

LC-NMR ili potpuniji uvid u složene smjese spojeva

KUI 23/2004
Prispjelo 12. rujna 2003.
Prihvaćeno 21. studenog 2003.

P. Novak*

PLIVA - Istraživački institut d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb
PLIVA - Research Institute Ltd., Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Croatia

Pregledom su obuhvaćene osnovne značajke spregnute metode LC-NMR, a dani su i noviji primjeri njene primjene u farmaceutskim istraživanjima. Osjetljivost, koja je bila glavni nedostatak za širu primjenu ove metode u samim počecima, znatno je povećana brzim tehnološkim razvojem u posljednjih desetak godina. To se prije svega odnosi na poboljšanja u NMR elektronici, uvođenje supravodljivih magneta velike jakosti, razvoj učinkovitih impulsnih slijedova za supresiju signala otapala i razvoj kriotehnologije. U ovom su radu opisane neke od osnovnih tehnika supresije otapala te su navedeni i konkretni primjeri. Razmatrani su i glavni načini rada LC-NMR-a koji najviše ovise o prirodi uzorka, konfiguraciji LC-NMR sustava, sastavu mobilne faze i načinu kromatografskog ispiranja. Naveden je i niz primjera uspješne primjene LC-NMR i LC-NMR-MS metodologija u rješavanju problema vezanih uz analizu složenih smjesa spojeva, razgradnih produkata finalnih farmaceutskih proizvoda, prirodnih spojeva kao izvora bioaktivnih molekula i metabolita lijekova i kliničkih kandidata.

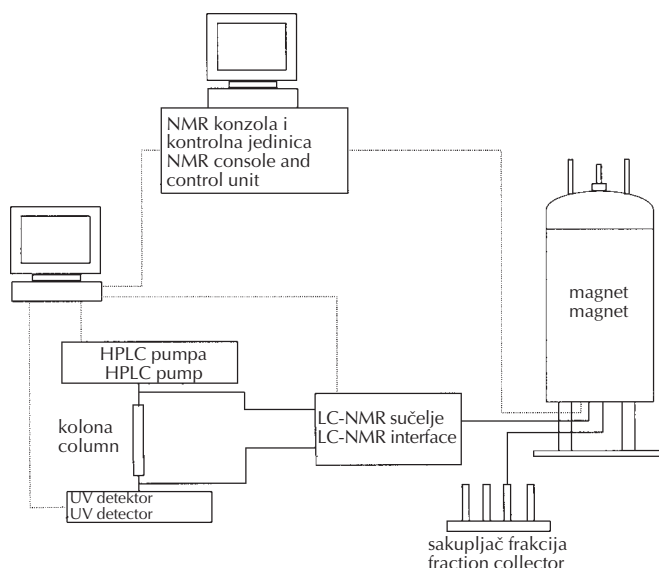
Ključne riječi: *Tekućinska kromatografija-nuklearna magnetna rezonancija, složene smjese spojeva, finalni farmaceutski proizvodi, razgradni produkti, metaboliti lijekova*

Uvod

Identifikacija i strukturna karakterizacija kemijskih spojeva u smjesi, bez prethodnog fizičkog odjeljivanja i pročišćavanja, dugo je vrijeme bio san analitičara ili kemičara koji se bavi prirodnim spojevima. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. high performance liquid chromatography-HPLC) snažno je i vrlo uspješno primjenjivano analitičko oruđe za odjeljivanje spojeva u smjesi koje služi za rutinsku i ekspertnu analizu.^{1,2} Često se kao krajnji rezultat analize traže i strukturni podatci o pojedinim poznatim ili nepoznatim sastojcima u smjesi. Tradicionalan pristup rješavanju ovakvog problema uključuje potpuno odvajanje i pročišćavanje spojeva te daljnu analizu nekom od poznatih tehnika za određivanje strukture, što je u najvećem broju slučajeva dugotrajan i iscrpljujuć posao. Stoga je u posljednjih petnaestak godina razvijeno više integriranih sustava, odnosno tzv. spregnutih tehnika koje primjenjuju neku od metoda odjeljivanja u izravnoj sprezi s detektorom kao što su UV (engl. ultra violet), IR (engl. infra red) i MS (engl. mass spectrometry). Od tehnika odjeljivanja najčešće se za ovakve analitičke sustave primjenjuju tekućinska kromatografija, plinska kromatografija, kapilarna elektroforeza, gel-propusna kromatografija, fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima.

Sprega tekućinske kromatografije i spektrometrije mase (LC-MS), jedna je od najčešće primjenjivanih spregnutih tehnika, prije svega zbog njezine visoke osjetljivosti, a isto tako i zbog činjenice da se njome mogu dobiti podatci o strukturnim fragmentima molekule.³ Međutim, da bi se dobio potpuni uvid u strukturu molekule, a pogotovo u slučaju analize izomera i kiralnih spojeva, LC-MS analiza nije dovoljna. Tada je prijeko potrebna primjena spregnutog sustava tekućinske kromatografije i spektroskopije nuklearne

magnetne rezonancije (LC-NMR).⁴⁻⁶ Još jedna prednost LC-NMR u usporedbi s LC-MS tehnikom je ta što LC-NMR nije destruktivna metoda, pa se uzorak može sačuvati i podvrgnuti mogućim daljnjim analizama. Na slici 1 shematski su prikazane glavne komponente LC-NMR sustava.



