

POREĐENJE HPLC I UHPLC METODA U FARMACEUTSKOJ ANALIZI

Maja Mihajlović¹, Jasmina Šljivić²

Apstrakt

Savremene hromatografske metode imaju široku primjenu u razvoju i kontroli kvaliteta aktivnih farmaceutskih supstanci i gotovih proizvoda. Najviše se primjenjuje tečna hromatografija visokih performansi koja je pogodna za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Ipak, posljednjih godina sve veću primjenu nalazi i relativno nova tehnika tečne hromatografije pod ultravisokim pritiskom koja je zadržala prednosti klasične tečne hromatografije visokih performansi, ali je dodatno unaprijeđena efikasnijim hromatografskim performansama. U radu je izvršeno poređenje ove dvije savremene, efikasne i po principu veoma slične hromatografske metode koje su pronašle opsežnu primjenu u analizi aktivnih farmaceutskih supstanci i gotovih proizvoda. Značajno je sagledati sve razlike u primjeni ove dvije metode u rutinskoj analizi vodeći se naučno utemeljenim dokazima za njihove prednosti i nedostatke. Veliki doprinos su pružile i stacionarne faze koje imaju čestice malih dimenzija koje podnose veći pritisak u odnosu na klasične stacionarne faze, pa je stoga neophodno izvršiti i dodatna prilagođavanja sistema.

Ključne riječi: HPLC, UHPLC, tečna hromatografija, farmaceutska analiza

Uvod

Tokom razvoja bilo kojeg lijeka, kao i u kasnijoj kontroli njegovog kvaliteta, izuzetno važnu ulogu ima farmaceutska analiza. Ona se provodi se u svim fazama razvoja lijeka, počev od sinteze supstance, do procjene bioraspodivnosti gotovog lijeka. Zahvaljujući ovom postupku lijek dobija potvrdu o svom kvalitetu, efikasnosti i bezbjednosti, na osnovu čega se i može dobiti odobrenje za stavljanje lijeka u promet.

U farmaceutskoj analizi lijekova teži se primjeni što osjetljivijih analitičkih metoda koje obezbjeđuju odgovarajuću selektivnost. Primjer su određene hromatografske metode, prvenstveno tečna hromatografija visokih performansi (HPLC, eng. high performance liquid chromatography) i tečna hromatografija ultra visokih performansi (UHPLC, eng. ultra high performance liquid chromatography), koje se zbog svojih povoljnih karakteristika primjenjuju na

¹Maja Mihajlović, Univerzitet „BIJELJINA“ Bijeljina, Farmaceutski fakultet, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina, Tel.: 065 490 599, e-mail: maja.maja40@gmail.com

²Jasmina Šljivić, Ph.D., Docent, Univerzitet „Bijeljina“ Bijeljina, Farmaceutski fakultet, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina, Tel.: 061 641 232, e-mail: jasminasljivic86@gmail.com

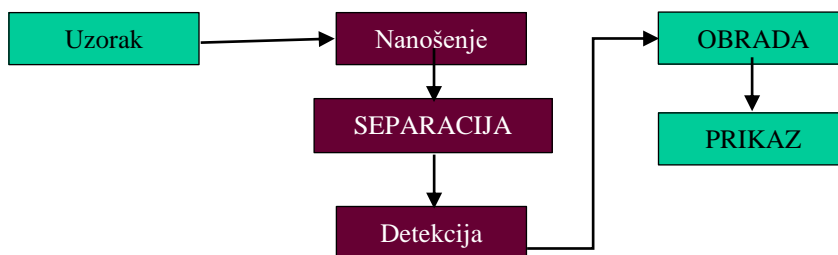
različitim naučnim poljima, između ostalog i u farmaceutskoj analizi. Princip hromatografske analize, sudeći po definicijama koje predlažu IUPAC (eng. International Union for Pure and Applied Chemistry, 2006) i Medenica i Pejić (2018), se zasniva na razdvajanju komponenti smješe koje se odvija na granici između dvije faze koje se međusobno ne miješaju. Prva faza je nepokretna i naziva se stacionarna faza, a može biti u tečnom ili čvrstom agregatnom stanju, pakovana unutar kolone ili vezana za određenu podlogu. Druga faza je pokretna, naziva se mobilna i može biti tečnost, gas ili fluid u superkritičnom stanju (Tabela 1).

Tabela 1. Hromatografske tehnike prema fizičkom, odnosno agregatnom stanju mobilne i stacionarne faze

MOBILNA FAZA	STACIONARNA FAZA	HROMATOGRAFSKA TEHNIKA
Gasna	Tečna	Gasno-tečna ili češće gasna hromatografija
	Čvrsta	Gasno-čvrsta ili češće gasna hromatografija
Tečna	Tečna	Tečno-tečna ili češće tečna hromatografija – uključuje papirnu hromatografiju i HPLC
	Čvrsta	Tečno-čvrsta ili češće tečna hromatografija – uključuje tankoslojnu, papirnu, HPLC i UHPLC
Superkritični fluid	Čvrsta	Hromatografija sa superkritičnim fluidima

Izvor: Prilagođeno prema: Medenica i Pejić, 2018

Osim prema agregatnom stanju faza, hromatografske metode se mogu podijeliti i na osnovu geometrije stacionarne faze na planarnu hromatografiju (koja se izvodi na ravnim površinama) i hromatografiju u koloni. Takođe, prema postavljenom cilju izvođenja analitičkog postupka hromatografija se dijeli na preparativnu koja omogućava izdvajanje i prikupljanje komponenti iz smješe i analitičku koja podrazumijeva kvalitativno-kvantitativnu analizu smješe i koristi se u analizi lijekova. **Grafikon 1.** prikazuje šemu izvođenja analitičkog postupka (Mihajlović, 2024).



Grafikon 1. Šema izvođenja analitičkog postupka

Izvor: Mihajlović, 2024, prema Medenica i Pejić, 2018

Tečna hromatografija visokih performansi

Naziv hromatografija uveden je početkom dvadesetog vijeka i od tada do danas su otkrivene različite hromatografske metode, koje se kontinuirano unapređuju. Samo neke od njih svoju primjenu pronalaze u farmaceutskoj analizi, ali je upravo bez istih analiza lijekova, kao i određenih prehrambenih proizvoda, nezamisliva. Najviše se primjenjuje HPLC metoda, kako u kontroli kvaliteta lijekova, tako i u drugim oblastima. HPLC uređaji su i danas prisutni u gotovo svim savremenim laboratorijama, bilo da se one bave kontrolom kvaliteta lijekova, biohemijskim ispitivanjima ili sličnim poslovima. Ovo je relativno mlada instrumentalna metoda, koja se jako brzo razvijala i u kratkom vremenskom periodu postala jako značajna. Na početku razvoja se izvodila na način da je mobilna faza propuštana kroz kolonu pod visokim pritiskom. Zbog toga se skraćenica HPLC u to vrijeme odnosila na tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (eng. *high pressure liquid chromatography*). Vremenom je metoda unaprijeđena, uvedene su nove stacionarne faze, poboljšale su se pumpe, razvili veoma precizni injektori i još osjetljiviji detektori, te se odrednica *pressure* pretvorila u *performance*. „Visoke performanse“, iz današnje skraćenice HPLC zajednički su naziv za skup karakteristika HPLC metode i to za efikasnost, selektivnost, osjetljivost, reproduktivnost, brzinu, automatizaciju, kontrolu eksperimentalnih parametara i slično (Medenica i Pejić, 2018).

Upravo nabrojane performanse su omogućile da HPLC postane ključna metoda za praćenje stabilnosti lijekova i osiguranje njihovog kvaliteta, kao i za razdvajanje i pojedinačnu analizu komponenti farmaceutske formulacije. Ova hromatografska metoda je vrlo fleksibilna, zbog čega se rutinski primjenjuje u farmaceutskoj industriji, istraživačkim, analitičkim, kao i kliničkim laboratorijama. Kroz svoju praksu koja traje sada već više od 30 godina dokazala se kao jedna od najdominantnijih i najvažnijih tehnologija koje se koriste u analitičkim laboratorijama za analizu lijekova širom svijeta. Obično se koristi za analizu neisparljivih jedinjenja (Ravi Sankar et al., 2019, Srivastava et al., 2010, Van Deemter et al., 1965).

Princip HPLC metode se zasniva na tome da se kroz kolonu sa stacionarnom fazom pod visokim pritiskom propušta analizirana smješa, rastvorena najčešće u mobilnoj fazi. Komponente smješe se različitim redoslijedom zadržavaju na površini stacionarne faze, što za posljedicu ima različit redoslijed izlaska sa kolone, tj. različita vremena zadržavanja u koloni (retencionna vremena). Zavisno od polarnosti mobilne i stacionarne faze, HPLC može biti hromatografija reverznih i normalnih faza. Kvalitativna analiza (identifikacija) se vrši na osnovu reprezentativnog hromatograma ili relativnog retencionog vremena, koje dobijamo poređenjem retencionog vremena posmatranog pika (na primjer pik analizirane nečistoće) sa retencionim vremenom referentnog pika (na primjer pik aktivne supstance) (Malenović i Stojanović, 2010).

S druge strane, kvantitativna analiza (kvantifikacija), koja predstavlja određivanje koncentracije neke komponente, vrši se poređenjem izmjerene površine pika analita sa površinom pika referentnog standarda. Za kvantitativnu analizu koriste

se: metoda kalibracione krive, metoda normalizacije površina i metoda unutrašnjeg (internog) standarda (Pertot, 2005).

Jedan od osnovnih problema sa kojim se analitičari susreću kod razvoja ove tehnike je uticaj materijala za pakovanje na razdvajanje u koloni. Kod primjene ovog mehanizma razdvajanja osnovna je Van Deemeterova jednačina koja opisuje odnos između brzine protoka (linearne brzine) i visine platoa, a koja glasi:

$$H=A+B/v +Cv \quad (1)$$

U navedenoj jednačini, koja je zapravo empirijska formula, A se odnosi na vrtložno miješanje, B je aksijalna difuzija, dok je C prenos mase rastvora. Pošto je veličina čestica jedna od promjenljivih, Van Deemeterova kriva, u kojoj su A, B i C konstante, a v linearna brzina, tj. brzina protoka gasa nosača, se može koristiti za ispitivanje hromatografskih performansi. Termin A ne zavisi od brzine i predstavlja „vrtložno“ miješanje. Najmanji je u slučaju kada su čestice nabijene kolone male i ujednačene. Konstanta B predstavlja prirodnu tendenciju difuzije molekula. Obzirom da se ovaj efekat smanjuje pri visokim brzinama protoka, ovaj član se dijeli sa v. Izraz C je posljedica kinetičke otpornosti na ravnotežu u procesu odvajanja. Kinetički otpor predstavlja vremensko zakašnjenje potrebno za prelazak iz gasne u stacionarnu fazu pakovanja i nazad. Što je protok gasa veći, to više molekula na pakovanju teži da zaostaje za molekulima u mobilnoj fazi. Stoga je član C proporcionalan v (Zhang et al, 2000, Zhou et al., 2005, Zhu et al., 2005).

Tečna hromatografija ultra visokih performansi

Tečna hromatografija ultra visokih performansi (UHPLC) predstavlja unapređenu verziju HPLC metode, jer se zasniva na istim principima kao i HPLC, ali se odlikuje drugačijim performansama. Osnovna razlika između ove dvije metode je u veličini čestica materijala kolone. Kod UHPLC metode veličina čestica je manja od 2 μm, što povećava prednosti kolone, odnosno stvara robusno, snažno i pouzdano rješenje. Sve navedeno doprinosi poboljšanju performansi UHPLC metode u odnosu na HPLC tehniku (Taleuzzaman et al., 2015).

Pored navedenih prednosti efikasnost UHPLC-a se može još i dodatno poboljšati. Upotreba visoke temperature smanjuje viskozitet mobilne faze, kao i brzinu protoka ukoliko je visoka. Povratni pritisak je u ovom slučaju značajno smanjen. Karakteristika specifična za UHPLC analizu, koja takođe čini UHPLC tehniku drugačijom od HPLC, su međusobno povezani skeleti, kao i međusobno povezani putevi protoka (kroz pore) koji se nalaze u monolitnim kolonama. Uporedna istraživanja su pokazala da je u UHPLC hromatogramu bolja rezolucija i separacija u odnosu na HPLC, a prednosti UHPLC tehnike su i mogućnost izvođenja osjetljivijih analiza, smanjenje potrošnje rastvarača i velika brzina analize (Tanaka et al., 2001, Wu et al, 2004).

Hemija malih čestica stacionarne faze

Ideal Van Deemeterove jednačine, ne može se izvesti bez upotrebe čestica manjih od onih koje se tradicionalno koriste u HPLC analizama. Zbog ove činjenice, naučnici iz ove oblasti su posljednjih godina fokusirani na dizajniranje i razvoj

čestica manjih od 2 μm , što predstavlja značajan i aktuelan izazov u ovoj oblasti. Van Deemterova grafika ilustruje evoluciju veličine čestica u poslednje tri decenije. Decenijama unazad, aktuelno je i pitanje ubrzavanja analiza. Ovakva „potreba za brzinom“ pri istraživanjima u okviru otkrivanja lijekova proizašla je iz odabira velikog broja uzoraka u različitim laboratorijama i istovremene dostupnosti sofisticiranih instrumenata kao što je UHPLC sa detektorom kao što je maseni spektrometar. Tokom analiza istražena je i primjena veće temperature, koja pruža dvostruke prednosti jer utiče na smanjenje viskoziteta i povećanje prenosa mase povećanjem difuzivnosti analita. Međutim, pri upotrebi konvencionalnih veličina čestica i pritisaka, granične akcije se brzo postižu, te se moraju napraviti kompromisi, pri čemu se najčešće ugrožava rezolucija u korist vremena (Nguyen et al., 2006).

Prilikom poređenja analiza UHPLC metodom i klasičnom HPLC metodom razdvajanja, utvrđeno je da u HPLC-u postoje mnoge prednosti kao što su robusnost, jednostavnost upotrebe, dobra selektivnost i podesiva osjetljivost, ali da je glavno ograničenje nedostatak efikasnosti u poređenju sa gasnom hromatografijom ili kapilarnom elektroforezom zbog niskih koeficijenata difuzije u tečnoj fazi, uključujući sporu difuziju analita u stacionarnoj fazi. Moguće je izvršiti povećanje efikasnosti klasične HPLC separacije. Rad na višim temperaturama omogućava velike brzine protoka smanjenjem viskoziteta mobilne faze što značajno smanjuje otpor protoka. Efikasnost može povećati i upotreba monolitnih stubova koji sadrže polimerizovanu poroznu potpurnu strukturu koja pruža niže otpore protoka od uobičajenih kolona sa česticama (Unger et al., 2000, Wu et al., 2001).

Korištenjem navedena dva parametra analiza postaje brža, osjetljivija i dobija se hromatogram sa jasnim vrhom, dobijaju se ultra visoke performanse i tada se govori o tečnoj hromatografiji ultra visokih performansi. Upotreba malih čestica štedi vrijeme i smanjuje potrošnju rastvarača. Nova metoda zadržava istu analitičku sposobnost razdvajanja kao HPLC, koja je pronašla široku primjenu, a istovremeno prevazilazi određene nedostatke HPLC analize, tj. omogućava veću brzinu i osjetljivost analize uz visoku rezoluciju. U današnjem vremenu borbe za tržište i utrkivanja za patentnu zaštitu, velike farmaceutske kuće se odlučuju za novi način koji smanjuje troškove i vrijeme razvoja lijekova, pri tome ne utičući na kvalitet njihovih proizvoda. Upotrebom UHPLC metode analitičke laboratorije uspijevaju da ispune najviše očekivanja do sada. Brzina omogućava da se izvede veći broj analiza u kraćem vremenskom periodu, čime se povećava protok uzoraka i produktivnost laboratorije. Sve navedeno su prednosti brže analize, a time i tečne hromatografije ultra visokih performansi. Kako bi se postigla veća propusnost analize uzorka i bolja osjetljivost analize, tipični test je optimizovan za UHPLC sistem. Analizom operativnih troškova i propusnosti uzorka utvrđeno je da je cijena UHPLC sistema povoljnija u odnosu na HPLC sistem (Zhang et al., 2000, Zhou et al., 2005, Zhu et al., 2005).

Manje čestice ne obezbjeđuju samo povećanu efikasnost, već one imaju sposobnost da rade pri većoj linearnoj brzini bez gubitka efikasnosti, obezbjeđujući paralelno i rezoluciju i brzinu. Efikasnost je osnovni parametar koji izdvaja

UHPLC, jer se ova metoda, kao što je navedeno oslanja na istu selektivnost i zadržavanje kao HPLC. Ukoliko se veličina čestica smanjuje za faktor tri, broj teorijskih platoa se povećava za tri, a rezolucija za kvadratni korijen od tri (Gerber, 2004, Greibrokk and Andersen, 2003, Zhou et al., 2005, Zhu et al., 2005).

Što su vrhovi pikova uži, to ih je lakše međusobno odvojiti. Visina pika je obrnuto proporcionalna širini pika. Veličina čestice se smanjuje da bi se povećao broj teorijskih platoa, a potom i rezolucija, pri čemu se povećava osjetljivosti. Ukoliko se veličina čestica smanjuje, optimalni protok za postizanje maksimuma broja teorijskih platoa se povećava. Efikasnost je proporcionalna dužini kolone i obrnuto proporcionalna veličini čestica, pa se kolona može skratiti za isti faktor kao i veličina čestica i to bez gubitka rezolucije. Primjenom tri puta veće brzine protoka zbog manjih čestica i primjenom kolone koja je skraćena za jednu trećinu, razdvajanje se završava za 1/9 vremena uz zadržavanje rezolucije. Dizajn i razvoj čestica ispod 2 μm je veoma značajan izazov za sve istraživači koji su već neko vrijeme aktivni po ovom pitanju i koji pokušavaju da iskoriste njihove prednosti (Zhang et al., 2000, Zhou et al., 2005).

Iako su visokoefikasne neporozne čestice od 1,5 μm komercijalno dostupne, one imaju loš kapacitet opterećenja i zadržavanja zbog male površine. Čestice na bazi silicijum-dioksida posjeduju dobru mehaničku čvrstoću. S druge strane one imaju brojne nedostatke koje obuhvataju ograničen pH opseg i zadržavanje osnovnih analita. Polimerne kolone mogu prevazići pH ograničenja, ali imaju nisku efikasnost, ograničen kapacitet opterećenja i slabu mehaničku čvrstoću. Kompanija Waters je 2000. godine predstavila XTerra®, prvu generaciju hibridne hemije. Ove kolone su mehanički jake, visoke efikasnosti i pogodne za primjenu u proširenom pH opsegu (Greibrokk and Andersen, 2003, Zhu, 2005).

Pri izvođenju UHPLC, uvođenje uzorka je kritično. Konvencionalni ventili koji služe za ubrizgavanje neovisno o tome da li su automatizirani ili ručni, nisu dizajnirani niti ojačani za rad pod ekstremnim pritiskom. Kako bi se kolona zaštitila od ekstremnih fluktuacija pritiska, proces ubrizgavanja mora biti relativno bez impulsa, a volumen uređaja također mora biti minimalan kako bi se smanjilo potencijalno širenje pojasa. Brzo vrijeme ciklusa ubrizgavanja je neophodno kako bi se u potpunosti iskoristila brzina koju pruža UHPLC. Injekcije malog volumena sa minimalnim prijenosom također su potrebne za povećanje osjetljivosti. Rezolucija UHPLC kolona je povećana u koloni sa česticama od 1,7 μm jer je efikasnost bolja (Taleuzzaman et al., 2015).

Od samog uvođenja HPLC metode karakteristike aparature koja se koristi za njeno izvođenje se razvojem tehnologije konstantno usavršavaju, ali su osnovni dijelovi ovog sistema ostali isti i to su: pumpa, injektor, kolona, termostat za kolonu, detektor, sistema za prikupljanje i obradu podataka (Lough and Wainer, 1996). Za HPLC, kao i za UHPLC analizu koriste se UV/VIS detektori. Konvencionalno se detekcija analita zasniva na apsorbciji, odnosno detektorima osjetljivim na promjene koncentracije. Kod UHPLC bi se zapremina protočne ćelije morala smanjiti da bi se održala koncentracija i signali. Na osnovu Beerovog zakona, konvencionalne protočne ćelije manje zapremine takođe bi smanjile dužinu puta od koje zavisi jačina signala. Smanjenjem poprečnog presjeka smanjuje se put

svjetlosti, a prenos opada s povećanjem buke, tj. jačine zvuka. Iz navedenog se može izvesti zaključak da bi UHPLC osjetljivost bila ugrožena pri upotrebi konvencionalne HPLC protočne ćelije. Svjetlost se efikasno prenosi niz protočnu ćeliju u režimu unutrašnje refleksije koji održava dužinu putanje protočne ćelije od 10 mm sa zapreminom od samo 500 mL. Svi priključci u sistemu su efikasno usmjereni u cilju održanja niske disperzije i iskorištenja prednosti detektora curenja koji su povezani sa softverom kako bi upozorili korisnika na potencijalne probleme (Gerber et al., 2004, Tanaka et al., 2001).

Prednosti i nedostaci UHPLC

Opsežno poređenje dvije metode ukazuje na postojanje velikih prednosti UHPLC nad klasičnom HPLC. Ova metoda zahtijeva manje utroška vremena i rada, pruža povećanu osjetljivost analize obezbeđujući selektivnost i dinamički opseg tečne hromatografije. Na hromatogramu se dobijaju razdvojeni pikovi. Primjenjuju se metode višestrukih ostataka. Upotreba finih čestica (2 μ m) za pakovanje stacionarne faze čini analizu znatno bržom. Brza analiza daje tačnu kvantifikaciju analita i srodnih proizvoda. Potrošnja rastvarača i uopšteni troškovi analize su smanjeni. Povećanjem protoka uzorka omogućava se analitičarima da analiziraju više proizvoda sa postojećim resursima, a samim tim i proizvođačima da proizvode više proizvoda koji dosljedno ispunjavaju specifikacije očekivanog proizvoda, čak potencijalno elimišući varijabilnost, neuspjele serije, te potrebu za ponovnom obradom materijala. Omogućava se i analiza u realnom vremenu koje u korak prati proizvodni proces. Takođe se i osigurava kvalitet krajnjeg proizvoda, uključujući testiranje konačnog izdanja.

Nijedna analitička metoda nije savršena. Tako, iako pruža brojne prednosti, relativno nova UHPLC tehnika ima i određene nedostatke. Glavni nedostatak ove analitičke metode je kratak životni vijek kolona. Naime, tokom analize se razvija visok pritisak zbog izrazito male veličine čestica. Povećanje pritiska uzrokuje trenje i brza oštećenja, čime se smanjuje rok trajanja kolona. Navedeno zahtijeva redovno održavanje, odnosno čestu zamjenu kolona, što predstavlja određen finansijski izdatak. Iako je pokazano da je UHPLC metoda za velike kompanije ekonomski isplativa, naučnici bi u budućnosti mogli da rade na pronalaženju načina za otklanjanje ovog nedostatka i usavršavanje kompletnog sistema (Taleuzzaman et al., 2015).

Primjena HPLC metode

Bez obzira na uvođenje inovativne UHPLC metode, HPLC je još uvijek jedna od najzastupljenijih metoda u različitim laboratorijama, a posebno je značajna u oblasti farmacije. Najzastupljenija je hromatografska metoda u mnogim farmakopejama. Na samom kraju dvadesetog vijeka, oko 80% svjetske kontrole kvaliteta lijekova zasnivala se na HPLC. Tada je važila za najosjetljiviju tehniku koja je prva omogućila određivanje srodnih supstanci u velikom opsegu koncentracija, što je bilo naročito pogodno za analizu degradacionih proizvoda u farmaceutskim oblicima. Skoro da ne postoji farmakološka grupa jedinjenja koja,

na različitim stacioniranim fazama i pod prilagođenim uslovima, nije analizirana nekom HPLC tehnikom (Swadesh, 1997).

HPLC tehnika se opsežno primjenjuje kako za kvalitativnu procjenu, tako i za kvantitativnu analizu brojnih jedinjenja koja se nalaze u farmaceutskim proizvodima (aspirin, ibuprofen, paracetamol), soli kao što su na primjer natrijum hlorid i kalijum fosfat, nekih organskih jedinjenja kao što su polimeri polistiren ili polietilen, različitih proteina (bjelance, proteini krvi), teških ugljikoovodonika poput asfalta ili motornog ulja. Ova tehnika ima široku primjenu i pri analizi različitih prirodnih proizvoda kao što su biljni lijekovi ili ekstrakti, kao i termički nestabilna jedinjenja kao što je trinitrotoluen. Ima široko rasprostranjenu primjenu i u kliničkoj hemiji (Ravi Sankar et al., 2019).

Tokom opsežne analize farmaceutskih proizvoda, mogućnosti za primjenu HPLC počinju već od faze razvoja i proizvodnje. Ove mogućnosti nisu ograničene samo na jednu oblast, već je ova analitička metoda značajna pri mnogobrojnim kritičnim koracima koji su potrebni za farmaceutsku analizu koja mora zadržati kriterijum robusnosti. HPLC je tehnika koja definitivno pomaže biofarmaceutskim istraživačima i proizvodnim pogonima u cilju karakterizacije kandidate za lijekove ili tretmane koji pokazuju značajan potencijal. Ove tehnike takođe pomažu tome da se lijekovi proizvode na bezbjedan i dosljedan način. HPLC metoda ima veliki značaj i u istraživanju hemijskih osobina molekula malih veličina, kao i pri razvoju novih bioterapeutika. Ona se primjenjuje za procjenu hidrofobnosti molekula. Veliku primjenu ima i za analizu strukture šećera na monoklonskom antitijelu koje pokazuje značajan uticaj na imuni odgovor.

HPLC se primjenjuje i za određivanje roka trajanja, posebno pojedinih bioterapeutika koji su u znatnoj mjeri podložni agregaciji tokom vremena. Do ove pojave dolazi ukoliko ne skladište pravilno, a HPLC tehnika se svakako može primijeniti za praćenje ove agregacije. Takođe, ova metoda omogućava kvantitativnu analizu molekula, te se primjenjuje za tačno određivanje doza aktivnih sastojaka, jačine i uniformnosti sadržaja, kao i za potvrdu identiteta sirovina, što se odnosi na kvalitativnu analizu (Mihajlović, 2024).

Primjena HPLC metode se koristi i za otkrivanje i identifikaciju nečistoća koje definitivno predstavljaju ozbiljan sigurnosni rizik za pacijente, ukoliko su prisutne u proizvodu u procentu koji je veći od dozvoljenog limita. U cilju obezbjeđenja potpunog i tačnog profila nečistoća, klasične HPLC metode je moguće kombinovati sa drugim visoko efikasnim metodama kao što je na primjer ultraljubičaste spektrofotometrije (Dalal et al., 2021).

HPLC metoda pruža izuzetno važnu mogućnost za praćenje stabilnosti. Stabilnost se odnosi na sposobnosti očuvanja identiteta, sadržaja, kvaliteta i čistoće farmaceutske supstance i gotovog proizvoda koji su predviđeni zahtjevima specifikacije (FDA, 2001). Farmaceutski proizvodi su podložni uticaju različitih spoljašnjih faktora, od kojih se posebno izdvajaju vlaga, kiseonik, svjetlost i toplota. Pod uticajem spoljašnjih faktora mogu se javiti različite fizičko-hemijske i mikrobiološke promjene. Degradacija aktivnih supstanci definitivno dovodi do promjene farmakoloških osobina lijeka, pri čemu se smanjuje terapijska

efikasnosti. Takođe se mogu javiti i toksični efekti. Stoga je od izuzetnog značaja obezbijediti, provjeriti i sačuvati stabilnost lijeka tokom njegove proizvodnje, transporta i čuvanja pri različitim uslovima. HPLC pomaže takođe i pri identifikaciji proizvoda degradacije, kao i pri određivanju nivoa promjene koja nastaje tokom vremena (Mihajlović, 2024).

Prva faza u razvoju metoda za praćenje stabilnosti u kojoj se primjenjuje tečna hromatografija pod visokim pritiskom je provođenje studija forsirane degradacije sa čistom aktivnom komponentom. Nakon toga slijedi ispitivanje interakcije između aktivne supstance i komponenata ekscipijenasa gotovog proizvoda, a potom i optimizacija hromatografskih uslova praćena validacijom metode (Zečević i sar., 2009). Validacija metode je neizostavan dio razvoja koji se odvija nakon postavljanja metode, a odnosi se na postupak potvrde prikladnosti metode za primjenu u određene svrhe u laboratoriji (FDA, 2019; prema Božić, 2020).

HPLC metoda ima mnogobrojne primjene u analizi farmaceutskih proizvoda. Koristi se, na primjer, za kvalitativnu analizu paracetamola, kofeina, acetilsalicilne kiseline i salicilne kiseline kao nečistoće u prašku za oralnu primjenu. Korištenjem HPLC metode mogu se razdvojiti komponente kombinovanog praška koji je zbog cijene i farmaceutskog oblika i danas zanimljiv pacijentima. Metoda omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu komponenata, ali i identifikaciju salicilne kiseline koja predstavlja nečistoću koja se javlja kao degradacioni proizvod acetilsalicilne kiseline (Malenović i Stojanović, 2010).

Primjenom reverzno-fazne HPLC se može provesti i ispitivanje sadržaja aktivne supstance i degradacionih proizvoda/nečistoća u tabletama nimesulida (Tubić i sar., 2013).

U novim istraživanjima se primjenom različitih hromatografskih metoda čak tumači biološka aktivnost i ekotoksičnost određenih supstanci i sintetskih lijekova. Ovakav pristup obuhvata uspostavljanje korelacije između strukture molekule, fizičko-hemijskih osobina i ponašanja koje jedinjenje pokazuje u određenom biološkom medijumu (Vastag et al, 2013).

Apostolov i Đerđi (2021) su razmatrali i biološku aktivnost derivata fenilacetamida, koji predstavlja prekursor za sintezu penicilina i ostalih mnogobrojnih lijekova, prvenstveno nesteroidnih antiinflamatornih lijekova i antimikrobnih veterinarskih lijekova i insekticida.

Primjena UHPLC metode

Jedinstvene karakteristike UHPLC su joj obezbijedile jako veliku potražnju u farmaceutskoj industriji, tako da je ona danas jedna od najkorištenijih analitičkih metoda i polako preuzima prednost nad do sada aktuelnom HPLC metodom. Već je navedeno da zbog visoke rezolucije u hromatogramu, a istovremeno kratkotrajne analize koja omogućava više analitičkog rada za manje vremena sa pouzdanim, vrijednim i autentičnim podacima, velike farmaceutske kompanije percipiraju UHPLC kao isplativu metodu. Zbog tačnosti i preciznosti razvijenih metoda, što daje mogućnost istraživanja analita na nano nivou, UHPLC se često

primjenjuje u analitičkim laboratorijama. Takođe, ova tehnika se može koristiti za analizu biljnog materijala i lijekova biljnog porijekla. Primjena ove metode omogućava razlikovanje standarda analize u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu, kao i kod složenih uzoraka. Kombinovani UHPLC/masena spektrometrija sistem se koristi za generisanje podataka kod složenih smješa supstanci. Koristeći maseni spektrometar kao detektor sa UHPLC-om, moguće je detaljno interpretirati analizu, što je veoma korisno na bioanalitičkom polju. Visoka rezolucija i brza analiza, kao jedinstvene karakteristike UHPLC-a su takođe od velike pomoći u farmakokinetičkim studijama koje mjere fizička i hemijska svojstva jedinjenja, kao što su – adsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje (ADME). UHPLC/masena spektrometrija/masena spektrometrija metoda štedi vrijeme pa se proces razvoja i formulacije lijeka, profiliranje, detekcija i kvantifikacija ljekovitih supstanci i njihovih nečistoća mogu izvršiti vrlo precizno i brzo (Wu et al., 2004).

Zaključak

Osnovni cilj savremenih hromatografskih metoda je da se izvrši pogodno razdvajanje analizirane smješe na sastavne komponente u što je moguće kraćem vremenskom intervalu i da se na reprezentativnom hromatogramu dobiju oštri, simetrični i potpuno razdvojeni pikovi. HPLC metoda ima neprocjenjiv značaj i izuzetno široku primjenu u modernoj farmaceutskoj analizi. Radi se o metodi koja je osjetljiva, brza, selektivna, vrlo efikasna i fleksibilna zbog čega je svakako najzastupljenija metoda rutinskoj praksi za različite namjene u cilju ispitivanja kvaliteta lijekova. Uređaji imaju relativno visoku cijenu, a nedostatak ove metode se takođe ogleda i u činjenici da se identifikacija zasniva na poređenju retencionih vremena pa je stoga korištenje ove metode uglavnom ograničeno na kvantitativnu analizu, kao i na određivanje stepena čistoće farmaceutskih supstanci. Danas se HPLC tehnika često kombinuje i sa drugim instrumentalnim metodama čime se uklanjanju neki od postojećih nedostataka.

UHPLC se odnosi na tehniku razdvajanja koja je definitivno zadržala sve prednosti HPLC uz dodatno unaprijeđene hromatografske performanse. Ona primjenjuje stacionarne faze koje imaju čestice malih dimenzija koje imaju sposobnost da podnesu veći pritisak u odnosu na klasičnu HPLC, pa ovaj sistem zahtijeva dodatna prilagođavanja po pitanju brzine injektovanja, razdvajanja i prikupljanja podataka. Najznačajnije prednosti UHPLC tehnike se odnose na skraćeno vrijeme trajanja analize, dobijanje veoma oštarih i simetričnih pikova, poboljšanje rezolucije i efikasnosti, kapaciteta razdvajanja i osjetljivosti. Najveći nedostatak UHPLC tehnike je visoka cijena kolona i uređaja. Kolone koje se koriste pri izvođenju UHPLC analiza imaju kratak vijek trajanja i slabu regeneraciju.

Literatura

1. Apostolov, S., Đerđi, E. (2021). Hromatografski parametri kao prediktori biološke aktivnosti derivata fenilacetamida, Departman za hemiju, biohemiju

i zaštitu životne sredine, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno - matematički fakultet, Novi Sad, Srbija.

2. Božić, J. (2020). Validacija analitičkih metoda, završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
3. Dalal, P. S., Deshmukh, S. U., Bavage, N. B., Bavage, S. B. (2021). Use Of High-Performance Liquid Chromatography in the Pharmaceutical Industry. *International Journal of Innovative Research in Technology*, 8(2), 506-511.
4. FDA (2001). Guideline for submitting Documentation for the stability of Human drugs and Biologics, Centre for Drugs and Biologics. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, U. S.
5. FDA (2019). Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products 3rd Edition. Food and Drug Administration, Foods Program, U.S.
6. Gerber, F., Krummen, M., Potgeter, H., Roth, A., Siffrin, C., Spöndlin, C. (2004). Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 microm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *J. Chromatogr A.*, 1036, 127-133.
7. Greibrokk, T., Andersen, T. (2003). High-temperature liquid chromatography. *J. Chromatogr A.*, 1000, 743-755.
8. International Union of Pure and Applied Chemistry. (2006). IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 3rd ed.; Online version 3.0.1, (dostupno na: <https://doi.org/10.1351/goldbook.C01075>).
9. Lough, W. J., Wainer, I. W. (1996). High Performance Liquid Chromatography, Blackie Academic & Professional, Glasgow.
10. Malenović, A., Stojanović, B. (2010). Farmaceutska analiza, praktikum, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija.
11. Medenica, M., Pejić, N. (2018). Instrumentalne metode, Beograd, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
12. Mihajlović, M. (2024). Primjena tečne hromatografije visokih performansi u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi lijekova. Prva naučno-stručna konferencija sa međunarodnim učešćem, Aktuelnosti u farmaciji i biomedicini, Univerzitet „Bijeljina“ Bijeljina, online izdanje.
13. Nguyen, D. T., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J.L. (2006). Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.*, 29, 1836-1848.
14. Pertot, I. (2005). Određivanje hidrohloriazida u tabletama primenom reverznofazne-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom, diplomski rad, Katedra za analitiku lijekova, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

15. Ravi Sankar, P., Sai Snehalatha, K., Tabassum Firdose, S., Srinivasa Babu, P. (2019). Applications in HPLC in pharmaceutical analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 59(1), 117-124, Global Research online.
16. Srivastava, B., Sharma, B. K., Baghel, U. S., Yashwant, Sethi. N. (2010). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Chromatography Technique. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 2, 19-25.
17. Swadesh, J. (1997). HPLC Practical and Industrial Application, CRC Press, New York, U. S.
18. Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S. J., Imam, S. S., Hafeez, A. (2015). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – A Review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 2(6): 1056.
19. Tanaka, N., Kobayashi, H., Nakanishi, K., Minakuchi, H., Ishizuka, N. (2001). Monolithic columns-a new type of chromatographic support for liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 73, 420-429.
20. Tubić, B., Kasagić-Vujanović, I., Mihajlica, N., Gagić, Ž., Bubić-Pajić, N. (2013). Ispitivanje sadržaja aktivne supstance i degradacionih proizvoda/nečistoća u tabletama nimesulida primjenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom. *Arh.farm*, 63, 1 – 19.
21. Unger, K. K., Kumar, D., Grun, M., Buchel, G., Ludtke, S., Adam, T.H. (2000). Synthesis of spherical porous silicas in the micron and submicron size range: challenges and opportunities for miniaturized high-resolution chromatographic and electrokinetic separations. *Journal of Chromatography A.*, 892: 47-55.
22. Van Deemter, J. J., Zuiderweg, E. J., Klinkenberg, A. (1965). Longitudinal diffusion & resistance to mass transfer or cause of non ideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.*, 5: 271-289.
23. Vastag, G., Apostolov, S., Perišić-Janjić, N., Matijević, B. (2013). Multivariate analysis of chromatographic retention data and lipophilicity of phenylacetamide derivatives, *Anal. Chim. Acta.*, 767: 44–49.
24. Wu, N., Dempsey, J., Yehl, P. M., Dovletoglu, A., Ellison, A. Wyvratt, J. (2004). Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using monolithic columns. *Journal of Analytical Chemistry.*, 523, 149-156.
25. Wu, N., Lippert, J. A., Lee, M. L. (2001). Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 911: 1-12.
26. Zečević, M., Jocić, B., Kuntić, V., Vujić, Z. (2009). Primena metode tečne hromatografije u ispitivanju stabilnosti farmaceutskih supstanci i farmaceutskih preparata. *Arh. farm*, 59, 294 – 304.

27. Zhang, Y. H., Gong, X. Y., Zhang, H. M., Larock, R. C., Yeung, E.S. (2000). Combinatorial screening of homogeneous catalysis and reaction optimization based on multiplexed capillary electrophoresis. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 2, 450-452.
28. Zhou, C., Jin, Y., Kenseth, J. R., Stella, M., Wehmeyer, K. R., Heineman, W. R. (2005). Rapid pKa estimation using vacuum-assisted multiplexed capillary electrophoresis (VAMCE) with ultraviolet detection. *J. Pharm. Sci*, 94, 576-589.
29. Zhu, J., Goodall, D. M., Wren, S. A. C. (2005). Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications. *LCGC.*, 23: 54-72.

COMPARISON OF HPLC AND UHPLC METHODS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

Maja Mihajlović¹, Jasmina Šljivić²

Abstract

Modern chromatographic methods are widely used in the development and quality control of active pharmaceutical substances and dosage forms. High-performance liquid chromatography, which is suitable for qualitative and quantitative analysis, is mostly used. However, in recent years, the relatively new technique of liquid chromatography under ultra-high pressure, which has retained the advantages of classic high-performance liquid chromatography, has been increasingly used, but has been additionally improved with more efficient chromatographic performance. The paper compares these two modern, efficient and in principle very similar chromatographic methods, which found extensive use in the analysis of active pharmaceutical substances and dosage forms. It is important to perceive the differences in the application of these two methods in routine analysis, guided by scientifically based evidence for their advantages and disadvantages. A great contribution was also made by the stationary phases, which have particles of small dimensions that can withstand greater pressure compared to classical stationary phases, and therefore it is necessary to make additional adjustments to the system.

Key words: HPLC, UHPLC, liquid chromatography, pharmaceutical analysis.

¹Maja Mihajlović, Bijeljina University, Faculty of Pharmacy, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Phone: 065 490 599, e-mail: maja.maja40@gmail.com

²Jasmina Šljivić, Ph.D., Assistant professor, Bijeljina University, Faculty of Pharmacy, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Phone: 061 641 232, e-mail: jasminasljivic86@gmail.com