

Prisilna razgradnja inkluzijskog kompleksa nabumetona i β -ciklodekstrina

Sakoman, Franjo

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:250632>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Franjo Sakoman

Prisilna razgradnja inkluzijskog kompleksa nabumetona i β -ciklodekstrina

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc.
Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Davida Klarića, mag. chem.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Nives Galić na zanimljivoj temi diplomskog, strpljenju, savjetima i pristupačnosti tijekom izrade diplomskog rada.

Puno hvala neposrednom voditelju Davidu Klariću, mag. chem., na iznimnoj pomoći tijekom cijele izrade rada. Hvala na svim savjetima, uputama, brzim odgovorima, trudu, strpljenju i ugodnoj radnoj atmosferi. Hvala na svemu.

Hvala mojoj obitelji na konstantnoj podršci i motivaciji tijekom obrazovanja. Ne bih bio tu bez vas. Hvala vam na svemu, volim vas.

Posebno hvala bratu Filipu, sestri Ani, Boniju, Lari, Josipu i Nikoli. Hvala vam što ste uvijek uz mene i na svim savjetima (koje nisam nažalost odmah poslušao). Hvala na svim druženjima, razgovorima, strpljenju, razumijevanju, podršci i uspomenama bez kojih nikako ne bih mogao.

Hvala mojim Vantačićanima na prekrasnim i nezaboravnim ljetima. Hvala vam na svim druženjima, dubokoumnim (a i maloumnim) razgovorima i smijehu. Hvala vam na prijateljstvu od malih nogu na malom molu i svim odlascima u Belec i Kings! Nadam se da ćemo još mnogo puta skupa ljetovati i putovati.

Hvala svim kolegama koji su mi pomogli tijekom studiranja. Posebno hvala Toniju, Franku, Matei, Miji, Marku, Filipu, Saranyarat, Igoru, Ivanu, Bojanu, Tei i Moniki. Učinili se mi studiranje jednim nezaboravnim iskustvom i hvala vam puno što smo se upoznali. Hvala vam na konstantnoj motivaciji, lijepim druženjima i neopisivoj pomoći. Hvala vam na prenesenom znanju i svim savjetima (iz kemije i izvan nje).

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Nabumeton.....	2
2.1.1. <i>Biofarmaceutski sustav klasifikacije</i>	<i>5</i>
2.2. Ciklodekstrini	7
2.2.1. <i>β-ciklodekstrini i derivati</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Kompleksi ciklodekstrina i analitičke tehnike za njihovu karakterizaciju</i>	<i>9</i>
2.2.3. <i>Interakcije nabumetona i ciklodekstrina</i>	<i>11</i>
2.3. Mehanokemijska aktivacija	13
2.3.1. <i>Tehnika suhog mljevenja.....</i>	<i>14</i>
2.3.2. <i>Visokoenergijski vibracijski mlin i varijable mljevenja</i>	<i>16</i>
2.4. Studije prisilne razgradnje lijekova	17
2.4.1. <i>Hidrolitički uvjeti</i>	<i>19</i>
2.4.2. <i>Oksidativni uvjeti</i>	<i>19</i>
2.4.3. <i>Termička razgradnja.....</i>	<i>19</i>
2.4.4. <i>Fotolitička razgradnja</i>	<i>20</i>
2.4.5. <i>Metoda za praćenje stabilnosti</i>	<i>20</i>
2.4.6. <i>Studije prisilne razgradnje nabumetona</i>	<i>21</i>
2.5. Kromatografija.....	23
2.5.1. <i>Kromatografski parametri</i>	<i>24</i>
2.5.2. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti</i>	<i>26</i>
2.6. Spektrometrija masa.....	28
2.6.1. <i>Ionski izvori.....</i>	<i>29</i>
2.6.2. <i>Analizatori masa</i>	<i>31</i>
2.6.3. <i>Vezani sustav tekućinska kromatografija–tandemna spektrometrija masa (LC–MS/MS)</i>	<i>32</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Kemikalije i materijali.....	33
3.1.1. <i>Priprava otopina natrijevog hidroksida.....</i>	<i>33</i>
3.1.2. <i>Priprava otopina klorovodične kiseline</i>	<i>34</i>
3.1.3. <i>Priprava otopine vodikovog peroksida</i>	<i>34</i>

3.1.4. Priprava ishodnih otopina nabumetona i mljevenog uzroka nabumetona s β -CD	34
3.1.5. Priprava otopina za provođenje prisilne razgradnje.....	35
3.2. Instrumentacija	36
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	38
4.1. Analiza uzoraka nabumetona nakon prisilne razgradnje pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti.....	38
4.1.1. Utjecaj neutralnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona	38
4.1.2. Utjecaj kiselih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona.....	40
4.1.3. Utjecaj bazičnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona	42
4.1.4. Utjecaj oksidativnih uvjeta na razgradnju nabumetona	44
4.2. Analiza uzoraka nabumetona s β-CD nakon prisilne razgradnje pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti.....	46
4.2.1. Utjecaj neutralnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD.....	46
4.2.2. Utjecaj kiselih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD	47
4.2.3. Utjecaj bazičnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD	49
4.2.4. Utjecaj oksidativnih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD.....	51
4.3. Analiza spektrometrijom masa visokog razlučivanja.....	54
4.3.1. MS i MS/MS analiza nabumetona.....	54
4.3.2. MS i MS/MS analiza nabumetona nakon razgradnje pri kiselim hidrolitičkim uvjetima	59
4.3.3. MS i MS/MS analiza nabumetona nakon razgradnje pri bazičnim hidrolitičkim uvjetima	65
4.3.4. MS i MS/MS analiza nabumetona uz prisutnost β -CD nakon razgradnje pri bazičnim hidrolitičkim uvjetima	72
4.3.5. MS i MS/MS analiza nabumetona uz prisutnost β -CD nakon razgradnje pri oksidativnim uvjetima.....	81
4.3.6. Okarakterizirani razgradni produkti nabumetona, bez i uz prisutnost β -CD.....	97
§ 5. ZAKLJUČAK	98
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	99
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	102
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRISILNA RAZGRADNJA INKLUZIJSKOG KOMPLEKSA NABUMETONA I β -CIKLODEKSTRINA

Franjo Sakoman

Nesteroidni protuupalni predlijek nabumeton se u jetri metabolizira u svoj farmakološki akivan oblik, 6-metoksi-2-naftiloctenu kiselinu, koja djeluje kao selektivan inhibitor izoenzima ciklooksigenaza-2. Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari, nabumeton pripada drugoj skupini koju karakteriziraju slaba topljivost i visoka permeabilnost. Njegova se topljivost može poboljšati nastajanjem inkluzijskog kompleksa s cikličkim oligosaharidima, ciklodekstrinima. Provođenjem studija prisilne razgradnje dobivaju se informacije o stabilnosti lijeka i njegovim razgradnim produktima koji utječu na njegovu učinkovitost i sigurnost. U sklopu ovog diplomskog rada korišten je spregnuti sustav tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa visokog razlučivanja za analizu razgradnih produkata nabumetona nastalih u kiselom, lužnatom, i oksidirajućem mediju, pri sobnoj ili povišenoj temperaturi, uz ili bez prisutnosti β -ciklodekstrina. Strukture i sheme fragmentiranja razgradnih produkata nabumetona pretpostavljene su na temelju rezultata analize tandemnom spektrometrijom masa.

(103 + XXVIII stranica, 74 slika, 41 tablica, 43 literaturnih 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 -ciklodekstrin, inkluzijski kompleks, nabumeton, prisilna razgradnja

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić
Neposredni voditelj: David Klarić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
 2. prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. doc. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivan Nemet

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

FORCED DEGRADATION STUDY OF NABUMETONE - β -CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX

Franjo Sakoman

Nonsteroidal anti-inflammatory prodrug nabumetone is metabolized in the liver into its pharmacologically active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, which acts as a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. According to the Biopharmaceutical Classification System of drug substances, nabumetone is classified in the second group which is characterized by low solubility and high permeability. Its solubility can be increased by the formation of inclusion complexes with cyclic oligosaccharides cyclodextrins. Forced degradation studies provide information about drug stability and its degradation products which affect its effectiveness and safety. In this work, ultra performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry was used for the analysis of nabumetone degradation products formed in acidic, alkaline, and oxidizing media, at room or elevated temperature, with or without the presence of β -cyclodextrin. Structures and fragmentation schemes of nabumetone degradants were proposed according to the results of tandem mass spectrometry analysis.

(103 + XXVIII pages, 74 figures, 41 tables, 43 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 -cyclodextrin, forced degradation, inclusion complex, nabumetone

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor

Assistant mentor: David Klarić, MChem

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Ivan Nemet, Assistant Professor

Date of exam: 21 February 2023

Franjo Sakoman

Diplomski rad

§ 1. UVOD

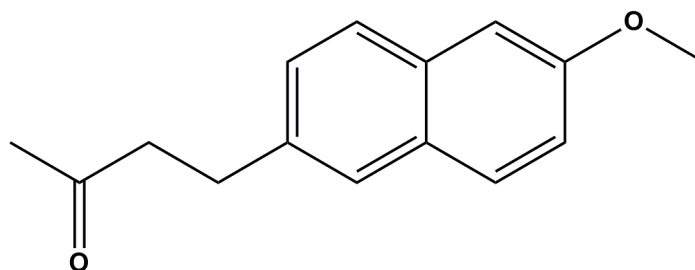
Nabumeton je nesteroidni protuupalni predlijek koji u svom nativnom obliku posjeduje slabu farmakološku aktivnost, no metabolizmom u jetri nastaje njegov farmakološki aktivan oblik, 6-metoksi-2-naftiloctena kiselina, koja djeluje kao mnogo snažniji inhibitor enzima ciklooksigenaza. Nabumeton se uglavnom koristi prilikom liječenja pacijenata oboljelih od osteoartritisa i reumatoidnog artritisa, u svrhu ublažavanja upalnih procesa, te kod akutnih ozljeda mekog tkiva. Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari može se svrstati u drugu skupinu koju karakteriziraju djelatne tvari slabe topljivosti i visoke permeabilnosti, a njegova se topljivost može poboljšati nastajanjem inkluzijskog kompleksa s cikličkim oligosaharidima ciklodekstrinima. Nastajanjem inkluzijskog kompleksa molekula gosta (lijek) ulazi u hidrofobnu središnju šupljinu ciklodekstrina pri čemu dolazi do poboljšanja topljivosti te posljedično i bioraspoloživosti slabo topljivog lijeka. Ciklodekstrini u inkluzijskom kompleksu s lijekovima mogu pozitivno ili negativno utjecati na njihovu kemijsku i fizikalnu stabilnost. Stabilnost djelatnih tvari i njihovih farmaceutskih formulacija je od iznimne važnosti jer ona utječe na sigurnost, kvalitetu i učinkovitost lijekova. U svrhu procjene stabilnosti provode se studije prisilne razgradnje lijekova za određivanje razgradnih produkata i onečišćenja prisutnih u djelatnoj tvari ili farmaceutskoj formulaciji.

Cilj rada je ispitati stabilnost nabumetona te utjecaj prisutnosti β -ciklodekstrina na njegovu stabilnost. Uzorci nabumetona s β -ciklodekstrinom koji su pripremljeni u visokoenergijskom vibracijskom mlinu tehnikom suhog mljevenja, kao i uzorci čistog nabumetona, podvrgnuti su hidrolitičkim stresnim uvjetima (u kiselom, neutralnom i lužnatom mediju) te oksidativnim stresnim uvjetima pri sobnoj i povišenoj temperaturi u različitim vremenskim periodima. Postotak razgradnje nabumetona određen je tekućinskom kromatografijom uz detektor s diodnim nizom. Na temelju rezultata analize spregnutim sustavom tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti – spektrometrija masa visokog razlučivanja te eksperimentima tandemne spektrometrije masa (na odabranim ionima) pretpostavljene su strukture i sheme fragmentiranja nastalih razgradnih produkata nabumetona.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nabumeton

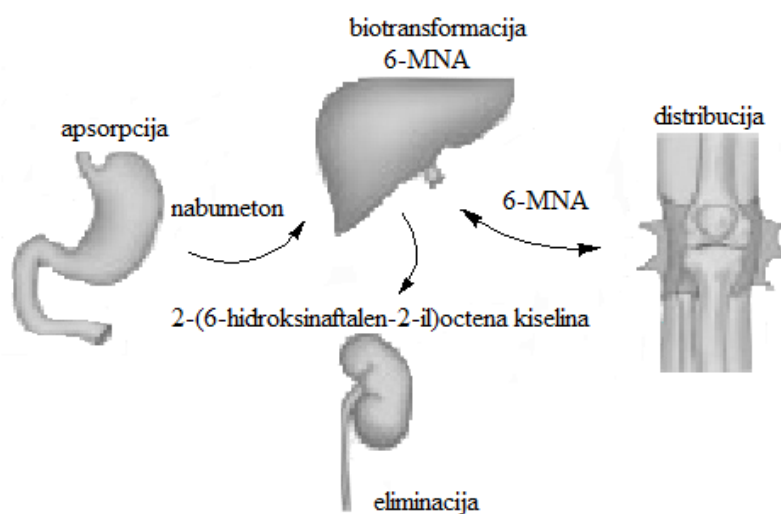
Nabumeton (NAB) je predlijek koji pripada skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs).¹⁻⁴ NSAIDs se općenito koriste za liječenje bolova, upala i povišene tjelesne temperature te imaju slična osnovna farmakološka svojstva, sličan osnovni mehanizam djelovanja i slične nuspojave. Molekulska formula nabumetona je $C_{15}H_{16}O_2$, a molarna masa iznosi 228,29 Da. Prema pravilima za nomenklaturu organske kemije koja propisuje Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) nabumeton nosi naziv 4-(6-metoksinaftalen-2-il)butan-2-on. Njegova strukturna formula prikazana je na slici 1.



Slika 1. Strukturna formula 4-(6-metoksinaftalen-2-il)butan-2-on

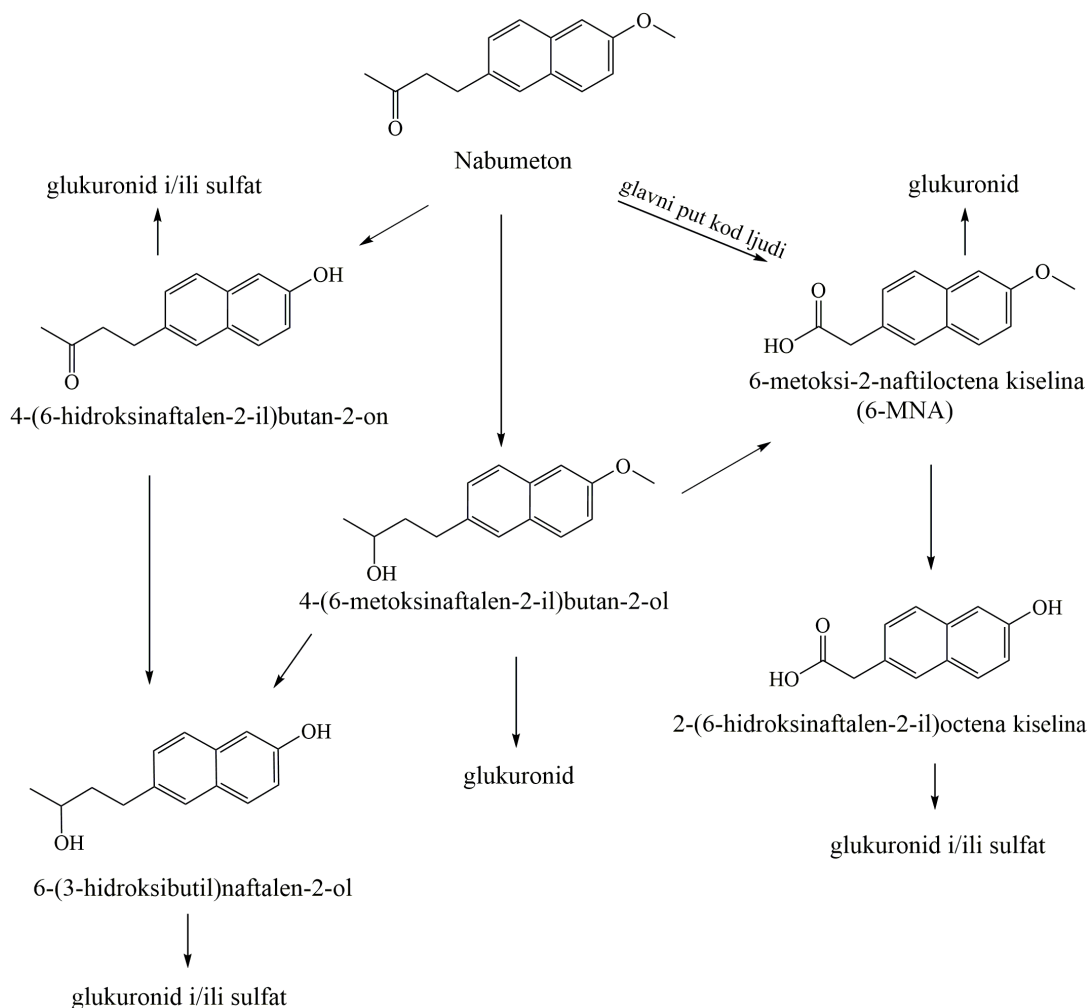
Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS), nabumeton se može svrstati u drugu skupinu⁴ koju karakteriziraju djelatne tvari slabe topljivosti i visoke permeabilnosti kroz membrane probavnog sustava. Ovaj se predlijek pri oralnoj administraciji lako apsorbira iz probavnog trakta te prolazi kroz opsežan metabolizam, odnosno eliminaciju prvog prolaska (slika 2) pri čemu nastaje niz različitih metabolita.¹

Osnovni metabolički putevi nabumetona su *O*-demetilacija, redukcija ketona do alkohola te oksidativno cijepanje bočnog lanca, čime dolazi do nastajanja derivata octene kiseline.¹



Slika 2. Metabolički put nabumetona nakon oralne administracije¹

Sam nabumeton kao predlijek posjeduje vrlo slabu farmakološku aktivnost, dok njegov glavni farmakološki aktivan oblik, 6-metoksi-2-naftiloctena kiselina (6-MNA) je, za razliku od nabumetona, mnogo snažniji inhibitor enzima ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*, COX). Nabumeton se u 6-MNA u sklopu eliminacije prvog prolaska metabolizira u jetri oksidativnim cijepanjem pokrajnjeg lanca. Prema nekim istraživanjima ovaj metabolit nabumetona preferentno inhibira COX-2 izoformu enzima, dok prema nekim drugim istraživanjima 6-MNA pokazuje podjednaku inhibitornu aktivnost prema obje izoforme, COX-1 i COX-2. Inhibicijom ove dvije izoforme enzima 6-MNA učinkovito sprječava sintezu prostaglandina i tromboksana smanjenjem količine njihovih prekursora (prostaglandina H₂ i tromboksana A₂), čime dolazi do terapijskog učinka, odnosno sprječavanja upala, boli i agregacije trombocita.^{1,5}

Slika 3. Metabolički putevi nabumetona¹

Nabumeton se uglavnom koristi prilikom liječenja pacijenata oboljelih od osteoartritisa (OA) ili reumatoidnog artritisa (RA) u svrhu smanjenja boli i upala te kod akutnih ozljeda mekog tkiva. Optimalna doza prilikom oralne primjene predliječka kod pacijenata oboljelih od OA iznosi 1 do 2 g dnevno, a učinkovitost ovakve terapije je slična u usporedbi s uobičajenim NSAID djelatnim tvarima koje djeluju kao COX inhibitori. Kod pacijenata koji boluju od RA preporučene doze su slične kao u prethodnom slučaju, a utvrđeno je da nabumeton izaziva jednake ili manje nuspojave u usporedbi s ostalim uobičajenim COX inhibitorima. Koncentracija nabumetona u njegovom nativnom obliku u krvnoj plazmi nakon oralne primjene je ispod granice detekcije, a koncentracija njegovog aktivnog metabolita, 6-MNA u sinovijalnoj tekućini kreće se između 10 i 16 mg dm⁻³ nakon 4 do 12 sati od prve primjene lijeka. Nabumeton se uglavnom izlučuje urinom, ali ne u svom nativnom obliku nego u obliku svojih metabolita. Svega <1 % primijenjene doze nabumetona se urinom izlučuje u obliku 6-MNA

metabolita. Velik dio nabumetona (oko 45 %) se urinom izlučuje u obliku nekih njegovih manjih, neaktivnih metabolita koji nastaju daljnjim metaboličkim putevima. Ukupno se 80 % primijenjene doze nabumetona izlučuje putem urina, a oko 10 % putem izmeta.^{1,2,6}

Najčešće nuspojave su slične onima koje izazivaju ostali COX inhibitori, a uključuju dijareju, glavobolju, mučninu, dispepsiju i bolove u trbuhu. Također, slično kao i ostali COX inhibitori, nabumeton može nepovoljno utjecati na sluznicu probavnog trakta zbog mogućnosti nastajanja gastrointestinalnih perforacija, ulceracija, iritacija i krvarenja. Ipak, u usporedbi s neselektivnim COX inhibitorima nabumeton i 6-MNA pokazuju povoljniji utjecaj na sluznicu probavnog trakta, a moguć uzrok tomu je nekisela priroda ovog predliješka, nedostatak enterohepatičke cirkulacije te moguća preferentna inhibicija COX-2 izoforme. U usporedbi s COX-2 selektivnim inhibitorima nabumeton pokazuje slična protuupalna i analgetska svojstva bez dodatnih gastrointestinalnih komplikacija.¹

Nabumeton je razvila farmaceutska tvrtka SmithKline Beecham pod komercijalnim nazivom *Relafen*, a odobrenje za njegovo korištenje je Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *United States Food And Drug Administration*, USFDA) po prvi put izdala u prosincu 1991. godine.⁶

2.1.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije

Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari ima široku primjenu u otkrivanju, razvoju i regulaciji lijekova. Prema njemu se djelatne tvari dijele na četiri skupine koje se međusobno razlikuju prema fizikalno-kemijskim svojstvima, odnosno prema topljivosti u vodi i intestinalnoj permeabilnosti što se povezuje s otapanjem i bioraspoloživosti ljekovitih proizvoda (tablica 1).⁷⁻⁹ BCS danas odobravaju bitna regulatorna tijela poput Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMEA), Američke agencije za hranu i lijekove te Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), a uklopljen je u pravilnike te popise za odobravanje izuzimanja obveze od provođenja *in vivo* ispitivanja bioekvivalencije (engl. *biowaiver*) poput primjerice *ICH M9 on BCS biowaivers* ili pak *WHO Biowaiver list*. Zadaća ovog sustava kategorizacije djelatnih tvari je unaprjeđenje učinkovitosti razvoja djelatnih tvari te farmaceutskih formulacija kao i pomoć u predviđanju *in vivo* farmakokinetičkih svojstava djelatnih tvari na temelju određivanja *in vitro* parametara topljivosti i intestinalne permeabilnosti.¹⁰ Glavna zadaća BCS sustava klasifikacije je unaprjeđenje razvoja lijekova te lakše rješavanje izazova i poteškoća prilikom razvoja novih

farmaceutskih formulacija, pogotovo za lijekove s oralnom primjenom, jer topljivost i intestinalna propusnost određuju brzinu i opseg oralne apsorpcije iz krutih oblika doziranja takvih lijekova.

Tablica 1. Podjela djelatnih tvari po skupinama prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije

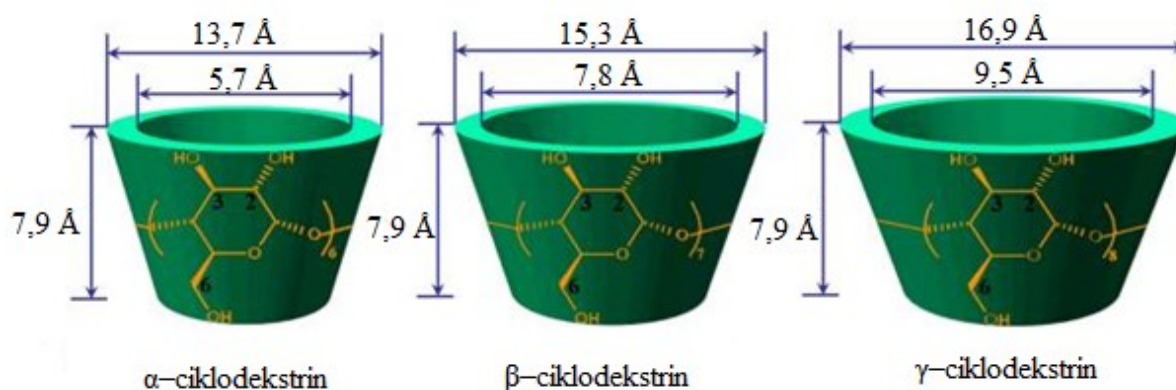
Skupina I visoka topljivost visoka permeabilnost	Skupina II slaba topljivost visoka permeabilnost
Skupina III visoka topljivost slaba permeabilnost	Skupina IV slaba topljivost slaba permeabilnost

Kriterij topljivosti lijeka, određen prema USFDA regulativi, u biofarmaceutskom sustavu klasifikacije temelji se na najvećoj dozi oralno primijenjenog lijeka s trenutnim oslobađanjem. Lijek se smatra dobro topljivim kada je najveća doza tog lijeka topljiva u 250 mL ili manje vodenog medija unutar raspona pH vrijednosti od 1,0 do 7,5, a u protivnom se smatra slabo topljivim. Klasifikacija propusnosti temelji se izravno na stupnju intestinalne apsorpcije lijeka kod ljudi ili neizravno na mjerenjima brzine prijenosa kroz crijevnu membranu. Lijek se smatra visoko propusnim ukoliko se utvrdi opseg intestinalne apsorpcije $\geq 90\%$ primijenjene doze ili u usporedbi s intravenskom referentnom dozom.^{8,10}

Lijekovi koji pripadaju BCS skupini I imaju idealna fizikalno-kemijska svojstva za apsorpciju lijeka iz gastrointestinalnog trakta. Bioraspoloživost BCS lijekova II skupine je ograničena brzinom otapanja, ali su zbog svoje visoke propusnosti u pozornosti istraživanja povećanja topljivosti koja se bave razvojem prikladnih formulacija za ovu skupinu lijekova.^{8,10} Jedna od strategija koja se može koristiti za povećanje bioraspoloživosti slabo topljivih lijekova jest njihovo kompleksiranje ciklodekstrinima.¹¹ Ciklodekstrini omogućavaju povećanje topljivosti u vodi i biorelevantnim medijima, a posljedično i bioraspoloživost lijekova koji pripadaju II i IV BCS skupini. S druge strane, za hidrofilne lijekove koji bivaju slabo apsorbirani iz gastrointestinalnog trakta (BCS skupine III) kompleksiranje ciklodekstrinima ima zanemariv učinak na povećanje bioraspoloživosti, dok za hidrofilne lijekove koji se dobro apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta (BCS skupine I) ciklodekstrini mogu ometati njihovu gastrointestinalnu apsorpciju.⁷

2.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi građeni od glukopiranoznih jedinica međusobno povezanih α -1,4-glikozidnom vezom. Prirodni, a ujedno i najizučavaniji su oni sa šest (α -CD), sedam (β -CD) i osam (γ -CD) glukopiranoznih jedinica (slika 4.). Ciklodekstrine s manje od šest glukopiranoznih jedinica nije moguće sintetizirati zbog prevelikih steričkih smetnji.^{11,12}



Slika 4. Strukture i dimenzije α , β i γ -ciklodekstrina¹³

Struktura ciklodekstrina podsjeća na krnji stožac sa središnjom šupljinom, pri čemu se primarne i sekundarne hidroksilne skupine orijentiraju na suprotnim obodima molekule. Primarne hidroksilne skupine se nalaze na užem, dok se sekundarne hidroksilne skupine nalaze na širem obodu molekule. Zahvaljujući svojoj karakterističnoj strukturi, ciklodekstrini posjeduju hidrofilan (vanjski dio molekule) te hidrofoban tj. lipofilan karakter (središnja šupljina).^{7,11,12}

Hidrofobni karakter središnje šupljine, zbog eterskih kisika i atoma ugljika, omogućuje tvorbu inkluzijskih kompleksa sa širokim rasponom hidrofobnih molekula. Da bi došlo do nastajanja inkluzijskog kompleksa, u središnju se šupljinu ciklodekstrina uklapa molekula gosta svojom cijelom strukturom ili samo jednim dijelom svoje strukture, odnosno jedna ili dvije molekule gosta mogu graditi kompleks s jednom, dvjema ili većim brojem molekula ciklodekstrina. Pri nastajanju inkluzijskih kompleksa ne dolazi do cijepanja ili formiranja novih kovalentnih veza već se radi o dinamičkoj ravnoteži slobodnih i vezanih molekula gosta.⁷ Pokretačka sila potrebna za nastanak takvih inkluzijskih kompleksa posljedica je različitih fenomena poput: otpuštanja entalpijom bogatih molekula vode iz središnje šupljine CD, van der Waalsovih interakcija, vodikovih veza, smanjenja napetosti ciklodekstrinskog prstena itd.^{11,12} Uklapanje molekule gosta u središnju šupljinu ciklodekstrina je reverzibilan proces koji

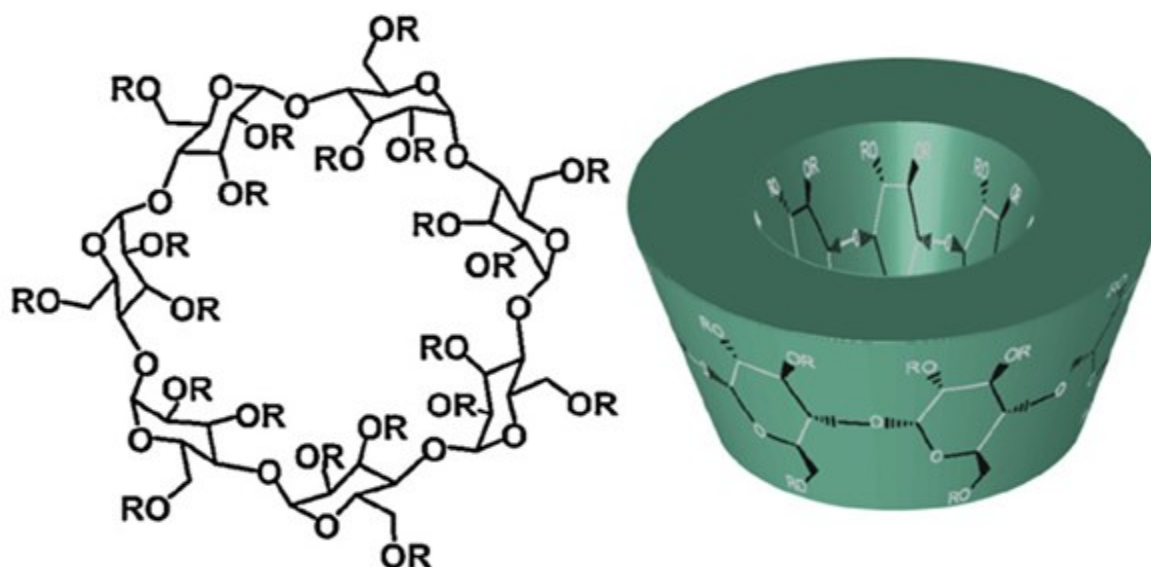
može dovesti do povoljnih fizikalno-kemijskih modifikacija koje inače nisu ostvarive, primjerice, promjena kemijske reaktivnosti, povećanje topljivosti slabo topljivih molekula ili kontrolirano i ciljano otpuštanje lijekova.¹²⁻¹⁴ Zbog reverzibilnosti procesa u otopini dolazi do brze i stalne izmjene između vezanog i nevezanog stanja^{7,12}, a molekule lijeka se brzo oslobađaju iz kompleksa uslijed razrjeđivanja medija ili zbog kompetitivnih reakcija drugih molekula koje se također uklapaju u središnju šupljinu CD (npr. žučne kiseline ili lipidi u gastrointestinalnom traktu).⁷ Ipak, kako bi molekula gosta i ciklodekstrin tvorili inkluzijski kompleks potrebna je povoljna sterička okolina, kao i povoljne termodinamičke interakcije.¹¹

U većini slučajeva dodatak ciklodekstrina kao pomoćne tvari formulacijama lijekova pozitivno utječe na kemijsku i fizikalnu stabilnost lijeka, čime se produljuje njegov vijek trajanja, ali u nekim slučajevima dolazi do smanjenja stabilnosti, odnosno do ubrzane razgradnje.¹⁴ Općenito, ciklodekstrini mogu poboljšati oralnu apsorpciju i bioraspoloživost lijekova koji pripadaju lijekovima skupine II (slaba topljivost, visoka permeabilnost) prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije.⁷ Ipak, učinak ciklodekstrina na stabilnost lijeka se treba ispitati i provjeriti u konačnoj formulaciji lijeka pod preporučenim uvjetima skladištenja.¹⁴

2.2.1. β -ciklodekstrini i derivati

Kao što je već ranije navedeno, β -ciklodekstrini se sastoje od sedam α -1,4 povezanih glukopiranoznih jedinica (slika 5.). Općenito su najpovoljniji i najkorišteniji, ali ih karakterizira slabija topljivost u vodenom mediju u usporedbi s α i γ -ciklodekstrinom zbog prisutnih sedam vodikovih veza koje nastaju između C_2 -OH i C_3 -OH susjedne glukopiranozne jedinice.¹² Broj glukopiranoznih jedinica određuje unutarnji promjer središnje šupljine i njezin volumen, a središnja šupljina β -ciklodekstrina je pogodna za kompleksiranje aromata i heterocikličkih spojeva. Fizikalno-kemijska i biološka svojstva ciklodekstrina su slična njihovim linearnim ekvivalentima, uz pojedine razlike. Linearni ekvivalent β -ciklodekstrina je maltoheptoza, čija je molekulska formula $C_{42}H_{72}O_{36}$. Zbog svoje cikličke strukture ciklodekstrini su manje osjetljivi na enzimsku razgradnju od linearnih dekstrina te su bolja sredstva za kompleksiranje.⁷ Prirodni ciklodekstrini imaju ograničenu topljivost u vodenom mediju što ograničava njihovu primjenu kao kompleksacijskih tvari, ali su podložni derivatizaciji korištenjem različitih reagenasa kako bi se dobili derivati poboljšane topljivosti.^{7,11,12} Sinteza derivata obuhvaća esterifikaciju, eterifikaciju ili aminaciju primarne ili sekundarne hidroksilne skupine,¹¹ a pri

sintezi jednakih derivata ciklodekstrina koji nisu smjesa različitih izomera potrebna je upotreba regioselektivnih reagenasa, optimizacija reakcijskih uvjeta i odjeljivanje produkata. Ovisno o skupini, derivati ciklodekstrina imaju različite volumene hidrofobne centralne šupljine, topljivost, stabilnost, enantioselektivnost i interakciju s molekulom gosta. Općenito se ciklodekstrini u farmaceutskoj industriji koriste zbog svojih prednosti poput definirane kemijske strukture, niske farmakološke aktivnosti te mogućnosti zaštite lijeka od biorazgradnje tvorbom inkluzijskog kompleksa, pri čemu najčešće dolazi do kompleksiranja jedne molekule lijeka s jednom molekulom ciklodekstrina. Zbog svoje vrlo niske biorasploživosti α -ciklodekstrini, β -ciklodekstrini, γ -ciklodekstrini te njihovi hidrofilni derivati su netoksični prilikom oralne primjene.^{11,12}



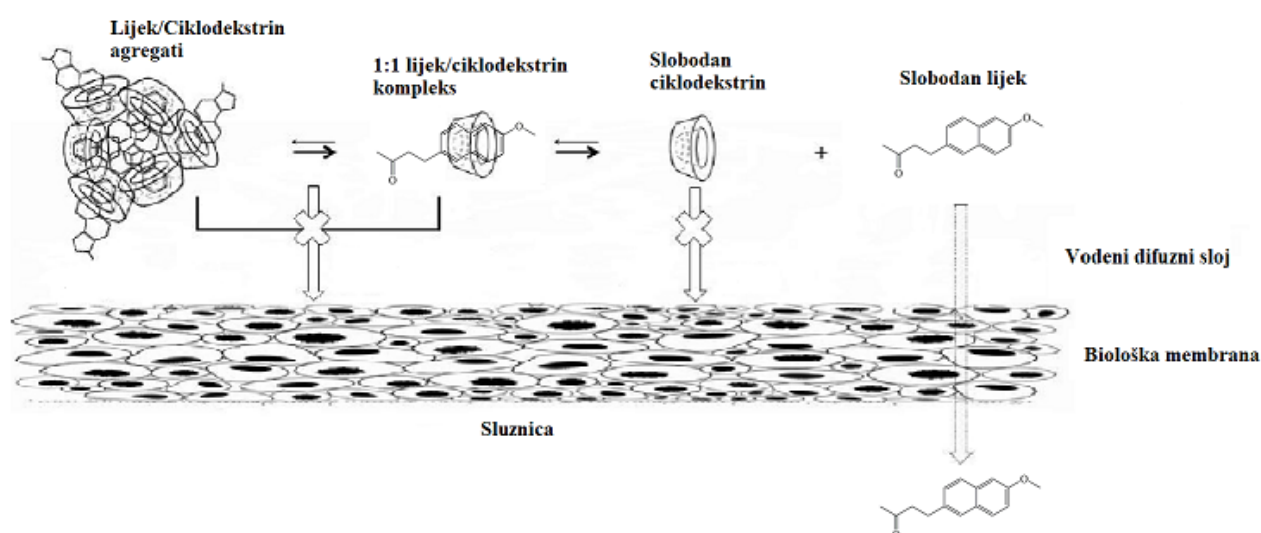
Slika 5. Molekulska i trodimenzijska struktura β -ciklodekstrina¹⁵

2.2.2. Kompleksi ciklodekstrina i analitičke tehnike za njihovu karakterizaciju

Kao što je već navedeno, ciklodekstrini mogu tvoriti inkluzijske komplekse s različitim molekulama u čvrstom, tekućem te plinovitom stanju. Središnja šupljina ciklodekstrina koja ima lipofilan karakter oblikuje mikrookoliš u koji se može uklopiti nepolarna molekula gosta svojom cijelom strukturom ili samo jednim njenim dijelom.¹¹ Učinkovitost kompleksiranja ciklodekstrinom se u nekim slučajevima može poboljšati poticanjem nastajanja ternarnih kompleksa, odnosno dodatkom treće komponente (npr. polimera, organske kiseline, metalnog iona ili lipida) inkluzijskom kompleksu. Ciklodekstrini i njihovi derivati mogu tvoriti agregate,

a takvo grupiranje se povećava s povećanjem koncentracije ciklodekstrina i može smanjiti njihovu interakciju s lijekovima. No, većina ciklodekstrinskih derivata ima smanjenu tendenciju stvaranja agregata u razrijeđenim vodenim otopinama, a općenito promjene u vrijednosti pH, povećana temperatura, mehaničke sile te dodatak kaotropnih reagenasa poput uree ili natrijeva klorida mogu uzrokovati smanjenje agregacije.^{7,16}

Ciklodekstrini i njihovi kompleksi ne prodiru kroz biološke membrane (kao što su sluznica ili koža) zbog svoje hidrofilne strukture i visoke molekulske mase, ali pospješuju prodiranje lijeka kroz biološke barijere koje se sastoje od vanjskog vodenog sloja (tj. difuzijskog sloja) i lipofilne membrane. Ciklodekstrini otapaju slabo topljive lijekove u vanjskom vodenom dijelu i isporučuju molekule lijeka do lipofilne membrane. Molekule lijekova se tada kroz membranu transportiraju pasivnom difuzijom, pri čemu je glavna pokretačka snaga koncentracijski gradijent lijeka (slika 6).⁷



Slika 6. Shematski prikaz prodiranja lijeka iz inkluzijskog kompleksa u vodenom sloju kroz membranu putem pasivne difuzije⁷

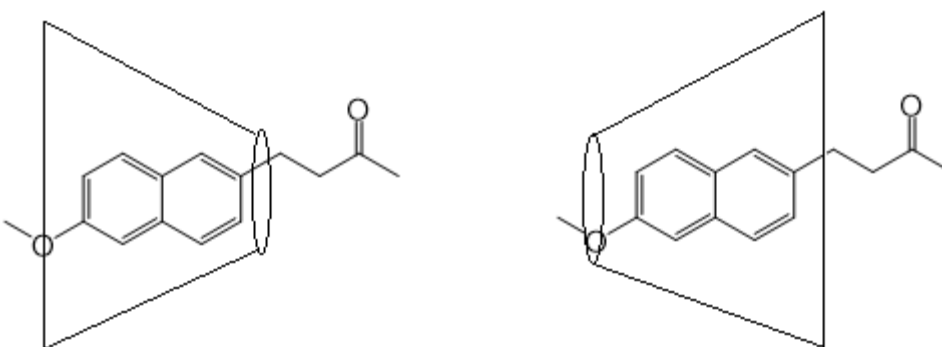
Osim što ciklodekstrini mogu poboljšati topljivost, stabilnost i bioraspoloživost lijekova u inkluzijskom kompleksu također mogu smanjiti ili spriječiti iritaciju te ostale nuspojave lijekova, spriječiti interakcije lijek-lijek i lijek-pomoćna tvar te povoljno mijenjaju organoleptička svojstva lijeka.¹⁶

Proučavanje fenomena kompleksacije ciklodekstrinima kao i cjelokupna karakterizacija njihovih kompleksa nije jednostavan zadatak. Uglavnom je potrebno upotrijebiti više različitih analitičkih tehnika te dobivene rezultate objediniti i zajednički interpretirati budući da svaka od tih tehnika izučava neko određeno svojstvo gosta ili kompleksa. Većina analitičkih tehnika za izučavanje takvih kompleksa bazira se na detekciji promjene nekog fizikalnog ili kemijskog svojstva molekule gosta uslijed kompleksiranja ciklodekstrinom. Kada govorimo o analitičkim tehnikama koje se koriste za izučavanje inkluzijskih ili nespecifičnih kompleksa CD u otopini najčešće se spominju spektroskopske tehnike poput: UV/Vis apsorpcijske spektroskopije, spektroskopije cirkularnog dikroizma, spektrofluorimetrije te spektroskopije nuklearne magnetne rezonancije.¹⁷ Ukoliko se govori o tehnikama koje se koriste za analizu takvih kompleksa u čvrstom stanju onda se najčešće spominju diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC), rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku (engl. *powder X-ray diffraction*, PXRD), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) i pretražna elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscopy*, SEM).¹⁸

2.2.3. Interakcije nabumetona i ciklodekstrina

Interakcije nabumetona s različitim prirodnim ciklodekstrinima i njihovim sintetskim derivatima već su ranije izučavane. Valero i sur.¹⁹ proučavali su kompleksaciju nabumetona s ciklodekstrinima UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom, spektrofluorimetrijom i spektroskopijom ¹H NMR, pri čemu su predložili različite zaključke za kompleksiranje NAB s α -CD u usporedbi s β -CD i njegovim hidroksipropiliranim derivatom (HP β CD). Nabumeton uz apsorpciju UV/Vis zračenja posjeduje sposobnost intrinzične fluorescencije. Dodatak gore navedenih CD u vodene otopine nabumetona rezultiralo je različitim efektom na njegove apsorpcijske i emisijske spektre, zbog promjene u solvataciji nabumetona uslijed kompleksiranja. Vrijednosti konstanti vezanja (K) za navedene sustave izračunate su na temelju rezultata spektrofluorimetrijskih titracija. Uslijed titriranja otopine NAB otopinom navedenih CD uočen je hiperkromni efekt u emisijskom spektru NAB zbog procesa inkluzije u hidrofobnu šupljinu CD. Stehiometrija inkluzijskih kompleksa za sve izučavane sustave bila je 1:1. Vrijednost konstante vezanja kompleksa NAB i β -CD te HP β CD je očekivano viša u odnosu na kompleks s α -CD, budući da β -CD posjeduje središnju šupljinu čije su dimenzije pogodnije za enkapsuliranje naftalenskog dijela molekule NAB. Analize spektroskopijom ¹H NMR

provedene su kako bi se dobila detaljnija saznanja o geometriji i orijentaciji lijeka u inkluzijskom kompleksu s ciklodekstrinima. Interpretacijom rezultata, odnosno na temelju kemijskih pomaka protona vezanog i nevezanog NAB-a predloženo je nastajanje kompleksa inkluzijom nabumetona kroz oba oboda β -CD, pri čemu se naftalenski dio molekule NAB nalazi unutar, dok se supstituenti u -2 (butan-2-on) ili -6 (metoksi) položaju na naftalenskom prstenu NAB-a nalaze izvan šupljine β -CD (slika 7). U slučaju kompleksiranja NAB s α -CD najveći kemijski pomaci utvrđeni su za metilenske protone butan-2-onske skupine.¹⁹



Slika 7. Dva moguća načina inkluzije molekule NAB-a u središnju šupljinu β -CD-a prema rezultatima analize spektroskopijom ^1H NMR