Slika 1 — Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i nuklearne magnetne rezonancije

Fig. 1 — Coupling of liquid chromatography and nuclear magnetic resonance

Prvi pokušaji da se integriraju tekućinska kromatografija i NMR dogodili su se prije petnaestak godina kada su snimljeni i prvi ¹H-LC-NMR spektri i to tehnikom prekinutoga protoka.⁷ No najveći problem koji je tada spriječio širu pri-

mjenu LC-NMR tehnologije bila je osjetljivost. Naime, NMR u usporedbi s drugim spektroskopskim ili spektrometrijskim tehnikama ima i do nekoliko jedinica intenziteta manji prag detekcije. Stoga nije bilo jednostavno povezati s jedne strane tekućinsku kromatografiju, koja za optimalnu kromatografsku rezoluciju zahtijeva vrlo male koncentracije analita, i s druge strane NMR, kod kojega je pak potrebno znatno više uzorka da bi se snimili svi potrebni jedno- i dvo-dimenzijski spektri za potpunu strukturnu karakterizaciju. Da bi se, dakle, riješio ovaj problem i omogućio ulazak LC-NMR-a u analitički laboratorij nužno je bilo razviti nove tehnologije.

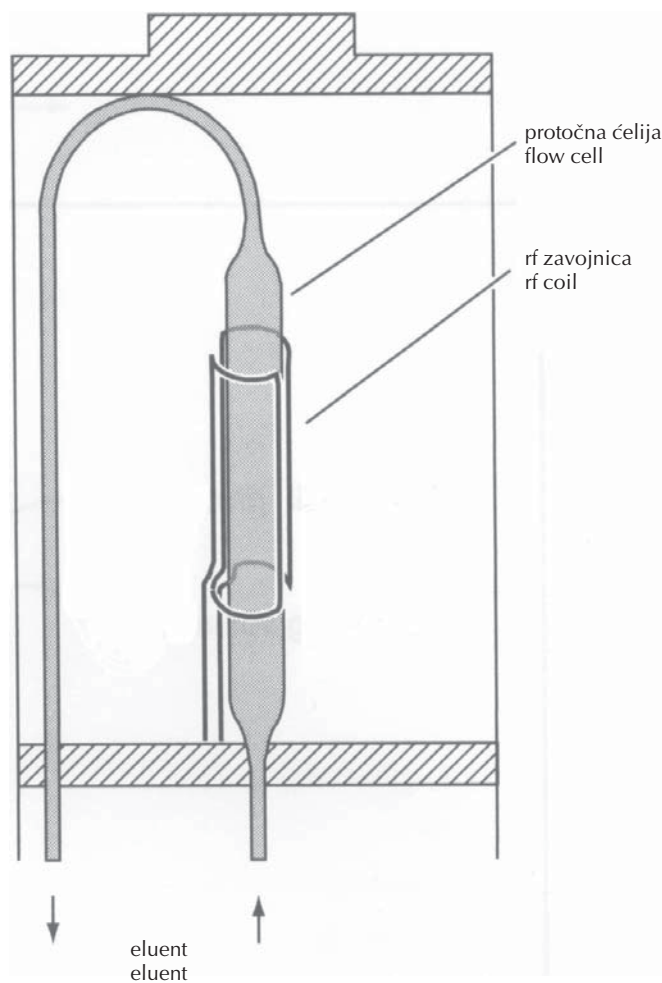
Prvobitna ograničenja LC-NMR metode i tehnološki razvoj

Kao što je bilo spomenuto jedno od najvažnijih ograničenja LC-NMR-a je osjetljivost eksperimenta, odnosno omjer korisnog signala prema šumu, *S/N* (engl. signal to noise ratio). Osjetljivost se može povećati tako da se povećaju volumen uzorka odnosno broj jezgri za detekciju i magnetno polje te da se snizi temperatura i smanji šum predpojačala.⁸

I upravo su u tom pravcu usmjerena glavna tehnološka poboljšanja u posljednjih petnaestak godina. Tako danas postoje NMR spektrometri visoke moći razlučivanja koji rade na magnetnim poljima do čak 21,14 T (900 MHz spektrometar) od kojih se za potrebe LC-NMR-a rabe oni do 18,79 T, što je uz razvoj boljih sustava pretvaranja analognog u digitalni signal (engl. analog to digital converter - ADC), digitalnih filtera, digitalne kvadrature detekcije i dvostrukog uzorkovanja (engl. oversampling) dovelo do znatnog poboljšanja dinamičkog raspona (engl. dynamic range), a time i osjetljivosti. Isto tako je zamjetan napredak učinjen u dizajnu protočnih NMR ćelija.^{9,10} Standardna ćelija LC-NMR-a koja se danas primjenjuje prikazana je na slici 2.

To je vrsta vertikalno usmjerene ćelije koja direktno na sebi ima tzv. Helmholtzovu zavojnicu oblika dvostrukog sedla. Cijeli sustav nalazi se u staklenoj posudi unutar NMR probe u kojoj se nalazi i termočlanak za mjerenja na različitim temperaturama. Standardne ćelije imaju obujam detekcije između 60-240 ml. Ovakav dizajn omogućuje optimalnu rezoluciju u NMR spektrima, no nedostatak je taj što su obujmi detekcije još uvijek veliki za visoku kromatografsku rezoluciju. Prema nekim teorijskim predviđanjima¹¹ za kromatografsku kolonu duljine 250 i promjera 4 mm, optimalan obujam detekcije je između 1 ml i 5 ml. Kao jedno od dobrih rješenja razvijene su, i u novije vrijeme se primjenjuju, kapilarne NMR probe sa znatno manjim obujmom detekcije (protočna proba obujma od 2,5 ml).

Uvođenjem tzv. krio-tehnologije učinjen je sljedeći bitan korak u poboljšanju osjetljivosti NMR eksperimenta općenito.¹² Naime, ako se radiofrekventne zavojnice u NMR probi i prepojačalo ohlade do vrlo niskih temperatura (ca. 25 K) dolazi do smanjenja termo šuma, što utječe na povećanje omjera *S/N* i to nekoliko puta.^{13,14} Stoga danas suvremeni LC-NMR sustav često sadrži i krio platformu. Još jedan tehnološki napredak, napravljen u posljednjih nekoliko godina, omogućio je da se cijeli LC-NMR sustav može smjestiti na vrlo malo prostora, a da time postane prikladan za velik broj spektroskopskih ili analitičkih laboratorija. Naime, radi se o tehnologiji aktivnoga magnetnog štita (engl. actively



Slika 2 – LC-NMR protočna ćelija
Fig. 2 – LC-NMR flow cell

shielded magnetic system) koji izrazito smanjuje utjecaj magnetnog polja NMR magnetna na okolinu (horizontalna linija od 5 Gausa za magnet od 14,1 T je svega 1,8 m). Time je omogućeno da se u neposrednu blizinu magnetna može postaviti druga analitička (HPLC ili neki drugi sustav za odjeljivanje) ili računalna oprema.

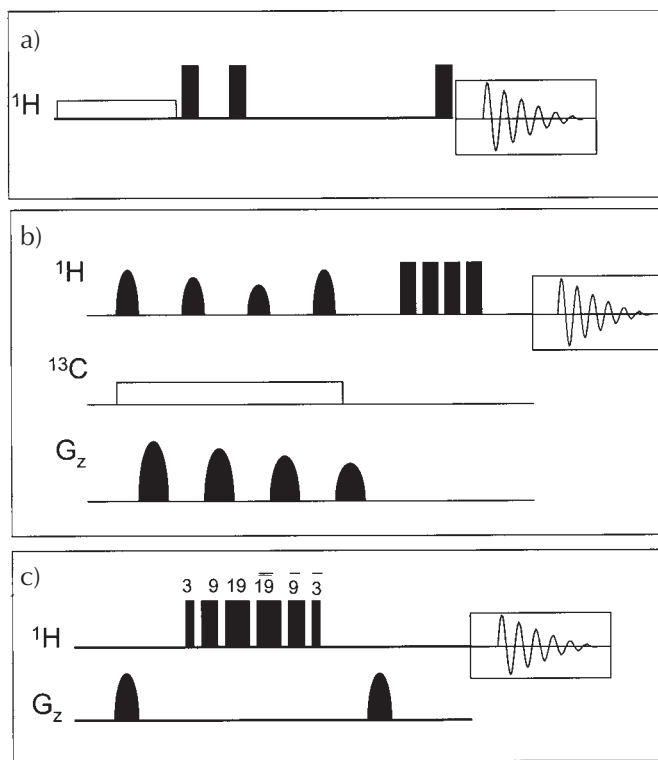
Tehnike supresije signala otapala

U tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza najčešće se primjenjuje pokretna faza koja se sastoji od smjese dvaju ili više otapala ovisno o kompleksnosti smjese za analizu. Ta otapala nisu deuterirana kao što je to slučaj s otapalima za NMR jer bi u suprotnom cijeli postupak odjeljivanja bio preskup i neekonomičan. S obzirom da uzorak za LC-NMR analizu sadrži otapala u velikom suvišku u odnosu na analit, u NMR spektrima bit će vidljivi samo signali koji dolaze od otapala zbog ograničenja koja nameće dinamički raspon odnosno omjer najjačeg i najslabijeg signala u NMR spektru, koji pak ovisi o snazi ADC-a. Bez obzira na činjenicu što se danas primjenjuju ADC sustavi od 19 bita, najčešće nije moguće opaziti LC-NMR signale svih spojeva koji se nalaze u smjesi, a pogotovo ne onih spojeva čija je koncentracija vrlo mala. Zato je bilo potrebno razviti takve NMR impulsne sekvence koje će otkloniti ili umanjiti

signale otapala kako bi se u spektru mogli detektirati signali analita. Tek tada je bilo omogućeno snimanje dovoljno kvalitetnih jedno- i dvodimenzijskih LC-NMR spektara koji su omogućili potpunu strukturnu karakterizaciju spojeva u smjesi. Postoji niz tehnika supresije otapala koje primjenjuju kombinaciju tvrdih impulsa, selektivnih i gradijentnih impulsa za supresiju signala iz otapala, a za LC-NMR potrebe najčešće se primjenjuju sljedeće:

- tehnika prezasićenja,
- WET tehnika (engl. water suppression enhanced through T_1 effects),¹⁵
- WATERGATE (engl. water suppression by gradient-tailored excitation),¹⁶
- tehnika dvostruke spinske jake.¹⁷

Na slici 3 prikazani su impulsi slijedovi nekih tehnika supresije koje smo primjenjivali u istraživačkom laboratoriju u PLIVI.

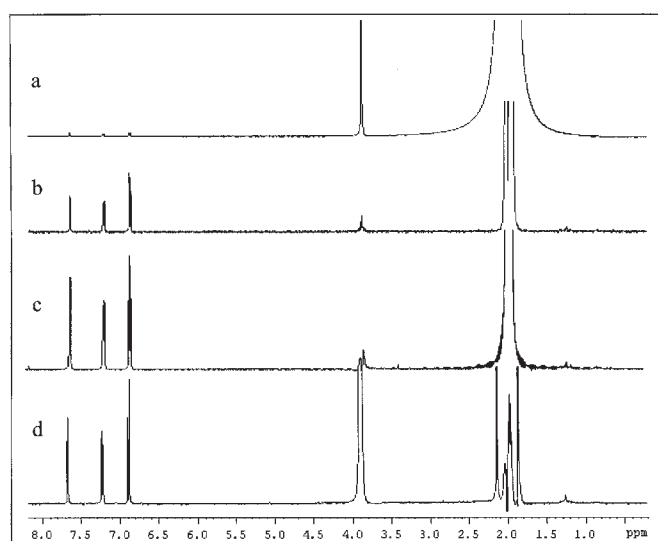


Slika 3 – Pulsni slijedovi za supresiju signala otapala. a) NOESY prezasićenje, b) WET i c) WATERGATE (W3) tehnike

Fig. 3 – Pulse sequences for solvent signal suppression. a) NOESY presaturation, b) WET and c) WATERGATE (W3) sequences

Tehnika prezasićenja koja primjenjuje NOESY shemu¹⁸ jednostavna je i vrlo učinkovita u slučajevima kada treba suprimirati jednu ili dvije rezonancije (slika 3a). Prije akvizicije NMR signala kontinuirano se primjenjuje slabo radio-frekventno polje ili sklop impulsa na položaju frekvencija otapala, što dovodi do zasićenja odnosno izostanka signala u spektru. No u slučaju supresije više rezonancija rabe se suvremenije metode, kao npr. WET koja se temelji na selektivnom defaziranju signala otapala pomoću gradijentata magnetnog polja (slika 3b). Na slici 4 prikazani su 1H spektri lijeka mesalazina bez supresije signala otapala i uz primjenu tehnika za supresiju.¹⁹ Vidljivo je da se u normalnom spektru gotovo i ne opažaju signali mesalazina, dok

je u ostalim spektrima intenzitet signala znatno veći, što omogućava daljnu spektralnu analizu. Danas je općenito prihvaćeno da se za pokretnu fazu u LC-NMR analizi rabe ona otapala koja imaju što manje signala za supresiju jer se time znatno olakšava analiza. Stoga se kao sastavni dio pokretne faze u kromatografiji obrnutih faza vrlo često primjenjuju deuterirana voda (D_2O), zbog toga što nije preokupa a ujedno služi i za tzv. unutrašnji "lock" signal za kontrolu stabilnosti magnetnog polja. D_2O se rabi u kombinaciji s drugim otapalima, najčešće acetonitrilom i metanolom. Uz supresiju signala otapala vrlo često je potrebno otkloniti i tzv. signale ^{13}C satelita koji proizlaze iz skalarne sprege kroz jednu kemijsku vezu 1H - ^{13}C (slika 4b i 4c), a pogotovo u slučajevima kada se signali analita nalaze u blizini signala otapala. To se može učiniti na način da se u impulsni slijed umetne ^{13}C rasprezajući modul (slika 3b).



Slika 4 – 1H spektri mesalazina u sustavu 71 % CH_3CN i 29 % D_2O . a) normalni spektar, b) LC-NMR spektar sa dvostrukim NOESY prezasićenjem i ^{13}C rasprezanjem, c) LC-NMR spektar sa WET supresijom i ^{13}C rasprezanjem d) LC-NMR spektar sa WATERGATE (W3) supresijom bez ^{13}C rasprezanja.

Fig. 4 – 1H spectra of mesalazin in 71 % CH_3CN and 29 % D_2O . a) normal spectrum, b) LC-NMR spectrum with NOESY double presaturation and ^{13}C decoupling, c) LC-NMR spectrum with WET suppression and ^{13}C decoupling, d) LC-NMR spectrum with WATERGATE (W3) suppression without ^{13}C decoupling.

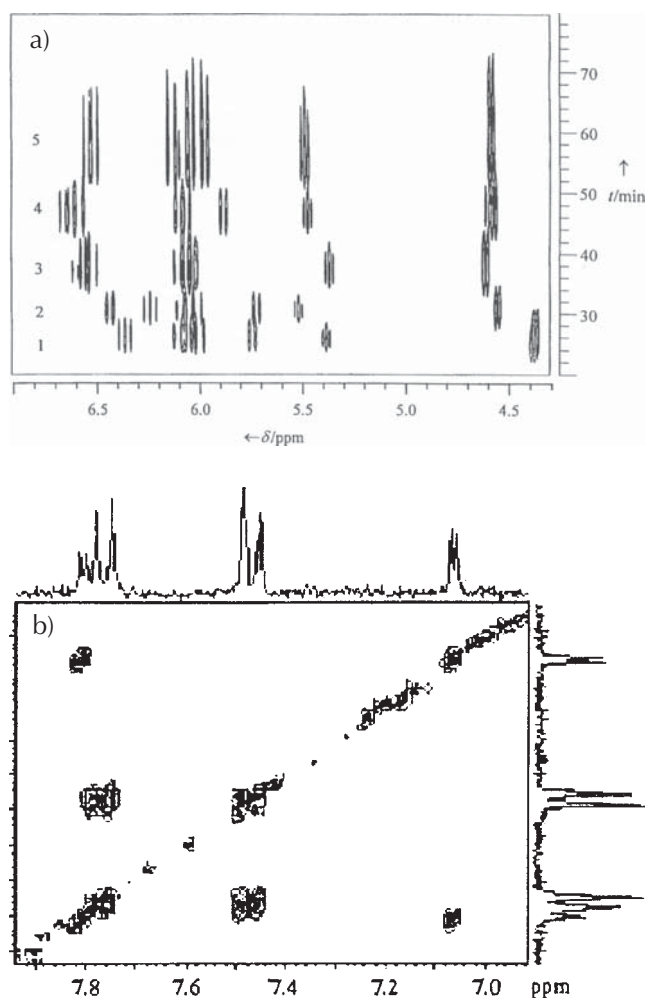
Načini rada LC-NMR-a

Odabir pojedinog načina izvođenja LC-NMR analize ovisi o nekoliko osnovnih čimbenika. Prvi je konfiguracija i opremljenost LC-NMR sustava, zatim priroda uzorka za analizu te sastav pokretne faze koja se primjenjuje za odjeljivanje. Za izokratno i gradijentno kromatografsko ispiranje (eluiranje) postoji nekoliko osnovnih načina na koji se mogu izvoditi LC-NMR eksperimenti:

- tehnika neprekinutoga protoka,
- tehnika prekinutoga protoka u kratkim vremenskim intervalima,
- tehnika prekinutoga protoka,
- tehnika sakupljanja pikova u kapilarne petlje,
- tehnika sakupljanja pikova na čvrstoj fazi.

Izvođenje eksperimenta neprekinutim protokom je najjednostavniji način LC-NMR analize. Ovaj se način primjenjuje za uzorke nepoznatih kromatografskih svojstava te za nestabilne spojeve koji podliježu brzom razgradnji ili izomerizaciji. S obzirom da je vrijeme zadržavanja koje uzorak provede u NMR protočnoj ćeliji kratko zbog toga što nema prekida protoka, ovim se načinom najčešće mogu snimiti samo jednodimenzijski ^1H i ^{19}F NMR spektri. Ako se primjenjuje gradijentno ispiranje, doći će do promjene kemijskih pomaka otapala kako se mijenja njihov omjer tijekom ispiranja. Postoji nekoliko načina za rješavanje ovog problema. Jedan su preliminarni pokusi gdje se unaprijed odrede promjene pomaka signala otapala, drugi je uporaba programa dostupnih na suvremenim spektrometrima koji mogu izračunati te promjene u hodu, a nedavno je predložena i tzv. kompenzacijska metoda.²⁰ U slučaju kada su poznata vremena zadržavanja sastojaka koje treba odvojiti ili ako one imaju karakteristične UV kromofore primjenjuje se tehnika prekinutoga protoka. Nakon što je odjeljena komponenta došla u protočnu ćeliju NMR-a, dolazi do zaustavljanja protoka i daljnje kromatografije. Uzorak može ostati u ćeliji dulje vrijeme, što omogućava i snimanje dvodimenzijskih homonuklearnih a ponekad i heteronuklearnih NMR eksperimenata. Na slici 5 nalaze se tipični LC-NMR spektri snimljeni tehnikama neprekinutoga i prekinutoga protoka.

Ako je predmet LC-NMR analize uzorak čiji su sastojci slabo odvojeni ili imaju slabu odnosno nikakvu UV apsorpciju te nedovoljno definirana vremena zadržavanja, može se upotrijebiti tehnika prekinutoga protoka u kratkim vremenskim intervalima. Prilikom izvođenja LC-NMR eksperimenta prekinutoga protoka može doći do disperzije pikova na kromatografskoj koloni ako je protok zaustavljen dulje vrijeme, što onda znatno otežava analizu ostalih komponenti. Isto tako dolazi do poremećaja u kromatografskom odjeljivanju zbog zaustavljanja protoka i ponovnog pokretanja. Vrlo uspješan način kako se tomu može doskočiti jest uporaba kapilarnih petlji (engl. loops). Nakon odjeljivanja, sastojci iz smjese spremaju se jedan za drugim u petlje. Kad je kromatografsko odjeljivanje završeno, sastojci se neovisno šalju u protočnu ćeliju NMR-a gdje se mjere NMR spektri. Donje granice detekcije za spojeve molekulske mase oko 350 Da uz uporabu standardnih kolona (unutarnji promjer 4,6 mm) te protok od 1 ml min^{-1} su 5–10 g za tehniku neprekinutoga protoka odnosno submikrogramsko područje (nekoliko stotina ng) za tehniku prekinutoga protoka, bez uporabe krio-tehnologije. Ovo se odnosi na snimanje jednodimenzijskih protonskih spektara na NMR spektrometru od 500 MHz. Ako se pak umjesto kapilarnih petlji u LC-NMR uvede sustav ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. solid-phase extraction - SPE), kromatografski pikovi mogu se spremati na čvrstu fazu. Dvije su osnovne prednosti takvog sklopa. Prvo, postupak spremanja pikova na čvrstu fazu može se ponoviti više puta, što povećava osjetljivost eksperimenta. Druga bitna prednost je to što se eluens može pod strujom plinovitog dušika odstraniti s čvrste faze nakon čega se uzorak ispire s uobičajenim deuteriranim otapalima za NMR i šalje u protočnu probu NMR-a. Stoga nije potrebna uporaba impulsnih slijedova za supresiju signala otapala, pa se cijela analiza pojednostavnjuje. Nadalje, za ispiranje s čvrste faze uvedu se manji obujmi otapala što povećava S/N. Najučinkovitiji LC-NMR sustav koji se danas može naći na tržištu je onaj koji uz SPE dodatak sadrži i



Slika 5a) — ^1H LC-NMR spektar izomera vitamina A snimljen tehnikom neprekinutoga protoka²¹ i b) COSY LC-NMR spektar nepoznate komponente u uzorku mesalazina snimljen tehnikom prekinutoga protoka.¹⁹

Fig. 5a) — Continuous-flow ^1H LC-NMR spectrum of vitamin A isomers²¹ and b) Stop-flow COSY LC-NMR spectrum of the unknown component in mesalazin.¹⁹

krio platformu. S njim je moguće analizirati količine uzorka od svega 5 ng na NMR spektrometru od 600 MHz. Danas se u suvremenom analitičkom ili farmaceutskom laboratoriju može naći i sustav koji pored UV i NMR-a ima još neki detektor, najčešće spektrometar masa s ionskom stupicom ili nekim drugim analizatorom mase uz ionizaciju elektro raspršivanjem. Spektrometar masa može se spojiti ili paralelno ili serijski u LC-NMR-MS sustav.²² Imajući na umu sve ono što je ovdje navedeno te uz neminovan daljnji tehnološki napredak, sustav koji će sadržavati spregu LC-SPE-NMR-MS opremljen i krio-probom moći će odgovoriti i najtežim zahtjevima koje danas nameće suvremena znanost i industrija.²³

Primjena LC-NMR-a u farmaceutskim istraživanjima

Zahvaljujući tehnološkim inovacijama koje su izrazito poboljšale osjetljivost, LC-NMR sustav je u posljednjih nekoliko godina našao široku praktičnu primjenu u razli-

čitim znanstvenim područjima i industriji. Tako je danas ova metoda postala jedno od glavnih i nezamjenjivih analitičkih oruđa u farmaceutskim i biomedicinskim istraživanjima, zatim u analizi metabolita i prirodnih spojeva te u području zaštite okoliša.^{4,24} U okviru farmaceutskih istraživanja LC-NMR i LC-NMR-MS sustavi najčešće se primjenjuju za analizu smjese spojeva, različitih onečišćenja i razgradnih produkata kako finalnih proizvoda tako i aktivnih supstancija, za potrebe kombinatorijske kemije, analizu metabolita i prirodnih spojeva.

Regulatorne agencije (FDA, EMEA) nameću vrlo stroga pravila za čistoću gotovih farmaceutskih proizvoda pa je potrebno potpuno identificirati i okarakterizirati svako onečišćenje čiji je maseni udjel veći od 0,1%. Za tu svrhu LC-NMR se pokazao kao učinkovitija metoda koja može u vrlo kratkom vremenu dati relevantne informacije, a posebice u slučajevima kompleksnih smjesa više sastojaka s relativno visokim udjelima. Jedna od prvih publikacija upotrebe LC-NMR-a bila je identifikacija onečišćenja prekursora u sintezi gotovog farmaceutskog proizvoda.²⁵ Neki noviji primjeri primjene LC-NMR tehnike uključuju identifikaciju onečišćenja kao sastojak u sirovom proizvodu AG2034 koji pokazuje protutumorsku aktivnost kao inhibitor enzima glicinamid ribonukleotid transformilaze.²⁶ Na temelju analize ¹H LC-NMR i TOCSY LC-NMR spektara te kombinacije s LC-MS spektrima autori su uspješno odredili strukturu onečišćenja. U slučajevima kada onečišćenja imaju slabe ili uopće nemaju UV kromofore, LC-NMR se pokazao kao učinkovita tehnika analize. To je vidljivo na primjeru identifikacije i kvantifikacije onečišćenja aktivnog spoja SKF-99085.²⁷ LC-NMR tehnika prekinutoga protoka u kratkim vremenskim intervalima i tehnika prekinutoga protoka korisne su i za analizu onečišćenja flutikazon propionata.²⁸ Identifikacija razgradnih produkata lijekova vrlo je važan proces u razvoju lijekova, a pogotovo formulacija. Razgradni produkti mogu imati različitu biološku aktivnost, a isto tako mogu biti i toksični. Stoga je bitno da se oni u potpunosti okarakteriziraju. LC-NMR u kombinaciji s LC-MS metodom uspješno su primijenjeni za analizu šest razgradnih produkata inhibitora enzima metaloproteaze, presudne za razvoj nekih vrsta zloćudnih tumora i artritisa.²⁹ Isto tako su LC-NMR i LC-MS analize omogućile brzu i učinkovitu identifikaciju i strukturnu karakterizaciju razgrađenog produkta sirove akarboze koja se primjenjuje u liječenju dijabetesa.³⁰ Autori su koristili tehniku prekinutoga protoka te su snimili jedno- i dvodimenzionalne LC-NMR spektre (¹H i TOCSY). Na temelju analize LC-NMR i LC-MS podataka uspješno je određena struktura razgradnog produkta prije njegove izolacije i pročišćavanja. Potpuna identifikacija i asignacija smjese *cis* i *trans* izomera atrakurij bezilata, spoja koji služi u kirurgiji kao neuromuskularno blokirajući agens, napravljena je na temelju analize LC-NMR spektra snimljenih na spektrometru od 750 MHz uz uporabu kiralne kromatografske kolone.³¹ I premda postoje neka ograničenja LC-NMR analize pred konvencionalnim nespregnutim pristupom, kao npr. ako se radi o jednom ili dva onečišćenja prisutna u vrlo malim količinama,³² spregnute tehnike imaju izrazitu prednost u analizi kompleksnih smjesa.

Osim analize onečišćenja i razgradnih produkata lijekova i bioaktivnih spojeva, analiza prirodnih spojeva još je jedno veliko područje gdje se uspješno primjenjuje LC-NMR.³³

Prirodni spojevi bili su i još su uvijek bogat izvor aktivnih molekula za farmaceutsku industriju, pa se stoga ulažu znatni naponi da bi se izolirali i okarakterizirali spojevi dobiveni iz prirodnih izvora.^{34,35} Tako je nedavno LC-NMR upotrijebljen za identifikaciju di- i tri-glikoziliranih flavonoida dobivenih iz lišća brazilske biljke *Corocea bomplandii* poznate po svojim ljekovitim svojstvima.³⁶ U svom su radu *Fritsche* i sur.³⁷ primijenili LC-NMR-MS sustav kako bi strukturno okarakterizirali diastereoizomere sekoizolaricirezinol diglikozida dobivenih od lana. Sekoizolaricirezinol diglikozid ima zapaženu aktivnost u smanjivanju razine kolesterola, a isto tako je pokazao znakovito antitumorsko djelovanje ako se primjenjuje u ranoj fazi nastanka tumora.³⁷ Tehnike neprekinutoga i prekinutoga protoka uspješno su uporabljene za analizu ekstrakata đumbira.³⁸ Autori su uspjeli odrediti strukture nekoliko spojeva kao što su vanilin, ferulična kiselina, dihidroferulična kiselina itd. Tipičan primjer prednosti LC-NMR-MS sustava uz upotrebe kapilarnih petlji pred klasičnom analizom jest identifikacija glavnih klasa alkaloida dobivenih od ekstrakata ljekovitih biljaka iz regije poluotoka Cape.²³ Tradicionalnim fitokemijskim pristupom ovakva bi analiza trajala nekoliko mjeseci, dok je LC-NMR-MS analiza trajala samo 36 sati uz korištenje svega 150-300 mg uzorka svakoga ekstrakta.

