

Optimizacija tekućinsko-kromatografskog postupka za mjerenje koncentracije tramadola i njegovih metabolita u plazmi

Vida, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:471903>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Petra Vida

**OPTIMIZACIJA TEKUĆINSKO-
KROMATOGRAFSKOG POSTUPKA ZA
MJERENJE KONCENTRACIJE
TRAMADOLA I NJEGOVIH
METABOLITA U PLAZMI**

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Petra Vida

**OPTIMIZACIJA TEKUĆINSKO-
KROMATOGRAFSKOG POSTUPKA ZA
MJERENJE KONCENTRACIJE
TRAMADOLA I NJEGOVIH
METABOLITA U PLAZMI**

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek

Mentor rada: doc.dr.sc. Željko Debeljak, mag. med. biokem.

Neposredni voditelj: dr.sc. Dario Mandić, mag. med. biokem.

Rad ima 30 listova, 10 tablica i 8 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD	Error! Bookmark not defined.
1.1. Kromatografija.....	Error! Bookmark not defined.
1.2. Tekućinska kromatografija	Error! Bookmark not defined.
1.2.1. Izvedba tekućinske kromatografije	2
1.3. Opioidni analgetici	4
1.4. Tramadol.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1. Farmakokinetika tramadola	5
1.4.2. Određivanje koncentracije tramadola	6
2. CILJ	7
3. MATERIJAL I METODE.....	8
3.1. Ustroj studije.....	8
3.2. Materijal.....	8
3.3. Metode	10
3.4. Statističke metode.....	11
4. REZULTATI.....	13
4.1. Rezultati optimizacije	13
4.1.1. Testiranje djelotvornosti kolone uporabom pojedinačnih radnih otopina tramadola, M1, M2 i IS te smjese radnih otopina analita	13
4.2. Rezultati validacije	14
5. RASPRAVA.....	21
6. ZAKLJUČAK	25
7. SAŽETAK.....	26
8. SUMMARY	27
9. LITERATURA.....	28
10. ŽIVOTOPIS	30

POPIS KRATICA:

LC – tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

GC – plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

SFC – kromatografija sa superkričnom tekućinom (engl. *supercritical fluid chromatography*)

UV spektar – ultraljubičasti spektar

VIS spektar – vidljivi spektar

ECD – elektrokemijski detektor (engl. *electrochemical detector*)

MS – maseni spektrometar (engl. *mass spectrometer*)

FLD – fluorescentni detektor (engl. *fluorescence detector*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

M1 – O-desmetiltramadol

M2 – N-desmetiltramadol

IS – interni standard (engl. *internal standard*)

R – koeficijent korelacije (engl. *correlation coefficient*)

R² – koeficijent determinacije (engl. *determination coefficient*)

LOD – granica detekcije (engl. *limit of detection*)

LOQ – granica kvantifikacije (engl. *limit of quantitation*)

SD – standardna devijacija (engl. *standard deviation*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *relative standard deviation*)

1. UVOD

1.1. Kromatografija

Kromatografija je separacijska analitička tehnika koja podrazumijeva postojanje mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne) faze. Ovisno o vrsti nosača kromatografiju dijelimo na plošnu (planarnu) kromatografiju gdje je stacionarna faza nanosena na ravnu plohu, a mobilna faza se kroz nju kreće djelovanjem kapilarnih sila ili gravitacije, te na kromatografiju na stupcu ili koloni gdje je stacionarna faza u uskoj cijevi (koloni), a mobilna faza putuje djelovanjem tlaka ili gravitacije (1).

Sastojci smjese putuju različitim brzinama cijelom duljinom stacionarne faze nošeni mobilnom fazom. Brzina putovanja pojedinog sastojka ovisi o interakciji sa stacionarnom fazom. Što je ta interakcija veća, brzina putovanja će biti manja te će i vrijeme elucije (ispiranje sastojka s kolone) biti duže i obratno, manja interakcija znači brže vrijeme putovanja i kraće vrijeme elucije. Retencijsko vrijeme (vrijeme zadržavanja) je vrijeme potrebno sastojku da nakon injektiranja u kolonu dođe do detektora (2).

Ovisno o vrsti mobilne faze koju koristimo tijekom kromatografske analize razlikujemo tri vrste analiza:

- a) tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC) s tekućom mobilnom fazom
- b) plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) s plinovitom mobilnom fazom
- c) kromatografija sa superkričnom tekućinom (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC) s tekućom mobilnom fazom u superkričnim uvjetima (1).

1.2. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (LC) vrsta je kromatografske separacije koja se odvija na koloni s tekućom mobilnom fazom. Najčešće korištena LC tehnika je razdjelna kromatografija temeljena na razdiobi sastojaka smjese između tekuće mobilne faze i stacionarne faze koja može biti adsorbirana ili kovalentno vezana na punilo kolone za što se najčešće upotrebljava silikagel. Polarnost stacionarne faze dijeli razdjelnu kromatografiju na normalnu (engl.

normal phase) gdje je stacionarna faza polarna, a mobilna faza nepolarna i na reverznu (engl. *reverse phase*) gdje je stacionarna faza nepolarna, a mobilna faza polarna (2).

1.2.1. Izvedba tekućinske kromatografije

Unos uzorka u LC sustav danas se obavlja automatskim injektorom s ventilom i petljom (engl. *loop*), s određenim volumenom koji definira količinu uzorka koji se unosi u kolonu (3).

Pumpe ili crpke služe za transport i reguliranje protoka mobilne faze. Njihova važna uloga je i omogućavanje promjene sastava mobilne faze programiranjem sustava za uzimanje različitih omjera sastojaka u određenom vremenu za što je potrebno dvije ili više pumpi i spremnika (4).

Predkolone (smještene prije analitičke kolone), dijelovi su kromatografskih sustava čija je uloga sprječavanja kontaminacije glavne kolone i omogućavanje duljeg korištenja kolone (4). Veoma su važne kod analize bioloških uzoraka (serum, plazma, puna krv) koji imaju male količine analita i veliki broj interferencija matriksa (1).

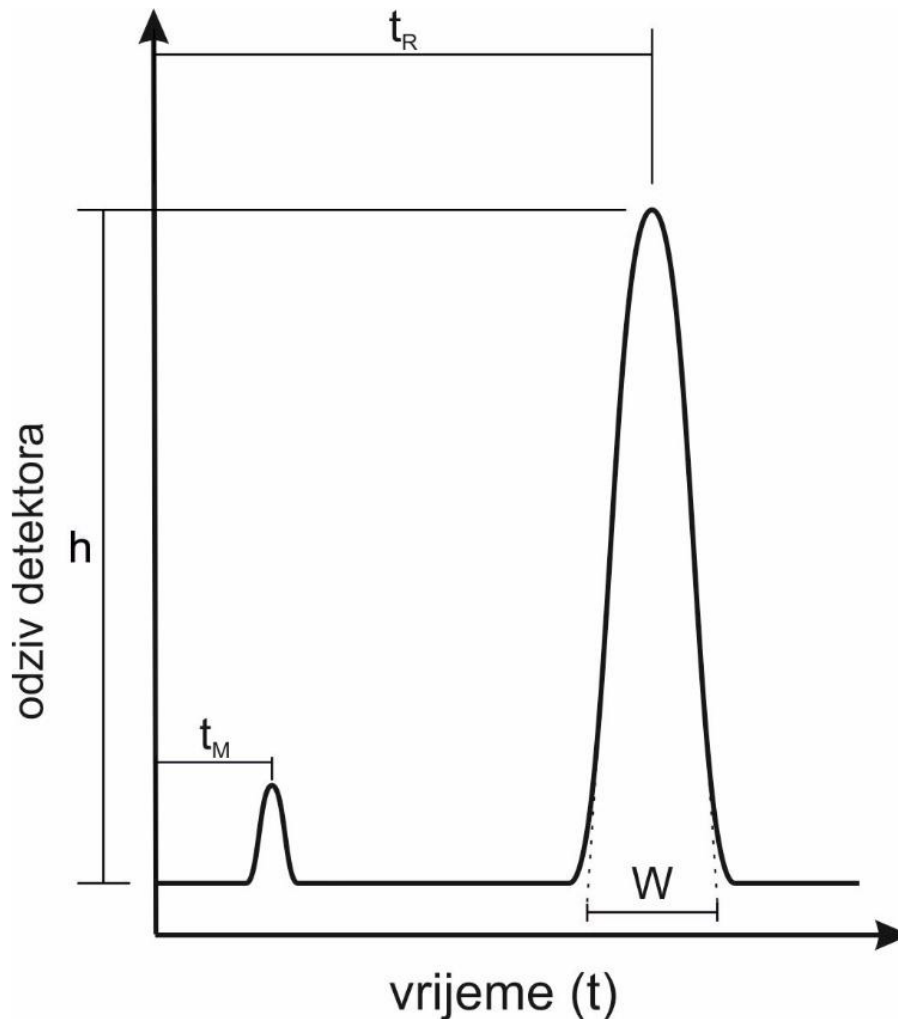
Kolona se tijekom analize nalazi u termostatom prostoru, tzv. pećnici (engl. *oven*), gdje se održava stalna optimalna temperatura za analizu. Na punilo kolone vezana je stacionarna faza koja može biti hidrofobna ili hidrofilna. Kroz unutrašnjost kolone teče mobilna faza noseći uzorak s analitima. Analiti suprotne polarnosti od stacionarne faze se vežu na nju dok analiti iste polarnosti zajedno s mobilnom fazom putuju prema detektoru. Analiti s najviše afiniteta za stacionarnu fazu ostaju najduže u koloni (3).