Goyenechea i sur.²⁰ su također proučavali interakcije nabumetona i prirodnog β -CD te njegovog nasumično metiliranog (RM β CD) i hidroksipropiliranog derivata spektrofluorimetrijom, pri čemu su utvrdili da se intenzitet emisije nabumetona povećava s povećanjem koncentracije β -CD uslijed nastajanja inkluzijskog kompleksa. Najveća vrijednost konstante vezanja izračunata je za kompleks NAB s RM β CD. Utvrđena stehiometrija kompleksa NAB i β -CD iznosila je 1:1 za sve komplekse, a konstante vezanja određene su pri nekoliko temperatura. Na temelju ovisnosti konstanti stabilnosti o temperaturi (prema Van't Hoff-ovoj jednadžbi) autori su odredili termodinamičke parametre, entalpiju (ΔH°) i entropiju (ΔS°). Negativne vrijednosti za promjenu reakcijske entalpije ukazuju na disociranje kompleksa nabumetona i β -CD s povećanjem temperature, a pozitivnu vrijednost promjene entropije autori povezuju s gubitkom strukturirane vode oko molekule gosta uslijed nastajanja inkluzijskog kompleksa. Rezultati molekulskog modeliranja potvrdili su mogućnost oba načina inkluzije molekule NAB u CD šupljinu iz prethodno spomenute publikacije Valera i sur. Al-Rawashdeh je spektrofluorimetrijski pratio interakcije NAB s α -CD, β -CD i γ -CD. Najveći afinitet vezanja

uočen je za γ -CD. Relativne vrijednosti entalpije za nastajanje inkluzijskog kompleksa rastle su u nizu: $\Delta H^\circ_{\text{NAB}:\beta\text{-CD}} < \Delta H^\circ_{\text{NAB}:\gamma\text{-CD}} < \Delta H^\circ_{\text{NAB}:\alpha\text{-CD}}$, dok je vrijednost entropije izračunata za nastajanje inkluzijskog kompleksa NAB: γ -CD veća u usporedbi s onom za NAB: β -CD.²¹

Occhiuzzi i sur.²² su proučavali fotostabilnost nabumetona u vodenoj otopini i inovativnoj gel formulaciji uz prisutnost odabranih β -CD, pri čemu su fotolitičku razgradnju pratili spektrofotometrijski. Navedene gel formulacije pružaju mogućnost razvoja novih farmaceutskih formulacija djelatnih tvari s topikalnom primjenom. Pri snazi zračenja od 350 W m⁻² i konstantnoj temperaturi od 25 °C, upotrijebljena doza nabumetona razgradila se za 10 % u samo 2,08 min u etanolu te za 4,27 min u gelu. Utvrđen je nastanak 6-metoksi-2-naftaldehida kao glavnog produkta fotolitičke razgradnje nabumetona, uz tragove 4-(6-metoksi-2-naftil)-3-buten-2-ona kao drugog produkta. Nije uočeno značajnije poboljšanje fotostabilnosti nabumetona uz prisutnost β -CD i njegovog metiliranog derivata. U prisutnosti HP β CD utvrđena je poboljšana stabilnost NAB u vodenoj otopini. Kompleks HP β CD i nabumetona emulgiran u gelu pokazao je smanjenje razgradnje nabumetona pri čemu se 10 % razgradnje postiglo nakon 50,25 min. Dodatna fotostabilnost postigla se dodatkom 2 % askorbinske kiseline kao antioksidansa u gel formulaciju s HP β CD pri čemu se 10 % razgradnje nabumetona postiglo tek nakon 90,09 min.²²

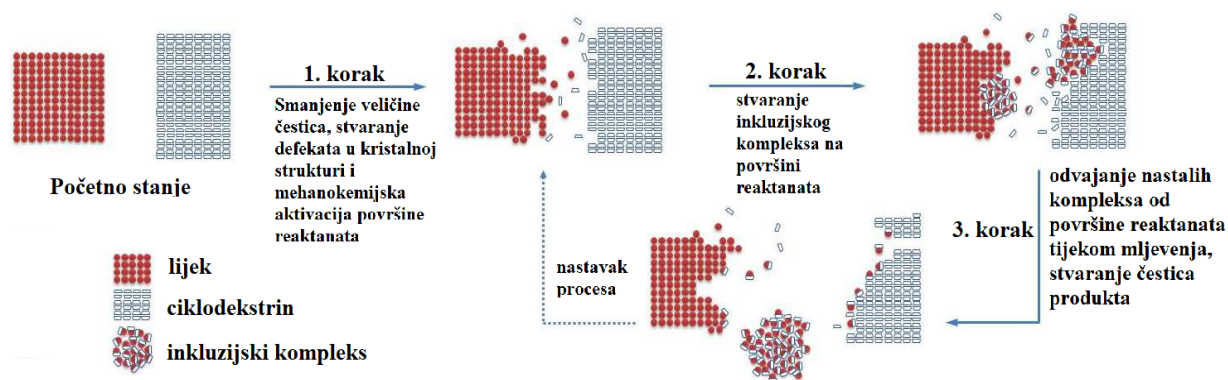
2.3. Mehanokemijska aktivacija

Izbor metode pripreme inkluzijskih kompleksa CD u čvrstom stanju važan je korak u razvoju farmaceutskih formulacija zato što im može odrediti ukupna svojstva i funkcionalnost. Učinkovito kompleksiranje lijeka s ciklodekstrinom omogućava brže otapanje i veće poboljšanje u bioraspoloživosti lijeka u usporedbi s potencijalnim formulacijama kod kojih je došlo do samo djelomičnog ili slabog kompleksiranja. Glavne metode za pripremu inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju mogu se podijeliti na metode u otopini, metode u polu-čvrstom stanju i metode u čvrstom stanju. Metode u otopini su one kod kojih su lijek i ciklodekstrin otopljeni u vodi ili smjesi organskog otapala i vode, gdje su temperatura i vrijednosti pH podešene tako da se dobije maksimalna interakcija komponenti. Glavni nedostaci ovakve metode su visoka potrošnja vremena, energije i organskih otapala (najčešće su to etanol i metanol) čije uklanjanje iz konačnog čvrstog produkta može biti zahtjevno, ali čija prisutnost može dovesti i do toksičnih učinaka. Metode u polu-čvrstom stanju su metode kod kojih se smjesa lijeka i ciklodekstrina najčešće gnječi uz mali volumen vode ili smjese vode

i etanola, a dobivena homogena smjesa se prevodi do praha koji se potom suši. Ovakve metode često rezultiraju djelomičnim kompleksiranjem lijeka i ciklodekstrina. Kod metoda u čvrstom stanju, priprava inkluzijskih kompleksa lijeka i ciklodekstrina može se postići pomoću mikrovalnog zračenja, blagim zagrijavanjem u zatvorenoj posudi na temperaturi ispod točke taljenja spojeva ili mehanokemijskom aktivacijom mljevenjem smjese lijeka i ciklodekstrina u različitim vrstama mlinova. Za razliku od mikrovalnog zračenja i zagrijavanja u zatvorenoj posudi, tokom kojih može doći do razgradnje lijeka, mljevenje je jednostavna, brza, ekološki prihvatljiva i učinkovita metoda priprave inkluzijskih kompleksa lijekova i ciklodekstrina u čvrstom stanju.¹⁶

2.3.1. Tehnika suhog mljevenja

Mehanokemija se bavi fizikalno-kemijskim pretvorbama i kemijskim reakcijama u krutom stanju koje su izazvane unosom mehaničke energije npr. ručnim mljevenjem pomoću tarionika i tučka ili mehaničkim mljevenjem pomoću kugličnih, oscilirajućih ili vibracijskih mlinova. Mljevenje se koristi kako bi se smanjila veličina čestica, a time poboljšala topljivost lijekova budući da je veličina čestica lijeka intrinzično povezana s njihovom topljivosti.^{8,16,23} Osim što se mljevenje koristi za smanjenje veličina čestica, proširilo je upotrebu na sintezu i proučavanje različitih supramolekulskih sustava, u razvoju farmaceutski važnih polimorfa, kokristala, inkluzijskih kompleksa itd. Točan mehanizam nastajanja inkluzijskog kompleksa tijekom mljevenja smjese lijeka i ciklodekstrina još uvijek nije dovoljno istražen, ali se može pretpostaviti na temelju općenitih procesa i mehanizama mehanokemijskih reakcija (slika 8).¹⁶ Termin "mehanokemijska aktivacija" obuhvaća proces amorfizacije, nastanak polimorfa i pojavu kemijskih reakcija.²³

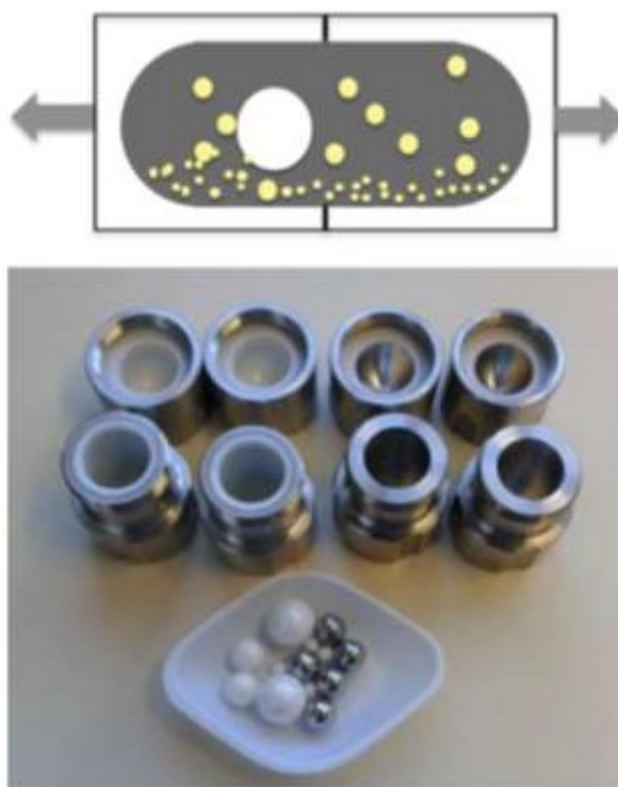


Slika 8. Shematski prikaz pretpostavljenih procesa tijekom nastajanja inkluzijskih kompleksa lijek:ciklodekstrin u čvrstom stanju procesom mljevenja¹⁶

Tehnika suhog mljevenja (engl. *neat grinding*) predstavlja način provođenja mehanokemijske aktivacije prilikom koje smjesa lijek:ciklodekstrin podvrgnuta mljevenju dobiva puls mehaničke energije svaki put kada bude zarobljena između sudarajućih kuglica za mljevenje ili između stijenke posudice mlina i kuglica za mljevenje. Ukoliko su ti udarci dovoljnog intenziteta, dolazi do kvaziadijabatske lokalne akumulacije energije te nastajanja metastabilne strukture, pri čemu se glavni dio energije koja je unesena u sustav oslobađa u obliku topline što potiče interakcije u čvrstom stanju između lijeka i ciklodekstrina. Naprezanja u određenim kristalnim zonama uzrokuju usitnjavanje kristala, što rezultira smanjenjem veličine čestica do nekog kritičnog praga, čime se posljedično povećava ukupna površina koja je dostupna za interakcije lijeka i ciklodekstrina. Dodatan unos mehaničke energije dovodi i do amorfizacije prisutnih kristalnih materijala u smjesi, počevši od tankog površinskog sloja pa sve do cjelokupnog uzorka što rezultira nastankom „aktiviranog“ materijala. Pretpostavlja se da se nastajanje inkluzijskog kompleksa odvija reakcijom aktiviranih materijala na površinama obiju komponenti. Nastavkom mljevenja dolazi do odvajanja nastalog inkluzijskog kompleksa od čestica lijeka i ciklodekstrina, čime se oslobađaju njihove površine za nastavak reakcije (slika 8, treći korak). Dodatan doprinos mljevenja interakciji lijeka i ciklodekstrina u čvrstom stanju je intenzivno miješanje te homogenizacija reaktanata. Mljevenje smjese lijeka i ciklodekstrina najčešće dovodi do nastajanja amorfnih produkata ili produkata koji sadrže samo tragove kristalnog lijeka, ovisno o vremenu i intenzitetu mljevenja te fizikalno-kemijskim svojstvima korištenog lijeka i ciklodekstrina.^{16,23}

2.3.2. Visokoenergijski vibracijski mlin i varijable mljevenja

Općenito se visokoenergijski vibracijski mlinovi sastoje od posude toroidalnog oblika ili metalnih diskova koji nose zasebne cilindrične posudice za mljevenje koje prilikom rada mlina podliježu radijalnim oscilacijama u vodoravnom položaju (slika 9).¹⁶



Slika 9. Shematski prikaz osciliranja visokoenergijskog vibracijskog mlina (gore) te posudica za mljevenje od ZrO_2 i nehrđajućeg čelika (10 mL) s pripadajućim kuglicama (dolje)¹⁶

Inercija kuglica za mljevenje uzrokuje njihovu neprestanu koliziju s uzorkom na zaobljenom dijelu krajeva posudica, a dodatan doprinos ukupnoj mehaničkoj energiji dolazi od sudara čestica smjese i klizanja kuglica što dovodi do usitnjavanja uzorka i mehanokemijske aktivacije. Vrijeme mljevenja koje je potrebno za postizanje potpune amorfizacije produkta i vjerojatnog nastajanja inkluzijskog kompleksa u čvrstom stanju općenito iznosi između 30 i 60 minuta, a ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima komponenti smjese kao i omjeru korištenih komponenti.¹⁶

Tijekom pripreve inkluzijskog kompleksa lijek:ciklodekstrin u čvrstom stanju pomoću mljevenja važno je imati na umu i kontrolirati parametre poput energije, volumena, temperature

i vremena mljevenja te stupnja punjenja posudica za mljevenje. Ipak, njihov utjecaj je u direktnoj vezi s vrstom odabranog uređaja za mljevenje, koji bitno određuje učinkovitost mljevenja i karakteristike konačnih produkata. U slučaju korištenja visokoenergijskih vibracijskih mlinova vrijeme i frekvencija mljevenja su parametri koji se najlakše kontroliraju (najčešće 15 – 25 Hz), dok je temperaturu mljevenja gotovo nemoguće kontrolirati budući da se reakcijske posudice zagrijavaju uslijed kolizija koje se događaju unutar njih prilikom mljevenja. Na temperaturu mljevenja također utječe stupanj punjenja posudica i njihova veličina, volumen kuglica za mljevenje, količina korištenog uzorka te upotrijebljena frekvencija osciliranja posudica. Veća frekvencija osciliranja posudica za mljevenje u konačnici uzrokuje veću brzinu kuglica, odnosno veći unos energije, koji se povećava i produljenjem vremena mljevenja. Ipak, prijenos energije do kojeg dolazi prilikom kolizija se izravno ne može kontrolirati, budući da ovisi o volumenu kuglica za mljevenje, stupnju punjenja posudica, materijalu od kojeg je pribor za mljevenje načinjen itd.¹⁶

2.4. Studije prisilne razgradnje lijekova

Kemijska stabilnost djelatnih tvari i njihovih farmaceutskih formulacija je od iznimne važnosti jer ona utječe na sigurnost i učinkovitost konačnog lijeka. Promjene u stabilnosti lijeka mogu ugroziti sigurnost pacijenata ukoliko dođe do nastanka toksičnih razgradnih produkata ili isporukom niže doze djelatne tvari od očekivane. Spoznaje o kemijskoj stabilnosti omogućavaju odabir odgovarajuće formulacije i pakiranja lijeka te osiguravanje odgovarajućih uvjeta skladištenja i roka trajanja.^{24,25} Podaci o stabilnosti ispitivanog lijeka se zahtijevaju od strane FDA i Međunarodnog vijeća za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za ljudsku primjenu (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), kako bi se uvidjela promjena kvalitete djelatnih tvari i njihovih dozirnih oblika ovisno o vremenu djelovanja različitih čimbenika iz okoline.²⁴

Prisilna razgradnja (engl. *forced degradation*) je proces koji podrazumijeva razgradnju (degradaciju) djelatne tvari ili njegovog doziranog oblika u žustrijim uvjetima u odnosu na uvjete koji se primjenjuju prilikom studija ubrzanog starenja (engl. *accelerated stress studies*). Provodi se kako bi se kvalitativno i kvantitativno okarakterizirali razgradni produkti, odredili mehanizmi razgradnje i degradacijski putevi, odredila intrinzična stabilnost i kemijska svojstva djelatne tvari u formulaciji, prepoznala onečišćenja povezana s djelatnom tvari ili pomoćnim

tvarima te za osmišljavanje stabilnijih formulacija.²⁴ Onečišćenje se, prema ICH smjernicama, definira kao svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita ili pomoćna tvar. Onečišćenja prisutna u lijeku trebaju se identificirati jer produžena izloženost njima može dovesti do citotoksičnih, karcinogenih ili teratogenih učinaka. Prema ICH smjernicama, onečišćenja se mogu klasificirati kao organska (početni materijali, nečistoće povezane s procesom sinteze, međuprodukti i razgradni produkti), anorganska (soli, katalizatori, ligandi i teški metali), ostali materijali (pomoćna sredstva za filtriranje i aktivni ugljen) te zaostala organska i anorganska otapala.²⁶ Regulatorna tijela potiču provođenje studija prisilne razgradnje u predkliničkoj ili u prvoj fazi kliničkog istraživanja kako bi se dobilo dovoljno vremena za optimiranje korištenih uvjeta te za identifikaciju i karakterizaciju strukture razgradnih produkata.²⁴ Razgradni produkt se definira kao onečišćenje nastalo kao posljedica kemijske promjene djelatne tvari ili lijeka tijekom proizvodnje i skladištenja uslijed reakcije s vodom ili pomoćnom tvari iz lijeka, pod utjecajem svjetlosti, topline ili promjenom vrijednosti pH.²⁷ Općenito se studije prisilne razgradnje za određivanje stabilnosti djelatnih tvari i njihovih dozirnih oblika provode kiselo-baznom hidrolizom, oksidacijom, pri utjecaju povišene temperature, različitoj relativnoj vlažnosti te uz prisutnost svjetla, ali i kombinacijom navedenih parametara.²⁴⁻²⁷ Prihvatljive granice razgradnje su u rasponu od 5 % do 20 %^{24,25}, a smatra se da je razgradnja od 10 % optimalna za razvoj analitičke metode.²⁴ Ipak, prisilna razgradnja ne mora nužno rezultirati razgradnim produktom, a nastali produkti prisilnom razgradnjom su potencijalni produkti koji mogu i ne moraju nastati pod odgovarajućim uvjetima skladištenja. Suviše žustri uvjeti razgradnje mogu dovesti do nastajanja sekundarnih razgradnih produkata koji se ne bi opazili pri normalnim uvjetima proizvodnje, skladištenja i korištenja lijeka, a preslabi uvjeti razgradnje možda neće uvjetovati nastajanje dovoljno razgradnih produkata.²⁴ Dio znanstvene zajednice smatra da je praktično započeti ispitivanje pri ekstremnim uvjetima razgradnje u kraćim vremenskim periodima za pojedinu djelatnu tvar i njen dozirni oblik, koji se zatim mogu prilagoditi kako bi se dobio optimalan stupanj razgradnje. Praktično bi bilo ovakva ispitivanja provoditi tijekom više vremenskih intervala kako bi se procijenila brzina razgradnje i kako bi bilo moguće razlučiti primarne od sekundarnih razgradnih produkata. Koncentracija otopine uzorka koji se ispituje nije definirana regulatornim smjernicama, ali je preporuka da iznosi 1 mg cm⁻³ ili da se podudara s koncentracijom djelatne tvari koja se očekuje u konačnoj formulaciji.²⁴

2.4.1. Hidrolitički uvjeti

Hidroliza je kemijski proces koji uključuje razgradnju kemijskog spoja u reakciji s vodom te je najčešća kemijska reakcija razgradnje. U kiselim i bazičnim uvjetima dolazi do katalize ionizabilnih funkcionalnih skupina molekule te nastanka primarnih razgradnih produkata u željenom rasponu pH. Odabir kiseline ili baze i njezine koncentracije ovisi o stabilnosti djelatne tvari. Kao najčešće korišteni stresori izdvajaju se klorovodična kiselina (HCl) ili sumporna kiselina (H₂SO₄) za kiselu hidrolizu te otopine natrijevog hidroksida (NaOH) ili kalijevog hidroksida (KOH) za bazičnu hidrolizu, s rasponom koncentracija 0,1 – 1 mol dm⁻³. Ukoliko djelatna tvar ili njena formulacija imaju nisku intrinzičnu topljivost u vodi moguće je upotrijebiti kootapalo koje se odabire prema strukturi djelatne tvari kako bi se uzorak otopio u kiselini ili bazi. Općenito se reakcije započinju na sobnoj temperaturi, a ukoliko nije došlo do zadovoljavajućeg stupnja razgradnje temperatura se postepeno povisuje. Kako bi se izbjegla daljnja razgradnja nakon ispitivanja uzorak je potrebno neutralizirati odgovarajućom kiselinom, bazom ili puferom.²⁴

2.4.2. Oksidativni uvjeti

Odabir oksidirajućeg sredstva i njegova koncentracija za prisilnu razgradnju ovisi o proučavanoj djelatnoj tvari, a najčešće se koriste vodikov peroksid (H₂O₂), određeni metalni ioni, kisik ili neki karakteristični inicijatori radikala. Najčešće se primjenjuje 0,1 % – 3 % vodikov peroksid pri neutralnim uvjetima i sobnoj temperaturi. Oksidativna razgradnja djelatne tvari ili njezinog dozirnog oblika uključuje mehanizam prijenosa elektrona za nastajanje reaktivnih kationa i aniona.²⁴

2.4.3. Termička razgradnja

Termička razgradnja pri povišenim temperaturama se općenito provodi u rasponu od 40 °C do 80 °C. Uzorci djelatne tvari i njezinog dozirnog oblika u krutom stanju se podvrgavaju suhim i vlažnim uvjetima pri povišenoj temperaturi, a u tekućem stanju se podvrgavaju suhim uvjetima.²⁴

2.4.4. Fotolitička razgradnja

Ispitivanje fotostabilnosti se provodi kako bi se procijenilo dolazi li do neprihvatljive promjene u strukturi djelatne tvari prilikom izlaganja svjetlu. Ispitivanja se provode izlaganjem djelatne tvari ili njezinog doziranog oblika UV zračenju ili fluorescentnim uvjetima, kako bi se generirali primarni razgradni produkti. Uvjeti fotolitičke razgradnje su jedini uvjeti koji su propisani regulatornim smjernicama, a propisuje ih ICH. Uzorci djelatnih tvari najčešće se izlažu utjecaju zračenja u rasponu od 300 – 800 nm s minimalnom količinom osvjetljenosti od 1,2 milijuna lx h (200 Wh m^{-2}). Fotolitička razgradnja može potaknuti fotooksidaciju uzoraka radikalskim mehanizmom.²⁴

2.4.5. Metoda za praćenje stabilnosti

Metoda za praćenje stabilnosti ili stabilitetno-indikativna metoda (engl. *stability indicating method*, SIM) je validirani analitički postupak kojim se može kvantificirati smanjenje količine djelatne tvari uslijed razgradnje te tako ukazuje koliko se mijenja stabilnost djelatne tvari i njenih dozirnih oblika u vremenu. Omogućava precizno mjerenje promjena u koncentraciji djelatne tvari bez interferencija koje potječu od ostalih razgradnih produkata, nečistoća ili pomoćnih tvari.²⁴

Provođenje stabilitetnih studija je jedan od zahtjeva koje je potrebno ispuniti prilikom registracije novih lijekova i njihovih dozirnih oblika. Takve studije mogu biti dugotrajne (12 mjeseci) ili se pak može raditi o studijama ubrzanog starenja (6 mjeseci). Studije prisilne razgradnje djelatnih tvari i njihovih dozirnih oblika za razliku od navedenih stabilitetnih studija u kratkom vremenu generiraju razgradne produkte koji se mogu iskoristiti za razvoj metode za praćenje stabilnosti, kojom se zatim proučavaju uzorci dobiveni dugotrajnim stabilitetnim te studijama ubrzanog starenja.²⁴

Najčešće tehnike koje se primjenjuju za razvoj metoda za praćenje stabilnosti su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC), tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance thin layer chromatography*, HPTLC), kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE) i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC). Neke od ovih kromatografskih tehnika moguće je spregnuti s drugim spektroskopskim ili spektrometrijskim tehnikama kako bi se razvile i validirale metode za praćenje stabilnosti s mogućnošću

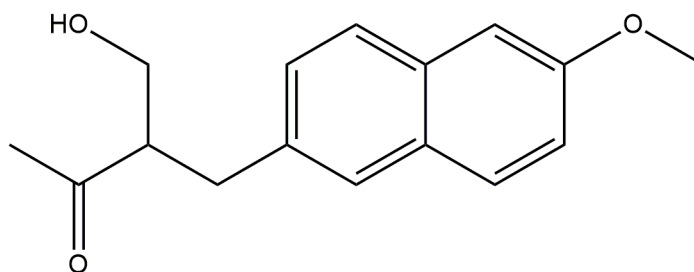
istovremene kvalitativne i kvantitativne analize. Neke od takvih spregnutih tehnika koje su postale standard u modernim analitičkim laboratorijima koji se bave stabilitetnim studijama su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz detektor s diodnim nizom (engl. *high performance liquid chromatography – diode array detector*, HPLC-DAD) ili pak HPLC spregnut sa spektrometrom masa visokog razlučivanja (engl. *high-resolution mass spectrometry*, HRMS). Metode za praćenje stabilnosti bi trebale biti specifične, točne, osjetljive, pouzdane, ponovljive i robusne.^{24,28}

2.4.6. Studije prisilne razgradnje nabumetona

Visoka učinkovitost i kraće vrijeme analize su osnovni zahtjevi za kromatografsko odjeljivanje kojima su se vodili Sethi i sur. prilikom razvoja i validacije stabilitetno-indikativne metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. *reverse phase-ultra performance liquid chromatography*, RP-UPLC) za kvantitativnu analizu nabumetona u obliku tableta.²⁹ Kromatografsko odjeljivanje postiglo se upotrebom Waters Acquity BEH kolone (100 · 2,1 mm, 1,7 µm) pri čemu se kao pokretna faza uz izokratno eluiranje koristio sustav: 5 mmol dm⁻³ amonijev acetat u vodi i acetonitril (25:75, v/v) uz protok od 0,3 mL min⁻¹. Kvantifikacija je provedena korištenjem detektora s nizom fotodioda i praćenjem eluiranja komponenti pri valnoj duljini detekcije od 230 nm. Prisilna razgradnja nabumetona provedena je pri kiseloj (otopina HCl koncentracije $c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$) i baznoj (otopina NaOH koncentracije $c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$) hidrolizi te pri povišenoj temperaturi (3 sata na 68 °C) i oksidativnim uvjetima (30 % H₂O₂). Pri navedenim uvjetima nije došlo do nastanka razgradnih produkata, odnosno utvrđeni postotak razgradnje bio je zanemariv. U usporedbi s HPLC metodama, razvijena RP-UPLC metoda dala je kraća vremena zadržavanja uz održavanje dobrog razlučivanja i osjetljivosti. Metoda je validirana uz provjeru parametara poput preciznosti, točnosti, osjetljivosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, robusnosti, specifičnosti i linearnosti.²⁹

Sawant i sur.³⁰ također su razvili i validirali stabilitetno-indikativnu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza nakon provođena prisilne razgradnje. Nabumeton je podvrgnut prisilnoj razgradnji pri neutralnim, kiselim (otopina HCl koncentracije $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$) i baznim (otopina NaOH koncentracije $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$) hidrolitičkim uvjetima pri 50 °C u trajanju od 4 dana te pri fotolitičkim uvjetima uz istovremenu izloženost hidrolizi (HCl i NaOH, $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) u trajanju od 13 dana. Nadalje, provedena je prisilna razgradnja pri oksidativnim uvjetima (30 % H₂O₂) u trajanju od 2 dana te termalna razgradnja pri 50 °C u

trajanju od 21 dan. Kromatografsko odjeljivanje je postignuto korištenjem Hypersil Gold C18 kolone (250 · 4,6 mm, 5 µm) uz izokratno eluiranje, pri čemu se kao pokretna faza koristio sustav acetonitrila i 10 mmol dm⁻³ fosfatnog pufera (60:40, v/v). Jedini razgradni produkt (slika 10.) uočili su pri fotoneutralnim uvjetima s postotkom razgradnje od 24 %. Za karakterizaciju i identifikaciju nastalog razgradnog produkta korišten je spregnuti sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS) pri čemu je spomenuti fosfatni pufer zamijenjen 10 mmol dm⁻³ amonijevim acetatom. Provela se validacija metode uz provjeru specifičnosti, linearnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, preciznosti, točnosti te robusnosti.³⁰



Slika 10. Strukturna formula jedinog razgradnog produkta nabumetona koju su predložili Sawant i sur.³⁰

Sushmitha i sur.⁵ razvili su i validirali brzu, preciznu i osjetljivu stabilitetno-indikativnu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza za analizu nabumetona u obliku tableta. Razvijena stabilitetno-indikativna metoda učinkovito odjeljuje nabumeton od njegovih razgradnih produkata koji su dobiveni u sklopu prisilne razgradnje lijeka u svrhu provjere specifičnosti metode prilikom njene validacije. Pri tome je korištena Cosmosil C18 (150 · 4,6 mm, 5 µm) kolona uz izokratno eluiranje pri čemu se kao pokretna faza koristio sustav acetonitrila i vode (55:45, v/v) s protokom od 0,8 mL min⁻¹. Kvantifikacija je provedena korištenjem detektora s nizom fotodioda pri valnoj duljini detekcije od 229 nm. Prisilna razgradnja nabumetona provedena je pri kiselim (otopina HCl koncentracije $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$), baznim (otopina NaOH koncentracije $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) i neutralnim (voda pH = 7,0 ± 0,05) hidrolitičkim uvjetima, oksidativnim uvjetima (3 % H₂O₂), fotolitičkim uvjetima (1,2 milijuna lx h) te pri suhim uvjetima povišene temperature (80 °C). Analiza se provodila u različitim vremenskim intervalima kako bi se procijenila brzina razgradnje. Utvrđena razgradnja nabumetona pri neutralnim hidrolitičkim uvjetima nakon 12 sati iznosila je 40 %. Za baznu

hidrolizu uočeno je nastajanje dva razgradna produkta pri relativnim vremenima zadržavanja 2,1 min i 2,3 min nakon 12 sati s postotkom razgradnje nabumetona od 44 %. Pri kiseloj hidrolizi došlo je do nastanka dva razgradna produkta pri relativnim vremenima zadržavanja 2,3 min i 3,6 min nakon 12 sati s postotkom razgradnje nabumetona od 46 %. Pri oksidativnim uvjetima došlo je do nastanka dva razgradna produkta pri relativnim vremenima zadržavanja 1,3 min i 4,9 min nakon 8 sati s najvećim postotkom razgradnje od 47 %. Pri termičkoj razgradnji došlo je do 10 % razgradnje nakon 12 sati, a pod utjecajem fotolitičke razgradnje postotak je iznosio 20 % nakon 5 dana. Sushmitha i suradnici su utvrdili da je nabumeton osjetljiv na oksidativne, kisele i bazične uvjete, a najmanja razgradnja se uočila prilikom izlaganja lijeka u čvrstom stanju povišenoj temperaturi. Nastali razgradni produkti nisu identificirani, a metoda je validirana uz provjeru linearnosti, specifičnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, točnosti, preciznosti te robusnosti.⁵

2.5. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između nepokretne i pokretne faze. Nepokretna (stacionarna) faza može biti krutina, gel ili tekućina adsorbirana na čvrstom nosaču, a pokretna (mobilna) faza je tekućina u slučaju tekućinske kromatografije, plin u slučaju plinske kromatografije te fluid u slučaju fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima. Uzorak koji se analizira mora biti dobro topljiv u pokretnoj fazi koja ga prenosi kroz ili uzduž nepokretne faze. Kromatografija se dijeli na kolonsku (kromatografija na stupcu) i plošnu kromatografiju prema obliku kromatografske podloge, a prema fizičkom stanju pokretne faze na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Također se kromatografske tehnike mogu razlučiti prema mehanizmu odvajanja na adsorpcijsku kromatografiju, razdjelnu kromatografiju, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju te kromatografiju isključenjem.^{31,32}

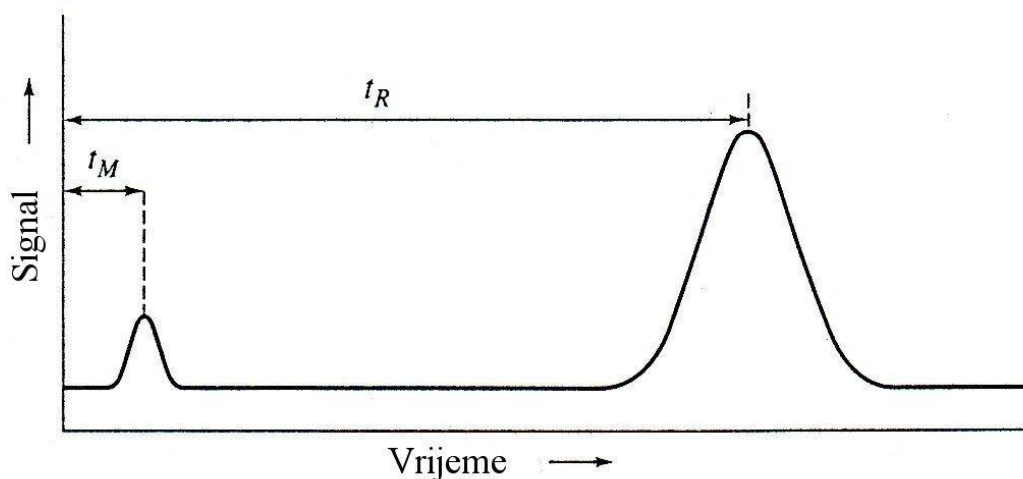
Glavna tehnika odjeljivanja u kolonskoj kromatografiji je ispiranje, odnosno eluiranje kod koje dodavanjem pokretne faze (eluensa) otopljeni uzorak putuje niz kolonu. Na taj se način sastojci uzorka niz kolonu neprestano ravnotežno raspodjeljuju između dviju faza koje se međusobno ne miješaju, pri čemu se različiti sastojci različito zadržavaju na nepokretnoj fazi. Sastojci uzorka se djelotvornije i bolje odjeljuju što se ravnotežna raspodjela više puta uspostavi, odnosno što je više prijelaza između faza. Odijeljeni sastojci smjese zbog različitog

zadržavanja na nepokretnoj fazi dolaze u različitim vremenima na detektor, pa se mogu osjetljivo i selektivno detektirati te kvalitativno i kvantitativno analizirati.^{31,32}

2.5.1. Kromatografski parametri

Grafički prikaz ovisnosti odgovora detektora, odnosno koncentracije analita u eluatu, prema volumenu eluata ili vremenu potrebnom da se sastojak ispere s kolone naziva se kromatogramom (slika 11). Kromatografska krivulja ili pik je dio kromatograma u kojem je zabilježen odziv detektora pri ispiranju jednog sastojka iz kolone. Ukupno vrijeme zadržavanja (t_R) je proteklo vrijeme od injektiranja uzorka u kolonu do maksimuma pika sastojka koji se zadržava na koloni, a vrijeme zadržavanja sastojka koji se ne zadržava na koloni označava se s t_M . Njihova razlika definira prilagođeno vrijeme zadržavanja (t_R'):

$$t_R' = t_R - t_M \quad (1)$$



Slika 11. Kromatogram smjese dvaju sastojaka, pri čemu prvi prolazi kroz kolonu bez zadržavanja³²

Vrijeme zadržavanja neke tvari u kromatografskoj koloni ovisit će o vrsti nepokretne faze, vrsti i protoku pokretne faze, prirodi tvari te o radnim uvjetima kromatografske analize. Kvalitativne podatke o eluiranom spoju daje njegovo vrijeme zadržavanja, a kvantitativne podatke visina ili površina ispod njegovog pika. Prema podacima očitanih iz kromatograma [vrijeme zadržavanja (t_R), volumen zadržavanja (V_R), širina pika pri osnovici (w_b), širina pika pri polovini visine (w_h)] mogu se izračunati različiti parametri koji su pokazatelji kvalitete kromatografske analize

poput: faktora zadržavanja (k), broja teorijskih tavana (N), separacijskog faktora ili faktora razdvajanja (α) te razlučivanja pikova (R_S).

Faktor zadržavanja omjer je vremena koje analizirani spoj provede u nepokretnoj fazi i vremena koje provede u pokretnoj fazi, a govori koliko duže sastojak putuje kroz kolonu zbog njegovog zadržavanja u nepokretnoj fazi, nego što bi putovao brzinom pokretne faze. Raspon vrijednosti pri kojemu se postiže dobro odjeljivanje analiziranih spojeva je općenito od 1 do 5, pri čemu manje vrijednosti označavaju prebrzo eluiranje spojeva dok vrijednosti veće od 20 označavaju predugo zadržavanje spojeva.³²

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_{R'}}{t_M} \quad (2)$$

Broj teorijskih tavana je kvantitativna oznaka za djelotvornost kromatografske kolone, odnosno broj uspostavljenih ravnoteža (faznih prijelaza) između nepokretne i pokretne faze. Za pojedini analit broj teorijskih tavana se može izračunati pomoću volumena ili vremena zadržavanja i širine kromatografskog pika pri njegovoj osnovici ili pri polovici njegove visine, a djelotvornost kromatografske kolone se povećava s povećanjem broja teorijskih tavana.³²

$$N = 16 \left(\frac{V_R}{w_b} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (3)$$

$$N = 5,545 \left(\frac{V_R}{w_h} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4)$$

Separacijskim faktorom, odnosno faktorom razdvajanja izražava se selektivnost kromatografske kolone, a ona je selektivnija što su vremena zadržavanja odjeljivanih sastojaka različitija.³²

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_M}{t_{R_1} - t_M} \quad (5)$$

Mjera razdvajanja dvaju pikova koja uključuje i selektivnost i djelotvornost kolone je razlučivanje pikova, koja se u odnosu na prosječnu širinu osnovice pikova izračunava kao:

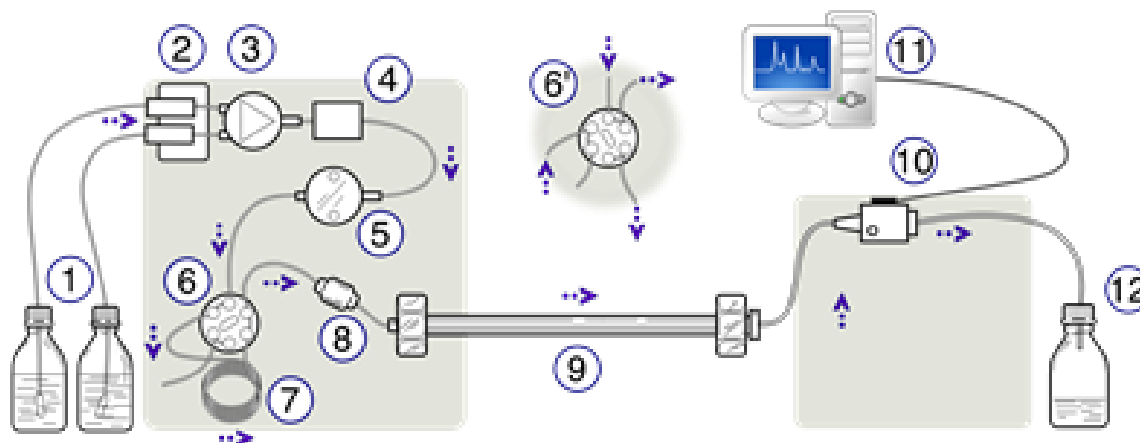
$$R_S = \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{(w_{b_1} + w_{b_2})/2} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{b_1} + w_{b_2}} \quad (6)$$

Kvaliteta kromatografskog procesa može se procijeniti temeljem navedenih veličina. Kako bi se poboljšalo odjeljivanje sastojaka smjese na kromatografskoj koloni, mogu se podesiti uvjeti analize koji će smanjiti širenje pikova (poboljšana djelotvornost) ili selektivnim mijenjanjem brzine gibanja sastojaka kroz kolonu (poboljšana selektivnost).³¹

2.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinskom kromatografijom mogu se kvalitativno ili kvantitativno odrediti spojevi male i velike molekulske mase, nehlapljivi ili termički nestabilni spojevi te biološki aktivni spojevi. Kao što je već navedeno, u tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je tekućina (voda, razna organska otapala ili njihove smjese u različitim omjerima) u kojoj se analizirani sastojci moraju dobro otapati, dok se ona ne smije miješati s tekućom nepokretnom fazom. U tekućinskoj razdjelnoj kromatografiji pokretne faze su otapala ili smjesa otapala različite polarnosti, a u pravilu se najprije bira nepokretna faza tako da njena polarnost bude slična polarnosti analiziranih spojeva. Razlikujemo kromatografiju normalnih faza kod koje je nepokretna faza polarnija od pokretne i kromatografiju obrnutih faza u kojoj je pokretna faza polarnija od nepokretne. Ukoliko je sastav pokretne faze tijekom ispiranja stalan radi se o izokratnom eluiranju, koji je najjednostavniji način odjeljivanja tekućinskom kromatografijom. Ipak, često se bolji kromatografski rezultati dobiju gradijentnim eluiranjem gdje se sastav pokretne faze kontinuirano mijenja tijekom ispiranja, pri čemu se obično dobivaju uži pikovi i njihovo bolje razlučivanje u usporedbi s izokratnim eluiranjem. Nepokretne faze su imobilizirane tekućine ili kemijski vezane faze. U kromatografiji obrnutih faza najčešće se kemijski vezane faze pripremaju vezanjem C_{18} i C_8 alkilnih skupina na silikagel.^{31,32}

Kromatograf za tekućinsku kromatografiju (slika 12) sastoji se od boca s otapalima (miješanjem tih otapala priprema se pokretna faza potrebna za analizu), otplinjača (uklanja plinove koji su ostali otopljeni u otapalima), visokotlačne pumpe (osigurava kontinuiran protok pokretne faze kroz kolonu), sustava za unasanje uzorka, tzv. injektora (putem kojeg se uzorak uvodi na kromatografsku kolonu), pretkolone (štiti kromatografsku kolonu kako bi joj se osigurao što dulji vijek trajanja), kromatografske kolone (na kojoj se sastojci smjese odjeljuju), detektora (kojim se sastojci nakon prolaska kroz kolonu detektiraju) te sustava za obradu podataka (računala).^{31,32}



Slika 12. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa. (1) Boce s otapalima, (2) otplinjač, (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 iz eluata³³

Kromatografske kolone najčešće su izrađene od nehrđajućeg čelika i ispunjene česticama punila (nepokretnom fazom), a ukoliko su čestice promjera oko 5 μm uz relativno visoki tlak pokretne faze na ulazu u kolonu, radi se o tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti. Injektiranje uzorka u kolonu pri visokom tlaku bez prekida protoka mobilne faze omogućuje sustav za unašanje uzorka koji se sastoji od prenosnog injektora s petljom. Korištena otapala (ili smjese otapala) kod analize HPLC-om moraju biti visoke čistoće i ne smiju sadržavati otopljen plinove i čvrste čestice. Uklanjanje eventualnih plinova otopljenih u otapalu i suspendiranih čestica provodi se filtriranjem otapala kroz filtre malih pora uz pomoć vakuuma. Također se otopljeni plinovi u otapalu, poput kisika i dušika, mogu ukloniti propuhivanjem plemenitim plinovima (helijem) ili tretiranjem otapala u ultrazvučnoj kupelji.³²

Detektori korišteni u tekućinskoj kromatografiji se dijele na one koji indirektno detektiraju sastojak bilježenjem promjene određenog svojstva pokretne faze (npr. vodljivost, indeks loma, raspršenje svjetla) te na detektore koji detektiraju sastojak na temelju nekog njegovog svojstva (npr. apsorpcija UV/Vis zračenja, fluorescencijska emisija, elektrokemijske reakcije). Najčešće korišteni su apsorpcijski detektori, kod kojih se detekcija analita temelji na mjerenju apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog zračenja u eluatu koji se po izlasku s kolone uvodi u protočnu kvarcnu ćeliju. Od apsorpcijskih detektora, detektor s nizom dioda omogućava snimanje cijelog UV/Vis spektra odijeljenih sastojaka.³²

Ukoliko je kolona ispunjena česticama punila manjeg promjera ($\leq 2,7 \mu\text{m}$) govorimo o tekućinskoj kromatografiji ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC).³¹ Danas se tekućinska kromatografija primjenjuje prilikom odjeljivanja analita i pročišćavanja uzoraka, a široko se koristi u analitičkoj kemiji, organskoj kemiji, farmaciji, forenzici, ekologiji, medicinskim istraživanjima, kliničkim ispitivanjima i sl.³²

2.6. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je široko korištena analitička tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a zatim se nastali ioni u plinskoj fazi razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Spektar masa je grafički prikaz relativne zastupljenosti (u postocima) u odnosu na omjer m/z , pri čemu se najintenzivniji signal (s intenzitetom od 100 %) naziva osnovnim ili baznim signalom, koji može odgovarati signalu molekulskog iona ili fragmentnog iona. Intenziteti ostalih signala se preračunavaju u odnosu na intenzitet baznog signala. Signal koji odgovara masi molekule analita obično je pri najvećoj vrijednosti m/z (signal molekulskog iona), a iza tog signala nalaze se izotopni signali kao posljedica prisutnosti težih izotopa jednog ili više elemenata. Izotopni signali omogućavaju izračunavanje broja odgovarajućih atoma u molekuli, a signali pri manjim vrijednostima m/z odgovaraju ionima koji su nastali zbog fragmentiranja ili pregradnje molekulskog iona. Ako do fragmentiranja iona dolazi izvan ionizacijske komore (na putu do detektora), tada se u spektru masa uočava razvučen signal slabog intenziteta koji odgovara metastabilnom ionu pri vrijednosti m/z :

$$m^* = m_2^2/m_1 \quad (7)$$

pri čemu je m^* masa metastabilnog iona, m_2 masa iona produkta i m_1 masa iona prekursora.

