

Identifikacija kompleksnih spojeva prazikvantela vezanim sustavom tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa

Rimanić, Hana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:203318>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Hana Rimanić

**IDENTIFIKACIJA KOMPLEKSNIH SPOJEVA
PRAZIKVANTELA VEZANIM SUSTAVOM
TEKUĆINSKA KROMATOGRFIJA – TANDEMNA
SPEKTROMETRIJA MASA**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2020. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i laboratoriju za analitiku u Plivi – istraživanje i razvoj pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Mislava Runje.

U spomen na moju voljenu mamu Nives Grbić - Rimanić.

Sve dobro u meni je zbog tebe. Volim te.

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici, Prof. dr. sc. Nives Galić na pomoći i vodstvu kroz izradu ovog diplomskog rada.

Hvala dr.sc. Mislavu Runje na neposrednom voditeljstvu pri izradi ovog diplomskog rada i hvala Plivi – istraživanje i razvoj na ustupanju laboratorija i opreme te djelatnicima Plive na ljubaznosti i pomoći u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada.

Hvala svim djelatnicima Prirodoslovno-matematičkog fakulteta kako Kemijskog tako i Biološkog odsjeka na prenesenom znanju.

Hvala teti Ankici iz referade na strpljenju i pomoći pri svakom od mojih nebrojenih posjeta kroz godine.

Hvala mojim kemičarima; Barbari, Špaci, Lukinu, Frigi, Bubašu i ostatku ekipe na velikoj podršci kroz godine, puno smijeha i iskrenom prijateljstvu.

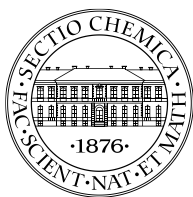
Hvala mojim najdražim prijateljicama; Zorani, Mireli, Flaviji, Andrei, Ani, Perli, Kiki, Luci i Marti što me trpe, nasmijavaju, vole i nesebično podržavaju.

Na kraju hvala mojim roditeljima Nives i Nenadu na neizmjerneoj ljubavi i razumijevanju. Volim Vas.

Sadržaj

SAŽETAK	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Prazikvantel	2
2.1.1. <i>Fizikalna i kemijska svojstva</i>	2
2.1.2. <i>Farmakološka svojstva i primjena prazikvantela</i>	2
2.2. β-ciklodekstrini	3
2.2.1. <i>Ciklodekstrini</i>	3
2.2.2. <i>β-ciklodekstrini</i>	4
2.2.3. <i>Kompleksi prazikvantela s odabranim β-ciklodekstrinima</i>	4
2.3. Vezani sustav	6
2.3.1. <i>Tekućinska kromatografija</i>	6
2.3.2. <i>Spektrometrija masa</i>	9
2.3.3. <i>Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa</i>	17
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Korištene kemikalije i instrumenti	18
3.1.1. <i>Korištene kemikalije</i>	18
3.1.2. <i>Instrumentacija</i>	18
3.2. Priprava uzoraka	19
3.2.1. <i>Priprava ishodnih otopina</i>	19
3.2.2. <i>Priprava uzoraka za LC-MS/MS i MS/MS analizu</i>	19
3.3. LC-MS/MS i MS/MS analiza	20
3.3.1. <i>LC-MS/MS analiza</i>	20
3.3.2. <i>MS/MS analiza</i>	21
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Rezultati LC-MS/MS analize	22
4.2. Rezultati MS/MS analize	29
4.3. Rasprava	31
§ 5. ZAKLJUČAK	33
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	34
§ 7. LITERATURNI IZVORI	35

§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

IDENTIFIKACIJA KOMPLEKSNIH SPOJEVA PRAZIKVANTELA VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA – TANDEMNA SPEKTROMETRIJA MASA

Hana Rimanić

Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska
Laboratorij za analitiku, Pliva – istraživanje i razvoj, prilaz Baruna Filipovića 29, Zagreb, Hrvatska

Prazikvantel je lijek iz skupine antihelmintika. Primjenjuje se oralno i karakterizira ga slaba bioraspoloživost zbog izazito slabe topljivosti u vodi. Istraživanja su pokazala da se topljivost prazikvantela poboljšava kompleksiranjem s β -ciklodekstrinom i njegovim derivatima. U ovom radu pokušali su se identificirati inkluzijski kompleksi prazikvantela s β -ciklodekstrinom, sulfobutileter- β -ciklodekstrinom, hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i nesumično metilanim β -ciklodekstrinom vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa. Cilj je bio izolirati ione prazikvantela i nekovalentno vezanih inkluzijskih kompleksa te predložiti sheme njihovih fragmentacija ne temelju rezultata tandemne spektrometrije masa.

(36 stranica, 21 slika, 3 tablice, 22 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: β -ciklodekstrini, kompleksi, prazikvantel, vezani sustav tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić
Neposredni voditelj: dr. sc. Mislav Runje
Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Nives Galić
 2. Doc. dr. sc. Morana Dulić
 3. Prof. dr. sc. Davor Kovačević
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF PRAZIQUANTEL COMPLEXES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETRY

Hana Rimanić

Division of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb,
Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia
Laboratory for analytics, Pliva R&D, prilaz Baruna Filipovića 29, Zagreb, Croatia

Praziquantel is an antihelmintic drug used in both human and veterinary medicine. It is administered orally and its bioavailability is low due to its poor water solubility. Experiments have shown that praziquantel complexes with β -cyclodextrin and its derivatives show improved water solubility in contrast to the molecule alone. In this thesis, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used in an attempt to identify praziquantel complexes with β -cyclodextrin, sulphobutylether- β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and randomly methylated β -cyclodextrin. The main goal was to isolate molecular ions of praziquantel and ions of its non-covalent inclusion complexes and propose fragmentation schemes based on the results obtained by tandem mass spectrometry.

(36 pages, 21 figures, 3 tables, 22 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: β -cyclodextrins, complexes, hyphenated system liquid chromatography - tandem mass spectrometry, praziquantel

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor

Assistant mentor: Dr. sc. Mislav Runje

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 3. Dr. Davor Kovačević, Professor
- Substitute: Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Date of exam: February 25, 2020.

§ 1. UVOD

Prazikvantel je lijek iz skupine antihelmintika koji se koristi u liječenju zaraza organizmima iz porodice metilja i trakavica. To je derivat pirazinoizokvinolina molekulske formule $C_{19}H_{24}N_2O_2$. β -ciklodekstrini su ciklički ugljikohidrati sastavljeni od 7 glukopiranoznih jedinica. Zanimljivi su, između ostalog, zbog svojih kompleksirajućih svojstava. Tvore nekovalentne komplekse s raznim molekulama pri čemu mogu mijenjati svojstva molekule koju vežu u svoju šupljinu. Također, modifikacijom same molekule β -ciklodekstrina može se utjecati na njena vezna svojstva. Istraživanja su pokazala da se kompleksiranjem prazikvantela s β -ciklodekstrinima poboljšava njegova topljivost. Povećanje topljivosti ima veliki značaj u medicinskoj primjeni prazikvantela budući da ga karakterizira izrazito slaba topljivost u vodi te je bioraspoloživost lijeka pri oralnoj primjeni niska.

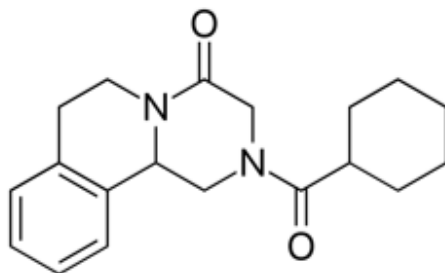
Cilj ovog rada bio je identificirati prazikvantel i komplekse prazikvantela s odabranim β -ciklodekstrinima metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) spregnute s tandemnom spektrometrijom masa (eng. *Tandem Mass Spectrometry*, MS). Korišten je spektrometar masa s elektroraspršenjem kao metodom ionizacije (*Electrospray Ionization*, ESI) te kombinacija kvadrupolnog (engl. *quadrupole*, Q) analizatora masa i analizatora masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time Of Flight*, TOF). Skraćeni naziv vezanog sustava koristeći internacionalno uvažene kratice je HPLC-ESI/QTOF. Također, analizirani su prazikvantel te β -ciklodekstrini zasebno koristeći samo MS/MS komponentu sustava te su gdje je bilo moguće predložene sheme fragmentiranja.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Prazikvantel

2.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva

Prazikvantel, (*RS*)-2-(cikloheksilkarbonil)-1,2,3,6,7,11b-heksahidro-4H-pirazino[2,1-a]izokinolin-4-on, je derivat pirazinoizokinolina molekulske formule $C_{19}H_{24}N_2O_2$ i molarne mase 312,4 g/mol. Izgledom je bijela kristalinična supstanca. Stabilan je pri standardnim uvjetima te se tali uz raspadanje pri 136 °C. Higroskopan je, izvrsno topiv u kloroformu i dimetilsulfoksidu, dobro topiv u etanolu te jako slabo topiv u vodi.¹



Slika 1. Molekulska struktura prazikvantela.

2.1.2. Farmakološka svojstva i primjena prazikvantela

Prazikvantel je lijek iz skupine antiparazitskih lijekova (antihelmintika) i koristi se za liječenje zaraza organizmima iz porodice metilja i trakavica. Naročito je djelotvoran u tretiranju schistosomijaze, odnosno zaraze parazitom *Schistosoma* iz porodice metilja.²

Kao lijek primjenjuje se oralno kao racemat, odnosno mješavina *R* i *S*-enantiomera, gdje je *R*-enantiomer eutomer, a *S*-enantiomer se povezuje s nuspojavama i odgovoran je za izrazito gorak okus lijeka.² Bioraspoloživost prazikvantela je niska zbog njegove slabe topljivosti u vodi te se manji dio aktivne tvari apsorbira u želucu. Metabolizam i eliminacija

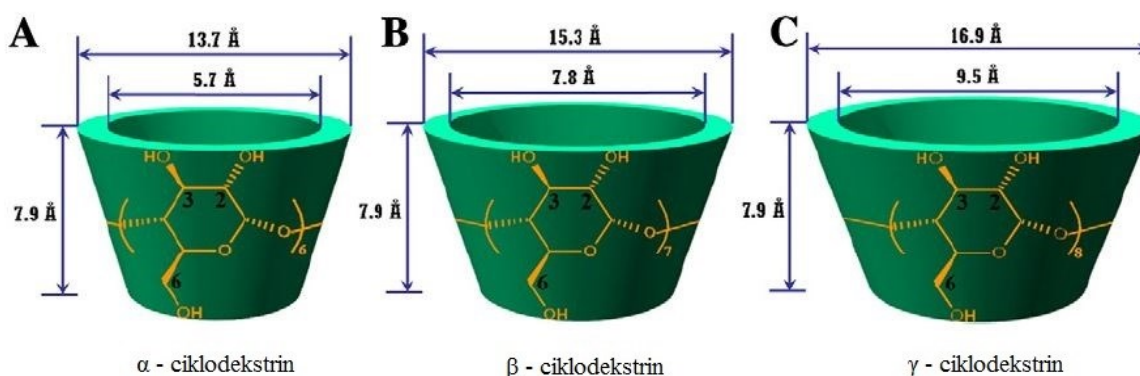
lijeka odvijaju se putem bubrega. Maksimalna koncentracija u serumu postiže se 1 do 3 sata nakon primjene. Vrijeme poluraspada prazikvantela u serumu iznosi od 0,8 do 1,5 sata.³

Unatoč mnogim godinama uspješne primjene, točan mehanizam djelovanja prazikvantela još nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da se mehanizam djelovanja prazikvantela bazira na povećanju propusnosti stanične membrane parazita za ione kalcija. Povećanje koncentracije kalcijevih iona u sarkoplazmatskom retikulumu mišićnih stanica rezultira trajnom kontrakcijom mišića, odnosno paralizom.⁴ Također, eksperimentalno se pokazalo da prazikvantel inhibira unos nukleozida adenzina tako što se veže na adenzinske receptore. Taj efekt moguće doprinosi ukupnom terapijskom učinku prazikvantela budući da metilji nemaju sposobnost *de novo* sinteze purina.⁵

2.2. β -ciklodekstrini

2.2.1. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi sastavljeni od molekula glukoze povezanih α -1,4 glikozidnim vezama. Mogu sadržavati do 32 monomerne glukoze jedinice, a najzastupljeniji i komercijalno najprimjenjeniji su ciklodekstrini sa 6 (α -ciklodekstrini), 7 (β -ciklodekstrini) i 8 glukoznih jedinica (γ -ciklodekstrini).⁶ Netoksični su i relativno se lako sintetiziraju iz škroba. Prvi korak je toplinska razgradnja ili razgradnja posredovana enzimom α -amilaza. Zatim, dodatkom enzima ciklodekstrin-glikoziltransferaze (CGTaze) nastaje mješavina α , β , i γ -ciklodekstrina. Omjer u kojem će oni nastati ovisi o tipu CGTaze koja se koristi.⁷



Slika 2. Struktura i dimenzije prirodnih ciklodekstrina (α , β i γ ciklodekstrini).⁸

Sekundarne hidroksilne skupine u molekuli CD protežu se oko šireg otvora, a primarne oko uskog otvora molekule (Slika 2)⁸ te je vanjski dio ciklodekstrina hidrofilan dok mu je unutrašnjost hidrofobna. Stoga su navedeni spojevi atraktivni kao molekule domaćina za hidrofobne spojeve. Zbog navedenih svojstava primjenjuju se u farmaceutskoj industriji gdje se koriste za poboljšanje topljivosti i bioraspodjelivosti aktivnih farmaceutskih tvari s kojima stvaraju inkluzijske komplekse. β -ciklodekstrini se također primjenjuju u kiralnim kolonama za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC).⁹

2.2.2. β -ciklodekstrini

β -ciklodekstrini su uz α -CD i γ -CD atraktivni za primjenu u farmaceutskoj industriji i proizvodnji hrane zbog svoje netoksičnosti i sposobnosti da modificiraju svojstva molekule koju kompleksiraju. Modifikacijom hidroksilnih skupina ciklodekstrina može se utjecati na njihova vezna svojstva. Najčešće modifikacije su O-metilacija i acetilacija.⁶ Također se primjenjuju i hidroksipropil te sulfobutyleter derivati β -ciklodekstrina. U ovom radu ispitana su vezna svojstva β -ciklodekstrina (β -CD), sulfobutyleter- β -ciklodekstrina (SBE- β -CD), 2-hidroksipropil β -ciklodekstrina (HP- β -CD) te nasumično metiliranog β -ciklodekstrina (RM- β -CD).

2.2.3. Kompleksi prazikvantela s odabranim β -ciklodekstrinima

Kao što je već rečeno, β -ciklodekstrini tvore inkluzijske komplekse s raznim molekulama. Upravo su β -ciklodekstrini zbog veličine svoje hidrofobne šupljine pogodni za "prihvaćanje" manjih molekula s aromatskim prstenom u svojoj strukturi kao što su mnogi farmaceutski aktivni spojevi.⁷ Također, modifikacije na β -ciklodekstrinima poput metilacije ili hidroksipropilacije utječu na samo kompleksiranje. Do sada je provedeno nekoliko različitih istraživanja u kojima su pripremljeni i identificirani kompleksi prazikvantela sa β -ciklodekstrinima te su im ispitana farmakološka svojstva.

2.2.3.1. Priprava i identifikacija kompleksa

U istraživanju koje se bavilo biofarmaceutskom karakterizacijom kompleksa i kokristala prazikvantela, kompleksi prazikvantela s β -ciklodekstrinom (β -CD), 2-hidroksipropil- β -

ciklodekstrinom (HP- β -CD), natrijevom soli sulfobutileter- β -ciklodekstrinom (SBE- β -CD) te nasumično metiliranim β -ciklodekstrinom (RM- β -CD) pripravljeni su u čvrstom stanju suhim mljevenjem.² Također su pripravljeni kokristali prazikvantela s odabranim organskim kiselinama mljevenjem uz dodatak otapala. Mehanokemijske metode omogućuju pripravu raznih kompleksa i kokristala u krutom stanju bez upotrebe otapala (suho mljevenje) ili uz dodatak minimalne katalitičke količine otapala (mljevenje uz dodatak otapala). Pripravljeni kompleksi su nakon toga identificirani različitim tehnikama: diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) i Rentgenskom difrakcijom na prahu (engl. *X-Ray Powder Diffraction*, XRPD) te vibracijskom spektroskopijom, konkretno Fourier-transformiranom spektroskopijom u infracrvenom području (engl. *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*, FTIR). Ispitana je topljivosti u biorelevantnom mediju i uočena je poboljšana topljivost svih pripremljenih kompleksa u odnosu na sam prazikvantel u simuliranom gastričkom (pH 1,2) te intestinalnom mediju (pH 6,8). Veće povećanje topljivosti zabilježeno je za kompleks prazikvantela sa β -ciklodekstrinima u odnosu na kokristale s organskim kiselinama. Najbolju topljivost imali su kompleksi prazikvantela sa β -CD, HP- β -CD, RM- β -CD te nešto slabiju topljivost kompleksi sa SBE- β -CD.²

Drugo istraživanje bavilo se pripravom kompleksa prazikvantela s β -CD-om u otopini i u čvrstom stanju, te utjecajem dodatka hidroksipropil metil-celuloze (HPMC) na učinkovitost kompleksiranja i topljivost kompleksa. Kompleksi su pripravljeni metodom liofilizacije te metodom gnječenja (engl. *kneading*). U metodi gnječenja korištena je otopina etanol:voda u omjeru 2:1. Nastanak kompleksa u obje metode provjeren je pomoću Rentgenske difrakcije na prahu (XRPD), Fourier-transformiranom spektroskopijom u infracrvenom području te skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Analiza topljivosti pokazala je da dodatak hidroksipropil metil-celuloze i nastanak tercijarnog kompleksa povećava topljivost samog kompleksa. Kompleks je također analiziran računalnim metodama. Metodom molekularnog modeliranja, odnosno pretraživanjem plohe potencijalne energije u odabranom otapalu određene su najstabilnije konformacije kompleksa (slika 3). Stehiometrijski omjer lijek:ciklodekstrin 1:1 određen je pomoću krivulja topljivosti te je potvrđen i računalnom analizom.¹⁰



Slika 3. Najstabilnija konformacija kompleksa prazikvantela s β -ciklodekstrinom dobivena konformacijskom analizom. Strelicom je označen položaj vodikove veze.¹⁰

2.3. Vezani sustav

2.3.1. Tekućinska kromatografija

Kromatografija obuhvaća sve analitičke metode pri kojoj se sastojci smjese razdvajaju na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza od kojih je jedna mobilna, a druga stacionarna. Mobilna, odnosno pokretna faza može biti tekućina i u tom slučaju govorimo o tekućinskoj kromatografiji ili plin te tada govorimo o plinskoj kromatografiji. Razvijena je i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima i u tom slučaju mobilna faza je fluid.

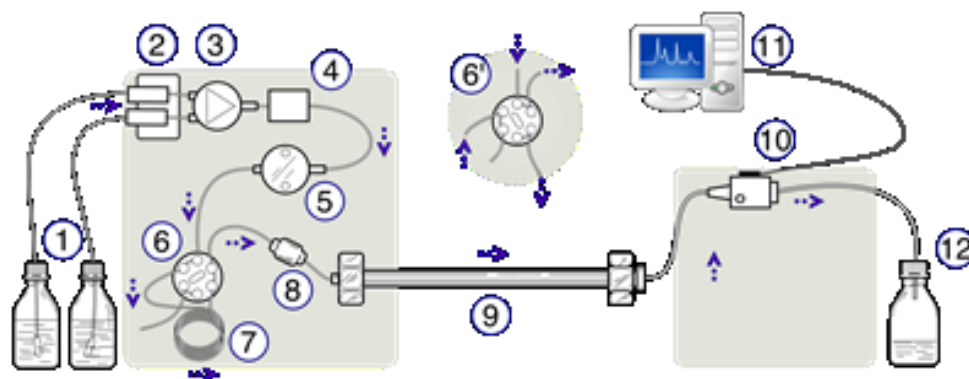
Tekućinska kromatografija koristi se za odijeljivanje termički nestabilnih spojeva i spojeva koje se ne mogu prevesti u plinovito stanje bez razgradnje. Prikladna je za analizu širokog spektra spojeva male i velike molekulske mase: proteina, lijekova, aminokiselina, biološki aktivnih molekula, lipida, polimera, nukleinskih kiselina, anorganskih spojeva. Mobilna faza je otapalo ili smjesa otapala u kojima je analit dobro topiv i ne smije se miješati sa stacionarnom fazom. S obzirom na instrumentaciju i način izvedbe, tekućinsku kromatografiju možemo podijeliti na kolonsku, gdje su uzorak kreće kroz kolonu u kojoj se

nalazi stacionarna faza, i plošnu gdje se uzorak kreće po čvrstoj podlozi na koju je nanescna stacionarna faza.

Prema mehanizmu separacije tekućinsko-kromatografske tehnike dijelimo na adsorpcijsku kromatografiju, razdjelnu kromatografiju, kromatografiju isključenjem, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju i afinitetnu kromatografiju.¹¹

2.3.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je kromatografska metoda koja se najšire primjenjuje. To je vrsta kolonske kromatografije u kojoj se uzorak otopljen u mobilnoj fazi propušta kroz kolonu pod visokim tlakom uz pomoć visokotlačne pumpe. Sustav za unašanje uzorka se sastoji od prenosnog injektora s petljom koji omogućuje injektiranje uzorka u kolonu pri visokom tlaku i bez prekidanja protoka mobilne faze. Otapala koja se koriste kao mobilna faza moraju biti visoke čistoće. Otopljeni plinovi koji mogu zaostati u otapalima uklanjaju se pomoću otplinjača. Kolone za HPLC napravljene su od nehrđajućeg čelika te su ispunjene česticama stacionarne faze promjera nekoliko μm . Ispred glavne kolone nalazi se pretkolona čija je funkcija zaštita glavne kolone i posljedično bolje razdvajanje u koloni (slika 4). Detektori u tekućinskim kromatografima su najčešće apsorpcijski ili fluorimetrijski. Apsorpcijski detektori baziraju se na mjerenju apsorpcije ultra-ljubičastog (UV) i vidljivog (VIS) svjetla u mobilnoj fazi na izlasku iz kolone. Fluorimetrijski detektori su znatno osjetljiviji od UV/VIS detektora no primjenjivi su samo ako analit fluorescira ili ako se prethodno prevede u fluorescirajući derivat.¹¹



Slika 4. Shema tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti.¹² (1) Boce s otapalima, (2) otplinjač za mobilnu fazu, (3) gradijentni ventil, (4) komora za miješanje, (5) visokotlačna pumpa (6) ventil za unos uzorka (7) petlja za injektiranje uzorka, (8) pretkolona, (9) kolona, (10) detektor, (11) računalo za obradu podataka, (12) boca za sakupljanje frakcija.

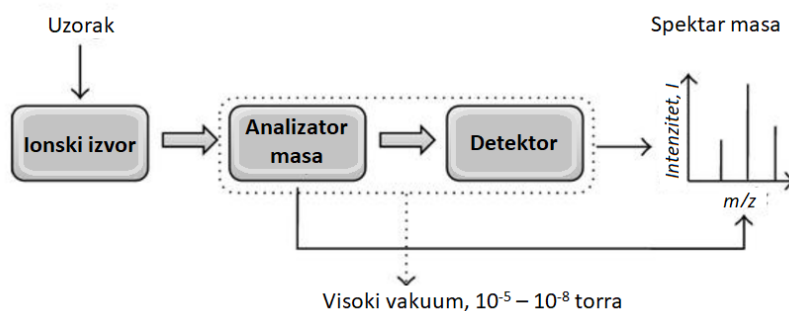
Vrijeme zadržavanja analita na koloni, t_R je vrijeme od injektiranja uzorka do detekcije analita otopljenog u mobilnoj fazi. Vrijeme zadržavanja ovisno je o sastavu mobilne i stacionarne faze kao i o prirodi samog spoja i njegovoj raspodjeli između dviju faza. Također je ovisno o temperaturi i tlaku u koloni.¹⁰ Molekule različite polarnosti će se na različit način raspodjeliti među fazama. Ako je mobilna faza polarna tada će se spojevi najveće polarnosti najkraće zadržavati na koloni i obrnuto. Standardna tekućinska kromatografija podrazumjeva da je stacionarna faza polarna, a mobilna nepolarna, dok metode u kojima je mobilna faza polarna, a stacionarna nepolarna se ubrajaju u tekućinsku kromatografiju obrnutih faza (engl. *Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC). Ispiranje uzorka sa kolone naziva se eluiranje. Eluiranje može biti izokratno, što znači da je sastav mobilne faze stalan tijekom ispranja te gradijentno, pri čemu se sastav mobilne faze mijenja tijekom ispranja najčešće stupnjevitim povećavanjem udjela jednog od sastojka mobilne faze. Gradijentnim eluiranjem dobiva se bolje odjeljivanje sastojaka na koloni, odnosno bolje su razlučeni pikovi u kromatogramu.¹¹

2.3.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je jedna od najšire primjenjivanih analitičkih tehnika pomoću koje određujemo elementni sastav tvari, strukturu anorganskih, organskih i bioloških molekula te kvalitativni i kvantitativni sastav smjesa. Jedna je od glavnih analitičkih tehnika u farmaceutskoj industriji, u granama znanosti kao što su proteomika i genomika, a također je važna i u medicinskoj dijagnostici.

2.3.2.1. Spektrometar masa

Spektrometar masa sastoji se od ionskog izvora, analizatora masa i detektora (slika 5).



Slika 5. Osnovne komponente spektrometra masa.¹³

Molekule analita se u ionskom izvoru ioniziraju nekom od ionizacijskih metoda, nastali ioni u plinskoj fazi dolaze do analizatora masa gdje se odjeljuju na temelju omjera mase i naboja odnosno m/z i detektiraju na detektoru te prevode u mjerljivi signal koji grafički prikazujemo kao spektar masa. Na spektru masa se odgovarajućim vrijednostima m/z pripisuje pripadajući intenzitet koji označava relativnu zastupljenost iona. Najintenzivniji signal nazivamo bazni signal i njegov intenzitet se nominalno proglašava vrijednošću jedan odnosno relativnoj zastupljenosti od 100 posto. Intenzitet ostalih signala se preračunava u odnosu na intenzitet baznog signala. Bazni signal može odgovarati molekulskom ionu ili fragmentnom ionu ovisno o jačini fragmentacije u ionskom izvoru. Iza svakog signala molekulskog iona ili fragmenta nalaze se izotopni signali zbog prisustva težih izotopa jednog ili više elemenata. Signali značajnog intenziteta pri nižim vrijednostima m/z najčešće su signali iona fragmenta nastalih prilikom ionizacije.^{14,15}

2.3.2.2. Ionski izvori

Postoje različite metode ionizacije. U nekim metodama dolazi do prijenosa velike količine unutarne energije na molekule analita što uzrokuje njihovu jaku fragmentaciju (jaki ionski izvori), dok se u drugim prenosi manja količina energije pa je fragmentacija mala ili u potpunosti izostaje (blagi ionski izvori). Koja će se metoda ionizacije primijeniti ovisi i o fizikalnim i kemijskim svojstvima analita.¹⁴

Za analizu hlapljivih i termički stabilnih uzoraka najčešće se koristi ionizacija elektronima gdje ioni nastaju direktno sudarima s elektronima ili kemijska ionizacija gdje se molekule analita ioniziraju posredno korištenjem plina reagensa. Prednost kemijske ionizacije je slaba fragmentacija te uglavnom nastajanje samo molekulskog iona dok je kod ionizacije elektronima fragmentacija izražena te će u spektru biti vidljivi signali fragmentnih iona.

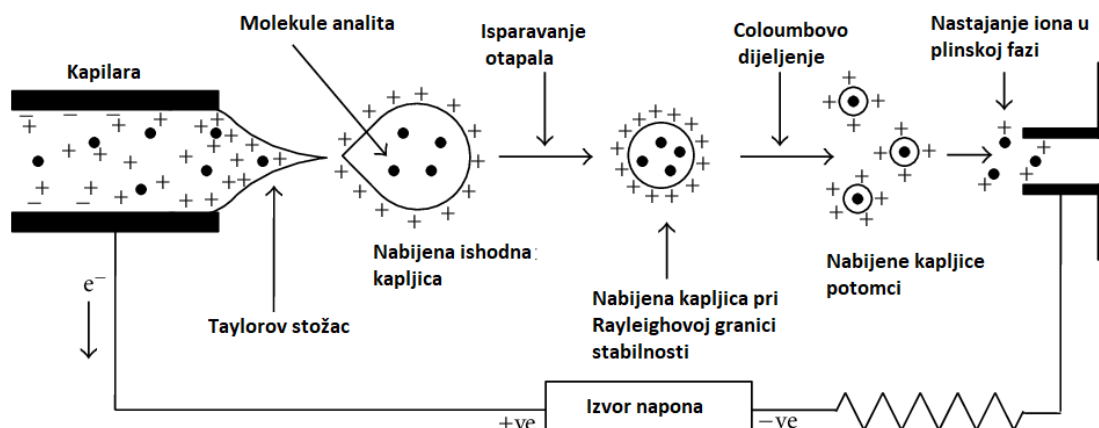
Za analizu otopina ili tekućih uzoraka koriste se ionizacija termoraspršenjem, elektroraspršenjem te kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku. Ograničavajući faktor za primjenu ionizacije termoraspršenjem je činjenica da ioni nastaju izmjenom naboja s dodanom soli što omogućuje analizu samo polarnih spojeva u polarnim otapalima. Ionizacija elektroraspršenjem je blagi način ionizacije koji omogućuje analizu malih i velikih molekula, kompleksnih spojeva, nenabijenih i ionskih spojeva. Ta je metoda korištena u ovom radu i o njoj će se nešto više reći u nastavku.

Za analizu krutina primjenjuju se desorpcijske metode. Neke od njih su ionizacija brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment*, FAB), ionizacija sekundarnim ionima (engl. *Secondary-Ion Mass Spectrometry*, SIMS), desorpcija laserom te matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI). Tehnika MALDI je vrlo popularna zbog toga što omogućuje analizu bioloških makromolekula poput proteina, peptida, ugljikohidrata, lipida i sintetskih polimera. U navedenim metodama potrebna je primjena krute (desorpcija poljem ili laserom) ili tekuće matrice (bombardiranje brzim atomima). Djelovanjem fotona ili visokoenergetskih čestica ioni analita desorbiraju s površine matrice.¹⁴

2.3.2.2.1. Ionizacija elektroraspršenjem

Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) spada u blage izvore ionizacije što znači da se na analit u procesu ionizacije ne prenosi velika količina energije te je fragmentacija minimalna. Uzorak se ionizira direktno iz otopine što omogućuje direktno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Zbog svih tih svojstava ovaj način ionizacije omogućuje analizu makromolekula kao što su šećeri, peptidi i proteini te također nabijenih ili ionskih spojeva i nekovalentnih kompleksa.

Proces ionizacije elektroraspršenjem odvija se na slijedeći način: otopina s analitom uvodi se u metalnu kapilaru na koju se primjenjuje jako električno polje (2-3 kV) pri čemu dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Kada je kapilara priključena na pozitivan kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i nakupljaju se na površini tekućine. Pri kritičnoj jakosti električnog polja nastaje tzv. Taylorov stožac u kojem se proizvode pozitivno nabijene kapljice koje sadrže ione analita. Priključivanjem kapilare na negativan kraj izvora napona proizvesti će se negativno nabijene kapljice. Grijanjem otapalo postupno isparava te se veličina kapljica smanjuje dok naboj ostaje konstantan. Kada se sila elektrostatskog odbijanja izjednači sa površinskom napetošću, kažemo da je postignuta Rayleighova granica stabilnosti i kapljice se podijele. To dijeljenje nazivamo Coloumbovo dijeljenje. Kapljice se dalje dijele nekoliko puta istim mehanizmom. Dijeljenje kapljica je nesimetrično, pri čemu nastaju velike kapljice koje sadrže neželjene sparene ione analita te manje iz kojih će na kraju nastati ioni u plinskoj fazi (Slika 6). Smatra se da ioni malih molekula isparavaju iz kapljica i prije nego se one podijele, dok ioni velikih molekula mase veće od 3300 Da nastaju isparavanjem posljednje molekule otapala iz kapljica nastalih sukcesivnim dijeljenjem.¹⁴

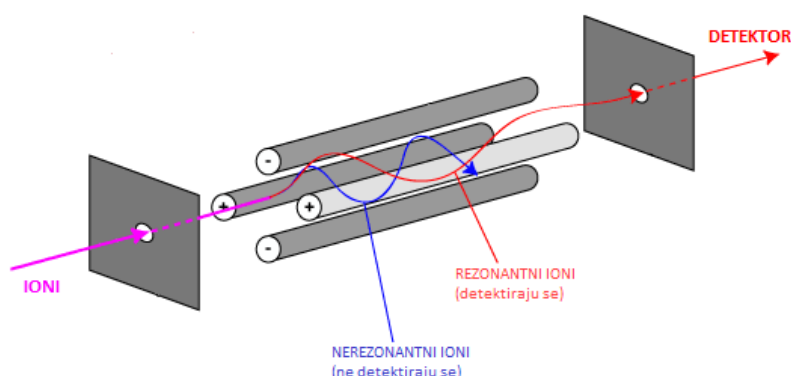
Slika 6. Mehanizam ionizacije elektroraspršenjem.¹⁶

2.3.2.3. Analizatori masa

Analizatori masa odijeljuju ione nastale ionizacijom na temelju omjera njihovog naboja i mase tj. m/z . Analizatore masa karakterizira (i) gornja granica masa, tj. najveća vrijednost m/z koja se može izmjeriti, (ii) razlučivanje, odnosno sposobnost razlučivanja iona s malom razlikom u masi te (iii) točnost mase koja predstavlja razliku između izmjerene i teoretske vrijednosti m/z . Separacija iona u dosad razvijenima analizatorima masa temelji se na različitim principima tako da razlikujemo: analizator masa s magnetskim sektorom, kvadrupol, ionsku stupicu, Fourier-transformiranu ionsko-ciklotronsku rezonanciju, elektrostatsku stupicu, analizator masa koji mjeri vrijeme leta (TOF), te orbitrap. Kvadrupolni i sektorski analizatori masa sukcesivno propuštaju ione tako oni određenog m/z dolaze na detektor u određeno vrijeme. Ostali istovremeno analiziraju sve ione.¹⁴ Analizatori masa se međusobno mogu kombinirati. Kombinacijom najboljih svojstva određenih analizatora dobivamo bolje uvjete za tandemnu spektrometriju masa. U ovom radu korištena je tehnika u kojoj se kombiniraju kvadrupol i TOF s reflektromom te će se o njima reći nešto više u nastavku.^{14,15}

2.3.2.3.1. Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri paralelno postavljene cilindrične elektrode. Ione razdvaja na temelju stabilnosti njihove putanje kroz oscilirajuća električna polja koja se primjenjuju na elektrode. Elektrode su u paru spojene na izvor istosmjernog i izmjeničnog potencijala. Vrijednost primjenjenih potencijala se tokom odijeljivanja iona povećava dok njihov omjer ostaje konstantan. Polaritet elektroda se mijenja te se na taj način ioni prvo fokusiraju u horizontalnoj ravnini, a zatim u vertikalnoj što za posljedicu ima složeno gibanje iona. Ioni koji u takvom polju imaju nestabilnu putanju udarat će u elektrode i tako se neutralizirati, dok će do detektora proći samo ioni sa stabilnom putanjom (slika 7). Tako kvadrupol djeluje kao filter masa koji će pri određenim vrijednostima primjenjivanih napona propuštati ione samo odabranog omjera m/z . Maseni spektrometar s kvadrupolom kao analizatorom masa je često upotrebljavan zbog pristupačne cijene i velike brzine snimanja spektara dok mu je nedostatak slabo razlučivanje.^{14,15}



Slika 7. Shematski prikaz kvadrupolnog analizatora masa.¹⁷

Razvijena je i tehnika tandemne spektrometrije masa gdje se koriste tri uzastopno povezana kvadrupola. Prvi i treći kvadrupol funkcioniraju kao klasični kvadrupol dok je središnji kvadrupol kolizijska ćelija u kojem ioni podliježu sudarima s molekulama inertnog plina, najčešće dušika, te fragmentiraju, a nastali fragmenti se odijeljuju u trećem kvadrupolu.

2.3.2.3.2. Analizator masa koji mjeri vrijeme leta

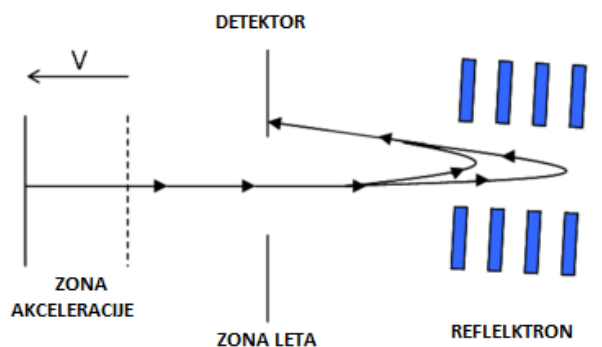
Analizator masa koji mjeri vrijeme leta, TOF, ione odjeljuje na temelju vremena koje je potrebno da pređu put od izvora do detektora. Na izlazu iz ionskog izvora ioni se ubrzavaju primjenom električnog potencijala V te ioni mase m i naboja z imaju vrijednost kinetičke energije prema izrazu (1). Vrijeme potrebno za prolazak udaljenosti l od izvora do detektora jednako je omjeru udaljenosti l i brzine kretanja iona (2).

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = zV \quad (1)$$

$$t = \frac{l}{v} \quad (2)$$

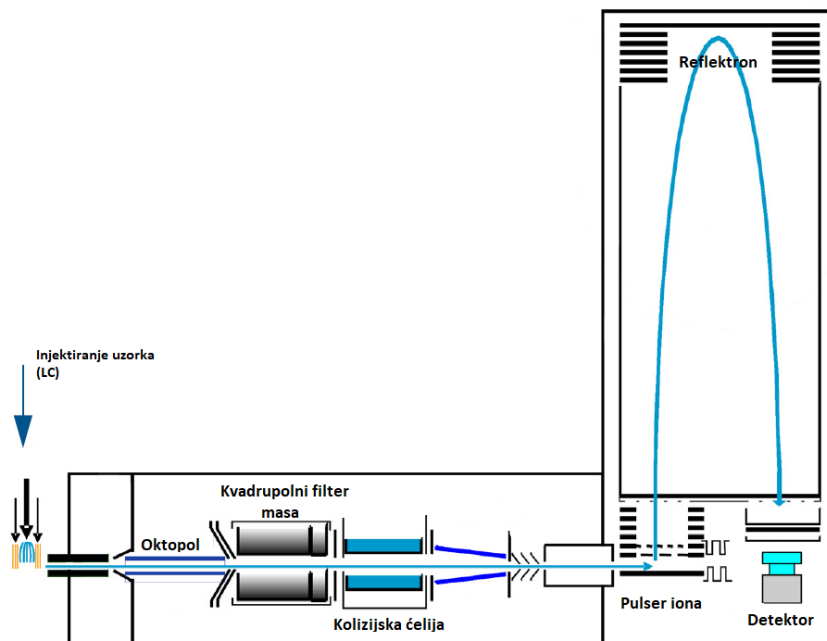
$$t = \sqrt{\frac{ml^2}{z2Ve}} \quad (3)$$

Iz izraza (3) vidimo da je vrijeme leta direktno proporcionalno korijenu omjera m/z , uzevši u obzir da su udaljenost od izvora do detektora te napon konstante instrumenta, a e je univerzalna konstanta i označava naboj elektrona. Također vidljivo je da se kod iona velikih masa razlika u vremenu dolaska do detektora progresivno smanjuje. To je jedan od uzroka zbog kojeg ovaj analizator masa ima slabo razlučivanje. Također, distribucija kinetičke energije među ionima istog omjera m/z nije uvijek jednaka pa će ioni istog omjera m/z imati različito vrijeme dolaska do detektora. Da bi se ta pogreška umanjila razvijeni su uređaji s ionskim zrcalom odnosno reflektrom. Reflektrom se sastoji od niza prstenastih elektroda na koje se primjenjuje električni potencijal i tako se stvara električno polje koje ione zakreće i usmjerava prema detektoru. Ioni s većom kinetičkom energijom ući će dublje u ionsko zrcalo te će na detektor stići u isto vrijeme kao ioni istog omjera m/z ali manje kinetičke energije (slika 8). TOF se najčešće kombinira s pulsnom tehnikom ionizacije jer je za sam princip odjeljivanja po vremenu leta iona potrebno da svi ioni kreću u isto vrijeme.¹⁴

Slika 8. Shema masenog analizatora TOF sa reflektrom.¹⁸

2.3.2.4. Tandemna spektrometrija masa uz kvadrupol i analizator masa koji mjeri vrijeme leta - Q/TOF

Masene analizatore možemo kombinirati kako bi se iskoristile njihove prednosti i umanjili potencijalni nedostaci poput niskog razlučivanja, male brzine i točnosti. Takvi hibridni uređaji mogu imati kombinaciju istih analizatora poput već opisanog trostrukog kvadrupola ili na primjer linearnog TOF-a sa TOF-reflektrom, a mogu biti i kombinacija različitih analizatora masa. Tandemni sustav koji se koristio u ovom radu sastoji se od kvadrupolnog filtera masa, heksapolne kolizijske ćelije te analizatora masa koji mjeri vrijeme leta. Takav sustav skraćeno se naziva Q/TOF(engl. *Quadrupole/Time of Flight*).



Slika 9. Shema masenog spektrometra Agilent 6540 Q/TOF koji se sastoji od kvadrupola, kolizijske ćelija i analizatora masa koji mjeri vrijeme leta.¹⁹

2.3.2.5. Detektori

Detektori imaju zadatak da ione koji su odijeljeni u analizatoru masa zabilježe i prevedu u mjerljivi signal. Komercijalno se najčešće koriste detektori koji pojačavaju signal poput elektronskog multiplikatora i fotomultiplikatora¹⁴. Instrument korišten u ovom radu za detektor ima fotomultiplikator sa scintilatorom ispred kojeg se nalazi mikrokanalna pločica (*Microchannel Plate*, MCP).

Mikrokanalna pločica je izrađena od izrazito otpornog materijala i debljine je oko 2 mm te je ispunjena pravilno raspoređenim međusobno paralelnim mikrokanalićima koji se protežu od jedne do druge strane pločice. Kroz pločicu se primjenjuje jako električno polje te tako svaki kanalić djeluje kao dinodni elektronski multiplikator. Kanalići su pod malim kutem što osigurava da će ion udariti u njega i tako izazvati emisiju elektrona. Elektroni dolaze na scintilator koji će apsorbirati elektrone i emitirati fotone. Fotoni zatim dolaze do fotomultiplikatorske cijevi gdje se udaranjem u fotokatodu po principu fotoelektričnog efekta prevode ponovno u elektrone i zatim umnažaju pomoću niza dioda. Funkcija mikrokanalne

pločice u ovakvom detektoru je dodatna električna izolacija površine detektora i cijevi TOF-a od signala koji dolaze od iona koji stižu na detektor i dalje se elektronički obrađuju.^{20,14,21}

2.3.3. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Tekućinske i plinske kromatografe moguće je direktno povezati sa spektrometrom masa. Instrumenti se povezuju pomoću međuspojeva (engl. *interface*). Vrsta međuspoja ovisi o vrsti kromatografije, specifikacijama kolone te protoku mobilne faze. Maseni spektrometar tada ima funkciju detektora te omogućuje nedvojbenu identifikaciju analita.

Glavni problem u povezivanju tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa je održavanje potrebnog visokog vakuuma u spektrometru masa. Visoki vakuum je kompromitiran uvođenjem tekuće faze relativno velikog protoka. Da vakuum ne bi bio narušen razvijeni su međuspojevi koji reguliraju uvođenje tekuće faze u maseni spektrometar te uklanjaju suvišak otapala prije uvođenja analita u ionski izvor. Kada kao metodu ionizacije koristimo elektroraspršenje povezivanje je relativno jednostavno. Preduvjet je malen protok mobilne faze od 1 do 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. U tom slučaju uzorak se pri atmosferskom tlaku uvodi u ionski izvor kroz iglu od nehrđajućeg čelika na koju se primjenjuje visoki napon. Na izlazu iz kapilare nastaju nabijene kapljice molekula analita i otapala iz kojih naposljeko nastaju ioni analita prema već opisanom mehanizmu ionizacije elektroraspršenjem. Kod većih protoka mobilne faze, do 2 mL/min koristi se ionsko raspršenje. Pri toj ionizaciji koristi se kombinacija elektroraspršenja i pneumatske nebulizacije.¹⁴

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Korištene kemikalije i instrumenti

3.1.1. Korištene kemikalije

U eksperimentalnom radu korišteno je više kemikalija:

- Prazikvantel, kratica PZQ, Genera d.d., Hrvatska
- β -ciklodekstrin, kratica β -CD, proizvođača CycloLab
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, kratica HP- β -CD, CycloLab
- Natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrin, kratica SBE- β -CD, CycloLab
- Kompleks prazikvantel- β -ciklodekstrin, kratica PZQ- β -CD (pripremljen u Zavodu za analitičku kemiju)
- Kompleks prazikvantel sulfobutileter- β -ciklodekstrin, kratica PZQ-SBE- β -CD (pripremljen u Zavodu za analitičku kemiju)
- Kompleks prazikvantel 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, skraćeno PZQ-HP- β -CD (pripremljen u Zavodu za analitičku kemiju)
- Kompleks prazikvantel-metil- β -ciklodekstrin, kratica PZQ-RM- β -CD (pripremljen u Zavodu za analitičku kemiju)
- Acetonitril, p.a. 1L, Kemika
- Mravlja kiselina, 98%, 1L, Kemika
- Natrij klorid, Kemika

3.1.2. Instrumentacija

Za analizu je korišten vezani sustav koji se sastoji od Agilent 1290 infinity UHPLC uređaja za tekućinsku kromatografiju ultravisoke i visoke djelotvornosti te Agilent 6550 iFunnel Q-TOF masenog spektrometra. Za tekućinsku kromatografiju korištena je kolona UPLC BEH C18 proizvođača Waters s promjerom 2,1 mm, duljine 100 mm te česticama promjera 1,7 μ m.

Maseni spektrometar Agilent 6550 iFunnel Q-TOF kao metodu ionizacije koristi ionizaciju elektroraspršenjem. Tandemni sustav sastoji se od kvadrupolnog filtera masa,

heksapolne kolizijske ćelije te masenog analizatora koji mjeri vrijeme leta s reflektrom. U eksperimentalnom radu je također korištena analitička vaga AX205 DeltaRange proizvođača Mettler Toledo.

3.2. Priprava uzoraka

3.2.1. Priprava ishodnih otopina

Prvi korak eksperimentalnog dijela rada bila je priprava ishodnih otopina analiziranih spojeva i kompleksa. Otopine su pripravljene u sustavu otapala acetonitril (kratica ACN)/(voda, 0,1% mravlja kiselina) u omjeru 1:1.

Ishodna otopina prazikvantela je pripravljena otapanjem 1 mg prazikvantela u 10 mL acetonitrila te je dodano 10 mL vode s 0,1% mravlje kiseline. Masena koncentracija ishodne otopine iznosila je 50 µg/mL.

Ishodne otopine ciklodekstrina pripravljene su tako da bi bile molarno približno ekvivalentne ishodnoj otopini prazikvantela pa je otopljeno po 3,63 mg β-ciklodekstrina, 4,13 mg SBE-β-CD te 3,81 mg HP-β-CD u 20 mL istog sastava otapala kao za prazikvantel.

Ishodne otopine kompleksa pripremljenih mljevenjem priređene su otapanjem 1 mg kompleksa u 20 mL sustava acetonitril:voda u omjeru 1:1. Masena koncentracija pripremljenih ishodnih otopina iznosila je 50 µg/mL.

3.2.2. Priprava uzoraka za LC-MS/MS i MS/MS analizu

Za LC-MS/MS analizu ishodne su otopine pomiješane tako da konačan molarni omjer prazikvantel:ciklodekstrin iznosi 1:1, 5:1, 1:5 te 1:10. Otpipetirano je po 20 µL svake od pripremljenih otopina u staklene bočice za HPLC te nadopunjeno otopinom ACN:voda u omjeru 6:4 do 1 mL.

Otopine prethodno pripremljenih kompleksa u čvrstom stanju priređene su tako da je automatskom pipetom otpipetirano po 20 µL svake od otopine kompleksa u bočice za HPLC te nadopunjeno s otopinom ACN:voda 6:4 do 1 mL.

Za MS/MS analizu pripravljene su otopine prazikvantela, svih korištenih ciklodekstrina te otopine kompleksa pripremljenih mljevenjem. Otopine prazikvantela su pripravljene na isti način kao u prethodnoj analizi samo što je u ovom slučaju razrjeđenje bilo 1000 puta u odnosu na ishodnu otopinu te je u bočicu za MS otpipetirano po 1 μ L svake od otopina te nadopunjeno s otopinom ACN:voda 6:4 do 1 mL.

Pripravljene su i zasebne otopine svih ciklodekstrina s dodatkom NaCl u molarnim omjerima CD:NaCl 1:2 i 1:10. Otopine su pripravljene tako da je pomiješana otopina NaCl u sustavu otapala acetonitril/(voda 0,1% mravlja kiselina) u omjeru 1:1 s ishodnim otopinama ciklodekstrina.

3.3. LC-MS/MS i MS/MS analiza

3.3.1. LC-MS/MS analiza

Temperatura kromatografske kolone prilikom odjeljivanja iznosila je 60 °C. Mobilna faza A bio je čisti acetonitril, dok je faza B bila voda s 0,01 % mravlje kiseline. Udio pojedinih faza se tijekom ispiranja s kolone mijenjao prema rasporedu navedenom u tablici 1. Vrijeme trajanja svake od kromatografskih analiza bilo je 22 minute.

Tablica 1. Udio pojedine mobilne faze i protok tijekom kromatografskog odjeljivanja (mobilna faza A – acetonitril, mobilna faza B – voda s 0,01% mravlje kiseline).

vrijeme / min	udio mobilne faze A (%)	udio mobilne faze B (%)	protok (mL / min)
0,00	95	5	0,4
5,00	20	80	0,4
20,00	20	80	0,4
20,01	95	5	0,4
22,00	95	5	0,4

Za MS/MS analizu korišteno je elektroraspršenje kao ionski izvor. Postavke u ionskom izvoru bile su sljedeće:

- Napon na kapilari: 3500 V
- Temperatura plina za sušenje (dušik): 200 °C
- Protok plina za sušenje: 13,9 L/min
- Temperatura pomoćnog plina (engl. *Sheath gas*): 350 °C
- Protok pomoćnog plina: 11 L/min
- Tlak u nebulizatoru : 35 psig

Spektri su snimani i u pozitivnom i u negativnom načinu rada.

3.3.2. MS/MS analiza

Za MS/MS analizu postavke su ostale iste, no nije korištena kromatografska kolona. Ovim načinom analizirani su uzorci čija je priprava opisana u odjeljku 3.2.2. te su spektri snimljeni u pozitivnom i negativnom načinu rada. Uzorci ciklodekstrina s dodatkom iona Na⁺ pripremljeni su po uzoru na istraživanje u kojem se proučavala fragmentacija β-ciklodekstrina u pozitivnom načinu rada dodatkom Na⁺. Naime, dodatkom Na⁺ nastao je molekularni ion [β-CD Na]⁺ te fragmentni ioni, odnosno oligomeri glukoze koji su vezali ione natrija.²²

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati LC-MS/MS analize

U eksperimentalnom dijelu rada su LC-MS/MS metodom analizirane otopine prazikvantela, svih odabranih β -ciklodekstrina, smjese otopina pripravljene direktnim miješanjem otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina (β -CD), sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE- β -CD) te 2-hidroksipropil β -ciklodekstrina (HP- β -CD) u različitim molarnim omjerima te otopina prethodno pripremljenih kompleksnih spojeva prazikvantela s β -ciklodekstrinom i različito supstituiranim β -ciklodekstrinima. U spektrima masa snimljenima u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije očekivali su se signali molekulskih iona prazikvantela, kompleksnih iona te supstituiranih β -ciklodekstrina pri vrijednostima m/z navedenima u tablici 2.

Tablica 2. Molekulske mase prazikvantela, ciklodekstrina te kompleksnih spojeva i očekivane vrijednosti m/z u pozitivnom (+) i negativnom (-) načinu ionizacije. Molarne mase supstituiranih ciklodekstrina su izračunate koristeći prosječni koeficijent supstitucije (DS) naveden od proizvođača.

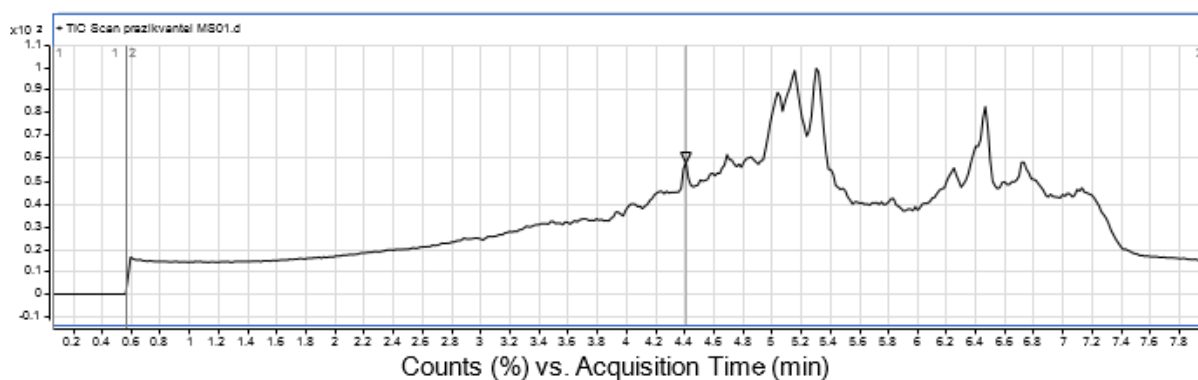
Ime spoja	Molekulska masa (g/mol)	Molekulski ion m/z (+)	Molekulski ion m/z (-)
prazikvantel	312,4	313,1911	311,1760
β -ciklodekstrin	1135,0	1135,3770	1133,3625
natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrin	2163,3	2163,6770	2161,6625

hidroksipropil- β - ciklodekstrin	1396,45	1396,827	1394,8125
kompleks PZQ- β -CD	1447,4	1448,1911	1446,1760
kompleks PZQ-SBE- β -CD	2475,7	2476,4911	2474.4760
kompleks PZQ-HP- β -CD	1708,85	1709,6411	1707,6260
kompleks PZQ-RM- β -CD	1615,4	1616,1911	1614,1760

Rezultati LC-MS/MS analize smjesa otopina prazikvantela i ciklodekstrina u različitim molarnim omjerima te otopina pripremljenih otapanjem prethodno izoliranih kompleksa u čvrstom stanju prikazani su pomoću kromatograma ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Current*). U nastavku rada takav kromatogram označavat će se kao TIC kromatogram. U TIC kromatogramu na osi y nanosi se intenzitet iona, a na osi x vrijeme. Ovakav prikaz često se koristi kada je spektrometrija masa spregnuta s kromatografijom. U tom slučaju na osi x su retencijska vremena kao u klasičnom kromatogramu. Na TIC kromatogramu intenzitet predstavlja sumu intenziteta svih detektiranih iona u određenom vremenu. Intenzivni pikovi na TIC kromatogramu indiciraju veliku koncentraciju iona nastalih u ionskom izvoru.

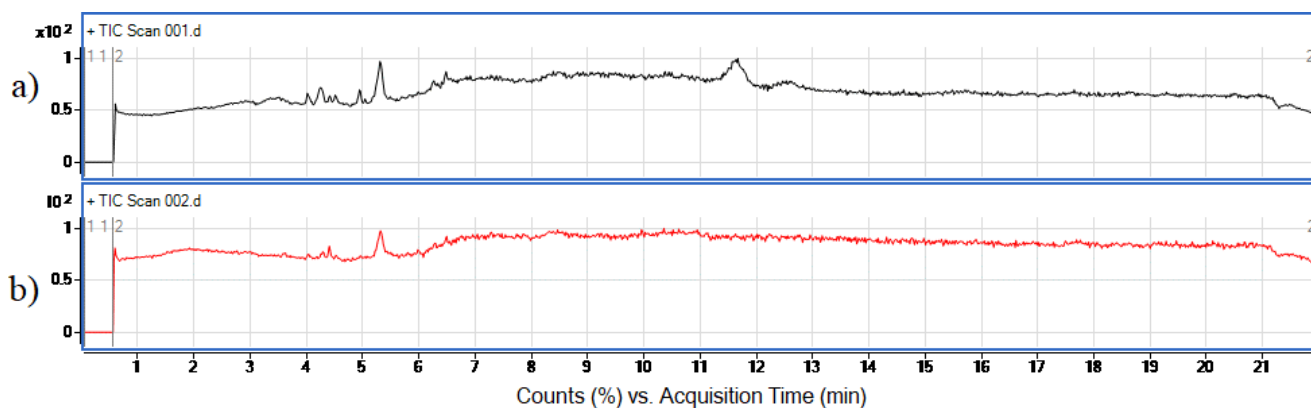
Prvo su snimljeni spektri uzoraka prazikvantela, te smjese otopina prazikvantela i ciklodekstrina pripremljenih miješanjem ishodnih otopina u molarnim omjerima PZQ: ciklodekstrin 1:1 i 1:5. Isti uzorci snimljeni su nakon stajanja na 5 °C cca 72 h, te svježe pripremljeni uzorci u istim omjerima, uzorci pripremljeni miješanjem ishodnih otopina u

molarnim omjeru PZQ:ciklodekstrin 1:10, uzorci pripremljeni otapanjem prethodno pripremljenih kompleksa u čvrstom stanju te također otopine samih ciklodekstrina.

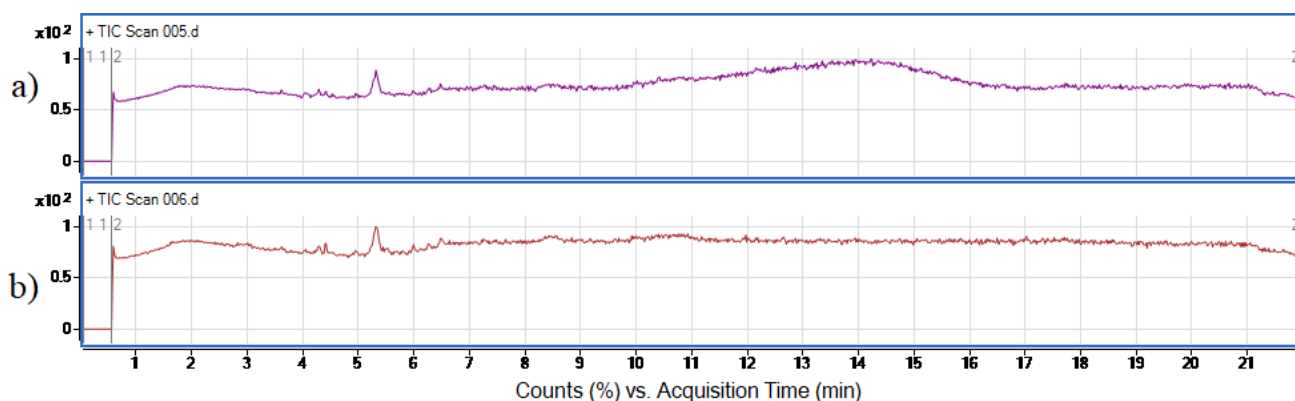


Slika 10. TIC kromatogram otopine prazikvantela.

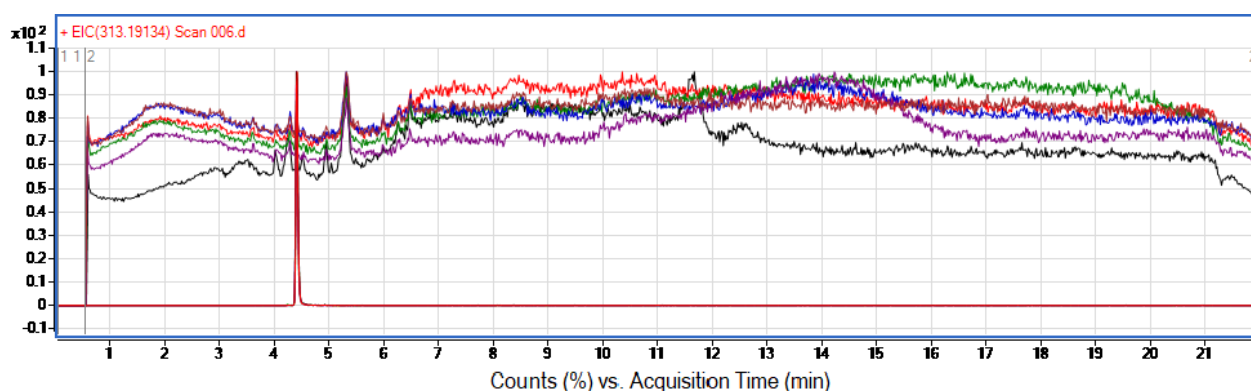
Vidljiv relativno intenzivan pik pri $t_R = 4,4$ min koji odgovara retencijskom vremenu prazikvantela.



Slika 11. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina (kromatogram a) te smjese otopina PZQ i hidroksipropil- β -ciklodekstrina (kromatogram b) pripremljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:ciklodekstrin 1:5 (prvo snimanje).

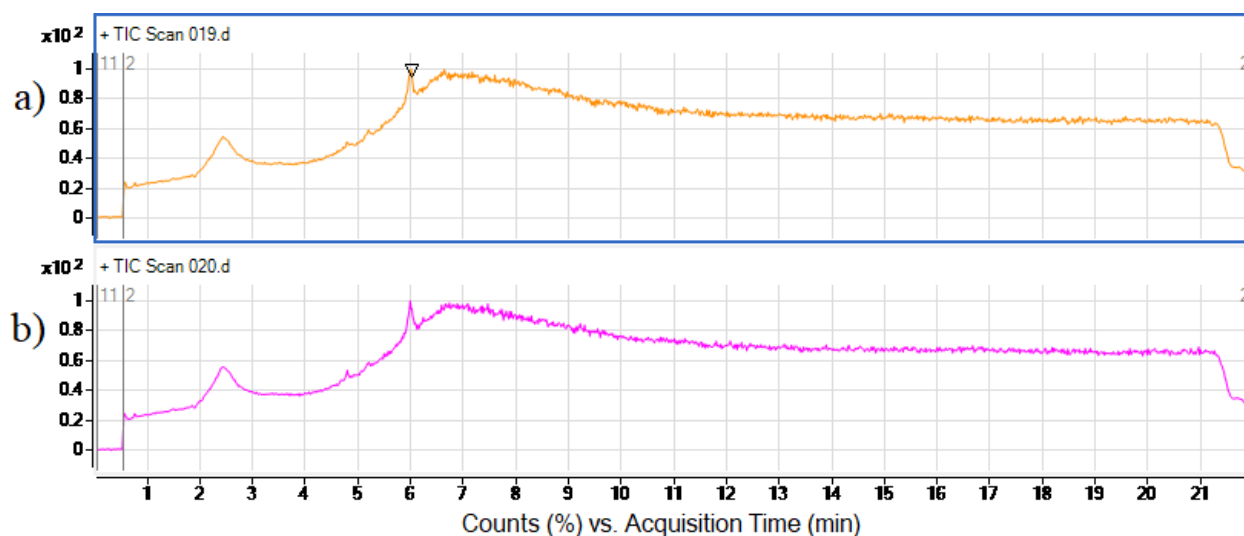


Slika 12. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina (kromatogram a) te smjese otopina PZQ i sulfobutileter- β -ciklodekstrina (kromatogram b) pripremljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:ciklodekstrin 1:1 (prvo snimanje).

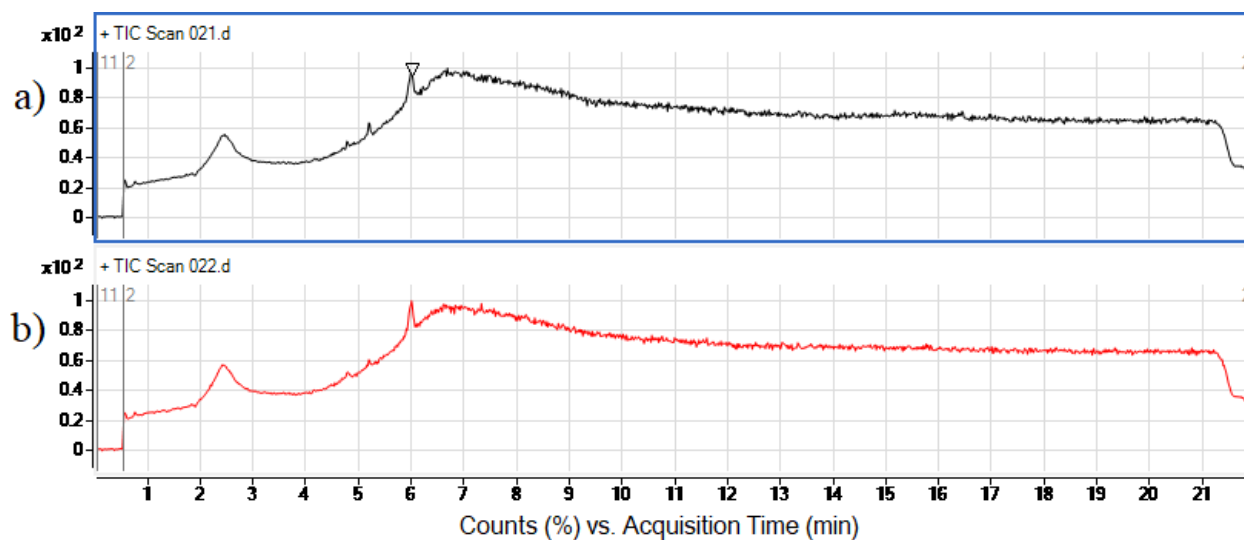


Slika 13. Preklopljeni TIC kromatogrami svih smjesa otopina PZQ i CD u molarnim omjerima PZQ:ciklodekstrin 1:1 i 1:5, najdonja linija predstavlja idealan kromatogram otopine prazikvantela (preklopljeni TIC kromatogrami iz slika 11,12 i D1).

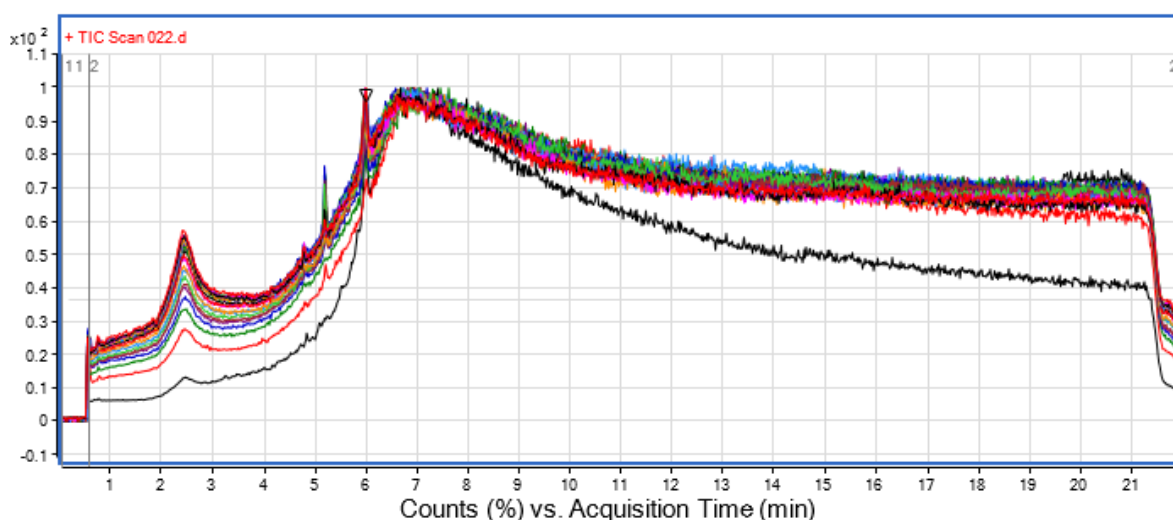
U svim kromatogramima može se uočiti pik pri $t_R = 4,4$ min koji odgovara molekuli prazikvantela. Također je vidljiv intenzivan pik pri cca $t_R = 11,5$ min u kromatogramu smjese otopina PZQ i β -CD pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ: β -CD 1:5 (prvo snimanje).



Slika 14. TIC kromatogrami otopina kompleksa prazikvantela s RM- β -CD (kromatogram a) te kompleksa sa SBE- β -CD (kromatogram b) pripravljenim otapanjem prethodno izoliranih kompleksa u čvrstom stanju.

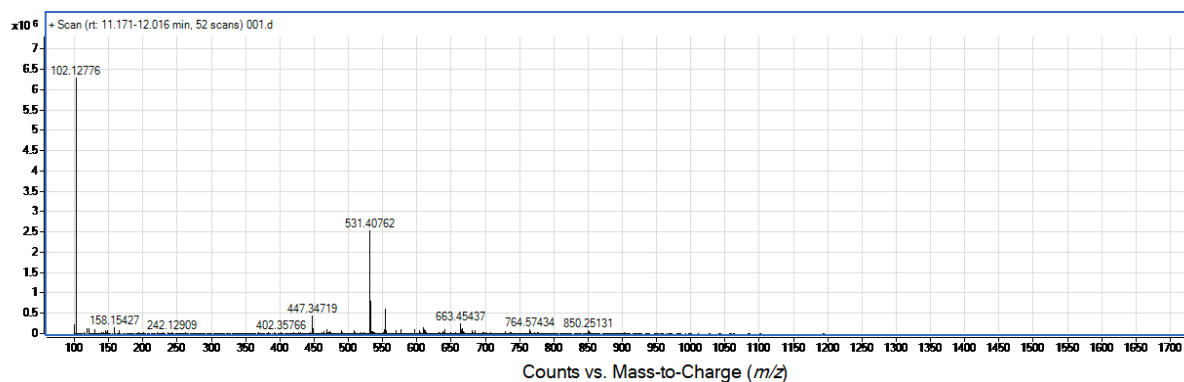


Slika 15. TIC kromatogrami otopina kompleksa prazikvantela s β -CD (kromatogram a) te kompleksa sa HP- β -CD (kromatogram b) pripravljenim otapanjem prethodno izoliranih kompleksa u čvrstom stanju.



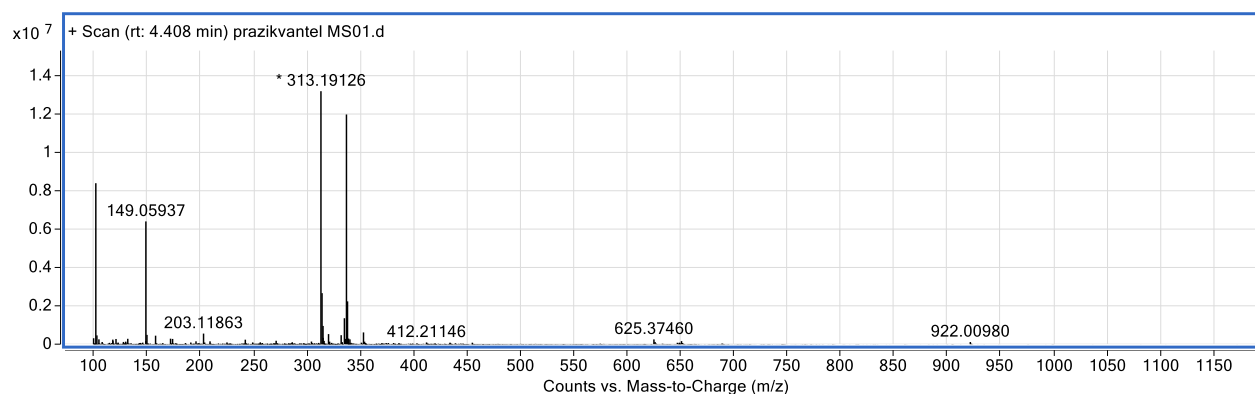
Slika 16. Preklopljeni TIC kromatogrami svih uzoraka snimljenih u drugoj LC-MS/MS analizi (preklopljeni TIC kromatogrami iz slika 14, 15, D3 – D11).

U kromatogramima otopina prazikvantela i svih smjesa otopina prazikvantela i ciklodekstrina u različitim molarnim omjerima te otopina pripremljenih otapanjem prethodno izoliranih kompleksa u čvrstom stanju vidljiv je intenzivan pik pri $t_R = 4,4$ minute koji odgovara retencijskom vremenu prazikvantela te pik pri cca 5,5 – 6,0 min (slike 9 – 16, D1 – D11). Analizom masenih spektara tvari s vremenom zadržavanja od 4,4 min potvrđeno je da se pri $t_R = 4,4$ min nalazi prazikvantel dok maseni spektri tvari s vremenom zadržavanja pri $t_R =$ cca 5,5 min kod svih uzoraka ne sadrže signale koji bi odgovarali masama molekulskih iona analiziranih ciklodekstrina niti kompleksnih iona, već sadrže signale koji odgovaraju često prisutnom onečišćenju u kromatografskom sustavu, najvjerojatnije deterdžentu. Također, u kromatogramu smjese otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ/ β -CD 1:5 vidljiv je intenzivan pik pri 11,5 min (slika 11). Analizom spektra masa tvari s vremenom zadržavanja $t_R = 11,5$ min snimljenih u pozitivnom načinu ionizacije utvrđeno je da ne sadrži signale koji bi odgovarali masi molekuskog iona β -ciklodekstrina pri m/z 1135,3770 niti iona kompleksa PZQ- β -CD pri m/z 1448,1911 (slika 17).



Slika 17. MS spektar tvari s retencijskim vremenom $t_R =$ cca 11,5 min (iz kromatograma smjese otopina PZQ i β -CD u molarnom omjeru PZQ: β -CD 1:5).

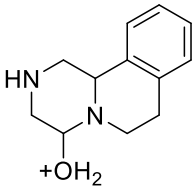
Analizom MS/MS spektra otopine prazikvantela (signal pri $t_R = 4,4$ min) vidljiv je bazni signal pri vrijednosti m/z 313,19126 koji odgovara masi jednostruko nabijenog molekuskog iona prazikvantela $[PZQ+H]^+$ (slika 18). Također je vidljiv intenzivan signal pri vrijednosti m/z 203,11863 koji je proučavajući literaturu asigniran jednostruko nabijenom fragmetnom ionu (tablica 3). Signali pri m/z 625,37460 i 922,00980 pripadaju unutarnjem standardu mase.



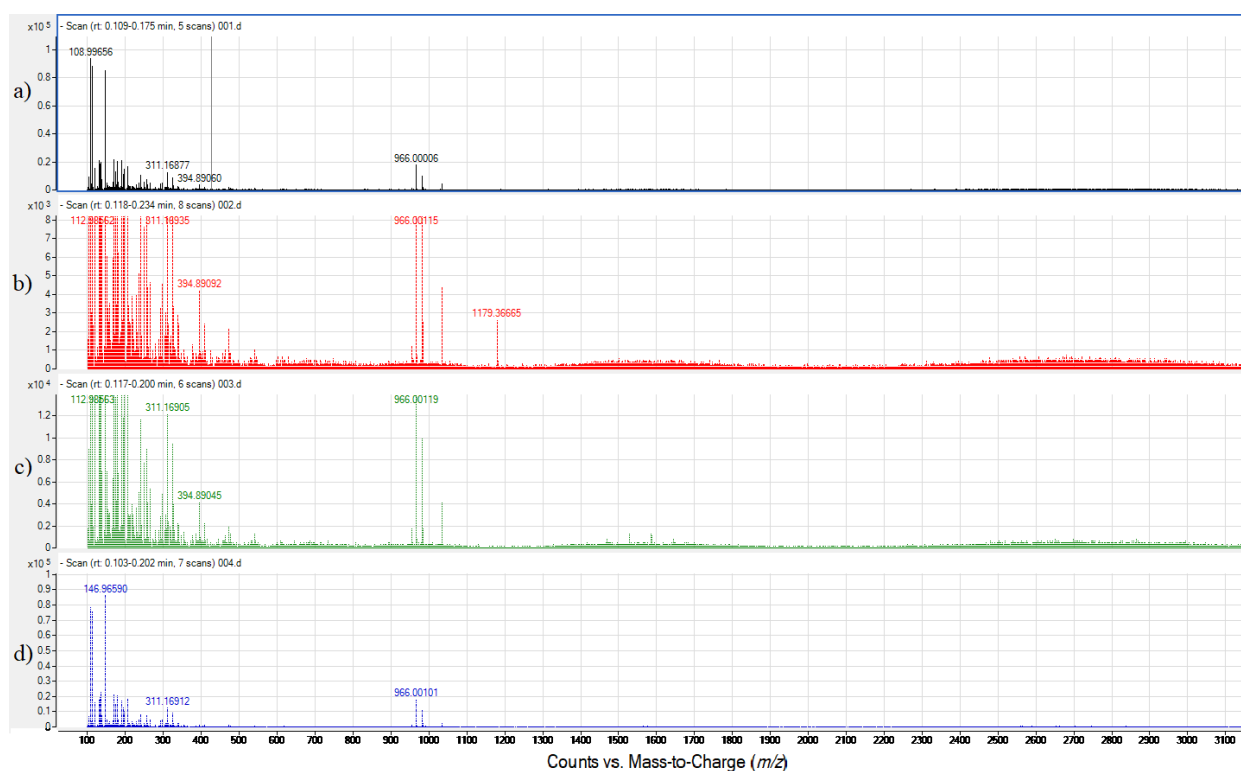
Slika 18. MS/MS spektar tvari s retencijskim vremenom, $t_R = 4,4$ min u uzorku otopine prazikvantela.

Intenzivan signal pri vrijednosti m/z 313,19126 odgovara molekuskom ionu $[PZQ+H]^+$.

Tablica 3. Značajni signali u MS/MS spektru otopine prazikvantela pri $t_R = 4,4$ min i njihove strukture.

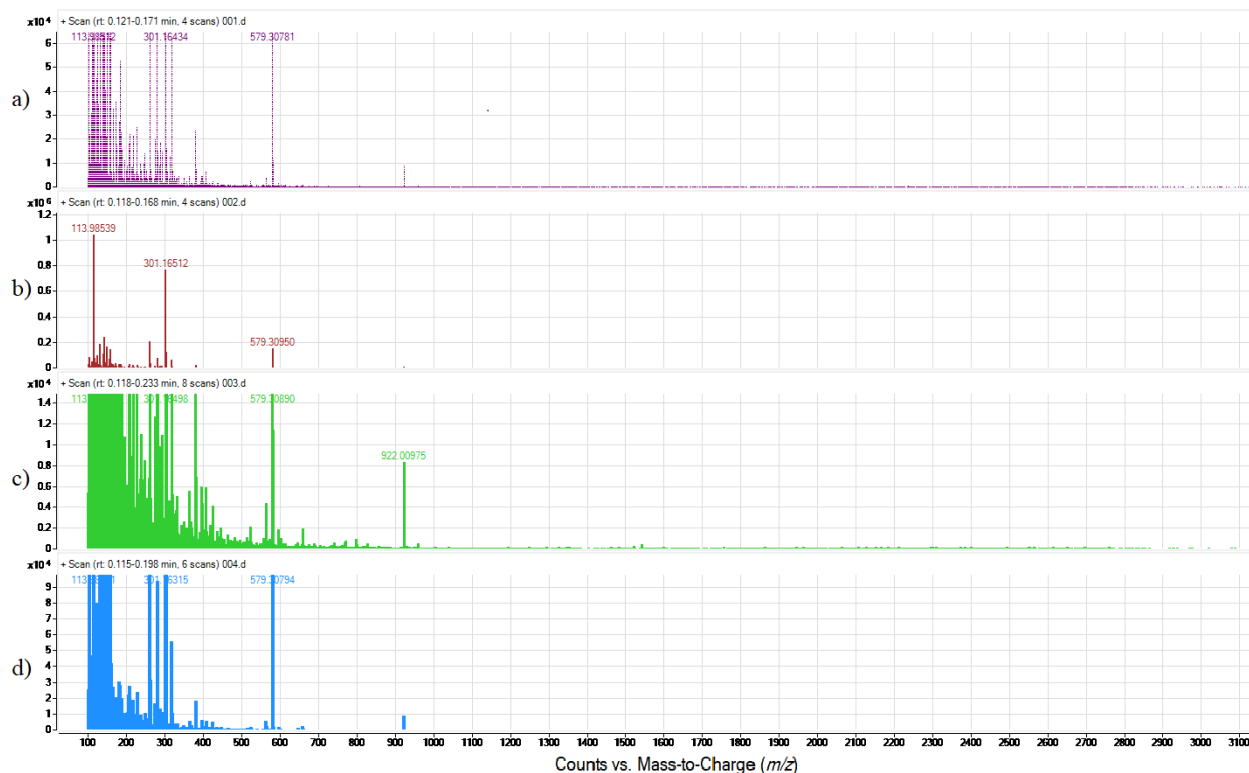
(m/z)	struktura iona
313,19126	$[PZQ+H]^+$
203,19126	

4.2. Rezultati MS/MS analize

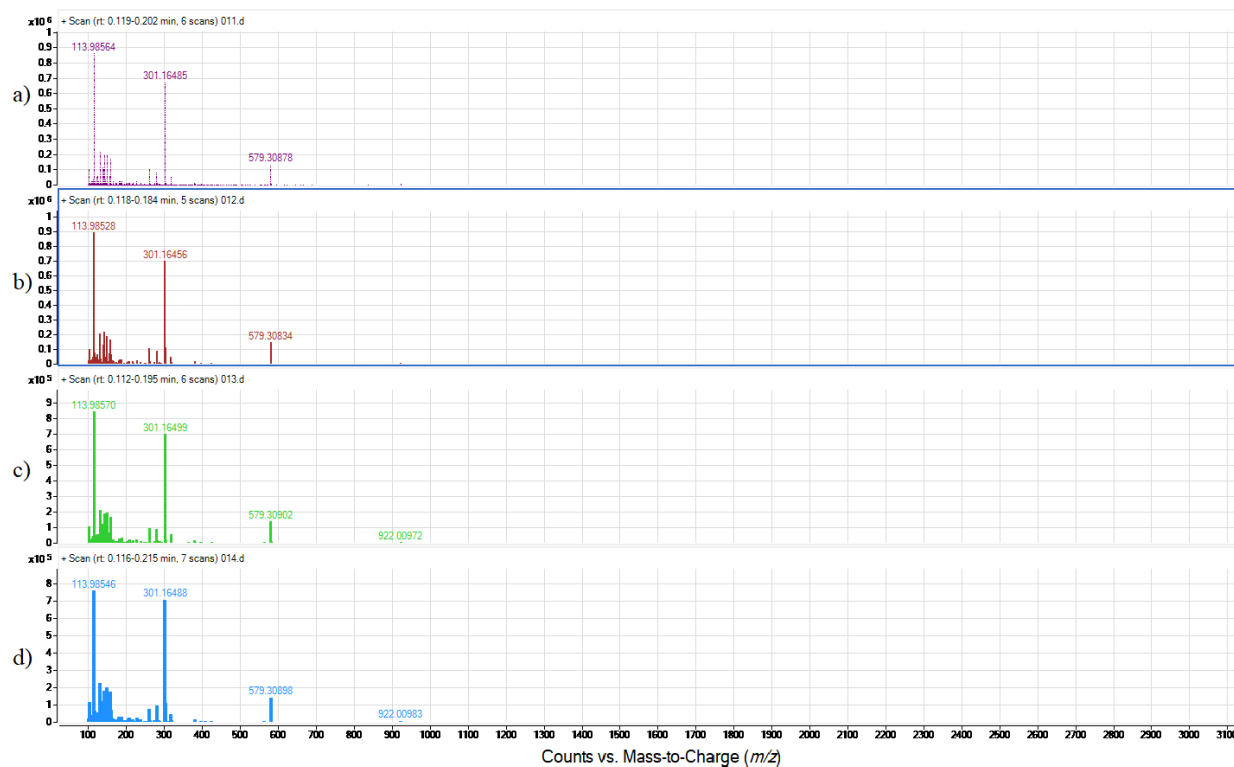


Slika 19. Spektri masa otopina: prazikvantela (a), β -ciklodekstrina (b), hidroksipropil- β -ciklodekstrina (c) i sulfobutileter- β -ciklodekstrina (d) snimljeni u negativnom načinu rada.

U spektru masa otopine prazikvantela snimljenom u negativnom načinu rada (slika 19a) može se uočiti signal pri vrijednosti m/z 311,16878 koji je pipisan jednostruko negativno nabijenom molekulskom ionu prazikvantela. Spektri svih ciklodekstrina (slike 19b,c,d i 20b,c,d) snimljeni u pozitivnom i u negativnom načinu rada ne sadrže signale pri vrijednostima m/z karakterističnim molekulskim ionima niti fragmentnim ionima ciklodekstrina (slike D14 i D15). Isto vrijedi i za spektre otopina pripremljenih otapanjem kompleksa u čvrstom stanju te spektre otopina ciklodekstrina s dodatkom Na^+ gdje su se u spektrima snimljenima u pozitivnom načinu rada očekivali signali adukata ciklodekstrina s Na^+ (slike 21, D12 i D13). Ovakvi rezultati upućuju na to da se molekule ciklodekstrina nisu ionizirale.



Slika 20. Spektri masa otopina: prazikvantela (a), β -ciklodekstrina (b), hidroksipropil- β -ciklodekstrina (c) i sulfobutileter- β -ciklodekstrina (d) snimljeni u pozitivnom načinu rada.



Slika 21. Spektri masa otopina ciklodekstrina s dodatkom Na^+ iona; otopina SBE- β -CD/ Na^+ u molarnom omjeru 1:10 (a), otopina SBE- β -CD: Na^+ u omjeru 1:2 (b), otopina HP- β -CD/ Na^+ u omjeru 1:10 (c) i otopina HP- β -CD: Na^+ u omjeru 1:2 (d), snimljeni u pozitivnom načinu rada.

4.3. Rasprava

Postavlja se pitanje koji su razlozi da se ni u jednom od provedenih eksperimenata nisu uspješno izolirali ni identificirali kompleksi prazikvantela s ciklodekstrinima. U kromatogramima smjesa otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina nisu pronađeni pikovi koji bi odgovarali kompleksnim spojevima prazikvantela s β -ciklodekstrinima što upućuje na pretpostavku da se metodom direktnog miješanja otopina ovakvi kompleksi ne mogu pripremiti. Kromatogrami otopina pripremljenih otapanjem prethodno pripremljenih i izoliranih kompleksa u čvrstom stanju dali su gotovo identične negativne rezultate. MS/MS analizom također nisu nađeni signali koji bi odgovarali kompleksima pa se može zaključiti da kromatografska separacija nije odgovorna za raspad kompleksa ukoliko je on i postojao u

otopini. U slučaju da je sam nekovalentni kompleks i "preživio" u otopini, jačina napona u ionskom izvoru moguće da je bila previsoka da bi se očuvale nekovalentne interakcije. Na takav zaključak upućuje izostanak literature u kojoj su opisani spektri masa kompleksa prazikvantela i ciklodekstrina u otopini.

Nadalje, MS/MS spektri otopina samih ciklodekstrina te otopina ciklodekstrina s dodatkom natrijevih iona nisu dali očekivane rezultate s obzirom na proučavanu literaturu. MS/MS analiza otopina ciklodekstrina s dodatkom Na⁺ iona napravljena je po uzoru na već spomenuti rad gdje se proučavala fragmentacija supstituiranih i nesupstituiranih β-ciklodekstrina ESI-MS metodom.²² U tom istraživanju kao otapalo korištena je samo voda te su se uvjeti snimanja spektara nešto razlikovali.

Također valja uzeti u obzir i ostale čimbenike koji su mogli uzrokovati izostanak signala β-ciklodekstrina kao što su hlapljivost i polarnost molekule analita te pH otapala. Primjećeno je i da ekvimolarne otopine različitih spojeva pri istim uvjetima ionizacije daju vrlo različit odgovor u vidu intenziteta i uspješnosti same ionizacije. Studija koja se bavila utjecajem pH otopine, uvjeta ionizacije, utjecaja samog instrumenta korištenog u ESI-MS analizi na intenzitet signala i učinkovitost ionizacije pokazala je da je intenzitet signala pri pH = 7 i pH = 3 pozitivno koreliran s bazičnošću i polarnosti molekule. Nepolarne hlapljivije molekule su dale znatno jače intenzitete pri nižem pH. Analizirano je 56 organskih spojeva uključujući aromatske amine i piridine. Također, zanimljiv je rezultat koji pokazuje da ponašanje analita znatno varira pri upotrebi različitih uređaja za ESI-MS analizu.²³

§ 5. ZAKLJUČAK

Detaljnou masenospektrometrijskom analizom utvrđeno je da u kromatogramima uzoraka nisu pronađeni pikovi koji bi odgovarali kompleksnim spojevima prazikvantela s β -ciklodekstrinima, odnosno različito supstituiranim β -ciklodekstrinima. Uzimajući u obzir da su spomenuti kompleksi u čvrstom stanju identificirani drugim tehnikama, izostanak signala u spektrima masa otopine kompleksa te smjesa otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina može biti uvjetovan iz više razloga: nestabilnost kompleksa u otopini, nenastajanje kompleksa direktnim mješanjem otopina prazikvantela i ciklodekstrina, nepogodnost sastava kromatografske kolone i mobilne faze za ovakvu separaciju, utjecaj odabranih otapala na nastajanje i stabilnost samog kompleksa, nestabilnost kompleksa u plinskoj fazi.

U daljnjem pokušaju identifikacije kompleksnih spojeva prazikvantela s β -ciklodekstrinima tehnikom spektrometrije masa mogla bi se razmotriti neka druga tehnika ionizacije, kao naprimjer matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, tj. MALDI budući da je prikladna za analizu uzoraka u čvrstom stanju.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN – acetonitril

β -CD – β (beta)-ciklodekstrin

ESI – *Electrospray Ionization*, ionizacija elektroraspršenjem

HP- β -CD – 2-hidroksipropil- β -Ciklodekstrin

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

LC – *Liquid Chromatography*, tekućinska kromatografija

MCP – *Microchannel Plate*, mikrokanalna pločica

MS – *Mass Spectrometry*, spektrometrija masa

PZQ – *Praziquantel*, prazikvantel

PZQ- β -CD Kompleks prazikvantel- β -ciklodekstrin

PZQ-HP- β -CD – kompleks prazikvantel 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin

PZQ-SBE- β -CD – kompleks prazikvantel sulfobutileter- β -ciklodekstrin

PZQ-RM- β -CD – kompleks prazikvantel-metil- β -ciklodekstrin

RM- β -CD – *Randomly methylated β -cyclodextrin*, nasumično metilirani β -ciklodekstrin

SBE- β -CD – natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrin

TOF – *Time Of Flight*, analizator masa koji mjeri vrijeme leta

UPLC – *Ultra-Performance Liquid Chromatography*, tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

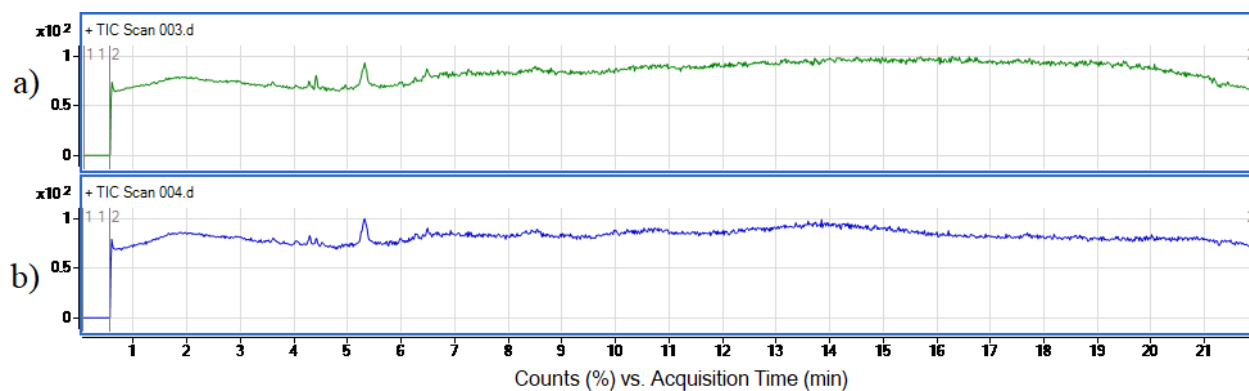
Q - *Quadrupole*, kvadrupol

§ 7. LITERATURNI IZVORI

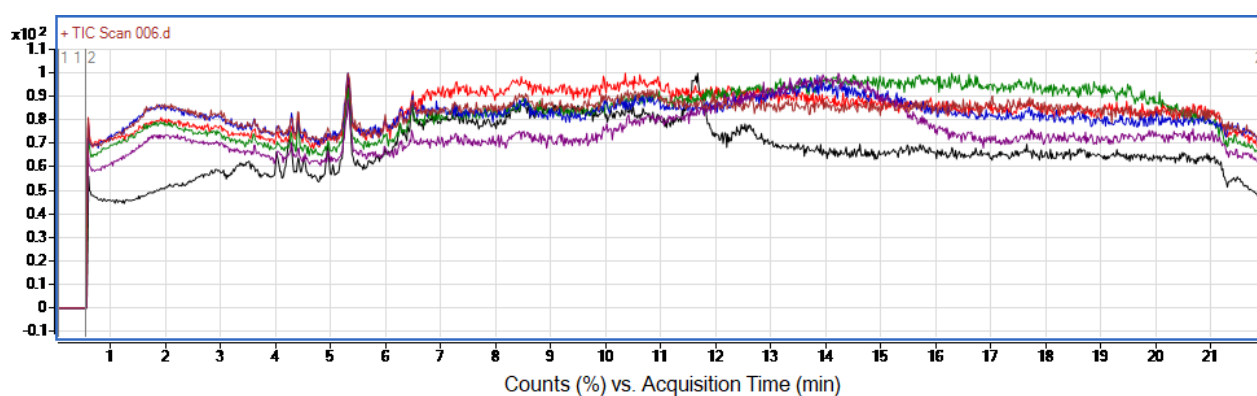
1. J. Li, Y. Wang, A. Fenwick, T. A. Clayton, Y. Y. K. Lau, C. Legido-Quigley i E. Holmes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45** (2007) 263–267.
2. M. Cugovčan, J. Jablan, J. Lovrić, D. Cinčić, N. Galić, M. Jug, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137** (2017) 42–53.
3. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/018714s012lbl.pdf, (datum pristupa 19. studenog 2019.)
4. C. E. Lanusse, G. L. Virkel i L. I. Alvarez, Anticestodal and antitrematodal drugs. J. E. Riviere & M. G. Papich (ur.), *Veterinary pharmacology & therapeutics*, Hoboken: Wiley-Blackwell, 2009. (9. izdanje, str. 1095–1117).
5. F. Angelucci, A. Basso, A. Bellelli, M. Brunori, L. Pica Mattoccia, C. Valle, *Parasitology*, **134** (2007) 1215–1221.
6. T. Wimmer, *Cyclodextrins. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, 2012.
7. A. Biwer, G. Antranikian, E. Heinzle, *Enzymatic production of cyclodextrins, Applied Microbiology and Biotechnology*, **59** (2002) 609–17.
8. J. Zhang, P. X. Ma, *Adv. Drug Delivery Rev.* **65** (9) (2013) 1215–123.3
9. A. Motoyama, A. Suzuki, O. Shirota, R. Namba, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28** (2002) 97–106.
10. L. da Silva Mourão, D. Ribeiro Batista, S. Honorato, A. Ayala, W. de Alencar Moraes, E. Barbosa, F. Raffin, T. de Lima e Moura, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **85** (2016) 151–160.
11. N. Galić, V. Drevenkar, Kromatografija, interna skripta za kolegij Instrumentna analitika 2
12. <https://www.ru.nl/systemschemistry/equipment/chromatography/hplc/>, (datum pristupa 4. prosinca 2019.)
13. https://www.researchgate.net/figure/The-basic-components-of-the-ESI-mass-spectrometer_fig9_225050758 (datum pristupa 21. studenog 2019.)
14. N. Galić, Spektrometrija masa, interna skripta za kolegij Instrumentna analitika 2

15. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, peto izdanje, Brooks Cole. 1997.
16. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process_fig31_225050758, (datum pristupa 20. studenog 2019.)
17. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms> (datum pristupa 20. studenog 2019.)
18. https://www.wikiwand.com/en/Time-of-flight_mass_spectrometry#/Reflectron_TOF, (datum pristupa 23. studenog 2019.)
19. <https://www.creative-proteomics.com/support/agilent-6540-uhd-quadrupole-time-of-flight-accurate-mass-mass-spectrometer.htm>, (datum pristupa 23. studenog 2019.)
20. J. Wiza, *Microchannel plate detectors*, *Nuclear Instruments and Methods*, **162** (1979) 587–601.
21. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3335-90173_TOF_Q-TOF_Concepts.pdf (datum pristupa 1. prosinca 2019.)
22. S. Sforza, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14** (2003) 124–135.
23. A. Kiontke, A. Oliveira-Birkmeier, A. Opitz, C. *PLoS ONE* **11(12)** (2016) 1–16.

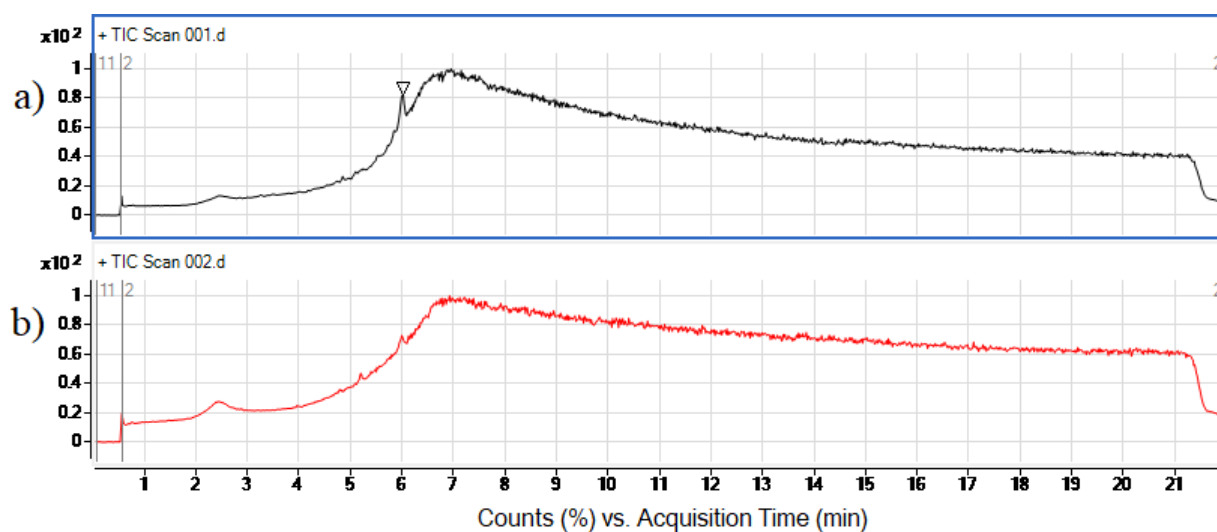
§ 8. DODATAK



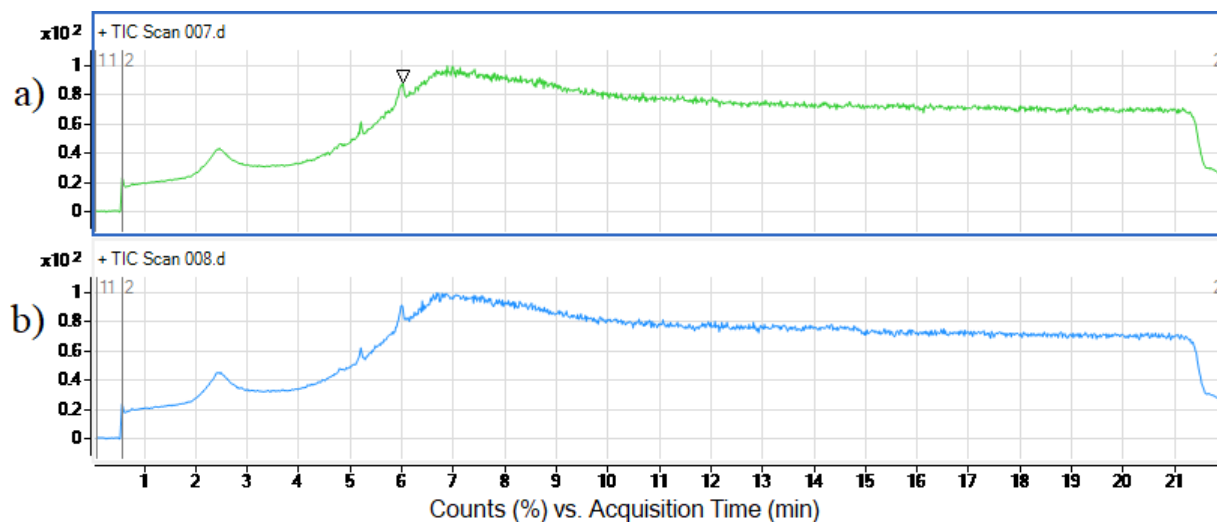
Slika D1. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i sulfobutileter- β -ciklodekstrina pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:SBE- β -CD 1:5 (kromatogram a), te smjese otopina prazikvantela i hidroksipropil- β -ciklodekstrina pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:HP- β -CD 1:1 (b).



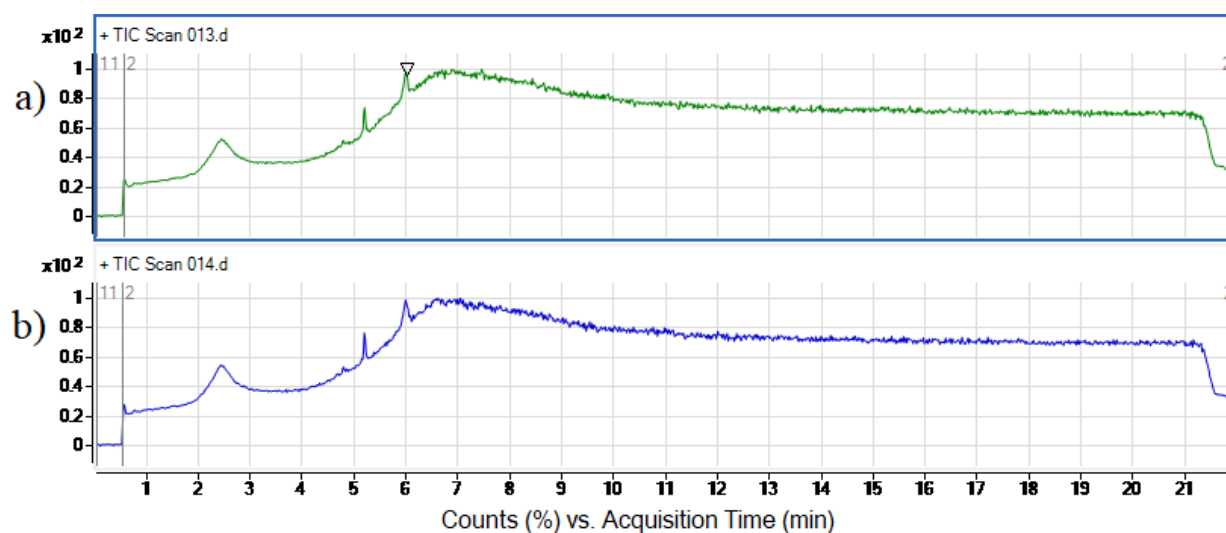
Slika D2. Preklopljeni TIC kromatogrami svih smjesa otopina prazikvantela i ciklodekstrina pripremljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:ciklodekstrin 1:1 i 1:5.



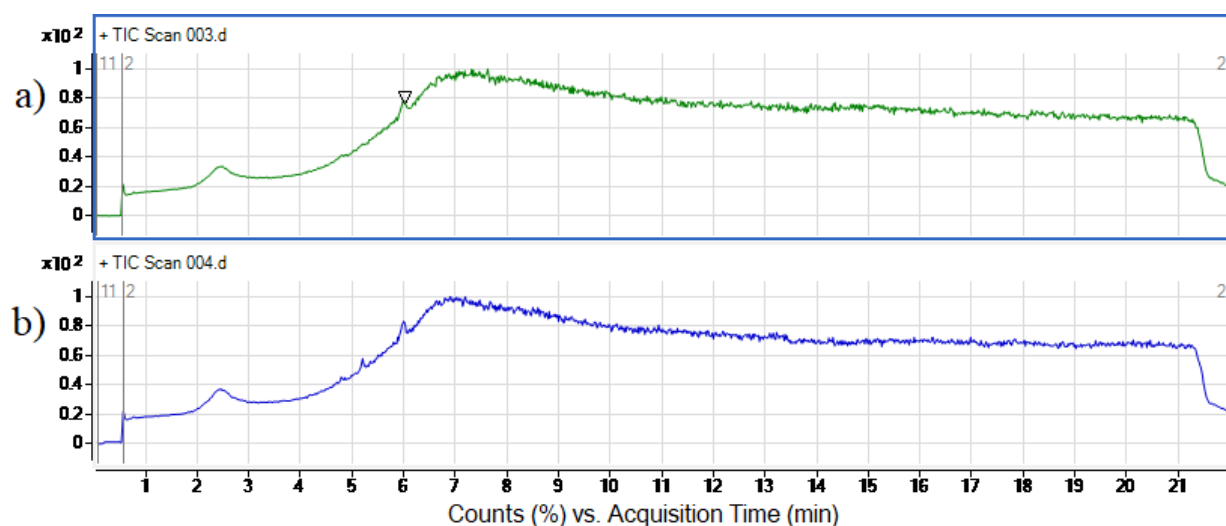
Slika D3. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i HP- β -CD pripravljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:HP- β -CD 1:1. Spektri su snimljeni 72h nakon pripreme uzoraka (kromatogram a) te odmah nakon pripreme (ponovno pripravljeni uzorak) (kromatogram b).



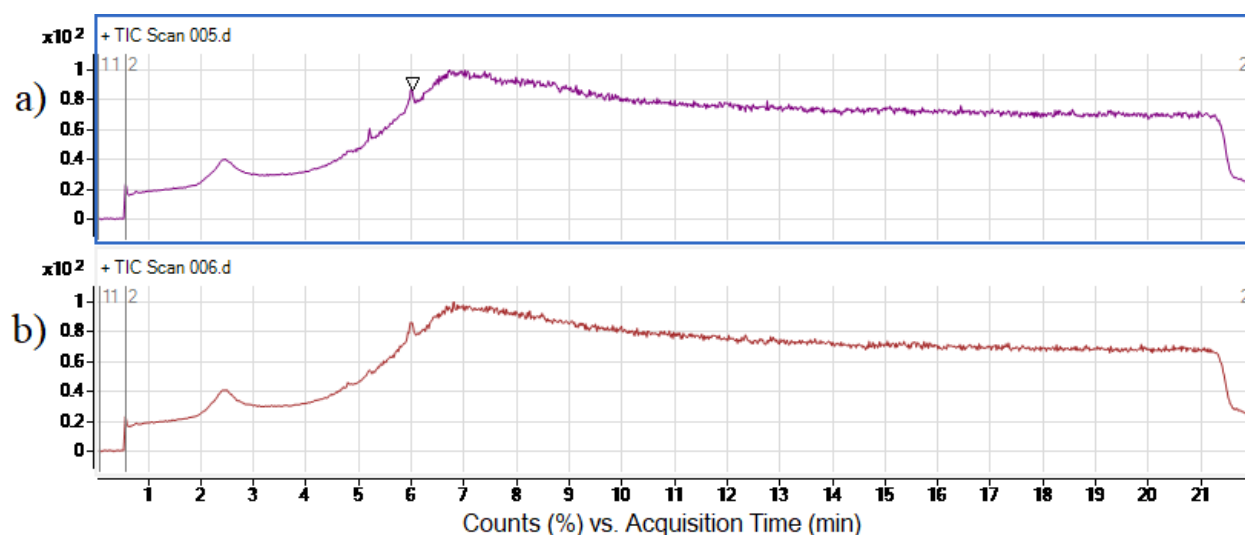
Slika D4. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i β -CD pripravljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ: β -CD 1:1. Spektri su snimljeni 72h nakon pripreme uzoraka (kromatogram a) te odmah nakon pripreme (ponovno pripravljeni uzorak) (kromatogram b).



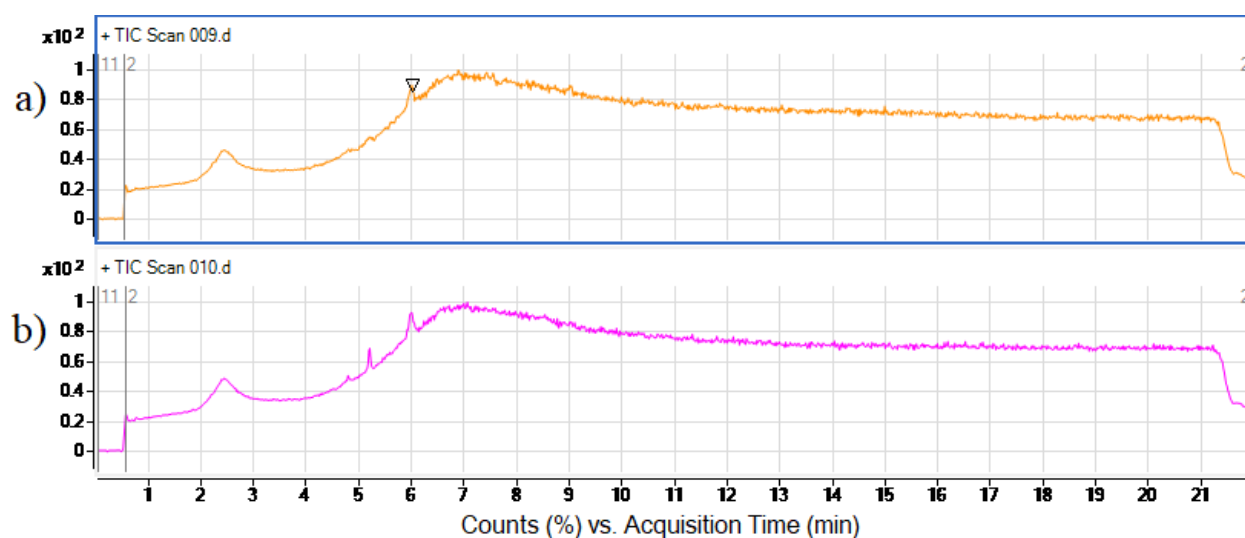
Slika D5. TIC kromatogrami smjesa otopina prazikvantela i SBE- β -CD pripremljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:SBE- β -CD 1:1. Uzorci su snimljeni 72h nakon pripreve (kromatogram a), te odmah nakon pripreve (ponovno pripremljeni uzorak) (kromatogram b).



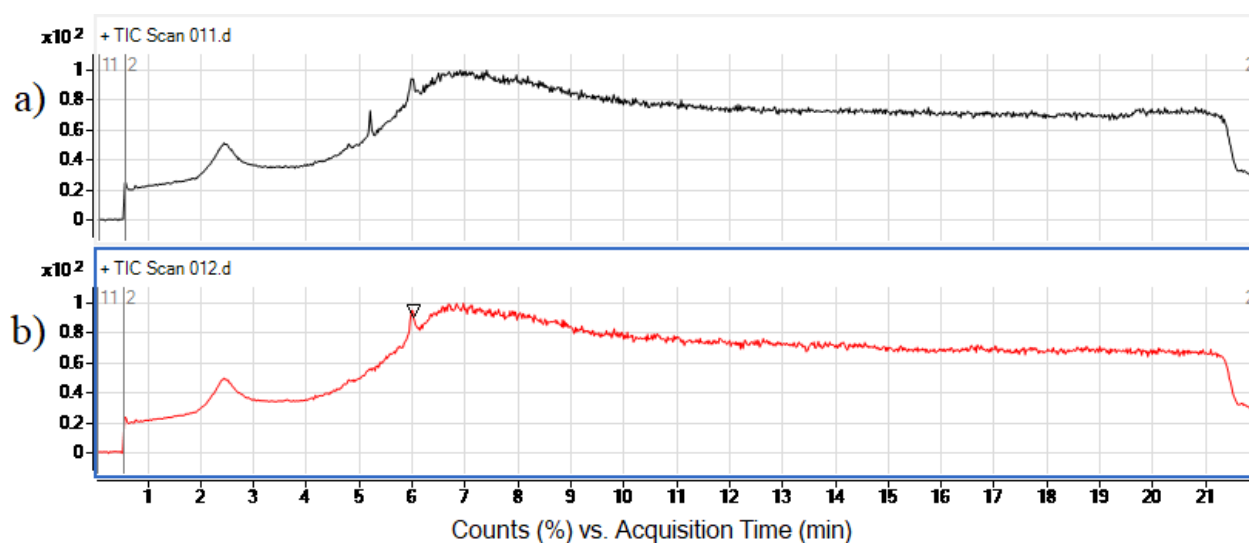
Slika D6. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i hidroksipropil- β -ciklodekstrina pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ/HP- β -CD 1:5 (kromatogram a), te smjese otopina PZQ i sulfobutileter- β -ciklodekstrina pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:SBE- β -CD 1:5 (kromatogram b).



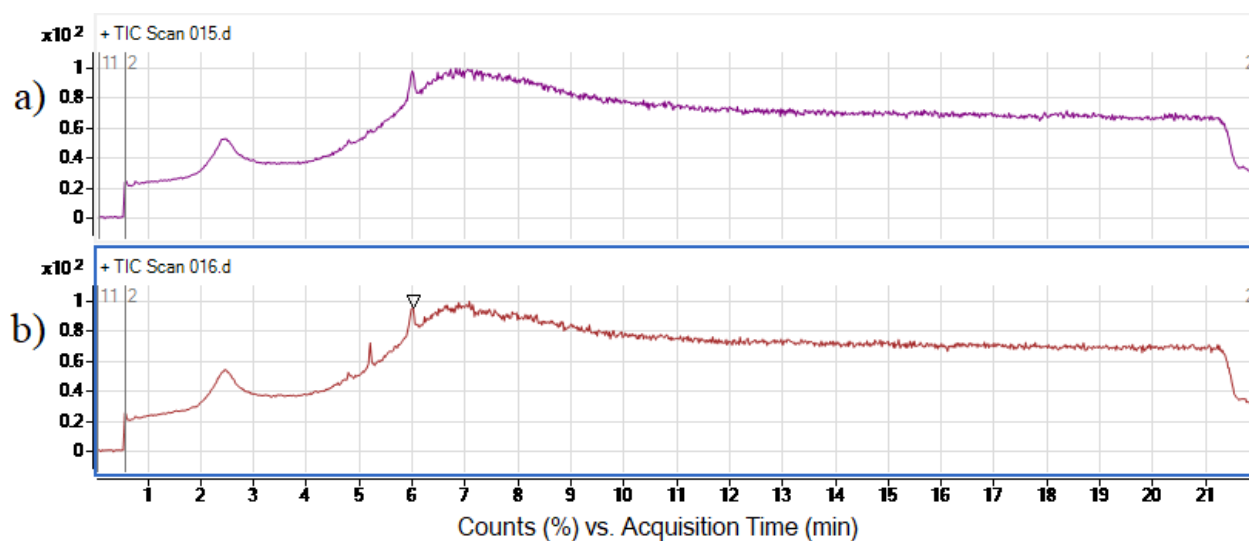
Slika D7. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i SBE- β -CD pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:SBE- β -CD 1:1 (kromatogram a) te smjese otopina PZQ i SBE- β -CD pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:SBE- β -CD 1:5 (kromatogram b).



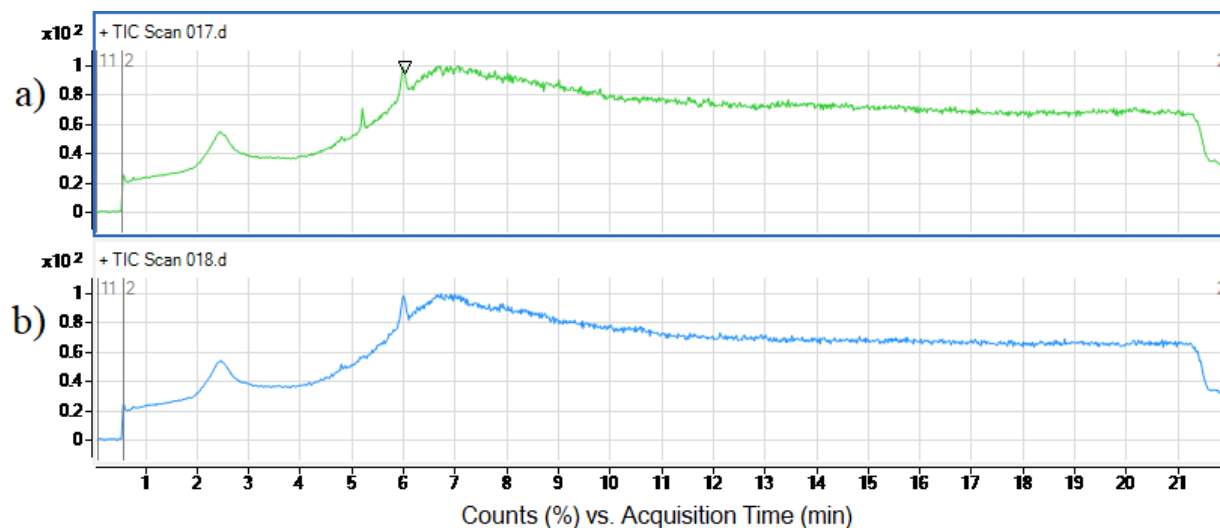
Slika D8. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ: β -CD 1:5 (kromatogram a, snimljen odmah nakon priprave), te smjese otopina PZQ i hidroksipropil- β -ciklodekstrina pripravljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:HP- β -CD 1:5 (kromatogram b, snimljen 72h nakon priprave).



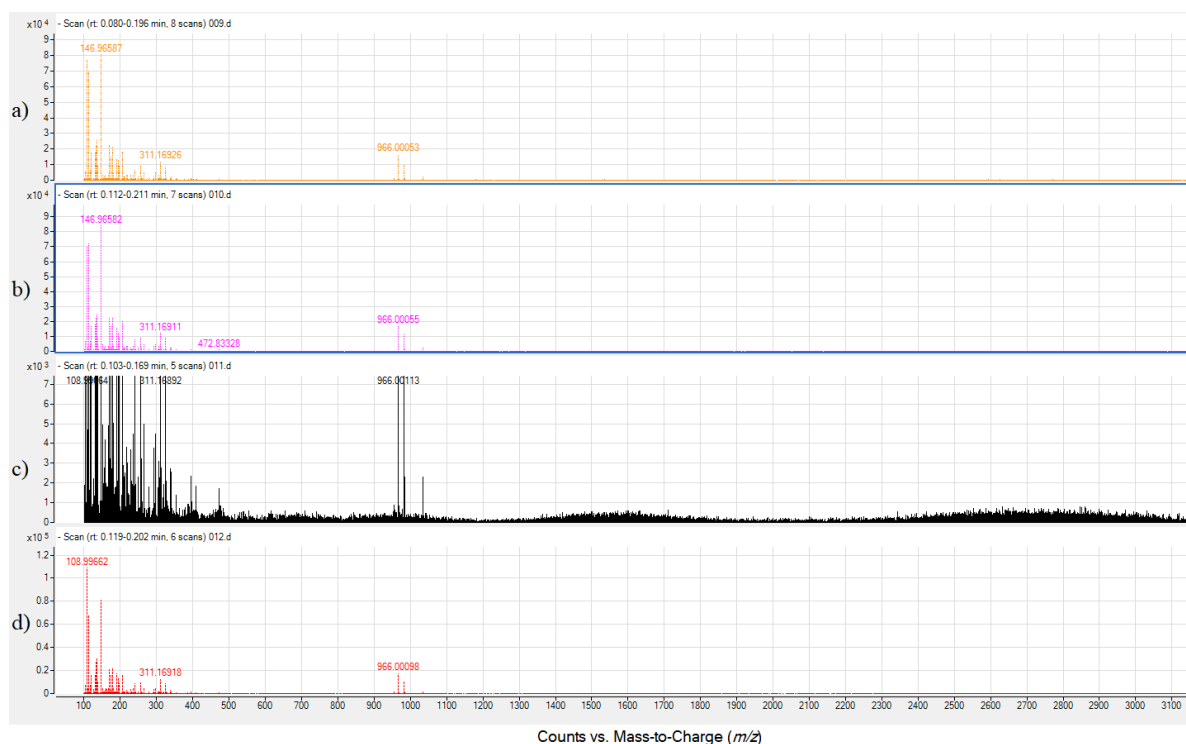
Slika D9. TIC kromatogrami smjesa otopina prazikvantela i hidroksipropil- β -ciklodekstrina pripremljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:HP- β -CD 1:5 (kromatogram a), te 1:10 (kromatogram b).



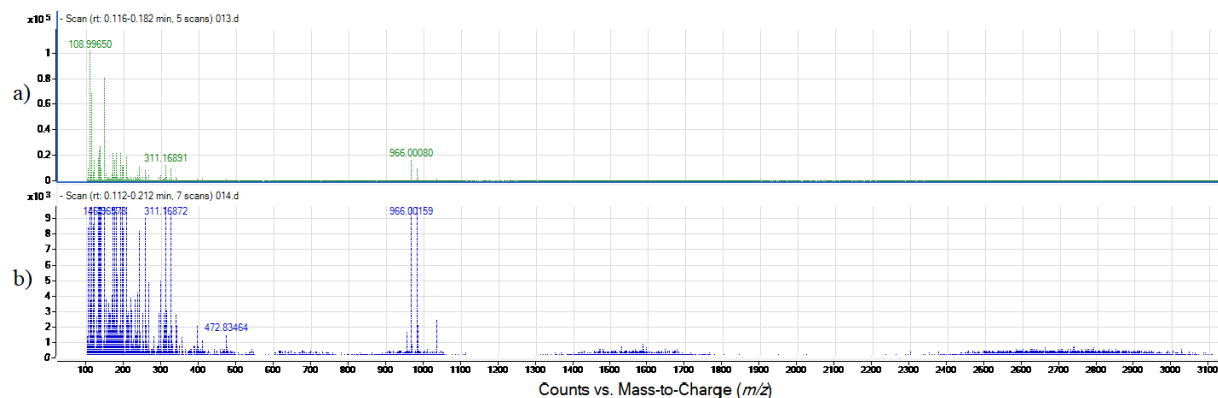
Slika D10. TIC kromatogrami smjese otopina prazikvantela i sulfobutileter- β -ciklodekstrina pripremljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ:SBE- β -CD 1:5 (kromatogram a, snimljen 72h nakon priprave), te smjese otopina PZQ i β -ciklodekstrina pripremljene miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ: β -CD 1:10 (kromatogram b, snimljen odmah nakon priprave).



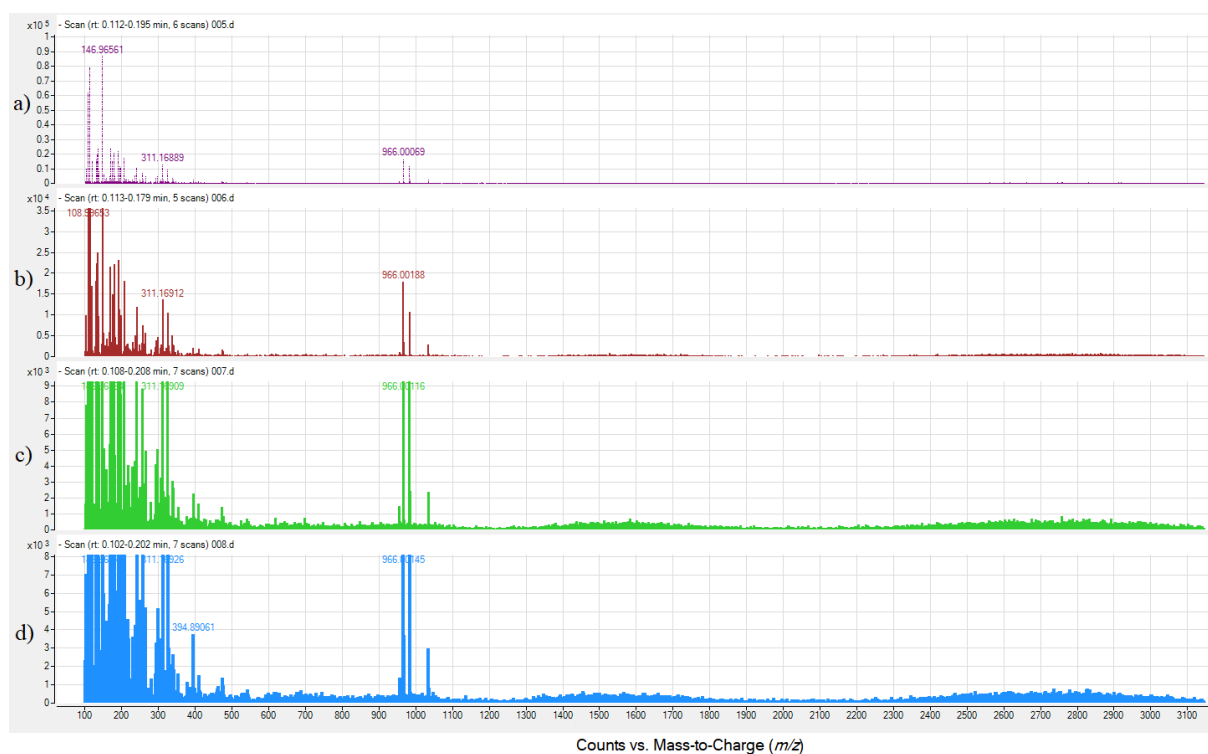
Slika D11. TIC kromatogrami smjesa otopina prazikvantela i β -ciklodekstrina pripremljenih miješanjem otopina u molarnom omjeru PZQ: β -CD 1:5 (kromatogram a), te 1:10 (kromatogram b).



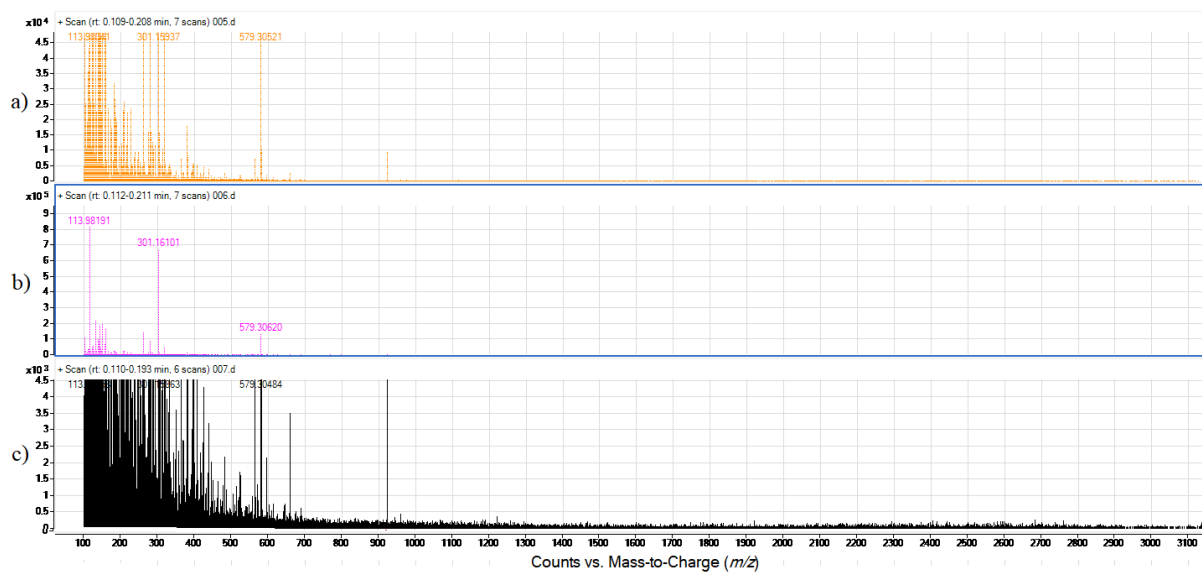
Slika D12. Spektri masa otopina ciklodekstrina s dodatkom Na^+ iona; otopina β -CD: Na^+ u molarnom omjeru 1:10 (spektar a), otopina β -CD: Na^+ u omjeru 1:2 (spektar b), otopina SBE- β -CD/ Na^+ u omjeru 1:10 (spektar c) i otopina SBE- β -CD/ Na^+ u omjeru 1:2 (spektar d) snimljeni u negativnom načinu rada.



Slika D13 . Spektri masa otopina hidroksipropil-ciklodekstrina s dodatkom Na^+ u molarnom omjeru: HP- β -CD: Na^+ 1:10 (spektara) i HP- β -CD: Na^+ 1:2 (b) snimljeni u negativnom načinu rada.



Slika D14 . Spektri masa otopina pripravljenih otapanjem prethodno izoliranih kompleksa: PZQ- β -CD (a), PZQ-HP- β -CD (b), PZQ-SBE- β -CD (c) i PZQ-RM- β -CD (d) snimljeni u negativnom načinu rada.



Slika D15. Spektri masa otopina pripremljenih otapanjem prethodno izoliranih kompleksa: PZQ- β -CD (a), PZQ-HP- β -CD (b), PZQ-SBE- β -CD (c) i PZQ-RM- β -CD (d) snimljeni u pozitivnom naćinu rada.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Hana Rimanić

Datum rođenja: 07. veljače 1992.

Mjesto rođenja: Zadar, Hrvatska

Obrazovanje

2017. – 2020. Sveučilišni diplomski studij kemije, smjer istraživački; grane: Biokemija i Analitička kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2010. – 2017. Sveučilišni preddiplomski studij molekularne biologije. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2006. – 2010. Gimnazija Juraj Baraković, Zadar

1998. – 2006. Osnovna škola Kruno Krstić, Zadar

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. F. Grgić, H. Rimanić, M. Pocrnić, D. Kontrec, A. Budimir, N. Galić, *Kompleksiranja lantanoida aroilhidrazonima izvedenim iz nikotinhidrazida: spektrofotometrijsko određivanje*, Knjiga sažetaka XXVI hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera / Nives Galić, Marko Rogošić, (ur.), Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2019. str. 80-80