Izlaskom s kolone sastojci prolaze kroz detektor koji je spojen s kolonom nakon čega se mjeri signal koji nastaje prolaskom čestica analita nošenih mobilnom fazom. Za tekućinsku kromatografiju razvijene su različite vrste detektora s različitim principom mjerenja signala. Detektor apsorbancije svjetlosti mjeri apsorbanciju analita koji izlazi s kolone, najčešće u ultraljubičastom ili vidljivom dijelu spektra (UV/VIS), elektrokemijski detektor mjeri elektrokemijski aktivne sastojke (ECD), maseni spektrometar (MS) koji osim detekcije daje informacije i o strukturi analita i fluorescentni detektor (FLD) koji mjeri fluorescenciju analita (2).



Slika 1. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC): A – spremnik mobilne faze, B – otplinjavač, C – pumpe, D – automatski injektor, E – pećnica, F – UV/VIS detektor, G – fluorescentni detektor, H – elektrokemijski detektor

Završni produkt kromatografske analize je kromatogram, prikaz niza simetričnih elucijskih krivulja (pikova) dobivenih mjerenjem signala i vremena izlaska (elucije) pojedinog sastojka. Iz kromatograma očitavamo kvalitativnu vrijednost (detekcija) gledajući položaj pika, odnosno retencijsko vrijeme i kvantitativnu vrijednost (koncentracija i količina) ovisno o površini ispod pika. Pikovi kromatograma izlaze iz bazne linije koja predstavlja signal čiste mobilne faze (5).



Slika 2. Kromatogram

1.3. Opioidni analgetici

Bol je izravan odgovor na nepovoljan događaj organizma kao što je ozljeda, upala, kronična bolest i drugo. Njegova kontrola jedan je od najvažnijih terapijskih prioriteta. Osobama koje subjektivno trpe bol koja im znatno narušava kvalitetu života daju se analgetici, lijekovi koji uzrokuju analgeziju, odnosno stanje sa smanjenom boli ili bez prisustva boli. Kod jačih bolova jedan od najčešće korištenih analgetika su opioidni analgetici. Djelujući na središnji živčani sustav, izazivaju konfuzije, halucinacije, sedaciju i euforiju, što je suprotno stanju boli koja je povezana s tjeskobom i uznemirenosti. Uz sprječavanje boli koriste se i u drugim stanjima organizma, ali i sami mogu uzrokovati razna nepogodna stanja za organizam (6,7).

Najznačajnija posljedica uzimanja opioida je povećani arterijski pCO_2 te pojava hipoventilacije. Kod manjeg broja pacijenata koji su uzimali opioide javlja se nemogućnost kašlja, mučnina, povraćanje, suženje zjenica. Korištenje opioida može smanjiti apsorpciju

drugih lijekova uzrokovano smanjenjem pokretljivosti crijeva. Bol uzrokovana žučnim kamencima samo se povećava uzimanjem opioida te se kod takvih osoba izbjegava navedena skupina analgetika (6). Na endokrini sustav djeluje pojačanim otpuštanjem antidiuretskog hormona, prolaktina i somatotropina, a može inhibirati otpuštanje luteinizirajućeg hormona. Pojačavaju otpuštanje histamina iz mastocita, čime dolazi do lokalnog efekta kao što je urtikarija, svrbež na mjestu uboda i sistemski efekti, hipotenzija i bronhokonstrikcija (7).

1.4. Tramadol

Jedan od važnijih opioida koji uklanja bol djelovanjem na središnji živčani sustav jest tramadol. Njegova glavna formulacija je tramadolklorid (8).

Tramadol se uzima oralno, intravenski i intramuskularno, ali primjenjuje se i u obliku analnog čepića, transdermalnog flastera, intranazalno i bazalnim transmukozalnim putem (8). Oralno se može uzeti 50-100 mg tramadola, no razmak između uzimanja mora biti veći od 4 sata kako dnevna koncentracija nebi bila viša od 400 mg. Uobičajena je terapijska koncentracija 100-800 µg/l. U istim koncentracijama s istim razmakom uzima se i intramuskularno i intravenski. Kod starijih osoba razmaci između uzimanja mogu biti i veći zbog produljenog izlučivanja samog tramadola. Brzo i gotovo potpuno apsorbira se nakon oralne i parenteralne primjene, a njegova maksimalna koncentracija u serumu vidljiva je 2 sata nakon uzimanja doze (9).

Bioraspoloživost tramadola ovisi o vrsti primjene. Tako je oralnom primjenom, koja se daje kod kronične boli, bioraspoloživost lijeka 70 – 75%, a nakon intramuskularne injekcije koja se daje kod akutne boli, bioraspoloživost je 100%. Samo se 20% od cjelokupnog tramadola u plazmi veže na proteine, dok je ostalih 80% slobodno (9).

1.4.1. Farmakokinetika tramadola

Nakon oralne primjene gotovo se sav tramadol apsorbira (oko 90%) te prolazi kroz razne metaboličke reakcije. Najvažnije metaboličke reakcije tramadola su O-demetilacija gdje nastaje O-desmetiltramadol (M1) i N-demetilacija pri čemu nastaje N-desmetiltramadol (M2) (8). Njihovim daljnim metabolizmom nastaju N,N-didesmetiltramadol (M3), N,N,O-tridesmetiltramadol (M4) i N,O-didesmetiltramadol (M5) (11). O-desmetiltramadol jedini je aktivni metaboli tramadola, a analgetska aktivnost veća mu je i od aktivnosti samog tramadola. Osim N- i O- demetilacije tramadol može stupiti u reakcije konjugacije s glukuronskom kiselinom i sulfatom. Razni metabolički putevi tramadola omogućuju njemu i

njegovim metabolitima povećanje polarnosti zbog čega se nesmetano i gotovo u potpunosti izlučuju urinom. U roku tri dana urinom će se kod zdravih osoba odstraniti 90% cjelokupnog tramadola dok će se ostatak izlučiti fecesom. Poluživot u plazmi nepromijenjenog tramadola je 6 sati, a O-desmetiltramadola je 8 sati (8).

1.4.2. Određivanje koncentracije tramadola

Do danas su ispitivane brojne metode mjerenja tramadola i njegovih metabolita, no komercijalno dostupna metoda za detekciju tramadola i njegovih metabolita i dalje nije dostupna. Većina istraživanja bazirala se samo na detekciji tramadola, dok su samo pojedini pokušali s optimizacijom metode za njegove metabolite. Optimizacija analitičkih uvjeta za detekciju i tramadola i metabolita, kao i za detekciju niskih koncentracija analita pokazali su se kao ozbiljan analitički problem. Budući da je aktivnost M1 metabolita u nekim slučajevima veća i od aktivnosti tramadola, iznimno je važno pronaći referentnu metodu za detekciju svih komponenti i izvorne supstance i najvažnijih metabolita.

2. CILJ

Cilj istraživanja je optimizacija mjernog postupka za kvantifikaciju tramadola i njegovih metabolita u plazmi. U svrhu postizanja potrebne pouzdanosti mjernog postupka prilagodile su se analitičke postavke tekućinsko kromatografskog postupka. Nakon izbora stacionarne faze, optimiziran je sastav mobilne faze te postavke fluorescentnog detektora. Na koncu je ispitivana linearnost, limit detekcije i kvantifikacije, preciznosti i točnosti razvijenog postupka. Postavljeni kriteriji prihvatljivosti su: linearnost kalibracijskog pravca $R > 0,98$, limit kvantifikacije $< 10 \mu\text{g/l}$ za sve analite; točnost 90 – 110% (iskorištenje); preciznost $< 10\%$ (RSD).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Optimizacija metode provodila se iterativnim postupcima ispitivanja različitih stacionarnih faza (kromatografske kolone) i različitih sastava mobilne faze da bi se dobila optimalna separacija analita (tramadol i njegovi metaboliti te interni standard) i zadovoljavajuća analitička osjetljivost metode. Nakon odabira najprikladnije stacionarne i mobilne faze, daljnjim ispitivanjem optimizirao se postupak pripreme uzorka, postavke fluorescentnog detektora i volumen injektiranja pripremljenog uzorka. Nakon završene optimizacije analitičke HPLC metode, njene performanse su provjerene određivanjem linearnosti, granica detekcije i kvantifikacije metode preciznosti i točnosti.

3.2. Materijal

Za ispitivanje i mjerenje tijekom optimizacije metode određivanje tramadola i njegovih metabolita korištene su vodene otopine certificiranih referentnih materijala tramadola: O-desmetiltramadola i N-desmetiltramadola (LGC standards, Teddington, UK). Za ispitivanje pripreme uzorka humane plazme korišteni su navedeni referentni materijali tramadola i njegovih metabolita otopljeni u uzorcima plazme dobrovoljaca (istraživač) koji ne uzimaju tramadol niti bilo koje druge lijekove. U istraživanju su korišteni samo komercijalno dostupni certificirani referentni materijali.

a) Stock i radna otopina tramadola (T)

Za optimizaciju metode korištene su 4 stock otopine od kojih je svaka korištena i za izradu njezine radne otopine također korištene u optimizaciji.

Stock otopina tramadola dobivena je otapanjem 10 mg tramadol hidroklorida u 1 ml metanola. Kako bi dobili njezinu radnu otopinu, 0,1 ml stock otopine tramadola razrjeđujemo s ultračistom vodom do 100 ml.

b) Stock i radna otopina M1

Priprema stock otopine M1 obuhvaća otapanje 10 mg O-desmetiltramadol hidroklorida u 1 ml metanola. Radna otopina M1 sastoji se od 0,1 ml razrijeđene stock otopine M1 s ultračistom vodom do 100 ml.

c) Stock i radna otopina M2

Treća stock otopina, stock otopina M2, dobiva se otapanjem 10 mg N-desmetiltramadol hidroklorida u 1 ml metanola. Njezina radna otopina dobivena je s 0,1 ml stock otopine M2 razrijeđene s ultračistom vodom do 100 ml.

d) Stock i radna otopina internog standarda (IS)

Zadnja, stock otopina internog standarda (IS) pripremljena je otapanjem 1 g flukonazola u 5 ml metanola dok se njezina radna otopina dobije razrjeđivanjem 0,25 ml stock otopine IS s ultračistom vodom do 10 ml.

e) Mobilna faza

Priprema mobilne faze obuhvaća otapanje 0,147 g H_3PO_4 , vagano analitičkom vagom, u malo ultračiste vode. Zatim se dodaje 190 ml metanola i nadopunjuje se do 1000 ml s ultračistom vodom. Otopina mobilne faze zakiseljuje se do pH 2,5 s 1M H_3PO_4 .

f) Priprema uzorka krvne plazme

Za pripremu uzorka plazme u označenu Eppendorf epruvetu od 1,5 ml dodamo 120 μ l plazme, 20 μ l radne otopine IS i 50 μ l 2M NaOH te se sve zajedno lagano promiješa. Radna otopina IS i NaOH za uporabu moraju biti na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodaje se 1,25 ml etil-acetata, zatvara se epruveta i jednu minutu miješa se na vorteksu. Zatim se smjesa centrifugira 2 – 3 minute na 10000g. Točno 1,2 ml organskog sloja koji se odvoji tijekom centrifugiranja, prenesemo u vialu od 1,5 ml i uparavamo u struji dušika na 40°C do suha (otprilike 15 – 20 minuta). Zadnji korak je rekonstitucija uparenog uzorka dodavanjem 120 μ l mobilne faze te vorteksiranjem 5 – 6 sekundi.

g) Kalibracijski standard

Korišteni matriks kalibratora dobiveni su otapanjem točnih količina analita u uzorku plazme koji ne sadrži iste. Izrada kalibracijskih standarda vršila se iz radnih otopina tramadola, M1 i M2.

Tablica 1. Priprema matriks kalibratora

Kalibrac. točka	1	2	3	10000 µg/l	4	5	6	7
FAKTOR	500	200	100	FAKTOR	200	100	50	20
V stand. T (µl)	3	5	10	V stand. T (µl)	5	10	20	50
V stand. M1 (µl)	3	5	10	V stand. M1 (µl)	5	10	20	50
V stand. M2 (µl)	3	5	10	V stand. M2 (µl)	5	10	20	50
V st. uk.	9	15	30	V stand. uk.	15	30	60	150
V plazme (µl)	1491	985	970	V plazme (µl)	985	970	940	850
V ukupno (ml)	1,5	1	1	V ukupno (ml)	1	1	1	1
KONC. (µg/l)	2	5	10	KONC. (µg/l)	50	100	200	500

3.3. Metode

Optimizacija HPLC metode za određivanje tramadola i njegovih metabolita u plazmi provodila se na HPLC uređaju Shimadzu Nexera-R s fluorescentim detektorom Shimadzu RF- 20A XS (Shimadzu GmbH, Duisburg, Germany). Prilikom optimizacije bile su ispitane sljedeće stacionarne faze (kolone): GL Sciences Inertsil ODS- 4,5 µm, 4,6 x 150 mm, GL Sciences Inertsil ODS- 4,5 µm, 4,6 x 250 mm (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan), Agilent Zorbax SB-C18, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm i Agilent Zorbax SB-C8, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm (Agilent, Waldbronn, Germany) te mobilne faze sljedećeg sastava: metanol:1.5 mM vodena otopina H₃PO₄ (19:81), pH 2.5 i acetonitril:0.04M NaH₂PO₄ (25:75), pH 4.0. Kao interni standard korišten je flukonazol (LGC standards, Teddington, UK). Ispitivano je i pobuđivanje analita različitim valnim duljinama prilikom detekcije.

Nakon optimizacije kromatografske separacije izborom prikladne stacionarne i mobilne faze, protoka mobilne faze, temperature odjeljivanja, trajanja kromatografske analize te temperature detektora i izbora prikladnih valnih duljina ekscitacije i emisije za fluorescentni detektor, provedena je optimizacija pripreme uzorka humane plazme u kojoj će se provesti mjerenje tramadola i njegovih metabolita u uzorcima bolesnika.

Naposljetku je napravljena kalibracija metodom unutarnjeg standarda pripravom i mjerenjem otopina tramadola i njegovih metabolita uz određivanje linearnosti, granica detekcije i kvantifikacije, ponovljivosti i točnosti metode.

Kalibracijski pravac metode pokazatelj je linearnosti same metode. Za svaki analit odrađeno je 8 mjerenja pripremljenih kalibracijskih standarda (tablica 1.) u različitim koncentracijama za svako mjerenje. Iz dobivenih rezultata (površina kromatografskih pikova analita i IS) i poznate koncentracije metodom linearne regresije napravljen je kalibracijski pravac, te je određena kalibracijska jednadžba, odnosno jednadžba linearne regresije za izračun nepoznate koncentracije analita iz dobivenih vrijednosti površine pikova analita i IS.

3.4. Statističke metode

Iz dobivenih rezultata površine analita i IS te koncentracije pripremljenih kalibracijskih standarda metodom linearne regresijske analize dobiven je kalibracijski pravac čija jednadžba pravca predstavlja matematički model za određivanje nepoznate koncentracije analita iz izmjerenih površina analita i IS. Pokazatelji slaganja dobivene jednadžbe pravca i izmjerenih podataka parametri su linearnosti modela od kojih je najpoznatiji koeficijent korelacije točke pravca (R) koji smo izračunali pomoću Pearsonovog testa korelacije. Kvadriranjem R dobijemo koeficijent determinacije (R^2) koji je još jedan od pokazatelja linearnosti. Poželjno je da su R i R^2 što bliži vrijednosti 1 koja predstavlja idealno slaganje izmjerenih podataka i modela linearne regresije. Najmanja prihvatljiva vrijednost linearnosti koju smo odredili za našu metodu je 0,98.