Metabolizam lijekova i potencijalnih kliničkih kandidata vrlo je važno područje u procesu otkrića i razvoja novih lijekova. LC-NMR metoda je našla toliko široku primjenu u analizi metabolita da je čak predložen i izraz metabonomika temeljena na NMR-u.³⁹ Do sada se pomoću LC-NMR i LC-NMR-MS metoda od biotekućina najviše istraživao urin štakora, stoga što je u usporedbi s plazmom ili žuči puno jednostavnije analizirati urin.^{4,23,40} S obzirom na kompleksnost biotekućina, priprema uzoraka za LC-NMR-MS analizu ključan je korak u tom procesu da bi se dobili valjani podatci. Stoga se često prije kromatografije rabi i ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE).²³ Tako su *Shockcor* i sur.⁴¹ primjenjujući NMR spektrometar od 600 MHz uspjeli identificirati metabolite inhibitora monoamin oksidaze izravno u ekstraktima dobivenim iz mikrosoma ljudske jetre. Na temelju analize LC-NMR spektara snimljenih tehnikom prekinutoga protoka na spektrometru od 750 MHz identificirani su metaboliti fenoksipiridina u ekstraktima mikrosoma štakora u količini od 200 ng.⁴² Neka istraživanja su pokazala uvjerljivost metode ¹⁹F NMR spektroskopije za brzi probir kultura stanica kao modela za studij metaboličkih puteva u sisavaca.⁴³ Kao što je ranije spomenuto, hlađenje dijela NMR elektronike na vrlo niske temperature znatno povećava osjetljivost. Tako su nedavno *M. Spraul* i sur.⁴⁴ primjenjujući LC-NMR-MS sustav i krioprobe pokazali da se već sa spektrometrom od 500 MHz može analizirati obujam od 100 mg neobrađenoga ljudskog urina te su uz poznate sulfatne i glukuronidne metabolite odredili i acetaminofenske metabolite, što prije nije bilo moguće. Takva će tehnologija, s obzirom na smanjenje vremena NMR analize, omogućiti i dinamičke studije kemijski i biološki reaktivnih metabolita, kao što su acilglukuronidi i konjugati glutationa, koji se pak povezuju s toksičnošću nekih lijekova.

Zaključci

U ovome preglednom članku opisane su osnovne karakteristike spregnute analitičke tehnike LC-NMR te su prika-

zani neki primjeri njene primjene u farmaceutskim istraživanjima. Premda je ova tehnika u samom početku svoga razvoja imala niz nedostataka koji su sprečavali njenu širu primjenu, napredak u tehnologiji omogućio je da ona danas zauzima važno mjesto u suvremenom analitičkom, biomedicinskom ili farmaceutskom laboratoriju. Tehnološki napredak se prije svega odnosi na razvoj NMR elektronike, supravodljivih magneta i krio-tehnologije, koji su uz primjenu novih tehnika supresije signala otapala doveli do uvjerljivog poboljšanja osjetljivosti. Tako se granica detekcije LC-NMR tehnikom spustila do nekad nezamislivih nanograma, što je učinilo ovu metodu primamljivom ne samo za analizu prirodnih spojeva i različitih organskih onečišćenja i razgradnih produkata već i za studij metaboličkih puteva lijekova i bioaktivnih molekula u pretkliničkim ili kliničkim istraživanjima. U budućnosti se predviđa daljnji razvoj spregnutih metoda u automatizirani sustav koji će obuhvaćati tekućinsku kromatografiju, ekstrakciju na čvrstoj fazi, nuklearnu magnetnu razonanciju i spektrometriju masa (LC-SPE-NMR-MS). Uz primjenu kriotehnologije takav će pristup rješavanju složenih analitičkih i biomedicinskih problema imati odlučujuću prednost pred klasičnim nespregnutim metodama koje su se do sada koristile.

ZAHVALA

Zahvaljujem dr. sc. Vesni Gabelici i Ines Fistrić na diskusijama i korisnim savjetima te Predragu Tepešu, Marini Ilijaš i Mariju Cindriću za izvedbu nekih LC-NMR i LC-MS eksperimenata.

Popis kratica

List of abbreviation

HPLC — tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
— high performance liquid chromatography

NMR — nuklearna magnetna rezonancija
— nuclear magnetic resonance

MS — spektrometrija mase
— mass spectrometry

UV — ultraljubičasta spektroskopija
— ultra violet spectroscopy

IR — infracrvena spektroskopija
— infra red spectroscopy

SPE — ekstrakcija na krutom nosaču
— solid phase extraction

LC-NMR — tekućinska kromatografija-nuklearna magnetna rezonancija
— liquid chromatography- nuclear magnetic resonance

LC-MS — tekućinska kromatografija- spektrometrija mase
— liquid chromatography- mass spectrometry

LC-NMR-MS — tekućinska kromatografija-nuklearna magnetna rezonancija-spektrometrija mase
— liquid chromatography- nuclear magnetic resonance-mass spectrometry

S/N — omjer signala prema šumu
— signal to noise ratio

ADC — pretvarač analognog u digitalni signal
— analog to digital converter

WATERGATE — supresija signala vode pomoću pobude gradijentima
— water suppression by gradient-tailored excitation

WET — supresija signala vode pojačana pomoću efekata T₁
— water suppression enhanced through T₁ effects

NOESY — spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta
— nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

COSY — korelacijska spektroskopija
— correlation spectroscopy

TOCSY — totalna korelacijska spektroskopija
— total correlation spectroscopy

FDA — Agencija za hranu i lijekove
— Food and drug administration

EMA — Europska agencija za procjenu medicinskih proizvoda
— European Agency for the Evaluation of Medical Products

Literatura

References

1. T. Hanai, HPLC A Practical Guide. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, str. 1-134.
2. P. R. Brown, R. A. Hortwick (uredn.), High Performance Liquid Chromatography, Wiley, New York, 1989, str. 1-688.
3. R. Willoughby, E. Sheen, S. Mitrovich, A Global View of LC/MS, Global View Publishing, Pittsburgh, 1998, str. 1-549.
4. K. Albert (uredn.), On-line LC-NMR and Related Techniques, Wiley, Chichester, 2002, str. 1-290.
5. K. Albert, J. Chromatogr. A **703** (1995) 123.
6. J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, Prog. NMR Spectros. **29** (1996) 1.
7. N. Watanabe, E. Niki, Proc. Jpn. Acad. Ser B **54** (1978) 194.
8. D. I. Hoult, R. E. Richards, J. Magn. Reson. **24** (1976) 71.
9. K. Albert, M. Kunst, E. Bayer, H. J. De Jong, P. Genissel, M. Spraul, W. Bermel, Anal. Chem. **61** (1989) 772-775.
10. K. Albert, M. Kunst, E. Bayer, M. Spraul, W. Bermel, J. Chromatogr. **463** (1989) 355.
11. R. P. W. Scott, P. Kucera, J. Chromatogr. Sci. **17** (1985) 346.
12. H. D. W. Hill, Magnetic Moments **8** (1996) 4.
13. P. Styles, N. F. Soffe, C. A. Scott, D. A. Cragg, F. Row, D. J. White, P. C. H. White, J. Magn. Reson. **60** (1984) 397.
14. P. Styles, N. F. Soffe, C. A. Scott, J. Magn. Reson. **84** (1989) 376.
15. S. H. Smallcombe, S. L. Patt, P. A. Keifer, J. Magn. Reson. Ser A **117** (1995) 295.
16. M. Pioto, V. Saudek, V. Sklenář, J. Biomol. NMR **2** (1992) 661.
17. C. Dalvit, G. Shapiro, J.-M. Böhlen, T. Parella, Magn. Reson. Chem. **37** (1999) 7.
18. M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvorsak, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, Anal. Chem. **65** (1993) 327.
19. P. Novak, V. Gabelica, P. Tepeš, I. Fistrić, u pripravi.
20. D. A. Jayawickrama, A. M. Wolters, J. V. Sweedler, Analyst **128** (2003) 421.
21. K. Albert, G. Schlotterbeck, U. Braumann, H. Händel, M. Spraul, G. Krack, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **34** (1995) 641.
22. S. D. Taylor, B. Wright, E. Clayton, I. D. Wilson, Rapid Commun. Mass Spectrom. **12** (1998) 1732.
23. O. Corcoran, M. Spraul, Drug Disc. Today **8** (2003) 624.
24. B. J. Stockman, Curr. Opin. Drug Discov. Dev. **3** (2000) 269.
25. J. K. Roberts, R. J. Smith, J. Chromatogr. A **677** (1994) 385.
26. B. C. M. Potts, K. F. Albizzati, M. O'N. Johnson, J. P. James, Magn. Reson. Chem. **37** (1999) 393.

27. S. D. McCrossen, D. K. Bryant, B. R. Cook, J. J. Richards, J. Pharm. Biomed. Anal. **17** (1998) 455.
28. N. Mistry, I. M. Ismail, M. S. Smith, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, J. Pharm. Biomed. Anal. **16** (1997) 697.
29. S. X. Peng, B. Borah, R. L. M. Dobson, Y. D. Liu, S. Pikul, J. Pharm. Biomed. Anal. **20** (1999) 75.
30. P. Novak, P. Tepeš, M. Cindrić, M. Ilijaš, S. Dragojević, K. Mihaljević, J. Chromatogr. **1033** (2004) 299.
31. N. Mistry, A. D. Roberts, G. E. Tranter, P. Francis, I. Barilsky, I. M. Ismail, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, Anal. Chem. **71** (1999) 2838.
32. G. J. Sharman, I. C. Jones, Magn. Reson. Chem. **41** (2003) 448-454.
33. J. L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettman, Curr. Org. Chem. **2** (1998) 575.
34. B. Vogler, I. Klaiber, G. Roos, C. U. Walter, J. Nat. Products **61** (1998) 175.
35. J. L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettman, J. Chromatogr. A **1000** (2003) 437.
36. F. D. P. Andrade, L. C. Santos, M. Datchler, K. Albert, W. Vilegas, J. Chromatogr. A **953** (2002) 287.
37. J. Fritsche, R. Angoelal, M. Dachtler, J. Chromatogr. A **972** (2002) 195.
38. S. Saha, R. M. Smith, E. Lenz, I. D. Wilson, J. Chromatogr. A **991** (2003) 143.
39. J. K. Nicholson, J. C. Lindon, E. Holmes, Xenobiotica **29** (1999) 1181.
40. J. C. Lindon, J. K. Nicholson, U. G. Sidelmann, I. D. Wilson, Drug. Metab. Rev. **29** (1997) 705.
41. J. P. Shockcor, I. S. Silver, R. M. Wurm, P. N. Sanderson, R. D. Farrant, B. C. Sweatman, J. C. Lindon, Xenobiotica **26** (1996) 41.
42. O. Corcoran, M. Spraul, M. Hofmann, I. M. Ismail, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, J. Pharm. Biomed. Anal. **16** (1997) 481.
43. O. Corcoran, J. C. Lindon, R. Hall, M. Ismail, J. K. Nicholson, Analyst **126** (2001) 2103.
44. M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Withers, W. E. Maas, O. Corcoran, Anal. Chem. **75** (2003) 1546.

SUMMARY

LC-NMR or a Deeper Insight into Complex Mixtures

P. Novak

This article describes main characteristics of a hyphenated LC-NMR technique and gives an overview of its recent applications in pharmaceutical research. Inherent low sensitivity, which prevented a wider use of this technique at its early stages, has been substantially increased by technological developments in the past decade. This primarily includes innovations in NMR electronics, powerful superconducting magnets, efficient solvent suppression schemes and cryo-technology. The main solvent suppression pulse sequences currently used in LC-NMR are described and some typical examples are given. LC-NMR working modes are discussed in terms of nature of a sample, available equipment, composition of a mobile phase and the way of chromatographic elution. Recent results are presented demonstrating a widespread use of LC-NMR and LC-NMR-MS methodologies in solving problems which involve complex mixture analysis, degradation products of final drug substances, natural products, and drug metabolites.

PLIVA - Research Institute Ltd.
Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Croatia

Received September, 12, 2003
Accepted November 21, 2003