađuje. Termostabilnost stacionarne faze se podrazumeva i temperatura kolone obično ne prelazi 60 °C, pogotovo ako mobilna faza sadrži rastvor puferskih soli. Ograničavajuću okolnost predstavlja i termostabilnosti uzoraka za analizu [1, 4].

Zamena toksičnih manje toksičnim komponentama mobilne faze

Uobičajene komponente *zelenih* mobilnih faza su voda, aceton, metanol i etanol. Etanol se naročito preporučuje budući da ima slične osobine kao tradicionalno upotrebljavani acetonitril i metanol, izuzev što je manje isparljiv, manje toksičan i jeftiniji za odlaganje. Sa druge strane, smeše etanola i vode su veoma viskozne i imaju ograničenja prilikom prodaje i distribucije. Aceton dobro rastvara sve vrste analita i dobro se meša sa ostalim rastvaračima, ali se manje koristi zbog izražene UV apsorpcije u opsegu talasnih dužina do 340 nm, kao i otežanog upumpavanja u sistem zbog gustine [4]. Poslednjih godina, pojavio se trend upotrebe čiste vode pod posebnim uslovima, veoma zagrejana voda (eng. *superheated water* – SHW) i voda pod pritiskom. Voda predstavlja potpuno *zelenu* mobilnu fazu, pošto je veoma dostupna, jeftina, nezapaljiva i potpuno neškodljiva po životnu sredinu. Voda sama po sebi ne može eluirati mnoga organska jedinjenja na sobnoj temperaturi, pa se zato kombinuje sa visokom temperaturom (preko 100 °C). Ovo dodatno zahteva upotrebu termostabilnih stacionarnih faza sastavljenih od polimernih materijala (npr. polistiren-divinilbenzen) u koje mogu biti ugrađeni cirkoni (čestice cirkona sa polibutadienom, polistirenom ili presvučene ugljenikom). Kao i u slučaju zagrevanja kolone, ograničenje tokom analize je termostabilnost uzorka [4].

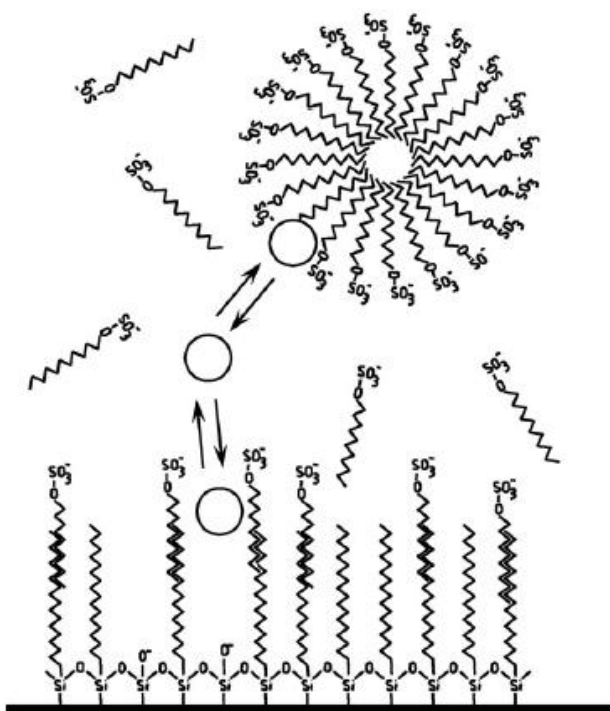
Sledeći način za postizanje ekološki prihvatljivije tečne hromatografije je upotreba supstanci pod uslovima koji se označavaju kao superkritični (eng. *supercritical fluid chromatography*). Kritični parametri za čist ugljen-dioksid su temperatura 31,1 °C i pritisak od 73,8 bara. Iznad ovih vrednosti, ugljen-dioksid je prisutan kao superkritični fluid. Blage promene temperature i pritiska oko kritične tačke mogu dovesti do značajnih promena u fizičkim osobinama (npr. gustina) što se može iskoristiti za podešavanje moći rastvaranja, isparavanja i ostalih svojstava rastvarača [1, 4]. Budući da je nepolaran eluent, u cilju povećanja polarnosti dodaje mu se organski rastvarač, najčešće metanol u zapreminskom udelu do 30%. Superkritični ugljen-dioksid upotrebljen za pripremu mobilne faze omogućava veoma brza i efikasna razdvajanja. Pošto ima osobinu brze difuzije, prilikom hromatografskih analiza sa gradijentnim eluiranjem, omogućava bržu re-ekvilibraciju sistema [1]. Uopšteno, superkritični fluidi imaju mali uticaj na životnu sredinu, nisku cenu odlaganja, omogućavaju smanjenje utroška toksičnih rastvarača i aditiva, sami su netoksični, za sobom ne ostavljaju rezidue