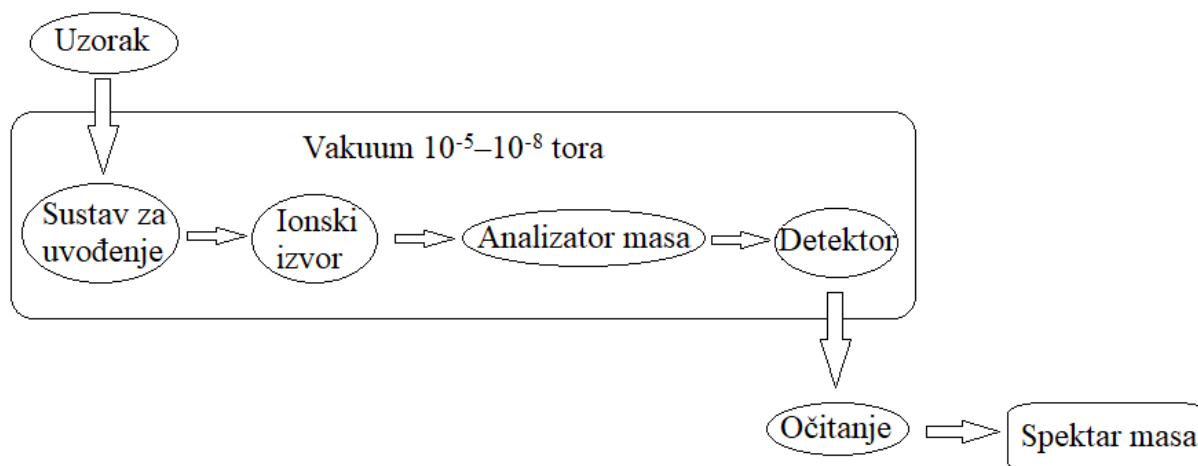
Razlučenost signala u spektru ovisi o sposobnosti instrumenta da razlikuje i razluči ione mase m_1 i m_2 , a razlučivanje sektorskih instrumenta se računa prema:

$$R = m_1/\Delta m \quad (8)$$

Izgled dobivenog spektra masa će ovisiti o načinu ionizacije molekula uzorka te o vrsti analizatora masa koji se nalazi u sklopu korištenog spektrometra masa.³⁴

Svi spektrometri masa imaju sličan osnovni princip rada, a glavne dijelove spektrometra masa (slika 13.) čine ionski izvor, analizator masa i detektor. Sustav za uvođenje uzorka omogućuje dovođenje uzorka u ionizacijsku komoru, uz minimalno narušavanje vakuuma, pomoću sustava ventila koji parcijalno prekidaju i uspostavljaju određeni tlak. U ionskom

izvoru (ionizacijskoj komori) dolazi do ionizacije molekula analita, a nastali se ioni zatim usmjeravaju prema analizatoru masa gdje se odjeljuju u vremenu ili prostoru na temelju njihovog omjera m/z i na kraju detektiraju.³⁴

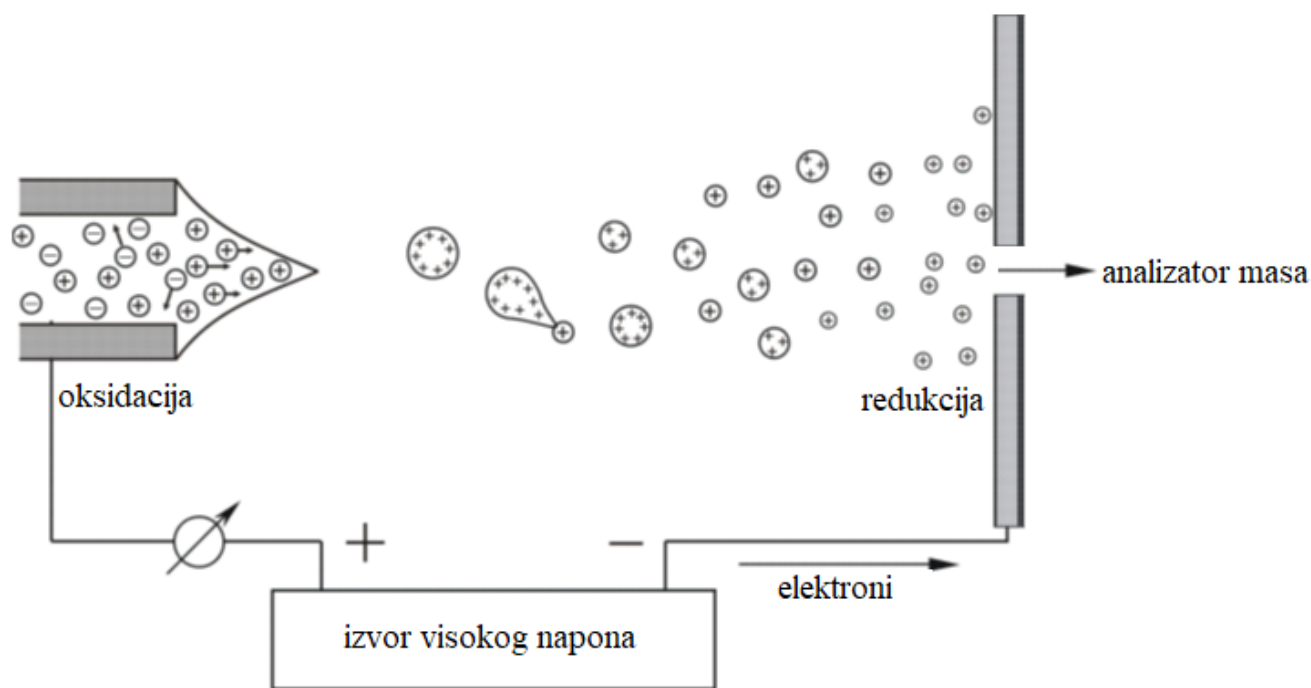


Slika 13. Prikaz osnovnih dijelova spektrometra masa (1 Torr = 1 mmHg = 133,3 Pa).

2.6.1. Ionski izvori

Ioni u plinskoj fazi nastaju unutar ionskog izvora ionizacijom neutralne molekule izbijanjem elektrona, protoniranjem, deprotoniranjem, tvorenjem adukata ili prijenosom nabijene vrste iz kondenzirane u plinsku fazu. Postoje različite ionizacijske tehnike, a one se mogu podijeliti prema fizičko-kemijskim svojstvima analita i na količinu unutarnje energije predane tijekom ionizacijskog procesa. Kod nekih tehnika npr. tehnike ionizacije elektronima (engl. *electron impact ionization*, EI) dolazi do prijenosa velike količine energije na molekule analita što dovodi do jake fragmentacije, a neke tehnike su blage, poput primjerice kemijske ionizacije (engl. *chemical ionization*, CI) gdje fragmentiranje uglavnom izostaje i nastaje samo molekulski ion. Ove dvije tehnike su prikladne samo za ionizaciju molekula analita u plinovitoj fazi te im je korištenje ograničeno na hlapljive i termički stabilne spojeve. Za analizu spojeva koji ne zadovoljavaju te uvjete ionizacija se mora provesti direktno u kondenziranoj fazi. Ukoliko se radi o tekućoj fazi, moguće je koristiti elektroraspršenje (engl. *electrospray ionization*, ESI), termoraspršenje (engl. *thermospray ionization*, TSP) ili kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) kao pogodne ionske izvore. Za analizu krutih uzoraka često se primjenjuju metode u kojima se koristi čvrsta ili tekuća matrica.³⁴

Jedna od često korištenih tehnika ionizacije u vezanim sustavima LC-MS je elektroraspršenje, koje omogućava direktno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, odnosno direktno prevođenje analita iz otopine u ione u plinskoj fazi pri atmosferskom tlaku. Proces elektroraspršenja može se podijeliti u nekoliko faza: nastajanje kapljica, smanjenje kapljica i nastajanje iona u plinskoj fazi. Otopina koja sadrži analit prvo se uvodi u metalnu kapilaru na koju se primjenjuje jako električno polje (2 – 3 kV) pri atmosferskom tlaku (slika 14). Tako dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini, a u slučaju da je kapilara priključena na pozitivan kraj izvora napona pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine. Negativno nabijene kapljice moguće je proizvesti mijenjanjem polariteta ionskog izvora. Pri kritičnoj jakosti polja nastati će tzv. Taylorov stožac, u kojemu se kontinuirano proizvode kapljice obogaćene pozitivno nabijenim ionima. Kapljice će pod utjecajem gradijenta potencijala i tlaka putovati prema analizatoru masa.^{34,35}



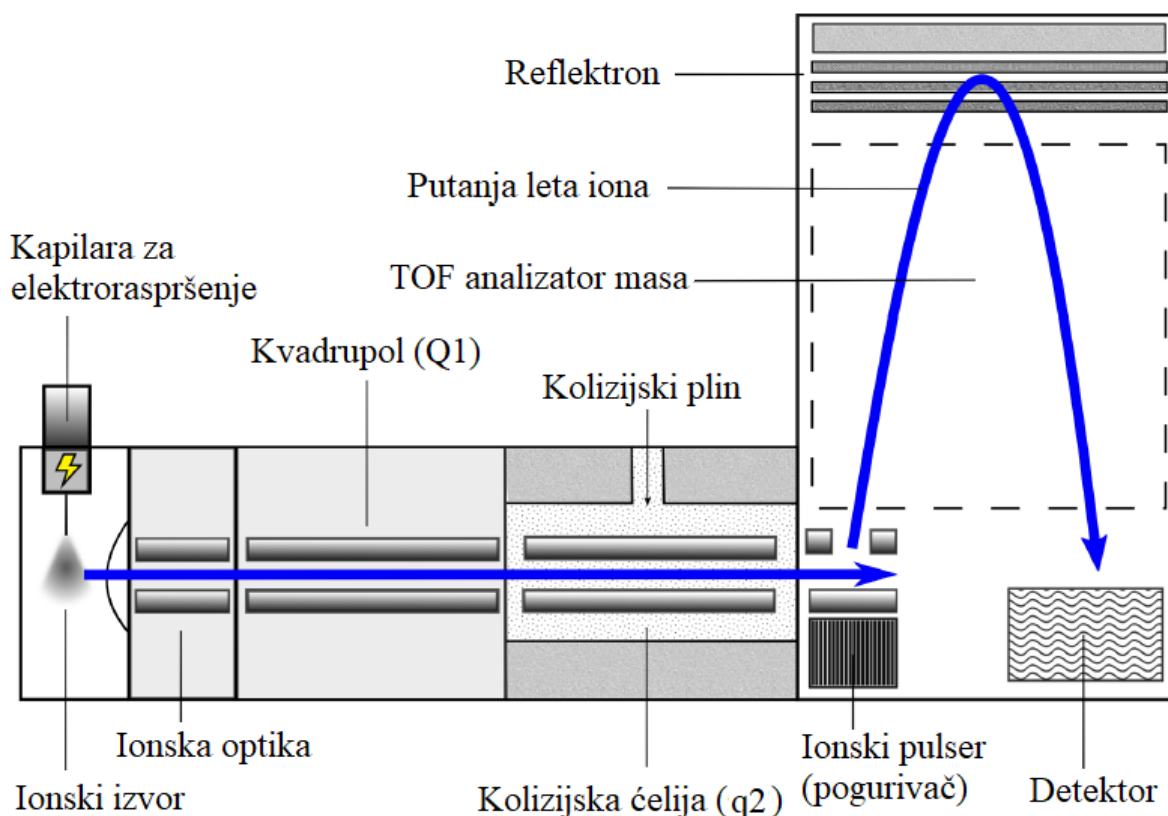
Slika 14. Shematski prikaz načina ionizacije u ESI ionskom izvoru³⁵

Početna veličina nabijenih kapljica nastalih elektroraspršenjem ovisi o nekoliko parametara (npr. protok otopine i svojstva otapala), s time da otapalo grijanjem isparava pa će se smanjiti veličina kapljica, ali će naboj ostati konstantan.^{34,35}

2.6.2. Analizatori masa

Generirani ioni nakon ionizacije se odjeljuju u analizatorima masa na temelju njihovih omjera m/z . Najčešći analizatori masa koji su dostupni u komercijalnim instrumentima su sektorski, kvadrupolni (engl. *quadrupole*, Q), ionska stupica (engl. *ion trap*), analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *time of flight*, TOF), Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko ciklotronske rezonancije (FT-ICR MS) te elektrostatska stupica (engl. *orbitrap*). Kod sektorskih i kvadrupolnih analizatora masa sukcesivno se propuštaju ioni tijekom vremena te tako samo ioni određene vrijednosti m/z prođu prema detektoru u određeno vrijeme. Simultana analiza svih iona, koji se odjeljuju u prostoru, postiže se pomoću analizatora masa koji mjeri vrijeme leta, ionskom stupicom, elektrostatskom stupicom ili analizatorom koji koristi ion ciklotronsku rezonanciju. Kako bi se unaprijedila separacija iona ili izazvala dodatna fragmentacija koja bi olakšala određivanje strukture analiziranog iona provode se analize tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS). U tu svrhu je moguće povezivati iste ili različite (hibridni instrumenti) vrste analizatora masa.³⁴

Jedan od primjera hibridnih instrumenata je kvadrupolni analizator masa s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *quadrupole time-of-flight mass spectrometry*, QTOF-MS) pri čemu instrument koristi visoku učinkovitost fragmentiranja analita koju posjeduje kvadrupol te sposobnost visokog razlučivanja koju posjeduje TOF (slika 15). QTOF se sastoji od dva međusobno povezana kvadrupola, na čijem se kraju nalazi TOF cijev s ionskim zrcalom, odnosno reflektrom. Prvi kvadrupol služi kao filter masa koji propušta ione određene vrijednosti m/z prema drugom kvadrupolu koji je zapravo kolizijska ćelija u kojoj propušteni ioni podliježu sudarima s molekulama inertnog plina što uzrokuje fragmentaciju iona analita. Izlaskom iz kvadrupola, ioni zatim ulaze u TOF dio analizatora gdje su ubrzani električnim poljem okomito na svoj prethodni smjer. Na taj se način osigurava jednaka količina kinetičke energije koja se predaje ionima te se mjeri vrijeme potrebno da prijeđu udaljenost do detektora. QTOF-MS je danas jedna od najkorištenijih MS tehnika visokog razlučivanja koja svoju upotrebu pronalazi u farmaceutskim i biološkim ispitivanjima, metabolomici, proteomici, toksikologiji i prilikom razvoja novih lijekova.³⁶

Slika 15. Shematski prikaz osnovnih dijelova QTOF-MS instrumenta³⁶

2.6.3. Vezani sustav tekućinska kromatografija–tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS)

Povezivanje kromatografskih sustava s drugim instrumentalnim tehnikama poput spektrometrije masa ili spektroskopije NMR omogućava osjetljivo i selektivno detektiranje spojeva te nedvojbenu identifikaciju analita u analiziranim uzorcima. U takvim vezanim sustavima kromatograf je sustav koji ima ulogu odjeljivanja analita iz uzorka te uvođenja eluata u spektrometar masa koji ima funkciju detektora. Ipak, povezivanje tekućinskog kromatografa sa spektrometrom masa nije jednostavno izvedivo budući da se mora pripaziti na očuvanje vakuuma u spektrometru masa. Zbog toga su razvijeni različiti međuspojevi koji omogućuju djelomično uvođenje tekuće faze u MS uz uklanjanje suviška otapala prije uvođenja analita u dio spektrometra masa u kojem vlada stanje visokog vakuuma.³²

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i materijali

- 4-(6-metoksinaftalen-2-il)butan-2-on, nabumeton ($C_{15}H_{16}O_2$), Cayman Chemical, Ann Arbor, SAD
- β -ciklodekstrin, β -CD ($C_{42}H_{70}O_{35}$), CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- Metanol, LC-MS stupanj čistoće, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska
- Acetonitril, LC-MS stupanj čistoće, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska
- Ultračista voda dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sistema za pročišćavanje, Merck, Darmstadt, Njemačka
- mravlja kiselina, LC-MS stupanj čistoće, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska
- 37 % klorovodična kiselina, HCl, *pro analysi* stupanj čistoće, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska
- Natrijev hidroksid, NaOH, *pro analysi* stupanj čistoće, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska
- 30 % otopina vodikovog peroksida, H_2O_2 , *pro analysi* stupnja čistoće, Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Filteri Chromafil O-20/15 MS, 0,20 μm promjer pora, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka

3.1.1. Priprava otopina natrijevog hidroksida

U odmjernu tikvicu volumena 100 cm^3 odvagano je 20 g granula natrijevog hidroksida te je u nju dodano približno 50 cm^3 ultračiste vode. Sadržaj u tikvici je uz pomoć ultrazvučne kupelji otopljen nakon čega je tikvica nadopunjena do oznake kako bi se dobila otopina približne koncentracije $5,0\text{ mol dm}^{-3}$. Nakon pripreme otopina je skladištena u plastičnoj boci s čepom. Otopina natrijevog hidroksida koncentracije $1,0\text{ mol dm}^{-3}$ pripravljena je razrjeđivanjem prethodno pripravljene otopine u odmjernoj tikvici volumena 100 cm^3 . Obje pripravljene otopine korištene su kao stresori u studijama prisilne razgradnje nabumetona i njegovog

kompleksa u bazičnim uvjetima. Otopine su korištene i za neutralizaciju prilikom prisilne razgradnje u kiselim uvjetima.

3.1.2. Priprava otopina klorovodične kiseline

Otopina klorovodične kiseline koncentracije $5,0 \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljena je razrjeđivanjem koncentrirane klorovodične kiseline (37 %). U odmjernu tikvicu volumena 100 cm^3 pipetirano je 25 cm^3 ultračiste vode, a zatim je u tikvicu otpipetiran 41 cm^3 koncentrirane kiseline, nakon čega je nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Otopina klorovodične kiseline koncentracije $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljena je razrjeđivanjem prethodno pripravljene otopine koncentracije $5,0 \text{ mol dm}^{-3}$. U odmjernu tikvicu volumena 100 cm^3 dodano je 25 cm^3 ultračiste vode, nakon čega je u nju otpipetirano 20 cm^3 otopine kiseline te je nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Obje pripravljene otopine korištene su kao stresori u studijama prisilne razgradnje nabumetona i njegovog kompleksa u kiselim uvjetima. Otopine su korištene i za neutralizaciju prilikom prisilne razgradnje u bazičnim uvjetima.

3.1.3. Priprava otopine vodikovog peroksida

Kao stresor prilikom oksidativne razgradnje nabumetona u sklopu ovog diplomskog rada korištena je 10 % otopina vodikovog peroksida. Ona je pripravljena u odmjernoj tikvici volumena 25 cm^3 pipetiranjem $8,30 \text{ cm}^3$ 30 % otopine vodikovog peroksida nakon čega je tikvica nadopunjena ultračistom vodom do oznake.

3.1.4. Priprava ishodnih otopina nabumetona i mljevenog uzorka nabumetona s β -CD

Ishodna otopina nabumetona koncentracije $1,0826 \text{ mg cm}^{-3}$ pripravljena je vaganjem $54,13 \text{ mg}$ spoja u odmjernoj tikvici volumena 50 cm^3 , nakon čega je odvaga uz pomoć ultrazvučne kupelji otopljena u acetonitrilu. Budući da je prilikom studija prisilne razgradnje u kiselim i bazičnim uvjetima (koncentracije stresora $5,0 \text{ mol dm}^{-3}$) prilikom neutralizacije otopina dolazilo do isoljavanja, odnosno odvajanja organske i vodene faze, pripravljena je nova ishodna otopina nabumetona u drugom organskom otapalu. U odmjernoj tikvici volumena 50 cm^3 odvagano je $50,17 \text{ mg}$ spoja te je on otopljen u metanolu uz pomoć ultrazvučne kupelji. Koncentracija spoja je iznosila $1,0034 \text{ mg cm}^{-3}$. Ishodna otopina mljevenog uzorka nabumetona s β -CD pripravljena je vaganjem $50,15 \text{ mg}$ spoja u odmjernoj tikvici volumena 50 cm^3 nakon čega je odvaga uz

pomoć ultrazvučne kupelji otopljena u sustavu otapala metanol:H₂O=50:50. Koncentracija spoja je iznosila 1,003 mg cm⁻³.

3.1.5. Priprava otopina za provođenje prisilne razgradnje

U odmjerne tikvice volumena 10 cm³ pipetiran je 1 cm³ ishodne otopine nabumetona, odnosno mljevenog uzorka nabumetona s β-CD. Nakon toga je u tikvicu pipetiran 1 cm³ otopine HCl koncentracije 5,0 mol dm⁻³. Tako pripravljene otopine su ostavljene na 1, 2, 4 i 6 h u termostatu na povišenu temperaturu od 80 °C. Nakon određenog perioda u tikvicu je pipetiran 1,0 cm³ otopine NaOH koncentracije 5,0 mol dm⁻³ kako bi se provela neutralizacija, a zatim i 2,0 cm³ metanola nakon čega je tikvica nadopunjena do oznake unaprijed pripremljenom smjesom otapala metanol:H₂O=50:50. Prisilna razgradnja nabumetona u bazičnim uvjetima provedena je na identičan način korištenjem otopine NaOH koncentracije 5,0 mol dm⁻³ uz neutralizaciju otopinom HCl koncentracije 5,0 mol dm⁻³. Prisilna razgradnja nabumetona u neutralnim hidrolitičkim uvjetima provedena je na identičan način s tim da je umjesto otopine kiseline ili baze korištena samo deionizirana voda.

Kako bi se provela prisilna razgradnja nabumetona u oksidativnim uvjetima u odmjerne tikvice volumena 10 cm³ pipetiran je 1 cm³ ishodne otopine nabumetona, a zatim i 1 cm³ 10 % otopine H₂O₂. Tako pripravljene otopine su ostavljene na 1, 2, 4 i 6 h u termostatu na povišenu temperaturu od 80 °C. Kako bi se postigao identičan sustav otapala u konačnoj otopini kao i u slučaju prethodno provedenih razgradnji u hidrolitičkim uvjetima u tikvice je pipetiran 1 cm³ vode umjesto otopine za neutralizaciju, a zatim su tikvice nadopunjene na jednak način kao i u prethodnim slučajevima.

Prisilna razgradnja u hidrolitičkim i oksidativnim uvjetima na uzorcima mljevenog nabumetona s β-CD provedena je na identičan način kao što je opisano u prethodnim slučajevima, s razlikom prilikom razrjeđivanja otopina. U ovom slučaju se umjesto 2,0 cm³ metanola u odmjerne tikvice pipetiralo 2,5 cm³ metanola uz nadopunu tikvice do oznake unaprijed pripremljenom smjesom otapala metanol:H₂O=50:50.

Prilikom provođenja prisilnih razgradnji na spomenutim pripremljeni su i odgovarajući kontrolni uzorci kod kojih nije provedena razgradnja, a također su pripravljene i odgovarajuće otopine slijepih proba. Slijepa proba za svaku razgradnju je pripravljena u odmjernim tikvicama volumena 10 cm³ pipetiranjem 1 cm³ metanola LC-MS čistoće, 1 cm³ odgovarajuće otopine stresora (te 1 cm³ odgovarajuće otopine za neutralizaciju ukoliko je to bilo potrebno) uz

nadopunu tikvice na način da sustav otapala odgovara otopinama u kojima je provedena prisilna razgradnja na uzorku nabumetona te nabumetona s β -CD.

Mjerne otopine volumena 1 cm^3 su pripravljene u kromatografskim vialama prema tablici 2 tako da koncentracija nabumetona u svim uzorcima bude približno $4 \mu\text{g cm}^{-3}$. Prilikom razrjeđivanja je korištena unaprijed pripravljena smjesa otapala metanol:H₂O=50:50.

Tablica 2. Priprema mjernih otopina za određivanje razgradnih produkata nabumetona.

Uzorak	V (aliquot) / mm^3	V (metanol:H ₂ O) / mm^3
NAB	40,0	960,0
NAB + β -CD	240,4	759,6

3.2. Instrumentacija

- spregnuti sustav tekućinska kromatografija (*Agilent 1290 infinity II*) i spektrometrija masa visokog rezlučivanja (*Agilent 6550 iFunnel Q-TOF*)
- termostat *Lauda n/D8/17*

Sve pripravljene mjerne otopine analizirane su uz pomoć LC (za određivanje postotka razgradnje lijeka) te LC-MS metode (za karakterizaciju razgradnih produkata) prema tablici 3, pri čemu se kao pokretna faza koristio sustav: 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (MF_A) i 0,1 % otopinom mravlje kiseline u metanolu (MF_B) uz gradijentno eluiranje i protok od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Volumen injektiranja uzorka iznosio je $2,0 \mu\text{L}$. Za potrebe odjeljivanja analita upotrijebljena je kromatografska kolona Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 dimenzija $2,1 \cdot 50 \text{ mm}$ i veličine čestica nepokretne faze od $1,8 \mu\text{m}$.

Tablica 3. Parametri LC i LC-MS metode za analizu razgradnih produkata nabumetona.

Kolona	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18		
MF _A	0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi		
MF _B	0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu		
Gradijent	<i>t</i> / min	MF _A / %	MF _B / %
	0	95	5
	15	5	95
Volumen injektiranja	2 µL		
Protok	0,2 mL min ⁻¹		
Temperatura kolone	30 °C		
Detekcija (DAD)	231, 266 i 275 nm		
Detekcija (MS)	ESI+		

Kromatogrami ukupne ionske struje (engl. *the total ion current chromatogram*, TIC) snimljeni su uz postavke parametara ionskog izvora prema tablici 4 u rasponu vrijednosti *m/z* od 100 do 1300.

Tablica 4. Parametri ionskog izvora prema kojima su snimljeni kromatogrami ukupne ionske struje.

Temperatura pomoćnog plina	250 °C
Protok pomoćnog plina	11 dm ³ min ⁻¹
Tlak raspršivača	25 psi
Potencijal kapilare	2 500 V
Potencijal mlaznice	0 V
Temperatura plina za desolvataciju	200 °C
Protok plina za desolvataciju	17 dm ³ min ⁻¹
Potencijal fragmentora	100 V

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa (MS/MS) provedeni su kolizijom izazvanom disocijacijom (engl. *collision-induced dissociation*, CID) u pozitivnom načinu rada ionskog izvora pri čemu se kao kolizijski plin koristio N₂, uz korištenje kolizijskih potencijala pri vrijednostima od 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V. MS/MS eksperimenti provedeni su na karakterističnim ionima nabumetona kao i na ionima potencijalnih razgradnih produkata.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako bi se odredio stupanj razgradnje lijeka u uzorcima nabumetona te NAB/ β -CD koristila se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti, uz DAD detektor pri valnoj duljini detekcije od 231 nm. Iako je kromatografska analiza prvotno provedena pri više valnih duljina, odabrana je prethodno spomenuta jer se radi o najintenzivnijem maksimumu apsorpcije nabumetona, odnosno pri toj valnoj duljini je najveći odziv detektora. Odabrani uzorci podvrgnuti prisilnoj razgradnji dodatno su analizirani spregnutim sustavom tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti – spektrometrija masa visokog razlučivanja te su se proveli eksperimenti tandemne spektrometrije masa na odabranim ionima od interesa u svrhu strukturne karakterizacije potencijalnih razgradnih produkata NAB.

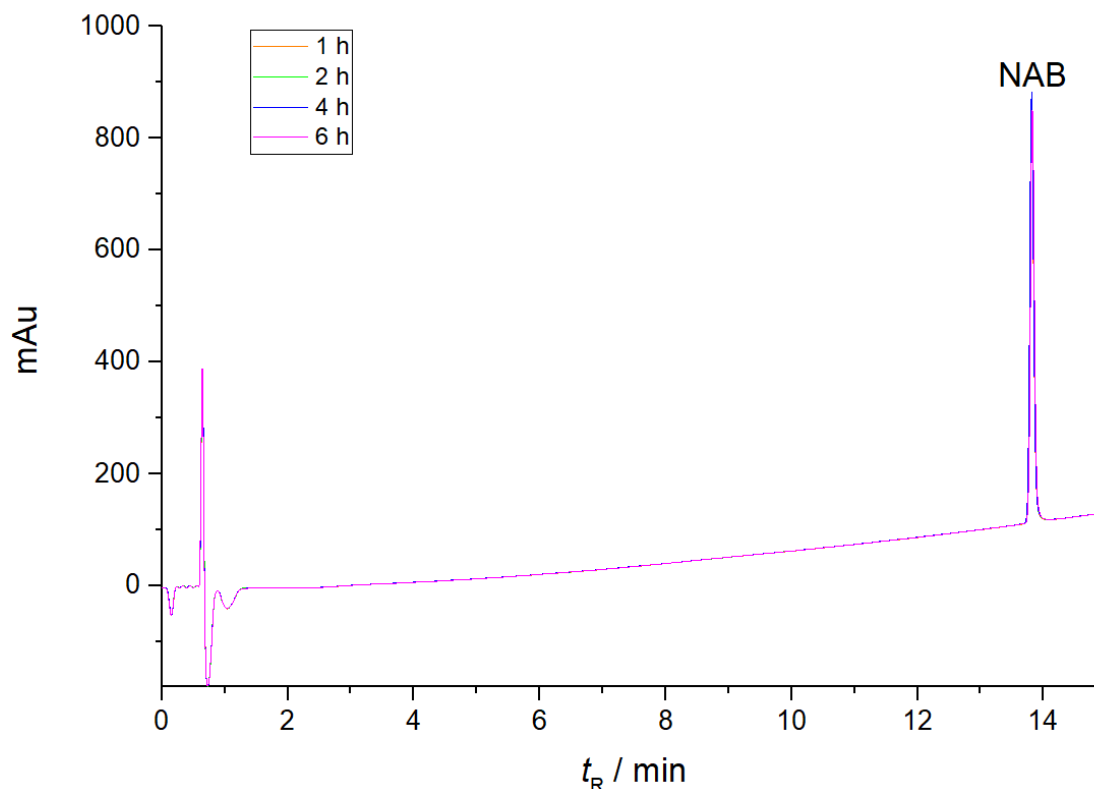
Pripravljene uzorci NAB s β -CD kao i uzorci čistog NAB izloženi su neutralnoj, kiseloj i bazičnoj hidrolizi te oksidativnim uvjetima, bez ili uz zagrijavanje pri 80 °C, kroz različite vremenske periode (1, 2, 4 i 6 h). Zbog izuzetno niske topljivosti NAB u vodenim otopinama⁴, kao kootapalo je korišten metanol LC-MS stupnja čistoće. Acetonitril nije korišten jer je uočeno odjeljivanje organske i vodene faze prilikom pripreve otopina za hidrolitičku razgradnju u kiselim i baznim uvjetima, kao što je ranije i navedeno. Najprije su analizirani kontrolni uzorci NAB (slika D1) i NAB/ β -CD (slika D2) kako bi se utvrdilo vrijeme zadržavanja nabumetona. Površine i vremena zadržavanja prikazane su u tablici D1. Također su analizirani i uzorci slijepih proba koje su sadržavale samo korišten sustav otapala metanol:H₂O=50:50 (slika D3), dodatak HCl i NaOH (slika D4) ili dodatak H₂O₂ (slika D5). Vrlo mali kromatografski pikovi uočeni u svim kromatogramima uzoraka NAB i NAB/ β -CD pri vremenima zadržavanja od 8,4 min te 8,8 min, također su prisutni i u kromatogramima spomenutih slijepih proba te su stoga izuzeti od daljnje analize.

4.1. Analiza uzoraka nabumetona nakon prisilne razgradnje pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti

4.1.1. Utjecaj neutralnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona

Prisilna razgradnja pri neutralnim hidrolitičkim uvjetima uz povišenu temperaturu od 80 °C, provela se na četiri uzorka nabumetona u različitim vremenskim periodima (1, 2, 4 i 6 h). Tako

su dobiveni karakteristični kromatogrami pri valnoj duljini od 231 nm pomoću kojih se može zaključiti da je nabumeton pri navedenim uvjetima stabilan (slika 15).



Slika 15. Kromatogrami uzoraka NAB nakon hidrolitičke razgradnje u neutralnim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

U pripadajućim kromatogramima uočen je samo pik nabumetona pri vremenu zadržavanja od 13,81 min (tablica 5) što je potvrda da pri neutralnim hidrolitičkim uvjetima ne dolazi do razgradnje i nastanka razgradnih produkata. Izračunat je postotak razgradnje prema očitanim površinama ispod kromatografskih pikova nabumetona iz kontrolnih uzoraka te uzoraka na kojima je provedena prisilna razgradnja prema izrazu:

$$\% \text{ Razgradnja} = \frac{P_{\text{kontrolni uzorak}} - P_{\text{razgrađeni uzorak}}}{P_{\text{kontrolni uzorak}}} \times 100 \quad (9)$$

Prvotno su uočene razlike u površinama pika nabumetona u uzorcima koji su podvrgnuti razgradnji, što je upućivalo na njegovu razgradnju, ali novi pikovi nisu uočeni. Neznatne razlike

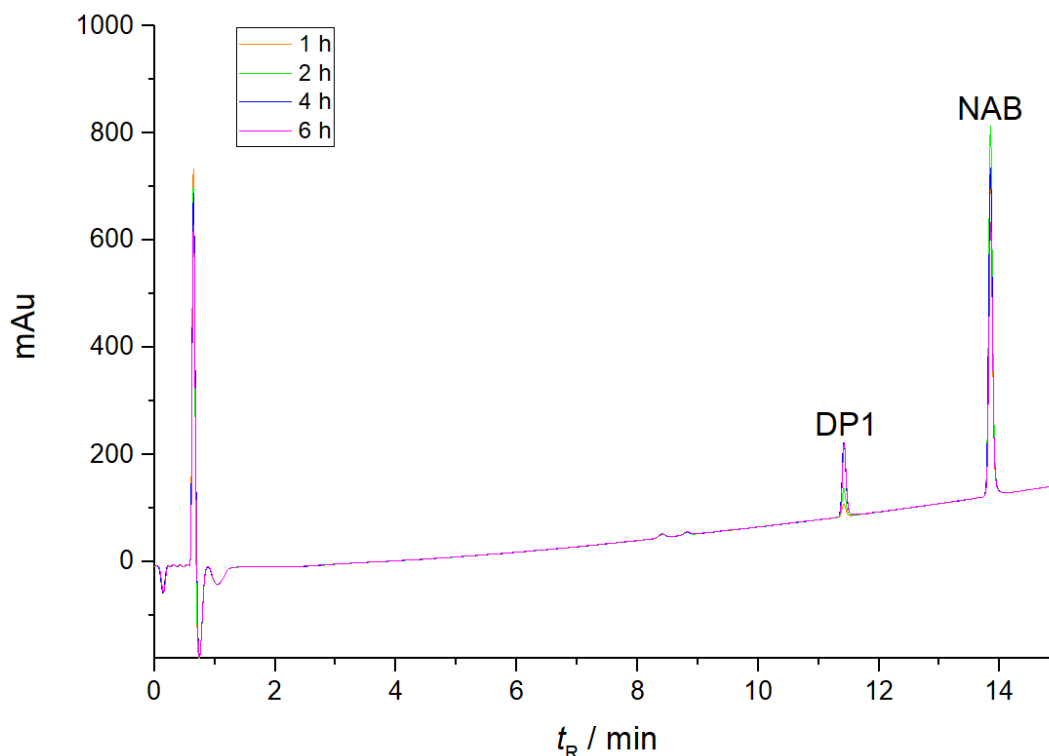
u površinama uzoraka mogu se pripisati pogrešci pri pipetiranju tijekom pripreve uzoraka ili prilikom razrjeđivanja uzoraka prije analize tekućinskom kromatografijom.

Tablica 5. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB nakon razgradnje u neutralnim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm.

Uzorak	P	t_R / min	%
kontrola	3436,6	13,81	-
1 h (80 °C)	3303,8	13,81	3,9
2 h (80 °C)	3390,6	13,81	1,3
4 h (80 °C)	3461,8	13,81	-0,7
6 h (80 °C)	3322,4	13,82	3,3

4.1.2. Utjecaj kiselih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona

Prisilna razgradnja pri kiselim hidrolitičkim uvjetima uz povišenu temperaturu od 80 °C u različitim vremenskim periodima (1, 2, 4 i 6 h) provedena je na uzorcima nabumetona dodatkom otopine HCl koncentracije 5 mol dm⁻³ te su uzorci analizirani nakon neutralizacije. Četiri uzoraka su razgrađivana i pri sobnoj temperaturi (slika D6), ali se uz karakteristični pik nabumetona nisu uočili nikakvi dodatni pikovi koji bi upućivali na nastajanje razgradnih produkata. Međutim, prilikom kromatografske analize nakon podvrgavanja takvih otopina povišenoj temperaturi uočen je novi pik pri 11,42 min (slika 16, tablica 6).



Slika 16. Kromatogrami uzoraka NAB nakon hidrolitičke razgradnje u kiselim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

Na kromatogramu se vidi povećanje odziva detektora za razgradni produkt 1 (DP1) s povećanjem vremena zagrijavanja dok se površina kromatografskog pika nabumetona smanjuje. Može se zaključiti da je razgradnja proporcionalna vremenu zagrijavanja. Prema površini kromatografskog pika nabumetona izračunati su postoci razgradnje za sve uzorke (tablica 6). Nakon 6 sati zagrijavanja pri 80 °C dolazi do najvećeg postotka razgradnje od 32,9 %. U usporedbi s rezultatima za neutralnu razgradnju ili za kiselu razgradnju pri sobnoj temperaturi vidi se kako kombinacijom zagrijavanja i dodatkom HCl postotak razgradnje postaje veći. Odstupanja uočena kod površina pikova mogu se pripisati pogrešci pri pipetiranju ili prilikom razrjeđivanja uzoraka prije analize.

Kod zagrijavanja 6 h pri 14,46 min se također pojavljuje novi pik od interesa, no njegova površina je izuzetno mala 4,6, što čini 0,15 % od pika NAB. Ovaj pik (s malom razlikom u vremenu zadržavanja) je bio nešto izraženiji pri drugim valnim duljinama.

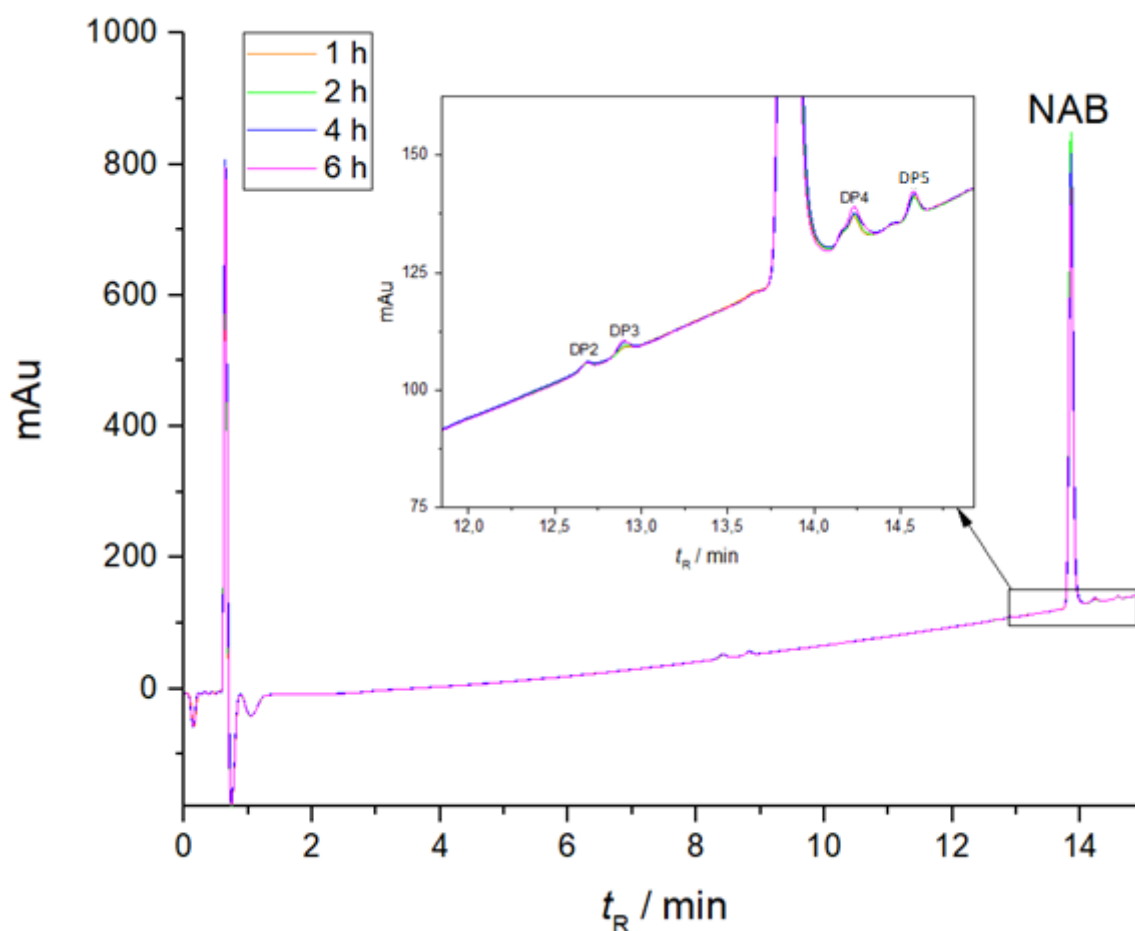
Tablica 6. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB nakon razgradnje u kiselim hidrolitičkim uvjetima bez ili uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm.

Uzorak	NAB			DP1	
	P	t_R / min	%	P	t_R / min
kontrola	3428,0	13,84	-		
1 h (s.t.)	2819,4	13,84	17,8	-	-
2 h (s.t.)	3341,1	13,85	2,5	-	-
4 h (s.t.)	3361,7	13,85	1,9	-	-
6 h (s.t.)	3229,9	13,84	5,8	-	-
1 h (80 °C)	2719,9	13,85	20,7	108,9	11,42
2 h (80 °C)	3180,3	13,85	7,2	238,2	11,42
4 h (80 °C)	2695,1	13,85	21,4	638,8	11,42
6 h (80 °C)	2298,5	13,85	32,9	621,4	11,42

s.t. = sobna temperatura

4.1.3. Utjecaj bazičnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona

Prisilna razgradnja pri bazičnim uvjetima uz povišenu temperaturu od 80 °C te pri sobnoj temperaturi provedena je u različitim vremenskim periodima (1, 2, 4 i 6 h) na uzorcima nabumetona dodatkom otopine NaOH koncentracije 5 mol dm⁻³ te su uzorci analizirani nakon neutralizacije. U kromatogramima uzoraka koji su podvrgnuti razgradnji pri sobnoj temperaturi uočava se samo pik nabumetona pri 13,86 min (slika D7, tablica 7), dok se u kromatogramima uzoraka koji su razgrađivani uz zagrijavanje nalaze dodatni pikovi malih površina (slika 17). Može se zaključiti kako je nabumeton podložniji hidrolitičkoj razgradnji u kiselim uvjetima u usporedbi s hidrolitičkom razgradnjom u bazičnim uvjetima.



Slika 17. Kromatogrami uzoraka NAB nakon hidrolitičke razgradnje u bazičnim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

Pik pri vremenu zadržavanja 12,68 min odgovara DP2, pik pri 12,89 min DP3, pri 14,2 min DP4 te pik pri 14,59 odgovara DP5. Treba naglasiti da su površine pikova razgradnih produkata DP2-DP5 vrlo male i nije bila moguća MS analiza, provedena za neke druge razgradne produkte u nastavku rada.

Izračunati su postoci razgradnje prema površinama kromatografskih pikova nabumetona u uzorcima (tablica 7). Najveći postotak razgradnje utvrđen je za uzorak koji je podvrgnut povišenoj temperaturi u trajanju od šest sati. Odstupanja među površinama pikova mogu se pripisati greškama prilikom pipetiranja i razrjeđivanja.

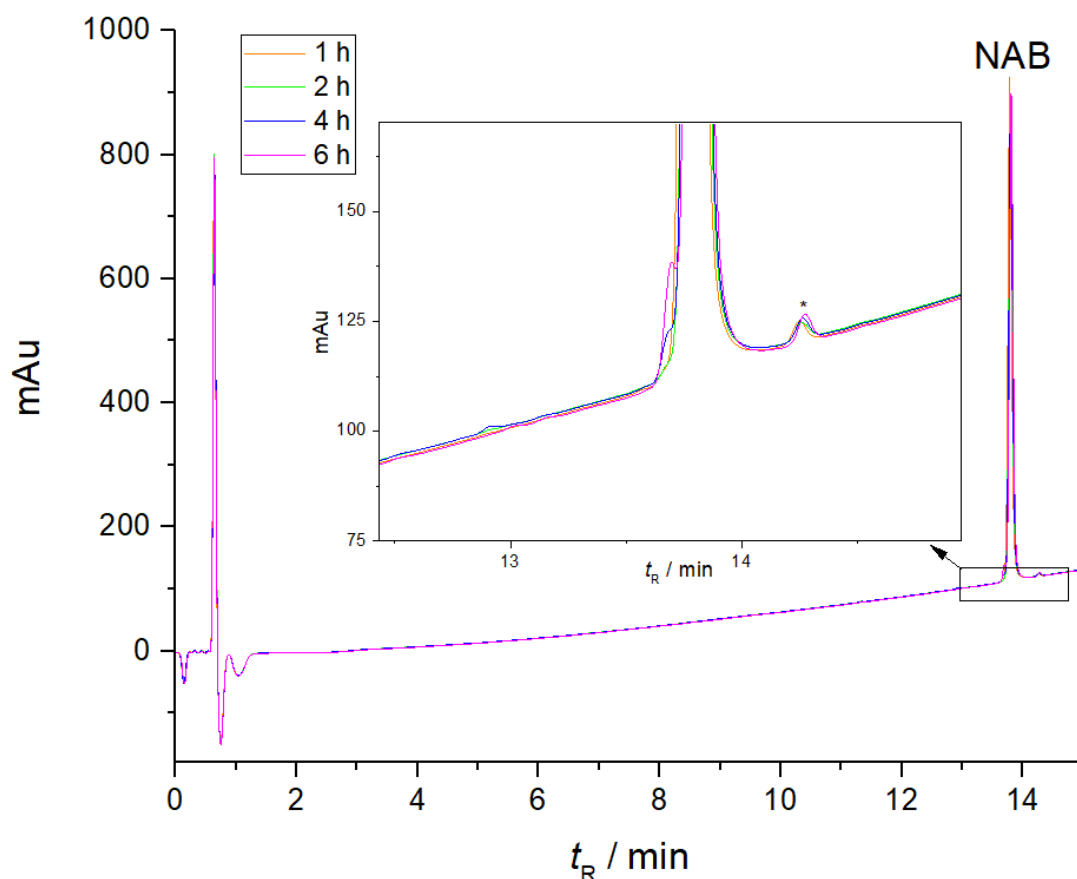
Tablica 7. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB nakon razgradnje u bazičnim hidrolitičkim uvjetima bez ili uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm.

Uzorak	NAB			DP2		DP3		DP4	
	P	t_R / min	%	P	t_R / min	P	t_R / min	P	t_R / min
kontrola	3428,0	13,84	-	-	-	-	-	-	-
1 h (s.t.)	3321,9	13,84	3,1	-	-	-	-	-	-
2 h (s.t.)	3199,8	13,86	6,7	-	-	-	-	-	-
4 h (s.t.)	3184,4	13,86	7,1	-	-	-	-	-	-
6 h (s.t.)	3609,2	13,86	-5,3	-	-	-	-	-	-
1 h (80 °C)	3014,7	13,85	12,1	-	-	-	-	66,6	14,23
2 h (80 °C)	3271,6	13,85	4,6	-	-	5,2	12,92	87,9	14,23
4 h (80 °C)	3137,2	13,85	8,5	4,2	12,69	8,7	12,91	91,9	14,24
6 h (80 °C)	2793,5	13,85	18,5	5,2	12,69	12,4	12,89	89,9	14,23

s.t. = sobna temperatura

4.1.4. Utjecaj oksidativnih uvjeta na razgradnju nabumetona

Prisilna razgradnja pri oksidativnim uvjetima uz povišenu temperaturu od 80 °C te pri sobnoj temperaturi provedena je u različitim vremenskim periodima (1, 2, 4 i 6 h) na uzorcima nabumetona dodavanjem 10 % otopine H₂O₂. U prikazanim kromatogramima koji se odnose na uvjete bez i uz zagrijavanje vidi se kromatografski pik pri vremenu zadržavanja od 14,20 min (slike D8 i 18, tablica 8), označen zvjezdicom (*). Površina ovog pika bila je izuzetno mala te se nije znatno mijenjala s obzirom na vrijeme razgradnje.



Slika 18. Kromatogrami uzoraka NAB nakon razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

Kromatografski pik pri 14,20 min pojavljuje se u svim kromatogramima uzoraka u kojima je provedena razgradnja s H_2O_2 , a dodatan pik pri 13,69 min koji nije potpuno odijeljen od karakterističnog kromatografskog pika nabumetona pojavljuje se tek nakon zagrijavanja otopine u trajanju od šest sati. Navedeni pikovi nisu uočeni pri razgradnji uzorka nabumetona s β -CD, već je uočen veći broj drugih kromatografskih pikova. Moguće je da su navedeni kromatografski pikovi pri 13,69 i 14,20 min posljedica nečistoća u uzorku.

Postotak razgradnje izračunao se prema površinama pikova nabumetona u uzorcima koji su podvrgnuti razgradnji (tablica 8). Prema izračunatim postocima razgradnje utvrđena je znatno manja podložnost nabumetona razgradnji u oksidativnim uvjetima u odnosu na njegovu razgradnju u kiselim i bazičnim hidrolitičkim uvjetima.

Tablica 8. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB nakon razgradnje u oksidativnim uvjetima bez ili uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm.

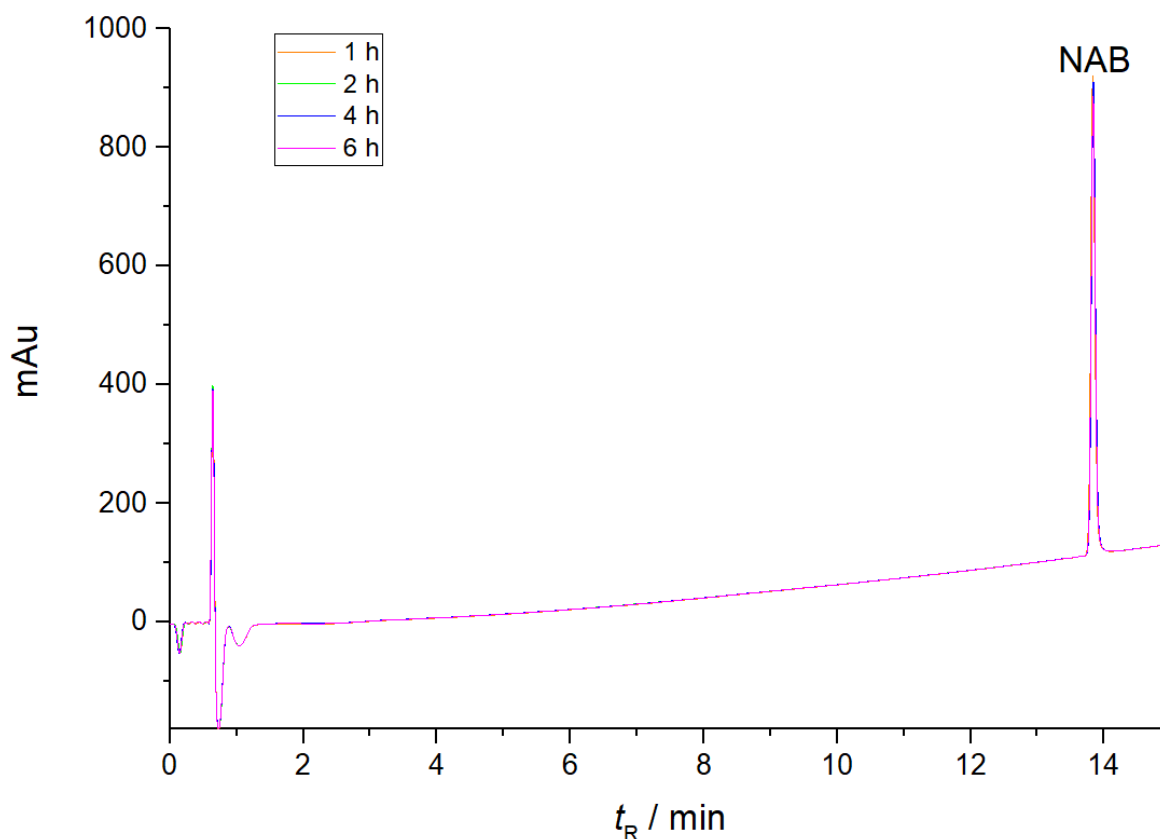
Uzorak	NAB		
	P	t_R / min	%
kontrola	3544,3	13,73	-
1 h (s.t.)	3626,7	13,75	-2,3
2 h (s.t.)	3584,8	13,76	-1,1
4 h (s.t.)	3637,2	13,76	-2,6
6 h (s.t.)	3608,4	13,78	-1,8
1 h (80 °C)	3664,2	13,78	-3,4
2 h (80 °C)	3319,7	13,79	6,3
4 h (80 °C)	3547,6	13,79	-0,1
6 h (80 °C)	3580,9	13,81	-1,0

s.t. = sobna temperatura

4.2. Analiza uzoraka nabumetona s β -CD nakon prisilne razgradnje pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti

4.2.1. Utjecaj neutralnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD

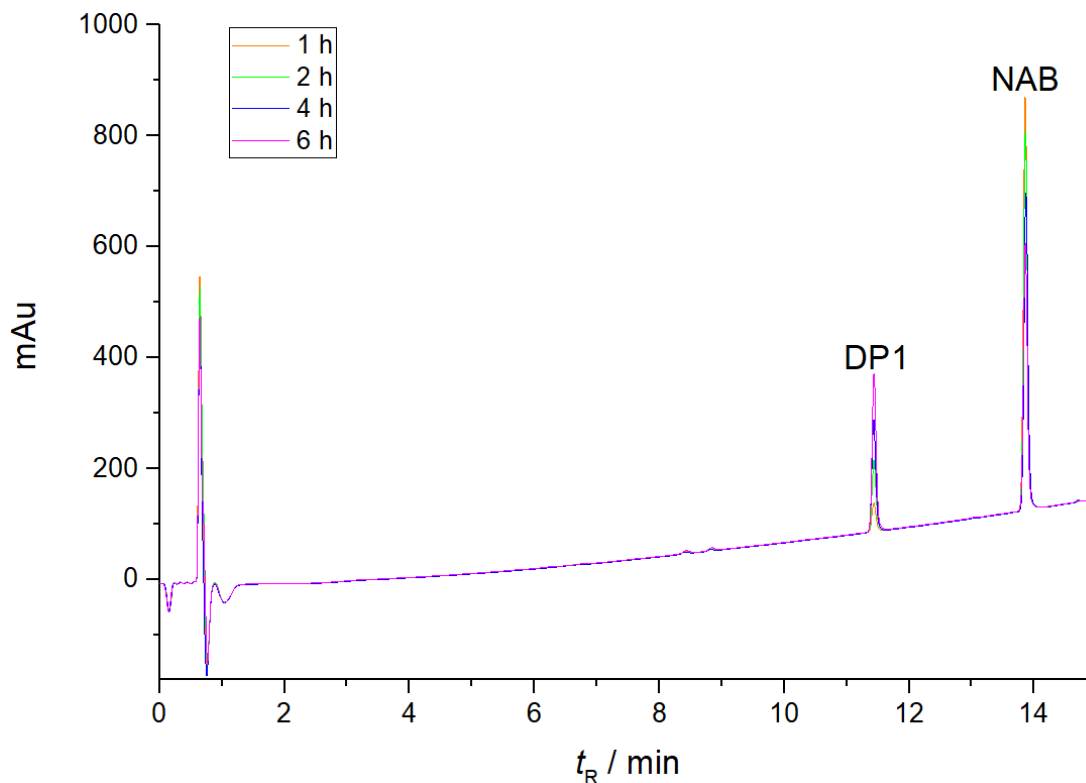
Nabumeton je pokazao stabilnost pri neutralnim hidrolitičkim uvjetima uz povišenu temperaturu i u prisutnosti β -CD, što je zaključeno uslijed izostanka dodatnih pikova u kromatogramu koji je prikazan na slici 19. Vrijednosti površina i vremena zadržavanja kromatografskih pikova nabumetona koje se odnose na uzorke koji su zagrijavani u različitim vremenskim periodima pri 80 °C su prikazane u tablici D2. Primjetne su neznatne razlike u površinama navedenih kromatografskih pikova.



Slika 19. Kromatogrami uzoraka NAB/ β -CD nakon hidrolitičke razgradnje u neutralnim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

4.2.2. Utjecaj kiselih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD

Prisutnost β -CD nije uzrokovala promjenu stabilnosti nabumetona prilikom podvrgavanja uzorka kiselim hidrolitičkim uvjetima pri sobnoj temperaturi. Razgradnja nabumetona nije uočena, što se može ustvrditi pregledom kromatograma koji su prikazani na slici D9. Međutim, nakon podvrgavanja uzorka nabumetona s β -CD kiselim hidrolitičkim uvjetima uz zagrijavanje pri 80 °C ponovno se uočava kromatografski pik pri 11,43 min koji odgovara DP1 (slika 20).



Slika 20. Kromatogrami uzoraka NAB/ β -CD nakon hidrolitičke razgradnje u kiselim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

Kromatografski pik nabumetona je pri vremenu zadržavanja od 13,86 min (tablica 9). U usporedbi s utjecajem kiselih hidrolitičkih uvjeta na uzorak samog nabumetona, uz prisutnost β -CD uočava se veća razgradnja uslijed zagrijavanja pri dužim vremenskim periodima. Primjerice, u uzorku NAB koji je zagrijavan šest sati postotak razgradnje iznosi 32,9 %, a uz prisutnost β -CD pri istim uvjetima on iznosi 40,2 %. Na temelju tih rezultata moglo bi se zaključiti da prisutnost β -CD narušava stabilnost NAB u kiselim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C. Međutim, nakon jednog sata zagrijavanja određena je veća razgradnja kod uzorka bez β -CD (20,7 %) u odnosu na uzorak s β -CD (5,6 %). Odstupanja u vrijednostima površina mogu proizlaziti iz pogreške prilikom pipetiranja kod pripreve uzoraka ili pri razrjeđivanju uzoraka prije analize stoga te eksperimente treba ponoviti kako bi se sa sigurnošću moglo utvrditi ima li β -CD utjecaj na stabilnost nabumetona.

U kromatogramu uzorka samog NAB se nakon šestosatnog zagrijavanja uočio pik pri 14,46 min, dok uz prisutnost β -CD taj pik izostaje, ali je u kromatogramima svih uzoraka s β -CD prisutan novi kromatografski pik pri 14,71 min s vrlo malim vrijednostima površina. Taj pik može ukazivati na prisutnost dodatnog razgradnog produkta.

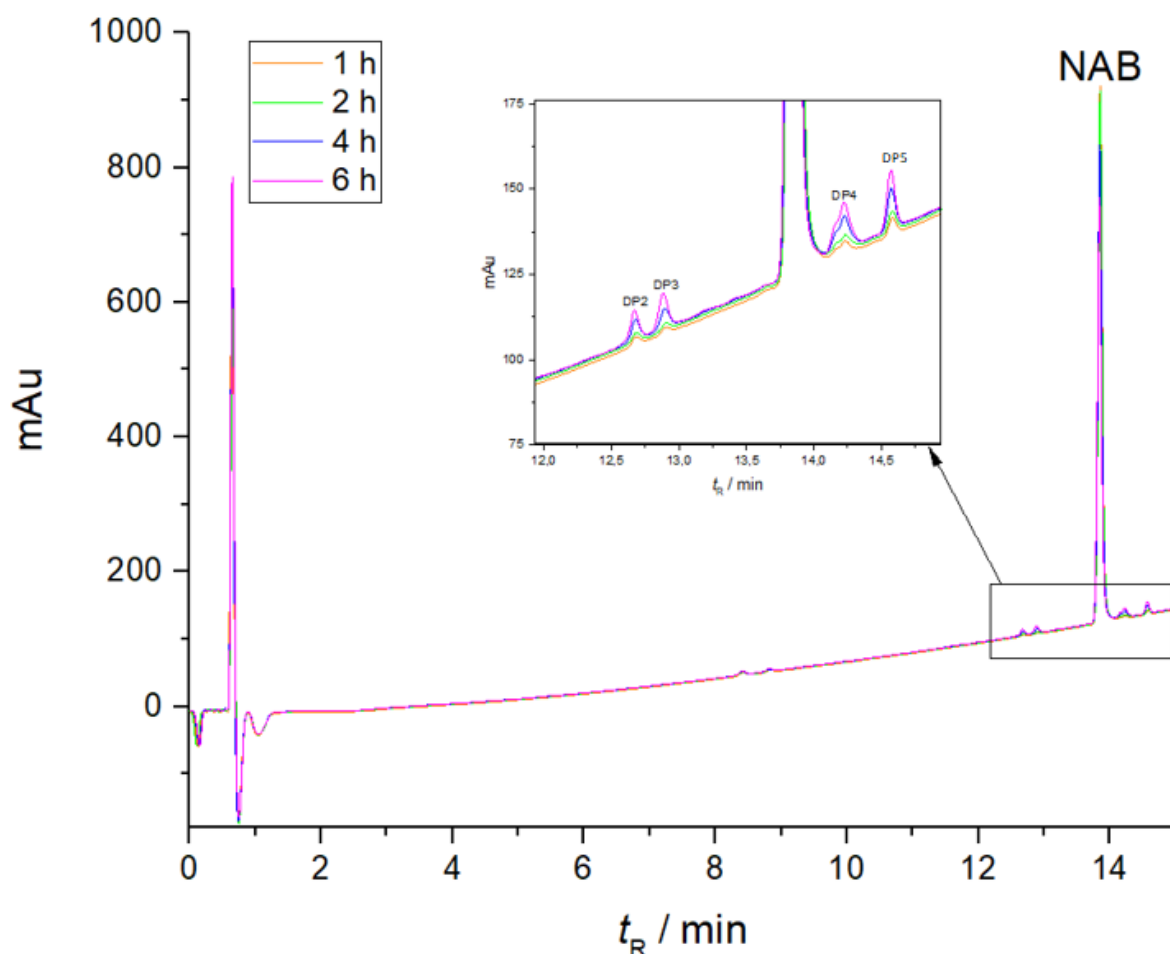
Tablica 9. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB/ β -CD nakon razgradnje u kiselim hidrolitičkim uvjetima bez ili uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm.

Uzorak	NAB			DP1	
	P	t_R / min	%	P	t_R / min
kontrola	3625,0	13,85	-	-	-
1 h (s.t.)	3636,7	13,86	-0,3	-	-
2 h (s.t.)	3585,0	13,86	1,1	-	-
4 h (s.t.)	3632,7	13,86	-0,2	-	-
6 h (s.t.)	3653,4	13,86	-0,8	-	-
1 h (80 °C)	3420,5	13,86	5,6	235,4	11,43
2 h (80 °C)	3123,8	13,86	13,8	591,8	11,43
4 h (80 °C)	2601,1	13,87	28,2	934,6	11,43
6 h (80 °C)	2169,1	13,86	40,2	1319,1	11,44

s.t. = sobna temperatura

4.2.3. Utjecaj bazičnih hidrolitičkih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD

Prilikom razgradnje u bazičnim hidrolitičkim uvjetima pri sobnoj temperaturi uzorka NAB/ β -CD nisu uočeni razgradni produkti što dovodi do zaključka da prisutnost β -CD ne uzrokuje smanjene stabilnosti samoga lijeka bez obzira na vrijeme izlaganja razgradnji (slika D10). Sam NAB također nije bio podložan razgradnji pri jednakim uvjetima, kao što je već ranije navedeno. Međutim, pri bazičnoj hidrolizi uz zagrijavanje (80 °C) nastaju razgradni produkti DP2 (12,68 min), DP3 (12,89 min), DP4 (14,2 min) te DP5 (14,5 min), uočeni u kromatogramima uzoraka samog NAB izloženog istim uvjetima bazične hidrolize (slika 21, tablica 10).



Slika 21. Kromatogrami uzoraka NAB/ β -CD nakon hidrolitičke razgradnje u bazičnim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

Postoci razgradnje NAB izračunati su korištenjem površina kromatografskih pikova nabumetona pri 13,85 min (tablica 10). U usporedbi s utjecajem bazičnih hidrolitičkih uvjeta na uzorak samog nabumetona, uz prisutnosti β -CD se uočavaju slični rezultati postotaka razgradnje. Najveći postotak razgradnje uočava se za vremenski period od šest sati za uzorak NAB/ β -CD te on iznosi 21,1 %, što je povećanje u usporedbi s razgradnjom u slučaju uzorka samoga nabumetona pri identičnim uvjetima gdje je iznosio 18,5 %. Međutim, nakon jednog sata nije došlo do razgradnje, dok je za sam NAB uočena razgradnja od 12,1 %.

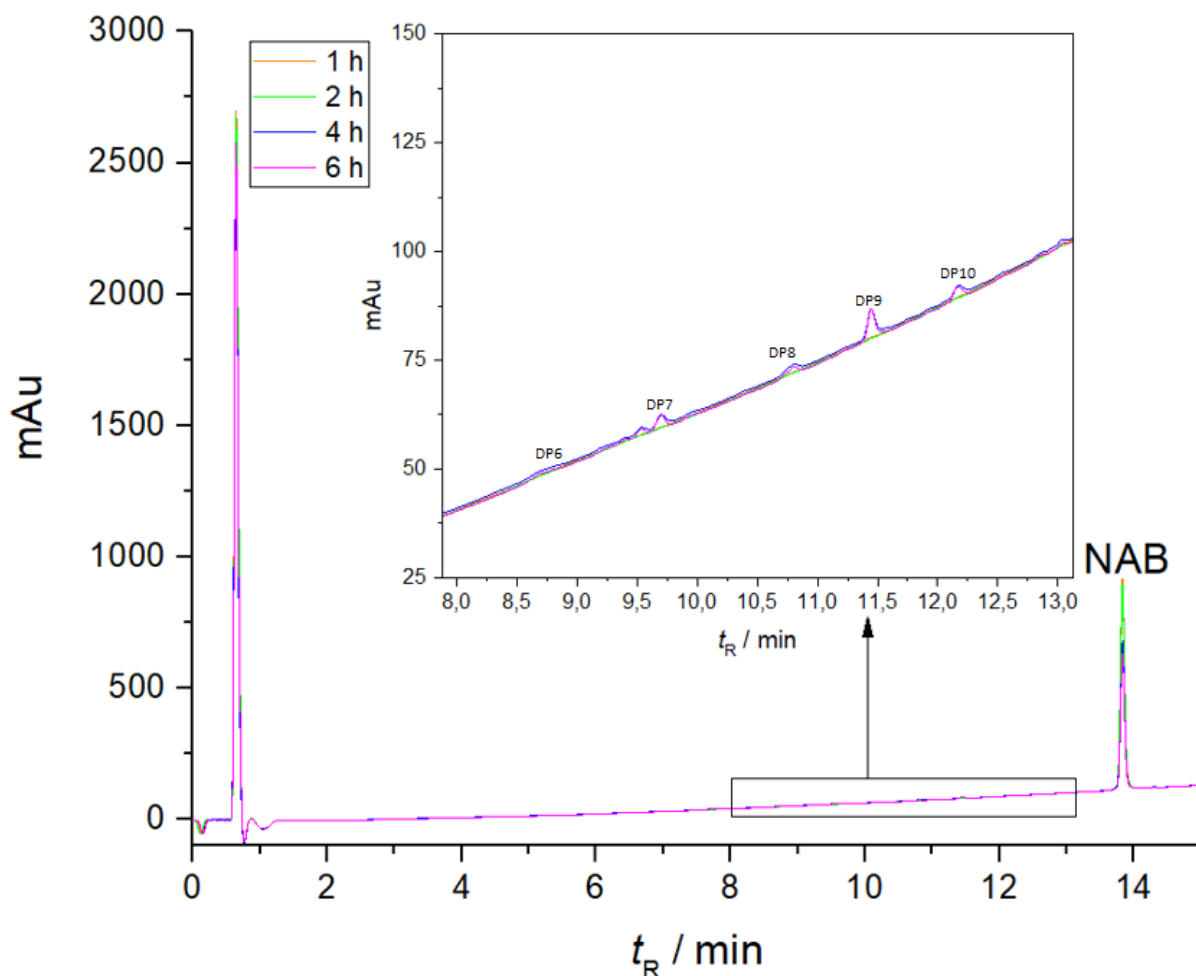
Tablica 10. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB/ β -CD nakon razgradnje u bazičnim hidrolitičkim uvjetima bez ili uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm.

Uzorak	NAB			DP2		DP3		DP4	
	P	t_R / min	%	P	t_R / min	P	t_R / min	P	t_R / min
kontrola	3625,0	13,85	-	-	-	-	-	-	-
1 h (s.t.)	3649,8	13,85	-0,7	-	-	-	-	-	-
2 h (s.t.)	3657,7	13,85	-0,9	-	-	-	-	-	-
4 h (s.t.)	3578,3	13,85	1,3	-	-	-	-	-	-
6 h (s.t.)	3650,7	13,85	-0,7	-	-	-	-	-	-
1 h (80 °C)	3625,0	13,85	0	9,3	12,68	5,5	12,91	69,0	14,23
2 h (80 °C)	3546,2	13,85	2,2	10,3	12,69	7,3	12,91	78,9	14,23
4 h (80 °C)	3217,8	13,84	11,2	25,8	12,68	25,1	12,89	103,4	14,23
6 h (80 °C)	2858,3	13,84	21,1	38,9	12,67	46,5	12,88	136,1	14,23

s.t. = sobna temperatura

4.2.4. Utjecaj oksidativnih uvjeta na razgradnju nabumetona uz prisutnost β -CD

U kromatogramima uzoraka NAB/ β -CD pri sobnoj temperaturi i uz zagrijavanje (slika D11 i slika 22) uočavaju se visoki pikovi za nezadržanu komponentu koja prolazi kroz kolonu bez zadržavanja te se stoga i prva eluira, kao što je bio slučaj i kromatogramima uzoraka nabumetona koji su bili razgrađivani u oksidativnim uvjetima. Otopina ovih uzoraka sadrži određeni udio vodikovog peroksida koji je korišten kao stresor prilikom ove razgradnje, a samim time se takav sustav otapala razlikuje od korištene mobilne faze što uzrokuje ovakav povećan odziv detektora u vremenu t_M . Na slici 22 uočava se smanjenje visine i površine kromatografskog pika NAB pri većim vremenskim intervalima, odnosno razgradnja se pospješuje duljim zagrijavanjem uzoraka NAB/ β -CD.



Slika 22. Kromatogrami uzoraka NAB/ β -CD nakon razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

Međutim, kromatografski pik NAB pri vremenu zadržavanja od 13,83 min je jedini jasno uočljiv pik u ovim kromatogramima. Ukoliko se kromatogram uveća u području eluiranja od 8. do 13. minute moguće je uočiti dodatne pikove vrlo niskih visina i površina. U usporedbi s rezultatima razgradnje u oksidativnim uvjetima za uzorak samog NAB, uz prisutnost β -CD se osim pika pri 14,2 min (koji je i ranije uočen) pojavljuju i pikovi pri 8,54 min (DP6), 9,70 min (DP7), 10,81 min (DP8), 11,45 min (DP9), 12,18 min (DP10), 13,19 min i 14,3 min te dodatan pik pri 7,77 min nakon zagrijavanja šest sati. Svi navedeni pikovi imaju postotak površine od oko 1 % površine kromatografskog pika NAB. U kromatogramima koji su dobiveni uz detekciju pri drugim valnim duljinama navedeni kromatografski pikovi također su bili vrlo niskog intenziteta.

Postoci razgradnje pri sobnoj temperaturi za uzorke NAB/ β -CD (tablica 11) se ne razlikuju u usporedbi s postocima razgradnje za uzorke samog NAB. Uzorci su stabilni u oba slučaja. Međutim, pri višim vremenskim intervalima, uz zagrijavanje, dolazi do velikih razlika u postocima razgradnje u odnosu na uzorke samog NAB. Primjerice, nakon šest sati zagrijavanja postotak razgradnje samog s NAB iznosi 1,0 %, dok kod uzorka NAB/ β -CD iznosi čak 33,8 %. Iz navedenih rezultata se može zaključiti da prisutnost β -CD destabilizira nabumeton u oksidativnim uvjetima uz zagrijavanje pri 80 °C.

Tablica 11. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB/ β -CD nakon razgradnje u oksidativnim uvjetima bez ili uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm.

Uzorak	NAB		
	P	t_R / min	%
kontrola	3577,6	13,82	-
1 h (s.t.)	3643,8	13,82	-1,9
2 h (s.t.)	3604,6	13,82	-0,8
4 h (s.t.)	3518,7	13,82	1,6
6 h (s.t.)	3600,0	13,83	-0,6
1 h (80 °C)	3649,3	13,83	-2,0
2 h (80 °C)	3567,5	13,83	0,3
4 h (80 °C)	2605,8	13,83	27,2
6 h (80 °C)	2366,9	13,83	33,8

s.t. = sobna temperatura

Prema navedenim rezultatima može se zaključiti kako je stabilnost nabumetona najveća prilikom neutralne hidrolitičke razgradnje, zatim pri oksidativnim uvjetima te bazičnim hidrolitičkim uvjetima, dok je najmanja pri kiselim hidrolitičkim uvjetima. Uz prisutnost β -CD, nabumeton je najstabilniji pri neutralnim hidrolitičkim uvjetima, zatim pri bazičnim hidrolitičkim uvjetima i oksidativnim uvjetima, dok je najnestabilniji pri kiselim hidrolitičkim uvjetima. Dobiveni se rezultati razlikuju od prije opisanih od strane Sushimithe i sur.⁵ (gdje je

poredak stabilnosti: termička razgradnja > bazična hidroliza > kisela hidroliza > oksidativni uvjeti) pri čemu su kao stresori korištene otopine HCl i NaOH koncentracije 1 mol dm⁻³ te 3 % H₂O₂. Rezultati se također razlikuju od onih koje su prikazali Vyas i sur.³⁷ koji su kao stresore koristili otopine HCl i NaOH koncentracije 2 mol dm⁻³ i 3 % H₂O₂ (termička razgradnja krutine > kisela hidroliza > bazična hidroliza > termička razgradnja otopine > oksidativni uvjeti).

Prema postotcima razgradnji koji su izračunati iz rezultata koji su dobiveni tekućinskom kromatografijom u sklopu ovog diplomskog rada može se primijetiti kako se stabilnost nabumetona smanjuje uz prisutnost β-CD uz zagrijavanje pri 80 °C. Prema rezultatima koji su prikazani u obliku kromatograma odabrani su uzorci kod kojih je uočena najveća razgradnja za daljnju karakterizaciju razgradnih produkata spektrometrijom masa visokog razlučivanja te tandemnom spektrometrijom masa.

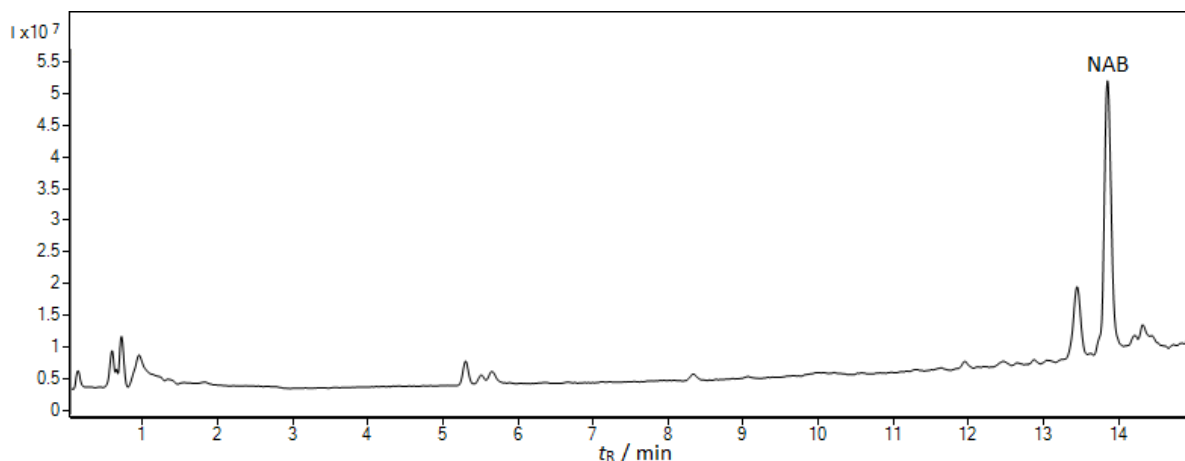
4.3. Analiza spektrometrijom masa visokog razlučivanja

Snimljeni su kromatogrami ukupne ionske struje za sve uzorke koji su razgrađivani šest sati uz zagrijavanje pri 80 °C te za kontrolne uzorke NAB i NAB/β-CD. Prilikom analize spektrometrijom masa visokog razlučivanja kao ionski izvor koristilo se elektroraspršenje uz pozitivnu ionizaciju (ESI+). Odabrani ioni analizirani su tandemnom spektrometrijom masa uz pozitivnu ionizaciju, pri čemu je fragmentacija provedena kolizijom iona s neutralnim molekulama dušika. Takav način fragmentacije, kolizijom izazvana disocijacija, proveden je pri različitim kolizijskim energijama (5, 10, 20 i 40 V). Prema dobivenim MS i MS/MS spektrima predložene su fragmentacijske sheme i strukture razgradnih produkata.

Neki od kromatograma ukupne ionske struje kao i neki od MS spektara za pojedine uzorke nalaze se u Dodatku (slike D12 – D24).

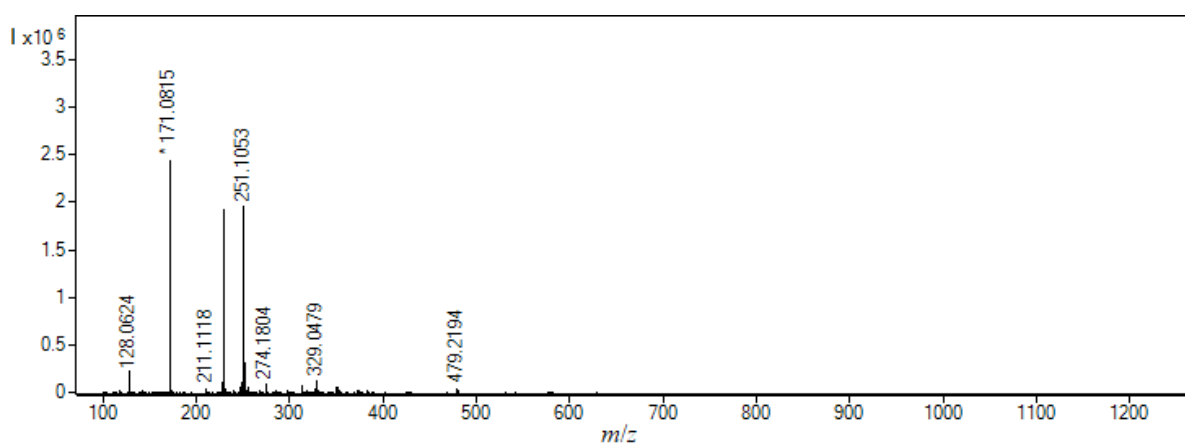
4.3.1. MS i MS/MS analiza nabumetona

Snimljen je kromatogram ukupne ionske struje kontrole nabumetona (slika 23). Pik pri vremenu zadržavanja od 13,86 min odgovara nabumetonu. U odgovarajućem spektru masa uočen je signal jednostruko protoniranog iona nabumetona s omjerom mase i naboja m/z 229,1231.



Slika 23. Kromatogram ukupne ionske struje kontrolnog uzorka nabumetona

Pik nabumetona uočen je pri vremenu zadržavanja od 13,86 min, a u pripadajućem spektru masa najintenzivniji signal odgovara ionu fragmenta čija vrijednost m/z iznosi 171,0815 (slika 24, tablica 12). Uz njega su prisutni i signali ostalih karakterističnih iona nabumetona poput jednostruko protoniranog molekuskog iona pri vrijednosti m/z od 229,1231 te signal iona adukta s natrijem pri vrijednosti m/z od 251,1053. Signal pri vrijednosti m/z od 479,2194 odgovara natrijevom aduktu dimera molekule nabumetona. U kromatogramu je uz navedeni pik pri vremenu zadržavanja od 13,86 min moguće primijetiti i neke dodatne pikove koji su posljedica onečišćenja, te stoga nisu dodatno analizirani i interpretirani.

Slika 24. MS spektar nabumetona ($t_R = 13,86$ min)

Tablica 12. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru nabumetona ($t_R = 13,86$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
479,2194	479,2193	-0,2	1,86	$[2M+Na]^+$
251,1053	251,1043	-3,9	79,46	$[M+Na]^+$
229,1231	229,1223	-3,5	77,45	$[M+H]^+$
171,0815	171,0804	-6,4	100	$[M+H-58]^+$

Kako bi se odredila struktura odabranih iona provela se fragmentacija tj. analiza tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) pri različitim kolizijskim energijama (5, 10, 20 i 40 V). Odstupanje monoizotopnih (točnih) od izmjerenih (eksperimentalnih) m/z izračunato je prema izrazu:

$$\text{Odstupanje (ppm)} = \frac{(m/z)_{\text{teor.}} - (m/z)_{\text{eksp.}}}{(m/z)_{\text{teor.}}} \times 10^6 \quad (10)$$

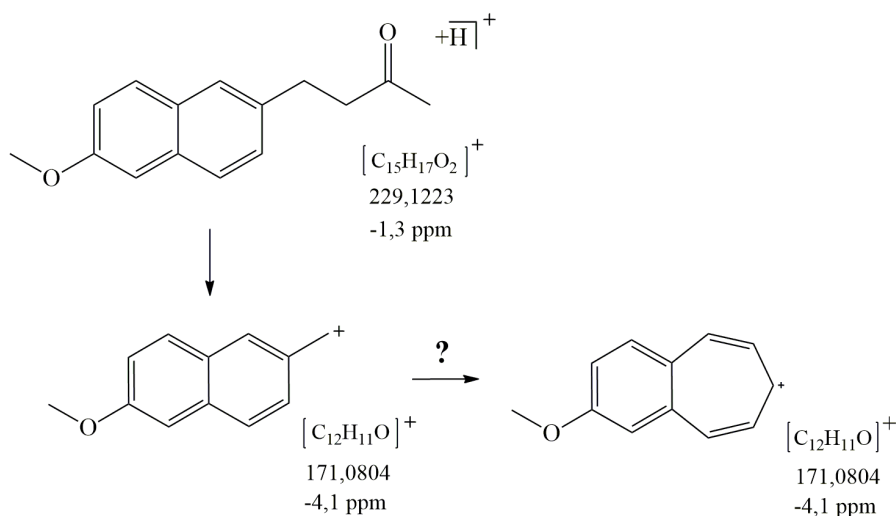
Rezultati fragmentiranja jednostruko protoniranog molekuskog iona nabumetona (m/z 229,1231) prikazani su u tablici 13 (slika D25). Iz molekuskog iona NAB (m/z 229,1231) gubitkom C_3H_6O (aceton) nastaje ion m/z 171,0811 čiji je intenzitet najveći i pri fragmentaciji od 20 V. Taj ion odgovara baznom signalu u MS spektru nabumetona (slika 24). Pri najvećoj kolizijskoj energiji, od 40 V, u spektru su uočeni signali pri vrijednostima m/z 156,0569 i 128,0619. Nastanak iona m/z 156,0569 mogao bi se objasniti homolitičkim cijepanjem iona m/z 171,0811, uz nastajanje kationskog radikala. Produkti ion pri m/z 128,0619 odgovara kationskom radikalu naftalena kojeg su u literaturi opisali West i sur.³⁸ Na temelju MS/MS spektara predložena je shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona NAB (m/z 229,1231), pri kolizijskom potencijalu od 10 V (slika 25).

Nastajanje kationskih radikala uobičajeno je pri ionizaciji elektronima, ali je također moguće u sklopu kolizijom inducirane disocijacije iona uz ionizaciju elektroraspršenjem. Elektroraspršenjem dolazi do nastanka iona parnog broja elektrona (engl. *even-electron ion*, EE^+), koji mogu biti protonirani $[M+H]^+$, deprotonirani $[M-H]^-$ i/ili ioni adukata npr. $[M+Na]^+$. Općenito, nakon cijepanja EE^+ nastaje novi kation s parnim brojem elektrona i neutralna molekula. Međutim, postoji manja vjerojatnost cijepanja uz gubitak radikala pri čemu nastaje

kationski radikal, odnosno ion s neparnim brojem elektrona (engl. *odd-electron ion*, $OE^{+\cdot}$). Nastali $OE^{+\cdot}$ mora biti stabilan, što ovisi o njegovoj strukturi i mogućnosti rezonancijske stabilizacije slobodnog elektrona.³⁹

Tablica 13. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima jednostruko protoniranog iona nabumetona ($m/z = 229,1231$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
229,1226	70,96	229,1219	7,42	-	-	-	-	$[M+H]^+$
171,0811	100	171,0812	100	171,0810	100	171,0804	24,99	$[C_{12}H_{11}O]^+$
156,0569	0,23	156,0567	0,29	156,0568	1,53	156,0569	9,00	$[C_{11}H_8O]^{+\cdot}$
128,0619	1,65	128,0620	1,84	128,0619	5,78	128,0626	100	$[C_{10}H_8]^+$



Slika 25. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona nabumetona ($m/z = 229,1231$) pri kolizijskom potencijalu od 10 V

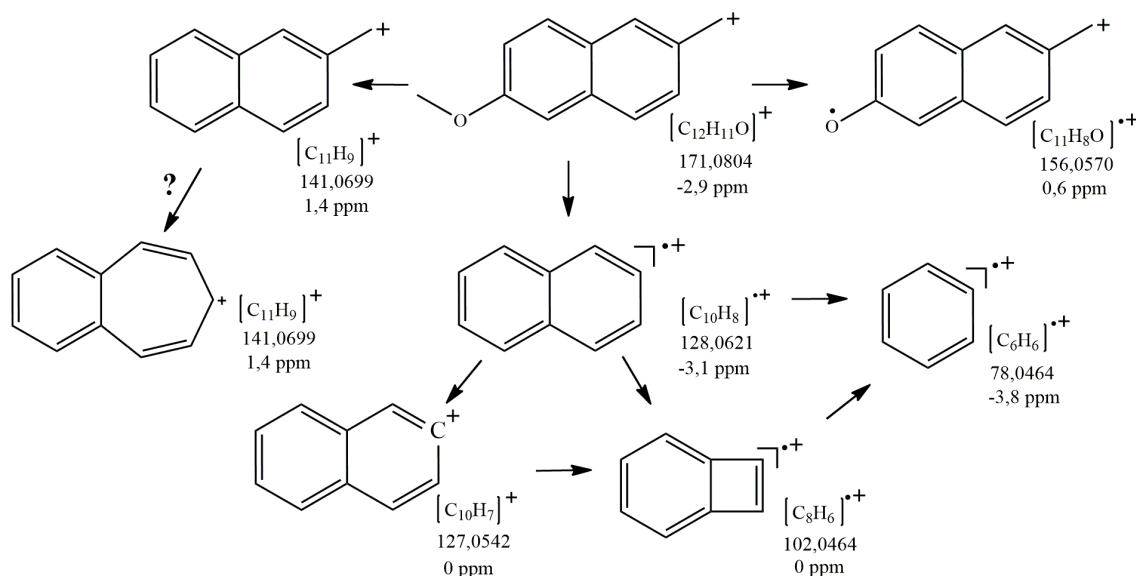
Kao što je već rečeno, signal iona m/z 171,0815 uočen je u MS spektru nabumetona kao bazni signal, te u MS/MS spektrima jednostruko protoniranog iona NAB ($m/z = 229,1231$). Iz dobivenih podataka može se zaključiti da do fragmentacije molekule nabumetona dolazi u ionskom izvoru (engl. *in-source fragmentation*, ISF). Fragmentacija unutar izvora koja se uočava tijekom

ionizacije elektroraspršenjem može otežati pa čak i uzrokovati pogrešnu interpretaciju spektara masa, identifikaciju metabolita u metabolomici, a time dovesti do pogrešnog tumačenja bioloških mehanizama. Na jednak način može otežati određivanje mehanizama degradacije prilikom provođenja studija prisilne razgradnje, kao što je bio slučaj u ovom diplomskom radu. Signali *in-source* fragmenata prisutni su u MS spektru čistog spoja te u njegovim MS/MS spektrima.⁴⁰

Tablica 14 prikazuje podatke dobivene nakon provedene MS/MS analize iona vrijednosti m/z 171,0815. Prilikom fragmentiranja ovog iona, slično kao i kod fragmentacije jednostruko protoniranog iona nabumetona, pri većim vrijednostima kolizijskog potencijala dolazi do homolitičkog cijepanja i nastanka iona pri m/z 156,0569. Signal velikog intenziteta pri m/z 128,0625 pripisan je kationskom radikal naftalena, nastalom homolitičkim cijepanjem, dok signal pri m/z 127,0542 odgovarajući EE^+ ion naftalena. Kationski radikal m/z 102,0464, čija je struktura također predložena u već spomenutoj publikaciji West i sur.³⁸, nastaje gubitkom C_2H_2 i formiranjem četveročlanog prstena iz m/z 127,0542 i/ili iz m/z 128,0625. Ion pri m/z 78,0467 je fenilni kationski radikal, a nastaje iz m/z 102,0464 gubitkom C_2H_2 i/ili iz m/z 128,0625 gubitkom C_4H_2 . Prema podacima je predložena shema fragmentiranja za ion m/z 171,0815 pri kolizijskom potencijalu od 20 V (slika 26).

Tablica 14. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima iona m/z 171,0815.

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
171,0809	100	171,0808	100	171,0809	100	171,0800	0,20	$[C_{12}H_{11}O]^+$
156,0570	0,39	156,0567	1,73	156,0569	21,15	156,0565	0,25	$[C_{11}H_8O]^{*+}$
141,0696	0,15	141,0697	0,51	141,0697	6,54	141,0700	0,59	$[C_{11}H_9]^+$
128,0620	2,26	128,0621	5,57	128,0625	98,86	128,0623	100	$[C_{10}H_8]^{*+}$
127,0543	0,13	127,0538	0,19	127,0542	2,83	127,0543	15,47	$[C_{10}H_7]^+$
-	-	102,0465	0,16	102,0464	1,04	102,0466	20,05	$[C_8H_6]^{*+}$
-	-	-	-	78,0467	0,51	78,0468	9,65	$[C_6H_6]^{*+}$

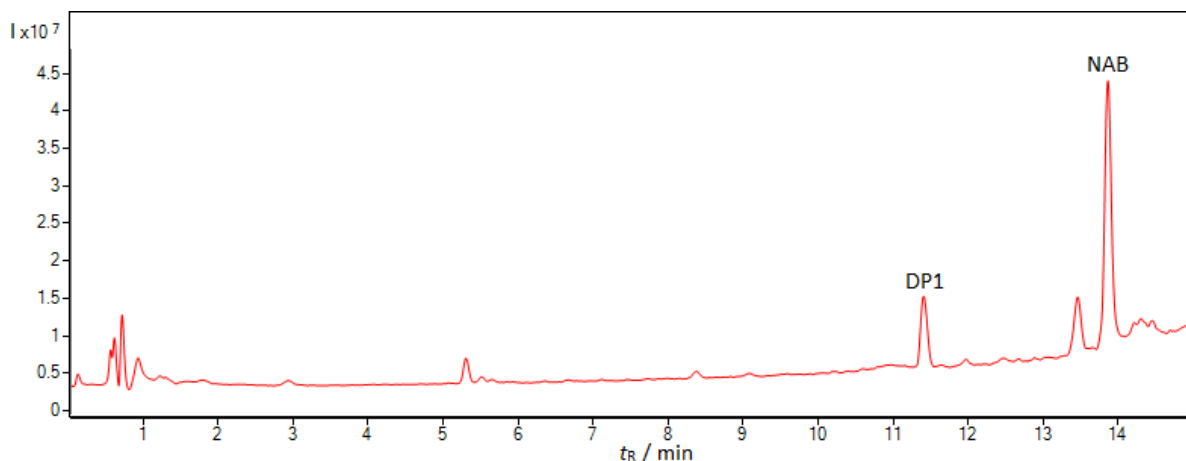


Slika 26. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 171,0815 pri kolizijskom potencijalu od 20 V

U MS spektru nabumetona (slika 24) signal pri m/z 251,1052 ima sličan relativni intenzitet kao signal jednostruko protoniranog iona nabumetona (m/z 229,1231). Usporedbom izmjerene (eksperimentalne) vrijednosti m/z te monoizotopne, teorijske vrijednosti m/z utvrđeno je da se radi o aduktu nabumetona s natrijem. MS/MS spektar navedenog iona pri kolizijskoj energiji od 20 V je prikazan na slici D26. Tandemnom spektrometrijom masa također se analizirao ion vrijednosti m/z 479,2194 (slika D27). Zaključeno je da navedeni ion odgovara aduktu dimera NAB s natrijem, koji fragmentira na neke od karakterističnih fragmenata NAB.

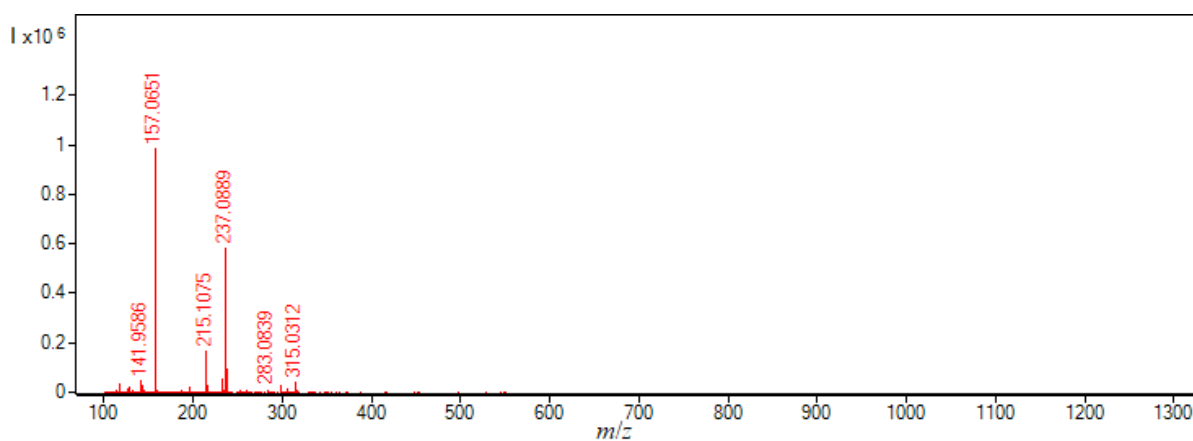
4.3.2. MS i MS/MS analiza nabumetona nakon razgradnje pri kiselim hidrolitičkim uvjetima

Na slici 27 prikazan je kromatogram ukupne ionske struje uzorka nabumetona nakon 6 h razgradnje u kiselim uvjetima pri 80 °C. Uz kromatografski pik pri vremenu zadržavanja od 13,83 min koji odgovara nabumetonu uočen je dodatan pik pri vremenu zadržavanja od 11,40 min koji odgovara razgradnom produktu 1 (DP1).



Slika 27. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB nakon 6 h razgradnje u kiselim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C

U pripadajućem spektru masa najintenzivniji signal, odnosno signal baznog iona odgovara onome pri m/z 157,0651 (slika 28, tablica 15). Uz njega su identificirani i ostali signali koji pripadaju ionima koji karakteriziraju ovaj razgradni produkt. Signali se nalaze pri m/z vrijednostima od 215,1075 te 237,0889 i vjerojatno su signali jednostruko protoniranog molekuskog iona te pripadajućeg adukta s natrijem ovog razgradnog produkta.



Slika 28. MS spektar razgradnog produkta DP1 ($t_R = 11,40$ min)

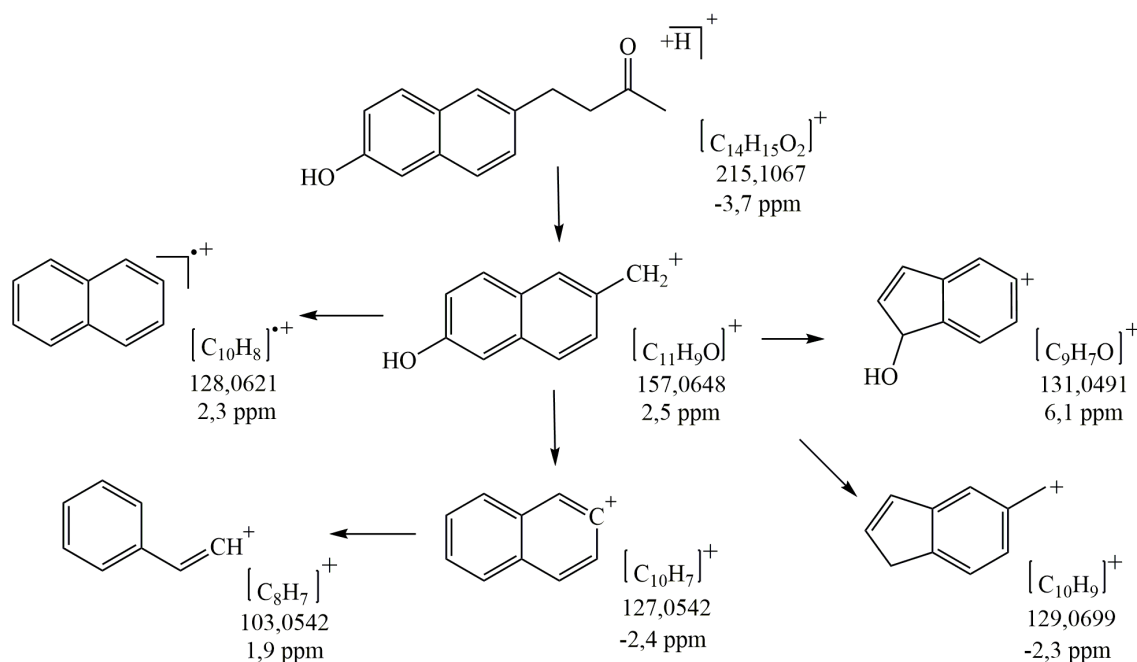
Tablica 15. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP1 ($t_R = 11,40$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
237,0889	237,0886	-1,3	59,16	[M+Na] ⁺
215,1075	215,1067	-3,7	16,61	[M+H] ⁺
157,0651	157,0648	-1,9	100	[M+H-58] ⁺

Tandemnom spektrometrijom masa analiziran je ion m/z 215,1075 pri različitim kolizijskim energijama. Rezultati su prikazani u tablici 16. Iz iona m/z 215,1062 gubitkom C₃H₆O (acetona) nastaje ion m/z 157,0644 kojem u MS/MS spektru odgovara signal najvećeg intenziteta. Nastali fragmentni ion dalje fragmentira dajući kationski radikal m/z 128,0618, strukture kao i fragment prikazan u sklopu MS/MS analize jednostruko protoniranog iona nabumetona. Također može doći do cijepanja prstena pri čemu iz iona m/z 157,0644 nastaje m/z 131,0483. Ion pri m/z 127,0545 ponovno odgovara EE⁺ ionu naftalena. Pucanjem veza unutar prstena iona m/z 127,0545 nastaje ion pri m/z 103,0533. Fragmentacija degradanta slična je fragmentaciji jednostruko protoniranog iona nabumetona. Intenzivan pik u kromatogramu ukupne ionske struje ukazuje da bi analizirani ion m/z 215,1075 mogao biti razgradni produkt NAB (DP1). Na temelju dobivenih podataka predložena je shema njegovog fragmentiranja (slika 29).

Tablica 16. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP1 ($m/z = 215,1075$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
215,1062	35,72	215,1067	4,16	-	-	-	-	$[C_{14}H_{15}O_2]^+$
157,0646	100	157,0645	100	157,0644	100	157,0644	60,38	$[C_{11}H_9O]^+$
-	-	131,0490	0,67	131,0483	1,10	131,0489	23,55	$[C_9H_7O]^+$
129,0694	0,49	129,0688	0,53	129,0702	1,46	129,0697	19,62	$[C_{10}H_9]^+$
128,0613	0,82	128,0605	0,70	128,0618	2,89	128,0620	100	$[C_{10}H_8]^+$
-	-	-	-	127,0545	1,07	127,0541	47,34	$[C_{10}H_7]^+$
-	-	-	-	103,0533	0,21	103,0537	7,76	$[C_8H_7]^+$



Slika 29. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 215,1075 pri kolizijskom potencijalu od 20 V

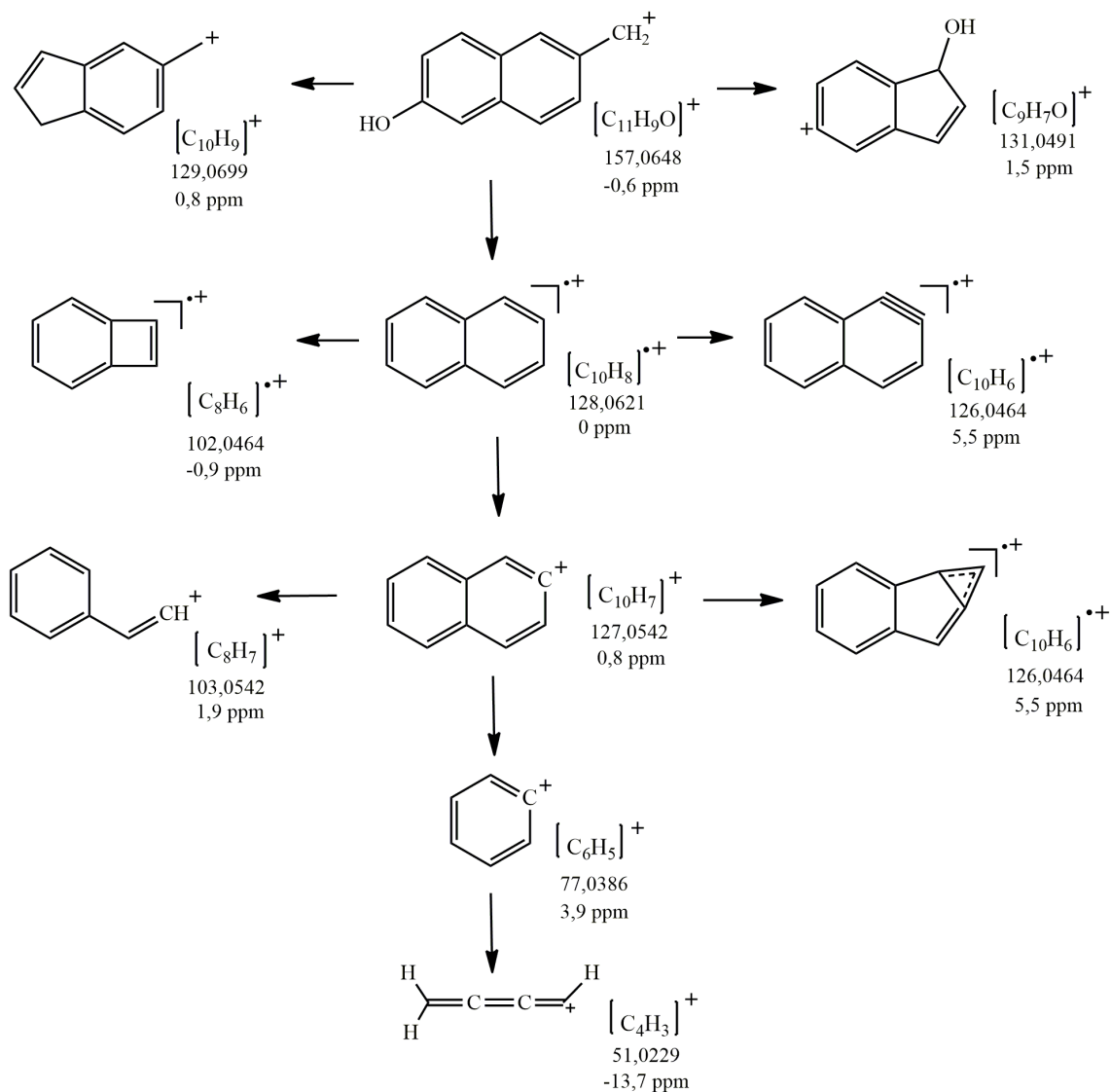
Također je provedena analiza tandemnom spektrometrijom masa iona m/z 157,0651 (tablica 17, slika 30), koji slično fragmentira kao i ion m/z 215,1075. Ponovno su uočeni signali fragmentnih

iona pri m/z 131,0489, 129,0698, 128,0621, 127,0541 te 103,0540 koji su ranije opisani. Kationski radikal pri m/z 128,0621 fragmentira dalje dajući ion m/z 102,0465 koji je uočen i pri fragmentiranju jednostruko protoniranog iona nabumetona. Uočeno je nastajanje kationskog radikala m/z 126,0457, čija je struktura objašnjena u publikaciji Westa i sur.³⁸ Autori navode kako ovaj ion nastaje od kationskog radikala m/z 128,0621 gubitkom H_2 . Međutim, također su predložili drugi način nastajanja kationskog radikala m/z 126,0457, i to iz iona m/z 127,0541. Pucanjem veza unutar prstena iona m/z 127,0541 nastaje ion pri m/z 103,0540. Fragmentiranjem m/z 127,0541 nastaje fenilni kation m/z 77,0383, a iz njega gubitkom C_2H_2 nastaje m/z 51,0236.

Ion pri m/z 157,0651 zapravo je fragment DP1 (m/z 215,1075) koji nastaje unutar ionskog izvora. To se može zaključiti zbog prisutnosti odgovarajućeg signala u MS spektru razgradnog produkta DP1 kao i zbog sličnog načina fragmentiranja.

Tablica 17. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima iona $m/z = 157,0651$.

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
157,0648	100	157,0651	100	157,0649	100	157,0644	1,20	$[C_{11}H_9O]^+$
131,0486	0,22	131,0490	0,64	131,0489	10,05	131,0489	12,14	$[C_9H_7O]^+$
129,0698	0,47	129,0696	1,44	129,0698	18,66	129,0692	1,33	$[C_{10}H_9]^+$
128,0623	0,82	128,0622	2,21	128,0621	43,96	128,0621	100	$[C_{10}H_8]^{*+}$
127,0542	0,44	127,0541	1,05	127,0541	18,04	127,0541	37,28	$[C_{10}H_7]^+$
-	-	-	-	126,0457	0,19	126,0463	6,98	$[C_{10}H_6]^{*+}$
-	-	-	-	103,0540	1,42	103,0541	20,01	$[C_8H_7]^+$
-	-	-	-	102,0465	0,33	102,0462	14,44	$[C_8H_6]^{*+}$
-	-	-	-	-	-	101,0384	5,02	-
-	-	-	-	-	-	89,0386	6,85	-
-	-	-	-	-	-	78,0464	6,42	$[C_6H_6]^{*+}$
77,0382	0,11	77,0385	0,15	77,0383	0,90	77,0387	56,27	$[C_6H_5]^+$
-	-	-	-	63,0226	0,18	63,0230	9,02	-
-	-	-	-	51,0236	0,15	51,0231	9,77	$[C_4H_3]^+$

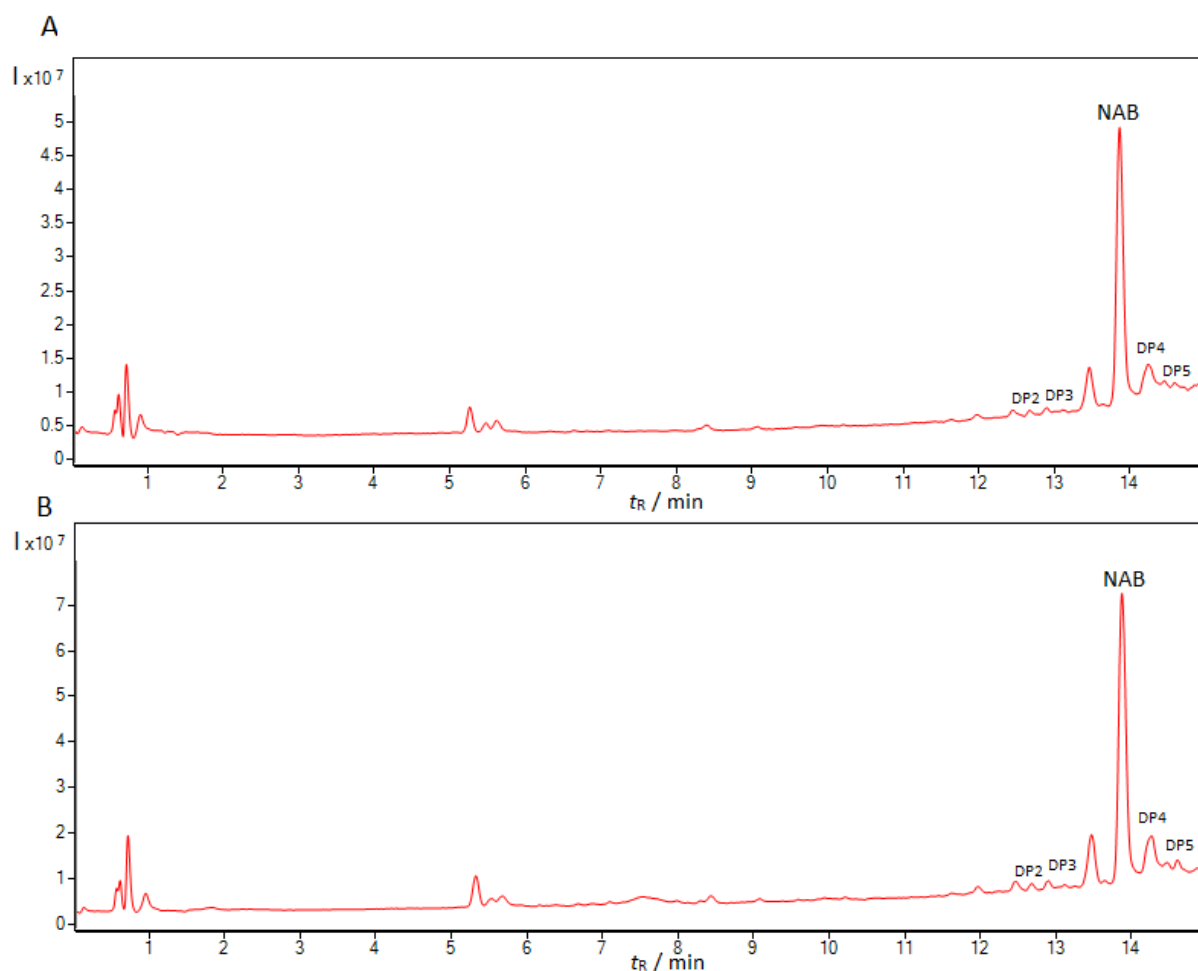


Slika 30. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 157,0651 pri kolizijskom potencijalu od 20 V

Tandemnom spektrometrijom masa analizirana su i preostala dva iona od interesa (slika 28) pri različitim kolizijskim energijama. Ion vrijednosti m/z 237,0889 odgovara aduktu DP1 (m/z 215,1075) s natrijem (Slika D28), a za ion m/z 315,0312 je pretpostavljeno da se radi o dimeru fragmenta m/z 157,0651 nastalom u ionskom izvoru (Slika D29). Taj ion fragmentira na zanimljiv način dajući fragmentni ion m/z 157,0645 te još neke fragmentne ione nešto većih vrijednosti m/z .

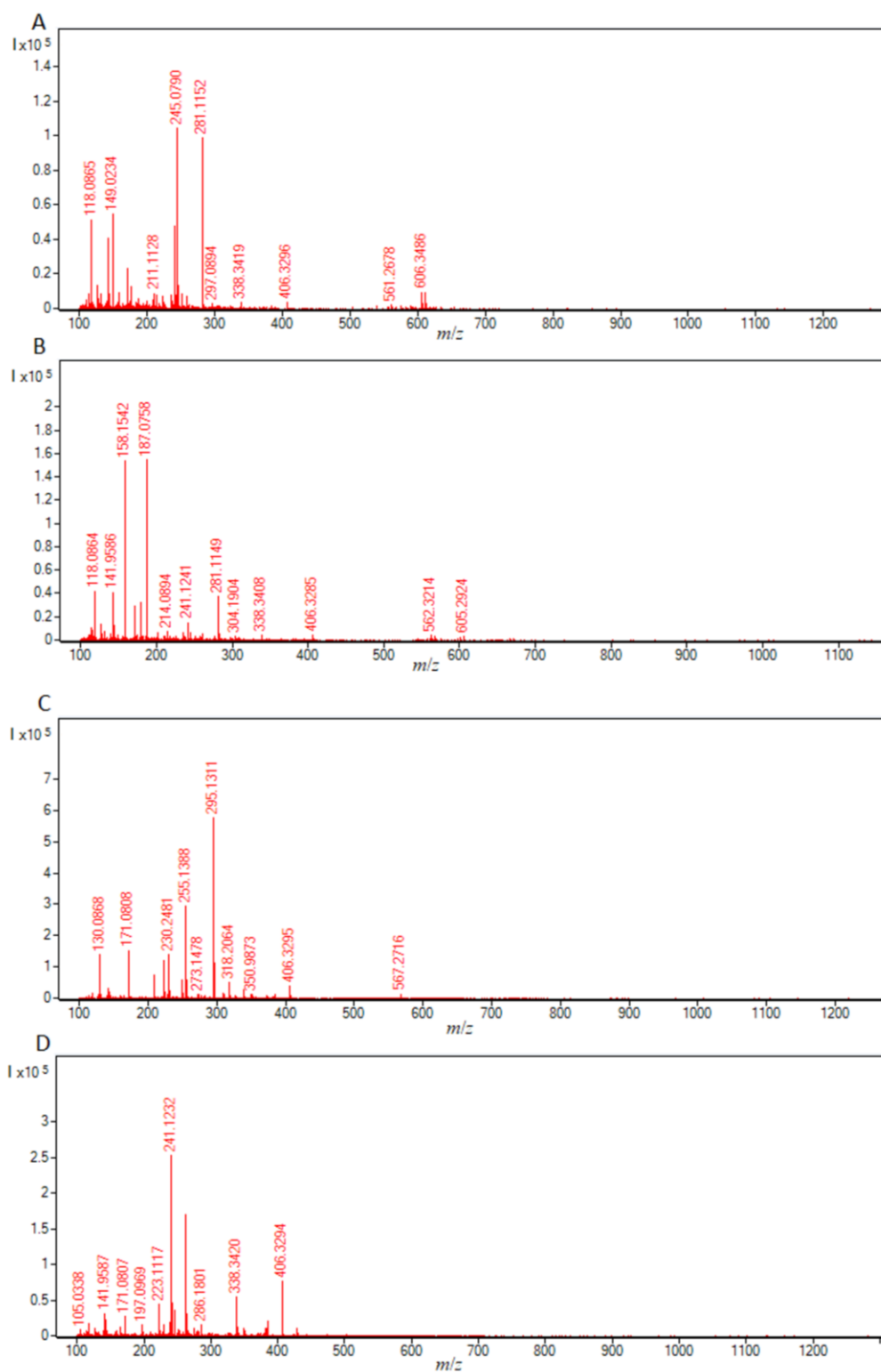
4.3.3. MS i MS/MS analiza nabumetona nakon razgradnje pri bazičnim hidrolitičkim uvjetima

Kromatogram ukupne ionske struje uzorka nabumetona koji je bio podvrgnut bazičnim uvjetima hidrolitičke razgradnje pri 80 °C u trajanju od 6 h, snimljen je uz volumen injektiranja od 2 µL. Međutim, pri tom volumenu injektiranja pikovi potencijalnih razgradnih produkata bili su malih površina pa ioni od interesa nisu imali dovoljnu zastupljenost da bi ih se izoliralo za MS/MS analize. Stoga je volumen injektirana povećan na 4 µL (slika 31). Uz kromatografski pik pri vremenu zadržavanja od 13,83 min koji odgovara nabumetonu uočeni su i dodatni pikovi pri različitim vremenima zadržavanja. Pikovi pri 12,68 min, 12,88 min, 14,26 min te pik pri 14,60 min mogli bi potjecati od potencijalnih razgradnih produkata nabumetona.



Slika 31. Kromatogrami ukupne ionske struje uzorka NAB nakon 6 h razgradnje u bazičnim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C, pri volumenu injektiranja od 2 µL (A) i 4 µL (B)

Karakteristični MS spektri spojeva kojima odgovaraju prethodno navedeni kromatografski pikovi prikazani su na slici 32. Unatoč povećanju volumena injektiranja s 2 na 4 μL u nekim slučajevima nije bilo moguće izolirati željene ione kako bi se kvalitetno provela analiza tandemnom spektrometrijom masa. U slučaju nekih MS spektara problem je predstavljao veći broj iona koji su pripadali potencijalnim produktima razgradnje u bazičnim hidrolitičkim uvjetima.



Slika 32. MS spektri potencijalnih razgradnih produkata s vremenom zadržavanja 12,68 (A), 12,88 (B), 14,26 (C) te 14,60 min (D)

Za daljnju analizu tandemnom spektrometrijom masa uspješno je izoliran ion m/z 187,0758 (kromatografski pik pri 12,88 min, tablica 18) te ion m/z 241,1232 (kromatografski pik pri 14,60 min, tablica 19). U spektru masa koji odgovara spoju s pikom pri 12,88 min se uz ion pri m/z 187,0758 uočava i ion pri m/z 158,1542 koji je vjerojatno njegov fragment nastao uslijed fragmentacije unutar ionskog izvora. Isto vrijedi i za ion pri m/z 223,1117 (pik u kromatogramu s vremenom zadržavanja od 14,60 min). Ovaj ion je fragment iona m/z 241,1232. Ion pri m/z 263,1052 je odgovarajući natrijev adukt tog spoja.

Tablica 18. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP3 ($t_R = 12,88$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
187,0758	187,0754	-2,1	90,57	[M+H] ⁺
158,1542	-	-	100	-

Tablica 19. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP5 ($t_R = 14,60$ min).

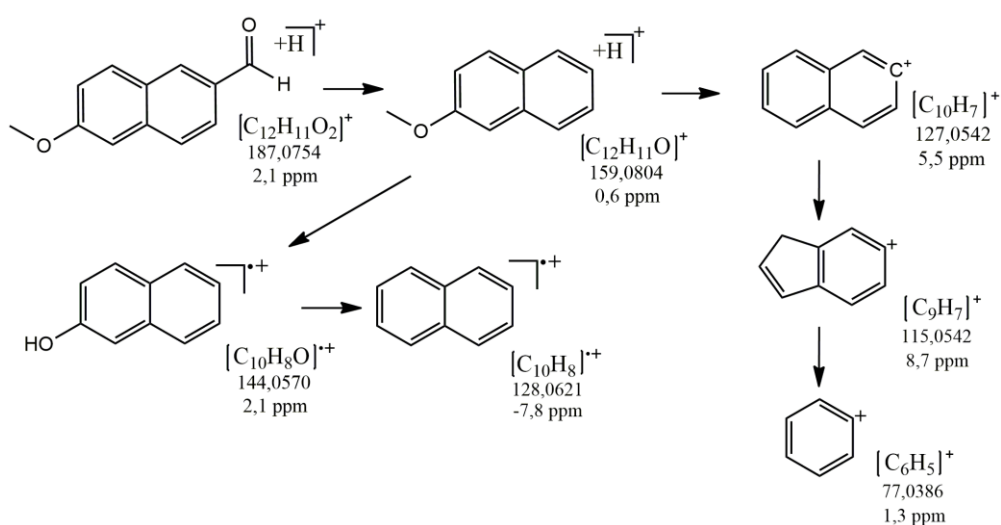
Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
263,1052	263,1043	-3,4	67,19	[M+Na] ⁺
241,1232	241,1223	-3,7	100	[M+H] ⁺
223,1117	223,1117	0	17,42	[M+H-18] ⁺

Tablica 20 prikazuje podatke dobivene nakon provedene MS/MS analize iona pri m/z 187,0758. Ion m/z 187,0758 opisali su Valero⁴¹ te Occhiuzzi i sur²² kao jednostruko protonirani 6-metoksinaftalen-2-karbaldehid, odnosno fotokemijski razgradni produkt NAB. Iz navedenog iona gubitkom karbaldehidne skupine nastaje ion m/z 159,0803. Međutim, moguć je i drukčiji način fragmentacije pri kojemu nastaje kationski radikal m/z 144,0567. Iz njega vjerojatno nastaje kationski radikal m/z 128,0631, koji se uočio i u prijašnjim uzorcima. Iz iona m/z 159,0803 daljnjom fragmentacijom nastaje ion m/z 127,0535. Ion m/z 115,0532 nastaje iz iona

m/z 127,0535 cijepanjem veza unutar prstena. Na temelju podataka analize tandemnom spektrometrijom masa zaključeno je da je ion m/z 187,0758 razgradni produkt NAB (DP3) te se predložila odgovarajuća shema fragmentiranja (slika 33).

Tablica 20. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP3 ($m/z = 187,0758$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
187,0752	100	187,0750	86,76	187,0756	0,60	-	-	$[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2+\text{H}]^+$
159,0800	24,22	159,0803	100	159,0801	16,35	-	-	$[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}+\text{H}]^+$
144,0567	9,57	144,0567	59,94	144,0569	100	144,0569	17,82	$[\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}]^{++}$
128,0612	0,46	128,0631	0,69	128,0617	3,85	128,0620	16,63	$[\text{C}_{10}\text{H}_8]^+$
127,0538	1,95	127,0535	5,23	127,0540	21,60	127,0543	44,54	$[\text{C}_{10}\text{H}_7]^+$
-	-	-	-	-	-	126,0457	5,05	-
116,0606	0,34	116,0620	2,34	116,0616	7,79	116,0618	56,77	$[\text{C}_9\text{H}_8]^+$
115,0535	0,45	115,0532	2,83	115,0537	4,06	115,0539	100	$[\text{C}_9\text{H}_7]^+$
77,0371	0,13	-	-	77,0371	0,25	77,0385	17,46	$[\text{C}_6\text{H}_5]^+$



Slika 33. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 187,0758 pri kolizijskom potencijalu od

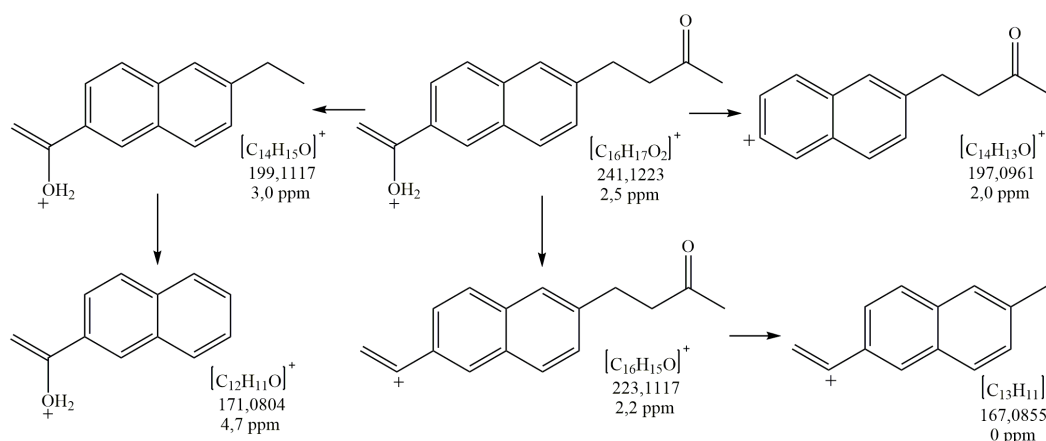
10 V

Također je provedena MS/MS analiza iona vrijednosti m/z 241,1232 (tablica 21, slika 34). Strukturu iona jednake vrijednosti m/z prethodno su predložili Sawant i sur., pri čemu su naveli da se radi o fragmentu iona m/z 259,128.³⁰ U MS spektru može se uočiti signal iona vrijednosti m/z 259,1286, ali jako niskog relativnog intenziteta. Međutim, nakon provedene MS/MS analize iona m/z od 241,1232 utvrđeno je da isti ne dijeli sličan način fragmentiranja kao ion naveden u publikaciji Sawant i suradnika.

Iz iona m/z 241,1232 gubitkom molekule vode nastaje ion m/z 223,1112. Gubitkom C_3H_6O (aceton) ovaj ion fragmentira na m/z 167,0855. Ion m/z 199,1111 nastaje gubitkom iona $C_2H_3O^+$ čiji signal je vidljiv u spektru masa pri m/z 43,0183. Daljnjim cijepanjem nastaje ion sa signalom pri m/z 171,0796. Ion m/z 197,0957 nastaje gubitkom $C_2H_5O^+$. Odgovarajući signal u spektrima masa nalazi se pri m/z 45,0336. Prema dobivenim podacima može se pretpostaviti da je ion m/z 241,1232 razgradni produkt (DP5) s vremenom zadržavanja od 14,60 min. Predložena shema fragmentiranja tog razgradnog produkta nalazi se na slici 34.

Tablica 21. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP5 ($m/z = 241,1232$).

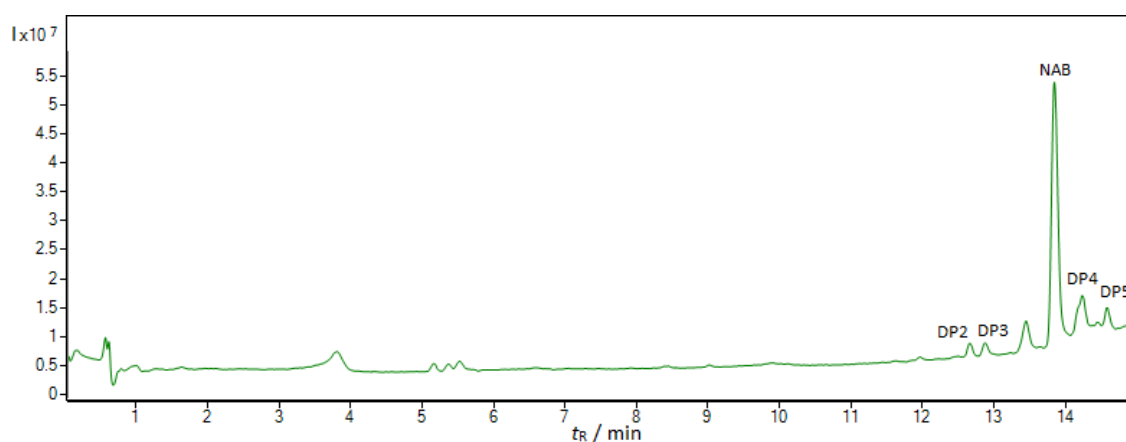
5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
241,1219	100	241,1217	76,83	241,1219	2,64	-	-	[C ₁₆ H ₁₇ O ₂] ⁺
223,1113	27,03	223,1112	100	223,1114	59,76	223,1114	0,59	[C ₁₆ H ₁₅ O] ⁺
208,0871	0,52	208,0870	2,23	208,0881	18,49	208,0883	4,08	-
199,1112	5,89	199,1111	27,24	199,1110	8,05	-	-	[C ₁₄ H ₁₅ O] ⁺
197,0959	12,99	197,0957	60,70	197,0955	21,62	197,0900	0,14	[C ₁₄ H ₁₃ O] ⁺
191,0854	0,19	191,0846	1,82	191,0852	5,68	191,0853	3,73	-
183,0804	1,58	183,0791	4,61	183,0799	5,05	183,0774	0,94	[C ₁₃ H ₁₁ O] ⁺
182,0726	1,32	182,0721	6,58	182,0719	16,34	182,0715	1,80	-
-	-	181,0635	0,28	181,0644	3,52	181,0643	5,22	[C ₁₃ H ₉ O] ⁺
-	-	180,0970	0,52	180,0930	5,36	180,0921	3,46	
171,0802	1,98	171,0796	13,78	171,0802	39,82	171,0803	15,05	[C ₁₂ H ₁₁ O] ⁺
167,0855	1,59	167,0855	8,53	167,0851	14,21	167,0850	1,93	[C ₁₃ H ₁₁] ⁺
165,0693	5,52	165,0696	26,82	165,0697	36,89	165,0695	34,68	-
158,0720	3,42	158,0723	27,41	158,0724	100	158,0720	19,50	-
-	-	156,0559	0,21	156,0563	0,48	156,0567	5,57	-
153,0685	0,12	153,0658	0,19	153,0690	2,65	153,0697	5,26	-
143,0460	0,17	143,0489	0,81	143,0489	4,59	143,0491	13,81	-
141,0702	0,17	141,0683	0,46	141,0689	1,72	141,0690	6,11	-
128,0625	0,13	128,0622	1,09	128,0617	5,17	128,0619	44,35	[C ₁₀ H ₈] ⁺
115,0538	0,30	115,0535	3,42	115,0540	9,07	115,0539	100	[C ₉ H ₇] ⁺
45,0333	1,12	45,0336	6,90	45,0336	24,81	45,0338	12,77	[C ₂ H ₅ O] ⁺
43,0184	7,44	43,0183	37,51	43,0183	33,18	43,0182	14,42	[C ₂ H ₃ O] ⁺



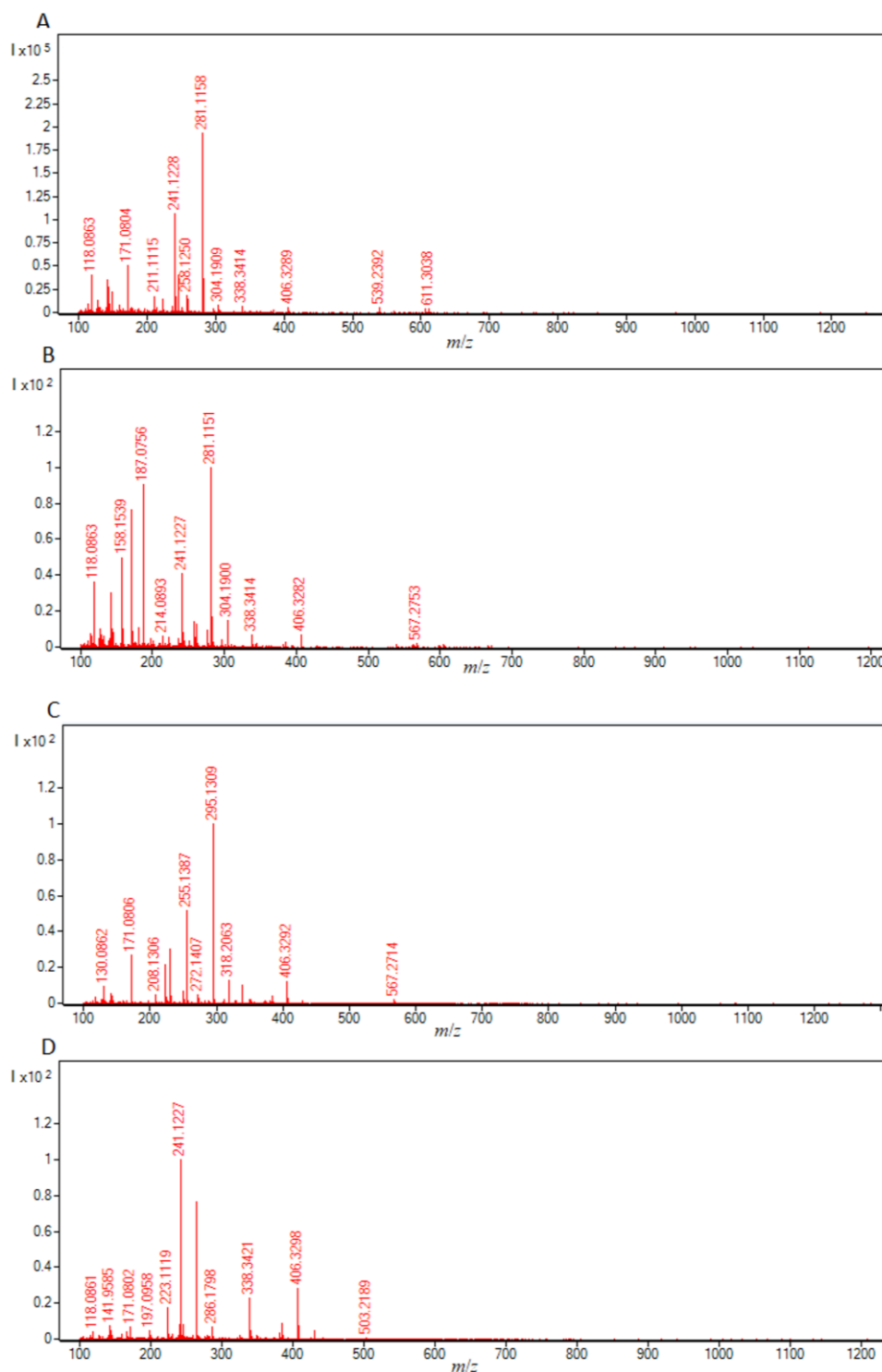
Slika 34. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 241,1232 pri kolizijskom potencijalu od 10 V

4.3.4. MS i MS/MS analiza nabumetona uz prisutnost β -CD nakon razgradnje pri bazičnim hidrolitičkim uvjetima

Kromatogram ukupne ionske struje uzorka kompleksa nabumetona i β -CD podvrgnutog razgradnji u bazičnim uvjetima pri 80 °C tijekom 6 h (slika 35) snimljen je i uspoređen s kromatogramom uzorka nabumetona bez prisutnosti β -CD, podvrgnutom istim eksperimentalnim uvjetima. Uz kromatografski pik koji odgovara nabumetonu ponovno su uočeni i dodatni pikovi pri različitim vremenima zadržavanja s nešto većim vrijednostima visina i površina, što ukazuje na veći stupanj razgradnje. Kromatografski pikovi uočeni su pri vremenima zadržavanja od 12,68, 12,88, 14,24 te 14,59 min. Vremena zadržavanja odgovaraju onima koja su zabilježena u TIC-u uzorka nabumetona bez β -CD.



Slika 35. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u bazičnim uvjetima pri 80 °C



Slika 36. MS spektri potencijalnih razgradnih produkata s vremenima zadržavanja od 12,68 (A), 12,88 (B), 14,24 (C) te 14,59 min (D)

Na slici 36 prikazani su MS spektri koji odgovaraju spojevima s navedenim kromatografskim pikovima iz kromatograma ukupne ionske struje. Detaljnim pregledom ovih MS spektara te

usporedbom s odgovarajućim MS spektrima za iste pikove iz uzorka nabumetona bez prisutnosti β -CD utvrđeno je njihovo slaganje što dovodi do zaključka da se radi o identičnim razgradnim produktima. U MS spektru koji odgovara vremenu zadržavanja od 12,68 min uočeni su signali pri m/z 171,0804, 241,1228, 245,0783, 259,1319 te 281,1158. Za pik pri 12,88 min uočeni su signali pri m/z 158,1539, 171,0804, 187,0756, 241,1227 te 281,1151. Pri 14,24 min uočeni su signali pri m/z 171,0806, 230,2480, 255,1387 te 295,1309. Pri 14,59 min uočeni su signali pri m/z 223,1119, 241,1227 te 263,1048. Za daljnju analizu odabrani su ioni vrijednosti m/z 259,1319 (tablica 22), m/z 241,1227 (tablica 23), m/z 187,0758 (tablica 24) i m/z 171,0805 (tablica 25).

Tablica 22. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP2 ($t_R = 12,68$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
281,1158	281,1148	-3,6	100	[M+Na] ⁺
259,1319	259,1329	5,4	7,39	[M+H] ⁺
241,1228	241,1223	-2,1	55,18	[M+H-18] ⁺
171,0804	171,0804	0	26,58	[M+H-88] ⁺

Tablica 23. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP3 ($t_R = 12,88$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
187,0756	187,0754	-1,1	90,46	[M+H] ⁺
158,1539	-	-	50,26	-

Tablica 24. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP4 ($t_R = 14,24$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
295,1309	-	-	100	-
255,1387	-	-	51,42	-
171,0806	-	-	27,04	-

Tablica 25. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP5 ($t_R = 14,59$ min).

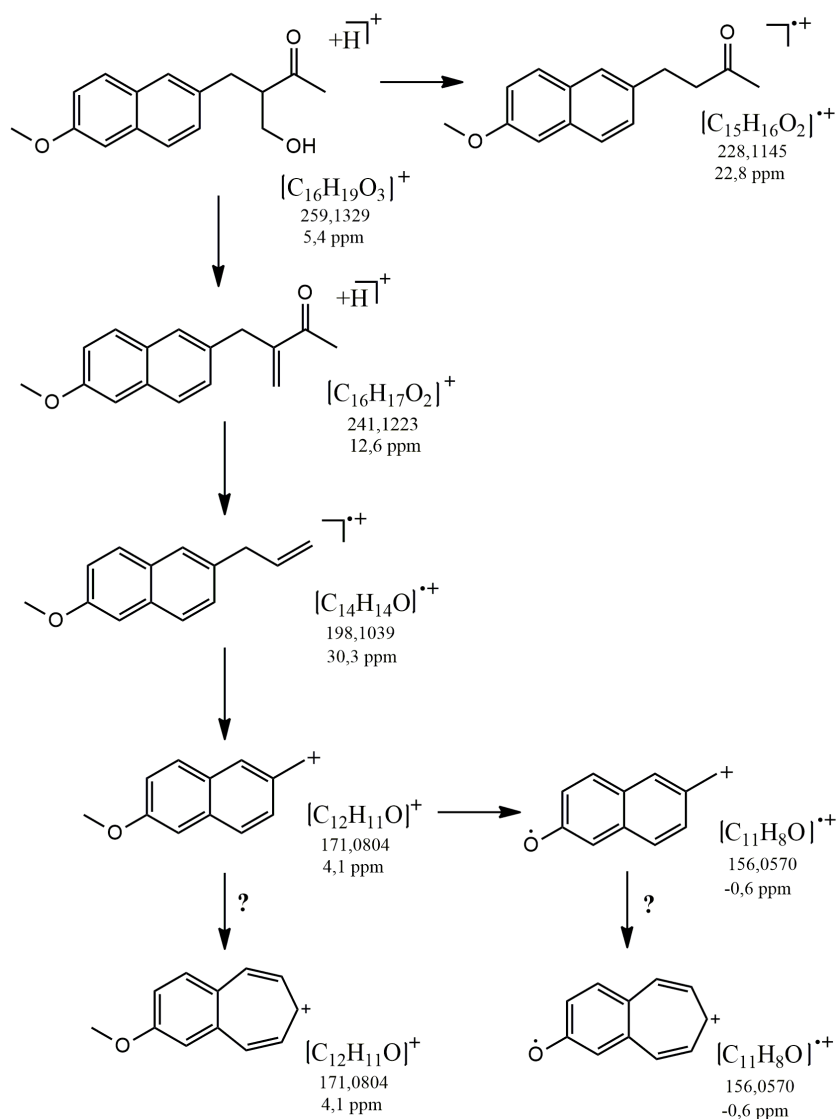
Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
263,1046	263,1043	-1,1	76,76	[M+Na] ⁺
241,1227	241,1223	-1,7	100	[M+H] ⁺
223,1119	223,1117	-0,1	17,71	[M+H-18] ⁺

Pri analizi kromatograma uzorka kompleksa nabumetona i β -CD i odgovarajućih MS spektara, najveći problem predstavljao je veliki broj signala iona pripisanih potencijalnim produktima razgradnje. Prilikom provođenja analiza tandemnom spektrometrijom masa pojedini ioni su nešto uspješnije izolirani nego u slučaju uzorka samog NAB budući da im je zastupljenost bila veća, jer je i razgradnja nabumetona uz prisutnost β -CD bila nešto veća. Ion m/z 259,1319 analiziran je tandemnom spektrometrijom masa pri različitim kolizijskim energijama, a rezultati su prikazani u tablici 26. Kao što je već spomenuto, Sawant i sur. su predložili su strukturu iona slične vrijednosti m/z , a njegov nastanak pripisali adiciji formaldehida, nastalog uslijed ozračivanja otopine lijeka u acetonitrilu UV i Vis zračenjem. U sklopu ovog rada kao kootapalo se koristio metanol, budući da NAB ima slabu topljivost u vodenim otopinama, a samim time i u reagensima za razgradnju. Esterifikacija uvjetovana prisutnošću metanola kao kootapala opisana je u znanstvenoj publikaciji Pandya i sur., koji su nastale razgradne produkte efonidipina nazvali pseudo-razgradnim produktima.⁴²

Usporedbom MS/MS spektara navedenog iona sa spektrima prikazanim u publikaciji Sawant i sur. ustanovljeno je da ti ioni ne dijele sličan fragmentacijski put. Fragmentiranjem iona 259,1319 nastaje ion m/z 241,1192 koji zasigurno odgovara gubitku jedne molekule vode. U spektrima se uočava i ion pri m/z 228,1093 pri čemu se vjerojatno radi o kationskom radikalu. Iz njega zatim nastaje kationski radikal m/z 198,0979. Signali iona pri m/z 171,0804, 156,0571, 128,0642 i 127,0532 primijećeni su prilikom fragmentiranja jednostruko protoniranog iona NAB, a njihove strukture opisane. U slučaju nekih opisanih struktura prisutno je nešto veće odstupanje između izmjerene i monoizotopne (točne) mase. Prema dobivenim podacima zaključeno je kako signal pri m/z 259,1319 pripada jednostruko protoniranom ionu razgradnog produkta (DP2) te mu je predložena shema fragmentiranja (slika 37).

Tablica 26. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP5 ($m/z = 259,1319$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
259,1315	87,13	259,1315	17,91	-	-	-	-	$[C_{16}H_{19}O_3]^+$
241,1192	9,98	241,1180	5,18	-	-	-	-	$[C_{16}H_{17}O_2]^+$
228,1093	2,88	228,1071	4,00	228,1052	5,53	-	-	$[C_{15}H_{16}O_2]^{++}$
199,0185	7,70	199,0040	1,01	-	-	-	-	-
198,0979	14,24	198,0984	11,48	198,0997	7,03	-	-	$[C_{14}H_{14}O]^{++}$
172,0866	2,81	172,0823	6,21	172,0837	10,04	172,0823	10,56	-
171,0797	100	171,0801	100	171,0800	100	171,0805	72,16	$[C_{12}H_{11}O]^+$
-	-	-	-	166,0714	1,95	166,0753	20,01	-
-	-	-	-	156,0534	0,93	156,0571	15,98	$[C_{11}H_8O]^{++}$
-	-	-	-	141,0657	0,47	141,0690	9,54	$[C_{11}H_9]^+$
-	-	138,9626	3,86	138,9636	7,00	138,9630	12,91	-
-	-	128,0642	1,54	128,0621	2,73	128,0612	100	$[C_{10}H_8]^{++}$
-	-	-	-	127,0530	0,30	127,0532	5,69	$[C_{10}H_7]^+$
-	-	43,0180	0,79	43,0179	2,16	43,0181	9,30	$[C_2H_3O]^+$



Slika 37. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 259,1319 pri kolizijskom potencijalu od 5 V

Analiza tandemnom spektrometrijom masa provedena je i za ione m/z 241,1227 i m/z 187,0758 (tablice 27 i 28). Ovi ioni uspješno su izolirani te fragmentirani i prilikom analize uzoraka bez prisutnosti β -CD (DP3 i DP5). Pretpostavljene sheme fragmentiranja jednake su onima koje su prethodno predložene prilikom analize uzoraka bez prisutnosti β -CD (slike 33 i 34).

Tablica 27. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP3 ($m/z = 187,0758$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
187,0753	100	187,0747	73,18	187,0746	0,55	-	-	[C ₁₂ H ₁₁ O ₂] ⁺
159,0802	26,03	159,0804	100	159,0802	21,15	-	-	[C ₁₁ H ₁₁ O] ⁺
145,9545	6,17	145,9557	2,98	-	-	-	-	
144,0567	7,73	144,0566	51,04	144,0569	100	144,0566	21,49	[C ₁₀ H ₈ O] ⁺
128,0618	1,29	128,0622	1,31	128,0601	3,53	128,0611	17,90	[C ₁₀ H ₈] ⁺
127,0537	1,62	127,0522	5,59	127,0541	25,86	127,0534	70,50	[C ₁₀ H ₇] ⁺
127,0238	19,29	127,0237	50,82	127,0240	10,84	-	-	-
116,0636	0,26	116,0618	4,55	116,0612	8,18	116,0621	35,38	
115,0527	0,62	115,0524	1,73	115,0522	4,81	115,0539	100	[C ₉ H ₇] ⁺
102,9471	0,98	102,9463	3,76	102,9476	5,76	-	-	-
101,9647	2,98	101,9642	11,81	101,9642	7,33	-	-	-
100,9579	0,17	100,9561	2,04	100,9563	16,96	100,9552	11,26	-
86,9926	2,52	86,9919	5,36	86,9924	6,87	-	-	-
83,0341	0,57	83,0346	12,78	83,0339	28,29	83,0341	9,68	-
-	-	-	-	-	-	77,0390	10,78	[C ₆ H ₅] ⁺
72,9375	0,89	72,9368	7,95	72,9371	17,72	72,9374	20,66	-
68,9826	0,63	68,9819	5,64	68,9822	15,93	68,9820	48,19	-
-	-	-	-	59,9307	1,41	59,9307	24,40	-
-	-	-	-	-	-	56,9410	8,71	-
-	-	-	-	55,9339	5,48	55,9345	19,24	-

Tablica 28. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP5 ($m/z = 241,1227$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
241,1222	100	241,1220	71,17	241,1215	3,24	-	-	$[C_{16}H_{17}O_2]^+$
223,1114	28,18	223,1115	100	223,1112	54,70	-	-	$[C_{16}H_{15}O]^+$
208,0887	0,35	208,0878	2,88	208,0877	18,78	208,0876	2,94	-
199,1113	5,23	199,1114	21,30	199,1109	7,30	-	-	$[C_{14}H_{15}O]^+$
197,0957	14,08	197,0958	54,63	197,0952	20,80	197,0944	0,43	$[C_{14}H_{13}O]^+$
191,0849	0,28	191,0850	1,60	191,0847	7,31	191,0850	2,33	-
183,0797	1,73	183,0801	6,15	183,0803	4,12	183,0788	1,26	$[C_{13}H_{11}O]^+$
182,0720	1,04	182,0724	5,73	182,0720	12,60	182,0714	1,68	-
171,0803	1,75	171,0805	11,79	171,0805	42,13	171,0805	11,08	$[C_{12}H_{11}O]^+$
167,0854	1,72	167,0853	8,91	167,0849	13,00	167,0836	0,95	-
165,0693	5,42	165,0694	17,75	165,0694	34,38	165,0695	29,69	-
158,0717	3,56	158,0722	24,69	158,0723	100	158,0721	15,34	-
143,0487	0,34	143,0495	0,92	143,0479	5,14	143,0492	12,18	-
128,0611	0,29	128,0618	1,14	128,0617	6,81	128,0616	36,56	$[C_{10}H_8]^{*+}$
115,0537	1,11	115,0534	2,10	115,0537	9,98	115,0540	100	$[C_9H_7]^+$
45,0335	0,45	45,0336	8,06	45,0337	25,95	45,0340	12,12	$[C_2H_5O]^+$
43,0182	6,14	43,0182	32,55	43,0183	37,92	43,0182	12,63	$[C_2H_3O]^+$

Tandemnom spektrometrijom masa analizirani su ioni koji u LC-MS kromatogramu daju pik pri vremenu zadržavanja od 14,24 min. U odgovarajućem MS spektru signal baznog iona je pri vrijednosti m/z od 295,1309, a drugi najintenzivniji signal pri vrijednosti m/z od 255,1387. Uz njih uočen je i signal pri m/z 171,0806 za koji se odmah posumnjalo da pripada fragmentu koji nastaje unutar ionskog izvora. Nakon detaljnog pregleda MS/MS spektara iona vrijednosti m/z od 295,1309 i 255,1387 nisu uočeni nikakvi uobičajeni fragmentni ioni nabumetona koji bi dali naslutiti da se radi o nekom njegovom razgradnom produktu. Njihova prisutnost mogla bi biti

posljedica neke nečistoće, no pregledom TIC kromatograma slijepih proba i kontrolnih uzoraka prisutnost ovih iona nije uočena. Posljednji analizirani ion tandemnom spektrometrijom masa bio je ion vrijednosti m/z 171,0806 (tablica 29). Fragmentiranje uočeno za ovaj ion identično je onome koje je već opisano za ion m/z 171,0815 (tablica 14, slika 26). Prema dobivenim podacima pretpostavljeno je da je ion m/z 171,0805 *in-source* fragment razgradnog produkta DP4. Budući da nijedan od prethodno spomenutih iona iz istog MS spektra (m/z 255,1387 te 295,1309) vjerojatno ne pripadaju ovom razgradnom produktu, LC-MS analizu bi trebalo ponoviti i izolirati neki od iona nižeg relativnog intenziteta kako bi se pokušalo identificirati signal molekuskog iona DP4.

Tablica 29. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima iona m/z 171,0806.

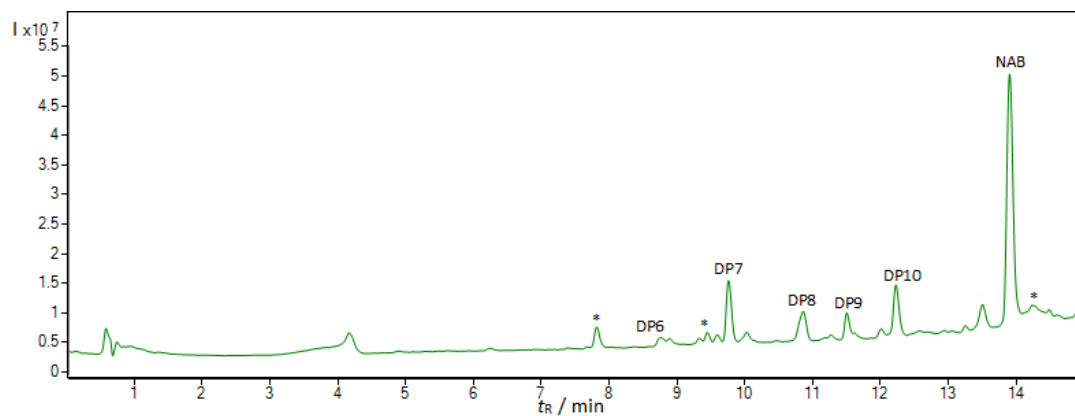
5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
171,0799	100	171,0801	100	171,0809	74,17	-	-	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}]^+$
-	-	156,0570	1,27	156,0547	13,57	-	-	$[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}]^{*+}$
128,0616	1,91	128,0616	8,72	128,0618	100	128,0617	100	$[\text{C}_{10}\text{H}_8]^{*+}$
-	-	-	-	127,0546	3,62	127,0543	14,41	$[\text{C}_{10}\text{H}_7]^+$
102,0460	0,20	102,0462	1,53	102,0448	2,83	102,0474	7,05	$[\text{C}_8\text{H}_6]^{*+}$
-	-	-	-	-	-	78,0458	6,57	$[\text{C}_6\text{H}_6]^{*+}$

4.3.5. MS i MS/MS analiza nabumetona uz prisutnost β -CD nakon razgradnje pri oksidativnim uvjetima

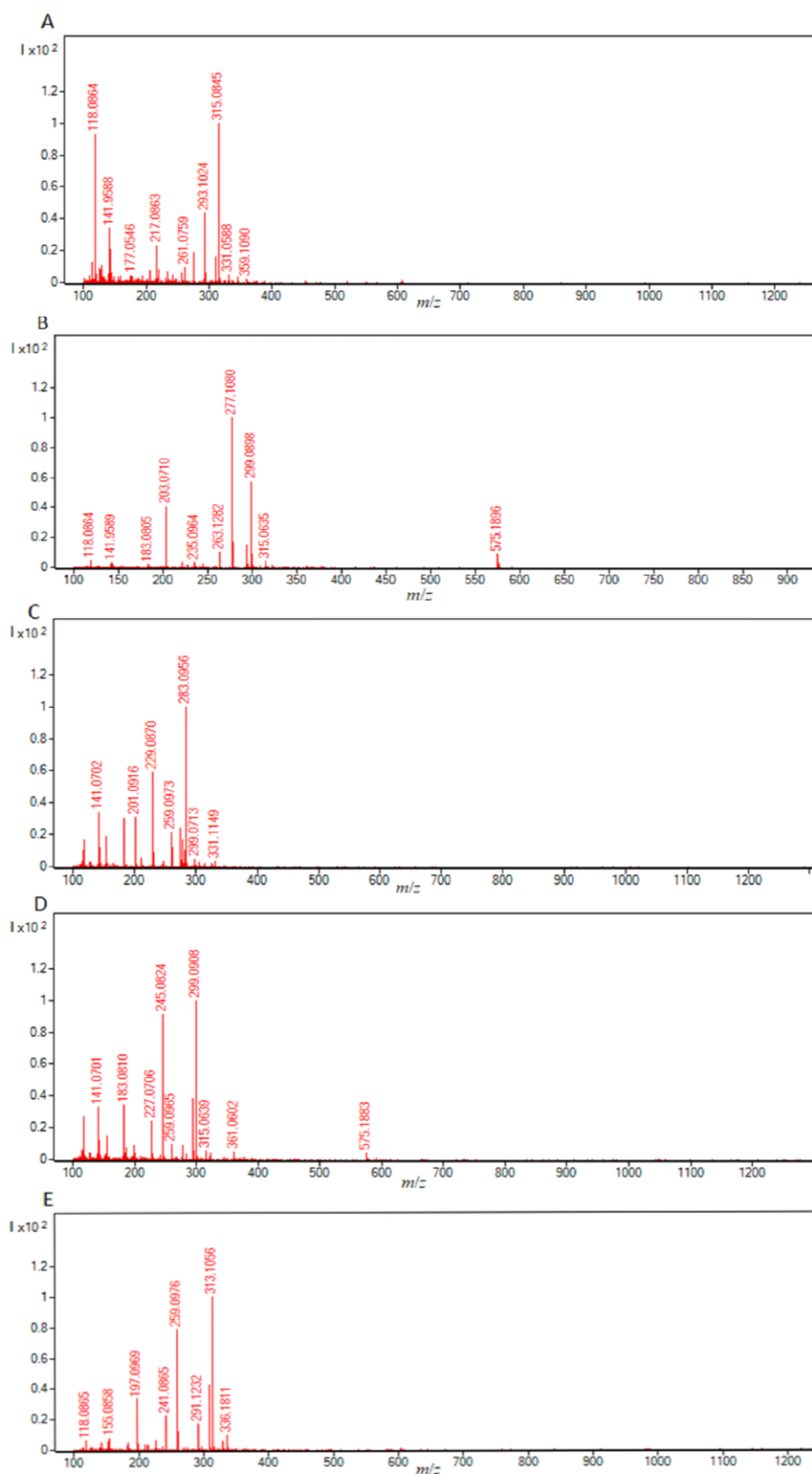
Baertschi, Alsante i Reed u svojoj knjizi daju općenite smjernice za provođenje studija prisilne razgradnje djelatnih tvari i farmaceutskih formulacija, a između ostalog opisuju i načine provođenja razgradnje u oksidativnim uvjetima. Napominju da se studije prisilne razgradnje pomoću vodikovog peroksida provode uz 0,3–3 % H_2O_2 pri temperaturi $< 30\text{ }^\circ\text{C}$. U suprotnom, korištenje koncentriranijih otopina stresora te viših temperatura, može dovesti do cijepanja slabe O-O veze i nastanka vrlo reaktivnih hidroksilnih radikala. Hidroksilni radikali su agresivniji oksidativni reagensi koji će oksidirati lijekove nerealnim i nepredvidivim mehanizmima. Ipak, u sklopu ovog diplomskog rada korištena je 10 % otopina H_2O_2 u svojstvu stresora pri temperaturi od $80\text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se potaknula što veća degradacija i kako bi se generirao što veći broj razgradnih produkata te provjerilo u kojoj mjeri ih se može odijeliti.⁴³

Na slici 38 prikazan je kromatogram ukupne ionske struje za uzorak NAB u prisutnosti β -CD uslijed šestosatne razgradnje u oksidativnim uvjetima uz povišenu temperaturu. U kromatogramu se odmah može uočiti veći broj kromatografskih pikova različitih visina i površina koji su uglavnom vrlo dobro odijeljeni. U spektru masa sastojka s pikom pri vremenu zadržavanja 8,91 min uočavaju se ioni m/z 275,0915, 293,1024, 315,0845 (DP6), a pri 9,76 min ioni m/z 203,0710 277,1080, 299,0808 (DP7) koji je nakon kromatografskog pika nabumetona (pri 13,83 min) pik s najvećom površinom. Zatim slijede pikovi bliskih visina i površina. Pik pri 10,87 min odgovara ionima m/z 283,0956 i 229,0870 (DP8), pik pri 11,51 min ionima m/z 183,0810, 227,0706, 245,0824 i 299,0908 (DP9) te pik pri vremenu zadržavanja od 12,23 min odgovara ionima m/z 197,0969, 241,0865, 259,0976, 313,1056 (DP10). MS spektri koji se odnose na spomenute kromatografske pikove prikazani su na slici 39. Pokušana je identifikacija signala koji bi se odnosili na ione razgradnih produkata nabumetona (tablice 30–34). Nakon toga izolirani su odgovarajući ioni i na njima su provedeni eksperimenti tandemne spektrometrije masa. U sklopu ovog diplomskog rada prikazat će se samo oni MS/MS spektri kod kojih su uočeni karakteristični fragmenti nabumetona.

Pikovi koji su u kromatogramu označeni zvjezdicom (*) odgovaraju potencijalnim razgradnim produktima, ali za prelaganje struktura tih razgradnih produkata potrebne su dodatne opširnije analize.



Slika 38. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C



Slika 39. MS spektri potencijalnih razgradnih produkata s vremenima zadržavanja od 8,91 (A), 9,76 (B), 10,87 (C), 11,51 (D) i 12,23 min (E)

Tablica 30. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP6 ($t_R = 8,91$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
315,0845	315,0839	-1,9	100	[M+Na] ⁺
293,1024	293,1020	1,4	43,60	[M+H] ⁺
275,0915	275,0914	-0,4	19,03	[M+H-H ₂ O] ⁺

Tablica 31. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP7 ($t_R = 9,76$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
299,0808	299,0890	27,4	57,57	[M+Na] ⁺
277,1080	277,1071	-3,2	100	[M+H] ⁺
203,0710	203,0703	-3,4	40,73	[M+H-74] ⁺

Tablica 32. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP8 ($t_R = 10,87$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
283,0956	-	-	100	-
229,0870	229,0859	-4,8	58,66	[M+H] ⁺
201,0916	201,0910	-3,0	30,98	[M+H-28] ⁺
183,0810	183,0804	-3,1	30,37	[M+H-46] ⁺

Tablica 33. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP9 ($t_R = 11,51$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
299,0908	-	-	100	-
245,0824	245,0808	-6,5	91,22	$[M+H]^+$
227,0706	227,0703	-1,3	24,01	$[M+H-H_2O]^+$
183,0810	183,0804	-3,3	34,35	$[M+H-H_2O-CO_2]^+$

Tablica 34. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru razgradnog produkta DP10 ($t_R = 12,23$ min).

Izmjereni m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
313,1056	-	-	100	-
259,0976	259,0965	-4,2	77,70	$[M+H]^+$
241,0865	241,0859	-2,5	21,99	$[M+H-H_2O]^+$
197,0969	197,0961	-4,1	30,60	$[M+H-H_2O-CO_2]^+$

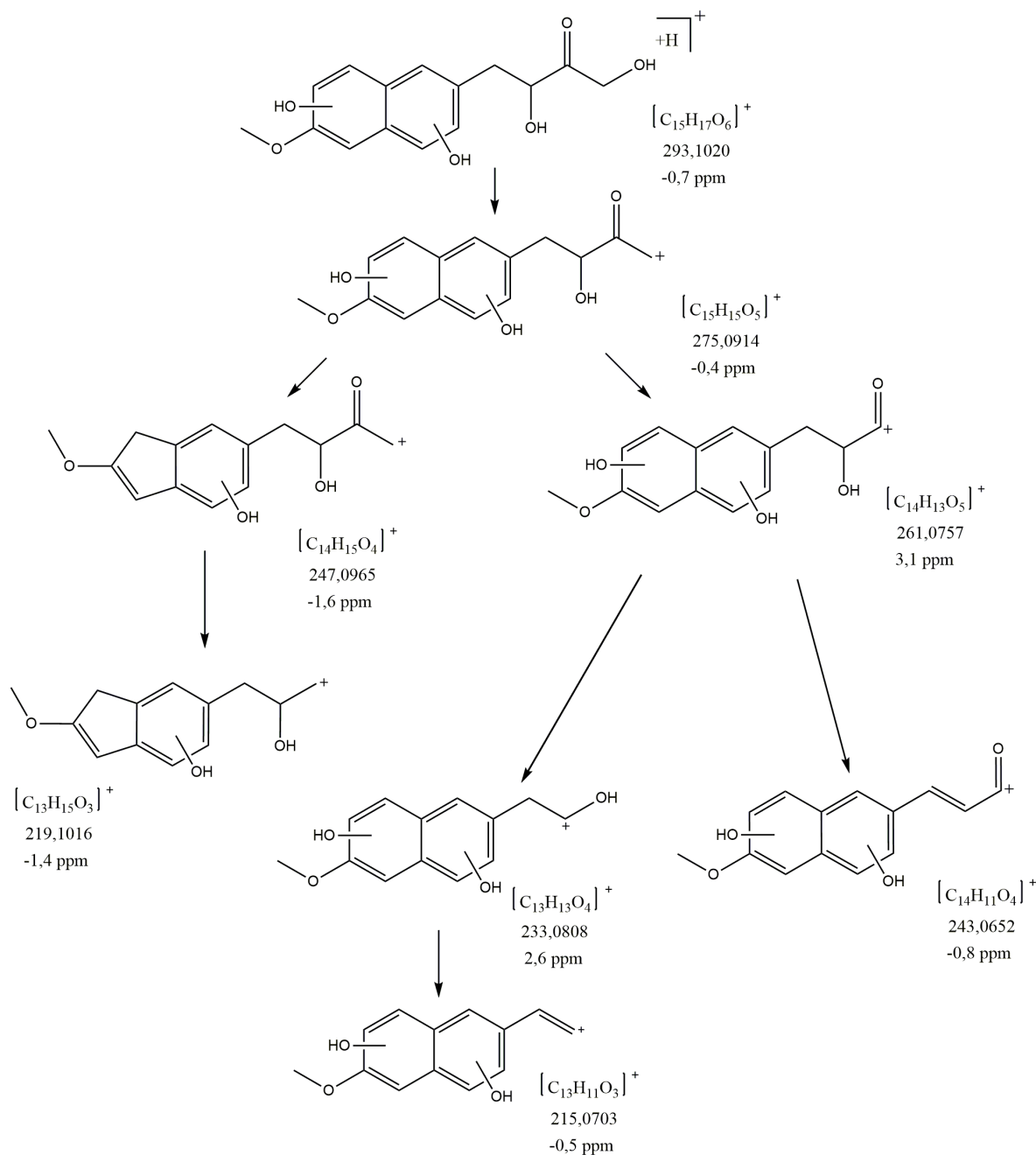
Provedena je analiza iona m/z 293,1024 tandemnom spektrometrijom masa (tablica 35). Taj ion odgovara molekuli NAB na koju su adirane četiri hidroksilne skupine. Nakon detaljnog proučavanja MS/MS spektara pretpostavljeno je da se dvije hidroksilne skupine nalaze na naftalenskom dijelu molekule. Međutim, nije bilo moguće odrediti njihovu točnu poziciju. Gubitkom molekule vode iz iona m/z 293,1022 nastaje ion m/z 275,0915. Iz tog iona daljnjim fragmentiranjem dolazi do nastanka iona m/z 247,0961 s peteročlanim prstenom, koji se dalje cijepa na ion m/z 219,1019. Fragmentiranjem iona m/z 275,0915 također može nastati ion m/z 261,0749 iz kojeg gubitkom vode nastaje ion m/z 243,0654, odnosno gubitkom CO ion m/z 233,0802. Daljnjim gubitkom vode iz iona m/z 233,0802 nastaje ion m/z 215,0703. Prema rezultatima MS/MS analize zaključeno je da signal pri m/z 293,1025 odgovara jednostruko protoniranom ionu razgradnog produkta (DP6) te je predložena odgovarajuća shema fragmentiranja (slika 40).

Tablica 35. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP6 ($m/z = 293,1024$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
293,1022	57,38	293,1023	6,22	293,1361	0,33	-	-	$[C_{15}H_{17}O_6]^+$
275,0915	100	275,0919	33,26	275,0920	0,15	-	-	$[C_{15}H_{15}O_5]^+$
261,0749	13,13	261,0754	7,33	-	-	-	-	$[C_{14}H_{13}O_5]^+$
247,0961	15,08	247,0964	11,30	247,0963	2,81	-	-	$[C_{14}H_{15}O_4]^+$
243,0654	42,46	243,0653	100	243,0653	100	243,0640	9,85	$[C_{14}H_{11}O_4]^+$
233,0802	22,14	233,0807	15,22	233,0802	6,47	-	-	$[C_{13}H_{13}O_4]^+$
231,1022	12,24	231,1016	14,07	231,1018	11,95	-	-	$[C_{14}H_{15}O_3]^+$
219,1019	18,82	219,1015	40,98	219,1019	44,88	219,1010	0,77	$[C_{13}H_{15}O_3]^+$
215,0704	3,80	215,0700	8,14	215,0694	11,79	215,0706	1,20	$[C_{13}H_{11}O_3]^+$
205,0854	10,34	205,0864	21,58	205,0856	33,90	205,0859	2,82	-
189,0880	0,51	189,0878	0,17	189,0926	5,57	189,0895	10,13	-
186,0288	0,16	-	-	-	-	186,0295	13,08	-
175,0432	0,27	175,0378	1,70	175,0389	5,19	175,0388	10,81	-
173,0587	0,67	173,0601	1,14	173,0598	4,59	173,0607	5,00	-
-	-	-	-	162,0662	0,88	162,0669	18,28	-
159,0777	0,91	159,0799	0,70	159,0809	9,24	159,0802	82,05	-
-	-	159,0440	2,28	159,0447	1,15	159,0449	11,79	-
-	-	-	-	-	-	157,0279	13,06	-
147,0413	0,52	147,0434	0,90	147,0447	4,84	147,0439	76,00	-
-	-	-	-	145,0643	2,18	145,0648	12,27	-
-	-	-	-	141,0680	0,32	141,0697	10,46	$[C_{11}H_9]^+$
131,0479	0,61	131,0486	0,99	131,0487	6,64	131,0487	15,35	-
-	-	-	-	-	-	130,0404	12,05	-

Tablica 35 nastavak. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP6 ($m/z = 293,1024$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
-	-	-	-	128,0634	0,21	128,0624	11,24	$[\text{C}_{10}\text{H}_8]^+$
-	-	119,0458	0,52	119,0491	2,62	119,0492	100	-
-	-	117,0726	0,20	117,0686	1,68	117,0699	17,64	-
-	-	-	-	115,0548	1,04	115,0540	13,16	$[\text{C}_9\text{H}_7]^+$
-	-	-	-	-	-	105,0696	12,26	-
-	-	102,0440	0,29	-	-	102,0454	12,91	-
-	-	91,0543	0,12	91,0538	1,85	91,0545	25,62	-
43,0184	0,23	43,0188	0,92	43,0185	3,57	43,0183	51,03	$[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$



Slika 40. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 293,1024 pri kolizijskom potencijalu od 5 V

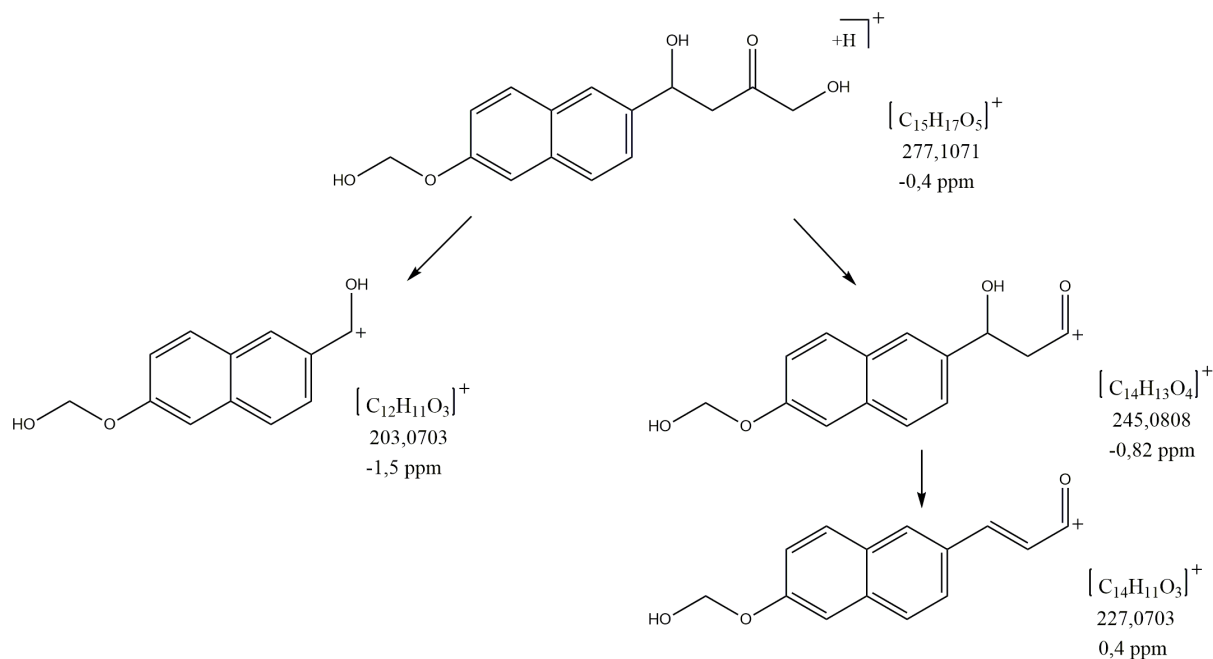
Tandemnom spektrometrijom masa analiziran je i ion m/z 277,1080 čiji signal je bazni signal u MS spektru spoja s vremenom zadržavanja od 9,76 min (slika 39, B). Prema izmjerenoj točnoj masi zaključeno je da je ovaj potencijalni degradacijski produkt rezultat adicije tri hidroksilne skupine na molekulu NAB. U MS spektru uočen je i signal iona m/z 203,0710 koji je također prisutan i u MS/MS spektru iona m/z 277,1080 pri svim primijenjenim kolizijskim

potencijalima (tablica 36). Iz navedenog se može zaključiti da je ion m/z 203,0710 *in-source* fragment iona m/z 277,1080. Pri fragmentiranju iona m/z 277,1080 može doći do gubitka CH_3OH pri čemu nastaje ion m/z 245,0808, a iz njega gubitkom jedne molekule vode nastaje ion m/z 227,0703.

Prema rezultatima provedenih MS/MS analiza pretpostavljeno je da je m/z 277,1080 razgradni produkt (DP7) sa vremenom zadržavanja od 9,76 min. Njegova predložena shema fragmentiranja je na slici 41.

Tablica 36. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP7 ($m/z = 277,1080$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
277,1073	100	277,1072	12,31	-	-	-	-	$[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_5]^+$
245,0808	7,79	245,0810	3,45	-	-	-	-	$[\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4]^+$
227,0700	5,61	227,0702	4,43	227,0709	0,66	227,0710	0,28	$[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$
203,0704	80,07	203,0706	100	203,0705	100	203,0704	30,69	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$
183,0804	4,03	183,0805	5,55	183,0804	3,92	183,0809	1,61	-
161,0600	0,22	161,0602	0,27	161,0602	1,53	161,0600	10,52	-
-	-	-	-	157,0640	0,28	157,0643	5,18	-
-	-	-	-	153,0695	0,52	153,0697	7,91	-
146,0355	0,18	-	-	146,0355	0,25	146,0360	22,07	-
141,0697	0,77	141,0701	1,37	141,0696	3,45	141,0696	9,44	$[\text{C}_{11}\text{H}_9]^+$
-	-	129,0693	0,11	129,0705	0,20	129,0700	12,24	-
-	-	-	-	-	-	128,0617	8,25	$[\text{C}_{10}\text{H}_8]^+$
117,0697	0,13	117,0708	0,12	117,0698	0,92	117,0700	16,08	-
115,0538	0,32	115,0537	0,16	115,0541	0,63	115,0542	20,56	$[\text{C}_9\text{H}_7]^+$
-	-	-	-	105,0712	0,22	105,0699	12,77	-
91,0528	0,20	91,0530	0,11	91,0534	0,17	91,0543	10,20	-
43,0186	0,17	43,0181	0,39	43,0182	2,64	43,0183	100	$[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$

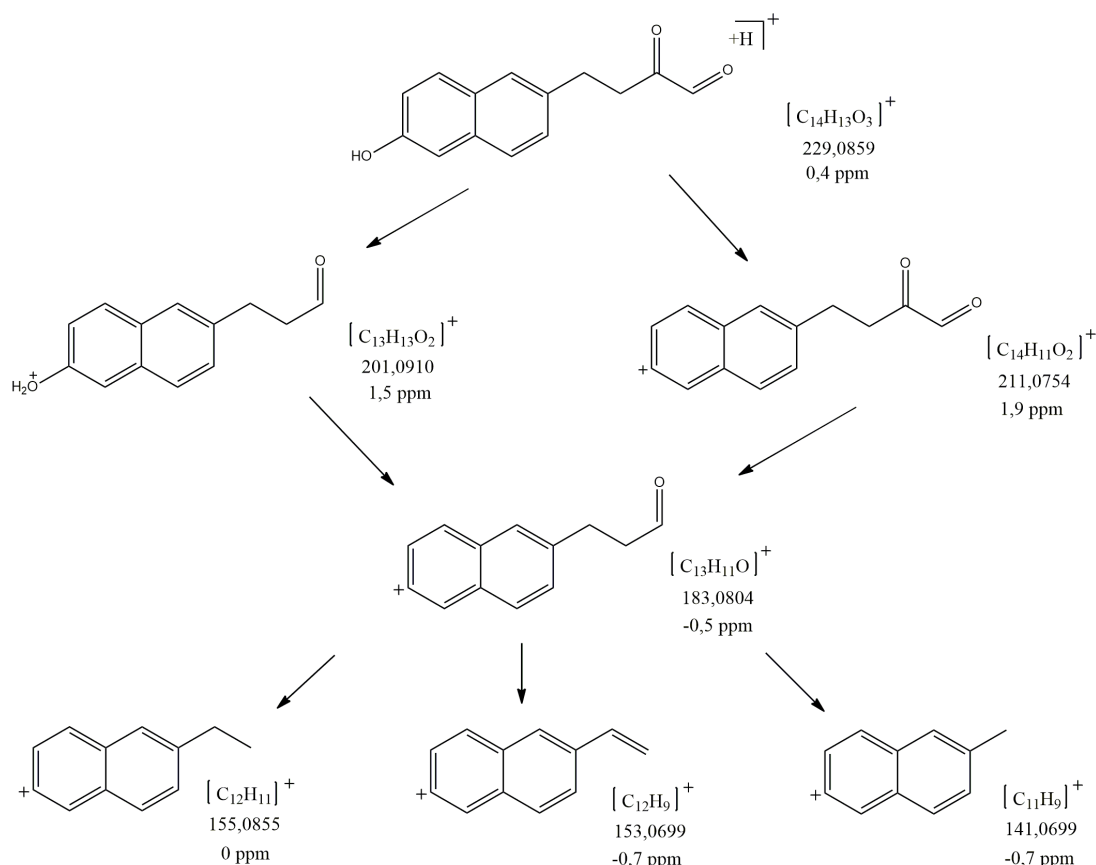


Slika 41. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 277,1080 pri kolizijskom potencijalu od 5 V

Sljedeći analizirani ion bio je m/z 229,0868 (tablica 37), koji se po svojoj nominalnoj masi slaže s jednostruko protoniranim ionom NAB (m/z 229,1231). Ipak, zbog signifikantne razlike u točnim masama zaključeno je da se njihove strukture razlikuju, što je potvrđeno različitim načinima njihovog fragmentiranja te činjenicom da se s kromatografske kolone eluiraju pri različitim vremenima zadržavanja. Iz iona m/z 229,0858 vjerojatno gubitkom molekule CO nastaje ion m/z 201,0907 koji se dalje, gubitkom vode, fragmentira na ion m/z 183,0805. Drugim načinom cijepanja prvo dolazi do gubitka vode te iz iona m/z 229,0858 nastaje ion m/z 211,0750, a potom iz njega gubitkom molekule CO nastaje ion m/z 183,0805. Signali iona m/z 201,0916 i m/z 183,0810 prisutni su i u MS spektru te su oni zapravo *in-source* fragmenti iona m/z 229,0868. Ponovnim gubitkom molekule CO iz iona m/z 183,0805 nastaje ion m/z 155,0855, a moguć je nastanak i iona m/z 153,0715 slične strukture. Također cijepanjem veza u ionu m/z 183,0805 nastaje ion m/z 141,0700 koji je već ranije opisan. Prema podacima dobivenim MS/MS analizom pretpostavljeno je da ion m/z 229,0868 odgovara razgradnom produktu (DP8) te se predložila njegova fragmentacijska shema (slika 42).

Tablica 37. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP8 ($m/z = 229,0868$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
229,0858	61,72	229,0861	11,00	229,0869	0,34	-	-	$[C_{14}H_{13}O_3]^+$
211,0750	17,19	211,0746	6,83	211,0766	0,82	-	-	$[C_{14}H_{11}O_2]^+$
201,0907	24,17	201,0912	45,39	201,0913	20,84	-	-	$[C_{13}H_{13}O_2]^+$
183,0805	100	183,0806	100	183,0808	21,77	-	-	$[C_{13}H_{11}O]^+$
173,0946	0,55	173,0970	3,35	173,0952	6,49	-	-	-
165,0699	0,98	165,0706	3,20	165,0699	10,10	165,0700	2,59	-
159,0815	1,47	159,0809	3,88	159,0806	8,77	-	-	-
155,0855	31,11	155,0856	64,79	155,0855	63,54	155,0865	1,14	$[C_{12}H_{11}]^+$
153,0715	0,47	153,0706	1,58	153,0700	9,20	153,0696	6,62	$[C_{12}H_9]^+$
143,0489	8,75	143,0495	31,21	143,0492	100	143,0490	14,52	$[C_{10}H_7O]^+$
141,0700	19,68	141,0697	63,87	141,0701	85,97	141,0698	12,22	$[C_{11}H_9]^+$
131,0841	0,17	131,0855	0,94	131,0852	7,28	131,0847	0,27	-
129,0689	0,90	129,0695	1,23	129,0698	9,88	129,0701	5,88	-
-	-	128,0614	0,21	128,0613	1,97	128,0622	8,25	$[C_{10}H_8]^{*+}$
-	-	127,0549	0,61	127,0546	1,31	127,0547	7,40	$[C_{10}H_7]^+$
115,0559	1,05	115,0543	5,86	115,0539	23,38	115,0543	100	$[C_9H_7]^+$
43,0178	1,00	43,0182	3,44	43,0184	28,57	43,0183	21,13	$[C_2H_3O]^+$



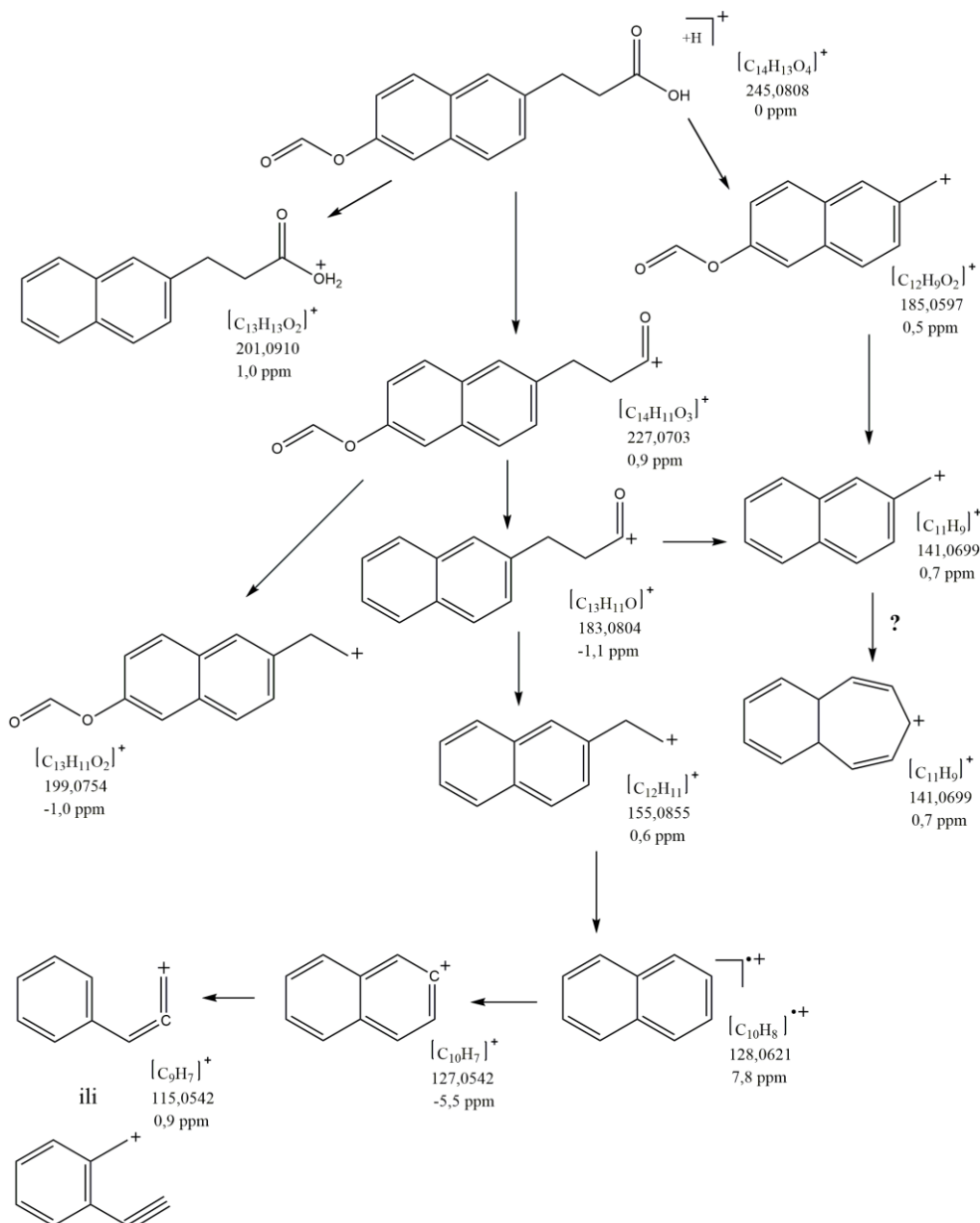
Slika 42. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 229,0868 pri kolizijskom potencijalu od 5 V

Provedena je MS/MS analiza iona m/z 245,0824 (tablica 38). Zaključeno je kako su ioni sa signalima pri m/z 227,0706 i 183,0810 u MS spektru spoja s vremenom eluiranja 11,51 min (slika 39, D) zapravo njegovi *in-source* fragmenti budući da su analogni signali uočeni i u MS/MS spektrima. Iz iona m/z 245,0824 nastaje ion m/z 201,0908, najvjerojatnije gubitkom neutralne molekule CO_2 , dok gubitkom neutralne molekule CH_3COOH nastaje ion m/z 185,0596. Gubitkom vode iz iona m/z 245,0824 nastaje ion m/z 227,0701, koji se dalje cijepa na ion m/z 183,0806 uz gubitak molekule CO_2 . Iz iona m/z 227,0701 može nastati ion m/z 199,0756 gubitkom CO , dok gubitkom CO iz iona m/z 183,0806 nastaje ion m/z 155,0854. Ion pri m/z 141,0698 nastaje iz iona m/z 183,0806, ali i gubitkom CO_2 iz iona m/z 185,0596. Homolitičkim cijepanjem alkilnih skupina u ionima m/z 155,0854 i m/z 141,0698 nastaje kationski radikal naftalena s m/z 128,0611. Ion vrijednosti m/z 127,0549 odgovara EE^+ ionu naftalena, koji se fragmentira na ion m/z 115,0541 cijepanjem prstena. Na temelju podataka dobivenih MS/MS analizom pretpostavlja se da je ion m/z 245,0824 razgradni produkt (DP9).

Tablica 38. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP9 ($m/z = 245,0824$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
245,0810	100	245,0808	11,07	-	-	-	-	$[C_{14}H_{13}O_4]^+$
227,0704	91,92	227,0701	43,75	227,0698	3,61	227,0669	0,19	$[C_{14}H_{11}O_3]^+$
209,0600	7,68	209,0602	13,48	209,0592	10,60	-	-	-
201,0911	2,01	201,0908	7,68	201,0912	16,74	-	-	$[C_{13}H_{13}O_2]^+$
199,0750	8,47	199,0756	19,76	199,0753	23,05	199,0740	0,25	$[C_{13}H_{11}O_2]^+$
185,0601	4,85	185,0596	11,99	185,0597	29,71	185,0600	3,80	$[C_{12}H_9O_2]^+$
183,0805	96,01	183,0806	100	183,0805	68,19	183,0790	2,81	$[C_{13}H_{11}O]^+$
181,0646	2,29	181,0652	6,92	181,0649	41,71	181,0636	4,84	-
159,0416	0,18	-	-	159,0444	3,08	159,0437	14,65	-
155,0857	25,05	155,0854	47,93	155,0855	55,15	155,0852	7,05	$[C_{12}H_{11}]^+$
153,0694	1,55	153,0700	1,46	153,0699	17,33	153,0697	31,96	-
152,0623	0,31	152,0600	0,52	152,0637	2,50	152,0620	38,61	-
144,0578	1,58	144,0582	0,90	144,0575	5,42	144,0567	21,77	-
141,0699	20,11	141,0698	47,88	141,0699	100	141,0699	47,78	$[C_{11}H_9]^+$
-	-	139,0532	0,66	139,0538	0,98	139,0540	15,13	-
-	-	131,0468	0,31	131,0489	0,63	131,0492	16,62	-
129,0711	0,62	129,0702	1,20	129,0701	5,35	129,0697	24,05	-
128,0622	1,43	128,0611	0,34	128,0626	2,03	128,0619	34,18	$[C_{10}H_8]^{*+}$
127,0503	0,17	127,0549	0,26	127,0546	1,98	127,0546	26,76	$[C_{10}H_7]^+$
115,0553	0,84	115,0541	1,72	115,0543	6,89	115,0543	100	$[C_9H_7]^+$
-	-	-	-	103,0549	0,32	103,0540	22,38	-
77,0387	0,81	77,0375	0,11	77,0386	2,28	77,0388	25,36	$[C_6H_5]^+$
55,0188	0,60	55,0179	0,34	55,0180	4,75	55,0182	10,75	-
43,0171	0,47	43,0179	0,37	43,0182	9,34	43,0183	26,99	$[C_2H_3O]^+$

Shema fragmentiranja iona m/z 245,0824 pri 10 V prikazana je na slici 43.

Slika 43. Predložena shema fragmentiranja ionskog kompleksa m/z 245,0824 pri kolizijskom potencijalu od

10 V

Zadnja provedena analiza tandemnom spektrometrijom masa odnosila se na ion m/z 259,0976 (tablica 39), čiji se kromatografski pik nalazio pri vremenu zadržavanja od 12,23 min (slika 38). Gubitkom neutralnog fragmenta CH_3OH iz ionskog kompleksa m/z 259,0966 nastaje ion m/z 227,0706, ion koji je nastao i pri MS/MS analizi DP9 m/z 245,0808 (slika 43). Fragmentiranjem ionskog kompleksa m/z 259,0966 također može nastati ion m/z 241,0861 gubitkom molekule vode. Ion m/z 227,0706 dalje fragmentira na ion m/z 183,0807 gubitkom neutralne molekule CO_2 ili na ion m/z 199,0756 gubitkom CO . Ion m/z 241,0861 također može fragmentirati uz gubitak molekule CO pri čemu

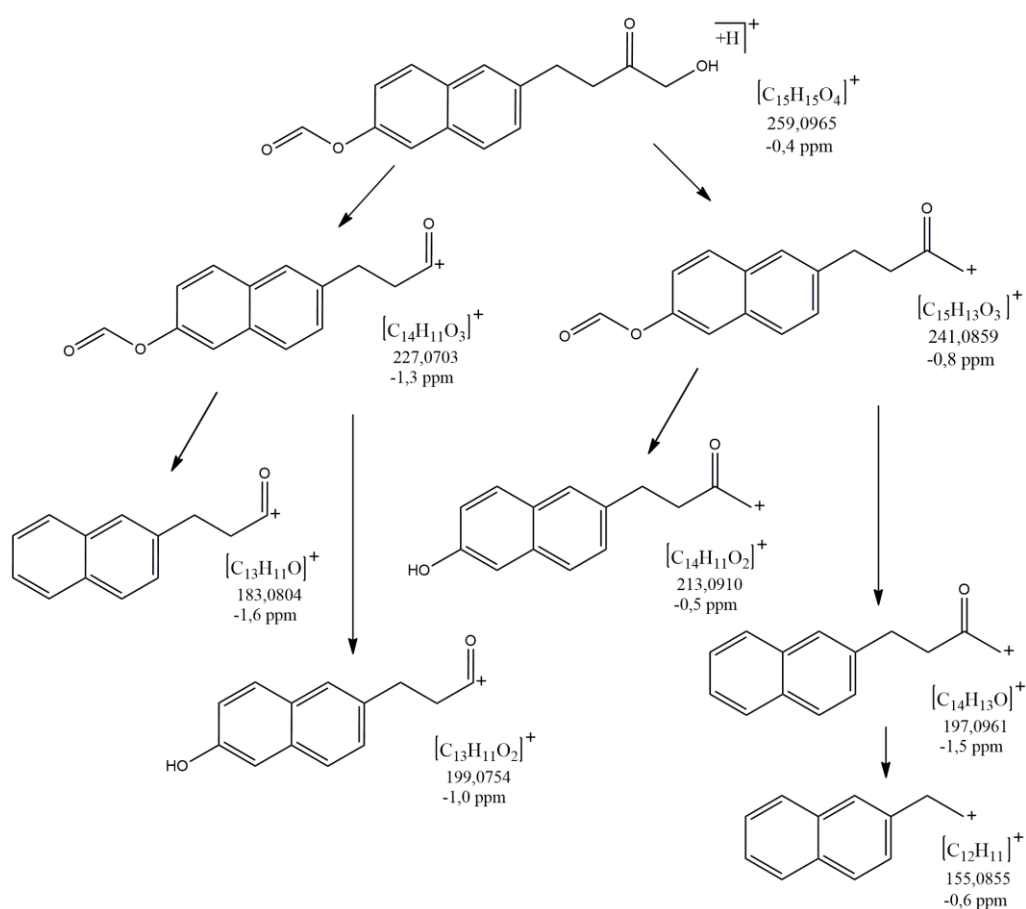
nastaje ion m/z 213,0911, odnosno gubitkom CO_2 i nastajanjem iona m/z 197,0964. Daljnjim cijepanjem iona m/z 197,0964 nastaje ion m/z 155,0856. Ioni pri m/z 241,0865 i m/z 197,0969 nalaze se i u MS spektru te je zaključeno kako se radi o *in-source* fragmentima iona m/z 259,0976. Na temelju podataka dobivenih MS/MS analizom pretpostavlja se da je ion m/z 259,0976 razgradni produkt (DP10) te je predložena njegova fragmentacijska shema (slika 44).

Tablica 39. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP10 ($m/z = 259,0976$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
259,0969	95,24	259,0966	10,82	259,0976	0,19	-	-	$[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_4]^+$
241,0861	100	241,0861	55,54	241,0857	4,75	241,0862	0,18	$[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3]^+$
227,0702	13,53	227,0706	15,59	227,0704	11,82	-	-	$[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$
213,0910	4,99	213,0911	10,16	213,0908	12,14	-	-	$[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$
209,0600	50,22	209,0601	75,21	209,0601	56,30	209,0595	1,15	-
199,0750	2,95	199,0756	9,66	199,0755	30,82	199,0753	2,48	$[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$
197,0964	53,80	197,0964	100	197,0964	100	197,0959	1,19	$[\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}]^+$
183,0812	3,44	183,0807	10,76	183,0809	25,18	183,0797	1,44	$[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}]^+$
182,0725	0,63	182,0720	3,38	182,0727	29,05	182,0722	2,51	-
181,0650	4,50	181,0650	11,56	181,0650	63,02	181,0653	18,76	-
173,0604	0,24	173,0594	0,20	173,0599	2,93	173,0597	17,44	-
165,0699	0,56	165,0696	0,94	165,0697	9,45	165,0700	9,43	-
157,0640	0,48	157,0647	0,70	157,0649	9,29	157,0647	13,80	-
155,0852	6,29	155,0856	13,85	155,0856	52,93	155,0855	9,69	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}]^+$
154,0778	1,35	154,0775	1,36	154,0778	20,05	154,0778	16,28	-
153,0696	1,55	153,0703	3,32	153,0701	25,54	153,0701	100	-
152,0622	0,61	152,0625	0,83	152,0619	5,13	152,0621	49,35	-
143,0499	0,33	143,0497	1,16	143,0489	8,20	143,0492	40,35	-
141,0693	0,39	141,0704	0,78	141,0700	7,11	141,0700	13,86	$[\text{C}_{11}\text{H}_9]^+$
-	-	139,0527	0,24	139,0541	1,11	139,0540	14,08	-

Tablica 39 nastavak. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala u MS/MS spektrima DP10 ($m/z = 259,0976$).

5 V		10 V		20 V		40 V		Asignacija
m/z	%	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
129,0688	0,23	129,0696	0,50	129,0701	4,88	129,0698	30,43	-
128,0622	0,33	128,0627	0,48	128,0619	3,73	128,0622	35,03	$[C_{10}H_8]^{++}$
-	-	127,0540	0,12	127,0537	1,02	127,0541	19,54	$[C_{10}H_7]^+$
115,0547	0,75	115,0538	0,64	115,0538	4,50	115,0544	43,87	$[C_9H_7]^+$
-	-	102,0463	0,18	102,0462	0,37	102,0464	6,95	$[C_8H_6]^{++}$
59,0130	1,14	59,0133	2,11	59,0132	17,12	59,0131	15,63	$[C_2H_3O_2]^+$
43,0191	0,16	43,0182	0,39	43,0183	3,62	43,0187	13,67	$[C_2H_3O]^+$

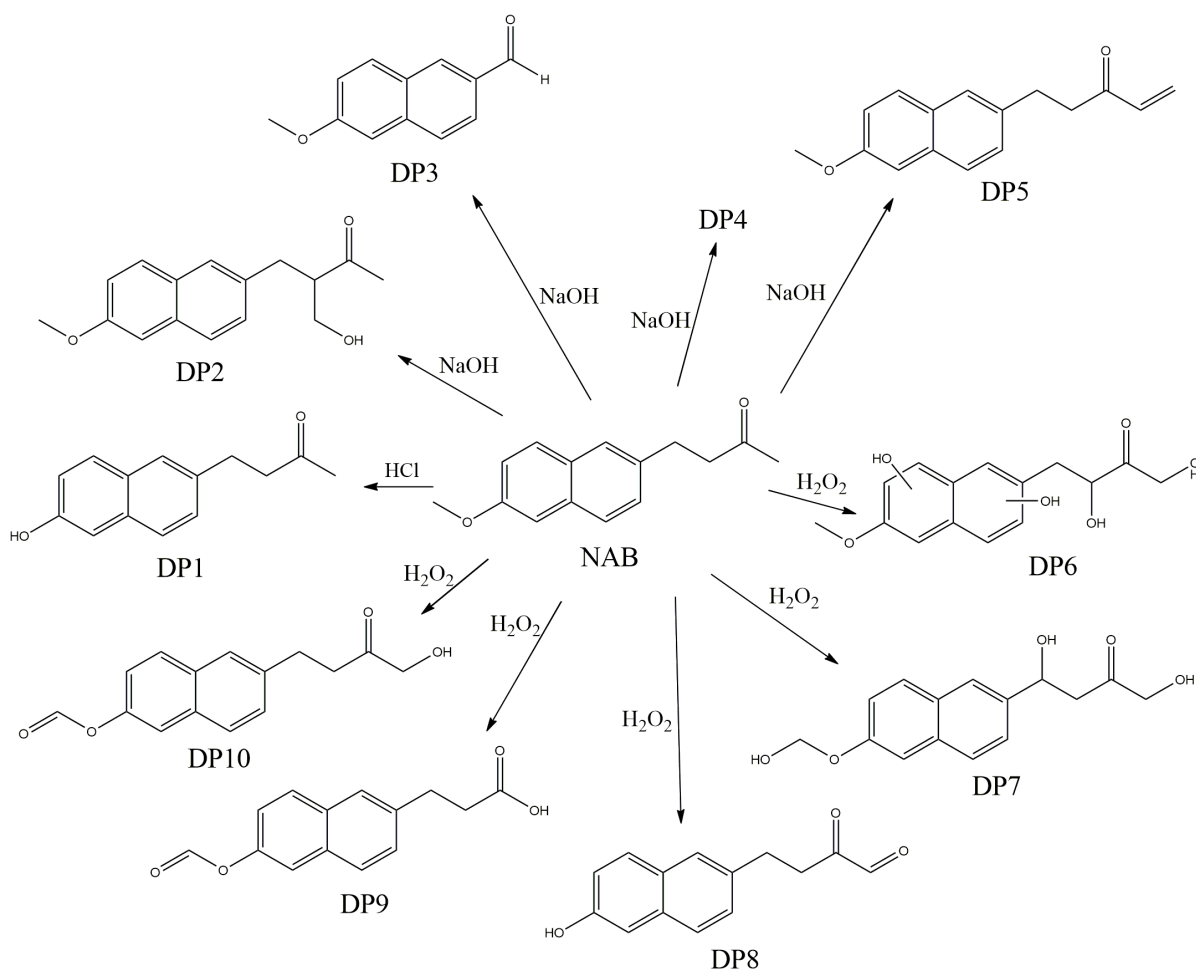


Slika 44. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 259,0976 pri kolizijskom potencijalu od

10 V

4.3.6. Okarakterizirani razgradni produkti nabumetona, bez i uz prisutnost β -CD

Na temelju provedenih analiza prisilne razgradnje može se zaključiti da je prisilnom razgradnjom u kiselim uvjetima nastao jedan razgradni produkt, u bazičnim uvjetima četiri razgradna produkta od kojih jedan nije uspješno okarakteriziran te u oksidativnim uvjetima pet uz potencijalne dodatne razgradne produkte. Predložene strukture svih razgradnih produkata, okarakteriziranih na temelju njihovih MS i MS/MS spektara, prikazane su na slici 45.



Slika 45. Predložene strukture dobivenih razgradnih produkata nabumetona

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada provedene su studije prisilne razgradnje u hidrolitičkim ili oksidativnim uvjetima pri sobnoj i pri povišenoj temperaturi od 80 °C na uzorcima nabumetona te uzorcima kompleksa nabumetona s β -CD. Kompleksi su pripremljeni tehnikom suhog mljevenja u visokoenergijskim vibracijskim mlinovima. Uzorci nabumetona i kompleksa bili su stabilni pod uvjetima neutralnog hidrolitičkog stresa, dok su pri kiselj hidrolitičkoj razgradnji dali jedan razgradni produkt. Na temelju provedenih mjerenja, ne može se sa sigurnošću utvrditi utjecaj β -CD na stabilnost nabumetona pri kiselj hidrolizi. Prilikom razgradnje NAB u bazičnim hidrolitičkim uvjetima prisutnost β -CD je neznatno povećavala stupanj njegove razgradnje. Najveći utjecaj β -CD na razgradnju NAB uočen je prilikom oksidativne razgradnje. Sam NAB nije bio podložan oksidativnoj razgradnji čak ni pri povišenoj temperaturi, dok je postotak razgradnje nabumetona u uzorku kompleksa pri tim uvjetima iznosio čak 33,8 %. U oksidativnim uvjetima pri povišenoj temperaturi dolazi do pucanja O-O veze u molekulama vodikovog peroksida i nastanka reaktivnih hidroksilnih radikala koji mogu utjecati na stabilnost kompleksa. Općenito, povišena temperatura je pospješila razgradnju nabumetona u prisutnosti nekog od stresnih reagenasa (HCl, NaOH ili H₂O₂).

Razgradne produkte nabumetona koji su okarakterizirani spektrometrijom masa i tandemnom spektrometrijom masa trebalo bi izolirati u većoj količini, primjerice preparativnom kromatografijom. Nadalje, na izoliranim razgradnim produktima trebalo bi ponovo provesti detaljnu masenospektrometrijsku analizu kako bi se izbjegao fenomen *in-source* fragmentiranja koji je uvelike otežavao karakterizaciju ovih produkata. Za potvrdu struktura razgradnih produkata predloženih na temelju spektrometrije masa treba provesti i dodatnu karakterizaciju spektroskopijom NMR.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

6-MNA – 6-metoksi-2-naftiloctena kiselina

APCI – kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*)

BCS – biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari (engl. *Biopharmaceutics Classification System*)

CD – ciklodekstrin (engl. *cyclodextrin*)

α -CD – α -ciklodekstrin (engl. *α -cyclodextrin*)

β -CD – β -ciklodekstrin (engl. *β -cyclodextrin*)

γ -CD – γ -ciklodekstrin (engl. *γ -cyclodextrin*)

CE – kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*)

CI – kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*)

CID – kolizijom izazvana disocijacija (engl. *collision-induced dissociation*)

COX – enzim ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*)

DAD – detektor s diodnim nizom (engl. *diode array detector*)

DP – degradacijski produkt (engl. *degradation product*)

DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*)

EE⁺ – ion parnog broja elektrona (engl. *even-electron ion*)

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

EI – tehnika ionizacije elektronima (engl. *electron impact ionization*)

ESI – elektroraspršenje (engl. *electrospray ionization*)

FT-ICR MS – Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko ciklotronske rezonancije

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)

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

HP β CD – hidroksipropil β -ciklodekstrin (engl. *hydroxypropyl β -cyclodextrin*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

HPLC-DAD – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz detektor s diodnim nizom (engl. *high performance liquid chromatography – diode array detector*)

HPTLC – tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance thin layer chromatography*)

HRMS – HPLC spregnut sa spektrometrom masa visokog razlučivanja (engl. *high-resolution mass spectrometry*)

ICH – Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za ljudsku primjenu (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)

ISF – fragmentacija unutar ionskog izvora (engl. *in-source fragmentation*)

IUPAC – međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LC-MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*)

LC-MS/MS – spregnuti sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*)

MS – spektrometrija mase (engl. *mass spectrometry*)

MS/MS – tandemna spektrometrija masa (engl. *tandem mass spectrometry*)

m/z – omjer mase i naboja iona (engl. *mass-to-charge ratio*)

NAB – nabumeton (engl. *nabumetone*)

NSAID – nesteroidni protuupalni lijek (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*)

NMR spektroskopija – spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*)

OA – osteoartritis (engl. *osteoarthritis*)

OE⁺ – ion s neparnim brojem elektrona (engl. *odd-electron ion*)

P – površina pika

PXRD – rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku (engl. *powder x-ray diffraction*)

Q – kvadrupol (engl. *quadrupole*)

QTOF-MS – kvadrupolni analizator masa s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *quadrupole time-of-flight mass spectrometry*)

RMβCD – nasumično metilirani β-ciklodekstrin (engl. *randomly methylated β-cyclodextrin*)

RA – reumatoidni artritis (engl. *rheumatoid arthritis*)

RP-UPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. *reverse phase-ultra performance liquid chromatography*)

SEM – pretražna elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscopy*)

SFC – fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*)

SIM – metoda za praćenje stabilnosti ili stabilitetno-indikativna metoda (engl. *stability indicating method*)

TIC – kromatogrami ukupne ionske struje (engl. *the total ion current chromatogram*)

TSP – termoraspršenje (engl. *thermospray ionization*)

UPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*)

USFDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *United States Food And Drug Administration*)

UV/Vis – ultraljubičasto i vidljivo područje elektromagnetskog spektra (engl. *ultraviolet-visible*)

Q–TOF – hibrid kvadrupola i analizatora koji mjeri vrijeme leta (engl. *quadrupole-time of flight*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

XRPD – rendgenska difrakcija na praškastom uzorku (engl. *X-ray powder diffraction*)

+ – simbol lokalizacije kationa

• – simbol lokalizacije radikala

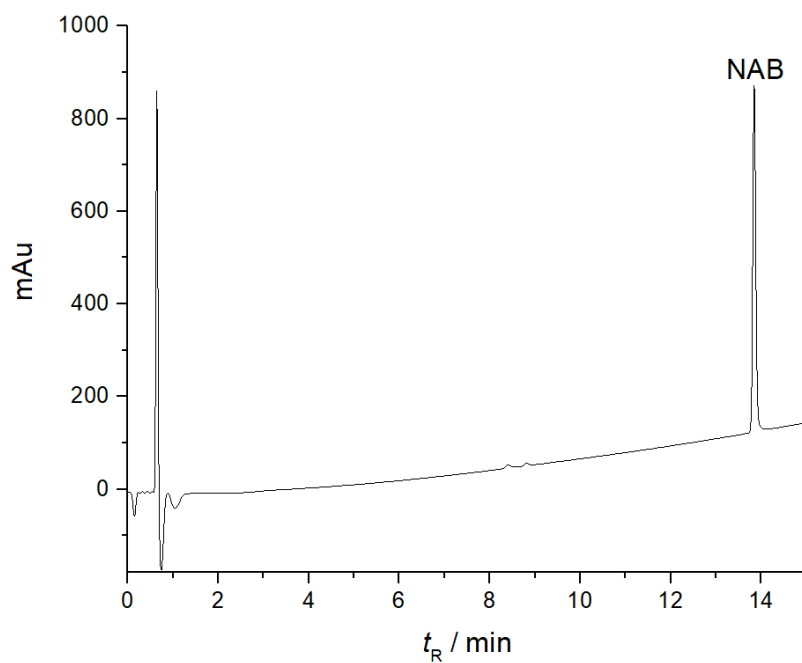
* – simbol potencijalnog razgradnog produkta

§ 7. LITERATURNI IZVORI

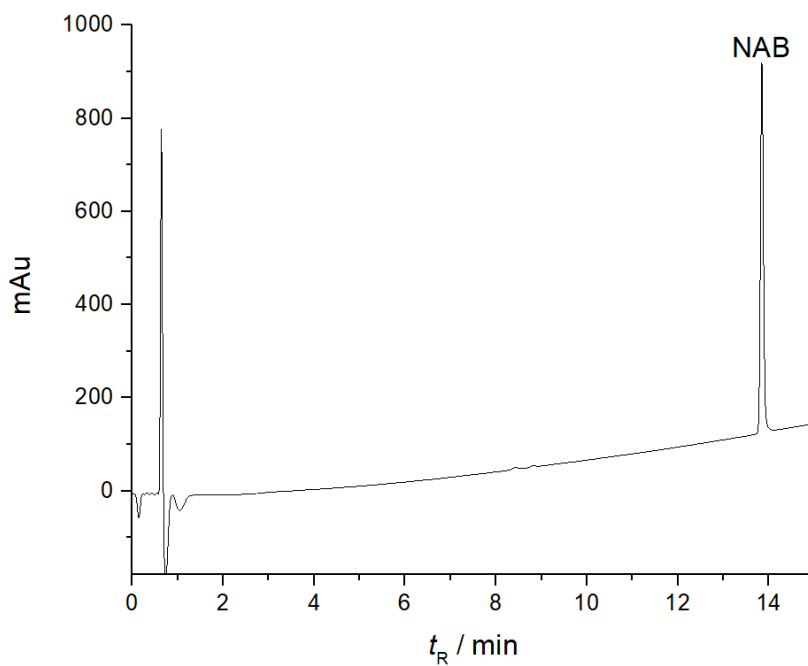
1. T. Hedner, O. Samulesson, P. Währborg, H. Wadenvik, K.-A. Ung, A. Ekbom, *Drugs* **64** (2004) 2315–2343.
2. M. Starek, J. Krzek, *Talanta* **77** (2009) 925–942.
3. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4409> (datum pristupa 4. srpnja 2022.)
4. S. M. Kawish, S. Ahmed, A. Gull, M. Aslam, J. Pandit, M. Aqil, Y. Sultana, *J. Mol. Liq.* **231** (2017) 514–522.
5. G. S. Sushmitha, G. Pai, M. Krishna, S. G. Vasantharaju, *Res. J. Pharm. Technol.* **11(11)** (2018) 4813–4820.
6. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00461> (datum pristupa 7. srpnja 2022.)
7. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 272–284.
8. P. Khadka, K. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun, J. Lee, *Asian J. Pharm. Sci.* **9** (2014) 304–316.
9. Y. Tsume, D. M. Mudie, P. Langguth, G. E. Amidon, G. L. Amidon, *Eur. J. Pharm. Sci.* **57** (2014) 152–163.
10. A. Charalabidis, M. Sfouni, C. Bergström, P. Macheras, *Int. J. Pharm.* **566** (2019) 264–281.
11. E. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
12. M. Jug, M. Bećirević-Laćan, *Farm. Glas.* **58** (2002) 189–204.
13. J. Zhang, P. X. Ma, *Adv. Drug Delivery Rev.* **65(9)** (2013) 1215–1233.
14. A. Popielec, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **531(2)** (2017) 532–542.
15. A. Celebioglu, F. Topuz, Z. Irem Yildiz, T. Uyar, *Carbohydr. Polym.s* **207** (2019) 471–479.
16. M. Jug, P. A. Mura, *Pharmaceutics* **10** (2018) 189.
17. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 238–250.
18. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 226–238.
19. M. Valero, S. M. B. Costa, J.R. Ascenso, M. M. Velázquez, L.J. Rodríguez, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **35** (1999) 663–677.
20. N. Goyenechea, M. Sánchez, I. Vélaz, C. Martín, M.C. Martínez-Ohárriz, G. González Gaitano, *Luminescence* **16(2)** (2001) 117–127.

21. N.A.F. Al-Rawashdeh, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **51** (2005) 27–32.
22. M.A. Occhiuzzi, F. Grande, M. De Luca, G. Ragno, A. Garofalo, G. Ioele, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **777** (2020) 1–8.
23. I. Colombo, G. Grassi, M. Grassi, *J. Pharm. Sci.* **98(11)** (2009) 3961–3986.
24. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, *J. Pharm. Anal.* **4(3)** (2014) 159–165.
25. H. Brummer, *SGS Life Science*, **31** (2011) 1–4.
26. A. K. Mullani, P. I. Nargatti, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **12(5)** (2021) 2683–2691.
27. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf (datum pristupa 10. listopada 2022.)
28. Y. L. Chew, M.-A. Khor, Y.-Y. Lim, *Heliyon*, **7** (2021) 1–12.
29. N. Sethi, A. Anand, K.K. Chandrul, G. Jain, K.S. Srinivas, *J. Chromatogr. Sci.* **50** (2012) 85–90.
30. S. Sawant, V. Barge, *Asian J. Chem.* **25** (2013) 6203–6208.
31. S. Miljanić, N. Galić, Viši praktikum analitičke kemije 1, Interna skripta, Zagreb, 2008.
32. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
33. <https://www.ru.nl/systemschemistry/equipment/chromatography/hplc/> (datum pristupa 13. listopada 2022.)
34. N. Galić, *Spektrometrija masa*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
35. N. Galić, *Kem. Ind.* **53(3)** (2004) 117–123.
36. D. R. Allen, B. C. McWhinney, *Clin. Biochem. Rev.* **40** (2019) 135–146.
37. A.J. Vyas, A.I. Patel, D.B. Sheth, J.R. Chavda, *Pharm. Lett.* **6(6)** (2014) 366–372.
38. B. West, C. Joblin, V. Blanchet, A. Bodi, B. Sztaray, P.M. Mayer, *J. Phys. Chem. A* **116** (2012) 10999–11007.
39. E. Fornal, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27** (2013) 1858–1866.
40. J. Guo, S. Shen, S. Xing, H. Yu, T. Huan, *Anal. Chem.* **93** (2021) 10243–10250.
41. M. Valero, *J. Photochem. Photobiol. A* **163** (2004) 159–164.
42. C. P. Pandya, S.J. Rajput, *J. Appl. Pharm. Sci.* **10(4)** (2020) 075–099.
43. S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, *Pharmaceutical stress testing – Predicting drug degradation*, 2nd edition, Informa Healthcare, London, 2011, str. 1–27.

§ 8. DODATAK



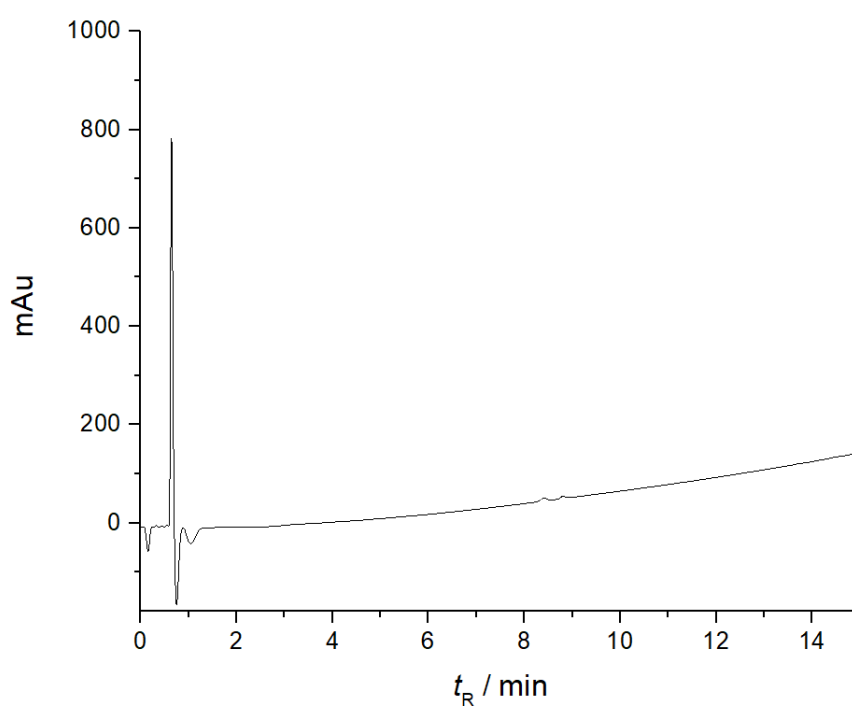
Slika D1. Kromatogram kontrolnog uzorka NAB pri valnoj duljini od 231 nm



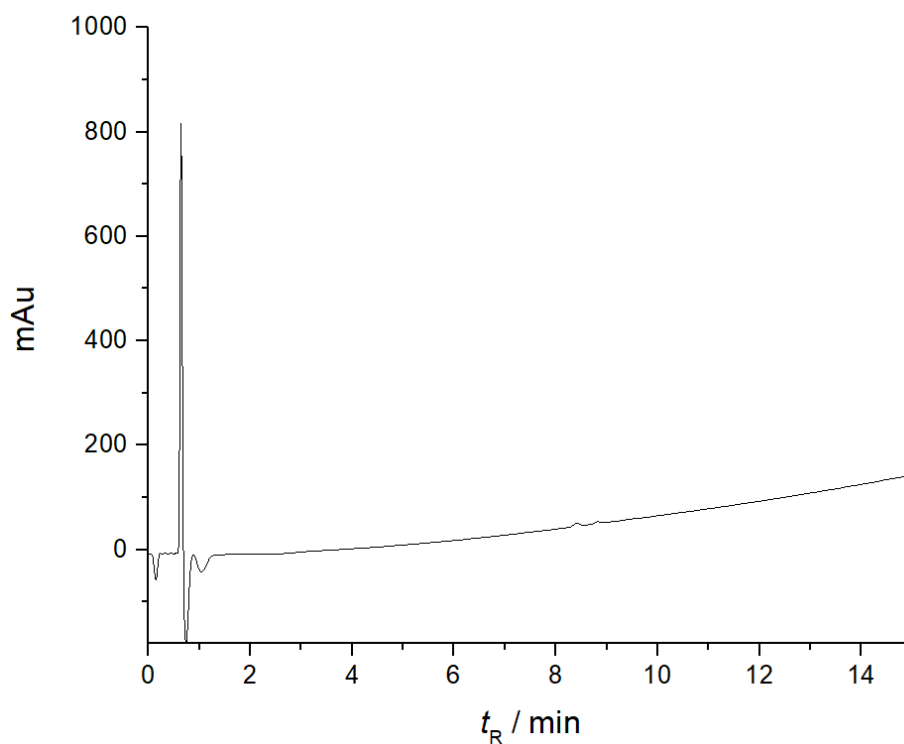
Slika D2. Kromatogram kontrolnog uzorka NAB/β-CD pri valnoj duljini od 231 nm

Tablica D1. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) nabumetona u kontrolnim uzorcima NAB i NAB/ β -CD pri 231 nm

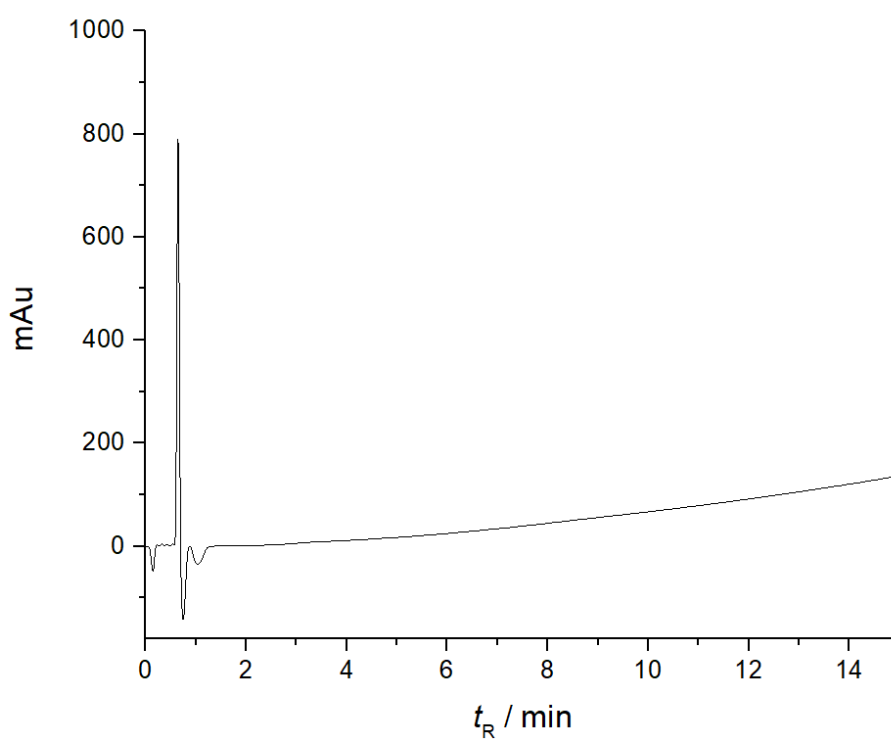
Uzorak	P	t_R / min
NAB kontrola	3428,0	13,84
NAB/ β -CD kontrola	3625,0	13,85



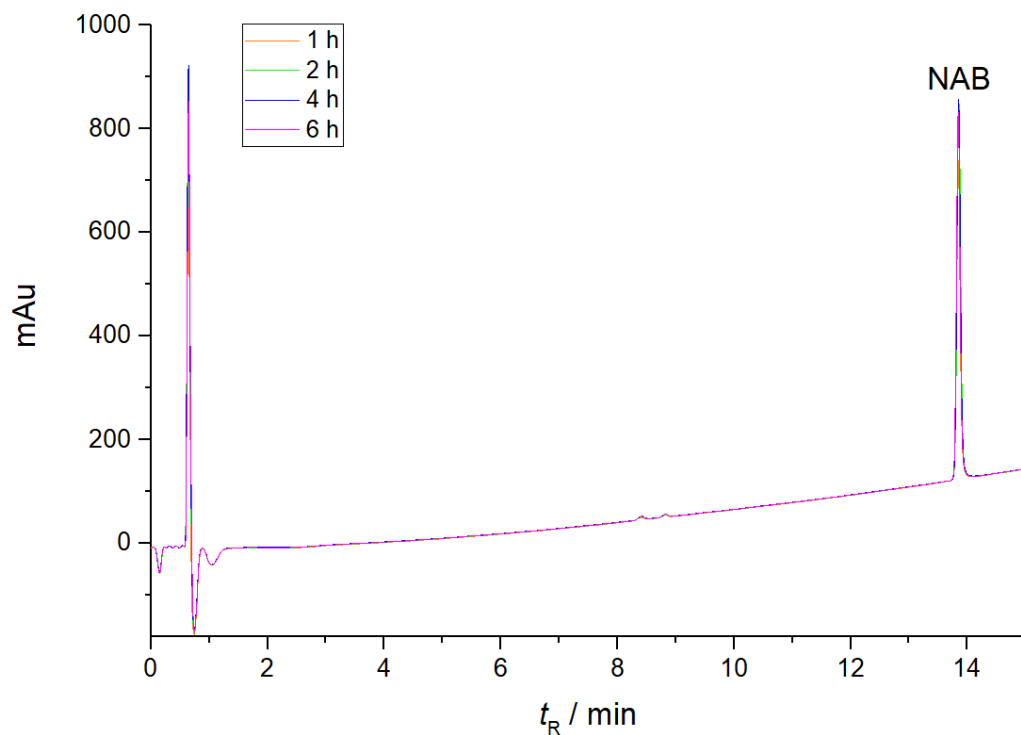
Slika D3. Kromatogram slijepe probe metanola i vode na sobnoj temperaturi pri valnoj duljini od 231 nm



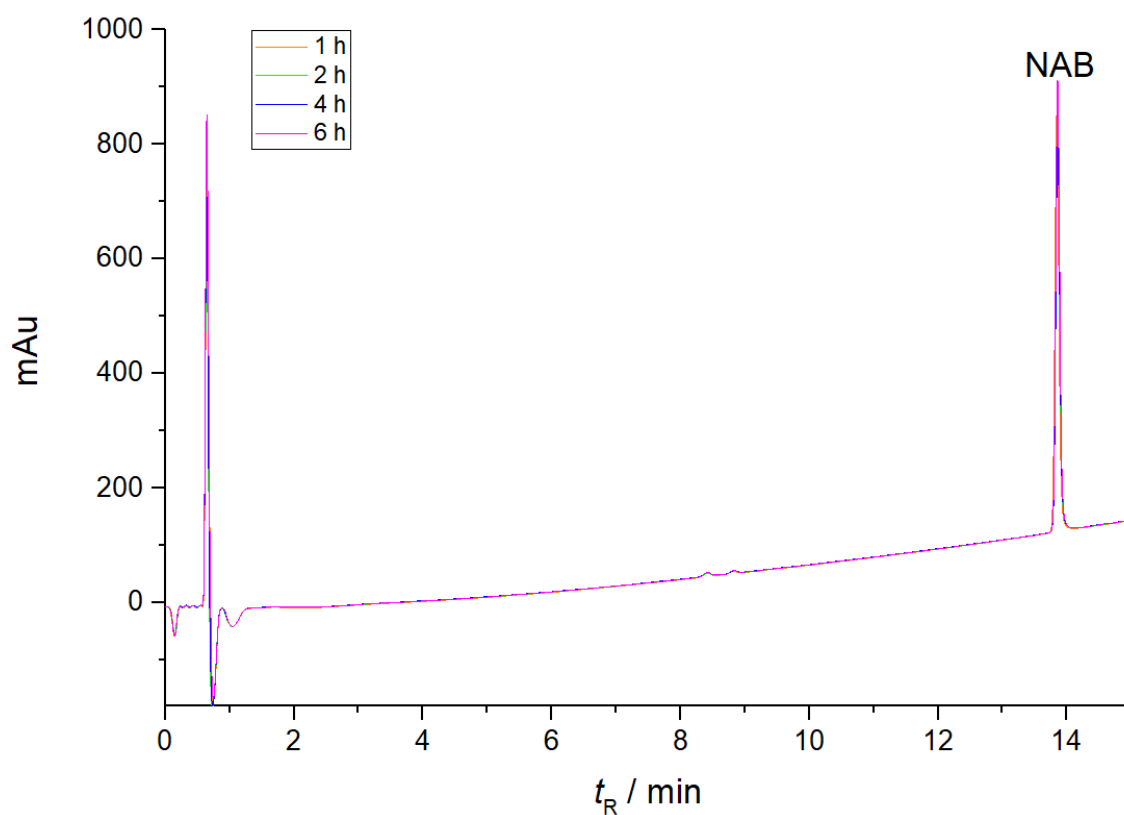
Slika D4. Kromatogram slijepe probe s klorovodičnom kiselinom i natrijevim hidroksidom pri valnoj duljini od 231 nm



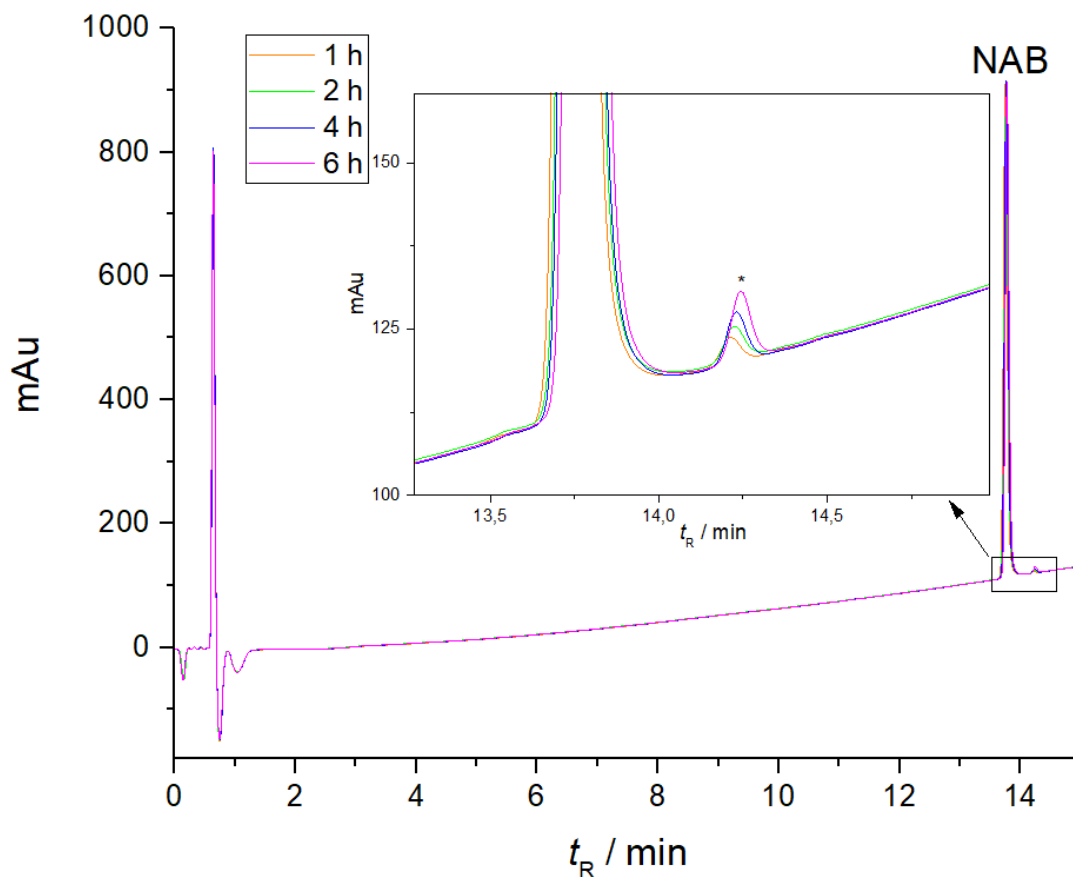
Slika D5. Kromatogram slijepe probe s vodikovim peroksidom pri valnoj duljini od 231 nm



Slika D6. Kromatogrami uzoraka NAB nakon hidrolitičke razgradnje u kiselim uvjetima pri s. t. u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm



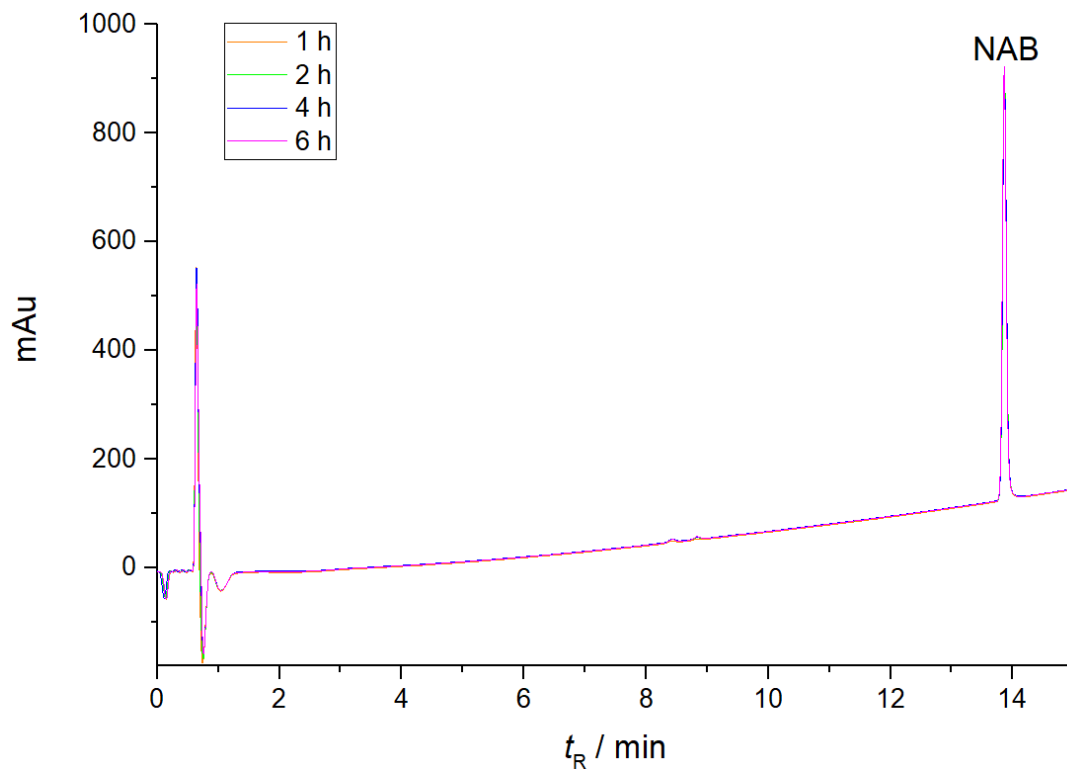
Slika D7. Kromatogrami uzoraka NAB nakon hidrolitičke razgradnje u bazičnim uvjetima pri s. t. u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm



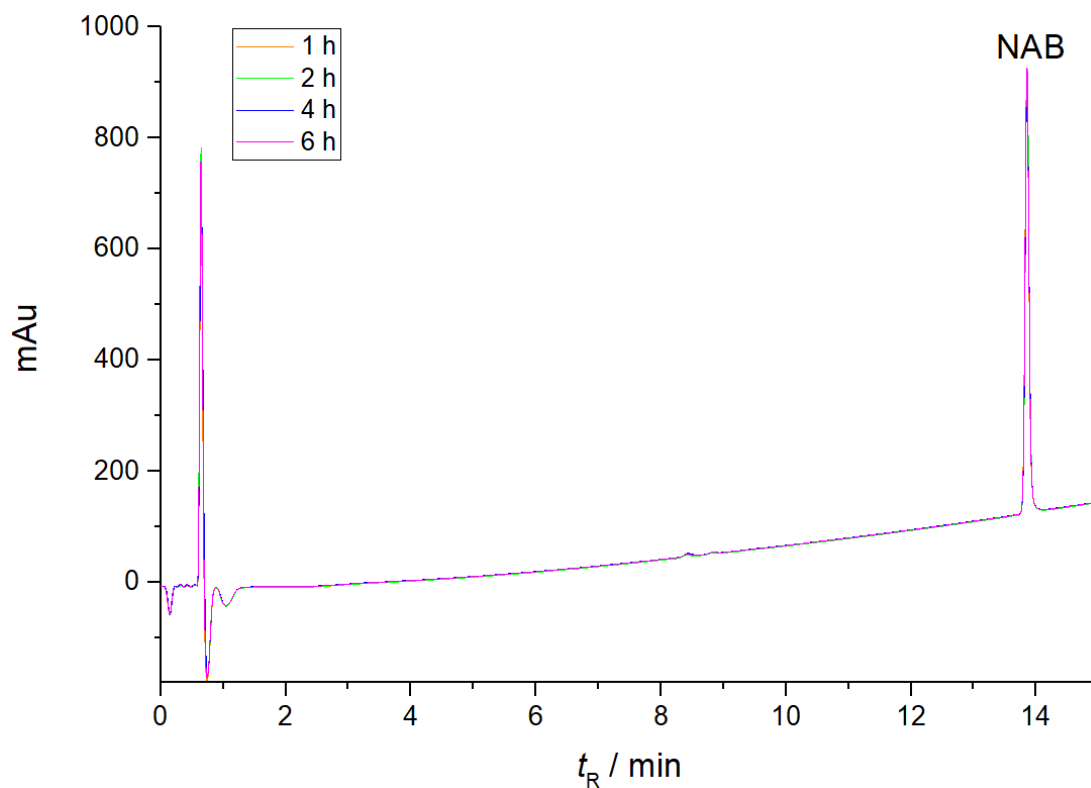
Slika D8. Kromatogrami uzoraka NAB nakon oksidativne razgradnje pri s. t. u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm

Tablica D2. Površine pikova (P), vremena zadržavanja (t_R) i postotak razgradnje u odnosu na kontrolni uzorak za uzorke NAB/ β -CD nakon razgradnje u neutralnim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C, pri valnoj duljini od 231 nm

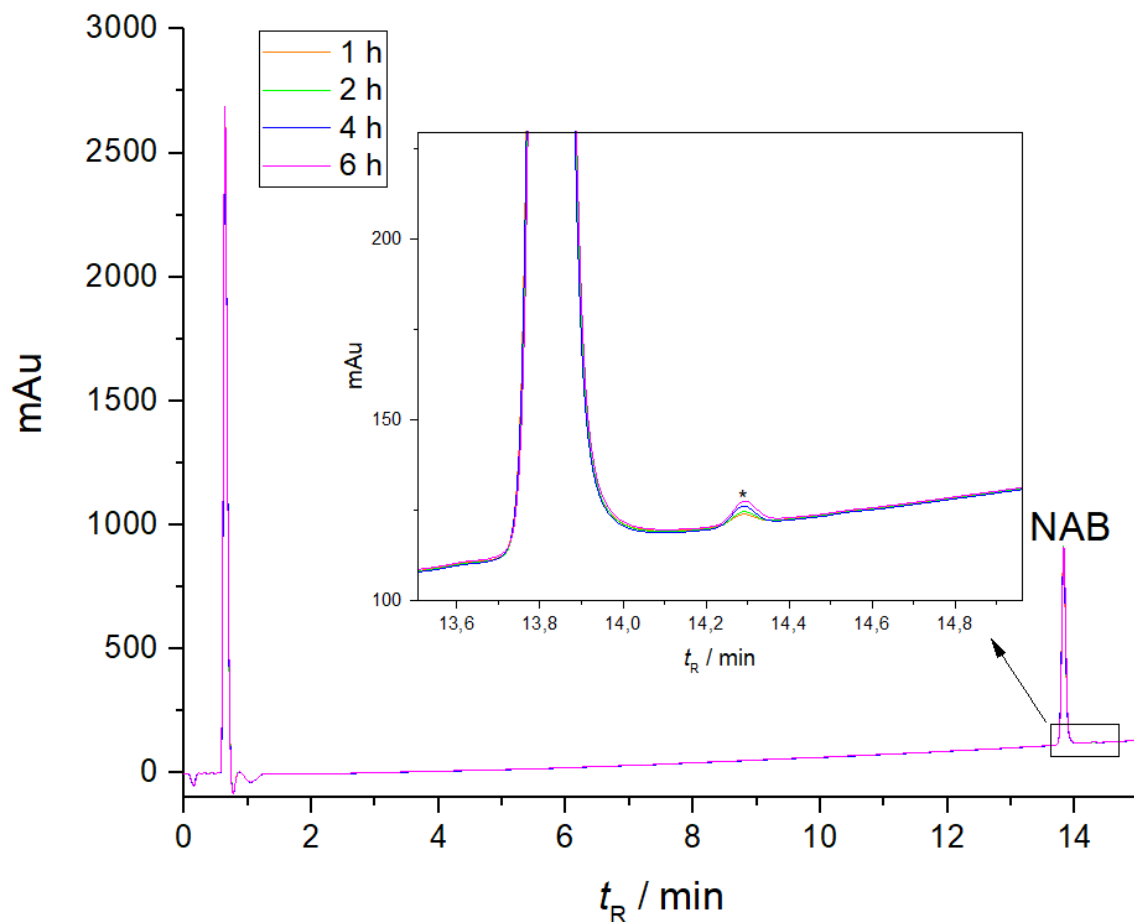
Uzorak	P	t_R / min	%
kontrola	3625,0	13,85	-
1 h (80 °C)	3645,6	13,83	-0,6
2 h (80 °C)	3538,3	13,84	2,4
4 h (80 °C)	3580,0	13,84	1,2
6 h (80 °C)	3489,2	13,84	3,7



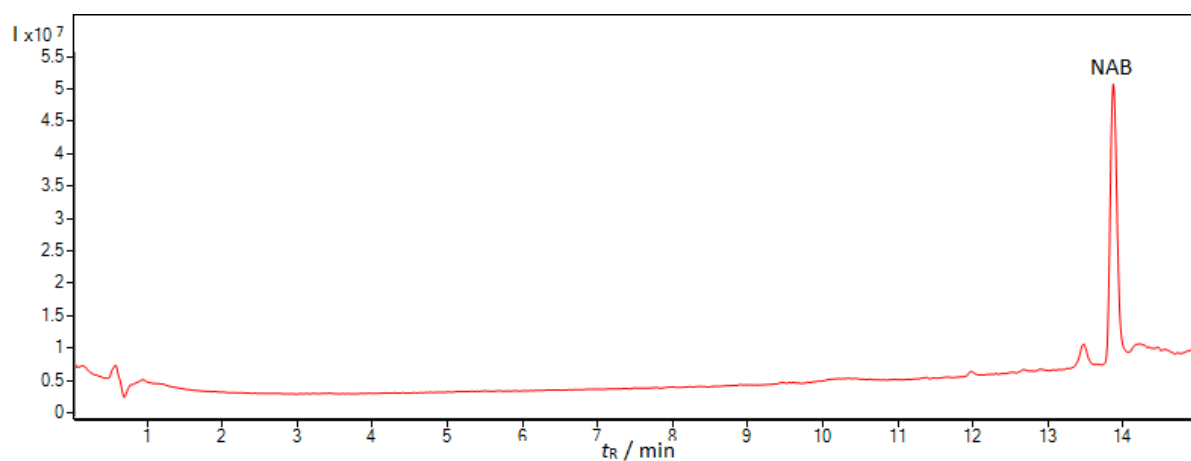
Slika D9. Kromatogrami uzoraka NAB/ β -CD nakon hidrolitičke razgradnje u kiselim uvjetima pri s. t. u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm



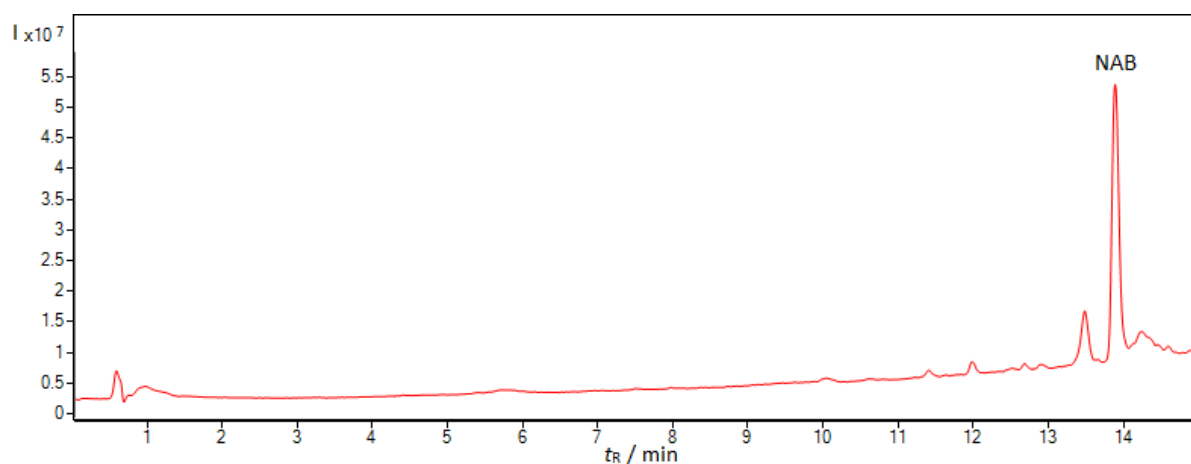
Slika D10. Kromatogrami uzoraka NAB/ β -CD nakon hidrolitičke razgradnje u bazičnim uvjetima pri s. t. u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm



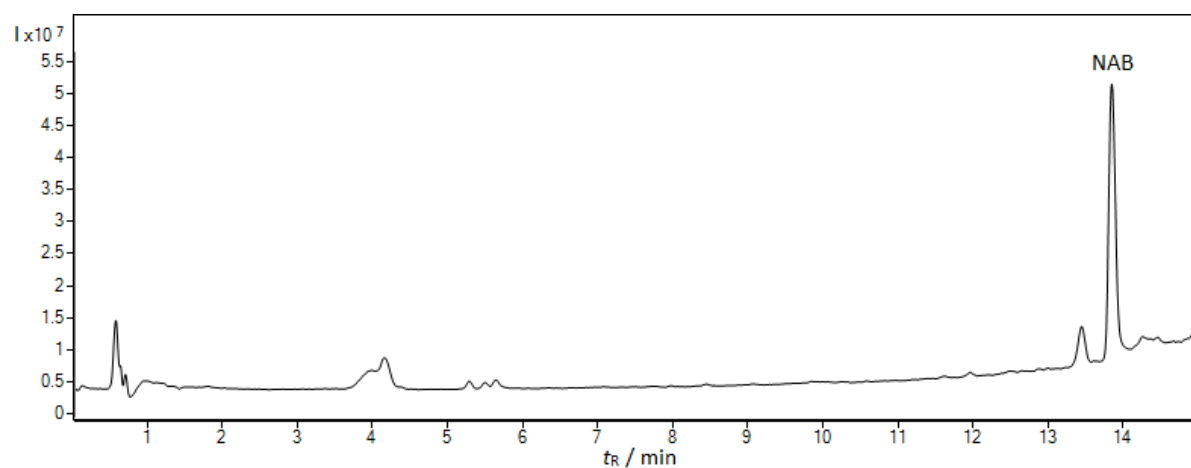
Slika D11. Kromatogrami uzoraka NAB/ β -CD nakon razgradnje u oksidativnim uvjetima pri s. t. u vremenskim periodima od 1, 2, 4 i 6 h, pri valnoj duljini od 231 nm



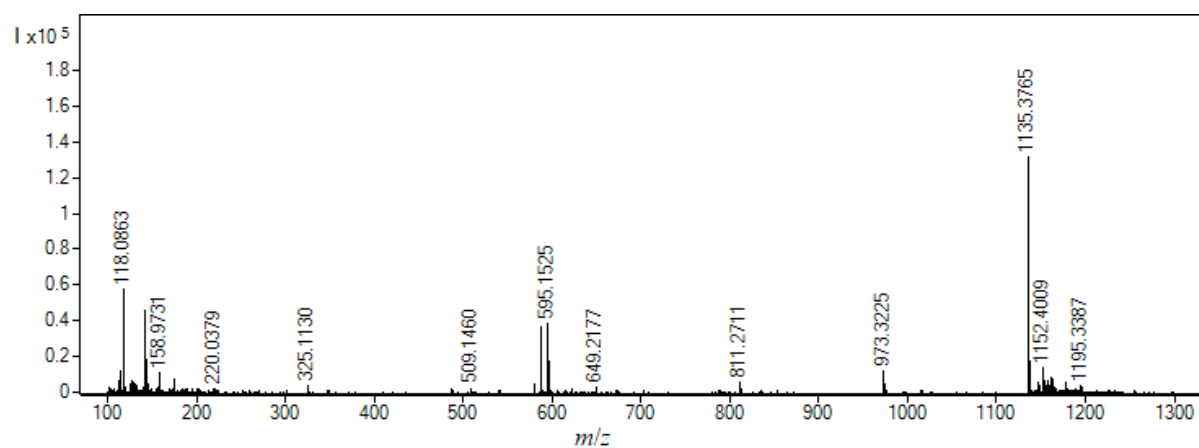
Slika D12. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB nakon 6 h razgradnje u neutralnim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C



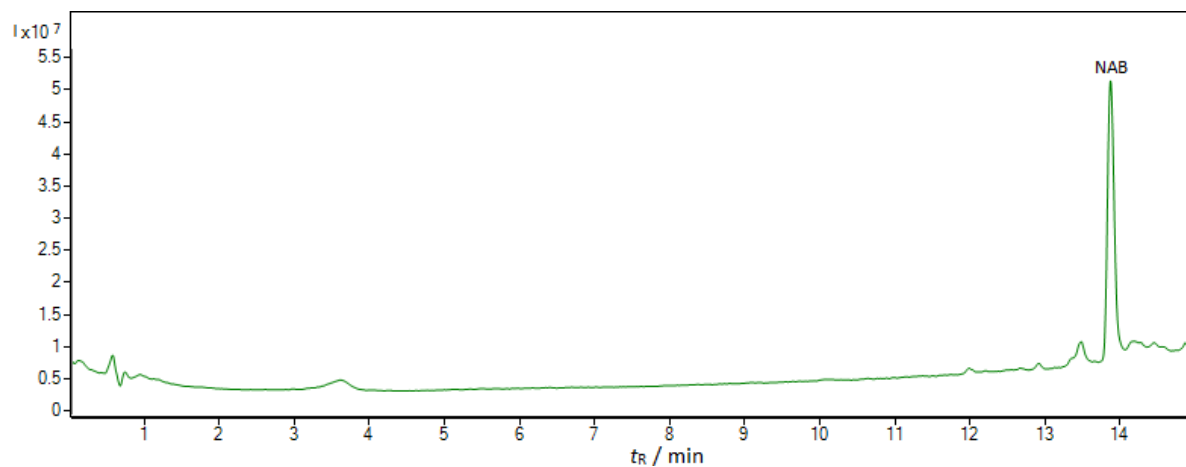
Slika D13. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C



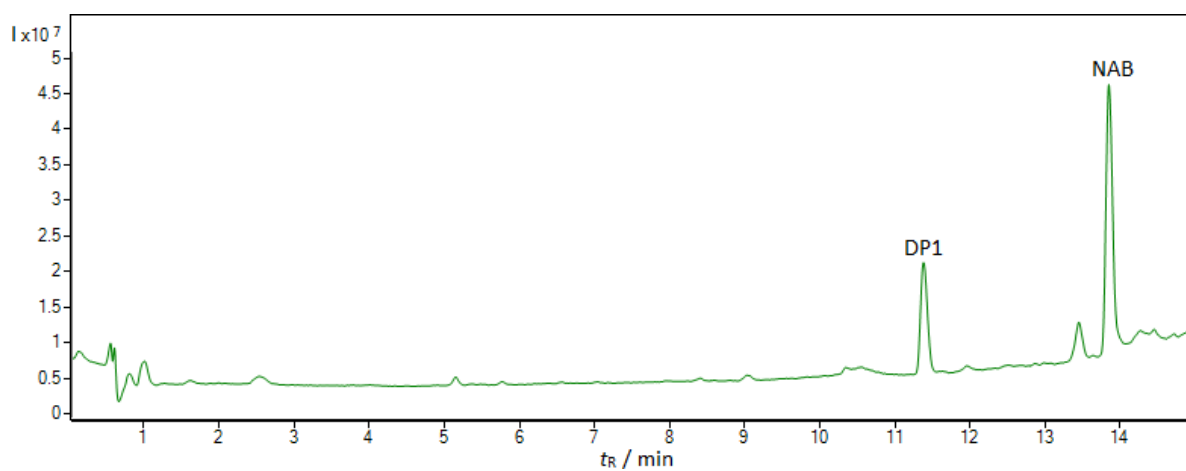
Slika D14. Kromatogram ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB/β-CD



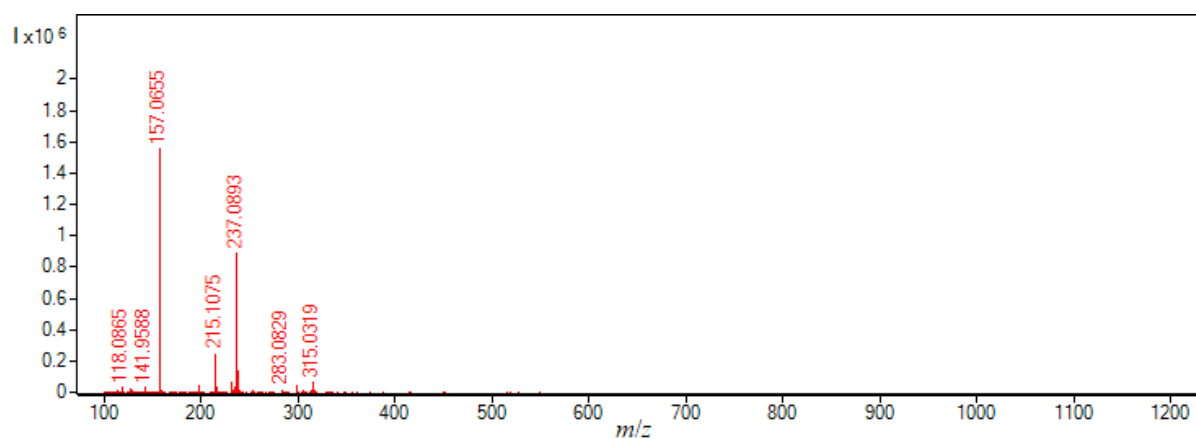
Slika D15. MS spektar kromatografskog pika β-CD (t_R = 4,17 min)



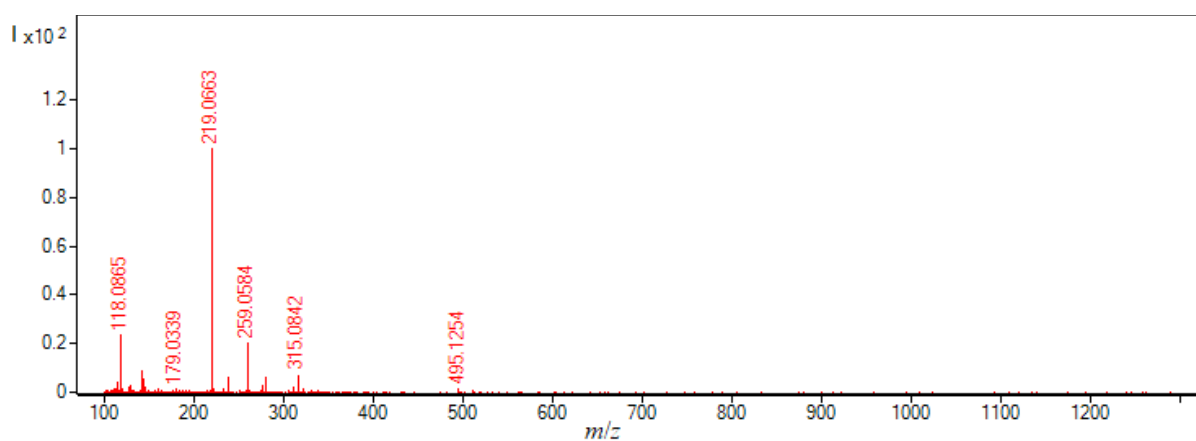
Slika D16. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u neutralnim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C



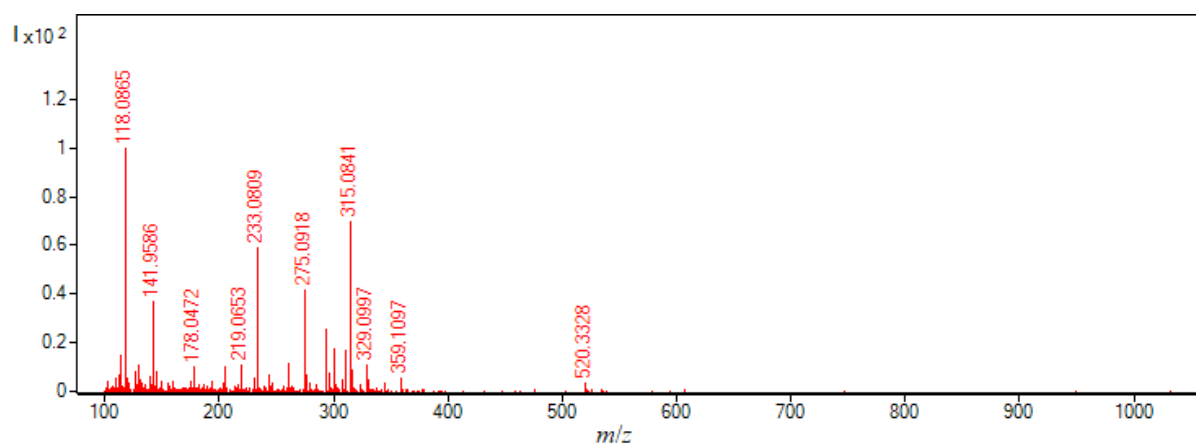
Slika D17. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u kiselim hidrolitičkim uvjetima pri 80 °C



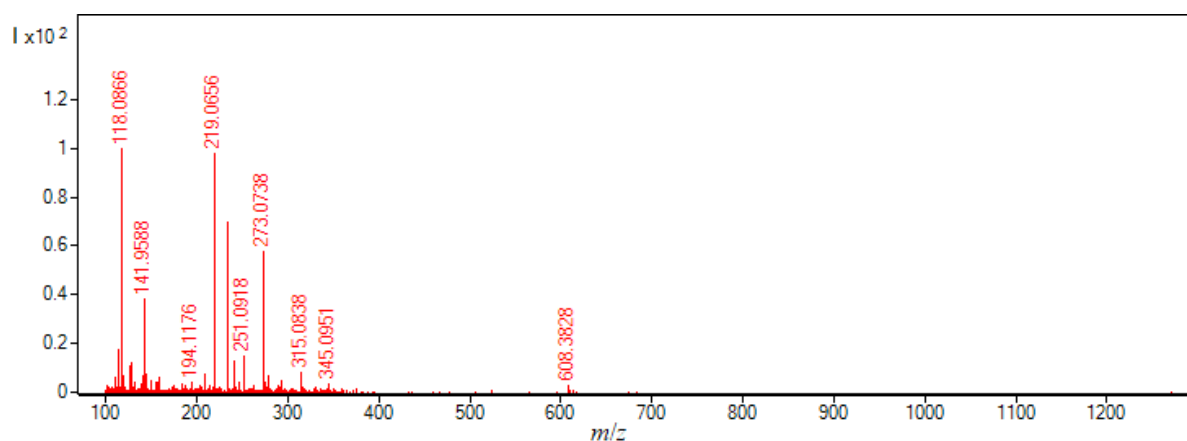
Slika D18. MS spektar kromatografskog pika razgradnog produkta DP1 iz uzorka NAB/ β -CD ($t_R = 11,40$ min)



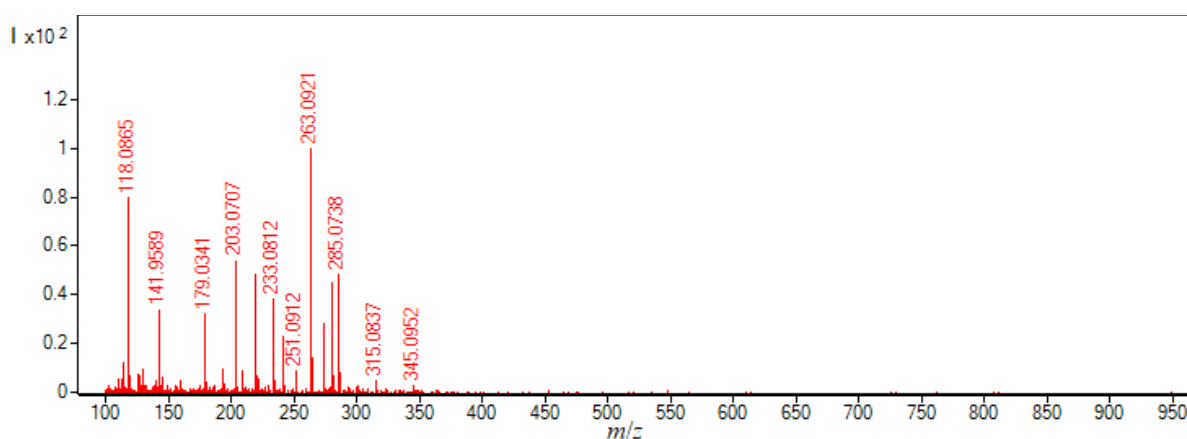
Slika D19. MS spektar kromatografskog pika potencijalnog razgradnog produkta iz uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C ($t_R = 7,82$ min)



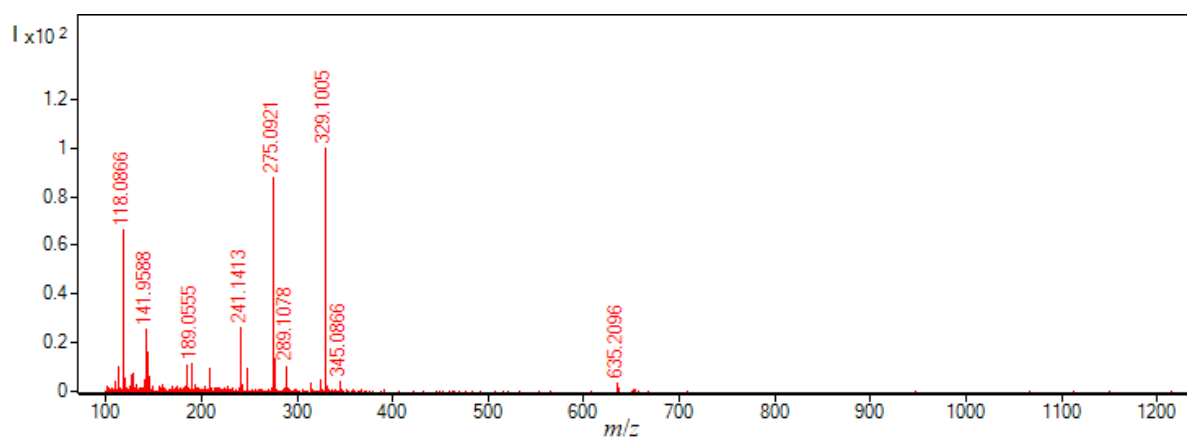
Slika D20. MS spektar kromatografskog pika potencijalnog razgradnog produkta iz uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C ($t_R = 8,78$ min)



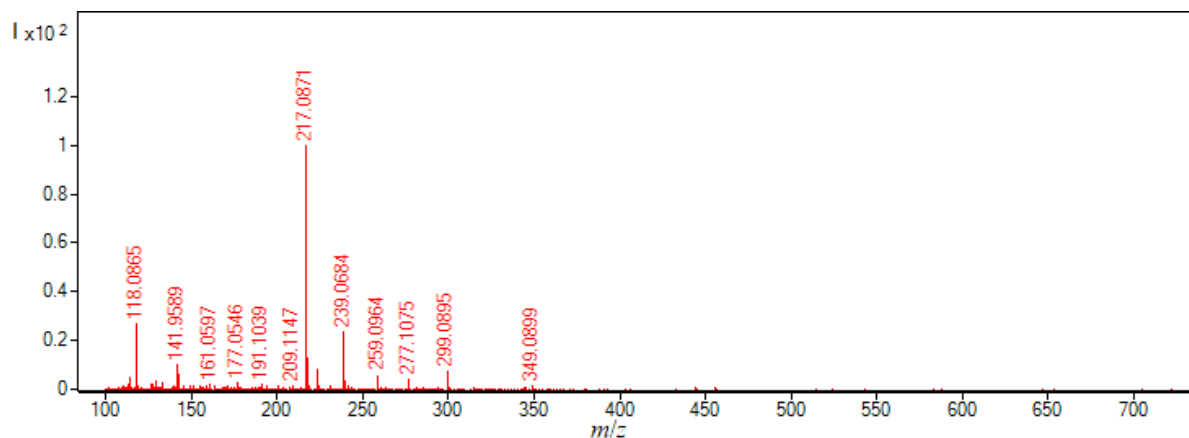
Slika D21. MS spektar kromatografskog pika potencijalnog razgradnog produkta iz uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C ($t_R = 9,33$ min)



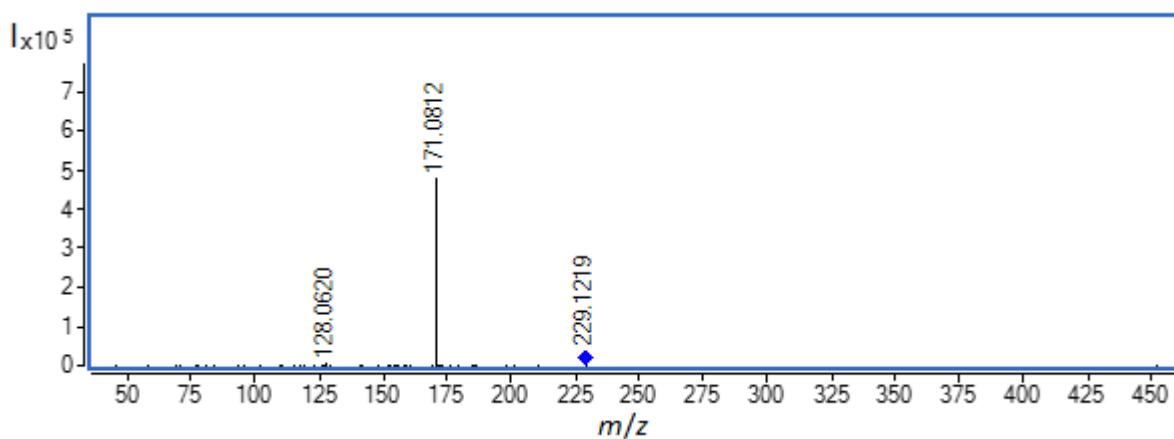
Slika D22. MS spektar kromatografskog pika potencijalnog razgradnog produkta iz uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C ($t_R = 9,45$ min)



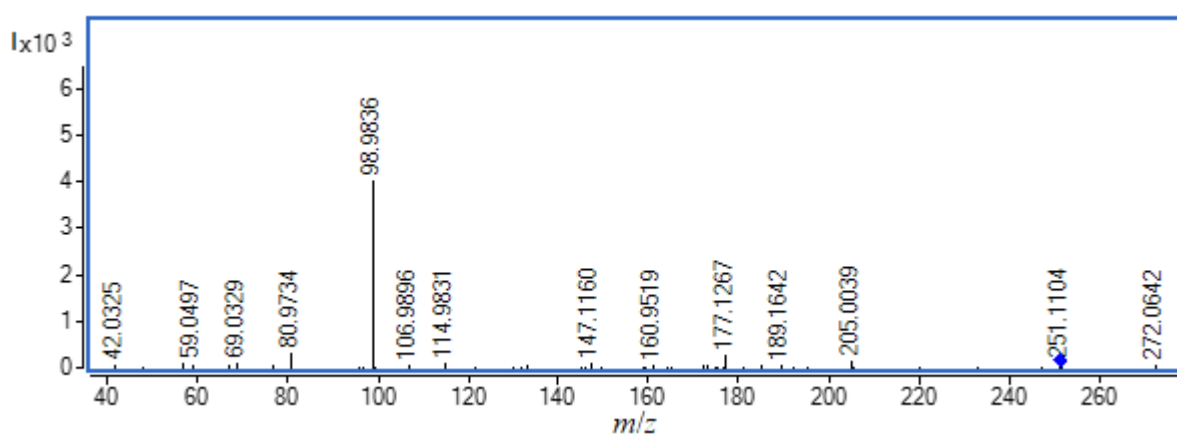
Slika D23. MS spektar kromatografskog pika potencijalnog razgradnog produkta iz uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C ($t_R = 9,59$ min)



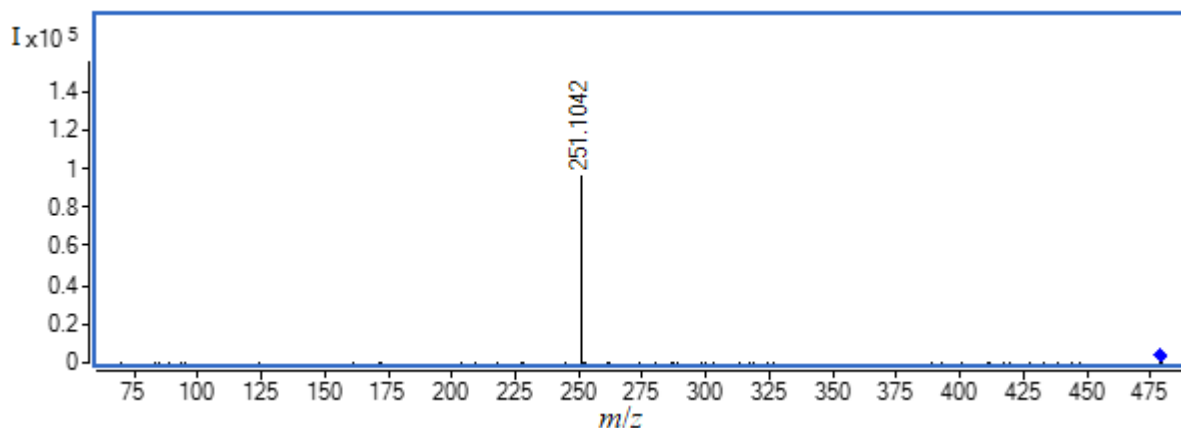
Slika D24. MS spektar kromatografskog pika potencijalnog razgradnog produkta iz uzorka NAB/ β -CD nakon 6 h razgradnje u oksidativnim uvjetima pri 80 °C ($t_R = 10,02$ min)



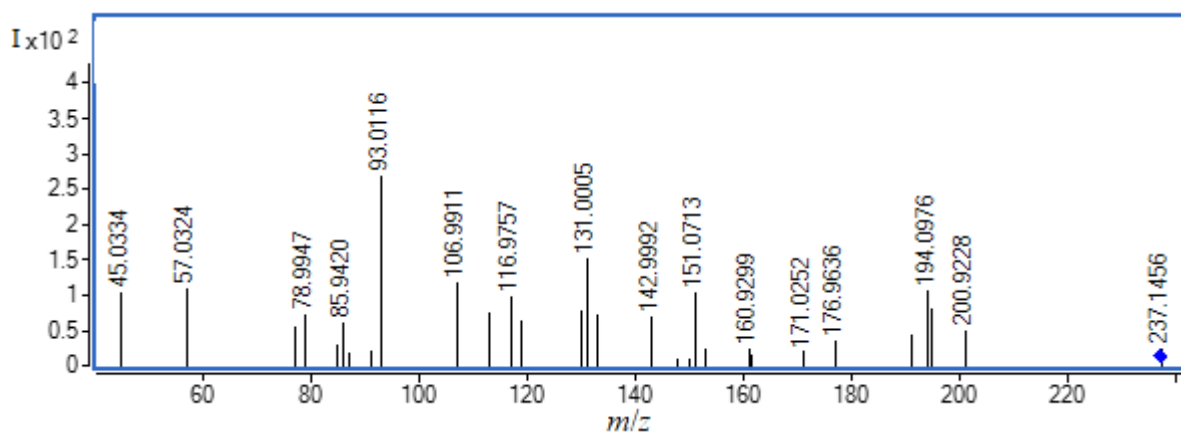
Slika D25. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona nabumetona $[NAB+H]^+$ (m/z 229,1231), pri kolizijskom potencijalu 10 V



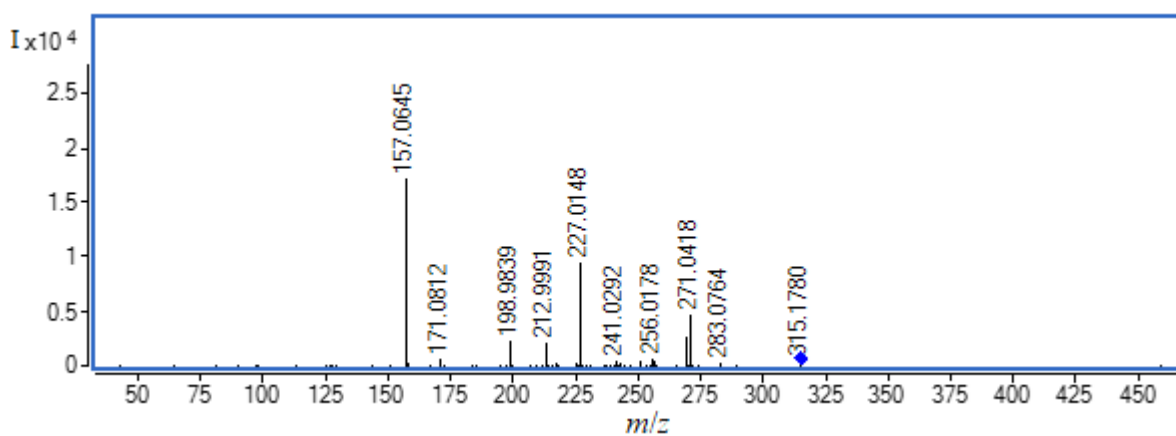
Slika D26. MS/MS spektar iona $[NAB+Na]^+$ (m/z 251,1053), pri kolizijskom potencijalu od 20 V



Slika D27. MS/MS spektar iona $[2M+Na]^+$ (m/z 479,2194), pri kolizijskom potencijalu od 20 V



Slika D28. MS/MS spektar iona $[M+Na]^+$ (m/z 237,0889) razgradnog produkta DP1, pri kolizijskom potencijalu od 20 V



Slika D29. MS/MS spektar iona m/z 315,0312 iz uzorka NAB nakon 6 h razgradnje u kiselim uvjetima pri 80 °C, pri kolizijskom potencijalu od 20 V

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Franjo Sakoman

Datum rođenja: 29. prosinca 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

Obrazovanje

2005–2013 Osnovna škola Augusta Šenoe, Zagreb

2013–2017 Srednja škola XIII. Gimnazija, Zagreb

2017–2020 Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2020–2023 Diplomski sveučilišni studij Kemija, Smjer: Istraživački, Grane: Analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019 Dan i noć na PMF-u, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2021 WorkIn' Science – WiSe – Dan karijera na PMF-u, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2022 EPSA Autumn Assembly 2022 – Omics the future is now – kongres Europske udruge studenata farmacije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Atena, Grčka

Stručna praksa

2022 Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za anorgansku geokemiju okoliša i keminamiku nanočestica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb