



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ivana Prkić

Forsirana razgradnja loratadina i inkluzijskih kompleksa loratadina i ciklodekstrina

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra(e) kemije

Zagreb, 2022.

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 Marijane Pocrnić, mag. chem.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Nives Galić na iskazanom povjerenju, savjetima te pristupačnosti tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se neposrednoj voditeljici Marijani Pocrnić, mag. chem., na strpljivosti te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada, kao i tijekom njegovog pisanja.

Zahvaljujem se svojoj obitelji što su mi omogućili iskustvo studiranja te im hvala za naizmjernu podršku tijekom cijelog školovanja.

Zahvaljujem se kolegama s fakulteta koji su mi olakšali svaki zadatak tijekom ovih pet godina studiranja.

Zahvaljujem se svojim prijateljima koji nikad nisu sumnjali u mene.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Loratadin	2
2.2. Ciklodekstrini	3
2.3. Inkluzijski kompleksi.....	6
2.3.1. Priprava inkluzijskog kompleksa u vodenom sustavu.....	7
2.3.2. Priprava inkluzijskog kompleksa u čvrstom stanju.....	8
2.4. Forsirana razgradnja.....	9
2.5. Tekućinska kromatografija.....	10
2.6. Spektrometrija masa.....	11
2.7. Vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometar masa.....	13
2.8. Forsirana razgradnja loratadina	14
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Kemikalije, reagensi i oprema	18
3.2. Priprema ishodnih otopina.....	18
3.3. Priprema reagensa za forsiranu razgradnju	18
3.4. Priprema uzoraka za forsiranu razgradnju	19
3.5. Uvjeti analize	19
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Analiza uzoraka loratadina nakon forsirane razgradnje tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.....	21
4.1.1. Razgradnja u kiselom mediju.....	21
4.1.2. Razgradnja u lužnatom mediju.....	22
4.1.3. Razgradnja pri oksidativnim uvjetima	24
4.2. Analiza uzoraka loratadina u prisutnosti β-CD nakon forsirane razgradnje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	26
4.2.1. Razgradnja u kiselom mediju.....	26
4.2.2. Razgradnja u lužnatom mediju.....	27
4.2.3. Razgradnja pri oksidativnim uvjetima	28
4.3. MS analiza	30

4.3.1. Razgradnja u lužnatom mediju.....	30
4.3.2. Razgradnja pri oksidativnim uvjetima	35
4.4. MS/MS analiza	37
4.4.1. Identifikacija razgradnih produkata nastalih pri razgradnji u lužnatom mediju	39
4.4.2. Identifikacija razgradnih produkata nastalih pri razgradnji u oksidativnim uvjetima	41
§ 5. ZAKLJUČAK	46
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	47
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	49
§ 8. DODATAK.....	XIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

FORSIRANA RAZGRADNJA LORATADINA I INKLUZIJSKIH KOMPLEKSA LORATADINA I CIKLODEKSTRINA

Ivana Prkić

Loratadin je antihistaminik, koji prema biofarmaceutskom klasifikacijskom sustavu spada u skupinu lijekova slabe topljivosti. Međutim njegova topljivost, ali i stabilnost može se poboljšati stvaranjem inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima. Stabilnost lijekova od velike je važnosti u farmaceutskoj industriji jer utječe na njihovu sigurnost i učinkovitost. Forsiranom razgradnjom dobivaju se informacije o stabilnosti lijeka i razgradnim produktima koji nastaju. U ovom radu istražen je utjecaj β -ciklodekstrina na stabilnost loratadina. Postotak razgradnje loratadina određen je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti. Uzorci s uočenim potencijalnim razgradnim produktima analizirani su vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa visokog razlučivanja. Na temelju MS i MS/MS spektara predložene su strukture razgradnih produkata.

(49 + XXIII stranica, 37 slika, 27 tablica, 21 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

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, forsirana razgradnja, inkluzijski kompleks, loratadin, spektrometrija masa

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić, redoviti profesor
Neposredni voditelj: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić, redoviti profesor
 2. prof. dr. sc. Željka Soldin, redoviti profesor
 3. prof. dr. sc. Davor Kovačević, redoviti profesor u trajnom zvanju
- Zamjena: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, redoviti profesor

Datum diplomskog ispita: 17. studenog 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

FORCED DEGRADATION OF LORATADINE AND LORATADINE/CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES

Ivana Prkić

Loratadine is antihistamine that is categorized in Biopharmaceutics Classification System as a poorly soluble drug. However, its solubility and stability can be improved by formation of inclusion complexes with cyclodextrins. The stability of drugs is of great importance in the pharmaceutical industry because it affects their safety and efficacy. Forced degradation provides information on stability of drugs and resulting degradation products. In this work effect of β -cyclodextrin on stability of loratadine was studied. Ultra-high performance liquid chromatography was used to determine the percentage of degradation in each sample. Liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometer was used on selected samples. Structures of degradants and fragmentation pathways were proposed based on obtained results.

(49 + XXIII pages, 37 figures, 27 tables, 21 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, Loratadine, Mass spectrometry

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor
Assistant mentor: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Davor Kovačević, Professor
- Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Date of exam: November 17, 2022

§ 1. UVOD

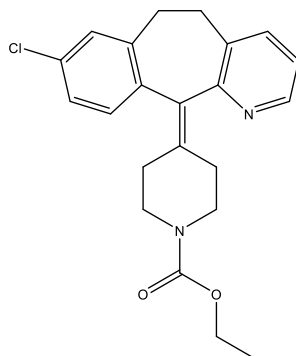
Loratadin je oralni lijek koji prema biofarmaceutskom klasifikacijom sustavu spada u II. skupinu lijekova koju karakterizira niska topljivosti i visoka permeabilnost.^{1,2} Djeluje na način da blokira histaminske H1-receptore.³ U kompleksu s ciklodekstrinom, očekuje se poboljšanje topljivosti i stabilnosti lijeka stvaranjem inkluzijskih kompleksa. Najčešće se u tu svrhu koristi β -ciklodekstrin zbog veličine centralne šupljine, jednostavnog načina dobivanja i ekonomske prihvatljivosti. Kako bi nastao inkluzijski kompleks, potrebno je podudaranje u veličini šupljine domaćina, β -ciklodekstrina, i veličine molekule gosta, loratadina. Stabilnost farmaceutika od velike je važnosti u farmaceutskoj industriji budući da utječe na sigurnost i efikasnost lijekova.^{4,5}

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj β -ciklodekstrina na stabilnost loratadina. Forsirana razgradnja loratadina sa i bez prisutnosti β -ciklodekstrina ispitana je u uvjetima kisele i lužnate hidrolize te pri oksidativnim uvjetima. Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom uz detektor niza dioda kako bi se odredio postotak razgradnje loratadina. Na temelju dobivenih rezultata, na odabranim uzorcima provela se analiza vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa visokog razlučivanja. Strukture dobivenih razgradnih produkata predložili su se na temelju MS i MS/MS analize.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

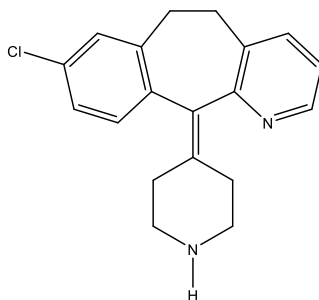
2.1. Loratadin

Loratadin, kemijske formule $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$, je derivat piperidina, koji se najčešće pojavljuje u formi bijelih kristala koji su slabo topljivi u vodi, a dobro topljivi u alkoholu i eteru. Po biofarmaceutskom klasifikacijskom sustavu (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS) svrstan je u II. kategoriju, koju karakterizira visoka permeabilnost i slaba topljivost, a njegova biodostupnost je ograničena brzinom otapanja.^{1,2} Struktura loratadina prikazana je na slici 1.



Slika 1. Kemijska struktura loratadina

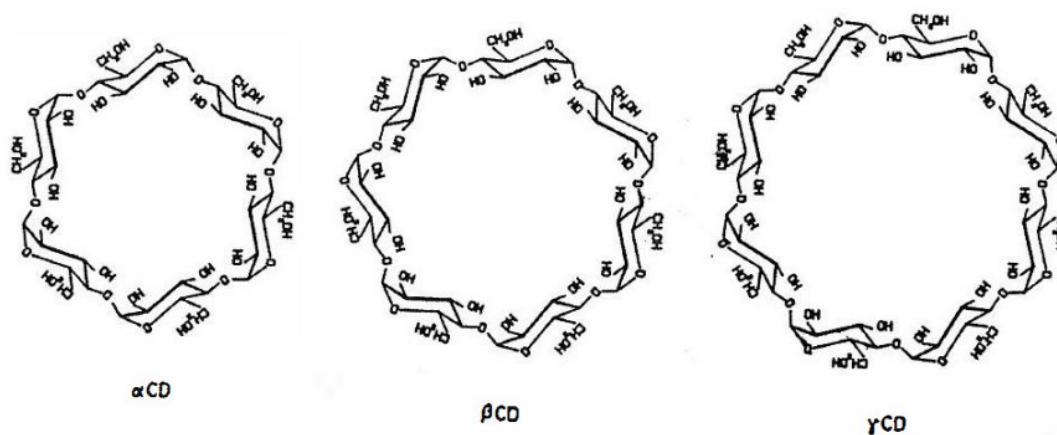
Loratadin je antihistaminik koji blokira H1-receptore histamina te time sprječava simptome alergijskih reakcija. Primjenjuje se prvenstveno za liječenje alergijskog rinitisa, urtikarije te astme. Ne izaziva ovisnost i ne utječe na središnji živčani sustav.³ Može se uzimati u obliku tableta ili sirupa.⁶ Loratadin se u jetri metabolizira u farmakološki aktivan metabolit, desloratadin (slika 2).⁷



Slika 2. Kemijska struktura desloratadina

2.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (engl. *cyclodextrin*, CD) su ciklički oligosaharidi koji sadrže šest (α -CD), sedam (β -CD) ili osam (γ -CD) D-glukopiranoznih jedinica povezanih α -1,4-glikozidnim vezama. Prirodni ciklodekstrini, α -ciklodekstrin (α -CD), β -ciklodekstrin (β -CD) i γ -ciklodekstrin (γ -CD), proizvode se u tri koraka. Prvi korak je bakterijska fermentacija i ekstrakcija ciklodekstrin glukoziltransferaze. Drugi korak je enzimska proizvodnja ciklodekstrina iz škroba i taloženje ciklodekstrina kompleksiranjem. Treći korak je uklanjanje kompleksirajućeg agensa i pročišćavanje produkta.⁸ Njihove strukture prikazane su na slici 3.

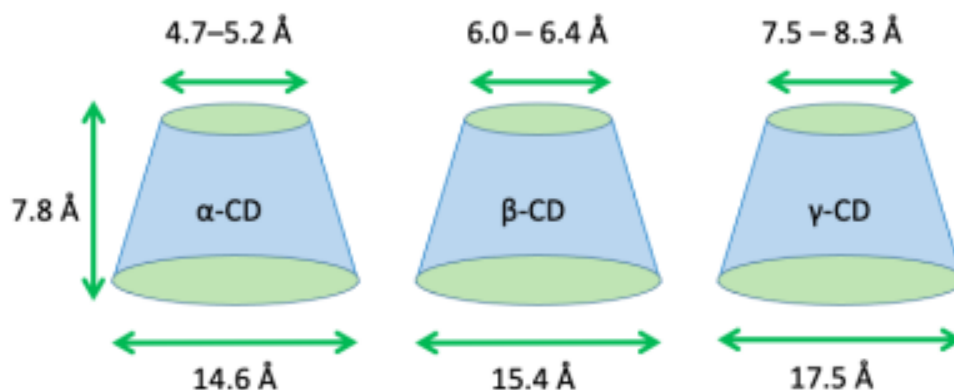


Slika 3. Struktura α -ciklodekstrina, β -ciklodekstrina i γ -ciklodekstrina⁴

Kako bi se sintetizirao željeni ciklodekstrin potrebno je kontrolirati pH i temperaturu reakcijske smjese. Dodatkom toluena u reakcijsku smjesu nastaje α -CD, dodatkom dekana β -CD, a dodatkom α -naftola i etilmetilketona nastaje γ -CD. Ciklodekstrine s manje od šest glukopiranoznih jedinica nije moguće sintetizirati zbog steričkih smetnji, dok je ciklodekstrine s više od osam glukopiranoznih jedinica moguće sintetizirati, ali su skuplji i imaju manji kapacitet prilikom kompleksiranja zbog čega su farmaceutski manje značajni. Osim po broju jedinica glukoze, α -CD, β -CD i γ -CD razlikuju se po molekularnoj masi te promjeru i volumenu šupljine što je prikazano u tablici 1 i na slici 4.^{4,5}

Tablica 1. Svojstva prirodnih ciklodekstrina⁵

CD	Broj jedinica glukoze	M (g mol ⁻¹)	Promjer šupljine (Å)	Vanjski promjer (Å)	Visina (Å)	Volumen šupljine (Å ³)
α -CD	6	972	4,7–5,2	14,6	7,8	174
β -CD	7	1135	6,0–6,4	15,4	7,8	262
γ -CD	8	1297	7,5–8,3	17,5	7,8	427

Slika 4. Dimenzije prirodnih ciklodekstrina, α -CD, β -CD i γ -CD⁵

Hidrofilnost vanjskog dijela molekule ciklodekstrina posljedica je slobodne rotacije hidroksilnih skupina koje zajedno s preostalim C–C, C–H i C–O–C vezama okružuju unutrašnjost šupljine koja je hidrofobna jer uključuje već spomenute atome ugljika i eterske atome kisika. Takva građa je odgovorna i za relativno dobru topljivost ciklodekstrina u vodi te za lipofilni karakter šupljine i sposobnost stvaranja inkluzijskih spojeva s hidrofobnim molekulama poput loratadina.⁴

Kod β -ciklodekstrina prisutno je sedam vodikovih veza koje formiraju prsten na način da u interakciju stupa C₂–OH jedne glukopiranozne jedinice i C₃–OH susjedne glukopiranozne jedinice. Vodikove veze uzrokuju rigidnost molekule i nisku topljivost u odnosu na derivate ciklodekstrina. α -ciklodekstrin zbog steričkih smetnji sadrži 4 od 6 mogućih vodikovih veza što rezultira većom topljivošću od β -ciklodekstrina. Najtopljiviji je γ -ciklodekstrin koji je fleksibilne i neplanarne strukture. U tablici 2 prikazana je topljivost prirodnih ciklodekstrina pri različitim temperaturama u 100 mL vode.^{4,5,8}

Tablica 2. Topljivost α -CD, β -CD i γ -CD pri temperaturama od 25, 45 i 60 °C u 100 mL vode⁵

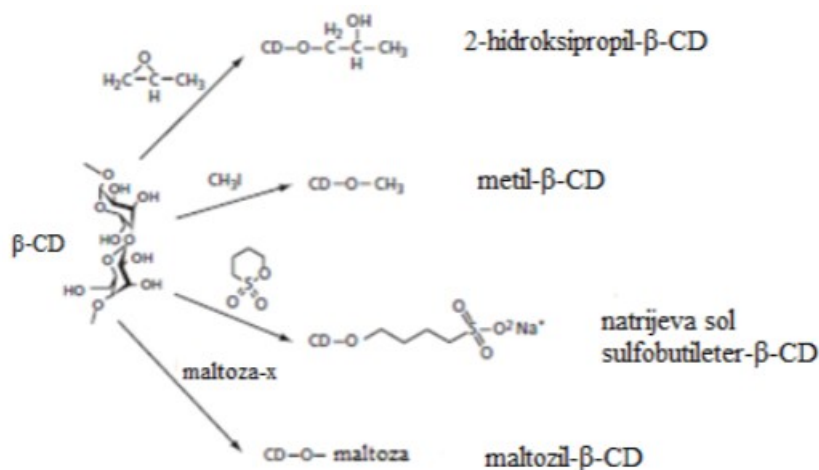
Temperatura (°C)	Topljivost (g / 100 mL)		
	α -CD	β -CD	γ -CD
25	12,8	1,8	25,6
45	29,0	4,5	58,5
60	66,2	9,1	129,2

Prirodni ciklodekstrini, osobito β -CD, ograničene su topljivosti u vodi i s lipofilnim lijekovima često daju teško topljive komplekse. Supstitucija jedne od hidroksilnih skupina koje sudjeluju u nastajanju vodikovih veza, čak i lipofilnim supstituentima kao što je metilna skupina, rezultira povećanjem topljivosti β -CD.^{5,9}

Derivati ciklodekstrina, u procesu sinteze, nastaju supstitucijom hidroksilne skupine kako bi doprinijeli razvoju novih nosača lijekova povećane topljivosti. Prilikom usporedbe prirodnog ciklodekstrina, β -CD i njegovih derivata, uočava se mogućnost povećanja topljivosti za više od 20 puta. Fizikalno-kemijska svojstva, prikazana u tablici 3, ovisna su o strukturi dodanog supstituenta, o lokaciji supstituenta i broju supstituenata po molekuli ciklodekstrina. Kemijska modifikacija hidroksilne skupine ciklodekstrina rezultira nastankom hidrofilnih ili hidrofobnih derivata, te ionskih derivata ili polimera. Hidrofilni derivati su metilirani (npr. metil CD, RM β CD), hidroksialkilirani (npr. hidroksipropil CD, HP β CD) te razgranati (npr. maltozil CD, M β CD) ciklodekstrini. Hidrofobni derivati uključuju alkilirane (npr. dietil CD) i peracilirane (npr. triacetil CD) ciklodekstrine. Ionski derivati su karboksialkil ciklodekstrini, sulfati i alkil sulfonati (npr. natrijeva sol sulfobutileter-CD, SBE β CD).⁸ Strukture nekih od navedenih primjera derivata ciklodekstrina moguće je vidjeti na slici 5.

Tablica 3. Svojstva derivata β -CD⁸

Svojstvo	RM β CD	HP β CD	SBE β CD	M β CD
M (g mol ⁻¹)	1312	1400	2163	1459
Topljivost u vodi pri 25 °C (mg mL ⁻¹)	>600	>600	>500	>500
Molarni stupanj supstitucije	1,8	0,65	0,9	0,14

Slika 5. Derivati β -CD (preuzeto i prilagođeno iz ref. 8)

Postoje i polimeri ciklodekstrina koji sadrže više kovalentno povezanih CD jedinica. Polimeri mogu biti topljivi i netopljivi. Topljivi polimeri sadrže 5–10 CD jedinica što znači da im je molarna masa u rasponu od 3000–6000 Da, a netopljivi polimeri imaju molarnu masu manju od 20 000 Da. Osim kao nosač lijeka, derivati ciklodekstrina mogu poslužiti u kontroli otpuštanja sastojaka hrane na način da uklanjaju komponente gorkog okusa u vodenoj otopini, stabiliziraju tekućinu ili mijenjaju okus, boju i slično.^{4,8}

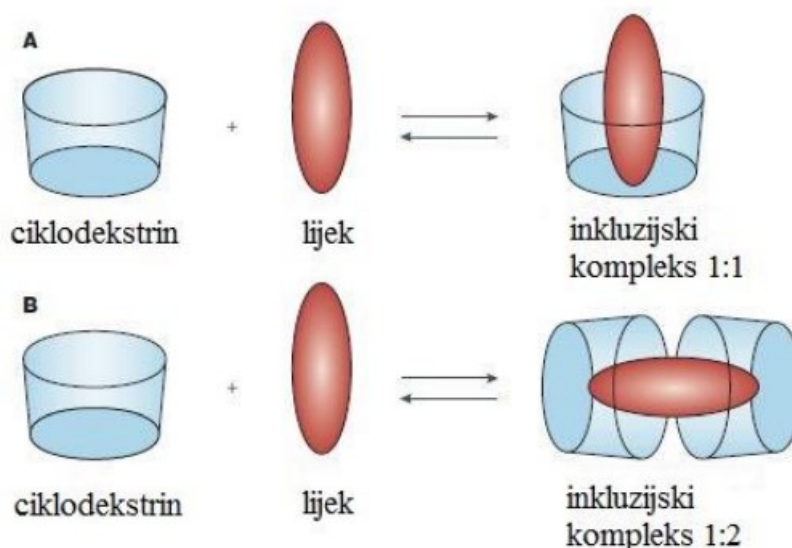
2.3. Inkluzijski kompleksi

Kompleksi su podijeljeni u dvije skupine, metalne komplekse poput diamin srebrovog (I) iona $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, i molekulske komplekse. Molekulski kompleksi obuhvaćaju komplekse između dvije male molekule, komplekse između male molekule i velikog liganda te komplekse između supstrata i enzima.¹⁰

Inkluzijski kompleksi su molekulske kompleksi, ali zbog svoje netipične strukture ne spadaju nužno u navedenu klasifikaciju kompleksa. Ciklodekstrini poboljšavaju kemijsku i fizičku stabilnost lijeka formiranjem inkluzijskih kompleksa, gdje molekula gosta (lijek) ulazi u šupljinu molekule domaćina (CD).¹¹ Kako bi nastao inkluzijski kompleks potrebno je doći do podudaranja u geometriji te formiranja nekovalentnih interakcija između lijeka i ciklodekstrina. Veličina supstrata treba odgovarati veličini hidrofobne šupljine ciklodekstrina.⁴

Većina inkluzijskih kompleksa nastaje uklapanjem jedne molekule, ili njenog dijela, u šupljini ciklodekstrina, prilikom čega nastaju kompleksi stehiometrijskog omjera 1:1. Također

je moguće i nastajanje inkluzijskih kompleksa višeg reda, primjerice uklapanjem molekule u dvije centralne šupljine (slika 6).^{8,11} Polarnost gosta utječe na stvaranje kompleksa na način da samo molekule koje su manje polarne od vode stvaraju komplekse.¹¹



Slika 6. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa u omjeru 1:1 (A) i 1:2 (B)¹¹

2.3.1. Priprava inkluzijskog kompleksa u vodenom sustavu

Kompleksi s ciklodekstrinom mogu nastati u otopini i u čvrstom stanju. Koriste se da bi utjecali na stabilnost, otapanje, permeabilnost, apsorpciju, biološku aktivnost te mnoga druga svojstva lijekova.¹⁰

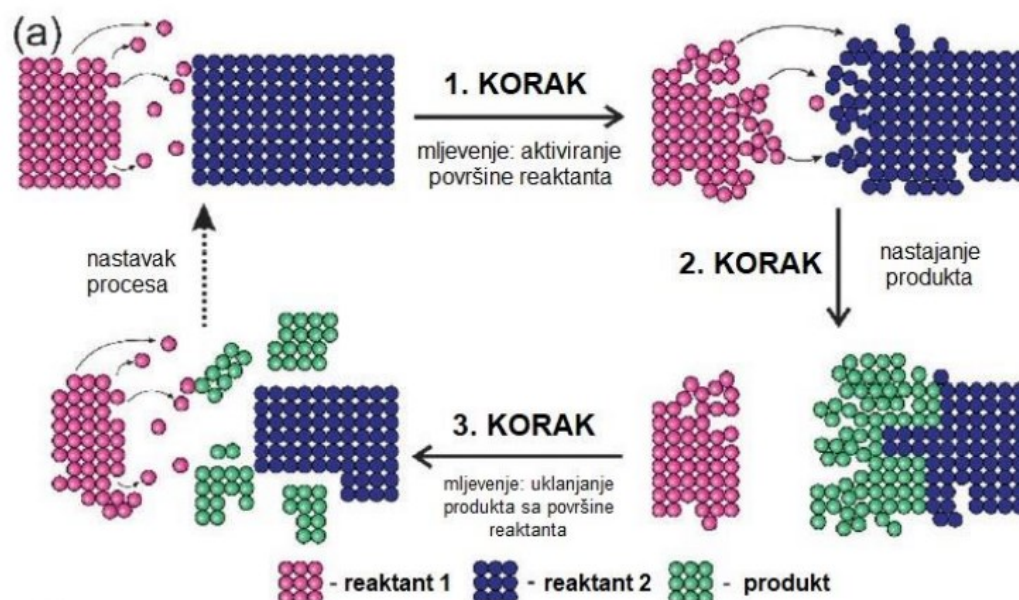
Jedna od metoda priprave u otopini je otapanje lijeka i ciklodekstrina u vodi ili smjesi vode i organskog otapala određenog pH i temperature, kako bi se postigla maksimalna interakcija otopljenih tvari. Nastali produkt može se izolirati kristalizacijom (engl. *crystallization*), adekvatnom tehnikom sušenja (engl. *drying*), evaporacijom pod sniženim tlakom (engl. *vacuum evaporation*), sušenjem raspršivanjem (engl. *spray drying*) ili sušenjem smrzanjem (engl. *freeze-drying*). Negativna strana ove metode je veliki utrošak vremena, energije i organskih otapala poput etanola ili metanola čije potpuno uklanjanje iz konačnog produkta može biti gotovo nemoguće. To može rezultirati toksičnim efektom prilikom primjene. Kao alternativna metoda može poslužiti ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. *supercritical fluid extraction*), ali ona zahtjeva skupu opremu.¹²

Također je moguća i metoda pripreve u polučvrstom stanju, na način da se pripravi homogena pasta od lijeka i ciklodekstrina s malim volumenom vode ili smjese vode i etanola. Kao produkt nastaje prah koji se osuši kako bi se uklonilo otapalo. Nedostatak je što ovom metodom dolazi do djelomičnog kompleksiranja lijeka i ciklodekstrina.¹²

Moguće je i pripreva inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju, pomoću mikrovalnog zračenja ili mehanokemijskom aktivacijom.^{11,12}

2.3.2. Priprava inkluzijskog kompleksa u čvrstom stanju

Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina u čvrstom stanju mogu biti pripremljeni na više načina. Jedna od mogućnosti je priprava mljevenjem, jer je ekonomična, ekološki prihvatljiva, ne zahtjeva korištenje organskih otapala, jednostavna, brza i efikasna. Ova metoda spada u mehanokemiju budući da potiče reakciju u čvrstoj fazi pomoću mehaničke energije. Metoda je uspješna u sintezi supramolekulskih i kovalentnih materijala, uključujući stvaranje interakcija kao što su metal-ligand, vodikove veze, halogenske veze, π - π interakcije, itd. Koristi se i za pripravljanje farmaceutski bitnih polimorfa, kokristala, poroznih metal-organskih mreža te inkluzijskih kompleksa. Točan mehanizam odvijanja reakcije mehanokemijskim pristupom nije potpuno razjašnjen, ali na slici 7 predložen je mogući tijek njezina odvijanja.¹²



Slika 7. Prikaz tijeka odvijanja reakcije mehanokemijskim pristupom¹¹

Mljevenjem se aktivira površina reaktanta tako da se veličina čestica smanjuje i formiraju se defekti u kristalnoj strukturi. Aktivacija površine rezultira nastajanjem produkta, odnosno inkluzijskog kompleksa na površini reaktanta. Formirani produkt se otpusti s površine reaktanta tijekom mljevenja te se mehanizam iznova ponavlja dok reaktant potpuno ne izreagira.¹²

Prilikom sinteze inkluzijskih kompleksa potrebno je analitički okarakterizirati dobiveni produkt za što se najčešće koristi diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) i rendgenska difrakcija na praškastom uzorku (engl. *X-ray powder diffraction*, XRPD). Nastanak inkluzijskog kompleksa dodatno se može potvrditi Fourier transformiranom infracrvenom spektroskopijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) te skenirajućom elektronskom mikroskopijom (engl. *scanning electron microscopy*, SEM). DSC i XRPD detektiraju amorfizaciju uzorka, odnosno prelazak iz kristaliničnog u amorfno stanje. Međutim, amorfizacija ne mora nužno biti posljedica inkluzije, već i nekih drugih procesa koji se mogu odvijati prilikom pripreme uzorka (nastanak čvrstih disperzija, oslobađanje kristalinične vode, itd). Stoga ove metode ne daju pouzdani dokaz da je nastao pravi inkluzijski kompleks, već samo ukazuju na inkluzijski fenomen. Osim toga, XRPD ne može detektirati prisutnost slobodnog amornog lijeka, a DSC može samo djelomično detektirati prisutnost slobodnog amornog lijeka.¹²

Strukturne informacije o nastalim inkluzijskim kompleksima mogu se pouzdano dobiti pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije čvrstog stanja (engl. *solid state nuclear magnetic resonance*, ssNMR). Kako bi se kemijski pomak u spektru mogao detektirati za odgovarajući kompleks potreban je prikladan referentni materijal.¹²

2.4. Forsirana razgradnja

Svrha forsirane razgradnje lijeka je odrediti njegovu stabilnost, nečistoće i/ili produkte degradacije u različitim uvjetima. Nečistoće i produkti degradacije mogu uzrokovati genotoksičnost, karcinogenost i druge toksične efekte. Nečistoće u lijekovima se prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) definiraju kao produkti degradacije lijeka ili produkti reakcije lijeka s drugom tvari. Klasificirane su kao organske ili anorganske

nečistoće te otapala. Organske nečistoće su zaostale tijekom proizvodnog procesa ili skladištenja lijeka. U njih spadaju početni materijal, nusprodukti, međuprodukti, produkti degradacije, reagensi, ligandi te katalizatori. Anorganske nečistoće također su prisutne kao posljedica proizvodnog procesa. U anorganske nečistoće svrstavamo reagense, ligande, katalizatore, teške metale i anorganske soli. Otapala su anorganske i organske tekućine koje zaostaju u aktivnoj farmaceutskoj tvari nakon ili tijekom sinteze.¹³

Identifikacija i strukturna karakterizacija nečistoća važna je jer razumijevanjem njihovog porijekla i prirode moguće je kontrolirati sintezu lijeka. Osim toga, procjenom strukture nečistoća, moguće ih je sintetizirati te upotrijebiti za određivanje granica detekcije i kvantifikacije tijekom kvantitativne analize. Poznavanjem nečistoće moguće je objasniti nuspojave lijeka te potvrditi i odrediti mehanizam te degradacijski put lijeka.¹³

Produkti forsirane razgradnje analiziraju se pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) koju karakterizira osjetljivost i jednostavno korištenje. Moguće je jednoznačno odrediti strukturu komponenata prisutnih u malim koncentracijama. Određivanje strukture degradanata provodi se na temelju MS/MS spektra. Nedostaci karakteristični za analizu tehnikom LC-MS su nemogućnost razlikovanja spojeva istog omjera m/z , loša ionizacija analita te postizanje optimalne osjetljivosti. Može doći do odsutnosti karakterističnih fragmentnih iona za određeni lijek, kao i pojava neuobičajenih fragmenata te poteškoće prilikom njihovog određivanja.^{14,15}

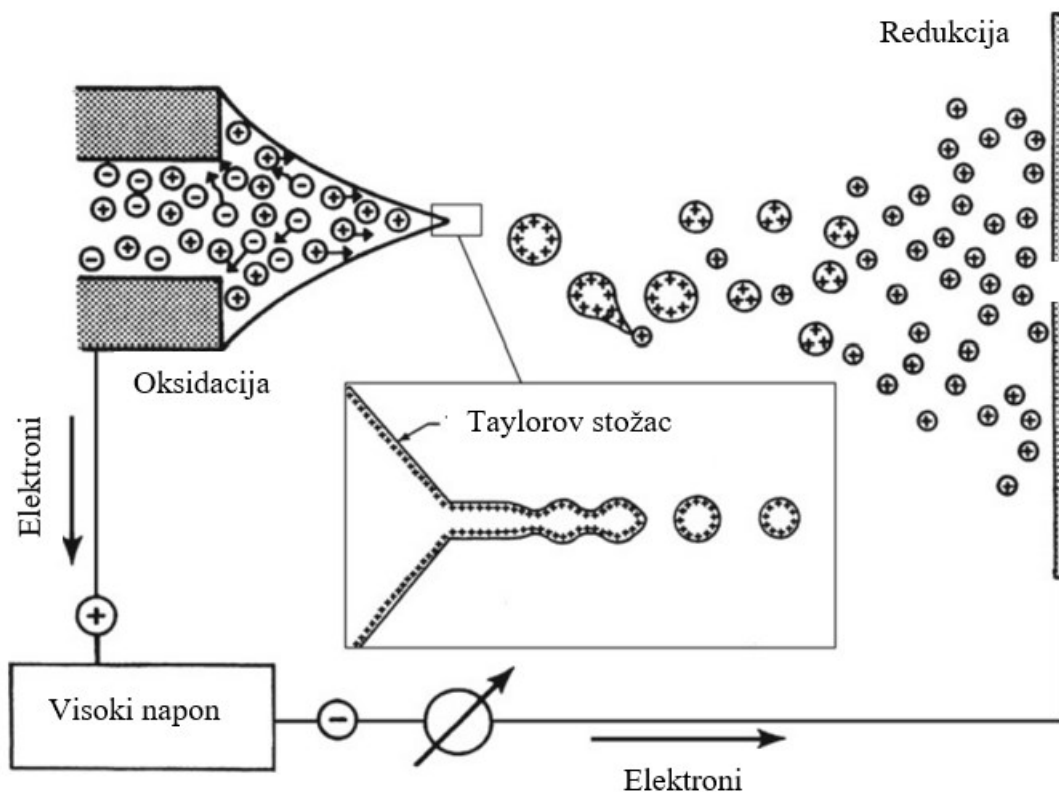
2.5. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna (kolona), a druga se kreće u određenom smjeru (otapalo). Služi za odjeljivanje spojeva male i velike molekulske mase, termički nestabilnih spojeva, spojeva koji se ne mogu prevesti u plinovito stanje, a da se ne raspadnu, i biološki aktivnih spojeva. Pokretna faza, tekućina, mora dobro otapati analizirani sastojak. Osim toga, trebala bi biti visoke čistoće i ne smije sadržavati otopljene plinove i čvrste čestice. Plinovi otopljeni u otapalu i suspendirane čestice uklanjaju se filtriranjem kroz filtere malih pora uz pomoć vakuuma te propuhivanjem plemenitim plinovima ili potresanjem otapala u ultrazvučnoj kupelji.^{14,15}

Načini odjeljivanja sastava pokretne faze mogu biti izokratno i gradijentno eluiranje. Izokratno eluiranje je ispiranje stalnim sastavom pokretne faze, dok se kod gradijentnog eluiranja sastav pokretne faze mijenja što rezultira boljim kromatogramom. Uzorak se unosi pomoću injekcijske šprice preko septuma u petlju. Protok eluensa kroz petlju injektira uzorak u kolonu pri visokom tlaku bez prekidanja protoka pokretne faze nakon čega dolazi do razdvajanja sastojaka. Kao detektor tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti, može se koristiti detektor diodnog niza (engl. *diode array detector*, DAD). Princip rada DAD detektora temelji se na mjerenju apsorpcije UV i vidljivog svjetla u pokretnoj fazi nakon prolaska kroz kolonu. Osim apsorpcijskog detektora, moguće je koristiti i fluorimetrijske detektore. Oni su prikladni za detekciju sastojaka koji fluoresciraju ili sastojaka koji ne fluoresciraju, ali se mogu prevesti u fluorescirajuće derivate. Kao izvor zračenja koristi se živina lampa ili ksenonov luk. Valne duljine pobude i emisije biraju se pomoću monokromatora ili se kao detektor koristi spektrofluorimetar.¹⁵

2.6. Spektrometrija masa

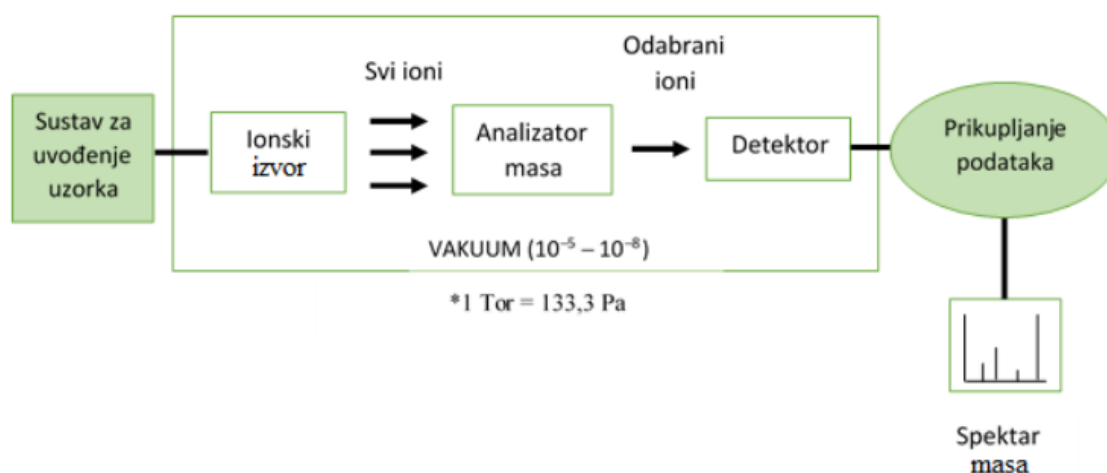
Spektrometrija masa je analitička tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a nastali ioni u plinskoj fazi se razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja, m/z . Spektrometar masa ima ulogu detektora. Uzorci se u spektrometar masa mogu uvesti na više načina. Svaka metoda uvođenja tekućeg uzorka u sustav treba osigurati djelomično uvođenje tekuće faze u spektrometar masa, djelotvorno uklanjanje viška otapala prije uvođenja analita u vakuumirani prostor masenog spektrometra te očuvanje vakuuma. Uvođenjem uzorka tekućinskom kromatografijom u spektrometar masa, prethodno navedeni uvjeti postižu se međuspojem. U tom slučaju radi se o vezanom sustavu tekućinske kromatografije-spektrometrije masa, LC-MS. Jedan od najčešće korištenih međuspojeva je elektroraspršenje.¹⁵



Slika 8. Ionizacija elektroraspršenjem (preuzeto i prilagođeno iz ref. 15)

Ionizacija elektroraspršenjem provodi se tako da se uzorak direktno iz otopine uvodi u metalnu kapilaru. Na metalnoj kapilari primjenjeno je električno polje koje odvlači pozitivni i negativni naboj. Ukoliko je kapilara priključena na pozitivan kraj izvora napona, pozitivni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine. Ukoliko je kapilara priključena na negativan kraj izvora napona, negativno nabijeni ioni se akumuliraju na površinu tekućine. Kritična jakost polja uzrokuje nastanak Taylorovog stošca, kao što je vidljivo na slici 8, što znači da se kontinuirano proizvode kapljice obogaćene pozitivno i negativno nabijenim ionima koje pod utjecajem gradijenta potencijala i tlaka putuju prema analizatoru masa (slika 9) gdje se odjeljuju na temelju omjera mase i naboja, m/z .¹⁵

Ioni razdvojeni na temelju omjera mase i naboja usmjeravaju se na detektor. Dolaskom na detektor, fotomultiplikator ili elektronski multiplikator, prikupljaju se podaci na temelju kojih se dobiva spektar masa. Spektar masa prikazuje ovisnost intenziteta određenog iona o m/z .¹⁵



Slika 9. Shema spektrometra masa (preuzeto i prilagođeno iz ref. 15)

Osim elektroraspršenjem, tekući uzorak se u spektrometar masa može uvesti i drugim metodama. To su direktno uvođenje tekuće faze u spektrometar masa (engl. *direct insertion probe*, DIP), termoraspršenje (engl. *thermospray*, TSP), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) te međuspoj *Particle beam* ili MAGIC (engl. *monodisperse aerosol generator interface for chromatography*).¹⁵

2.7. Vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometar masa

Vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, LC-MS, koristi se za analizu različitih uzoraka pripremljenih u različitim uvjetima, uvođenim pomoću injekcijske pumpe, prije čega su odabrana vrsta i količina otapala ovisno o topljivosti te koncentraciji uzorka. Protok je uobičajeno između 2 i 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Koncentracija lijeka prilikom određivanja trebala bi biti 5–50 ppm. Previsoka koncentracija može uzrokovati kontaminaciju ionizacijskog izvora. Uzorak se priprema otapanjem, filtracijom i neutralizacijom po potrebi. Lijekovi koji sadrže bazične funkcijske skupine ioniziraju se u spektrometru masa u pozitivnom načinu snimanja, a oni koji sadrže kisele funkcijske skupine ioniziraju se u negativnom načinu snimanja. Prije eksperimenta potrebno je kalibrirati i isprati spektrometar masa kako bi uklonili svaku sumnju na potencijalnu kontaminaciju te dobili što točniji spektar.^{15,16}

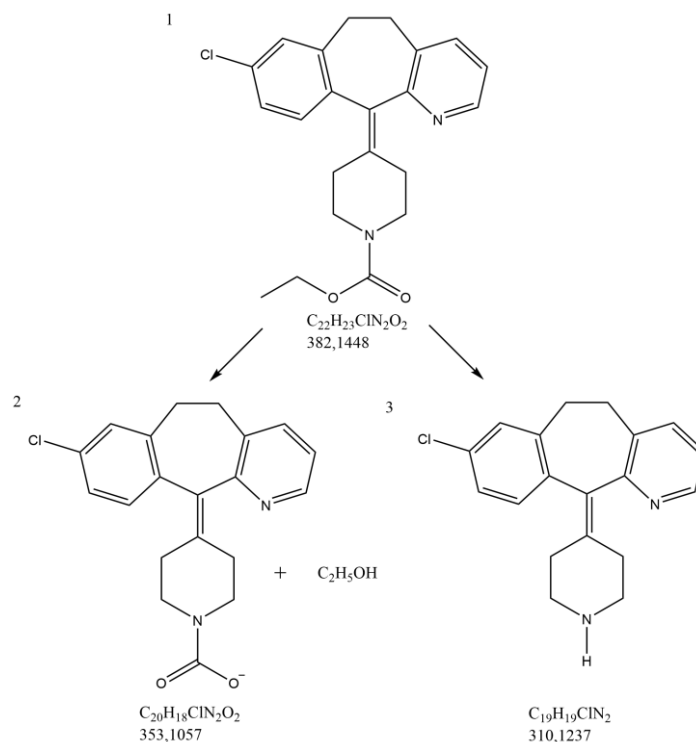
Važan dio ovakvog sustava je međuspoj koji omogućava održavanje potrebnog vakuuma u spektrometru masa, djelomično uvođenje tekuće faze u spektrometar masa te

djelotvorno uklanjanje viška otapala prije uvođenja analita u vakuumirani sustav. LC-MS ima veliki značaj pri određivanju onečišćenja u farmaceutskim pripravcima. Osjetljivost sustava osigurava pouzdane podatke. Razlikuje nepoznate nečistoće koje se nalaze u uzorku lijeka i identificira ih na temelju omjera m/z . Važnost metode je i pri određivanju koncentracije lijekova u otpadnim vodama, a njegovu količinu moguće je odrediti primjenom unutarnjeg standarda. LC-MS primjenjuje se i za identifikaciju peptida u biološkim uzorcima.¹⁵

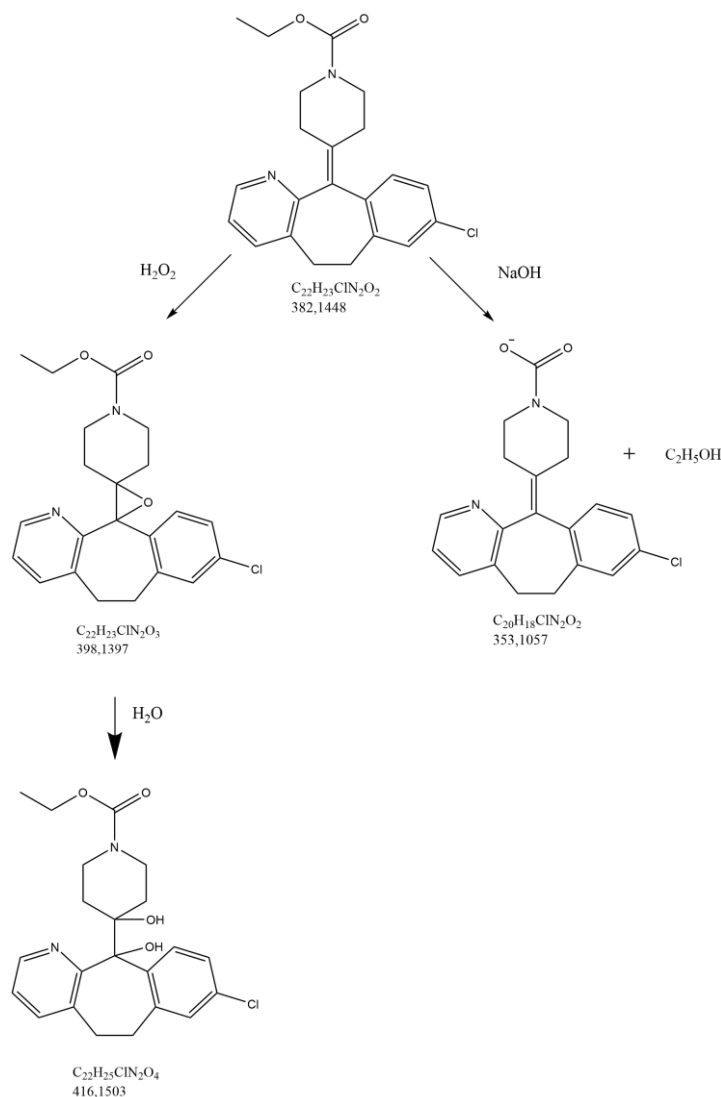
2.8. Forsirana razgradnja loratadina

Iako je forsirana razgradnja veoma važna u farmaceutskoj industriji, ne postoji mnogo radova u kojima su detektirani i identificirani razgradni produkti loratadina.

U svom radu, El. Ragehy i sur.² proveli su alkalnu hidrolizu loratadina te su razvili četiri stabilitetno indikativne metode analize loratadina u prisutnosti njegovog degradanta. Nakon neutralizacije, degradant je ekstrahiran eterom, uparen u vakuumu i osušen u eksikatoru. Izolirani degradant je potom analiziran spektrometrijom masa i IR spektroskopijom, te je predložena njegova struktura (2) na slici 10.² Gibbons i sur.¹⁷ su ponovili navedeni eksperiment, te su u komentaru objavljenom u istom časopisu kao i rad naveli neke probleme originalnog rada. Kao glavni problem su naveli nedostatak NMR analize kojom bi se potvrdila predložena struktura degradanta. Također su uočili i da MS spektar u radu ne odgovara predloženoj strukturi. Eksperiment razgradnje ponovili su u duljem vremenskom periodu te su nakon MS/MS te ¹H i ¹³C NMR analize predložili strukturu degradanta, koja odgovara desloratadinu (struktura 3 na slici 10).¹⁷

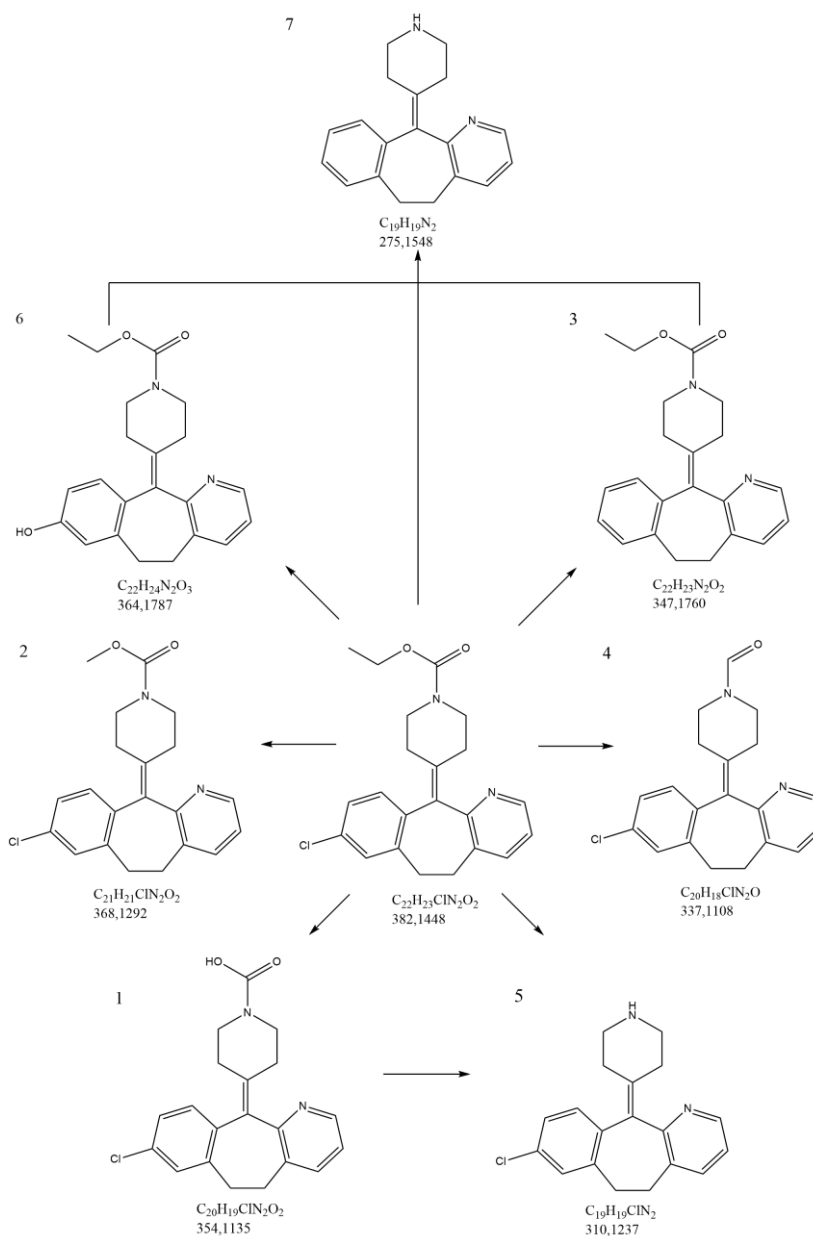
Slika 10. Degradacijski produkt loratadina nakon alkalne hidrolize^{2,17}

Walash i suradnici¹⁸ proveli su analizu stabilnosti loratadina i desloratadina u kiselom i lužnatom mediju te u oksidativnim uvjetima pomoću fluorescencijske spektroskopije. Lužnati ili kiseli medij postigao se dodatkom NaOH ili HCl koncentracije 2 mol L⁻¹. Uzorci su zagrijavani u vodenoj kupelji tijekom različitih vremenskim intervala (5–60 min) te potom ohlađeni i neutralizirani. Oksidativni uvjeti postignuti su dodatkom različitih volumena 6%-tnog H₂O₂, a eksperimenti su rađeni pri sobnoj temperaturi. Rezultati su pokazali da je loratadin podložan alkalnoj razgradnji (75% razgradnje), a da je stabilan u kiselim uvjetima (14% razgradnje). U prisutnosti H₂O₂ došlo je do trenutne razgradnje, a stupanj razgradnje ovisio je o dodanom volumenu H₂O₂ (87% razgradnje postignuto dodatkom 6,5 mL 6% H₂O₂). Predložene su strukture degradanata (slika 11), međutim nisu eksperimentalno potvrđene.¹⁸



Slika 11. Predloženi degradanti loratadina u lužnatom mediju i pri oksidativnim uvjetima¹⁸

Armaković i suradnici¹⁹ su teorijskim pristupom istražili degradaciju loratadina. Istražena je reaktivnost loratadina molekulskim modeliranjem i DFT izračunima. Pokazano je da N atom piridinskog prstena i O atom karboksilne skupine pokazuju nukleofilnu prirodu. Predloženi su degradacijski produkti na temelju računanja energije disocijacije veza (engl. *bond dissociation energies*, BDE) i molekulskog modeliranja. Dobiveni rezultati struktura 1 i 5, prikazani na slici 12, su u skladu s eksperimentalno dobivenim strukturama predloženim u radovima El Ragehy i sur.² i Gibbons i sur.¹⁷ Također su izračunate teoretske vrijednosti kemijskih pomaka u ¹³C i ¹H NMR spektrima predloženih degradacijskih produkata, koji bi mogli pružiti vrijedne informacije u budućim eksperimentalnim istraživanjima.¹⁹



Slika 12. Predložena degradacija loratadina u prisustvu molekula vode¹⁹

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije, reagensi i oprema

Za eksperimente korišteni su loratadin (LOR) proizvođača Carbosynth Ltd (Ujedinjeno Kraljevstvo) i β -ciklodekstrin (β -CD) proizvođača Cyclolab (Mađarska). Uzorak LOR/ β -CD pripremljen je mljevenjem LOR i β -CD u ekvimolarnom omjeru na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Klorovodična kiselina, HCl, natrijev hidroksid, NaOH, i vodikov peroksid, H₂O₂, proizvođača Gram mol (Hrvatska) su reagensi za forsiranu razgradnju koji su se koristili kako bi se postigli uvjeti kisele hidrolize, lužnate hidrolize te oksidativni uvjeti za istraživanje stabilnosti LOR te uzorka LOR/ β -CD.

Za pripremu mobilnih faza korišteni su metanol i mravlja kiselina visoke čistoće, proizvođača Carlo Erba (Francuska) te ultračista voda dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sustava za pročišćavanje (proizvođač Merck, Njemačka).

3.2. Priprema ishodnih otopina

Ishodne otopine LOR i LOR/ β -CD ($\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) pripremljene su vaganjem 25 mg uzorka u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopunjavanjem do oznake metanolom.

Ishodna otopina HCl, koncentracije 5 mol L^{-1} pripremljena je pipetiranjem 41,4 mL koncentrirane HCl u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je potom nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Ishodna otopina NaOH koncentracije $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ pripremljena je vaganjem 10 g NaOH u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je potom nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

3.3. Priprema reagensa za forsiranu razgradnju

Za forsiranu razgradnju pripremile su se otopine HCl i NaOH ($\gamma = 1 \text{ mol L}^{-1}$) te H₂O₂ (3%) pipetiranjem određenog volumena ishodnih otopina u odmjerne tikvice i nadopunjavanjem vodom do oznake.

3.4. Priprema uzoraka za forsiranu razgradnju

Forsirana razgradnja provodila se pri sobnoj temperaturi i pri povišenoj temperaturi (80 °C). Uzorci su analizirani u različitim vremenskim intervalima (1, 2 i 5 sati) kako bi se utvrdio stupanj razgradnje.

Uzorci su pripremljeni pipetiranjem 1 mL ishodne otopine LOR ili LOR/ β -CD i 1 mL reagensa za forsiranu razgradnju. Nakon određenog vremena dodan je 1 mL reagensa za neutralizaciju, te je tikvica nadopunjena do oznake metanolom. Također je pripremljen i kontrolni uzorak pipetiranjem 1 mL ishodne otopine LOR ili LOR/ β -CD u tikvicu od 5 mL koja je potom nadopunjena do oznake metanolom.

Prije snimanja, uzorci su profiltrirani pomoću PTFE filtera (promjer pora 0,45 μ m) proizvođača Fisher Scientific (SAD) i razrijeđeni otapalom sastava metanol-voda u omjeru 50:50.

Priredeni su i uzorci slijepih proba koji su sadržavali samo otapalo i reagense za forsiranu razgradnju.

3.5. Uvjeti analize

Analiza je provedena spektrometrom masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) uz direktno uvođenje uzoraka pomoću Agilent 1290 Infinity II HPLC sustava uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor. Korištena je kolona Agilent Zorbax Eclipse C18 (2,1 \times 50 mm, 1,8 μ m). Otopine uzoraka uvođene su u instrument injektiranjem 1 μ L uzorka uz protok mobilne faze 0,2 mL min⁻¹. Temperatura kolone odgovarala je sobnoj temperaturi. Kao mobilne faze korištene su otopine 0,1% mravlje kiseline u vodi (A) i u metanolu (B). Analiza je provedena gradijentnim eluiranjem (tablica 4).

Tablica 4. Sastav mobilne faze A prilikom gradijentnog eluiranja tijekom UHPLC analize

<i>t</i> / min	Sastav / %
0	95
15	5

Pomoću DAD detektora analizirani su uzorci kako bi se odredio postotak razgradnje loratadina. Korištene su valne duljine 250 i 275 nm, koje odgovaraju maksimumima apsorpcije loratadina, kako bi se postigao najveći odziv detektora. Valne duljine su odabrane na temelju UV-Vis spektra otopine loratadina snimljenog u okviru doktorske disertacije Marijane Pocrnić.

Na temelju dobivenih rezultata, na odabranim uzorcima provedena je analiza vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. MS i MS/MS analiza provedena je uz pozitivnu ionizaciju u području vrijednosti m/z 100–1000 za MS analizu, odnosno m/z 50–450 za MS/MS analizu. Fragmentacija analita provedena je pri kolizijskim energijama 10 V, 20 V i 30 V.

Parametri snimanja:

Temperatura protočnog plina (engl. *sheath gas*): 200 °C

Protok protočnog plina: 14 L min⁻¹

Tlak raspršivača (engl. *nebulizer*): 35 psi

Potencijal kapilare (engl. *V_{Cap}*): 3500 V

Potencijal mlaznice (engl. *nozzle voltage*): 300 V

Temperatura plina za desolvaciju (engl. *drying gas*): 350 °C

Protok plina za desolvaciju: 11 L min⁻¹

Kao protočni plin i plin za desolvaciju korišten je dušik.

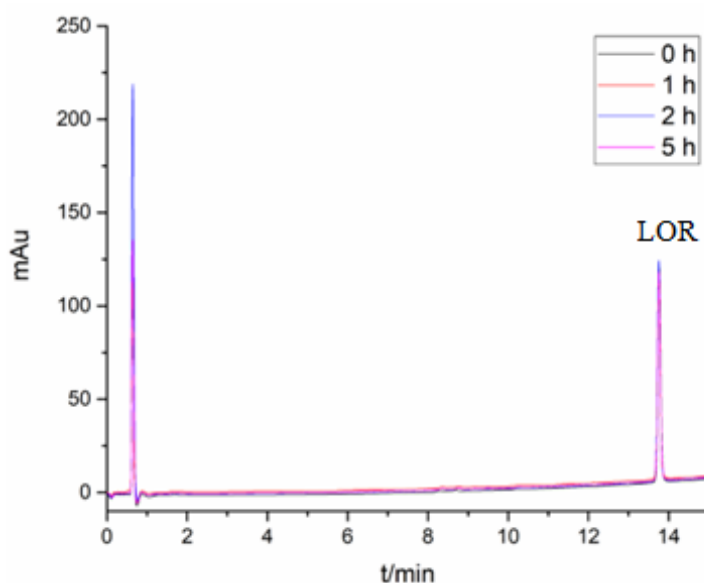
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza uzoraka loratadina nakon forsirane razgradnje tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti

Tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultrahigh performance liquid chromatography*, UHPLC), uz DAD detektor (pri valnim duljinama od 250 i 275 nm) određivalo se u kojim uzorcima nastaju degradanti. Navedene valne duljine su odabrane jer je za njih karakterističan maksimum apsorpcije loratadina, odnosno najveći odziv detektora.

4.1.1. Razgradnja u kiselom mediju

Uzorcima loratadina koncentracije 1 mg mL^{-1} dodana je HCl koncentracije 1 mol L^{-1} te su uzorci analizirani u različitim vremenskim periodima. Osam uzoraka različitih vremenskih intervala (0 h, 1 h, 2 h i 5 h) bez zagrijavanja ili uz zagrijavanje pri 80 °C dali su karakteristične kromatograme pri valnoj duljini od 275 nm na temelju kojih se zaključilo da je loratadin stabilan tijekom kisele hidrolize i na sobnoj temperaturi i uz zagrijavanje (slika 13 i slika D1). Vidljiv je isključivo pik loratadina pri vremenu zadržavanja oko 13,77 minuta (tablica D1) što je potvrda da ne dolazi do degradacije i nastanka razgradnih produkata.



Slika 13. Kromatogram LOR nakon razgradnje u kiselim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h uz zagrijavanje na 80 °C , pri valnoj duljini od 275 nm

Očitane su površine pikova loratadina te je izračunat postotak razgradnje (tablica 5). Iako se površina pika loratadina razlikuje u uzorcima, što bi moglo ukazivati na degradaciju loratadina, novi pikovi nisu uočeni. Stoga se razlike u površinama mogu pripisati pogrešci prilikom pipetiranja kod pripreve uzoraka za razgradnju ili pri razrijeđivanju uzoraka prije analize tekućinskom kromatografijom. Stabilnost loratadina pri kiselim uvjetima u skladu je s rezultatima prethodnih istraživanja.¹⁸

Tablica 5. Postotak razgradnje LOR u kiselom mediju u odnosu na kontrolni uzorak pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije loratadina, 275 nm

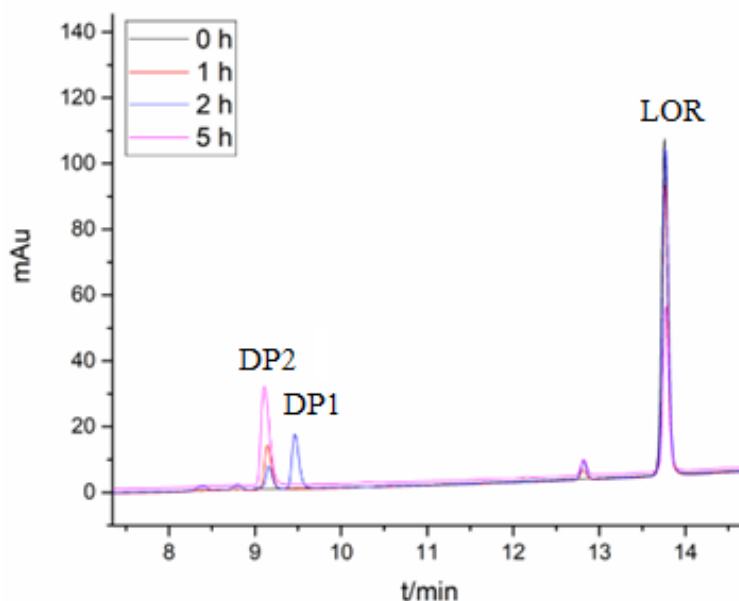
1 mol L ⁻¹ HCl		
Uzorak	Površina ($\lambda=275$ nm)	Postotak razgradnje / %
kontrola	472,8	-
0h	482,1	-2,0
1h (s.t.)	511,6	-8,2
1h (80 °C)	459,6	2,8
2h (s.t.)	492,9	-4,3
2h (80 °C)	489,8	-3,6
5h (s.t.)	451,6	4,5
5h (80 °C)	461,2	2,5

s.t. = sobna temperatura

4.1.2. Razgradnja u lužnatom mediju

Loratadin je stabilan pri lužnatoj hidrolizi pri sobnoj temperaturi čak i nakon 5 sati odvijanja reakcije, što je prikazano na slici D2. Površine pika loratadina relativno su jednake pri svim analiziranim vremenima razgradnje (tablica D2).

Nestabilnost loratadina zapaža se prilikom zagrijavanja na 80 °C u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h kao što je prikazano na slici 14. Iz kromatograma je vidljivo da se površina pika loratadina smanjuje povećanjem vremena zagrijavanja, što znači da je degradacija proporcionalna vremenu zagrijavanja. Novi pikovi od interesa pojavljuju se na vremenima zadržavanja od 9,46 min (DP1) i 9,14 min (DP2) (tablica D2).



Slika 14. Kromatogram LOR nakon razgradnje u lužnatim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h uz zagrijavanje na 80 °C, pri valnoj duljini od 275 nm

Na temelju površine kromatografskog pika loratadina, izračunat je postotak razgradnje u svakom uzorku (tablica 6). Može se uočiti da je uz zagrijavanje nakon jednog sata degradirano 23%, a nakon pet sati je degradirano 56% loratadina. Iako je za očekivati da povećanjem vremena zagrijavanja dolazi do povećanja postotka razgradnje LOR, u dobivenim rezultatima postoje neke nepravilnosti koje se mogu objasniti nepravilnim pipetiranjem. Iako je razgradnja loratadina najveća u uzorku nakon 5 sati zagrijavanja, za daljnju MS analizu odabran je uzorak nakon 2 sata zagrijavanja budući da je kod njega uočen i dodatan pik na 9,46 min.

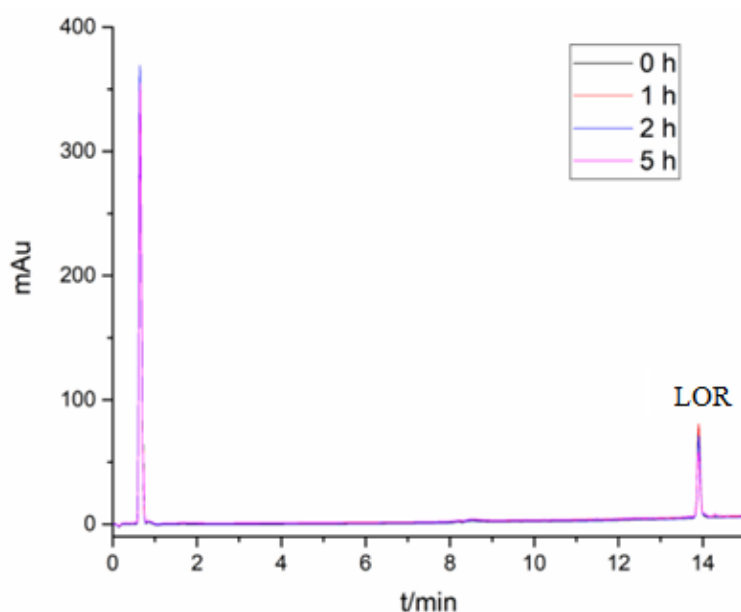
Tablica 6. Postotak razgradnje loratadina u lužnatom mediju u odnosu na kontrolni uzorak loratadina pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije loratadina, 275 nm

1 mol L ⁻¹ NaOH		
Uzorak	Površina (λ=275 nm)	Postotak razgradnje / %
kontrola	472,8	—
0h	420,6	11,0
1h (s.t.)	461,5	2,4
1h (80 °C)	364,1	23,0
2h (s.t.)	427,2	9,6
2h (80 °C)	408,8	13,5
5h (s.t.)	451,7	4,5
5h (80 °C)	206,1	56,4

s.t. = sobna temperatura

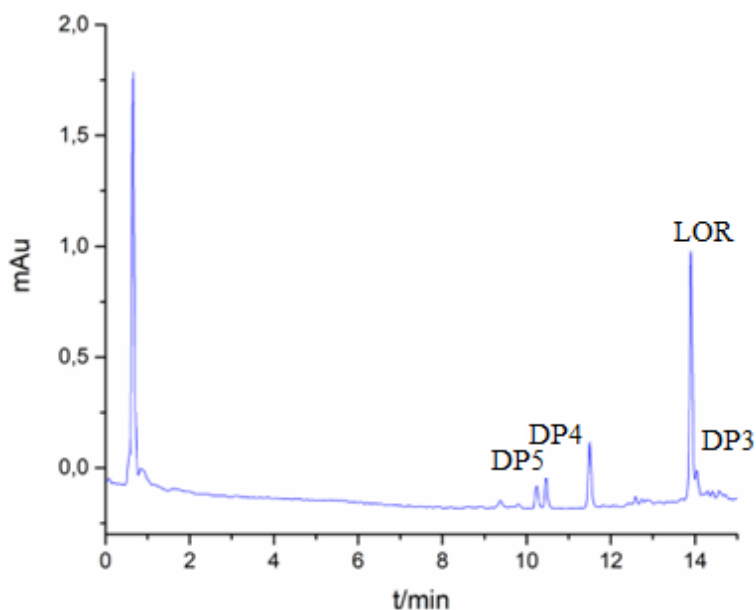
4.1.3. Razgradnja pri oksidativnim uvjetima

Osim toga, analiziran je uzorak loratadina (1 mg mL^{-1}) u oksidativnim uvjetima koji su postignuti dodatkom H_2O_2 (3%) tijekom 0 h, 1 h, 2 h i 5 h na sobnoj temperaturi te prilikom zagrijavanja u istim vremenskim intervalima. Uočeno je da dolazi do postepenog smanjenja kromatografskog pika u svim uzorcima, no pojava novih pikova nije uočena u kromatogramima pri valnoj duljini od 275 nm (tablica D3, slike 15 i D3).



Slika 15. Kromatogram LOR nakon razgradnje pri oksidativnim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 275 nm

Međutim u kromatogramu uzoraka pri valnoj duljini od 333 nm uočeni su novi kromatografski pikovi koji bi mogli odgovarati razgradnim produktima (slika 16). Novi pikovi od interesa nalaze se pri vremenima zadržavanja od 10,47 min (DP4); 10,24 min (DP5) i 14,04 min (DP3). Pik pri 10,24 min javlja se samo kod uzoraka koji su se zagrijavali pri 80 °C (tablica D4). Zbog prisutnosti svih navedenih pikova u uzorku loratadina s H_2O_2 uz 5 sati zagrijavanja provela se daljnja MS analiza.



Slika 16. Kromatogram LOR nakon razgradnje pri oksidativnim uvjetima u vremenskom intervalu od 5 h uz zagrijavanje pri 80 °C, pri valnoj duljini od 333 nm

Budući da su uočeni novi kromatografski pikovi u kromatogramu pri valnoj duljini od 333 nm, može se zaključiti da dolazi do razgradnje loratadina te su površine pikova pri valnoj duljini od 275 nm korištene kako bi se izračunao postotak razgradnje (tablica 7). Korištena je ova valna duljina zbog većeg odziva detektora te time i veće površine kromatografskog pika loratadina.

Tablica 7. Postotak razgradnje LOR pri oksidativnim uvjetima u odnosu na kontrolni uzorak loratadina pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije loratadina, 275 nm

3% H ₂ O ₂		
Uzorak	Površina ($\lambda=275$ nm)	Postotak razgradnje / %
kontrola	472,8	–
0h	285	39,7
1h (s.t.)	299,5	36,7
1h (80 °C)	291,8	38,3
2h (s.t.)	296,1	37,4
2h (80 °C)	257,4	45,6
5h (s.t.)	319,1	32,5
5h (80 °C)	201,4	57,4

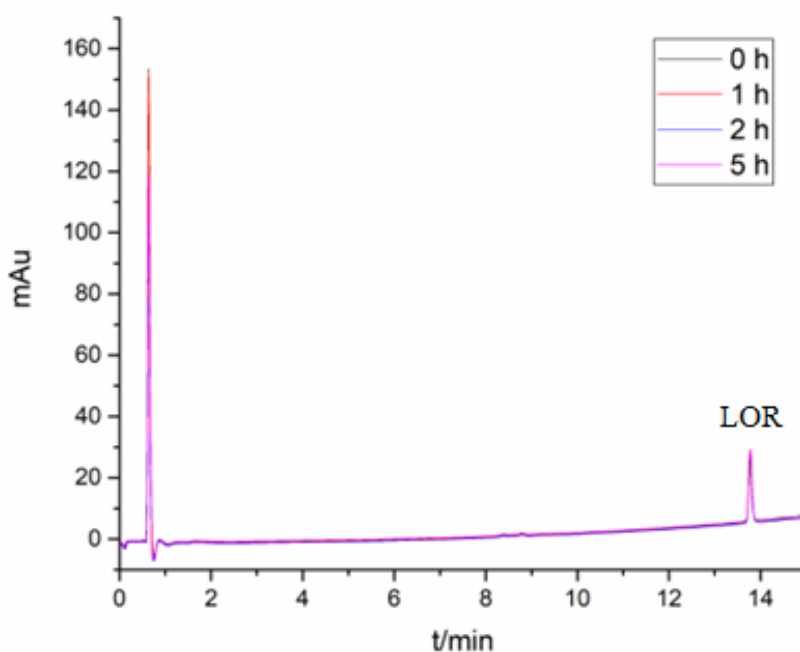
s.t. = sobna temperatura

4.2. Analiza uzoraka loratadina u prisutnosti β -CD nakon forsirane razgradnje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Analizirana je degradacija loratadina u prisutnosti β -CD u kiselom i lužnatom mediju te pri oksidativnim uvjetima.

4.2.1. Razgradnja u kiselom mediju

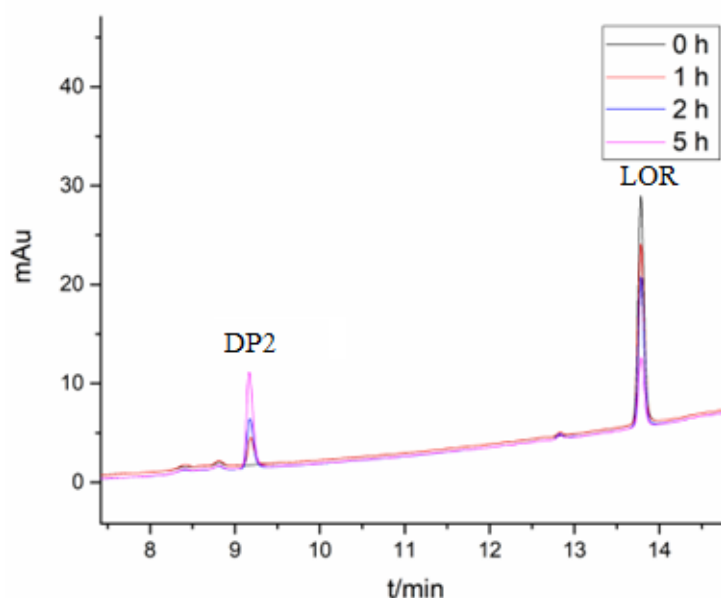
U kiselom mediju LOR je stabilan u prisutnosti β -CD što je očekivano jer je i sam LOR stabilan pri istim uvjetima kao što je detaljnije opisano u prethodnom poglavlju. Pik LOR se pojavljuje pri vremenu zadržavanja od 13,77 minuta (tablica D5). Očitane su površine pikova LOR u svim uzorcima te je izračunat postotak degradacije (tablica D6). Razlike u očitanim površinama moguće su zbog pogreške prilikom pipetiranja. Potvrda da nije došlo do razgradnje su kromatogrami prikazani na slici D4 i slici 17 na kojima je vidljiv samo jedan pik.



Slika 17. Kromatogram uzorka LOR/ β -CD nakon razgradnje u kiselim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h uz zagrijavanje na 80 °C pri valnoj duljini od 275 nm

4.2.2. Razgradnja u lužnatom mediju

Loratadin u prisutnosti β -CD za razliku od samog LOR je stabilniji pri istim uvjetima lužnate hidrolize. Kao i u slučaju samog loratadina, nije uočena razgradnja pri sobnoj temperaturi (slika D5). Međutim, u uzorcima koji su zagrijavani uočena je jedna novi pik pri 9,18 min (DP2) (slika 18 i tablica D7). Budući da je u uzorku samog loratadina uočena dodatni pik pri 9,46 min (DP1), može se zaključiti da β -CD utječe na razgradnju loratadina. Identifikacija struktura dobivenih razgradnih produkata mogla bi dati dodatne informacije i možda objasniti razlike u dobivenim razgradnim produktima.



Slika 18. Kromatogram uzorka LOR/ β -CD pri lužnatoj hidrolizi u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h uz zagrijavanje na 80 °C, pri valnoj duljini od 275 nm

Prema postotku razgradnje (tablica 8) vidljivo je da β -CD ne utječe znatno na stabilnost LOR, iako su uočene male razlike u postotku razgradnje u usporedbi sa samim LOR. Primjerice, u uzorcima koji nisu zagrijavani, u prisutnosti β -CD dolazi do manje razgradnje nego kada je LOR sam. Isto je vidljivo i u uzorku koji je zagrijavan jedan sat, budući da postotak razgradnje samog LOR iznosi 23%, a u prisutnosti β -CD 21,3%. Međutim, uočena su i neka odstupanja postotka razgradnje te neslaganje s navedenim zaključkom (primjerice u uzorku nakon 2 i 5 sati zagrijavanja). Uzrok tome može biti pogreška prilikom pipetiranja kod pripreve uzoraka za

razgradnju ili pri razrijeđivanju uzoraka prije analize. Međutim, moguće je i da prisutnost β -CD uzrokuje veću razgradnju LOR pri zagrijavanju.

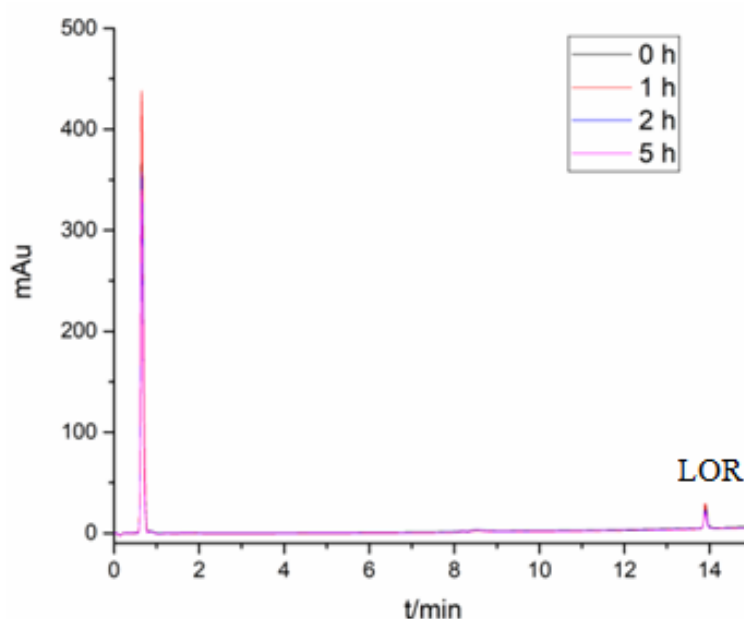
Tablica 8. Postotak razgradnje LOR u uzorku LOR/ β -CD u lužnatom mediju u odnosu na kontrolni uzorak LOR/ β -CD pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije loratadina, 275 nm

1 mol L ⁻¹ NaOH		
Uzorak	Površina ($\lambda=275$ nm)	Postotak razgradnje / %
kontrola	94,5	–
0h	93,6	1,0
1h (s.t.)	93,8	0,7
1h (80 °C)	74,4	21,3
2h (s.t.)	93,3	1,3
2h (80 °C)	61,5	34,9
5h (s.t.)	90,1	4,7
5h (80 °C)	28,4	69,9

s.t. = sobna temperatura

4.2.3. Razgradnja pri oksidativnim uvjetima

Analizom uzorka LOR/ β -CD pri oksidativnim uvjetima na valnoj duljini 275 nm uočen je samo jedan pik pri vremenu zadržavanja od 13,91 koji odgovara loratadinu (tablica D8). Ni u jednom uzorku nisu uočeni novi pikovi (slika D6 i slika 19), iako je uočeno smanjenje pika LOR.



Slika 19. Kromatogram uzorka LOR/ β -CD nakon oksidativne razgradnje u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h uz zagrijavanje na 80 °C, pri valnoj duljini od 275 nm

Budući da pri valnoj duljini od 275 nm nisu uočeni novi kromatografski pikovi, iako je došlo do značajnog smanjenja površine kromatografskog pika loratadina, uzeta je valna duljina od 333 nm gdje su vidljivi potencijalni degradanti u uzorcima pri sobnoj temperaturi i u uzorcima uz zagrijavanje (tablica 9). Na temelju toga može se zaključiti da dolazi do razgradnje LOR te da nastali degradanti ne apsorbiraju zračenje pri valnoj duljini od 275 nm. U svim uzorcima prisutni su pikovi pri vremenima zadržavanja od 10,45 (DP4); 14,04 (DP3) i 13,91 min (LOR), a u uzorci nakon 2 sata i 5 sati razgradnje uz zagrijavanje, uočen je i dodatan pik pri vremenu zadržavanja 10,23 minuta (DP5).

Tablica 9. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR i njegovih razgradnih produkata (DP) u uzorku LOR/ β -CD u oksidativnim uvjetima pri 333 nm

Uzorak	LOR		DP3		DP4		DP5	
	P	t_R / min	P	t_R / min	P	t_R / min	P	t_R / min
kontrola	2,8	13,77	-	-	-	-	-	-
0h	2,3	13,91	0,96	14,04	0,11	10,45	-	-
1h (s.t.)	2,2	13,91	0,97	14,04	0,12	10,46	-	-
1h (80 °C)	2,7	13,90	1,3	14,04	0,33	10,45	-	-
2h (s.t.)	2	13,91	1	14,04	0,16	10,46	-	-
2h (80 °C)	2	13,91	1	14,04	0,47	10,45	0,21	10,23
5h (s.t.)	2,1	13,91	1,1	14,04	0,22	10,45	-	-
5h (80 °C)	1,7	13,90	0,87	14,04	0,39	10,44	0,38	10,22

s.t. = sobna temperatura

Postotak razgradnje izračunat je na temelju površina kromatografskih pikova LOR pri valnoj duljini od 275 nm. Na temelju izračunatog postotka razgradnje LOR u prisutnosti β -CD, možemo uočiti trend povećanja razgradnje loratadina pri duljim vremenima razgradnje (tablica 10). Također, može se uočiti da je uz zagrijavanje razgradnja uspješnija. Usporedbom s rezultatima razgradnje samog LOR, može se zaključiti da β -CD utječe na stabilnost LOR, budući da dolazi do slabije razgradnje. Najveća razlika u postocima razgradnje može se uočiti u uzorcima analiziranim nakon 5 sati, gdje je postotak razgradnje samog LOR 57,4%, a u

prisutnosti β -CD, dolazi do razgradnje 37,5% loratadina. Odstupanja u dobivenim vrijednostima razgradnje mogu se pripisati pogrešnom pipetiranju kod pripreve uzoraka za razgradnju ili pri razrjeđivanju uzoraka prije analize.

Tablica 10. Postotak razgradnje LOR u uzorku LOR/ β -CD pri oksidativnim uvjetima u odnosu na kontrolni uzorak LOR/ β -CD pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije loratadina, 275 nm

3% H ₂ O ₂		
Uzorak	Površina ($\lambda=275$ nm)	Postotak razgradnje / %
kontrola	94,5	–
0h	86,7	8,3
1h (s.t.)	78,7	16,7
1h (80 °C)	97,1	-2,8
2h (s.t.)	71,7	24,1
2h (80 °C)	69,5	26,5
5h (s.t.)	73,9	21,8
5h (80 °C)	59,1	37,5

s.t. = sobna temperatura

Iz dobivenih kromatograma odabrani su uzorci loratadina u lužnatom mediju te pri oksidativnim uvjetima za daljnju MS i MS/MS analizu s obzirom na uočene degradante u uzorku. Uzorci loratadina u kiselom mediju su stabilni, stoga nisu korišteni u daljnjoj analizi.

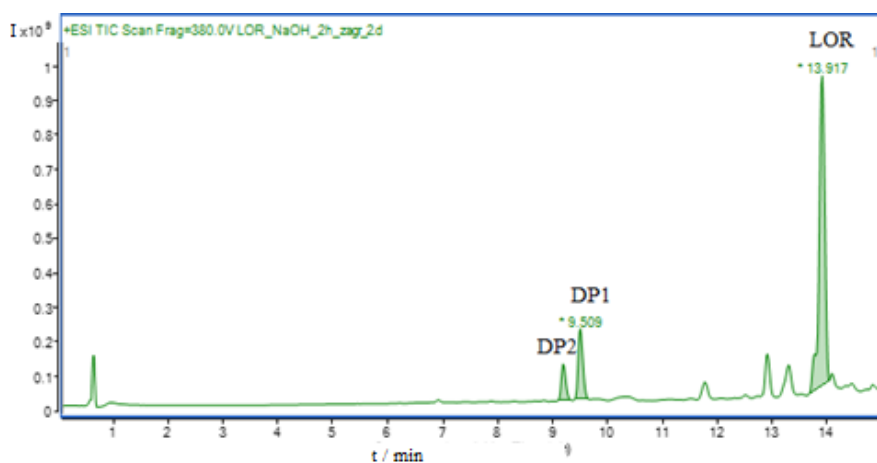
4.3. MS analiza

Snimljeni su spektri uzoraka loratadina u lužnatom mediju nakon dva sata zagrijavanja i loratadina u oksidativnim uvjetima nakon pet sati zagrijavanja uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem te su uočeni signali koji odgovaraju protoniranim ionima prisutnim u uzorku.

4.3.1. Razgradnja u lužnatom mediju

Na slici 20 prikazan je kromatogram ukupne ionske struje (engl. *total ion current*, TIC) uzorka loratadina u lužnatom mediju nakon dva sata zagrijavanja. Pik pri vremenu zadržavanja od 13,96 minuta, odgovara ionu m/z 383,1637, odnosno protoniranoj molekuli loratadina. Sljedeći

detektirani ion pri vremenu zadržavanja 9,56 minuta ima omjer mase i naboja m/z 364,1597, a pik na vremenu zadržavanja pri 9,25 minuta odgovara ionu m/z 311,1318 (tablica 11).

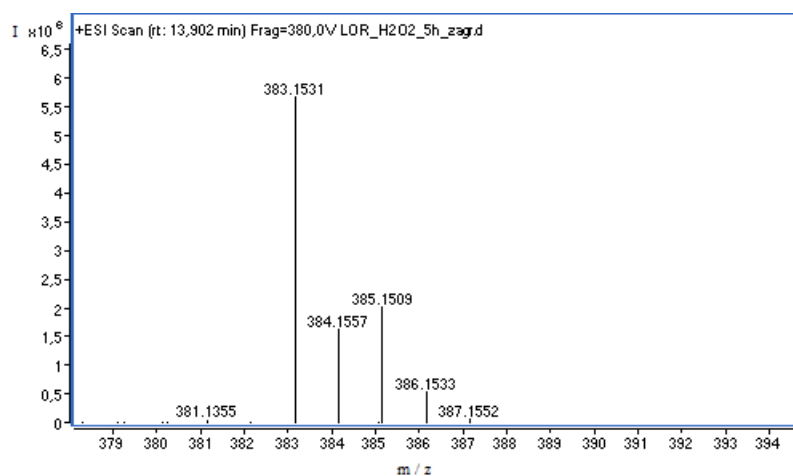


Slika 20. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka LOR u lužnatom mediju nakon dva sata zagrijavanja

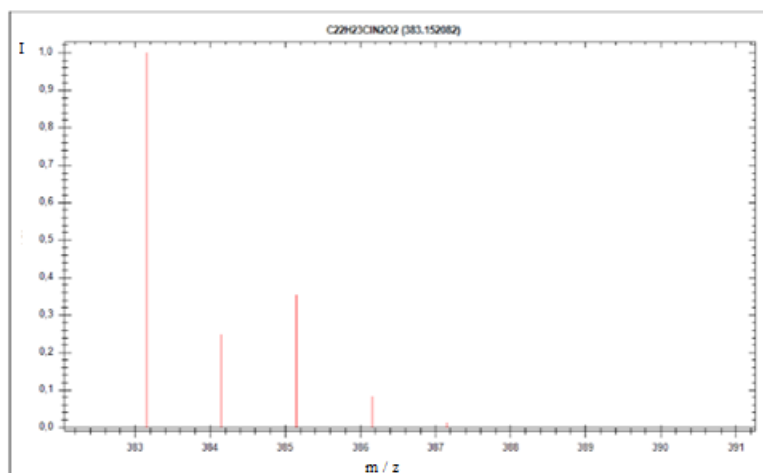
Tablica 11. Ioni prisutni u uzorku loratadina u lužnatom mediju nakon 2 h zagrijavanja

Degradacijski produkt	m/z	t_R / min
LOR	383,1637	13,96
DP1	364,1597	9,56
DP2	311,1318	9,25

Eksperimentalno dobivena izotopna raspodjela loratadina, prikazana na slici 21, podudara se s teoretskom izotopnom raspodjelom vidljivoj na slici 22. Izotopna raspodjela je karakteristična zbog prisutnosti klora u strukturi i pojavljuje se kod svih iona od interesa. Na taj način se prepoznaje da se uistinu radi o degradacijskim produktima loratadina.



Slika 21. Eksperimentalna izotopna raspodjela loratadina



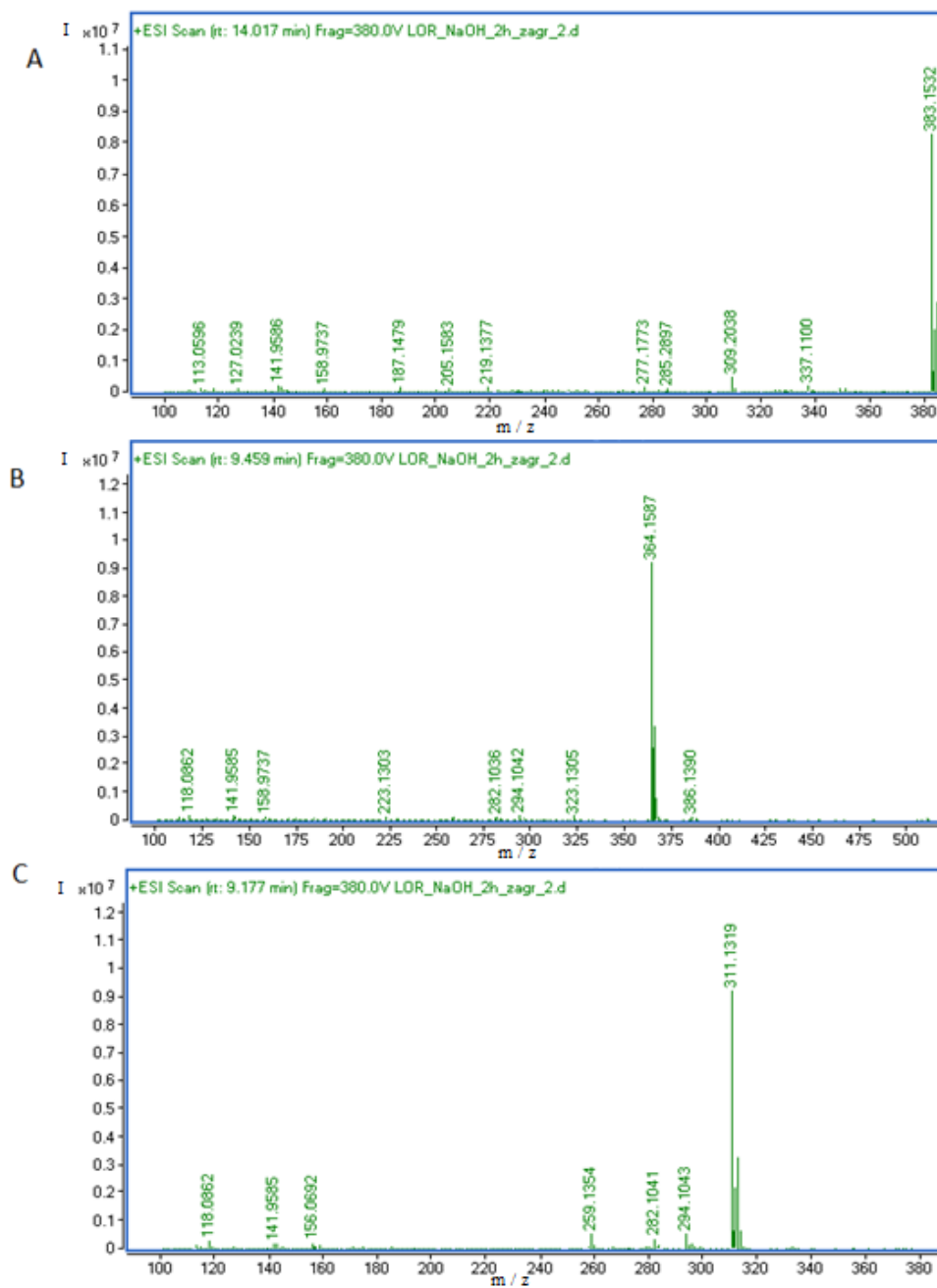
Slika 22. Teoretska izotopna raspodjela loratadina

Proučavajući izotopne signale klora, najizraženiji je signal $(M+2)^+$. Omjer signala molekulskog iona, M^+ i signala $(M+2)^+$ je 3:1.¹⁵ Budući da molekula loratadina sadrži atom klora, isti omjer signala uočen je i u spektru molekule loratadina (tablica 12). Teorijski relativni intenzitet signala M^+ odgovara ionu omjera mase i naboja, m/z 383,1521 i iznosi 100, dok relativni intenzitet signala $(M+2)^+$ odgovara ionu m/z 385,15 i iznosi 35,37.

Tablica 12. Teoretska i eksperimentalno određena izotopna raspodjela loratadina

<i>m/z</i> teoretski	Teoretski relativni intenzitet	<i>m/z</i> eksperimentalni	Eksperimentalni relativni intenzitet
383,1521	100	383,1531	100
384,1553	24,88	384,1557	28,74
385,15	35,37	385,1509	35,71
386,1527	8,29	386,1533	9,75
387,1555	1,1	387,1552	1,3
388,1582	0,11		
389,1609	0,01		

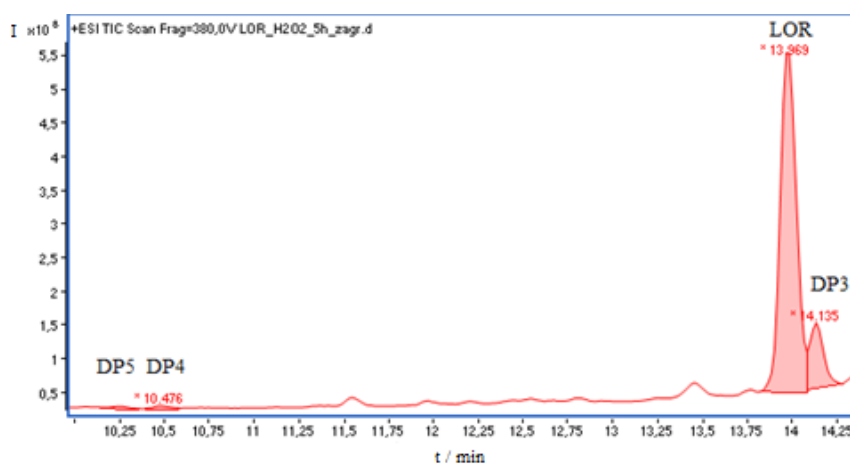
MS spektri iona od interesa prisutnih u uzorku loratadina u lužnatom mediju nakon dva sata zagrijavanja prikazani su na slici 23. Na temelju karakteristične izotopne raspodjele može se zaključiti da ioni sadrže klor te se stoga mogu smatrati potencijalnim degradacijskim produktima loratadina.



Slika 23. Prikaz MS spektara LOR m/z 383,1637 (A) i degradanata DP1 m/z 364,1597 (B) i DP2 m/z 311,1318 (C) prisutnih u uzorku loratadina u lužnatim uvjetima nakon dva sata zagrijavanja

4.3.2. Razgradnja pri oksidativnim uvjetima

Na slici 24 prikazan je kromatogram ukupne ionske struje uzorka loratadina pri oksidativnim uvjetima nakon pet sati zagrijavanja. Uz pik koji odgovara loratadinu, uočena su i 3 dodatna pika pri različitim vremenima zadržavanja (tablica 13). Pik pri vremenu zadržavanja 14,14 min odgovara ionu m/z 399,1483, a vrijeme zadržavanja od 10,48 min odgovara ionu m/z 399,1473. Pojavljuje se još jedan pik pri 10,26 min koji je odgovara ionu m/z 415,1420.

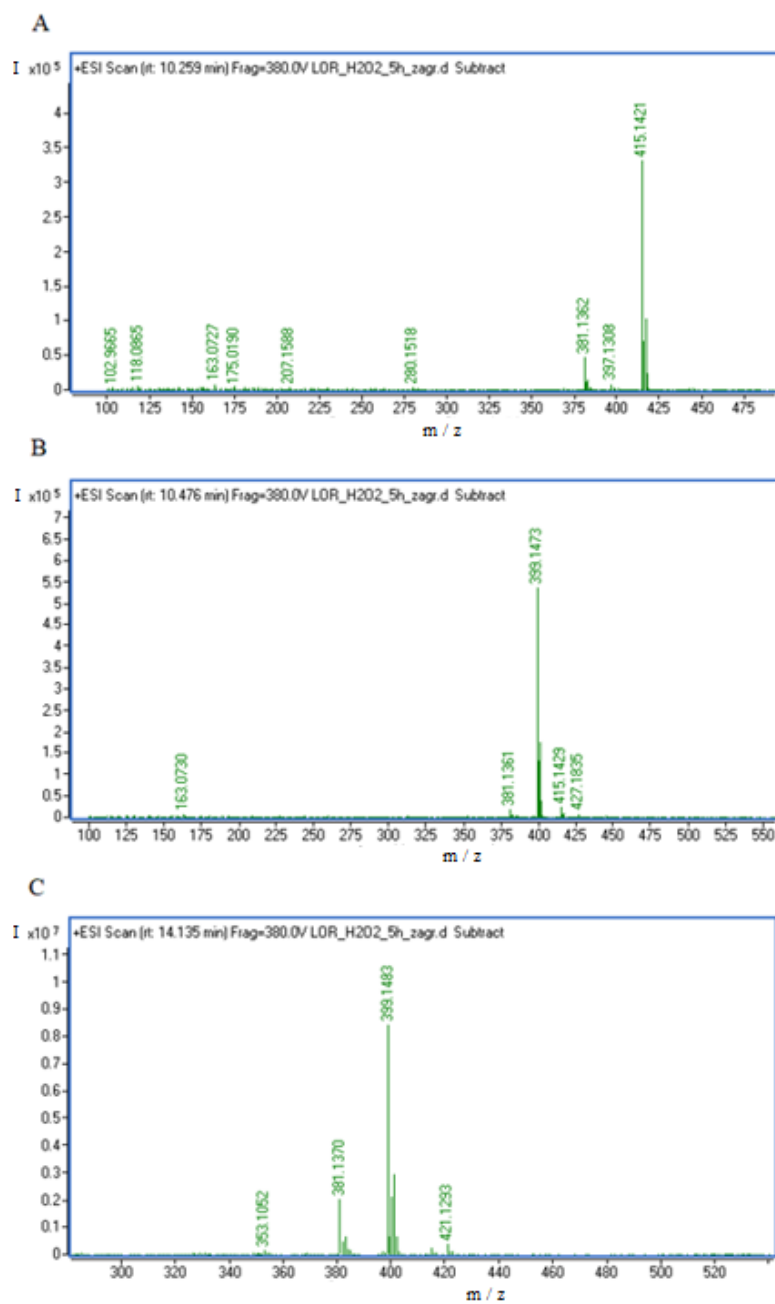


Slika 24. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka loratadina pri oksidativnim uvjetima nakon 5 sati zagrijavanja

Tablica 13. Ioni prisutni u uzorku loratadina i H_2O_2 nakon 5 h zagrijavanja

Degradacijski produkt	m/z	t_R / min
DP3	399,1483	14,14
LOR	383,1637	13,97
DP4	399,1473	10,48
DP5	415,1420	10,26

MS spektri iona od interesa prisutnih u uzorku pri oksidativnim uvjetima nakon 5 sati zagrijavanja prikazani su na slici 25. Vidljiva je karakteristična izotopna raspodjela zbog prisutnosti atoma klora u strukturi.



Slika 25. MS spektar degradanata DP5 m/z 415,1420 (A), DP4 m/z 399,1473 (B), DP3 m/z 399,1483 (C) u uzorku loratadina pri oksidativnim uvjetima nakon pet sati zagrijavanja

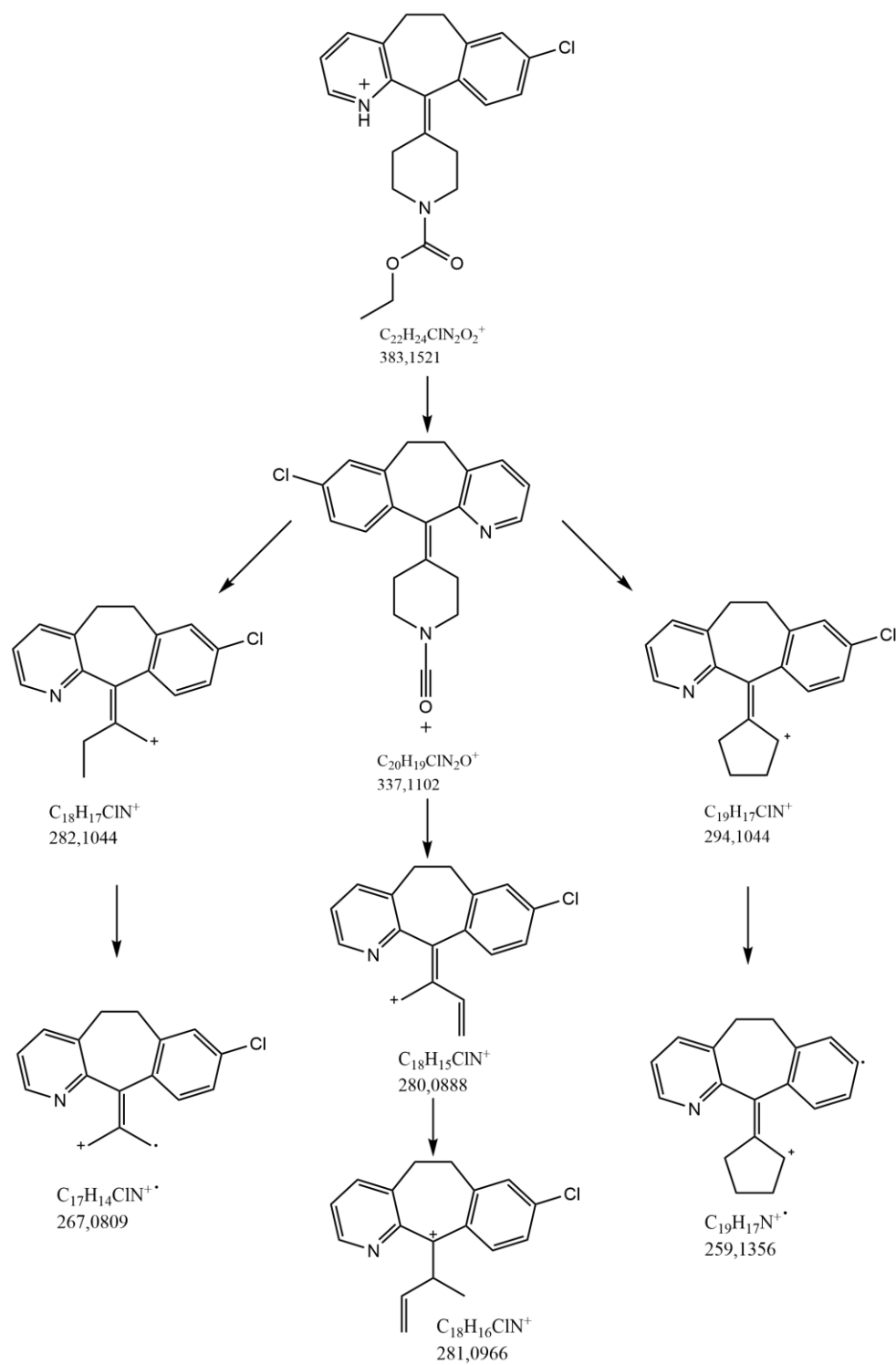
4.4. MS/MS analiza

Provedena je MS/MS analiza uz pozitivnu ionizaciju. Fragmentacija je provedena pri tri kolizijske energije: 10 V, 20 V i 30 V. Načinjene su fragmentacijske sheme za svaki ion u uzorku detektiran MS analizom.

Fragmentacija molekuskog iona LOR, m/z 383,1599, daje ione čija je struktura potvrđena u prethodno objavljenim radovima^{2,7,17-19} te monoizotopnom masom (tablica 14). Iz molekuskog iona LOR m/z 383,1599 gubitkom C_2H_5OH nastaje ion m/z 337,1102.^{2,7,17} Intenzitet ovog iona raste porastom primijenjene kolizijske energije. Iz iona m/z 337,1133 nastaje ion m/z 294,1365 gubitkom $NH=CO$ skupine pri čemu dolazi do pregradnje ostatka piperidinskog prstena.⁷ Ion m/z 282,1044 nastaje iz iona m/z 337,1102 gubitkom $NH=COCH_2$. Ion m/z 259,1365 nastaje iz iona m/z 294,1365 gubitkom atoma klora prethodno vezanog za triciklički dio molekule.⁷ Ion m/z 267,0823 nastaje iz iona m/z 282,1044 gubitkom metilne skupine. Fragmentacijska shema loratadina predložena je na slici 26.

Tablica 14. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom loratadina (m/z 383,1599) uz kolizijsku energiju od 10 V, 20 V i 30 V

10 V		20 V		30 V		Asignacija
m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	
383,1599	100	383,1568	100	383,1529	20,81	$C_{22}H_{24}ClN_2O_2^+$
337,111	12,7	337,1134	84,42	337,1133	100	$C_{20}H_{18}ClN_2O^+$
				294,1053	29,44	$C_{19}H_{17}ClN^+$
				282,1052	14,72	$C_{18}H_{17}ClN^+$
				281,0974	25,48	$C_{18}H_{16}ClN^+$
				280,0897	9,83	$C_{18}H_{15}ClN^+$
				267,0823	51,15	$C_{17}H_{14}ClN^{++}$
				259,1365	34,12	$C_{19}H_{17}N^{++}$



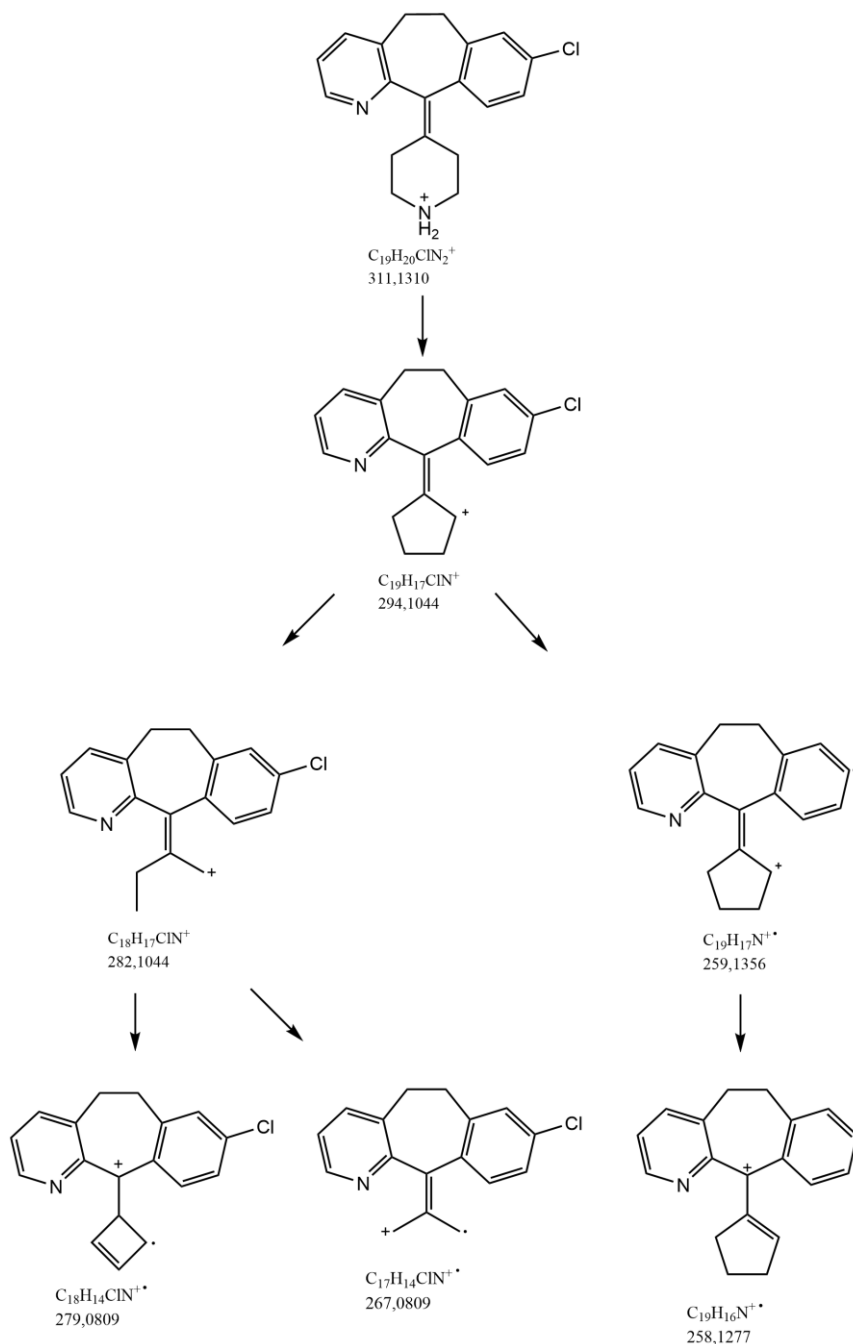
Slika 26. Fragmentacijska shema loratadina

4.4.1. Identifikacija razgradnih produkata nastalih pri razgradnji u lužnatom mediju

Jedan od iona detektiranih MS analizom u lužnatom mediju je ion m/z 311,1318 pri vremenu zadržavanja od 9,25 minuta. MS/MS analizom utvrđena je njegova struktura te struktura njegovih fragmenata, te je utvrđeno da se radi o desloratadinu, poznatom degradacijskom produktu loratadina.^{7,17,19} Struktura iona m/z 311,1318 razlikuje se od strukture loratadina u nedostatku etoksikarbonilne skupine vezane na piperidinski prsten.⁷ Fragmentacija desloratadina se odvija na sličan način kao i loratadina. Glavni fragmentacijski put je pucanje veza unutar piperidinskog prstena pri čemu ciklizacijom nastaje ion m/z 294,1056. Daljnje pucanje veza unutar piperidinskog prstena rezultira pojavom iona m/z 282,1044. Gubitkom klora, iz iona m/z 294,1056 nastaje ion m/z 259,1362. Pojavom dvostruke veze, iz iona m/z 259,1362 nastaje ion m/z 258,1281. Ioni m/z 279,0813 te 267,0812 nastaju iz iona m/z 282,1044. Relativni intenziteti nastalih iona prikazani su u tablici 15, a fragmentacijska shema na slici 27.

Tablica 15. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom degradanta DP1 (m/z 311,1318) uz kolizijsku energiju od 10 V, 20 V i 30 V

10 V		20 V		30 V		Asignacija
m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	
311,1318	100	311,1315	23,18			$C_{19}H_{20}ClN_2^+$
		294,1056	46,55	294,1049	24,83	$C_{18}H_{17}ClN^+$
		282,105	30,06	282,105	23,77	$C_{18}H_{17}ClN^+$
				279,0813	17,49	$C_{18}H_{14}ClN^{++}$
				267,0812	14,4	$C_{17}H_{14}ClN^{++}$
259,1362	16,7	259,1361	100	259,1364	100	$C_{19}H_{17}N^{++}$
				258,1281	24,61	$C_{19}H_{16}N^{++}$

Slika 27. Fragmentacijska shema DP1 (m/z 311,1318)

Osim navedenog degradacijskog produkta loratadina, zabilježen je i potencijalni degradacijski produkt u lužatom mediju detektiran pri retencijskom vremenu od 9,56 minuta kojem odgovara ion m/z 364,1597. Na temelju izotopne raspodjele može se zaključiti da detektirani ion sadrži klor. Većina uočenih fragmentnih iona, navedenih u tablici 16, identični su kao kod loratadina. To su fragmentni ioni pri m/z 294, m/z 282, m/z 281, m/z 280, m/z 267 te m/z 259. Identični fragmentni ioni ukazuju da bi detektirani ion mogao biti degradacijski produkt loratadina.

Međutim, strukturu ovog iona nije bilo moguće odrediti te su potrebne dodatne analitičke metode, primjerice spektroskopija NMR, kako bi se odredila njegova struktura.

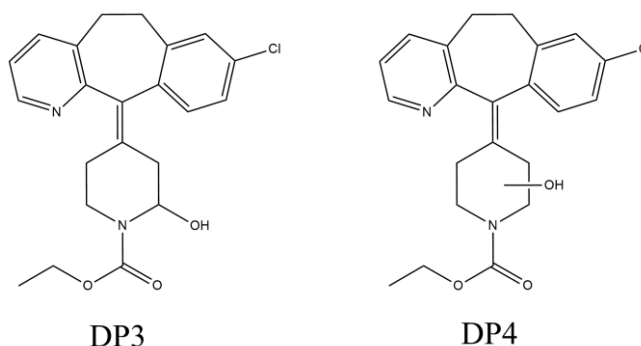
Tablica 16. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom degradanta DP2 (m/z 364,1597) uz kolizijsku energiju od 10 V, 20 V i 30 V

10 V		20 V		30 V		Asignacija
m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	
364,1592	100	364,1584	100			
		323,1319	36,81	323,1315	18,94	
		294,1052	33,11	294,1051	65,05	C ₁₈ H ₁₇ CIN ⁺
		282,1052	37,96	282,1052	52,67	C ₁₈ H ₁₇ CIN ⁺
				281,097	17,05	C ₁₈ H ₁₆ CIN ⁺
				280,0893	22,89	C ₁₈ H ₁₅ CIN ⁺
				279,0813	12,6	
				267,0814	17,5	C ₁₇ H ₁₄ CIN ⁺⁺
		259,1364	45,95	259,1362	100	C ₁₉ H ₁₇ N ⁺⁺
				258,1281	15,15	
				82,0609	16,07	

4.4.2. Identifikacija razgradnih produkata nastalih pri razgradnji u oksidativnim uvjetima

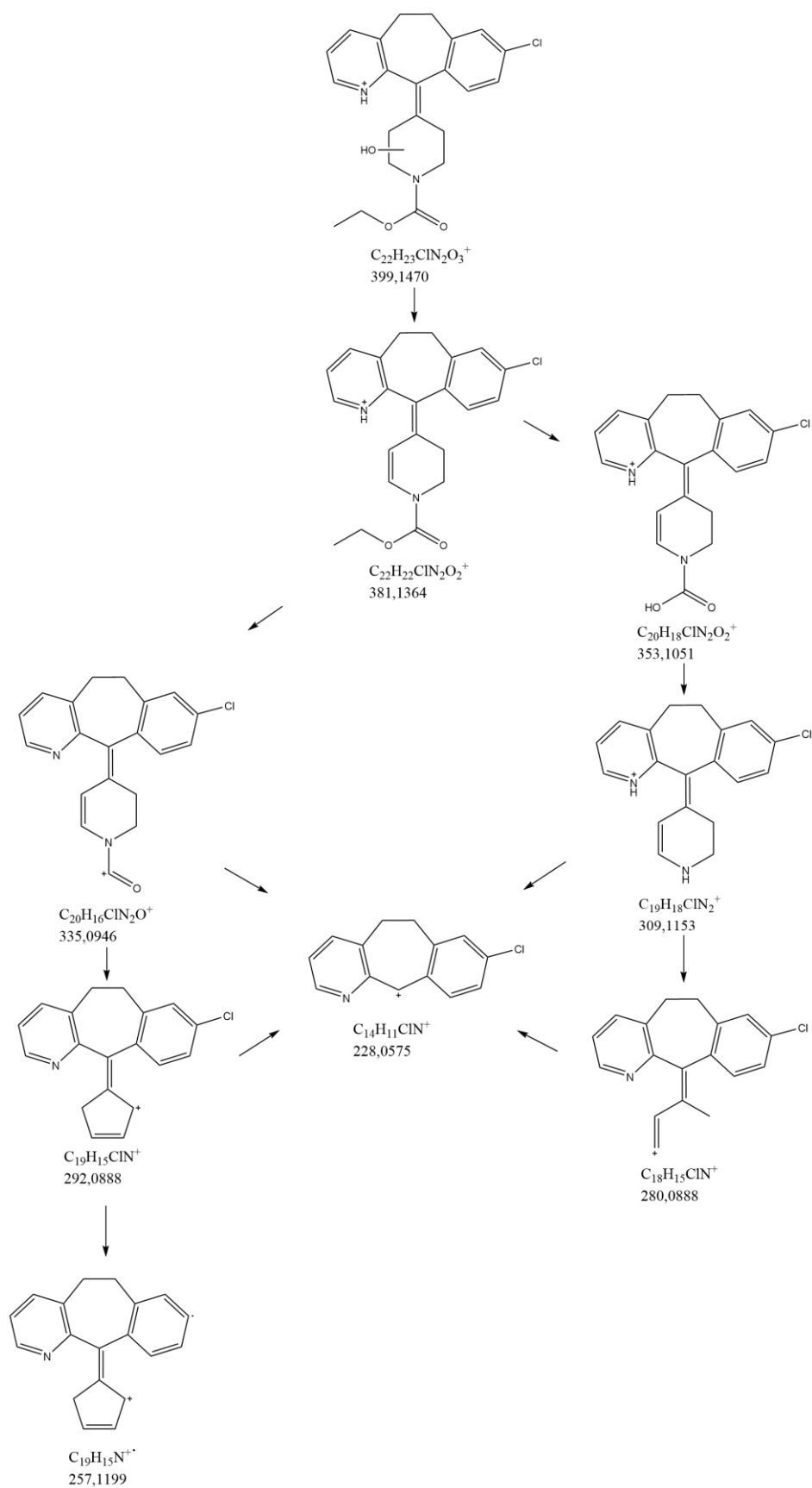
MS analizom uzorka loratadina nakon razgradnje u oksidativnim uvjetima uočeni su ioni m/z 399,1483 (DP3), m/z 399,1473 (DP4) te m/z 415,1420 (DP5). Ioni m/z 399,1483 i 399,1473 imaju slične mase, te odgovaraju monohidroksiliranom loratadinu. Budući da se pojavljuju na različitim vremenima zadržavanja, može se zaključiti da se radi o dvije strukture koje imaju hidroksilnu skupinu vezanu na različitim pozicijama. Budući da je u spektrima oba degradanta uočen ion pri m/z 228, može se zaključiti da je hidroksilna skupina vezana na piperidinski dio molekule, a ne na triciklički prsten.⁷ Poznato je da formiranje intramolekulskih vodikovih veza uzrokuje slabiju interakciju s mobilnom fazom što dovodi do stvaranja jačih interakcija sa stacionarnom fazom i duljih vremena zadržavanja.^{20,21} Budući da vrijeme zadržavanja DP3 iznosi 14,14 minuta, a DP4 iznosi 10,48 minuta, moguće je zaključiti da degradacijski produkt

pri duljem vremenu zadržavanja stvara vodikove veze što omogućuje jednoznačno određivanje položaja hidroksilne skupine (slika 28).



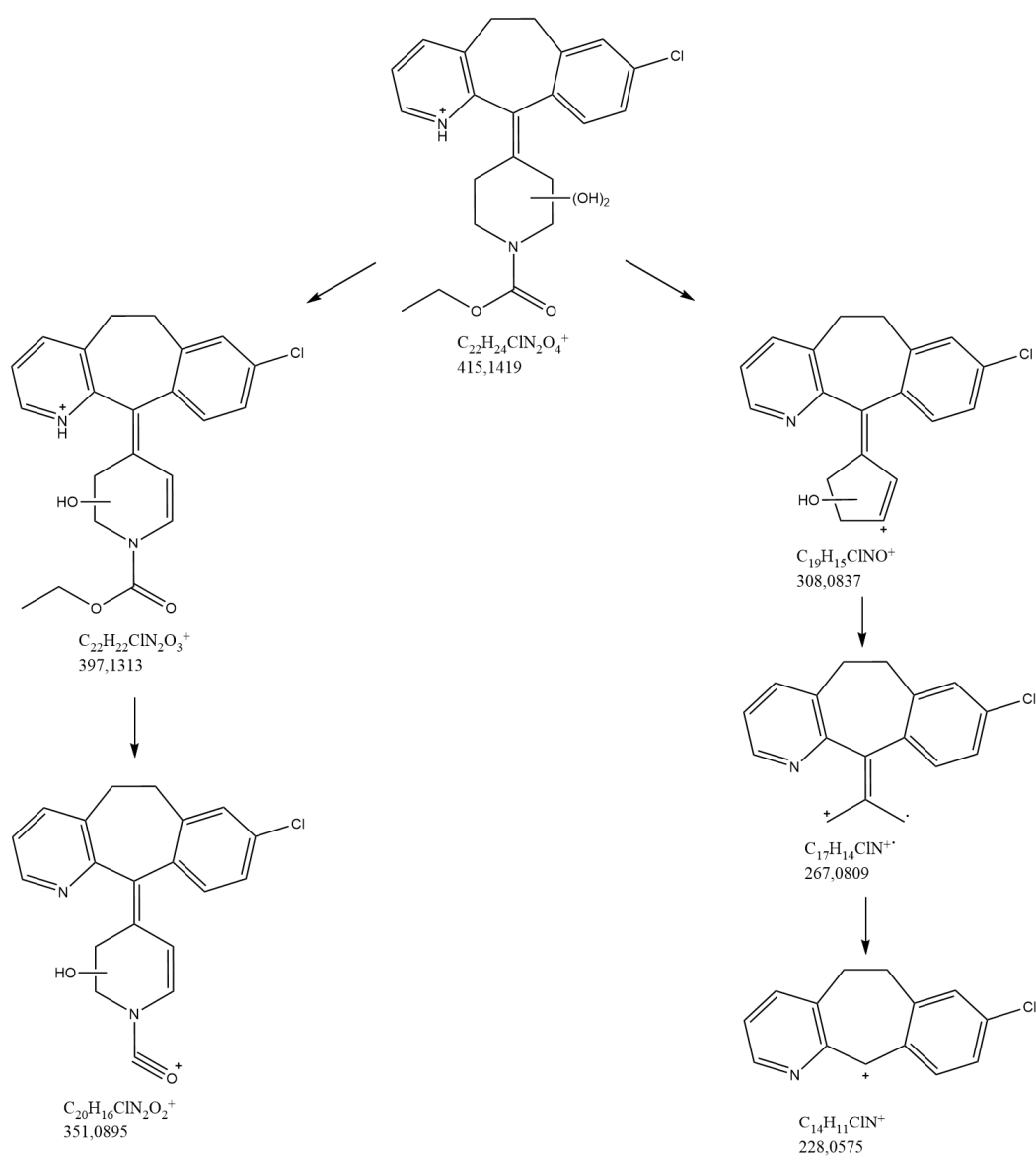
Slika 28. Predložene strukture degradanata DP3 i DP4 dobivenih nakon razgradnje LOR u oksidativnim uvjetima

Način fragmentacije oba degradacijska produkta je veoma sličan. U oba spektra pojavljuju se isti ioni, jedina je razlika u njihovim relativnim intenzitetima (tablica D9 i tablica D10). Na slici 29 vidljivo je da fragmentacijom iz iona m/z 399,1470 nastaje ion m/z 381,1364 gubitkom molekule vode što rezultira nastajanjem dvostruke veze na piperidinskom prstenu. Dalje se fragmentira u ion m/z 353,1051 gubitkom etilne skupine. Slijedi gubitak karboksilne skupine te nastaje ion m/z 309,1153. Iz iona m/z 309,1153 nastaje ion m/z 280,0888 gubitkom dijela prstena povezanog na triciklički dio molekule, točnije $\text{NH}=\text{CH}_2$. Iz iona m/z 381,1364 nastaje i ion m/z 335,0946 gubitkom $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Ion m/z 292,0888 nastaje iz iona m/z 335,0946 gubitkom $\text{NH}=\text{CO}$ skupine te se formira dvostruka veza ugljik-ugljik. Ion m/z 257,1199 nastaje gubitkom atoma klora. U konačnici ostaje samo triciklički dio molekule, odnosno fragment m/z 228,0575.⁷ Način fragmentacije iona m/z 399 odgovara fragmentaciji nađenoj u radu Ghosal i sur.⁷, u kojem je provedena MS i MS/MS analiza loratadina i njegovih metabolita, stoga se može zaključiti da strukture razgradnih produkata DP3 i DP4 odgovaraju poznatim metabolitima loratadina M54a i M54b.⁷



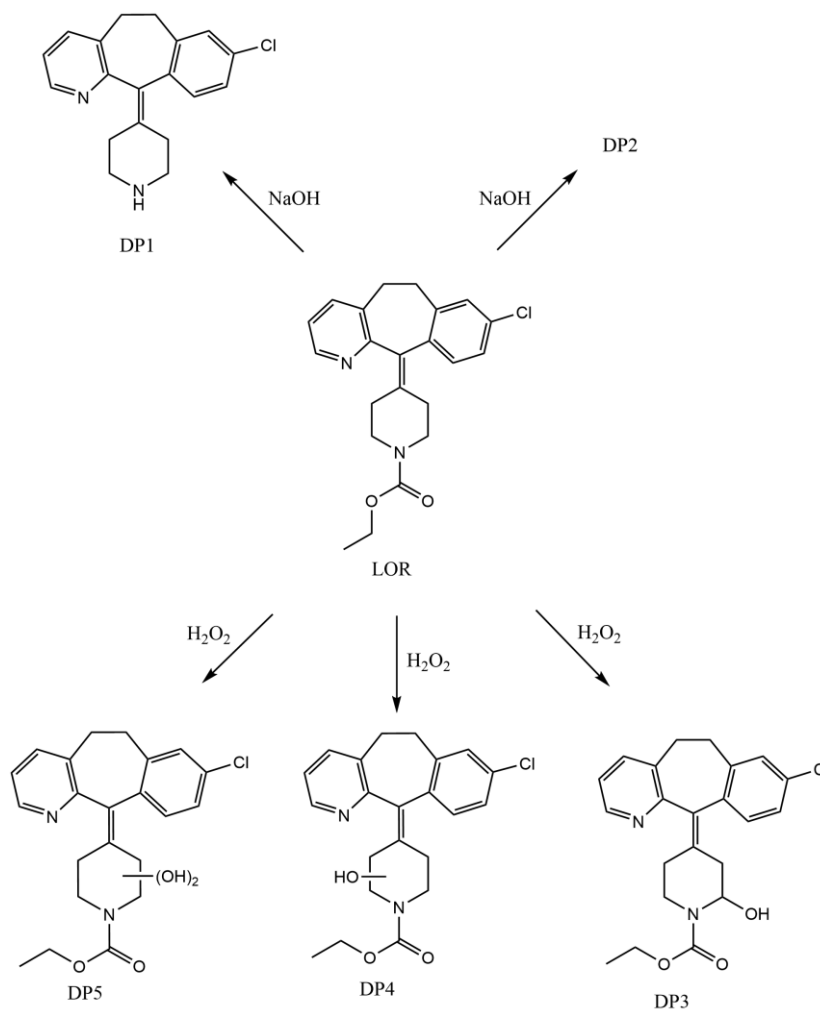
Slika 29. Fragmentacijska shema DP3 i DP4 (m/z 399)

Ion m/z 415,1420, označen kao DP5, sadrži dvije hidroksilne skupine. Budući da su uočeni ioni pri m/z 228 i 267 (tablica D11) može se zaključiti da se hidroksilne skupine ne nalaze na trickličkom prstenu, već na piperidinskom prstenu. Ion pri m/z 397 nastaje gubitkom jedne hidroksilne skupine, a daljnjom fragmentacijom nastaje ion m/z 351. Ion m/z 308 nastaje pucanjem veza unutar piperidinskog prstena i ciklizacijom (slika 30). Točan položaj hidroksilnih skupina nije bilo moguće odrediti, te su potrebna dodatna istraživanja. Primjerice, pojedini razgradni produkti mogu se izolirati semi-preparativnom tekućinskom kromatografijom te analizirati spektroskopijom NMR.



Slika 30. Fragmentacijska shema DP5 (m/z 415,1420)

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je razgradnjom u lužnatom mediju došlo do nastanka dva razgradna produkta, a pri oksidativnim uvjetima da su nastala tri razgradna produkta. U kiselom mediju ne dolazi do razgradnje loratadina. Strukture dobivenih razgradnih produkata dobivene su na temelju MS/MS spektara i prikazane su na slici 31. Od pet dobivenih razgradnih produkata, samo je jedan prethodno poznat, a ostali su novi, do sada neprijavljeni u literaturi.



Slika 31. Strukture razgradnih produkata LOR

Usporedbom rezultata stabilnosti loratadina sa i bez prisutnosti β -CD može se zaključiti da dolazi do malog povećanja stabilnosti loratadina kada je prisutan β -CD. Ovo može ukazivati na barem djelomično nastajanje inkluzijskog kompleksa budući da uklapanjem u šupljinu ciklodekstrina, loratadin može biti zaštićen od uvjeta pogodnih za razgradnju što može utjecati na njegovu stabilnost.

§ 5. ZAKLJUČAK

Tekućinska kromatografija i vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa visokog razlučivanja korišteni su pri analizi uzoraka loratadina sa i bez β -ciklodekstrina u kiselom i lužnatom mediju te pri oksidativnim uvjetima, na sobnoj temperaturi i uz zagrijavanje (80 °C).

Dokazano je da je loratadin u oba slučaja stabilan u kiselom mediju. U lužnatom mediju do degradacije dolazi samo uz zagrijavanje, a β -CD utječe na malo povećanje stabilnosti loratadina. Uzrok tome moglo bi biti nastajanje inkluzijskog kompleksa čime se loratadin stabilizira. Pri oksidativnim uvjetima loratadin se razgrađuje na sobnoj temperaturi i uz zagrijavanje, a također je uočena povećana stabilnost loratadina u prisutnosti β -CD. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da β -CD poboljšava stabilnost loratadina, te ima potencijalnu primjenu u pripravi novih formulacija loratadina s poboljšanim svojstvima.

U lužnatom mediju uočena su dva razgradna produkta (DP1 i DP2), a u oksidativnim uvjetima tri (DP3–DP5). Na temelju MS i MS/MS analize predložene su njihove strukture. Od pet uočenih razgradnih produkata, samo DP1 odgovara već poznatom razgradnom produktu prijavljenom u prošlim istraživanjima. Dva razgradna produkta, DP3 i DP4, opisani su u literaturi kao poznati metaboliti loratadina, a DP5 je novi razgradni produkt. Budući da nije bilo moguće odrediti točne strukture razgradnih produkata DP4 i DP5 potrebna su dodatna istraživanja. Primjerice, pojedini razgradni produkti mogu se izolirati semi-preparativnom tekućinskom kromatografijom te analizirati NMR spektroskopijom, što bi dalo dodatan uvid u strukturu i omogućilo nedvojbenu identifikaciju strukture svih razgradnih produkata.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

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

BCS – Biofarmaceutski klasifikacijski sustav (engl. *Biopharmaceutics Classification System*)

BDE – energija disocijacije veze (engl. *bond dissociation energy*)

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*)

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

DIP – direktno uvođenje tekuće faze (engl. *direct insertion probe*)

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

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

FTIR – Fourier transformirana infracrvena spektroskopija (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)

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

ICH – Međunarodna konferencija o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)

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

LOR – loratadin (engl. *loratadine*)

MAGIC – međuspoj vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometra masa (engl. *monodisperse aerosol generator interface for chromatography*)

M β CD – maltozil β -ciklodekstrin (engl. *maltosyl β -cyclodextrin*)

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

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

m/z – omjer mase i naboja iona

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

P – površina

PTFE – politetrafluoretilen (engl. *polytetrafluoroethylene*)

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

SBE β CD – natrijeva sol sulfobutyleter- β -ciklodekstrina (engl. *sulfobutylether- β -cyclodextrin sodium salt*)

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

ssNMR – spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije čvrstog stanja (engl. *solid state nuclear magnetic resonance*)

TIC – ukupna ionska struja (engl. *total ion current*)

TSP – termoraspršenje (engl. *thermospray*)

UHPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultrahigh performance liquid chromatography*)

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*)

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

+ – simbol lokalizacije kationa

• – simbol lokalizacije radikala

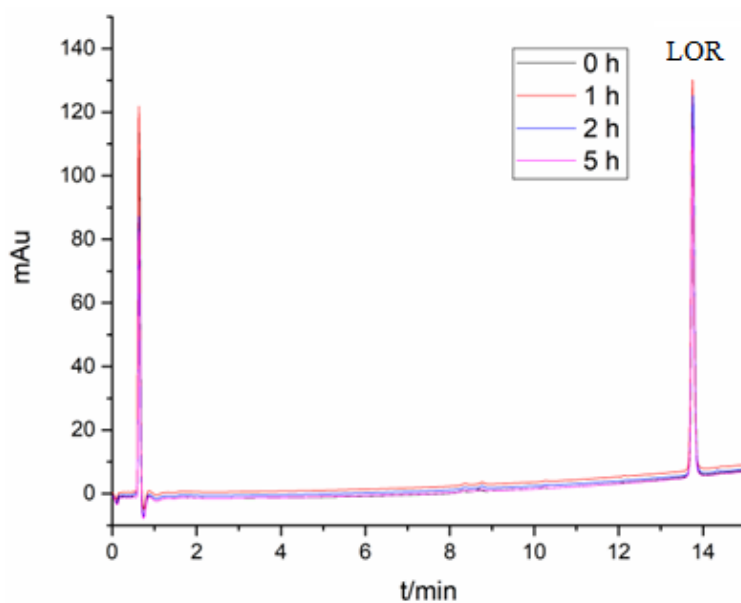
+• – simbol iona s neparnim brojem elektrona

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Y. Zhang, J. Zhang, Q. Xu, Y. Wang, W. Eu, W. Wang, X. Li, T. Zhang, *Drug Des. Devel. Ther.*, **15** (2021) 5109–5122.
2. N. A. El Ragehy, A. M. Badawey, S. Z. El Khateeb, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28** (2002) 1041–1053.
3. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Loratadine> (datum pristupa 23.4.2022.)
4. M. Jug, M. Bećirević-Laćan, *Farm. glas.* **58** (2002) 189–204.
5. B. G. Poulson, Q. A. Alsulami, A. Sharfalddin, E. F. El Agammy, F. Mouffouk, A. H. Emwas, L. Jaremko, M. Jaremko, *Polysaccharides* **3** (2022) 1–31.
6. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a697038.html> (datum pristupa 9.9.2022)
7. A. Ghosal, S. Gupta, R. Ramanathan, Y. Yuan, X. Lu, A. D. Su, N. Alvarez, S. Zbaida, S. K. Chowdhury, K. B. Alton, *Drug Metab. Lett.* **3** (2009) 162–170.
8. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607–1621.
9. T. Loftsson, D. Hreinsdottir, M. Masson, *Int. J. Pharm.* **302** (2005) 18–28.
10. A. Popielec, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **531** (2017) 532–542.
11. M. Cugovčan, *Mehanokemijska priprava i karakterizacija polimernih disperzija i kokristala prazikvantela*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
12. M. Jug, P.A. Mura, *Pharmaceutics* **10** (2018) 189.
13. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 148–173.
14. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2018, str. 746–63.
15. J. H. Gross, *Mass Spectrometry*, Springer, Berlin, 2017
16. M. Narayanam, T. Handa, P. Sharma, S. Jhajra, P. K. Muthe, P. K. Dappili, R. P. Shah, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 191–217.
17. J. Gibbons, D. Sardella, D. Duncan, R. Pike, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **3** (2007) 1191–1992.
18. M. I. Walash, F. Belal, N. El-Enany, M. Eid, R. N. El-Shaheny, *Luminescence* **26** (2011) 670–679.
19. S. Armaković, S. J. Armaković, B. F. Abramović, *J. Mol. Model.* **22** (2016) 240.

20. M. R. Clark, L. R. Garcia-rouira, C. R. Clark, *J. Liq. Chromatogr.* **11** (1988) 3213–3221.
21. W. L. Fitch, C. Khojasteh, I. Aliagas, K. Johnson, *Drug Metab. Lett.* **12** (2018) 93–100.

§ 8. DODATAK

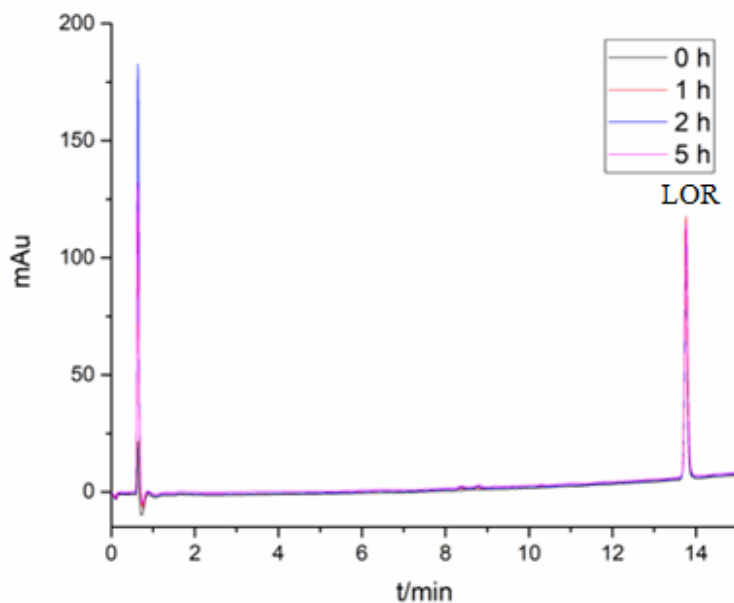


Slika D1. Kromatogram loratadina nakon razgradnje u kiselim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h na sobnoj temperaturi pri valnoj duljini od 275 nm

Tablica D1. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR u uzorku LOR u kiselom mediju pri 275 nm

Uzorak	LOR	
	P	t_R / min
0h	574,1	13,77
1h (s.t.)	608,6	13,77
1h (80 °C)	548,6	13,77
2h (s.t.)	585,1	13,77
2h (80 °C)	571,7	13,77
5h (s.t.)	533,8	13,77
5h (80 °C)	543,5	13,77

s.t. = sobna temperatura

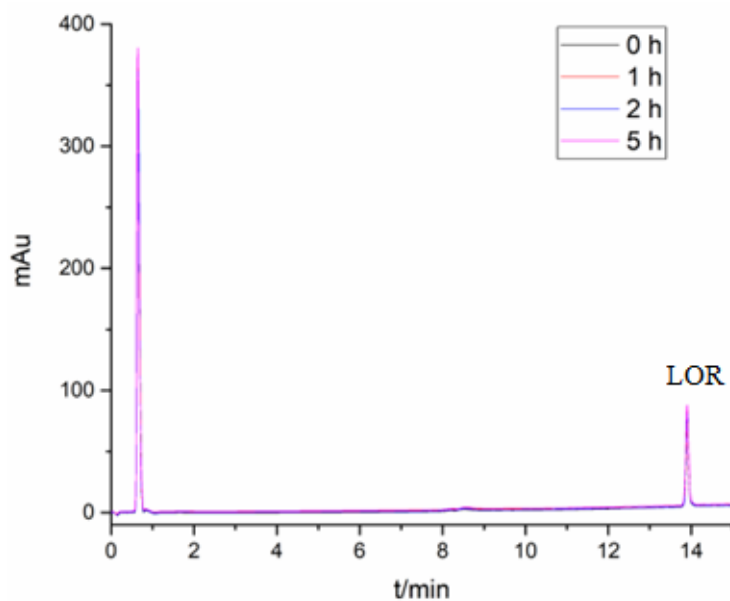


Slika D2. Kromatogram loratadina nakon razgradnje u lužnatim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h na sobnoj temperaturi pri valnoj duljini od 275 nm

Tablica D2. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR i njegovih razgradnih produkata (DP) u uzorku LOR u lužnatom mediju pri 275 nm

Uzorak	LOR		DP1		DP2	
	P	t_R / min	P	t_R / min	P	t_R / min
0h	494,9	13,77				
1h (s.t.)	545,5	13,77				
1h (80 °C)	430,8	13,76			74,3	9,14
2h (s.t.)	508,7	13,77				
2h (80 °C)	479,2	13,77	91,2	9,46	29,6	9,16
5h (s.t.)	526,1	13,77				
5h (80 °C)	243	13,77			204,1	9,11

s.t. = sobna temperatura



Slika D3. Kromatogram loratadina nakon degradacije pri oksidativnim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h na sobnoj temperaturi pri valnoj duljini od 275 nm

Tablica D3. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR u uzorku LOR u oksidativnim uvjetima pri 275 nm

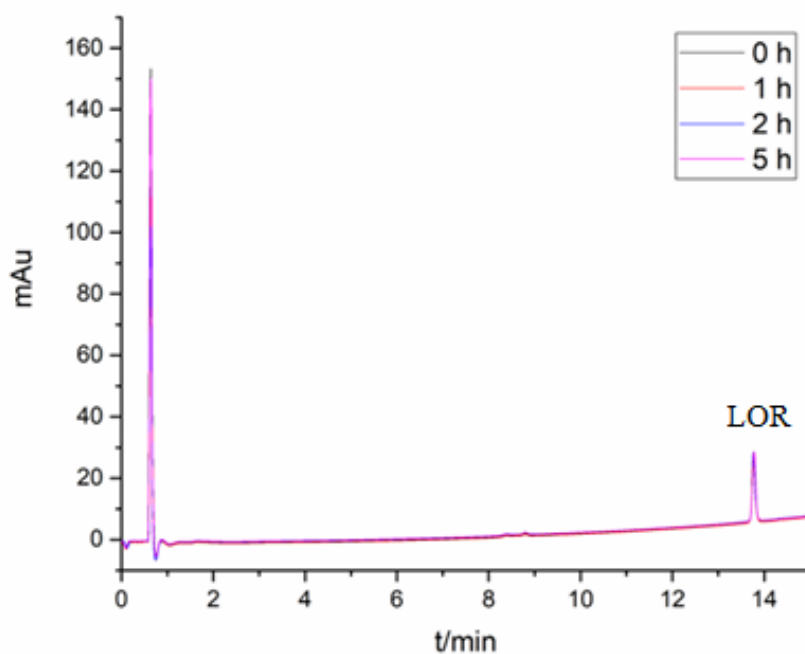
Uzorak	LOR	
	P	t_R / min
0h	290,7	13,90
1h (s.t.)	302,6	13,90
1h (80 °C)	295,8	13,91
2h (s.t.)	309,5	13,91
2h (80 °C)	263,5	13,91
5h (s.t.)	326,4	13,90
5h (80 °C)	216,9	13,90

s.t. = sobna temperatura

Tablica D4. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR i njegovih razgradnih produkata (DP) u uzorku LOR u oksidativnim uvjetima pri 333 nm

Uzorak	DP3		LOR		DP4		DP5	
	P	t_R / min	P	t_R / min	P	t_R / min	P	t_R / min
kontrola	-	-	13,14	13,86	-	-	-	-
0h	2,3	14,04	7,6	13,90	0,2	10,47	0,02	10,23
1h (s.t.)	2,3	14,04	8	13,90	0,19	10,48		
1h (80 °C)	2,3	14,04	7,8	13,91	0,24	10,47	0,012	10,25
2h (s.t.)	2,3	14,04	8	13,91	0,17	10,46		
2h (80 °C)	1,7	14,05	6	13,91	0,46	10,46	0,28	10,24
5h (s.t.)	2,3	14,04	8,8	13,90	0,16	10,49		
5h (80 °C)	0,57	14,04	5,6	13,90	0,65	10,46	0,52	10,24

s.t. = sobna temperatura



Slika D4. Kromatogram uzorka LOR/ β -CD pri kiselim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h na sobnoj temperaturi pri valnoj duljini od 275 nm

Tablica D5. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR u uzorku LOR/ β -CD u kiselom mediju pri 275 nm

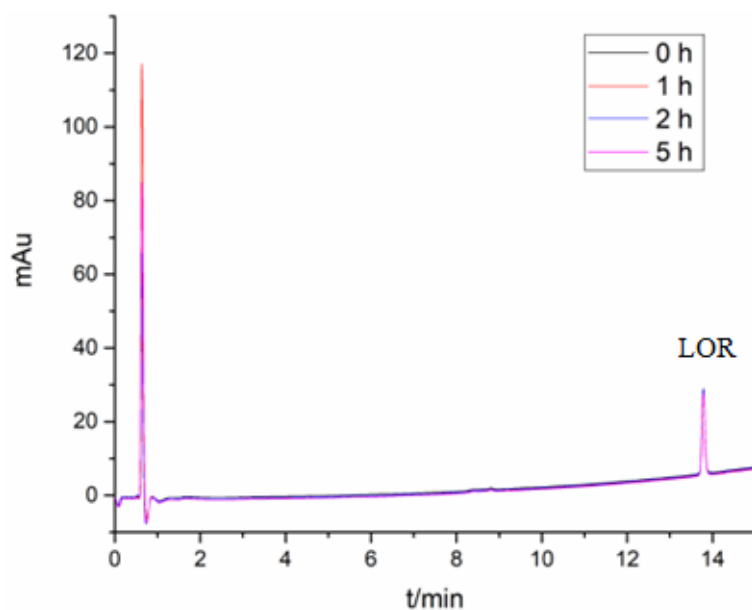
Uzorak	LOR/ β -CD	
	P	t_R / min
0h	107,4	13,77
1h (s.t.)	106,65	13,77
1h (80 °C)	110,34	13,77
2h (s.t.)	104,63	13,77
2h (80 °C)	104	13,77
5h (s.t.)	104	13,78
5h (80 °C)	109,1	13,78

s.t. = sobna temperatura

Tablica D6. Postotak razgradnje LOR u prisutnosti β -CD u kiselom mediju u odnosu na kontrolni uzorak pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije loratadina, 275 nm

1 mol L ⁻¹ HCl		
Uzorak	Površina ($\lambda=275$ nm)	Postotak razgradnje / %
Kontrola	94,5	–
0h	91,5	3,2
1h (s.t.)	91,4	3,3
1h (80 °C)	95,7	-1,3
2h (s.t.)	90,2	4,6
2h (80 °C)	90,9	3,8
5h (s.t.)	92,3	2,3
5h (80 °C)	94,4	0,1

s.t. = sobna temperatura



Slika D5. Kromatogram uzorka LOR/ β -CD nakon razgradnje u lužnom mediju u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h na sobnoj temperaturi i valnoj duljini od 275 nm

Tablica D7. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR i njegovih razgradnih produkata (DP) u uzorku LOR/ β -CD u lužnom mediju pri 275 nm

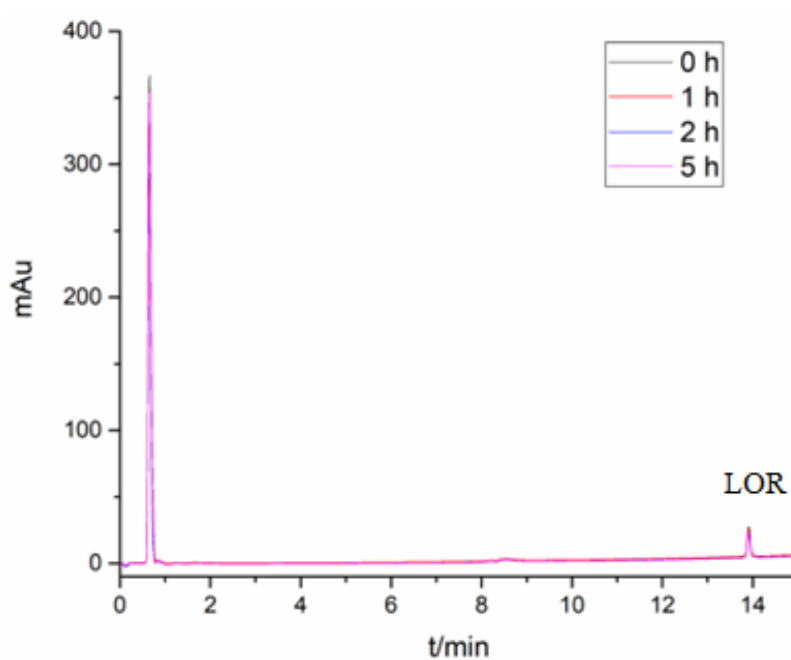
Uzorak	LOR		DP1	
	P	t_R / min	P	t_R / min
0h	108,5	13,78		
1h (s.t.)	108,3	13,78		
1h (80 °C)	84,9	13,78	13,1	9,19
2h (s.t.)	108,6	13,78		
2h (80 °C)	71,9	13,78	24,7	9,18
5h (s.t.)	103,6	13,78		
5h (80 °C)	31,7	13,78	50,8	9,17

s.t. = sobna temperatura

Tablica D8. Površina pikova (P) i vremena zadržavanja (t_R) LOR u uzorku LOR/ β -CD u oksidativnim uvjetima pri 275 nm

Uzorak	LOR/ β -CD	
	P	t_R / min
0h	94,1	13,91
1h (s.t.)	80,2	13,91
1h (80 °C)	93,2	13,90
2h (s.t.)	80,7	13,91
2h (80 °C)	72,3	13,91
5h (s.t.)	72,8	13,91
5h (80 °C)	67,4	13,90

s.t. = sobna temperatura



Slika D6. Kromatogram uzorka LOR/ β -CD pri oksidativnim uvjetima u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 2 h i 5 h na sobnoj temperaturi i valnoj duljini od 275 nm

Tablica D9. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom degradanta DP4 (m/z 399,1473) uz kolizijsku energiju od 10 V, 20 V i 30 V

10 V		20 V		30 V		Asignacija
m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	
399,1473	100	399,1467	14,82			$C_{22}H_{24}ClN_2O_3^+$
381,1367	79,77	381,1366	100	381,1361	35,02	$C_{22}H_{22}ClN_2O_2^+$
353,1052	12,5	353,1055	38,69	353,1051	59,38	$C_{20}H_{18}ClN_2O_2^+$
		335,0943	11,1	335,0945	24,56	$C_{20}H_{16}ClN_2O^+$
				309,115	25,5	$C_{19}H_{18}ClN_2^+$
		292,0889	19,07	292,0889	77,66	$C_{19}H_{15}ClN^+$
		280,0886	15,12	280,0891	100	$C_{18}H_{15}ClN^+$
				279,0808	33,45	$C_{18}H_{14}ClN^{+\bullet}$
				267,0806	13,08	$C_{17}H_{14}ClN^{+\bullet}$
				266,0728	16,5	$C_{17}H_{13}ClN^+$
				257,1199	37,86	$C_{19}H_{15}N^{+\bullet}$
		255,0809	23,58	255,0811	81,63	$C_{16}H_{14}ClN^{+\bullet}$
				254,073	20,66	$C_{16}H_{13}ClN^+$
				245,1197	34,59	$C_{18}H_{15}N^{+\bullet}$
				244,1119	34,05	$C_{15}H_{15}ClN^+$
				242,0732	39,16	$C_{15}H_{13}ClN^+$
				228,0573	11,29	$C_{14}H_{11}ClN^+$

Tablica D10. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom degradanta DP3 (m/z 399,1468) uz kolizijsku energiju od 10 V, 20 V i 30 V

10 V		20 V		30 V		Asignacija
m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	m/z	Rel. I	
399,1468	15,26	399,1468	52,67	399,1478	6,14	$C_{22}H_{24}ClN_2O_3^+$
381,1362	100	381,1363	100	381,1361	100	$C_{22}H_{22}ClN_2O_2^+$
		353,1047	11,39	353,1048	41,83	$C_{20}H_{18}ClN_2O_2^+$
				335,0942	16,23	$C_{20}H_{16}ClN_2O^+$
				310,0986	23,36	$C_{19}H_{19}ClN_2^+$
				309,1153	24,84	$C_{19}H_{18}ClN_2^+$
				292,0884	75,64	$C_{19}H_{15}ClN^+$
				282,1041	14,09	$C_{18}H_{17}ClN^+$
				280,0885	38,73	$C_{18}H_{15}ClN^+$
				279,0814	10,44	$C_{18}H_{14}ClN^+$
				267,0799	10,4	$C_{17}H_{14}ClN^+$
				257,1195	18,46	$C_{19}H_{15}N^+$
				256,0526	13,65	$C_{16}H_{15}ClN^+$
				229,0646	14,42	$C_{14}H_{12}ClN^+$
				228,0573	40,85	$C_{14}H_{11}ClN^+$

Tablica D11. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom degradanta DP5 (m/z 415,1420) uz kolizijsku energiju od 10 V, 20 V i 30 V

10 V		20 V		30 V		Asignacija
m/z	Rel int.	m/z	Rel int.	m/z	Rel int.	
415,1421	100	415,1420	85,32			$C_{22}H_{24}ClN_2O_4^+$
397,1306	13,05	397,1311	100	397,1311	23,67	$C_{22}H_{22}ClN_2O_3^+$
		385,1310	23,55	385,1318	10,6	$C_{21}H_{22}ClN_2O_3^+$
		369,1346	13,12			$C_{21}H_{22}ClN_2O_2^+$
		351,0893	33,1	351,0884	42,96	$C_{20}H_{16}ClN_2O_2^+$
				339,0882	17,12	$C_{19}H_{16}ClN_2O_2^+$
		323,0948	11,22	323,0945	25,55	$C_{19}H_{16}ClN_2O^+$
		308,0948	25,76	308,0831	100	$C_{19}H_{15}ClNO^+$
				296,0832	11,79	$C_{18}H_{14}ClNO^+$
		294,0679	10,58	294,0683	13,15	$C_{19}H_{17}ClN^+$
				280,0888	59,98	$C_{18}H_{15}ClN^+$
				267,0811	10,5	$C_{17}H_{14}ClN^{+\bullet}$
				266,0724		$C_{17}H_{13}ClN^+$
				253,0642	12,78	$C_{16}H_{12}ClN^+$
				245,1198	49,89	$C_{18}H_{15}N^{+\bullet}$
				229,0648	25,14	$C_{14}H_{12}ClN^{+\bullet}$
		228,0571	13,52	228,0569	66,01	$C_{14}H_{11}ClN^+$
				116,0706	15,47	$C_6H_9Cl^+$

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivana Prkić

Datum rođenja: 2. studenog 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

- | | |
|-----------|---|
| 2020-2022 | Diplomski sveučilišni studij Kemija, Smjer: Istraživački, Grane: Analitička i anorganska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |
| 2017-2020 | Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek |
| 2013-2017 | Gimnazija Vukovar, Vukovar |
| 2005-2013 | Osnovna škola Siniše Glavaševića, Vukovar |

Iskustvo

- | | |
|--------|--|
| 5/2022 | Stručna praksa u tvrtki Pliva d.o.o., Zagreb |
|--------|--|

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- | | |
|------|--|
| 2018 | Smotra Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku |
|------|--|