i mogu se potpuno regenerisati. Zbog svih navedenih osobina, primena superkritičnih fluida predstavlja pravi primer uspeha koji ovu tehniku čini boljom i *zelenijom* od klasičnih pristupa [1, 4].

Ekološki prihvatljive mobilne faze za razdvajanje polarnih i umereno polarnih jedinjenja mogu biti sastavljene i od smeša tečnosti sa povećanom protočnošću (eng. *enhanced fluidity liquid mixtures*). To su smeše polarnih rastvarača, na primer alkohola (etanol ili metanol) u koje je dodat visok procenat rastvorenog gasa. Kao i kod superkritičnih fluida, polarnost tečnosti sa povećanom protočnošću se može podešavati promenom pritiska, s tim što one zahtevaju niske pritiske da bi opstale u jednoj fazi. Zbog male gustine, ovakve mobilne faze se mogu koristiti u kombinaciji sa dugačkim kapilarnim kolonama (1 m ili više), kao i u reverzno-faznom i normalno-faznom hromatografskom sistemu, a u literaturi su opisane i metode sa razdvajanjem hiralnih jedinjenja [4].

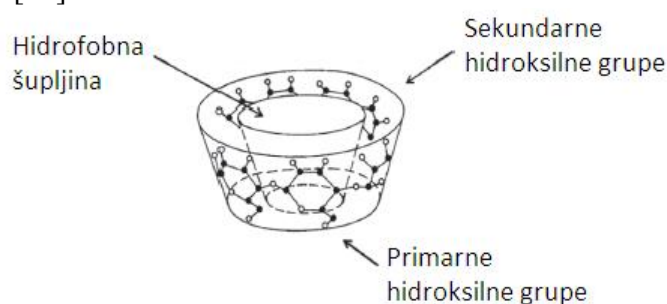
Sastav mobilne faze se može modifikovati i upotrebom vodenih micelarnih rastvora surfaktanata [4]. Kod micelarne tečne hromatografije koristi se reverzno-fazna (obično C18) kolona i mobilna faza koja sadrži asocijate monomera surfaktanta iznad svoje kritične micelarne koncentracije. Surfaktanti su molekule koje se sastoje iz hidrofilnih grupa koje ih čine veoma rastvornim u vodi i hidrofobnih grupa. Hidrofilni deo molekule surfaktanta naziva se glavom molekule, a čine ga anjonske (soli sulfatne kiseline, sulfati alkohola, alkilbenzen sulfonati, estri fosforne kiseline i soli karbonskih kiselina), katjonske (poliamidi i njihove soli, kvaternarne amonijum soli i oksidi amina) ili nejonizovane grupe (polioksietilen alkilfenoli, alkohol etoksilati, alkilfenol etoksilati i alkanoamidi). Hidrofobni deo surfaktanta je često dugi ugljenovodonični niz i naziva se repom molekula. Hidrofobne strukture orijentisane su ka unutrašnjosti micela i formiraju jezgro zaštićeno od rastvarača polarnim grupama glave surfaktanta. Micelarnim mobilnim fazama se dodaje mala količina organskog modifikatora da bi se povećala njena eluciona moć i efikasnost. Obično se dodaju alkoholi kratkog lanca (2-5%, v:v) i organski rastvarači (15-20%, v:v). U vodenoj fazi koncentracija slobodnog surfaktanta je u ravnoteži sa surfaktantom adsorbovanim na stacionarnoj fazi sa jedne strane i micelama sa druge strane. Monomeri jonskih surfaktanta su adsorbovani na površini stacionarne faze hidrofobnim interakcijama između repa surfaktanta i alkil radikala stacionarne faze. Naelektrisana glava surfaktanta tako ostaje u kontaktu sa vodenom fazom. Zbog ovakvog sastava micelnog hromatografskog sistema, retencija supstanci je veoma složena, odnosno prisutne su višestruke interakcije. Rastvorene supstance mogu ostati izvan micela u interakciji sa polarnom glavom surfaktanta tj. adsorbovane na hidrofilnoj površini micela, mogu biti u unutrašnjosti micela (jezgru) ili u međufazi jezgra i omotača. Rastvorene supstance mogu hidrofobnim interakcijama biti vezane za nepolaran rep adsorbovanog surfaktanta ili sa stacionarnom fazom, odnosno polarnim interakcijama sa naelektrisanom glavom adsorbovanog surfaktanta ili slobodnim silanolnim grupama stacionarne faze. Nepolarne supstance uglavnom grade hidrofobne veze sa micelama i stacionarnom fazom. Jonizovane supstance mogu biti privučene ili

odbijene u zavisnosti od naelektrisanja. Dakle, u ovom sistemu retencija supstanci predstavlja rezultat njenog ponašanja u više ravnotežnih sistema: raspodele rastvorene supstance između micela i vodene faze, raspodela rastvorene supstance između stacionarne faze i vodene faze, direktan transfer između micela i monosloja surfaktanta na površini stacionarne faze. Slika 1 prikazuje C18 stacionarnu fazu i analit koji je u interakciji sa natrijum-dodecilsulfatom vezanim za stacionarnu fazu, kao i delom koji je grupisan u micela. Zbog ovakve raspodele hromatografsko ponašanje analita je kompleksnije nego kod klasične reverzno-fazne hromatografije [12-17]. Upravo zbog toga, prednost micelarne hromatografije se ogleda u veoma širokom opsegu analita koji se mogu rastvarati u micelarnom rastvoru, što značajno pojednostavljuje postupak pripreme uzorka za analizu i dodatno smanjuje utrošak organskih rastvarača. Osim toga, postoji mogućnost i direktnog injektovanja uzoraka biološkog materijala. Primenom micelarne hromatografije, omogućena je separacija jedinjenja vrlo različite polarnosti, posebno je pogodna za analizu baznih i hidrofilnih jedinjenja koja se inače eluiraju sa frontom rastvarača. Micelarne mobilne faze su stabilne, nezapaljive, biodegradabilne, manje toksične i ekonomičnije od kovencionalnih. Ograničenja u upotrebi micelarnih mobilnih faza ogledaju se u tome što se pri korišćenju većih koncentracija surfaktanata povećava viskozitet mobilnih faza, kao i inkompatibilnost sa masenim spektrometrom kao detektorom zbog pojave promene u signalu (suprimiranje signala analita, interferirajući signal surfaktanta) [12, 13, 17].



Slika 1. Okruženje analita u micelarnom hromatografskom sistemu
 Figure 1. Analyte environment in micellar chromatographic system

Upotreba cikodekstrina kao aditiva hromatografskih mobilnih ili stacionarnih faza omogućava razvoj ekološki prihvatljivih analitičkih metoda pošto se enzimskom konverzijom proizvode od skroba, prirodnog i obnovljivog materijala [16-19]. Ciklodekstrini su sastavljeni od 6, 7 ili 8 jedinica *D*-glukoze (α -, β -, ili γ -ciklodekstrin) međusobno povezanih α -(1,4) vezama tako da čine strukturu skraćenog konusa. Slika 2 prikazuje strukturu β -ciklodekstrina. Unutrašnja šupljina konusa je prekrivena glikozidnim etarskim mostovima i C-H grupama koje joj daju hidrofobni karakter, dok su primarne i sekundarne hidroksilne grupe na spoljašnjim stranama konusa relativno hidrofilne. Ovakva građa ciklodekstrina omogućava im da grade inkluzione komplekse sa velikim brojem molekula koji se delimično ugrađuju u unutrašnjost njihove šupljine. Ciklodekstrini se vrlo lako mogu i sintetisati, a njihovom derivatizacijom, koja uključuje dodatak hidroksilnih grupa, modifikuje se rastvorljivost u vodi i selektivnost (dodatne interakcije sa analitom) [17, 18]. Slično kao i kod prethodno opisane upotrebe micela, proces povezivanja gostujućih molekula sa ciklodekstrinima je u ravnoteži sa distribucijom između stacionarne i mobilne faze. Takođe, kod jedinjenja sa hiralnim centrima, konstanta stabilnosti nagrađenog kompleksa se razlikuje zavisno od upotrebljenog enantiomera [20]. Uopšteno, povećanje količine ciklodekstrina u mobilnoj fazi, uglavnom dovodi do smanjenja retencije analita. U kontekstu zelene hromatografije, ovo omogućava smanjivanje udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi [17, 18]. Osim analize jedinjenja inače slabo rastvornih u vodi, primenom ciklodekstrinskih mobilnih faza kvalitet separacije u smislu selektivnosti i rezolucije nije ugrožen [20, 21]. U isto vreme, imajući u vidu bioanalitičke metode, kao i u slučaju micela, moguće je direktno injektovanje uzoraka za analizu pošto ciklodekstrini mogu da solubilizuju proteinske komponente uzorka [21]. Međutim, zbog ograničene rastvorljivosti ciklodekstrina u smešama vode i alkohola (uobičajene mobilne faze su sastavljene od metanola i vode), dolazi do povećanja pritiska u sistemu i smanjenja efikasnosti kolone. Zbog toga se obično upotrebljavaju vodeni rastvori ciklodekstrina koncentracija 3-15 mM [18]. Takođe, u literaturi se nalaze i primeri primene i micela i ciklodekstrina zajedno kao aditiva mobilnih faza u tečnoj hromatografiji. U tom slučaju su kombinovani njihovi uticaji na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, kao i povoljnosti u kontekstu iznalaženja ekološki prihvatljivih rešenja tokom razvoja analitičkih metoda [21].



Slika2. Struktura β -ciklodekstrina

Figure 2. β -cyclodextrin structure

Jonske tečnosti (eng. *ionic liquids* – IL) se poslednjih godina sve više upotrebljavaju kao aditivi hromatografskih mobilnih i stacionarnih faza i kao delovi membranskih filtera ili rastvarača za ekstrakciju u fazi pripreme uzoraka. IL predstavljaju soli koje su na sobnoj temperaturi u tečnom agregatnom stanju, a sastavljene su od velikih asimetričnih organskih katjona (imidazolijum, pirolidinijum, piridinijum, amonijum ili fosfonijum jon) i neorganskih ili organskih anjona (tetrafluoroborat ili bromidni jon). Različita kombinacija katjona i anjona omogućava im da imaju vrlo različit viskozitet ili polarnost (često se u literaturi nazivaju i dizajnerski rastvarači), ali generalno svim IL je zajedničko da imaju dobru termičku stabilnost, neisparljive su, nezapaljive, dobro se mešaju sa vodom i organskim rastvaračima i vrlo lako rastvaraju veliki broj neorganskih i organskih supstanci. Zbog svega ovoga, primena IL u razvoju novih hromatografskih metoda je trenutno veoma aktuelna, a svakako se uklapaju i u koncept ekološke prihvatljivosti [22, 23].

Načini za skraćenje ukupnog trajanja analitičkog postupka

Važan aspekt ekološke prihvatljivosti hromatografskih metoda je skraćivanje postupka pripreme uzorka za analizu. U ovom smislu, izloženost analitičara uticaju toksičnih rastvarača se može smanjiti primenom postupaka sa direktnim injektovanjem uzorka, kad god je to moguće. Na ovaj način se smanjuje upotreba materijala kao što su organski rastvarači, sorbensi, kertridži i slično, i skraćeno je vreme koje protekne od trenutka prikupljanja uzoraka do dobijanja rezultata. Međutim, direktna hromatografska analiza je izvodljiva samo u slučaju relativno čistih uzoraka jer inače može doći do skraćivanja životnog veka hromatografske kolone [4].

Ponekad se analitički uređaj postavlja *at-line* ili *on-line* što takođe skraćuje vreme ukupnog trajanja analitičkog postupka. Sa ovim u skladu je i relativno noviji koncept minijaturizacije analitičkih instrumenata (eng. *lab-on-a-chip*). Primena smanjenih instrumenata zahteva manje resursa za rad, stvara manje otpada i štedi energiju. Takođe, hromatografi koji su obično veličine metalnog novčića, lako se prenose i u slučaju masovne proizvodnje, mogu biti vrlo jeftini [4, 24].

Kada je potrebno potpuno okarakterisati sastav veoma kompleksnih smeša kao što su uzorci poreklom iz živih organizama ili životne sredine, obično je potrebno izvršiti veliki broj hromatografskih analiza. Potreba za povećanjem broja supstanci sa odgovarajućim stepenom razdvojenosti postignutim u samo jednom hromatografskom ranu (povećanje kapaciteta pikova) dovela je do razvoja multidimenzionalnih tehnika. U ovom slučaju se na isti uzorak primenjuje više separacionih mehanizama. Na primer, dvodimenzionalna tečna hromatografija (eng. *two-dimensional liquid chromatography* – 2D-LC ili LC×LC) se može postići primenom dva modela. Prvi se označava u literaturi kao *heart-cutting* i podrazumeva da se izabrana frakcija ili više njih iz prve dimenzije, odnosno sa jedne hromatografske kolone, usmerava na drugu dimenziju (kolonu)

pomoću odgovarajuće skretnice. Kod drugog tzv. sveobuhvatnog modela, ceo eluent prelazi iz jedne u drugu dimenziju. Za ostvarenje koncepta multidimenzionalne separacije, neophodna je kompatibilnost (ortogonalnost) stacionarnih i mobilnih faza (npr. reverzo-fazna i tečna hromatografija hidrofilnih interakcija). Prednost ovakvih metoda je prevencija kontaminacije i/ili gubitka uzorka, kao i mogućnost automatizacije analitičkog postupka. Sa druge strane, konstrukcija instrumenta je složenija, kao i upravljanje rezultatima i postavljanje optimalnih eksperimentalnih uslova [4, 25, 26].

Zaključak

Tokom razvoja novih analitičkih metoda uobičajeno se vrši optimizacija kritičnih analitičkih parametara razdvajanja i validacionih parametara. Međutim, istraživanja obavljena poslednjih godina pokazala su da analitičke laboratorije za sobom proizvode velike količine toksičnih otpadnih materija, pa je zato neophodno tokom razvoja metoda obratiti pažnju na aspekte koji se tiču bezbednosti analitičara, kao i uticaja na životnu sredinu. U ovom radu je predstavljen kratak pregled različitih ekološki prihvatljivih rešenja u analitici lekova primenom tečne hromatografije koje bi trebale postati obavezni činilac svih savremenih analitičkih metodologija.

Zahvalnica

Ovaj rad predstavlja deo rezultata naučno-istraživačkog projekta broj 172033 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

Literatura

76. Welch C, Wu N, Biba M, Hartman R, Brkovic T, Gong X, Helmy R, Schafer W, Cuff J, Pirzada Z, Zhou L. Greening analytical chromatography. *T Anal Chem.* 2010; 29 (7): 667-680.
77. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. Green Analytical Chemistry. *T Anal Chem.* 2008; 27 (6): 497-511.
78. Cielecka-Piontek J, Zalewski P, Jelinska A, Garbacki P. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia.* 2013; 76: 1429-1437.

79. Plotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Gorecki T, Namiesnik J. Green chromatography. *J Chromatogr A*. 2013; 1307: 1– 20.
80. Rocco A, Maruska A, Fanali S. Enantiomeric separations by means of nano-LC. *J Sep Sci*. 2013; 36: 421-444.
81. Protić A, Živanović Lj, Zečević M, Jocić B. Development of liquid chromatographic method for simultaneous determination of mycophenolate mofetil and its degradation product mycophenolic acid in dosage form. *J Chromatogr Sci*. 2009; 50: 149-155.
82. Živanović Lj, Protić A, Zečević M, Jocić B, Kostić M. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2009; 50: 640-648.
83. Protić A. Razvoj metoda za ispitivanje stabilnosti mikofenolat mofetila i praćenje mikofenolne kiseline i glukuronida mikofenolne kiseline u plazmi i urinu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet; 2011.
84. Otašević B, Milovanović S, Zečević M, Golubović J, Protić A. UPLC method for determination of moxonidine and its degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage form. *Chromatographia*. 2014; 77 (1-2): 109-118.
85. Golubović J, Protić A, Zečević M, Otašević B, Mikić M. Artificial neural networks modelling in UPLC method optimization of mycophenolate mofetil and its degradation products. *J chemometr*. 2014; 28: 567-574.
86. Milovanović S. Hemometrijski pristup u ispitivanju moksonidina, njegovih nečistoća i potencijalnih degradacionih proizvoda primenom metoda tečne hromatografije i masene spektrometrije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet; 2014.
87. Nishi H. Pharmaceutical applications of micelles in chromatography and electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1997; 780: 243-264.
88. Martinez-Algaba C, Bermudez-Saldana JM, Villanueva-Camanas RM, Sagrado S, Medina-Hernandez MJ. Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 40: 312-321.
89. Živanović Lj, Ivanović I, Vladimirov S, Zečević M. Stability testing of cefuroxime in tablets by micellar liquid chromatography. *Chromatographia*. 2004; 60: S61-S66.
90. Youngvises N, Chaida T, Khonyoung S, Kuppithayanant N, Tiyapongpattana W, Itharat A, Jakmunee J. Greener liquid chromatography using a guard column with micellar mobile phase for separation of some pharmaceuticals and determination of parabens. *Talanta*. 2013; 106: 350–359.
91. Gonzalez-Ruiz V, Leon A, Olives A, Martin A, Menendez JC. Eco-friendly liquid chromatographic separations based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives. *Green Chem*. 2011; 13: 115-126.
92. Ivanović I. Ispitivanje i praćenje stabilnosti diastereoizomera cefuroksimaksetila i njegovih geometrijskih i položajnih izomera u tabletama primenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom i micelarne tečne hromatografije. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet; 2004.

93. Marks D. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of LY309887 (thienyl-5,10-dideazatetrahydrofolate) stereoisomers using β -cyclodextrin as a mobile phase additive. *J chromatogr sci.* 1997; 35: 201-205.
94. Chen D, Jiang S, Chen Y, Hu Y. HPLC determination of sertraline in bulk drug, tablets and capsules using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as mobile phase additive. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 34: 239–245.
95. Oros G, Cserhati T, Maria Szogyi M. Cyclodextrins in chromatography. Part 1. Liquid chromatographic methods. *Eur Chem Bull.* 2013; 2(11): 920-926.
96. Albishri HM, Abd El-Hady D, Tayeb R. Eco-Friendly Simultaneous Chromatographic Determination of Amiloride Hydrochloride, Atenolol, and Hydrochlorothiazide in Urine. *Acta Chromatographica.* 2015; 27: 461–476.
97. Han D, Ho Ro K. Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology. *Molecules.* 2010; 15: 2405-2426.
98. Huang Y, Yao S, Song H. Application of Ionic Liquids in Liquid Chromatography and Electrodriven Separation. *J Chromatogr Sci.* 2013;51:739–752.
99. Temiz Y, Lovchik R, Kaigala G, Delamarche E. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectron Eng.* 2015; 132: 156-175.
100. Elsner V, Laun S, Melchior D, Kohler M, Schmitz O. Analysis of fatty alcohol derivatives with comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J chromatogr A.* 2012; 1268: 22-28.
101. Jandera P. Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2006; 29: 1763-1783.

The application of ecologically acceptable concept in liquid chromatographic method development in drug analyses

Biljana Otasevic*, Ana Protic, Jelena Golubovic, Mira Zecevic

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug analysis, Vojvode Stepe 450, 11 152 Belgrade

*e-mail: biljana.otasevic@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Liquid chromatography is the most widely used analytical technique in course of research and development, as well as for routine investigation and quality control of pharmaceutical products. Having in mind the remarkable amount of waist resulting from the use of organic solvents, especially for reversed-phase liquid chromatography, recently ecologically acceptable concepts in chromatographic method development were noticed. The 3 Rrule (*Reduce – Replace – Recycle*) refers to the decrease of the toxic solvents use, their replacement with less toxic ones and the use of renewable solvents. This paper presents different solutions commonly applied in drug analysis that are in accordance with the 3 Rrule.

Keywords: drug analysis, liquid chromatography, the use of organic solvents, ecologically acceptable solutions