Da bi se odredile granice detekcije (LOD), odnosno najmanji iznos analita koji se može pouzdano mjeriti, tj. razlikovati od nule i granice kvantifikacije (LOQ), najniža koncentracija analita u uzorku koja se može mjeriti s prihvatljivom preciznošću i točnošću, kroz 10 uzastopnih mjerenja otopine niske koncentracije analita izmjerene su koncentracije analita pomoću kojih je izračunata standardna devijacija (SD) s kojom možemo izračunati LOD i LOQ pomoću sljedećih formula (11).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SD}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}$$

Iz ponovljenih mjerenja izračunata je srednja vrijednost, relativna standardna devijacija (omjer srednje vrijednosti i SD izražen u postocima – RSD) i omjer signala i šuma (S/N) analita. Zadani kriterij prihvatljivosti za LOQ za našu metodu je $< 10 \mu\text{g/l}$ za sve analite.

Procjena ponovljivost metode, odnosno slaganje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem iste koncentracije analita u istim mjernim uvjetima, dobivena je pomoću RSD koja je

izračunata na temelju rezultata dobivenih kroz 10 uzastopnih mjerenja (4). Metoda je valjana ako su rezultati $RSD < 10 \%$.

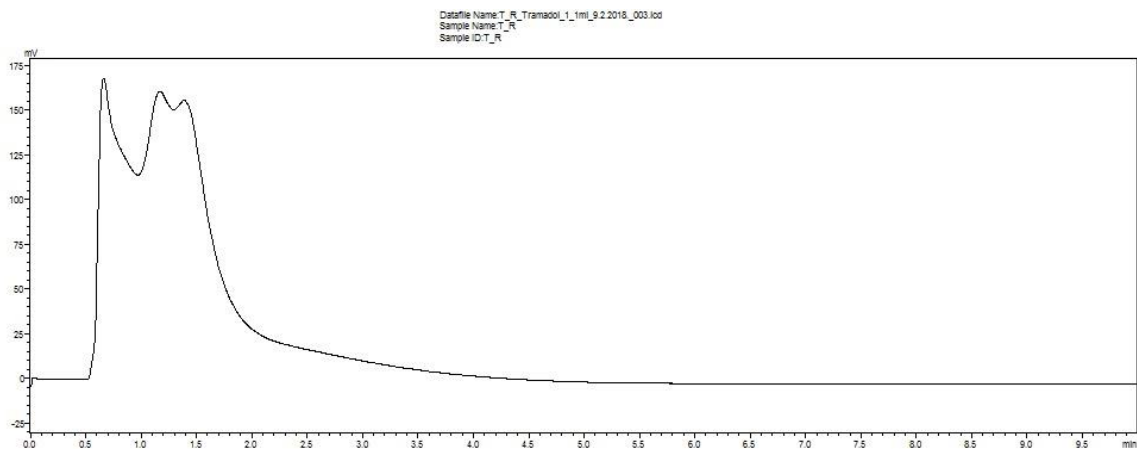
Procjena točnosti metode provedena je također uzastopnim mjerenjem iste koncentracije analita u istim mjernim uvjetima. Provedeno je 10 mjerenja otopina točno poznate koncentracije analita prema čijim je rezultatima izmjereno iskorištenje (engl. *recovery*) koje predstavlja omjer između koncentracije dobivene mjerenjem našom metodom i točno poznate koncentracije analita u uzorku (bilo kao vrijednost koje smo sami dodali ili kao vrijednost dobivene od proizvođača) u postotcima. Kriterij prihvatljivosti koji smo zadali za našu metodu je iskorištenje u rasponu 90 – 110 %. Izračuni su provedeni primjenom računalnog programa Microsoft Office Excel 2007.

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI OPTIMIZACIJE

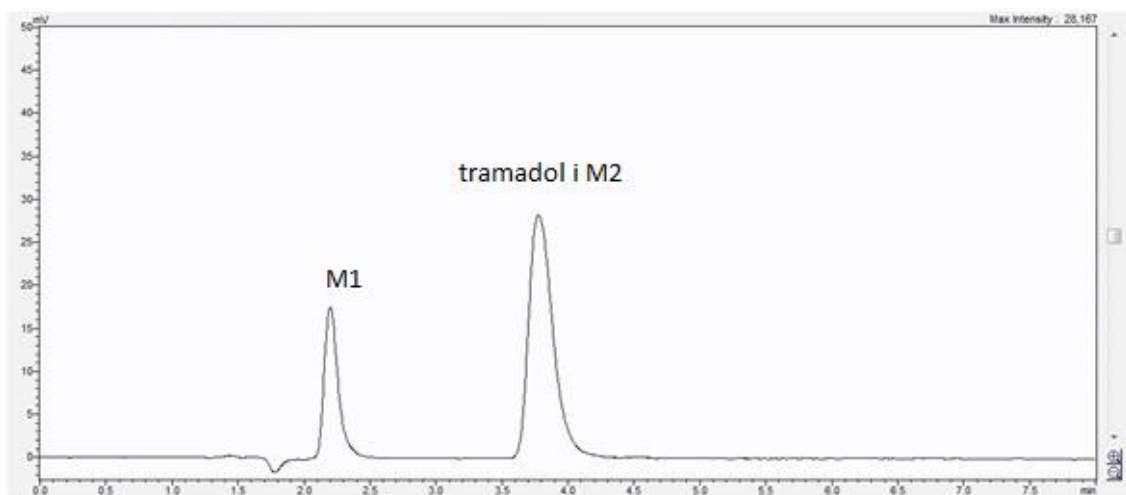
4.1.1. Testiranje djelotvornosti kolone uporabom pojedinačnih radnih otopina tramadola, M1, M2 i IS te smjese radnih otopina analita

- GL Sciences Inertsil ODS- 4,5 μm , 4,6 x 150 mm \rightarrow nije dobivena separacija analita (tramadol, M1, M2) s niti jednom mobilnom fazom;
- GL Sciences Inertsil ODS- 4,5 μm , 4,6 x 250 mm \rightarrow nije dobivena separacija analita (tramadol, M1, M2) s niti jednom mobilnom fazom;



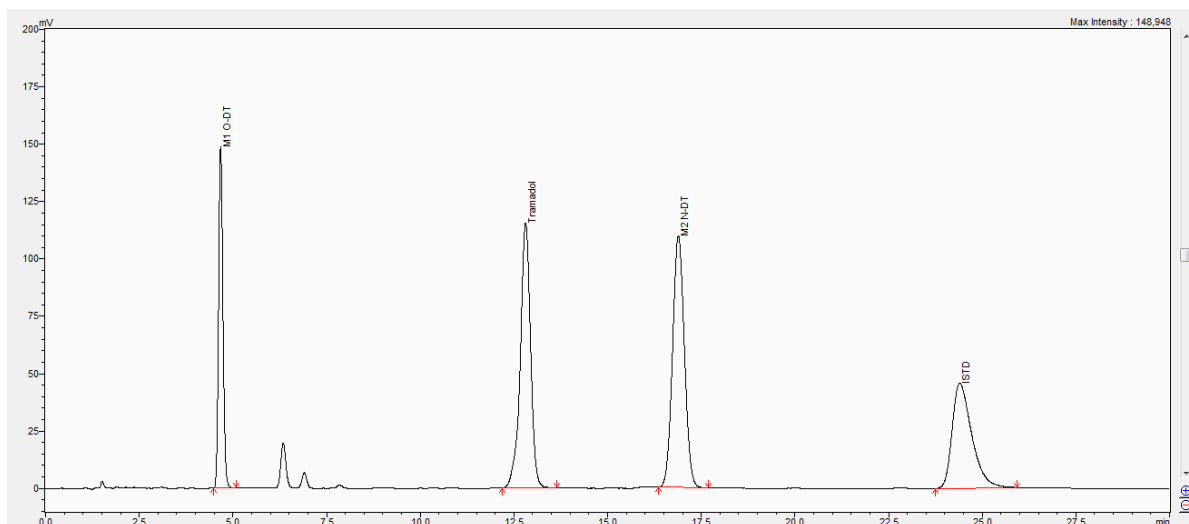
Slika 3. Prikaz kromatograma dobivenog korištenjem GL Sciences Inertsil ODS 4,5 μm , 4,6 x 250 mm kolone za detekciju tramadola, M1 i M2

- Agilent Zorbax SB-C18, 3,5 μm , 4,6 x 150 mm \rightarrow dobivena separacija M1, dok tramadol i M2 nisu separirani. Pik 1 je M1, a pik 2 su spojeni tramadol i M2.



Slika 4. Prikaz kromatograma dobivenog korištenjem Agilent Zorbax SB-C18, 3,5 μm , 4,6 x 150 mm kolone za detekciju tramadola, M1 i M2

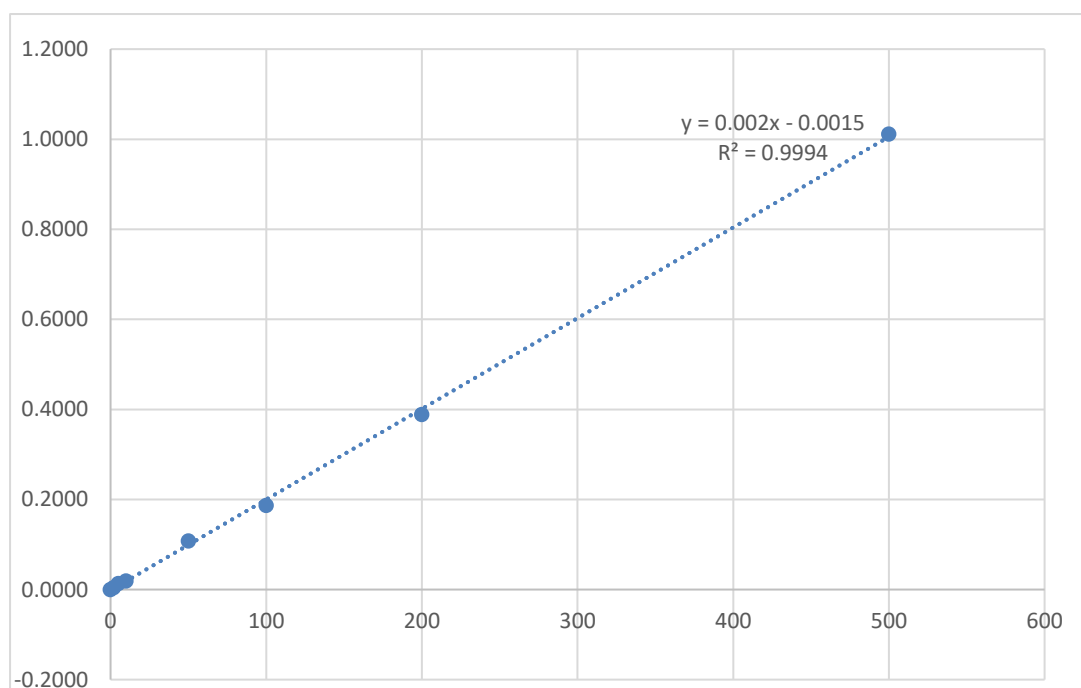
- d) Agilent Zorbax SB-C8, 3,5 μm , 4,6 x 150 mm \rightarrow dobivena je separacija triju analita i IS. Pik 1 je M1, pik 2 je tramadol, pik 3 je M2 i pik 4 je IS.



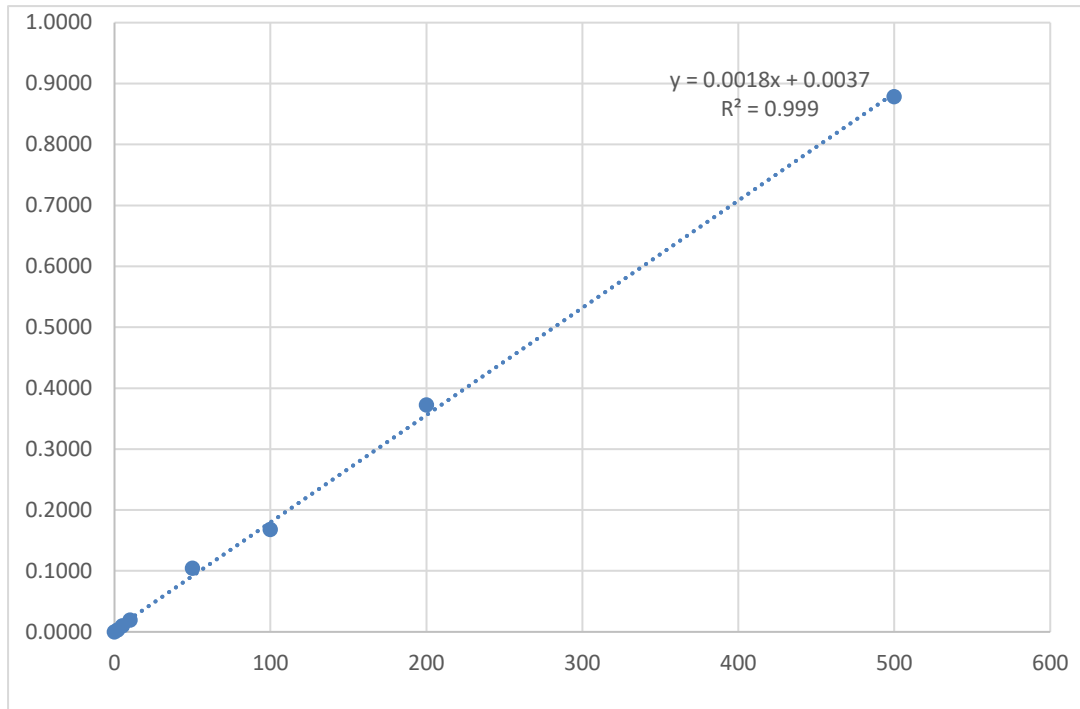
Slika 5. Prikaz kromatograma dobivenog korištenjem Agilent Zorbax SB-C8, 3,5 μm , 4,6 x 150 mm kolone za detekciju tramadola, M1 i M2

4.2. REZULTATI VALIDACIJE

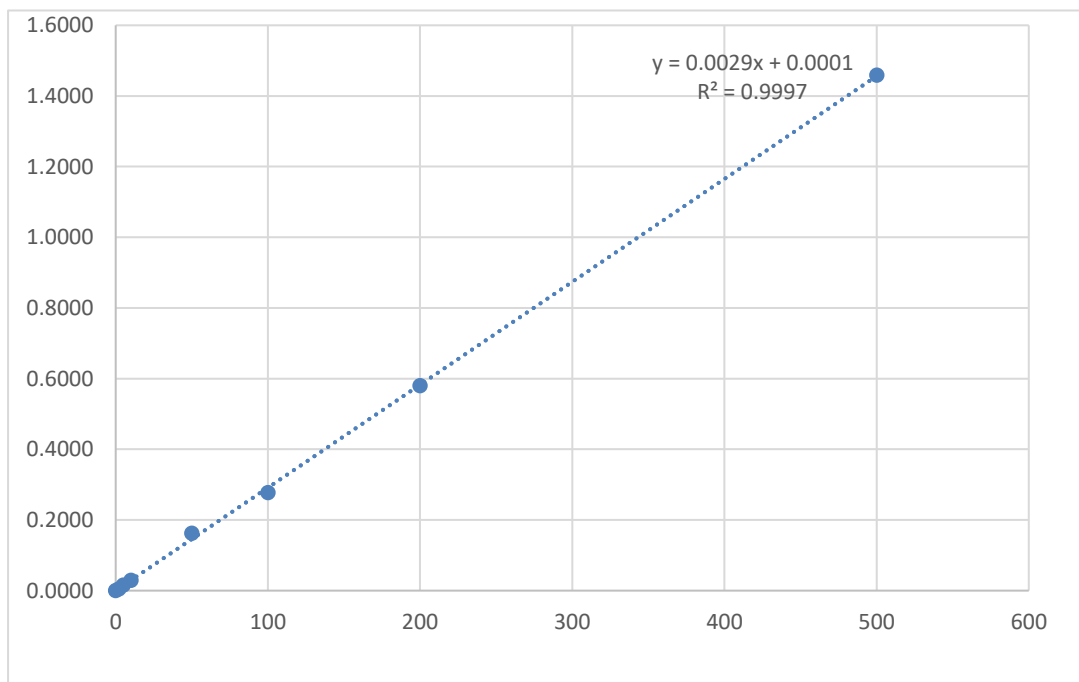
- a) Kalibracijski pravac



Slika 6. Kalibracijska krivulja za tramadol



Slika 7. Kalibracijska krivulja za M1



Slika 8. Kalibracijska krivulja za M2

b) Ispitivanje granica detekcije i kvantifikacije

Tablica 2. Rezultati ispitivanja granica detekcije i kvantifikacije za tramadol uporabom radne otopine tramadola

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA (pripremljeno)	KONCENTRACIJA (izmjereno)
1	5,00	4,93
2	5,00	5,80
3	5,00	4,63
4	5,00	5,52
5	5,00	5,49
6	5,00	4,64
7	5,00	4,87
8	5,00	5,12
9	5,00	5,25
10	5,00	4,95
Srednja vrijednost		5,12
SD		0,39
RSD (%)		7,62%
S/N		13,1
LOD		1,29 µg/l
LOQ		3,90 µg/l

Tablica 3. Rezultati ispitivanja granica detekcije i kvantifikacije za M1 uporabom radne otopine M1

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA (pripremljeno)	KONCENTRACIJA (izmjereno)
1	5,00	5,18
2	5,00	4,95
3	5,00	4,33
4	5,00	5,64
5	5,00	5,93
6	5,00	5,22
7	5,00	5,15
8	5,00	5,03
9	5,00	5,04
10	5,00	4,64
Srednja vrijednost		5,11
SD		0,45
RSD (%)		8,84%
S/N		11,3
LOD		1,49 µg/l
LOQ		4,52 µg/l

Tablica 4. Rezultati ispitivanja granica detekcije i kvantifikacije za M2 uporabom radne otopine M2

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA (pripremljeno)	KONCENTRACIJA (izmjereno)
1	5,00	4,69
2	5,00	5,03
3	5,00	4,94
4	5,00	5,10
5	5,00	5,30
6	5,00	4,80
7	5,00	4,80
8	5,00	4,45
9	5,00	4,75
10	5,00	4,05
Srednja vrijednost		4,79
SD		0,35
RSD (%)		7,34%
S/N		13,6
LOD		1,16 µg/l
LOQ		3,52 µg/l

c) Ispitivanje ponovljivosti metode

Tablica 5. Rezultati ispitivanja ponovljivosti metode za tramadol uporabom uzorka LGC QUARTZ Round 75 razrijeđen 1 : 4 s plazmom

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA	
1	238,1	
2	249,7	
3	242,0	
4	262,2	
5	247,5	
6	248,0	
7	248,4	
8	239,7	
9	259,7	
10	258,5	
Srednja vrijednost		249,4
SD		8,4
RSD (%)		3,37%

Tablica 6. Rezultati ispitivanja ponovljivosti metode za M1 uporabom radne otopine M1

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA
1	257,6
2	254,8
3	255,8
4	255,1
5	254,8
6	255,6
7	254,8
8	254,7
9	255,9
10	253,6
Srednja vrijednost	255,3
SD	1,1
RSD (%)	0,41%

Tablica 7. Rezultati ispitivanja ponovljivosti metode za M2 uporabom radne otopine M2

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA
1	248,5
2	251,7
3	250,0
4	243,5
5	244,9
6	244,8
7	239,2
8	239,7
9	239,4
10	241,7
Srednja vrijednost	244,3
SD	4,5
RSD (%)	1,85%

d) Ispitivanje točnosti metode

Tablica 8. Rezultati ispitivanja točnosti metode za tramadol uporabom uzorka LGC QUARTZ Round 75 razrijeđen 1 : 4 s plazmom

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA (pripremljeno)	KONCENTRACIJA (izmjereno)	KONCENTRACIJA (pripremljeno) PRERAČUNATA	KONCENTRACIJA (izmjereno) PRERAČUNATA	RECOVERY (%)
1	250,0	238,1	1000,0	952,4	95,24%
2	250,0	249,7	1000,0	998,9	99,89%
3	250,0	242,0	1000,0	968,2	96,82%
4	250,0	262,2	1000,0	1048,9	104,89%
5	250,0	247,5	1000,0	990,0	99,00%
6	250,0	248,0	1000,0	991,9	99,19%
7	250,0	248,4	1000,0	993,8	99,38%
8	250,0	239,7	1000,0	958,7	95,87%
9	250,0	259,7	1000,0	1038,6	103,86%
10	250,0	258,5	1000,0	1034,2	103,42%
	Sr. vrijednost			997,5	99,75%
	SD			33,6	3,36%
	RSD (%)			3,37%	3,37%

Uzorak LGC QUARTZ Round 75, koji smo koristili u procjeni točnosti, bio je izvan mjernog područja metode (500 µg/l), zato je prije pripreme uzorka razrijeđen 1 : 4 s plazmom, a faktor razrjeđenja je kasnije uzet u obzir kod preračuna stvarne koncentracije.

Tablica 9. Rezultati ispitivanja točnosti metode za M1 uporabom radne otopine M1

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA (pripremljeno)	KONCENTRACIJA (izmjereno)	RECOVERY (%)
1	250,0	257,6	103,0%
2	250,0	254,8	101,9%
3	250,0	255,8	102,3%
4	250,0	255,1	102,0%
5	250,0	254,8	101,9%
6	250,0	255,6	102,2%
7	250,0	254,8	101,9%
8	250,0	254,7	101,9%
9	250,0	255,9	102,4%
10	250,0	253,6	101,4%
	Srednja vrijednost	255,3	102,1%
	SD	1,1	0,42%
	RSD (%)	0,41%	0,41%

Tablica 10. Rezultati ispitivanja točnosti metode za M2 uporabom radne otopine M2

INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA (pripremljeno)	KONCENTRACIJA (izmjereno)	RECOVERY (%)
1	250,0	248,5	99,4%
2	250,0	251,7	100,7%
3	250,0	250,0	100,0%
4	250,0	243,5	97,4%
5	250,0	244,9	97,9%
6	250,0	244,8	97,9%
7	250,0	239,2	95,7%
8	250,0	239,7	95,9%
9	250,0	239,4	95,8%
10	250,0	241,7	96,7%
	Srednja vrijednost	244,3	97,7%
	SD	4,5	1,81%
	RSD (%)	1,85%	1,85%

5. RASPRAVA

Do sada su provedena brojna istraživanja u svrhu pronalaska optimalne metode za detekciju tramadola i njegovih metabolita. S obzirom da je u nekim slučajevima aktivnost M1 metabolita u organizmu jednaka ili čak veća od aktivnosti samog tramadola, važno je pronaći metodu koja omogućuje detekciju njegovih najvažnijih metabolita. Međutim kako svaki metabolit ima različita svojstva, komercijalno nije dostupna metoda koja ih može istovremeno sve identificirati.

Na temelju prijašnjih istraživanja i optimizacija metode za detekciju tramadola i njegovih metabolita na početku su isprobane kolone GL Sciences Inertsil C18 ODS 4,5 μm , 4,6 x 250 mm korištena za detekciju tramadola, M1 i M2 u istraživanju M.R. Rouinia i suradnika i GL Sciences Inertsil C18 ODS 4,5 μm , 4,6 x 150 mm, koju su koristili Xiao Zhou i Ji Liu za detekciju tramadola (15,16). S niti jednom ispitivanom kolonom u našem slučaju nismo dobili separaciju analita uz uporabu isprobanih mobilnih faza. Kako s prethodno navedenim kolonama nije dobivena separacija analita, ispitivana je treća kolona, Agilent Zorbax SB-C18, 3,5 μm , 4,6 x 150 mm. Uporabom te kolone na kromatogramu su nam se javila dva pika. Prvi pik odgovara M1 metabolitu, dok se u drugom piku preklapaju tramadol i M2 metabolit. Iako je separacija poboljšana u odnosu na prve dvije kolone, dobiveni rezultati ne pružaju optimalnu separaciju. Zadnja ispitivana kolona bile je Agilent Zorbax SB-C8, 3,5 μm , 4,6 x 150 mm. Dobiveni su pikovi za sva tri analita i IS: na početku izlazi M1 metabolit, zatim tramadol, nakon njega M2 metabolit i na kraju IS. Kako su uporabom te kolone dobivena četiri potpuno odvojena pika za svaki analit i IS, ova je kolona korištena kao referentna kolona u daljnjim mjerenjima.

Ispitane su dvije mobilne faze. Prva mobilna faza, korištena u Zhouovom i Liuvom istraživanju, bila je acetonitril:[0,04 M NaH_2PO_4] u omjeru 25:75. Njezin pH iznosi 4,0, a protok je 1 ml/min (16). Kako njihovo istraživanje nije bilo usmjereno prema pronalasku metabolita tramadola, mobilna se faza nije pokazala prikladnom u opisanom istraživanju te je ispitivana još jedna mobilna faza korištena u dva istraživanja Ardakana i suradnika iz 2007. godine. Ardakan i suradnici su u oba rada analizirali tramadol i njegove metabolite. Na temelju njihovih radova testirana je mobilna faza metanol:1,5 mM H_3PO_4 u H_2O (19:81), pH 2,5 čiji je protok 1 ml/min (12,13). Koristeći navedenu mobilnu fazu, dobivena je zadovoljavajuća separacija analita i IS te je ista korištena u daljnjim mjerenjima.

Iako kolona i mobilna faza korištene u Zhuovom istraživanju nisu bile prikladna za optimizaciju metode, temperatura kolone korištena u njegovom istraživanju, 35°C, pokazala se kao prikladna temperatura kolone Agilent Zorbax SB-C8, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm. Odrađena su mjerenja i pri nižoj temperaturi, 30°C, korištenoj u Rouinijevom istraživanju 2006. godine pri kojoj nismo dobili adekvatne rezultate (15). Mjerenja su odrađena i pri temperaturi od 40°C, pri kojoj također nije dobivena optimalna separacija.

Zbog svojstva fluorescencije tramadola i njegovih metabolita pri detekciji analita korišten je fluorescentni detektor. Na temelju prijašnjih istraživanja ispitivane su detekcije pobuđivanjem s tri različite valne duljine. Prema istraživanjima Zhoua i Liua valna duljina koju smo koristili kod pobuđivanja analita bila je 275 nm, a valna duljina emitiranja bila je na 302 nm (16). Drugi pokušaj detekcije temeljio se na istraživanju Campanera i suradnika iz 1998. godine, gdje smo uzorak pobudili svjetlošću valne duljine 207 nm te je emitirana svjetlost valne duljine 300 nm (14). Treća, nama najprikladnija metoda detekcije, obuhvaća pobuđivanje svjetlošću valne duljine 200 nm, gdje analiti emitiraju svjetlost valne duljine 301 nm. Odabranu valnu duljinu u oba svoja istraživanja koristio je Ardakani sa suradnicima i Rouini. Tom valnom duljinom dobili smo najbolje rezultate te smo ju koristili za daljnja mjerenja (13,14,16).

Osam mjerenja za određivanje linearnosti metode odrađeno je u koncentracijama 0 – 500 µg/l, pri čemu su nađene jednadžbe pravca koja za tramadol glasi $y = 0,0020x - 0,0015$. Površine ispod pika analita i IS odnosno njihov omjer koristi se za izradu kalibracijskog pravca. U omjer se stavi omjer površina i pripremljene koncentracije analita te se pomoću metode najmanjih kvadrata dobije jednadžba pravca koji najbolje povezuje izmjerene vrijednosti. Pomoću Pearsonova testa dobivene su vrijednosti korelacije koje za tramadol iznose $R = 0,9997$. Kvadriranjem koeficijenta korelacije dobiven je i koeficijent determinacije koji za tramadol iznosi $R^2 = 0,9994$. Za M1 jednadžba pravca je $y = 0,0018x + 0,0037$. R iznosi 0,9995, a R^2 0,9990, a za M2 dobivena jednadžba pravca je $y = 0,0029x + 0,0001$, $R = 0,9999$, a $R^2 = 0,9997$. Na temelju dobivenih rezultata, jer je prihvatljivi $R > 0,98$, možemo zaključiti da je za sva tri analita metoda linearna u koncentracijama od 2 do 500 µg/l.

Iz tablica 2., 3. i 4. iščitavamo mjerenja za određivanje granica detekcije i kvantifikacije tramadola, M1 i M2. Za sva tri analita bili su pripremljeni uzorci koncentracija 5 µg/l. Srednja vrijednost izmjerenih koncentracija za tramadol iznosi 5,12 µg/l, izmjerena SD iznosila je 0,39, RSD 7,62 % i omjer S/N je 13,1. Prema navedenim izrazima izračunati su LOD i LOQ:

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= 3,3 \times 0,39 \\ &= 1,29 \mu\text{g/l} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= 10 \times 0,39 \\ &= 3,90 \mu\text{g/l} \end{aligned}$$

Za M1 (tablica 3.) izračunata je srednja vrijednost koja iznosi 5,11 $\mu\text{g/l}$, a SD je 0,45. Na temelju dobivenih rezultata dobivene su LOD 1,49 $\mu\text{g/l}$ te LOQ 4,52 $\mu\text{g/l}$. Treće mjerenje iščitavamo iz tablice 4., koja pokazuje rezultate za M2. Srednja vrijednost izmjerenih koncentracija iznosi 4,79 $\mu\text{g/l}$ dok je dobiveni SD 0,35. Pomoću navedenih formula dobivene su vrijednosti gdje LOD iznosi 1,16 $\mu\text{g/l}$, a LOQ 3,52 $\mu\text{g/l}$. Ispunjen je zadani kriterij prihvatljivosti gdje je LOQ < 10 $\mu\text{g/l}$ za sve analite.

Sljedeća mjerenja odrađena su radi ispitivanja ponovljivosti metode. Rezultate možemo iščitati iz tablica 5., 6. i 7. Nakon 10 uzastopnih mjerenja za tramadol RSD iznosi 3,37 %. Za M1 RSD je 0,41 %. Zadnje je ispitana ponovljivost za M2 gdje je dobivena RSD 1,85 %. U sva tri slučaja metoda je prihvatljiva s obzirom da je kriterij prihvatljivosti RSD < 10 %.

Za procjenu točnosti metode za tramadol provedeno je dodatnih 10 uzastopnih mjerenja gdje je bila točno poznata koncentracija analita u uzorku od 1000 $\mu\text{g/l}$ (uzorak korišten za vanjsku procjenu kvalitete LGC QUARTZ Round 75, u kojemu se nalazio tramadol u točno poznatoj koncentraciji). Srednja preračunata vrijednost dobivenih rezultata za tramadol iznosi 997,5 $\mu\text{g/l}$, a RSD 3,37 %. Dobivene koncentracije podijele se s iznosom pripremljene koncentracije te se dobiveni rezultat prikaže u obliku postotka. Krajni rezultat postotka pokazuje iskorištenje čija srednja vrijednost za tramadol iznosi 99,75 %. Za mjerenje točnosti metode kod M1 i M2 korišteni su uzorci u koje je dodana točno određena količina metabolita M1 i M2, odnosno korišteni su rezultati dobiveni kod procjene ponovljivosti metode. Iz tablica 9. i 10. možemo iščitati iskorištenje. Izmjerena srednja vrijednost iskorištenja za M1 je 102,1 %, a za M2 je 97,7 %. Kod procjene točnosti, metoda se pokazala prihvatljivom jer je srednja vrijednost iskorištenja za sva tri analita u intervalu 90 – 110 %, koji je postavljen kao kriterij prihvatljivosti.

Optimizirana metoda za određivanje tramadola i njegovih metabolita prošla je i vanjsku procjenu kvalitete preko LGC QUARTZ sheme (LGC Standards, Wesel, Njemačka). Laboratorij je zaprimio uzorak krvi s nepoznatim koncentracijama lijekova među kojima je bio i tramadol. Uporabom optimizirane HPLC metode opisane u ovom radu dobiveni rezultat koncentracije tramadola u uzorku LGC QUARTZ Round 75 iznosi 0,93 mg/l. Nakon dostave rezultata organizatoru vanjske kontrole kvalitete (LGC), izvršena je usporedba poslanih rezultata s točno određenom koncentracijom proizvođača koji za tramadol iznosi 1 mg/l.

Budući da je prema dobivenim rezultatima iskorištenje tramadola 93%, možemo reći kako i to potvrđuje da opisana metoda, s obzirom na točnost, daje zadovoljavajuće rezultate.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- za detekciju tramadola i njegovih metabolita M1 i M2, u našem slučaju najbolje rezultate separacije pokazala je kolona Agilent Zorbax SB-C8, 3,5 μm , 4,6 x 150 mm;
- u kombinaciji s navedenom kolonom, najbolju separaciju dobili smo korištenjem mobilne faze sastava metanol:1,5 mM H_3PO_4 u H_2O (19:81) čiji pH iznosi 2,5;
- prilikom detekcije analita fluorescentnim detektorom (FLD) najbolje rezultate dobili smo korištenjem valne duljine ekscitacije od 200 nm i mjerenjem emisije valne duljine 301 nm;
- nakon optimizacije HPLC separacije provedena je djelomična validacija metode, čiji je prvi korak bila izrada kalibracijskog pravca metodom linearne regresije, gdje je dobivena prihvatljiva linearnost za sve analite ($R > 0,98$): $R(\text{tramadol})= 0,9997$, $R(\text{M1})= 0,9995$ i $R(\text{M2})= 0,9999$;
- procijenjeni LOQ za tramadol iznosi 3,90 $\mu\text{g/l}$, za M1 metabolit 4,52 $\mu\text{g/l}$, a za M2 metabolit 3,52 $\mu\text{g/l}$ što je niže od zadanih kriterija ($\text{LOQ} < 10 \mu\text{g/l}$);
- ponovljivost ($\text{RSD} < 10 \%$) prihvatljiva je za sva tri analita: $\text{RSD}(\text{tramadol}) = 3,37 \%$, $\text{RSD}(\text{M1}) = 0,41 \%$ i $\text{RSD}(\text{M2}) = 1,85 \%$;
- točnost metode (iskorištenje 90-110 %) također je prihvatljiva za sva tri analita: iskorištenje (tramadol) = 99,75 %, iskorištenje (M1) = 102,1 % i iskorištenje (M2) = 97,7 %;
- s obzirom na dobivene rezultate možemo reći kako je opisana HPLC metoda za određivanje tramadola i njegovih metabolita M1 i M2 prihvatljiva za analitičku primjenu u kliničkom laboratoriju.

7. SAŽETAK

Uvod: Tramadol je često korišten analgetik pri različitim stanjima boli u svakoj životnoj dobi. Njegova upotreba osim same analgezije može uzrokovati razne nuspojave. Tramadol se u organizmu metablizira u aktivni metabolit O-desmetiltramadol i neaktivni metabolit N-desmetiltramadol. Zbog njihove sve češće uporabe i različitih komplikacija koje se javljaju prilikom uzimanja, kliničaru je ponekad važno znati koncentraciju tramadola, a često i aktivnog metabolita.

Cilj: Optimizacija HPLC metode s FLD-om za određivanje koncentracije tramadol i njegova dva metabolita u svrhu postizanja što bolje kvantifikacije svih triju analita.

Materijal i metode: Isprobane su četiri kolone s različitim mobilnim fazama pri različitim temperaturama separacije i različitim postavkama fluorescentnog detektora. Nakon optimizacije HPLC separacije metoda je djelomično validirana ispitivanjem linearnosti, limita detekcije i kvantifikacije, preciznosti i točnosti.

Rezultati: LOQ za sva tri analita nalazi se u intervalu od 3,52 $\mu\text{g/l}$ do 4,52 $\mu\text{g/l}$. RSD je kod mjerenja ponovljivosti za sve analite bio < 10 %. Iskorištenje za sva tri analita bilo je u intervalu 90 – 110 %.

Zaključak: Nakon optimizacije metode i dobivenih rezultata djelomične validacije možemo zaključiti da je metoda prihvatljiva za određivanje tramadola i njegovih metabolita u uzorcima plazme.

Ključne riječi: fluorescentni detektor; N-desmatiltramadol; O-desmetiltramadol; optimizacija; tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti; tramadol; validacija metode

8. SUMMARY

Optimization of the liquid chromatography procedure for measurement of the tramadol and its metabolites in plasma

Introduction: Tramadol is often used as an analgesic to relieve pain symptoms and other conditions. It is appropriate and safe for all ages groups. Besides analgesia, it can cause various adverse effects in organism. Tramadol is metabolized in two main metabolites, active O-desmethyltramadol and inactive N-desmethyltramadol. Because of their more frequent usage and different adverse effects which occur during treatment with tramadol, sometimes it is important for the clinicant to know the concentration of tramadol and its active metabolite.

Goals: HPLC method optimization with FLD for determing plasma tramadol concentration and its two main metabolites with a view to achieve optimal quantification of all three analytes.

Materials and methods: Four columns were tested with two different mobile phases at different separation temperatures and with different FLD settings. After the optimization of HPLC separation, method is partially validated by the examining the linearity, detection limit range and quantification as well as precision and accuracy.

Results: LOQ for all three analytes is in the range 3,52 $\mu\text{g/l}$ – 4,52 $\mu\text{g/l}$. The RSD for repeatability of method was for all analytes < 10 %. Accuracy of method for all three analytes was in range 90 – 110 %.

Conclusion: After the optimization of method and performed partial validation of the results, it can be concluded that the method is suitable for the determination of tramadol and its two main metabolites in plasma samples.

Keywords: fluorescence detector; high performance liquid chromatography; method validation; N-desmethyltramadol; O-desmethyltramadol; optimization; tramadol

9. LITERATURA

1. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanbul 2016;3(2):156-160.
2. Švarc M. Diplomski rad, Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za analizu pirfenidona u hrani HPLC-DAD-MS metodom, 2016., Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijski fakultet.
3. Petrović V. Završni rad, Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda *Artemisa* L. plinskom kromatografijom, 2015., Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjstva i tehnologije.
4. Blašković NB. Specijalistički rad, Primjena koncepta kakvoće utemeljenje kroz dizajn u životnome ciklusu metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, 2016., Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijski fakultet.
5. International Union of pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology, Gold Book. Version 2. New Jersey: Wiley; 1997.
6. Analgesic drugs. U knjizi: Ritter J, Flower R, Henderson G, Rang H, editors. Rang & Dale's Pharmacology. London, Churchill Livingstone; 2015., str. 509-529.
7. Schumacher MA. Opioid Agonists & Antagonists. U: Katzung BG, Trevor AJ editors. Basic & Clinical Pharmacology. New York City, MC Graw Hill Education; 2014., str. 531-551.
8. Beakley BD, Kaye AM, Kaye AD. Tramadol, Pharmacology, Side Effects, and Serotonin Syndrome: A review. Pain Physician 2015; 18:395-400.
9. Miotto K, Cho AK, Khalil MA, Blanco K, Sasaki JD, Rawson R. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism and Misuse. Anesth Analg 2017; 124:44-51.
10. Zhuo H, Jin H, Peng H, Huang H. Distribution, pharmacokinetics and primary metabolism model of tramadol in zebrafish. Molecular medicine reports 2016 14: 5644-5652.
11. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). Biomolecular Detection and Quantification 2017; 12: 1-6.

12. Ardakani YH, Rouini MR. Pharmacokinetics of tramadol and its three main metabolites in healthy male and female volunteers. *Biopharm Drug Dispos*, 2007; 28(9): p.527-34.
13. Ardakani YH, Rouini MR. Improved liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tramadol and its three main metabolites in human plasma, urine and saliva. *J Pharm Biomed Anal*, 2007. 44(5): p. 1168-73.
14. Campanero MA, Calahorra B, Garcia-Quetglas E, Escolar M, Honorato J. High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Simultaneous Determination of Tramadol and Its Active Metabolites in Human Plasma. Application to Pharmacokinetic Studies. *Chromatographia*, 1998., vol.48, No.7/8 555-560.
15. Rouini MR, Ardakani YH, Soltani F, Aboul-Enein HY, Foroumadi A. Development and validation of a rapid HPLC method for simultaneous determination of tramadol, and its two main metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2006., 830 207-211.
16. Zhou X, Liu J. Fluorescence detection of tramadol in healthy Chinese volunteers by high-performance liquid chromatography and bioequivalence assessment. *Drugs Design, Development and Therapy*. 2015.;9 1225-1231.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Petra Vida

Datum i mjesto rođenja:

7. siječnja 1997., Našice

Obrazovanje:

2003. – 2007. Područna škola kralja Tomislava, Markovac Našički

2007. – 2011. Osnovna škola kralja Tomislava, Našice

2011. – 2015. Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

2015. – 2019. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku