

# Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu razgradnih produkata lijeka Entakapon

---

Knežević, Ani

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:975926>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

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



**ANI KNEŽEVIĆ**

**RAZVOJ METODE TEKUĆINSKE  
KROMATOGRFIJE ULTRAVISOKE  
DJELOTVORNOSTI ZA ANALIZU RAZGRADNIH  
PRODUKATA LIJEKA ENTAKAPONA**

**Diplomski rad**

**Zagreb,**

**2017.**



**ANI KNEŽEVIĆ**

**RAZVOJ METODE TEKUĆINSKE  
KROMATOGRFIJE ULTRAVISOKE  
DJELOTVORNOSTI ZA ANALIZU RAZGRADNIH  
PRODUKATA LIJEKA ENTAKAPONA**

**Diplomski rad**

Predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistre kemije

**Zagreb,**

**2017.**



Ovaj diplomski rad izrađen je u Pliva Hrvatska d.o.o., pod vodstvom dr.sc. Mislava Runje, i na Zavodu za analitičku kemiju, Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Galić.

*Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Galić, na pomoći oko diplomskog rada, prihvaćanju mojih želja, stručnim savjetima i brzim odgovorima na sva moja pitanja. Hvala Vam na razumijevanju i strpljenju.*

*Hvala mome neposrednom voditelju dr. sc. Mislavu Runji, na iznimnoj pomoći i savjetima za pisanje ovog rada. Hvala na pruženoj prilici, svakom prijedlogu i uvažavanju mojih želja. Boljeg mentora nisam mogla poželjeti.*

*Hvala svima iz Analitike, koji su cijelo vrijeme bili tu za mene, i pomagali u mome eksperimentalnom radu.*

*Hvala mojim roditeljima, Mami i Tati što ste bili uvijek uz mene i prihvaćali sve moje odluke. Vjerovali ste u mene uvijek, čak i kad sama nisam.*

*Hvala cijeloj mojoj obitelji, bližoj i daljoj, a posebno baki i djedu, koji su uz mene od mog prvog dana. Hvala što ste me naučili cijeniti sitnice i kako uvijek biti prijatelj.*

*Hvala mojoj teti Moni, na svim savjetima tijekom odrastanja, hvala što si me naučila kako se boriti za sebe.*

*Hvala svim mojim prijateljima, na podršci, slušanju i razumijevanju.*

*Hvala svim kolegama, u Splitu i u Zagrebu, učinili ste da svaki ispit bude lakši, i da studentski dani uistinu postanu najljepša uspomena. Posebno hvala Anđeli, Anti i Ivani.*

*Hvala Maši, Igoru, Sanji, Dijani i cijelom timu Fizikalne karakterizacije na pruženoj prilici i motivaciji za daljnji rad.*

*Hvala Ivani, šefici, na svakom savjetu i bezuvjetnoj pomoći, pokazala je što znači biti pravi prijatelj.*

*Hvala Iliji, Martini, Katarini i Petru, vi ste moja istinska motivacija i doživotni prijatelji, hvala što se uvijek uz mene.*

# SADRŽAJ

Zahvala.....	III
Sažetak.....	V
Abstract.....	VI
1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	2
2.1. Entakapon.....	2
2.2. Parkinsonova bolest i liječenje.....	3
2.3. Tekućinska kromatografija.....	4
2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	5
2.3.2. Kromatografski parametri.....	7
2.4. Spektrometrija masa.....	9
2.4.1. Dijelovi spektrometra masa.....	9
2.5. Primjena UHPLC-TOF-MS-a u analizi farmaceutika.....	11
2.6. DryLab metoda.....	12
3. Eksperimentalni pregled.....	14
3.1. Opis polaznog materijala.....	14
3.2. Priprava otopina za UHPLC analizu.....	15
3.3. Priprava otopina za forsiranu razgradnju.....	16
3.4. Uvjeti mjerenja UHPLC analize.....	17
3.5. DryLab metoda.....	20
3.6. Uvjeti mjerenja 2D-LC- MS analize.....	21
4. Rezultati i rasprava.....	22
4.1. Rezultati UHPLC analize.....	22
4.2. Rezultati DryLab analize.....	24
4.3. Rezultati forsirane razgradnje.....	28
4.4. Rezultati 2D-LC-MS.....	30
4.5. Rasprava rezultata UHPLC analize.....	36
4.6. Rasprava rezultata dobivenih forsiranom razgradnjom i 2D-LC-MS.....	36
5. Zaključak.....	38
6. Literatura.....	39
7. Popis oznaka, kratica i simbola.....	42
8. Dodatak.....	VII
8.1. Rezultati UHPLC analize.....	VII
8.1.1. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 30 i tg 10.....	VII
8.1.2 Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 30 i tg 30.....	XII
8.1.3 Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 65 i tg 10.....	XVIII
8.1.4 Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 65 i tg 30.....	XXIII
8.1.5 Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2.....	XXIX
8.1.6 Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 42 i tg 23.....	XXXIV
8.1.7. MS/MS spektri razgradnih produkata ENT-a.....	XLIII
9. Životopis.....	XLVII

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

Diplomski rad

**Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu  
razgradnih produkata lijeka Entakapona**

*Ani Knežević*

Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

U ovom diplomskog radu razvijena je brza i učinkovita metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za analizu onečišćenja i razgradnih produkata lijeka entakapona. Razvijenom metodom uspješno su odijeljeni pikovi entakapona, onečišćenja i razgradnih produkata. Za određivanje optimalnih uvjeta kromatografskog odjeljivanja metodom UHPLC, temperature i sastava pokretne faze, korišten je program Drylab.

Vezani sustav LC-MS/MS također je korišten pri analizi razgradnih produkata. Na temelju nastalih fragmenata pretpostavljene su strukture razgradnih produkata. Također su na temelju MS/MS spektara određeni mogući načini fragmentacije razgradnih produkata lijeka entakapona.

Ključne riječi: Entakapon, MS/MS, onečišćenja, razgradni produkti, UHPLC metoda

(43+ XLVIII stranica, 109 slika, 14 tablica, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska.

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenjivači rada: prof. dr. sc. Nives Galić  
izv. prof. dr. sc. Ines Primožič  
izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen: 17. veljače 2017.

## ABSTRACT

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma thesis

### **Development of ultra performance liquid chromatographic method for the analysis of Entacapone degradation products**

*Ani Knežević*

Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science,  
University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

A quick and efficient method of high efficiency liquid chromatography (UHPLC) for analysis of contaminants and degradation products of the drug entacapone was developed through this diploma thesis. The developed methods had successfully separated peaks of entacapone from contaminants and degradation products. Drylab software was used to determine the optimal conditions of UHPLC chromatographic separation method, with variables being temperature and composition of the mobile phase.

LC-MS/MS coupled system was used in the analysis of the degradation products. Structure of the degradation products were assumed based on the resulting fragments. Additionally, possible modes of entacapone degradation products fragmentation were assessed by analyzing MS/MS spectra.

Keywords: Entacapone, contaminants, degradation products, MS/MS, UHPLC method

(43+ XLVIII pages, 109 figures, 14 schemes, 35 references, original language: croatian)

The work is deposited in the Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia.

Supervisor: Prof. Dr. Nives Galić,

Reviewers: Prof. Dr. Nives Galić,  
Dr. Ines Primožič, Associate professor  
Dr. Biserka Prugovečki, Associate professor

Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate professor

Thesis accepted: 17<sup>th</sup> February 2017

# **1. UVOD**

## 1. Uvod

U lijeku, osim djelatne tvari, mogu se nalaziti razna onečišćenja i razgradni produkti. Zakonska regulativa zahtjeva od farmaceutske industrije detaljno poznavanje onečišćenja prisutnih u djelatnoj tvari te u gotovom lijeku. Onečišćenja i razgradne tvari su neželjene komponente koje uz djelatnu tvar nastaju u procesu proizvodnje lijeka ili njegovom razgradnjom. Zbog njihove prisutnosti primjena i učinkovitost lijeka može biti smanjena, te mogu biti genotoksična, kancerogena i mutagena. Zbog toga je jako važno odrediti i identificirati prisutnost onečišćenja, kvantificirati ih i odrediti njihovu kemijsku strukturu. Razvojem moderne analitičke instrumentacije razvile su se selektivne i osjetljive metode koje specifično odgovaraju na zahtjeve farmaceutske regulative.<sup>1</sup>

Entakapon je organska molekula, koja inhibira enzim katehol-O-metiltransferazu i na taj način omogućuje prelazak levodope u mozak. Koristi se za liječenje Parkinsonove bolesti u kombinaciji s karbidopom i levodopom. Za određivanje i kvantificiranje entakapona i njegovih razgradnih produkata koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Može se koristiti sama ili spregnuta s masenom spektrometrijom.<sup>2,3</sup>

U ovom radu razvijena je metoda za određivanje entakapona i njegovih razgradnih produkata u farmaceutskoj otopini. Tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti uz masenu spektrometriju određeni su razgradni produkti nastali forsiranom razgradnjom entakapona u lužini, kiselini i vodikovom peroksidu, te u netretiranom uzorku. Računalni program DryLab računa matematičku funkciju svakog pika i predviđa njihov položaj u drugim uvjetima. Moguće je dobiti informacije o temperaturi kolone, pH-vrijednosti, vremenskom gradijentu i slično. Na taj način dobili su se podaci o temperaturi kolone i vremenskom gradijentu pri kojima je odvajanje pikova onečišćenja i razgradnih produkata entakapona bilo najbolje. Uz idealne uvjete uzeta je još jedna temperatura kao potvrda metode. Pri istim uvjetima snimljen je i 2D-LC-MS te MS/MS, na osnovu kojeg je dobiven spektar masa. Prema dobivenim masama pretpostavljene su moguće strukture razgradnih produkata nastalih forsiranom razgradnjom i njihova fragmentacija.

## **2. LITERATURNI PREGLED**

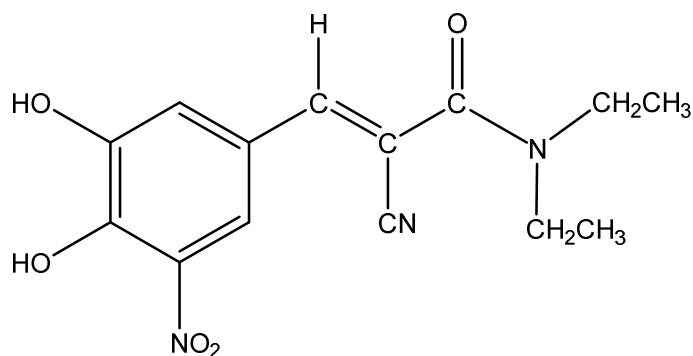


## 2.1. Entakapon

Entakapon je aktivna farmaceutska tvar koja se koristi u kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje Parkinsonove bolesti. U svojoj strukturi sadrži 14 atoma ugljika, a molekulska masa mu iznosi 305,29 Da (Slika 1).

Organska je molekula koja posjeduje inhibitorско djelovanje na enzim katehol-O-metiltransferazu (**COMT**), a klasificiran je kao selektivan i reverzibilan inhibitor. Navedeni enzim nalazi se u metaboličkom putu druge aktivne farmaceutske tvari, levodope (**LD**). Inhibirajući ovaj enzim, entakapon omogućuje prelazak **LD**-a u mozak. Entakapon se koristi samo u kombinaciji s **LD**-om, blokira njenu razgradnju prije ulaska u mozak i na taj način produžava djelovanje levodope.<sup>2,3</sup> To dovodi do povećanja bioraspoloživosti i koncentracije **LD**-a koja dostiže u mozak.

Entakapon inhibira enzim **COMT** pretežno u perifernim tkivima, a njegova aktivnost dokazana je kliničkim studijama. Na temelju tih istraživanja dopuštena je njegova upotreba u liječenju Parkinsonove bolesti. Entakapon reducira mogućnost razvoja motoričkih komplikacija. Ipak, ima ograničenu uporabu zbog utjecaja na jetru. Entakapon se veže na proteine plazme, uglavnom na albumin, te se brzo metabolizira.<sup>2,3,4</sup>



Slika 1. Struktura entakapona

## 2.2. Parkinsonova bolest i liječenje

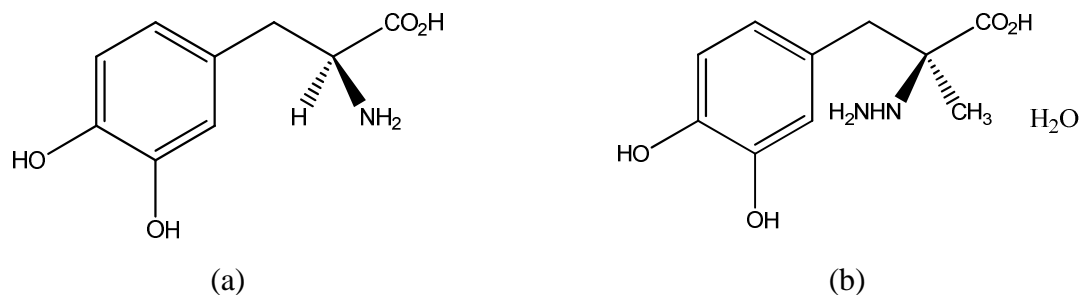
Parkinsonova bolest je kronični neurodegenerativni poremećaj. Simptomi karakteristični za ovaj poremećaj su problemi u motoričkom sustavu praćeni podrhtavanjem u stanju mirovanja, mišićna rigidnost, akinezija, bradikinezija te gubitak posturalnih refleksa. Prema ovim specifičnim simptomima moguće je razlikovati Parkinsonovu bolest od sličnih parkinsonizma. Parkinsonova bolest utječe na pokretljivost i kontrolu skeletnog mišićnog sustava. Drugi je najčešći progresivni poremećaj koji pogađa približno 1 do 2 % populacije u dobi iznad 50 godina. Uzrok ove bolesti je degeneracija neurona dopamina, što uzrokuje smanjenje razine dopamina u središnjem živčanom sustavu, a to dovodi do neravnoteže u motoričkom sustavu.

Liječenje Parkinsonove bolesti počinje s terapijom lijekova, uz kirurške zahvate i fizičko liječenje.<sup>2,3</sup> Terapija lijekovima za cilj ima povrat razine dopamina u mozak. Na taj način se poboljšava motorička kontrola, te smanjuju simptomi bolesti. Kao zamjena za dopamin, njegov prekursor **LD** je najučinkovitiji lijek za liječenje ove bolesti. Istraživanja su pokazala smanjenje simptoma u prvih 5 do 10 godina nakon početka terapije **LD**-om. Ipak, nakon određenoga vremena **LD** se ne može pohranjivati u završecima dopaminergičnih živaca. Također, teorijski je moguće da **LD** ima neurotoksična svojstva, budući da ima potencijal stvaranja slobodnih radikala kao i nekih drugih štetnih metabolita. Tako nastali radikali imaju sposobnost narušavanja preostalih dopaminergičnih neurona, te na taj način ubrzavaju razvoj Parkinsonove bolesti.

Iako je moguće da prijeđe krvno-moždanu granicu te tako dođe do središnjeg živčanog sustava, tek 1% **LD**-a to i uspije. To se događa zbog izrazito brzog metabolizma **LD**-a, koji ima dva enzimska puta. U jednom enzimskom putu sudjeluju enzim dopadekarboksilaza (**DDC**), a u drugom već spomenuti **COMT**. **COMT** prevodi **LD** u 3-O-metildopa, a **DDC** u vrstu dopamina koja ne može prijeći krvno-moždanu granicu.

Kako bi se poboljšala učinkovitost ovog lijeka, potrebni su inhibitori koji bi sprječavali metaboličku razgradnju **LD**-a. Tako je za **DDC** najčešći inhibitor karbidopa (**CD**), a za **COMT** entakapon. Kako bi se dobila dobra i učinkovita terapijska doza bilo je potrebno naći odgovarajuće kvantifikacijske omjere ova tri lijeka zajedno. **LD** se može odrediti sam ili zajedno s **CD**-om metodama elektrokemije, kapilarne elektroforeze ili tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detekciju masenom spektrometrijom (**HPLC-MS**).<sup>2,3,4,6</sup>

## 2. Literaturni pregled



Slika 2. Struktura:(a) levodopa, (b) karbidopa

Koktel lijekova korišten za liječenje Parkinsonove bolesti sastavljen od levodope, karbidope, entakapona i moguće još nekih drugi aktivnih farmaceutskih tvari (API-ja) zahtjevan je za analizu budući da svaka od ovih komponenti sa sobom nosi i određene nečistoće.<sup>7</sup>

### 2.3. Tekućinska kromatografija

Kromatografija je analitička metoda odjeljivanja sastojaka ispitivanog uzorka na temelju njihovih različitih putovanja kroz kromatografsku kolonu. Sustav u kojem se sastojci odjeljuju sastoji se od pokretne i nepokretne faze. Da bi se postiglo odjeljivanje, različiti sastojci smjese moraju imati različit afinitet prema nepokretnoj fazi. Tako će se molekule koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi čvršće na nju vezati te eluirati sporije s kromatografske kolone od molekula s manjim afinitetom prema nepokretnoj fazi.

Prema obliku kromatografske podloge, kromatografija se može podijeliti na kromatografiju na stupcu i plošnu kromatografiju. Prema fizičkom stanju pokretne faze, kromatografija se može podijeliti na tekućinsku kromatografiju (pokretna faza je tekućina), plinsku kromatografiju (pokretna faza je plin) i kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (pokretna faza je tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka).<sup>7</sup>

Tekućinska kromatografija može se podijeliti s obzirom na polarnost nepokretne faze na kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza sadrži polarnu nepokretnu fazu i nepolarnu pokretnu fazu, a kod kromatografije obrnutih faza pokretna faza je polarnija od nepokretne faze.

Prema mehanizmu odvajanja kromatografija se dijeli na adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem. (Tablica 1).<sup>8,9</sup>

## 2. Literaturni pregled

Tablica 1. Podjela tekućinske kromatografije s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze.

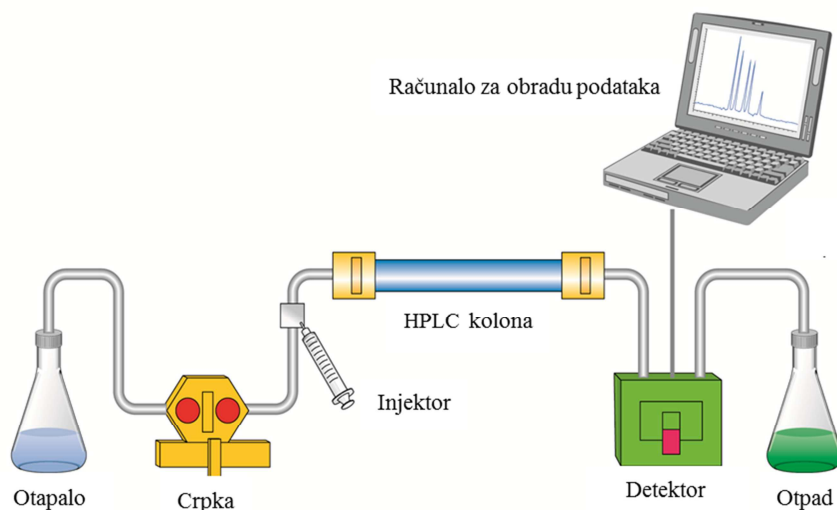
Vrsta tekućinske kromatografije	Princip odvajanja
Adsorpcijska kromatografija	Nepokretna faza je adsorbens, dok je pokretna faza tekućina ili plin
Razdjelna kromatografija	Nepokretna faza je tekućina nanešena na čvrsti inertni nosač
Afinitetna kromatografija	Nepokretna čvrsta faza sadrži na površini različite funkcijske skupine s definiranim prostornim rasporedom, te prilikom prolaska pokretne faze dolazi do specifičnih interakcija između analita u pokretnoj fazi i liganda iz nepokretne faze
Ionsko-izmjenjivačka kromatografija	Temelji se na različitom afinitetu sastojaka u smjesi prema ionskoj izmjeni
Kromatografija isključenjem	Nepokretna faza je materijal koji posjeduje pore točno definiranih dimenzija, sa slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima

Prilikom određivanja nečistoća i razgradnje farmaceutika, produkti koji pritom nastanu mogu biti jako polarni, te se mogu analizirati tehnikom tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC). U ovoj tehnici nepokretna faza je polarna, pokretna faza se sastoji od organskog otapala ili smjese organskih otapala.<sup>10</sup>

### 2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je vrsta kolonske tekućinske kromatografije. Razliku od obične tekućinske kromatografije čini primjena tlaka zbog kojeg pokretna faza brže prolazi kroz kolonu. Upravo zbog uporabe viših tlakova, ova metoda zahtjeva složeniju opremu (Slika 3).<sup>11,12</sup>

## 2. Literaturni pregled



Slika 3. Dijelovi HPLC kromatografa<sup>12</sup>

U sustavu mogu biti jedan ili više spremnika pokretne faze koji služe za skladištenje otapala iz kojega crpka kontinuirano vuče određeni volumen određenog otapala. Između spremnika i crpke su cjevčice kojima su one povezane. Crpka sadrži filter koji sprječava moguć unos čestica i onečišćenja u crpku. Konstantan protok pokretne faze u sustavu omogućava upravo crpku, koja radi pri jako visokim tlakovima. Postoje dvije vrste crpki: crpka s konstantnim tlakom i crpka s konstantnim protokom. Crpke s konstantnim protokom omogućavaju kontrolirano miješanje ukoliko se koristi kombinacija dva ili više otapala. Protok može biti izokratan (sastav pokretne faze je stalan) ili gradijentan (ukoliko se tijekom analiziranja mijenja sastav pokretne faze).

Automatski uzorkivač služi za automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu. Iz bočica za uzorke unosi se točno određeni volumen zadan programom. Kolona je najčešće uska metalna cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza. Dimenzije kolone, duljina i unutarnji promjeri, mogu biti različite. Duljina kolone može biti od 100 mm do 250 mm, a promjer kolone od 2 mm do 4,6 mm.<sup>13</sup> U koloni se nalaze materijali koji se sastoje od sitnih čestica, čime se povećava površina nepokretne faze. Analizirana tvar ili smjesa tvari prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom. U mobilnu fazu unosi se jako mali volumen uzorka, te se zbog specifičnih kemijskih interakcija, sastava pokretne i nepokretne faze i prirode analizirane tvari komponente smjese različito zadržavaju na koloni.

Na detektoru se mjere promjene svojstava analita ili pokretne faze. Najčešće se kao detektori koriste UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski detektor ili maseni spektrometar. Svaki detektor je specifičan i razlikuju se u radu jedan od drugog, ali svi daju

## 2. Literaturni pregled

signal koji je proporcionalan nekom određenom svojstvu analita. Računalom se upravlja HPLC sustavom, mogu se mijenjati i kontrolirati određeni parametri, a prikupljeni podaci mogu se dodatno obrađivati.<sup>13,14</sup>

### 2.3.2. Kromatografski parametri

Kromatogram je grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o vremenu ili volumenu. Položaj kromatografske krivulje ili pika koristi se za kvalitativnu, a visina odnosno površina pika za kvantitativnu analizu.<sup>9</sup>

Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) je karakteristično za pojedinu tvar, a predstavlja vrijeme u kojem se tvar eluira sa stupca. Vrijeme koje prođe od trenutka kad je tvar unesena u kolonu, ali se ne veže za nepokretnu fazu, te do trenutka njena određivanja je vrijeme zadržavanja nezadržane komponente ( $t_M$ ). Razlika između vremena zadržavanja i vremena zadržavanja nezadržavanog sastojka ( $t_R'$ ) zove se prilagođeno vrijeme zadržavanja. Širina pika može se mjeriti pri osnovici kromatografske krivulje  $w_b$  ili pri polovini visine  $w_h$ .<sup>8,9</sup>

Za uspješnu analizu vrlo je važno dobro razlučivanje susjednih pikova. Razlučivanje kromatografske kolone,  $R_s$  vrijednost, predstavlja omjer dvostruke razlike vremena zadržavanja između dvaju susjednih pikova i sumu njihovih širina pri osnovici (1). Što je ova vrijednost veća, to je bolje razlučivanje.

$$R_s = \frac{2\Delta t}{(w_1 + w_2)} \quad (1)$$

Na kromatografsko razlučivanje mogu utjecati faktori zadržavanja ( $k$ ), odjeljivanja ( $\alpha$ ) i broj teorijskih tavana ( $N$ ). Faktor zadržavanja predstavlja omjer vremena koje sastojak provede u nepokretnoj fazi i vremena koje provede u pokretnoj fazi (2). Na njega utječe polarost otapala. Odjeljivanje uzorka je dobro ukoliko je vrijednost faktora  $k$  između 1 i 20.<sup>8</sup>

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

Faktor odjeljivanja je omjer faktora zadržavanja dvaju sastojaka ispitivanog uzorka. Predstavlja mjeru relativnog zadržavanja odjeljivanih sastojaka. Na njega utječe priroda otapala, pH vrijednost pokretne faze te priroda nepokretne faze. Najvažniji je izbor nepokretne faze jer ona jako utječe na odjeljivanje sastojaka. Do odjeljivanja ne dolazi jedino u slučaju kada je  $\alpha = 1$ .<sup>8</sup>

## 2. Literaturni pregled

Prolazak uzorka kroz kolonu može dovesti do širenja vrpce, te na učinkovitost odjeljivanja. Prema klasičnoj teoriji, kolona se može podijeliti na određeni broj odsječaka koji imaju svoj visinu (engl. *Height equivalent to a theoretical plate*, HETP). Za odjeljivanje uzoraka potrebno je imati dovoljno odsječaka u kojima se uspostavlja ravnoteža razdiobe analita između nepokretne i pokretne faze. Manja visina odsječaka i veći broj teorijskih tavana ukazuju na bolje odjeljivanje sastojaka.<sup>8,9</sup> Broj teorijskih tavana određen je izrazom (3):

$$N = 16 \cdot \frac{t_R^2}{w} \quad (3)$$

Tijekom cijelog kromatografskog procesa sastojci smjese su u dinamičkoj ravnoteži između dviju faza, koja se narušava zbog gibanja pokretne faze. Zbog difundiranja molekula odjeljivanih sastojaka u pore kolonskoga punila dolazi do širenja vrpce, a koje se može smanjiti korištenjem čestica manjeg promjera, te po potrebi promjenom dimenzija kolone. Trenutno se najviše koriste kolone kojima je promjer čestica punila od 1,7 do 1,8  $\mu\text{m}$ .<sup>8</sup> Kako se smanjuje promjer čestica punila, smanjuje se i visina odsječaka u koloni, a sve to doprinosi boljem razlučivanju. Zbog korištenja jako malih čestica, potrebno je koristiti veće tlakove, te se stoga razvila tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC). U toj tehnici koriste se tlakovi između 1200 bara i 1400 bara čime se smanjuje vrijeme analize, te omogućuje bolje razlučivanje.

Za dobro odjeljivanje važan je i dobar izbor pogodnih otapala od kojih će se sastojati pokretna faza.<sup>13,15</sup> Prilikom izbora otapala bitna je polarnost otapala. Povećanjem polarnosti povećava se jakost otapala pri kromatografiji normalnih faza, dok se kod kromatografije obrnutih faza povećanjem polarnosti smanjuje.<sup>8,9</sup>

Kao pokretna faza najčešće se koristi voda u kombinaciji s još nekim organskim otapalom (najčešće metanol ili acetonitril). Još jedan bitan parametar je pH-vrijednost, koja se može podesiti dodatkom kiseline u pokretnu fazu. Da bi se postiglo dobro razlučivanje kromatografskih vrpce, pH-vrijednost pokretne faze treba biti dvije pH jedinice oko  $pK_a$  vrijednosti analita.<sup>16</sup>

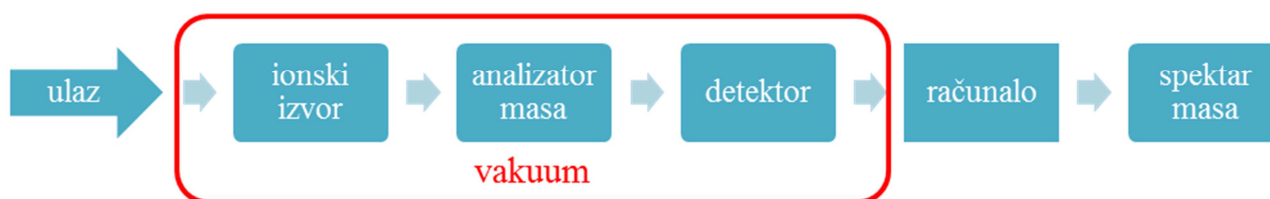
## 2.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (MS) je analitička instrumentna tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju omjera njihove mase i naboja. Između ostalog koristi se za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju malih farmaceutskih molekula i njihovih degradacijskih produkata i metabolita. Obzirom na osjetljivost tom metodom moguće je analizirati male volumene uzoraka (manje od 10  $\mu$ L).

Može se povezati s tekućinskom kromatografijom, kapilarnom zonskom elektroforezom i mikročipovima. Na ovaj način dobivaju su kontinuirane vezane tehnike (engl. *on-line*) u kojima se prilikom analize gubi malo uzorka, te su vremenski manje zahtjevne. Zbog metodoloških ograničenja mogu se koristiti i diskontinuirane metode (engl. *off-line*), a neke od njih su nanosprej-MS i MALDI-MS (engl. *Matrix assisted laser desorption/ionization*, MALDI). LC-MS/MS je spregnuti vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa koji omogućava analizu iona uz bolju fragmentaciju ili odvajanje. Prema dobivenim spektrima masa može se odrediti struktura analiziranog iona.<sup>17</sup>

### 2.4.1. Dijelovi spektrometra masa

Spektrometar masa sastoji se od tri dijela: ionskog izvora, analizatora masa i detektora (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz spektrometra masa

U ionskom izvoru dolazi do ionizacije molekula. Ovisno o količini energije koja se primjenjuje u procesu ionizacije i o svojstvima analita, molekule se mogu različito ionizirati.<sup>18</sup> Za ionizaciju molekula u plinovitom stanju koristi se ionizacija elektronima, kemijska ionizaciju i ionizacija u polju. Pri ionizaciji elektronima dolazi do sudara između molekula



## 2. Literaturni pregled

uzorka i elektrona pri čemu nastaje veliki broj fragmenata, te u spektru masa signal molekulskog iona može izostati. Za razliku od ionizacije elektronima, kemijska ionizacija koristi plin reagens za ionizaciju molekula uzorka. Prvo se ionizira plin reagens ionizacijom elektronima, koji zatim ionizira uzorak reakcijama kojim mogu nastati pozitivno i negativno nabijeni ioni. Pri kemijskoj ionizaciji u spektru masa jasno se vidi signal molekulskog iona. Ionizacija poljem koristi snagu električnog polja čime dolazi do izbijanja elektrona iz molekule uzorka. Tom metodom nastaju kationski radikali.

Tehnike koje se koriste za ionizaciju uzoraka u čvrstom stanju su MALDI ili maticom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, te ionizacija bombardiranjem sekundarnim ionima (engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS). U prvoj navedenoj metodi, MALDI, koristi se otopina malih organskih molekula (matrice). Laserom se osvijetli matrica s uzorkom, ali tek nakon što otapalo ispari. Energija lasera se apsorbira matricom, te time dolazi do desorpcije i ionizacije analita. Kod ionizacije SIMS nastaju ioni analita nakon bombardiranja površine uzorka snopom iona. Slična joj je metoda bombardiranjem brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB) u kojoj se uzorci otape u nehlapljivoj matrici, najčešće glicerolu.<sup>18,19</sup>

Za vezani sustav tekućinska kromatografija i spektrometrija masa (LC-MS) bitna je ionizacija uzorka direktno iz otopine. Koriste se tehnike pri atmosferskom tlaku poput termoraspršenja (engl. *thermospray*, TSP), elektroraspršenja (engl. *Electrospray ionization*, ESI), kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) i ionizacije fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure photoionization*, APPI). Ioni se uvode u analizator masa smješten u vakuumu kako bi nesmetano prošli od izvora do detektora. Bitno je da su otvori za prolaz iona dovoljno veliki zbog prolaska što većeg broja iona, ali ne previše zbog održavanja vakuuma u analizatoru masa.

Jedna od najvažnijih tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS je ionizacija elektroraspršenjem jer se može primijeniti na polarne, nepolarne i termički nestabilne spojeve. Na metalnu kapilaru kroz koju prolazi otopina s analitom primjenjuje se električno polje. Djelovanjem električnog polja dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Kapilara se može priključiti na pozitivan kraj izvora napona, pri čemu pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi gdje se akumuliraju.<sup>18</sup> Nedostatak ove tehnike je utjecaj matrice na ionizaciju analita. Sastojci matrice ili eluensa mogu utjecati na isparavanje otapala, što može izravno utjecati na prelazak analita u plinovito stanje.<sup>20</sup>

## 2. Literaturni pregled

Da ne bi došlo do prelaska analita u plinovito stanje, uzorak se najprije pročisti, razrijedi ili se poboljšava kromatografsko razlučivanje. Može se koristiti metoda umjeravanja gdje standardna otopina ne sadrži analit.<sup>21,22,23</sup>

Analizatori masa imaju svrhu razdvajanja nastalih iona u vakuumu na temelju njihovih omjera mase i naboja. Najvažniji su analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *time offlight*, TOF) i kvadrupolni analizator masa, a u posljednje vrijeme razvio se orbitalni analizator masa s ionskom klopkom. Analizator masa koji mjeri vrijeme leta razdvaja ione iste energije, ali različitih vrijednosti odnosa mase i naboja ( $m/z$ ) budući da putuju različitim brzinama. Početno ubrzanje za sve ione je isto, ali se počinju razdvajati kad u cijevi ne djeluje nikakvo električno polje. Ioni s većim omjerom mase i naboja ( $m/z$ ) putuju sporije od onih s manjim omjerom  $m/z$ . Masa se računa iz mjerenja vremena u kojem ioni dođu od izvora do detektora. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri elektrode, gdje su dvije suprotne pozitivno nabijene, a preostale dvije negativno nabijene. Na elektrode se primjenjuje kombinacija izmjeničnog i radiofrekventnog potencijala. Ioni s određenom vrijednošću  $m/z$  koji se gibaju stabilnom putanjom u oscilirajućem električnom polju, odvajaju se od ostalih i dolaze na detektor. Orbitalni analizator masa s ionskom klopkom je jedan od novijih analizatora masa. Koristi elektrostatsku klopku s Fourierovom transformacijom za odijeljivanje i detekciju iona. Kvadrupolni analizatori mogu se spojiti u seriju.

Detektor je zadnji dio masenog spektrometra. U njega ulaze ioni nakon što prođu kroz analizator i detektiraju se na osnovi mase, naboja ili brzine. Kako jako mali broj prođe kroz analizator, potrebno je pojačati signale koje daje detektor. Najpoznatiji detektori su Faradayev cilindar, fotografska ploča, te multiplikatori elektrona.<sup>17,24</sup>

### 2.5. Primjena UHPLC-TOF-MS-a u analizi farmaceutika

Pri analizi farmaceutika najveći problem u identifikaciji i kvantifikaciji predstavljaju njihove koncentracije u uzorcima koje mogu biti niske. Uz njih se u uzorcima nalaze i moguće nečistoće, te produkti razgradnje iz biotičkih procesa koji mogu utjecati na aktivnost tvari. Ukoliko dođe do razgradnje početne molekule farmaceutika, smanjuje se njena koncentracija. Dolazi do cijepanja početne molekule što rezultira promjenu u molekulskoj masi. Iz tih razloga važno je odrediti i okarakterizirati nečistoće i razgradne produkte.<sup>24</sup>

UHPLC-MS metoda se koristi za određivanje farmaceutika i njegovih onečišćenja i razgradnih produkata zbog brzine i efikasnosti odvajanja. Za razliku od standardnog HPLC-a,

## 2. Literaturni pregled

UHPLC posjeduje bolju optimizaciju pokretnih faza i selektivnost kolone. Uz to što se ovom tehnikom smanjuje promjer čestica s 5  $\mu\text{m}$  na 2  $\mu\text{m}$ , povećava se osjetljivost i rezolucija za 10 do 1000 puta. TOF maseni spektrometar može odrediti točnu masu molekule uz pogrešku manju od 2 mDa.<sup>25,26,27</sup>

Općenito utvrđivanje struktura, kako samih farmaceutika tako i njihovih razgradnih produkata se može jako dobro postići navedenom UHPLC-TOF-MS metodom. Dobro razvijenom UHPLC metodom, jasno se mogu odjeliti komponente koje se onda na spektrometru masa mogu detektirati. Detekcija se može postići fragmentacijom početnog iona i usporedbom s dobivenim fragmentnim ionima, te određivanjem točne mase koja zapravo daje molekulsku formu razgradnog produkta. Za analizu farmaceutika koristi se i dvodimenzijaska tekućinska kromatografija uz masenu spektrometriju (2D-LC-MS) koja je jako važna prilikom odvajanja kompleksnih uzoraka. Prednosti su kratka i brza separacija, te bolje detekcijske granice.<sup>28</sup>

### 2.6. DryLab metoda

Prilikom razvoja HPLC ili UHPLC metode koriste se različite kolone, vrste otapala, te dodaci pufera u pokretne faze. Potrebno je podešavati pH-vrijednost mobilne faze, što produžava vrijeme razvijanja efikasne metode. Kako bi se ubrzale analize, poboljšale efikasnosti, te dobilo više specifičnih podataka o metodama, razvili su se brojni softveri.<sup>29</sup> Jedan od njih je DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka)<sup>30</sup> koji se koristi od 1986. godine. To je računalni program koji se koristi za eksperimentalno modeliranje. Na temelju njega mogu se predvidjeti kromatografska ponašanja na jednoj nepokretnoj fazi, tako što su se prije toga definirali parametri poput načina eluiranja, pH-vrijednosti i protoka pokretne faze, temperature, trajanja eluiranja i ostalo. Ovaj program smanjuje vrijeme potrebno za optimizaciju metode u nekim rutinskim primjenama i pruža informacije o promjenama faktora (temperatura-T<sub>g</sub>, vremenski gradijent-t<sub>g</sub>, pH-vrijednost) prilikom kromatografskih analiza.

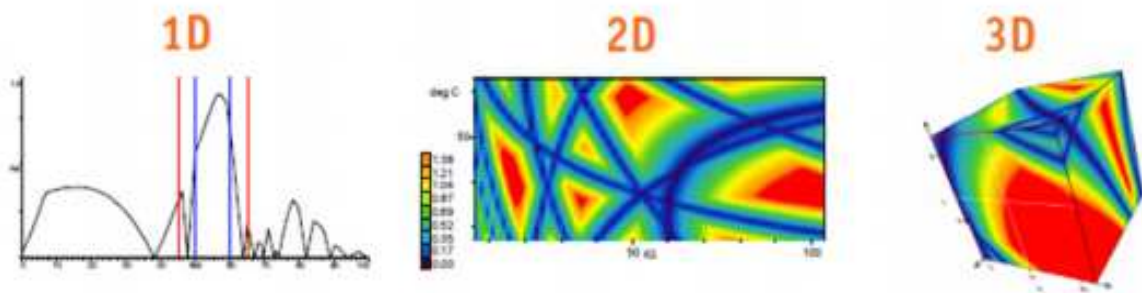
Mogu se vidjeti koje promjene utječu na kvalitetu metode. Proučavaju se retencijska vremena komponenti u uzorku i prate se promjene koje nastaju prilikom mijenjanja određenih parametara (temperature, pH-vrijednosti, vremenskog gradijenta).<sup>31,32</sup>

U program se unesu prethodno dobivena retencijska vremena i površine signala komponenti uzorka iz početnih eksperimenata UHPLC analize. Na osnovu prepoznavanja površine signala komponenti, softver automatski prepoznaje i prati pikove. Prepoznavanje

## 2. Literaturni pregled

pikova je dobro ukoliko je početni volumen uzorka bio konstantan tijekom analize. Ukoliko se primijeti promjena površine moguće je da u sustavu imamo preklapanje pikova. Na pogreške u programu mogu utjecati signali slične površine, veliki broj komponenti, te neke promjene u retencijskom vremenu.

Parametri koji se najčešće ugađaju u softveru su temperatura, vrijeme i pH-vrijednost pokretne faze. Rezultat mijenjanja navedenih parametara je trodimenzijski prikaz ovisnosti jednog parametra o druga dva. S obzirom na broj parametara koji se želi modificirati dobiju se grafički prikazi u funkciji jednog parametra, 1D (kritična vrijednost parametra na y-osi), dva parametra, 2D (kritična vrijednost parametra predstavljena površinom odgovarajuće boje na dvodimenzionalnu grafu), ili tri parametra, 3D, gdje se dobije kocka čija površina predstavlja kritičnu vrijednost parametra (Slika 5).



Slika 5. Grafički prikaz 1D, 2D i 3D kritičnih rezolucija<sup>33</sup>

Crvena boja predstavlja mjesta gdje je došlo do zadovoljavajućeg odvajanja, dok su plavom bojom označena mjesta gdje postoje neka preklapanja ili gdje se pojavljuju neki drugi problemi tijekom analize.<sup>32,33</sup>

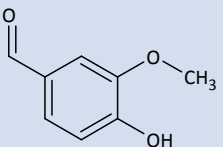
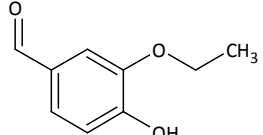
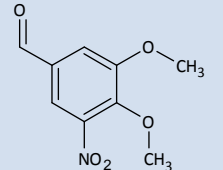
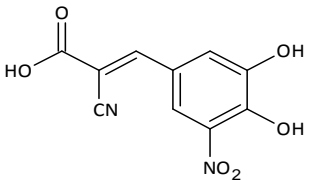
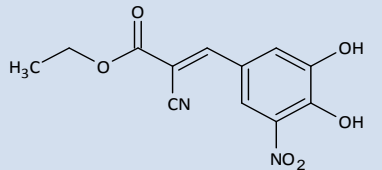
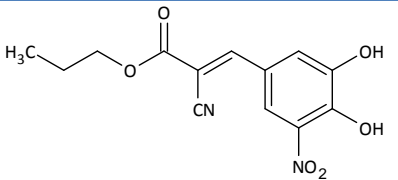
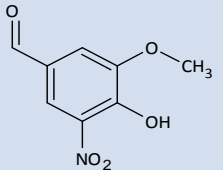
### **3. EKSPERIMENTALNI PREGLED**

### 3. Eksperimentalni pregled

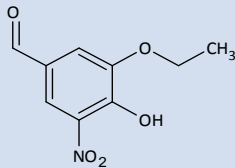
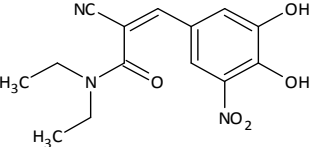
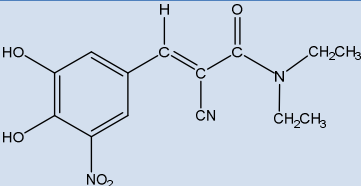
#### 3.1. Opis polaznog materijala

Polazni materijali su sintetizirani i dobiveni bez prethodnog pročišćavanja. Strukture entakapona i ostalih 9 onečišćenja nalaze se u tablici 2.

Tablica 2. Popis početnih uzoraka i njihove strukture

Oznaka uzorka	Kratica	Struktura	Proizvođač
vanilin	*		TAPI Pliva Hrvatska
etilvanilin	*		TAPI Pliva Hrvatska
VV/D16/18	*		TAPI Pliva Hrvatska
VV/D16/24	Eu.Ph. Imp F		TAPI Pliva Hrvatska
VV/D16/28	Eu.Ph. Imp B		TAPI Pliva Hrvatska
VV/D16/29	Eu.Ph. Imp I		TAPI Pliva Hrvatska
VV/D16/34	Eu.Ph. Imp G		TAPI Pliva Hrvatska

### 3. Eksperimentalni pregled

Oznaka uzorka	Kratica	Struktura	Proizvođač
VV/D16/35	*		TAPI Pliva Hrvatska
Entacapone Z-izomer	Eu.Ph. Imp A		TAPI Pliva Hrvatska
Entacapone	ENT		TAPI Pliva Hrvatska

\* nema podataka

### 3.2. Priprava otopina za UHPLC analizu

Za UHPLC analizu pripravljeno je 10 otopina. Prije pripreve otopina, pripremljen je pufer i diluent. Pripremljeno je 2 L 10 mmol L<sup>-1</sup> pufera, pH-vrijednosti 2,1. Odvagano je 2,7218 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i do oznake nadopunjeno MiliQ (engl. *Ultrapurewater*) vodom. pH-vrijednost se korigirala s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Pufer se koristio kao pokretna faza A, dok je pokretna faza B bio acetonitril (ACN). Popis korištenih kemikalija nalazi se u tablici 3.

Za pripravu diluenta u volumenu od 1 L koristio se ACN i MiliQ voda u omjeru 1:1. Pripremljene su otopine onečišćenja masene koncentracije 0,01 mg mL<sup>-1</sup>. Odvagano je po 1 mg svakog od 9 onečišćenja na analitičkoj vagi *MettlerToledo UMX2* i otopljeno u 5 mL diluenta. Za otapanje je bilo potrebno miješati na vorteks miješalici i koristiti ultrazvučnu kupelj. Za ENT odvagano je 25 mg i otopljeno u 25 mL diluenta. Ponovno se za otapanje koristila vorteks miješalica i ultrazvučna kupelj. Uzorci su zatim uzorkovani u vijale i postavljeni u UHPLC. Pripremljena je i otopina koja je sadržavala 25 mg ENT, te po 1 mL alikvota iz prethodno pripremljenih otopina onečišćenja, te do oznake je nadopunjeno diluentom. Tako pripremljena otopina je sadržavala 0,8 % svakog onečišćenja u odnosu na ENT.

### 3.3. Priprava otopina za forsiranu razgradnju

Za forsiranu razgradnju ENT koristio se 1 mol L<sup>-1</sup> HCl, 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH i 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pripravljena je otopina 1 mol L<sup>-1</sup> HCl iz koncentrirane otopine HCl. Otpipetiran je volumen od 8,3 mL i dodan u 100 mL vode.

Pripremljena je otopina NaOH koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup>. Odvagano je 4 g NaOH i otopljeno u 100 mL vode. Zatim su se pripremale otopine za reakcije forsirane razgradnje. U prvoj tikvici je otopljeno 25 mg ENT u 25 mL diluenta i ona je služila kao provjera.

U drugoj tikvici od 25 mL, odvagano je 25 mg ENT, dodano 3 mL diluenta i 1 mL prethodno pripremljene otopine HCl koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup>. Tikvica se ostavila 4 sata na sobnoj temperaturi za odvijanje reakcije. Nakon 4 sata dodan je 1 mL NaOH koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup> i do oznake nadopunjeno s diluentom. U trećoj tikvici od 25 mL odvagano je 25 mg ENT, dodano 3 mL diluenta i NaOH koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup>, te ostavljeno na sobnoj temperaturi 4 sata. Nakon toga dodan je 1 mL HCl koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup> i tikvica se nadopunila diluentom do oznake.

U četvrtoj tikvici od 25 mL odvagano je 25 mg ENT, dodano 3 mL diluenta i 1 mL 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ostavljeno je na sobnoj temperaturi na 4 sata zbog odvijanja reakcije i nakon toga je dodan diluent do oznake na tikvici. Sve pripremljen otopine su zatim postavljene na UHPLC, te su kasnije korištene za 2D-LC-MS analizu.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Proizvođač	CAS broj*	Rok valjanosti
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Sigma	101031156	**
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	J. T. Baker	7664-38-2	2017-12
<b>ACN (UHPLC)</b>	J. T. Baker	75-05-8	2018-11
<b>HCl</b>	Kemika	7647-01-0	**
<b>NaOH</b>	Kemika	1310-73-2	2020-11
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%</b>	Merck	46424798 512	2018-02

\*CAS broj – jedinstveni identifikacijski broj kemijske tvari

\*\*nema podataka



### 3. Eksperimentalni pregled

#### 3.4. Uvjeti mjerenja UHPLC analize

Prethodno pripravljeni uzorci su uzorkovani u vijale i postavljeni na UHPLC instrument, *Agilent UHPLC 1290 Infinity* s binarnom pumpom i s detektorom s nizom dioda (DAD). Parametri mjerenja i instrumenta navedeni su u tablicama od 4 do 9.

Tablica 4. Parametri prvog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity CSH C18; 100•2,1 mm; 1,7 µm</b>		
<b>Pufer</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1		
<b>Eluens A</b>	pufer		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90	10
	10	10	90
	12	10	90
	12,01	70	30
	15	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 µL		
<b>Protok</b>	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	210 (nm)		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

### 3. Eksperimentalni pregled

Tablica 5. Parametri drugog eksperimenta za UHPLC

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity CSH C18; 100•2,1 mm; 1,7 µm		
Pufer	10 mmol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1		
Eluens A	pufer		
Eluens B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90	10
	30	10	90
	32	10	90
	32,01	70	30
	35	70	30
Vrijeme stabilizacije	3 min		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Detektor	210 (nm)		
Temperatura kolone	30 °C		

Tablica 6. Parametri trećeg eksperimenta za UHPLC

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity CSH C18; 100•2,1 mm; 1,7 µm		
Pufer	10 mmol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1		
Eluens A	pufer		
Eluens B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90	10
	10	10	90
	12	10	90
	12,01	70	30
	15	70	30
Vrijeme stabilizacije	3 min		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Detektor	210 (nm)		
Temperatura kolone	65 °C		

### 3. Eksperimentalni pregled

Tablica 7. Parametri četvrtog eksperimenta za UHPLC

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity CSH C18; 100·2,1 mm; 1,7 µm		
Pufer	10 mmol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1		
Eluens A	pufer		
Eluens B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90	10
	15	70	30
	30	10	90
	32	10	90
	32,01	70	30
	35	70	30
Vrijeme stabilizacije	3 min		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Detektor	210 (nm)		
Temperatura kolone	65 °C		

Tablica 8. Parametri petog eksperimenta za UHPLC

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity CSH C18; 100·2,1 mm; 1,7 µm		
Pufer	10 mmol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1		
Eluens A	pufer		
Eluens B	ACN		
Gradijent	Vrijeme/min	% eluens A	% eluens B
	0,00	95	15
	23	10	90
	23,01	95	5
	25	95	5
Vrijeme stabilizacije	2 min		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Detektor	210 (nm)		
Temperatura kolone	42 °C		

### 3. Eksperimentalni pregled

Tablica 9. Parametri šestog eksperimenta za UHPLC

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity CSH C18; 100•2,1 mm; 1,7 µm		
Pufer	10 mmol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1		
Eluens A	pufer		
Eluens B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	83	17
	8,2	40	60
	10	40	60
	10,01	83	17
13	83	17	
Vrijeme stabilizacije	3 min		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Detektor	210 (nm)		
Temperatura kolone	45 °C		

### 3.5. DryLab metoda

Za DryLab metodu koristili su se uvjeti postavljeni na UHPLC-u. Temperature kolone 30 °C i 65 °C, a vrijeme trajanja je iznosilo 30 i 10 minuta. Protok pokretne faze iznosio je 0,4 mL min<sup>-1</sup>, a volumen zadržavanja 0,5 mL. Analizom rezultata DryLab metode dobiveni su parametri s kojima se ponovilo snimanje UHPLC-a. Temperatura kolone iznosila je 45 °C s vremenom trajanja 8,2 minute. Kao provjera uzeti su sljedeći uvjeti, temperatura kolone 42 °C s vremenskim gradijentom 23 minute. Zatim je provedena 2D-LC-MS analiza, a rezultati su prikazani u poglavlju 4. Postavljeni parametri nalaze se u tablici 10.

Tablica 10. Parametri kolone i instrumenta

DULJINA (cm)	10
UNUTARNJI PROMJER (cm)	0,21
VELIČINA ČESTICA (µm)	1,7
BRZINA PROTOKA (mL min <sup>-1</sup> )	0,4
VOLUMEN INJEKTIRANJA (µL)	10
VOLUMEN ZADRŽAVANJA (mL)	0,50
VALNA DULJINA (nm)	254

### 3.6. Uvjeti mjerenja 2D-LC-MS analize

Za snimanje 2D-LC-MS-a korišten je *Agilent UHPLC 1290 Infinity* s binarnom pumpom i kolonom *ZORBAX BONUS RP 2,1-50 mm, 1,8 μm*, uz detektor s nizom dioda (DAD) i *Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOFLC-MS*. Pokretna faza B je ACN posebno pripremljen za ovu metodu. Pokretna faza A bila je lako hlapivi pufer koji je pogodan za ionizaciju u MS-u, 10 mmol L<sup>-1</sup> amonijev formijat koji je već bio pripremljen. U tablici 11. se nalaze podaci o korištenim kemikalijama. Postavljeni su uvjeti dobiveni iz DryLab analize. Temperatura kolone iznosila je 45 °C, a vrijeme mjerenja 8,2 minute. Ukupno vrijeme analize iznosilo je 13 minuta. Protok je postavljen na 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Postavljeno je pet uzoraka, slijepa proba koja sadržava samo diluent (ACN:H<sub>2</sub>O), te ostale 4 otopine prethodno pripremljene za forsiranu razgradnju. Snimljeni spektri su uspoređeni sa spektrom diluenta. Pikovi koji se ne pojavljuju u diluentu su izdvojeni, a njihova masa i retencijsko vrijeme zabilježeno.

Na ionima s odabranim omjerima m/z provedeni su MS/MS eksperimenti. Provela se razgradnja pri različitim energijama sudara (10, 20 i 30 eV). Dobiveni rezultati nalaze se u poglavlju Rezultati 4.3.

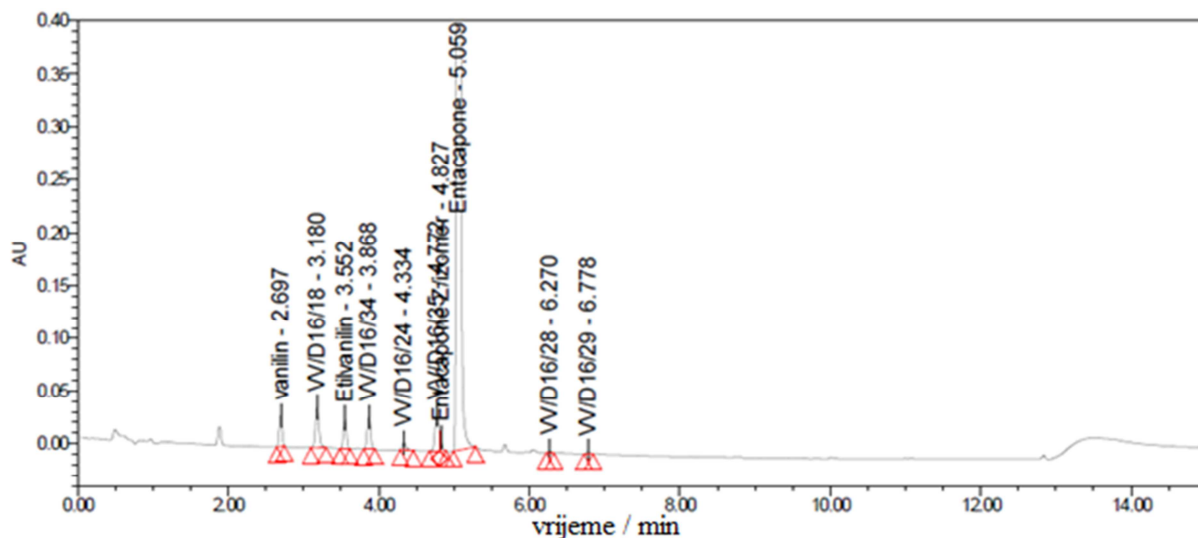
Tablica 11. Popis kemikalija korištenih za 2D-LC-MS analizu

Naziv	Proizvođač	CAS broj	Rok valjanosti
ACN (ULC/MS-CC/SFC)	Bisolve B.V.	75-05-8	2018-11
NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub>	Bisolve B.V.	540-69-2	2018-08
HCOOH 99% (ULC/MS-CC/SFC)	Bisolve B.V.	64-18-6	2018-02

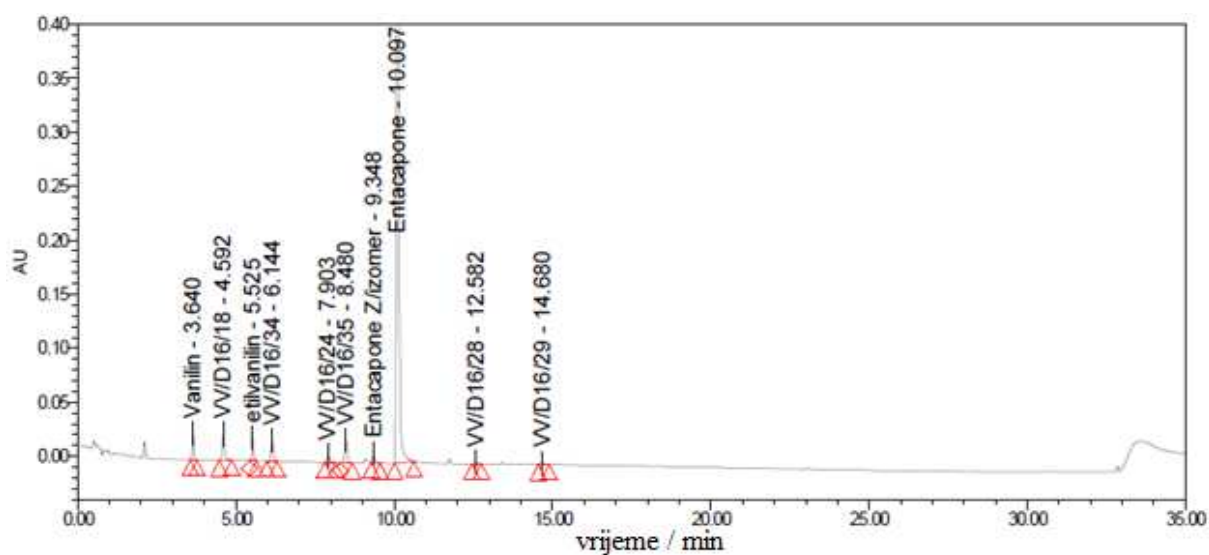
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### 4.1. Rezultati UHPLC analize

Za odvajanje dobivenih onečišćenja koristili su se najčešći parametri za kolonu i vrijeme trajanja analize. Provela su se četiri eksperimenta, gdje se mijenjala temperatura kolone i vrijeme trajanja analize. Na slikama od 6 do 9 prikazani su kromatogrami gdje su u uzorku otopine nalaze svih 9 onečišćenja zajedno s ENT. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka prikazani su u poglavlju 8. Dobiveni rezultati su iskorišteni za postavljanje 2D modela u DryLab softveru.

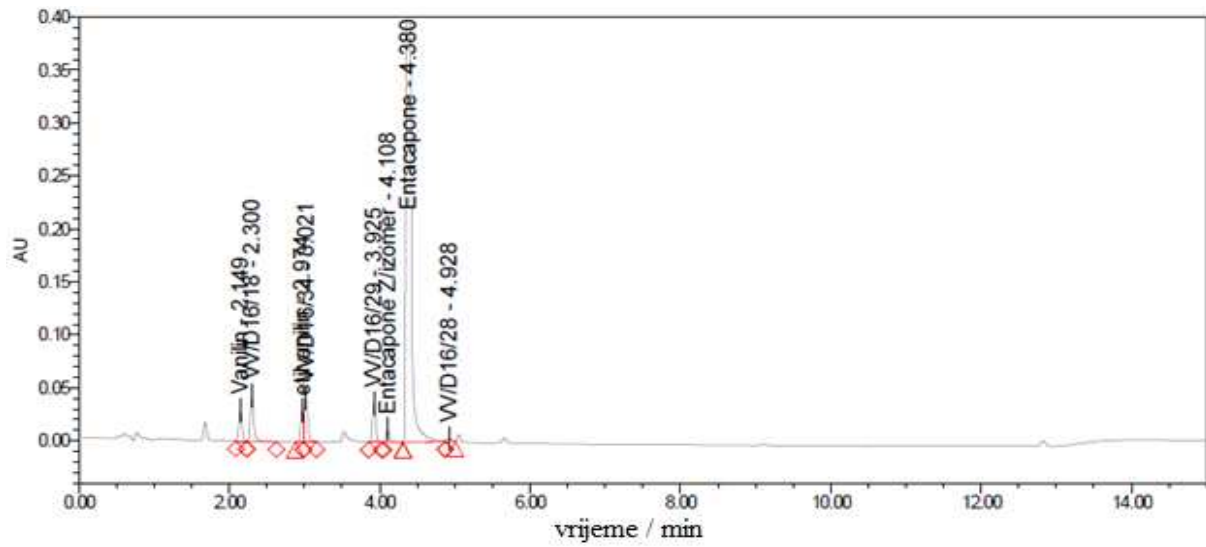


Slika 7. Kromatogram ENT i devet onečišćenja pri uvjetima Tg 30 i tg 10

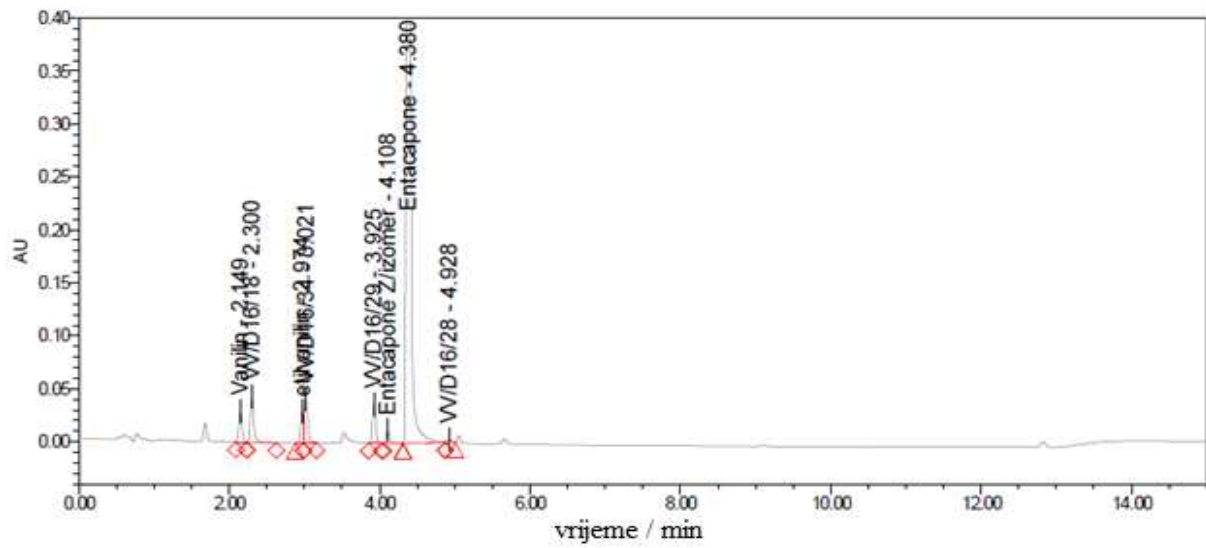


Slika 8. Kromatogram ENT i devet onečišćenja pri uvjetima Tg 30 i tg 30

#### 4. Rezultati i rasprava



Slika 9. Kromatogram ENT i devet onečišćenja pri uvjetima Tg 65 i tg 10



Slika 10. Kromatogram ENT i devet onečišćenja pri uvjetima Tg 65 i tg 30

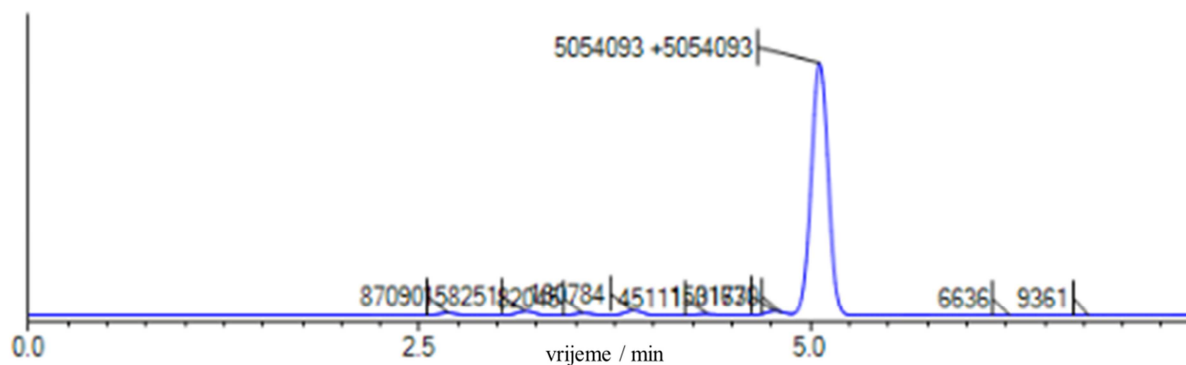


## 4.2. Rezultati DryLab analize

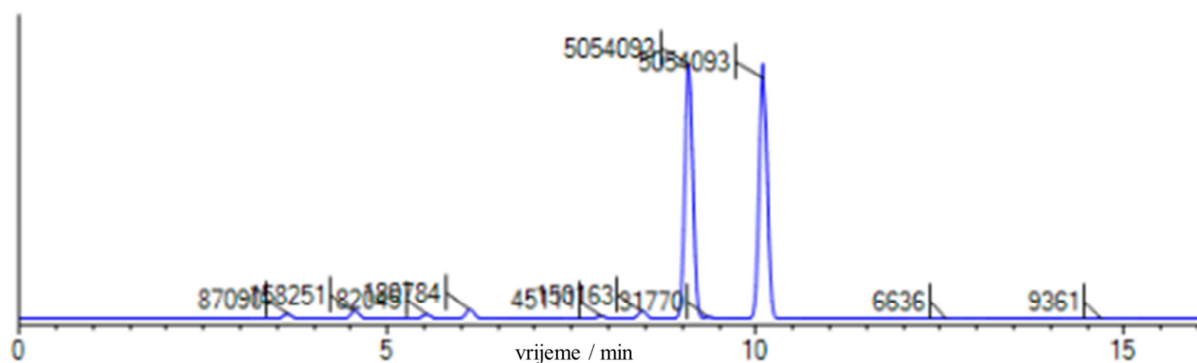
Rezultati dobiveni UHPLC analizom su korišteni za postavljanje DryLab analize. Dobiven je 2D graf iz kojeg proizlaze optimalni teorijski uvjeti za najbolje razdvajanje s obzirom na vrijeme eksperimenta i temperaturu kolone. Uvjeti provedena četiri eksperimenta nalaze se u tablici 12, a dobiveni rezultati na slikama od 11 do 14.

Tablica 12. Uvjeti četiri eksperimenta (temperatura i gradijent)

	tG <sub>1</sub> min	tG <sub>2</sub> min
tG	10	30
	T <sub>1</sub> (C°)	T <sub>2</sub> (C°)
T	30	65

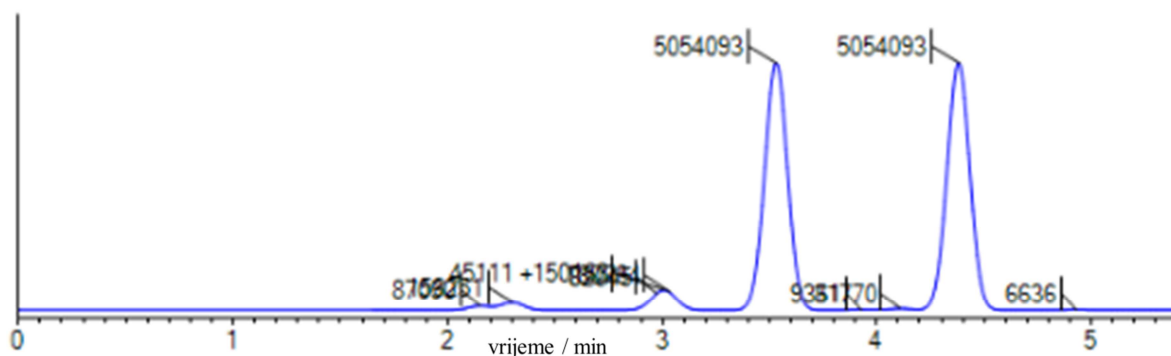


Slika 11. Kromatogram prvog eksperimenta za DryLab (Tg 30 i tg 10)

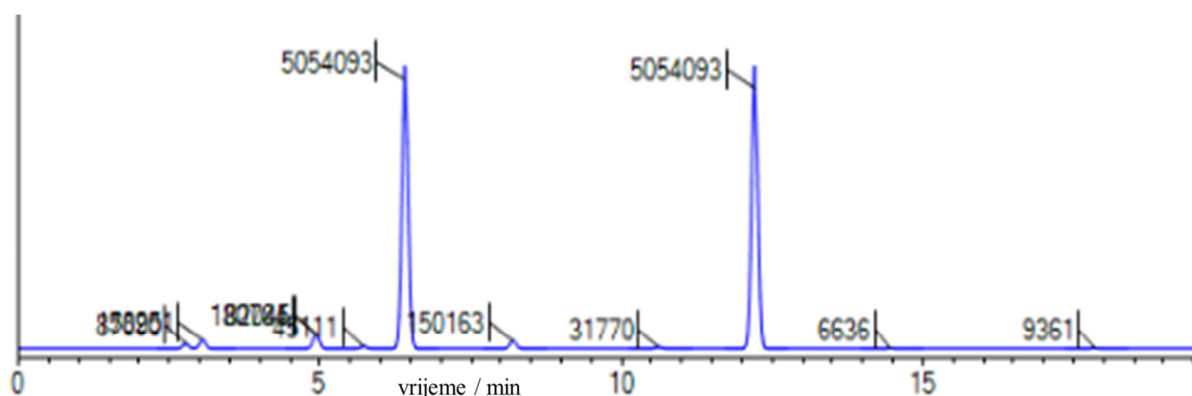


Slika 12. Kromatogram drugog eksperimenta za DryLab (Tg 30 i tg 30)

#### 4. Rezultati i rasprava



Slika 13. Kromatogram trećeg eksperimenta za DryLab (Tg 65 i tg 10)

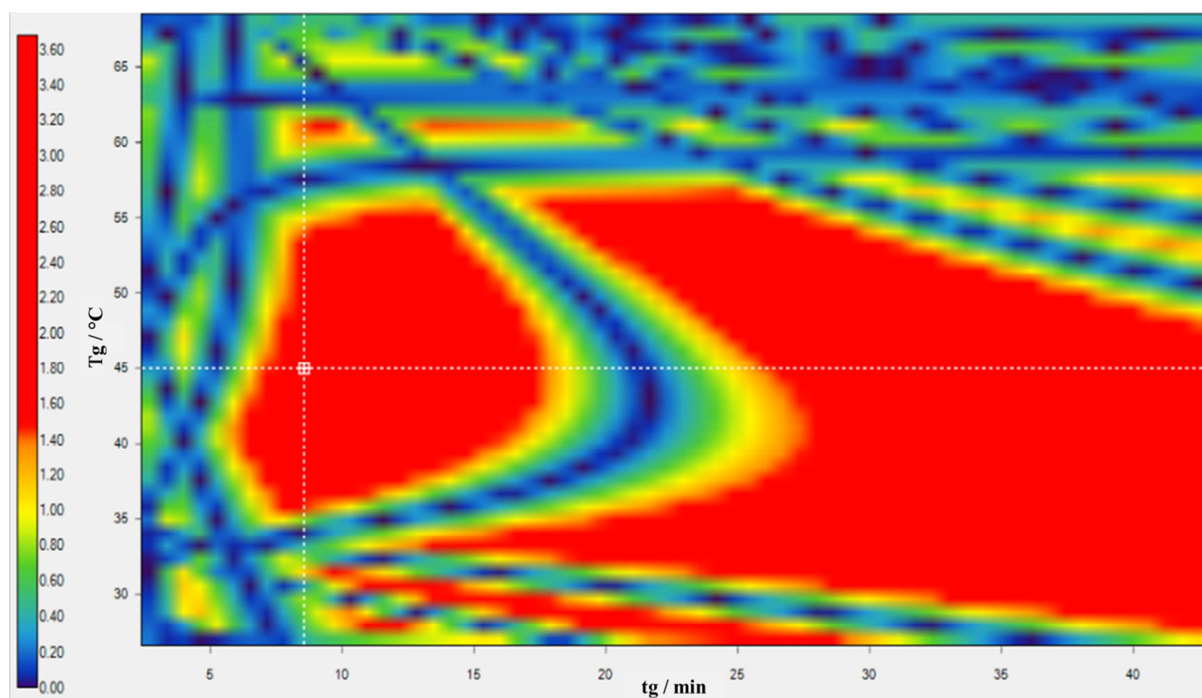


Slika 14. Kromatogram četvrtog eksperimenta za DryLab (Tg 65 i tg 30)

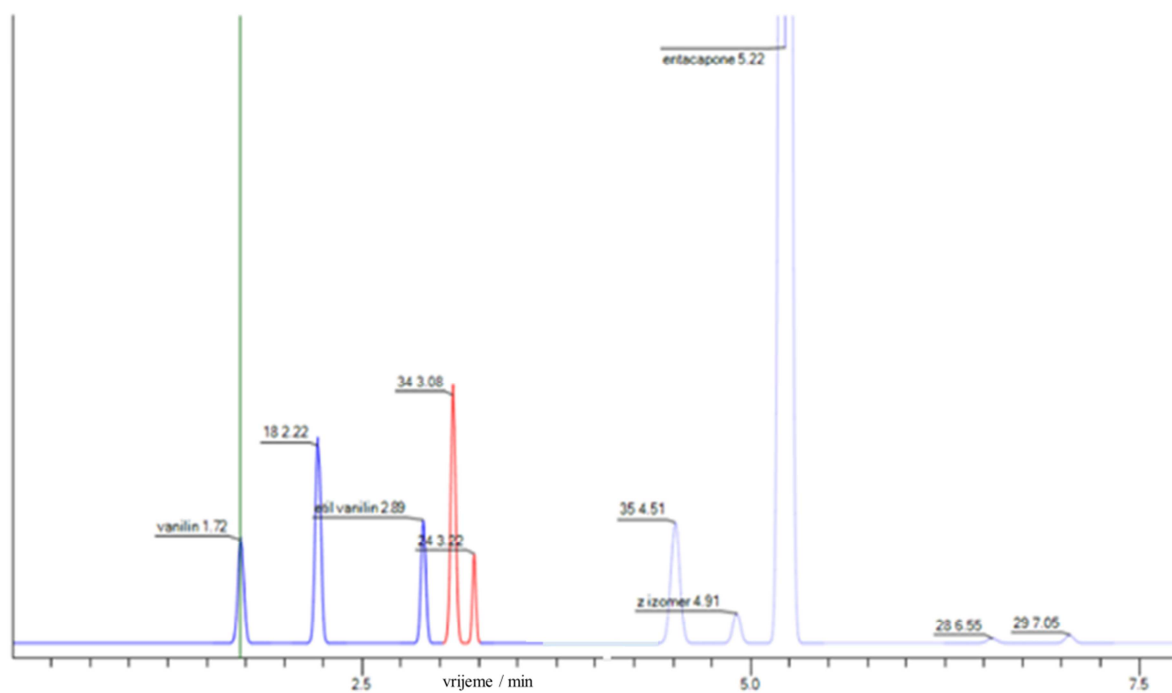
Podaci su uneseni u program na temelju kojih se dobio grafički prikaz s temperaturom i gradijentom u kojima bi odvajanje bilo najbolje. Prema rezultatima DryLab-a (Slika 15.) snimljen je još jedan kromatogram s istim parametrima kolone kao i u prvom eksperimentu. Temperatura kolone iznosila je 45 °C, a vremenski gradijent 8,2 minute. Dobiveni (idealni) kromatogram u DryLabu prikazan je na slici 16., a eksperimentalni na slici 17.

Osim ovih uvjeta, uzorci su snimljeni na temperaturi kolone 42 °C s vremenskim gradijentom 23 minute. Ovi uvjeti su postavljeni kao provjera za prve postavljene uvjete, a kromatogrami su prikazani u poglavlju 8.

#### 4. Rezultati i rasprava

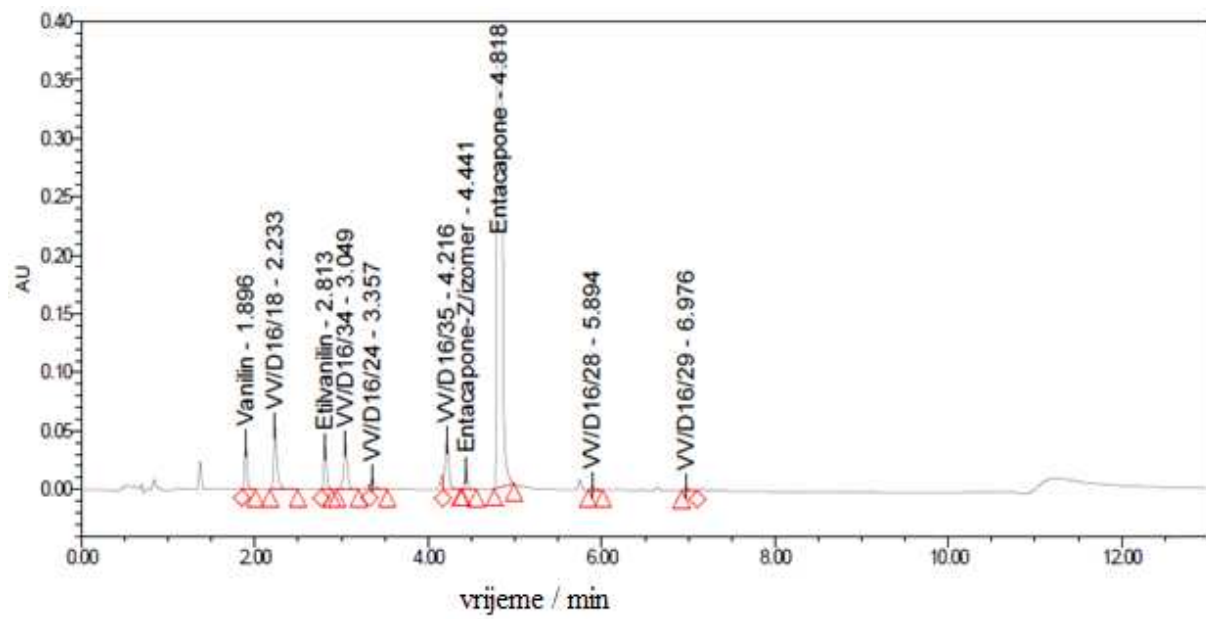


Slika 15. Grafički prikaz rezultata dobivenog DryLab metodom



Slika 16. Kromatogram dobiven DryLab metodom pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

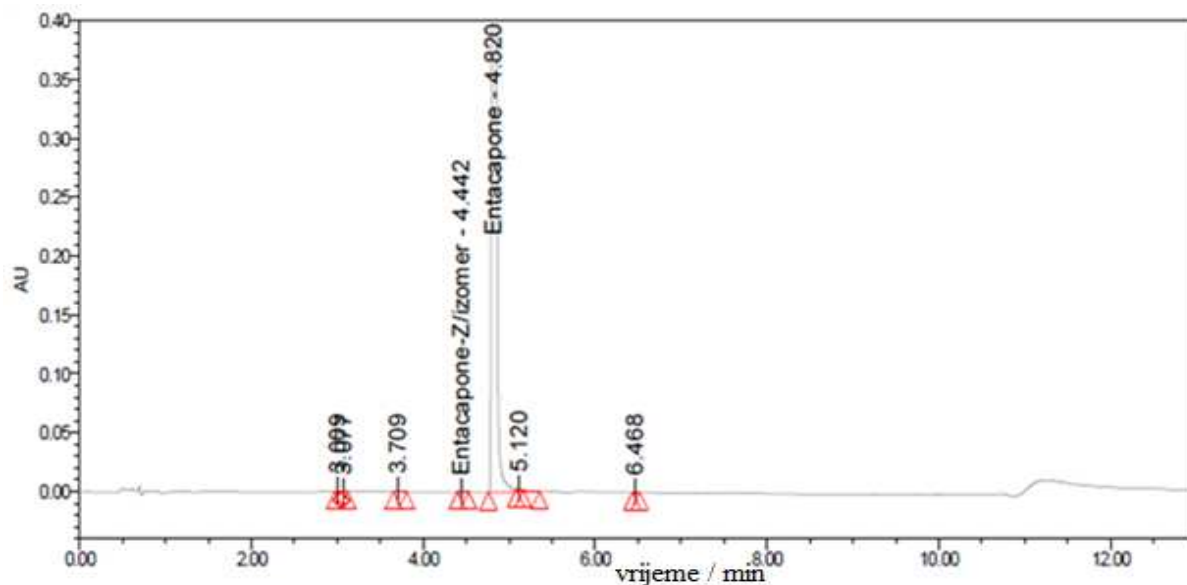
#### 4. Rezultati i rasprava



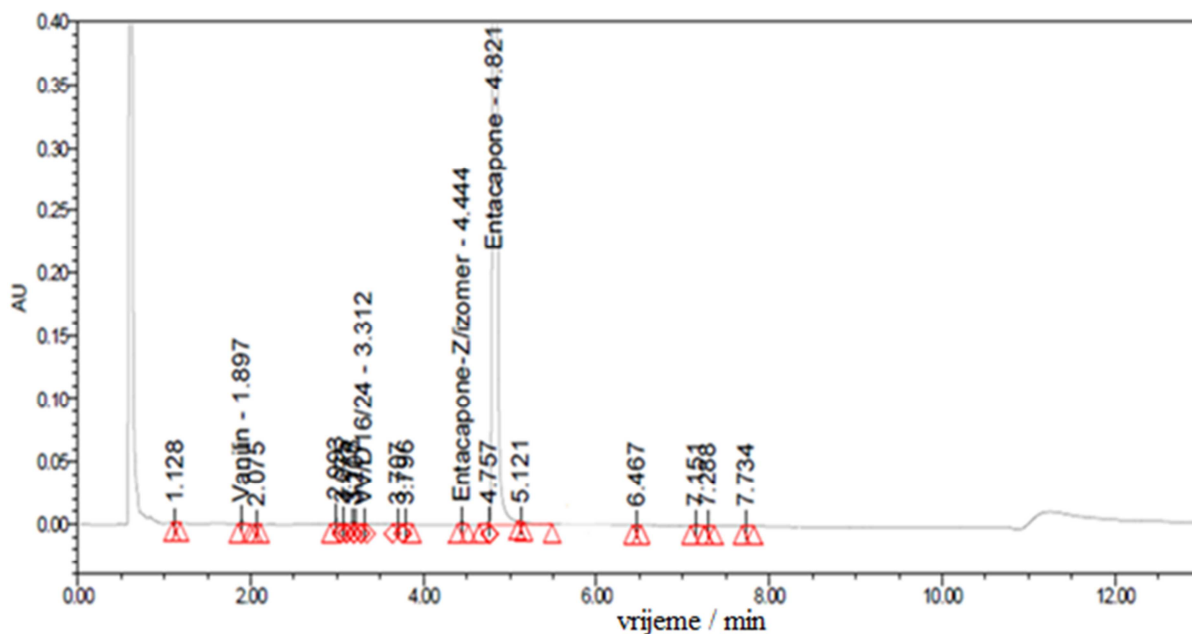
Slika 17. Kromatogram ENT i devet razgradnih produkata pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

### 4.3. Rezultati forsirane razgradnje

Za forsiranu razgradnju uzorci su ispitani na istim uvjetima dobivenim DryLab metodom za UHPLC analizu. Forsirana razgradnja provedena je na sobnoj temperaturi u trajanju od 4 sata, u otopinama 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup>, NaOH koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup> i jedna bez dodataka. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka nalaze se u poglavlju 8.

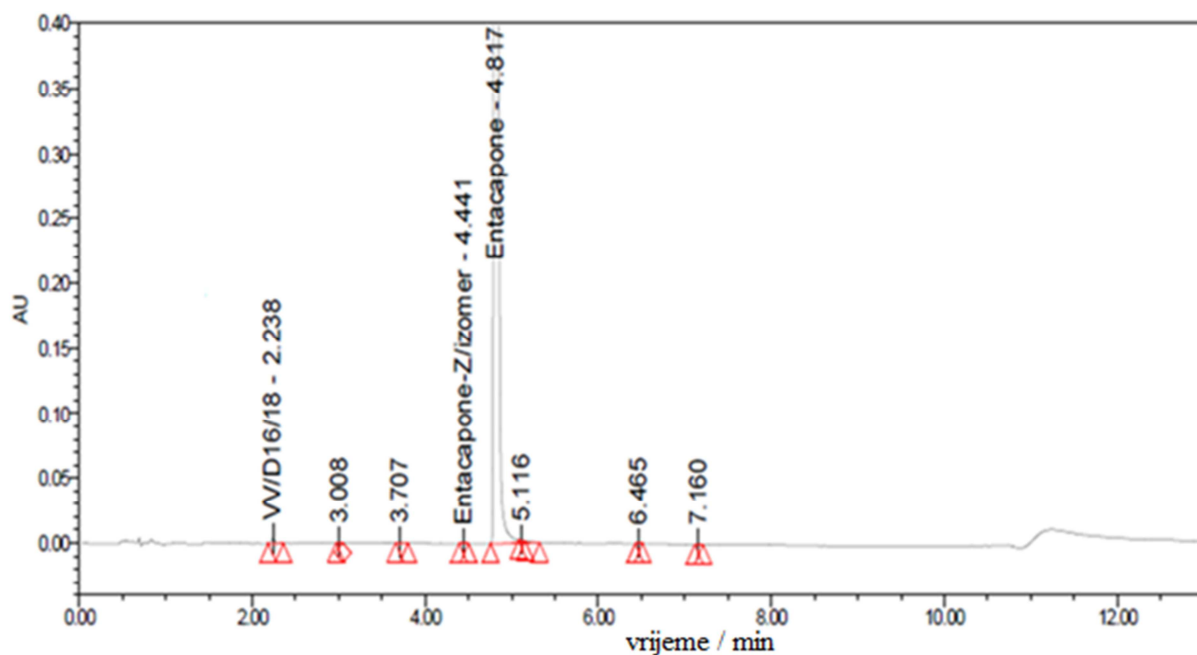


Slika 18. Kromatogram forsirane razgradnje ENT pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2 (4h, RT)

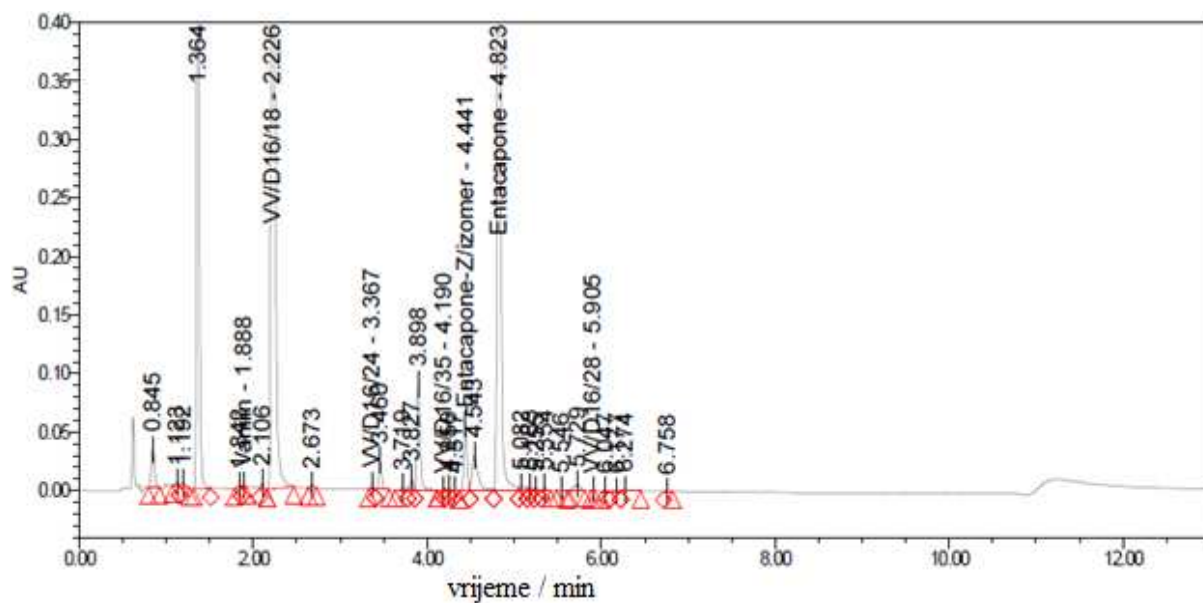


Slika 19. Kromatogram forsirane razgradnje ENT u 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2 (4h, RT)

#### 4. Rezultati i rasprava



Slika 20. Kromatogram forsirane razgradnje ENT u 1 mol L<sup>-1</sup> HCl pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2 (4h, RT)



Slika 21. Kromatogram forsirane razgradnje ENT u 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2 (4h, RT)

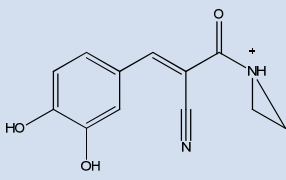
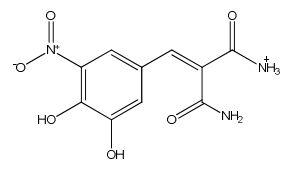
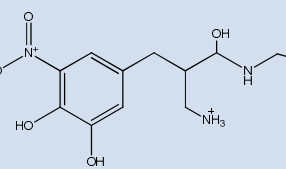
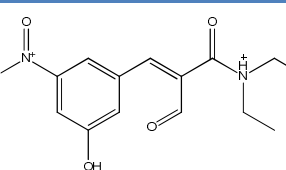
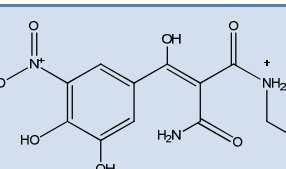
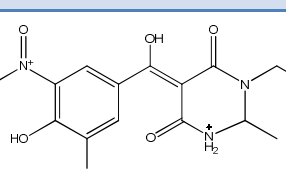
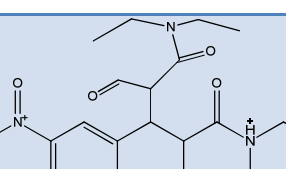
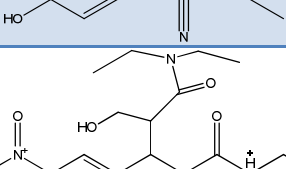
#### 4.4. Rezultati 2D-LC-MS

Na temelju dobivenih rezultata snimao se 2D-LC-MS. Postavljeni su uvjeti kao i za UHPLC. 2D-LC-MS sustav služi za identifikaciju nepoznatih produkata dobivenih forsiranom razgradnjom. Postavljena je ista kolona kao i kod prethodnog mjerenja, te se koristila metoda dobivena DryLab analizom. Temperatura kolone iznosi 45 °C, a vremenski gradijent 8,2 minute s ukupnim trajanjem 13 minuta.

Snimala su se tri uzorka u kojima se provela forsirana razgradnja i jedan u kojem se nalazila koncentracija 0,1 mg mL<sup>-1</sup> **ENT-a** u diluentu. Najviše fragmenata zabilježeno je pri razgradnji s NaOH, dok u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije došlo do razgradnje. Na osnovu masa fragmenata pretpostavljene su strukture razgradnih produkata entakapona koje se nalaze u tablici 13.

## 4. Rezultati i rasprava

Tablica 13. Nastali razgradni produkti i njihove strukture

Ime razgradnog produkta	Kemijska formula	Masa	Struktura
RP1	$C_{12}H_{11}N_2O_3^+$	231,08	
RP2	$C_{10}H_{10}N_3O_6^+$	268,06	
RP3	$C_{12}H_{20}N_3O_5^+$	286,31	
RP4	$C_{14}H_{17}N_2O_5^+$	293,11	
RP5	$C_{12}H_{14}N_3O_7^+$	312,08	
RP6	$C_{14}H_{16}N_3O_7^+$	338,29	
RP7	$C_{21}H_{29}N_4O_6^+$	433,21	
RP8	$C_{21}H_{31}N_4O_6^+$	435,22	

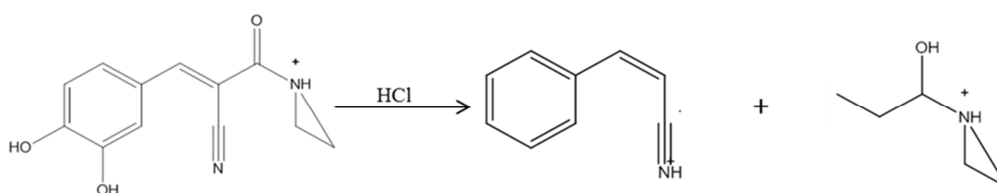


#### 4. Rezultati i rasprava

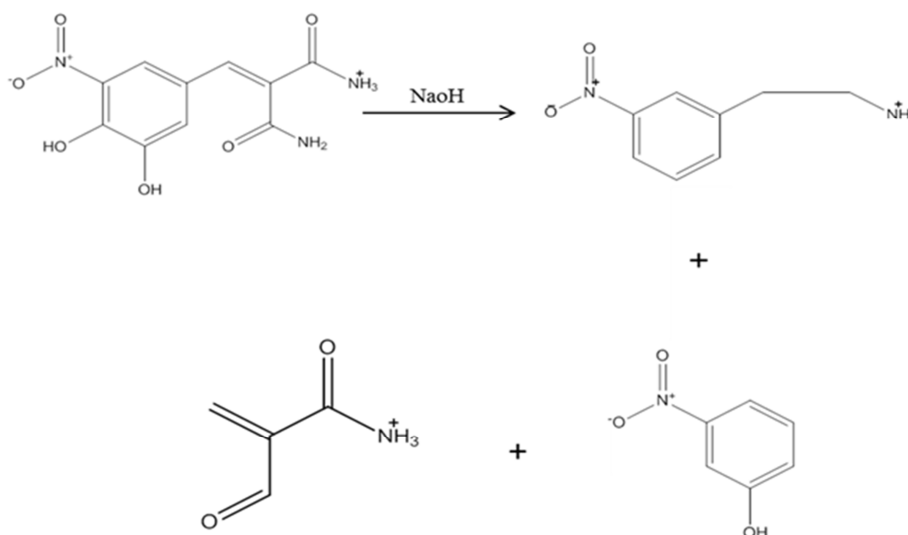
Tablica 14. Razgradni produkti i njihovi ionski fragmenti nakon analize MS/MS-om

RAZGRADNI PRODUKT	$t_R$ min	POČETNI ION $m/z$	ENERGIJA SUDARA eV	IONI PRODUKTI
<b>RP1</b>	2,8	231	10	130, 102
<b>RP2</b>	4,7	268	10	167,139 i 100
<b>RP3</b>	2,2	286	10	210, 157 i 114
<b>RP4</b>	4,9	293	10	220,152 i 141
<b>RP5</b>	1,3	312	10	294, 266 i 221
<b>RP6</b>	4,1	338	10	265,221 i 128
<b>RP7</b>	3,6	433	10	360, 332 i 297
<b>RP8</b>	4,3	435	10	362, 334 i 299

U tablici 14. navedene su mase nastalih fragmenata. Maseni spektri nalaze se u dodatku. Na temelju struktura razgradnih produkata **ENT**-a i masa nastalih fragmenata pretpostavljen je način razgradnje.

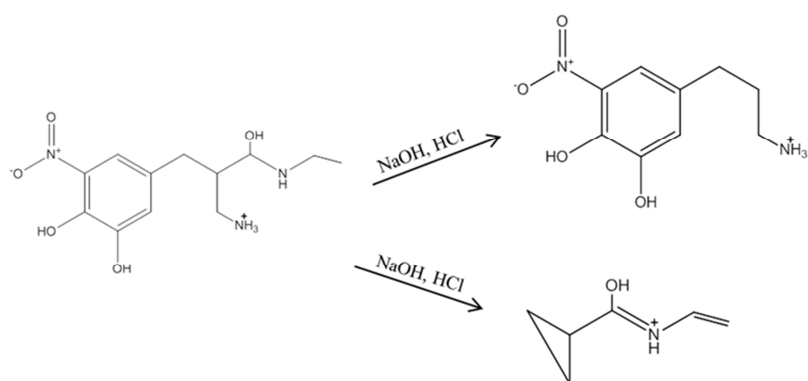


Slika 22. Fragmentacija razgradnog produkta **RP1**

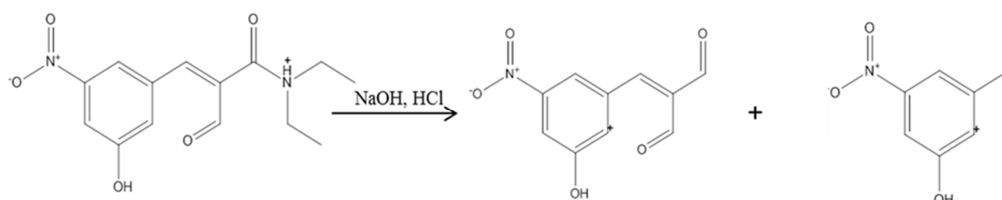


Slika 23. Fragmentacija razgradnog produkta **RP2**

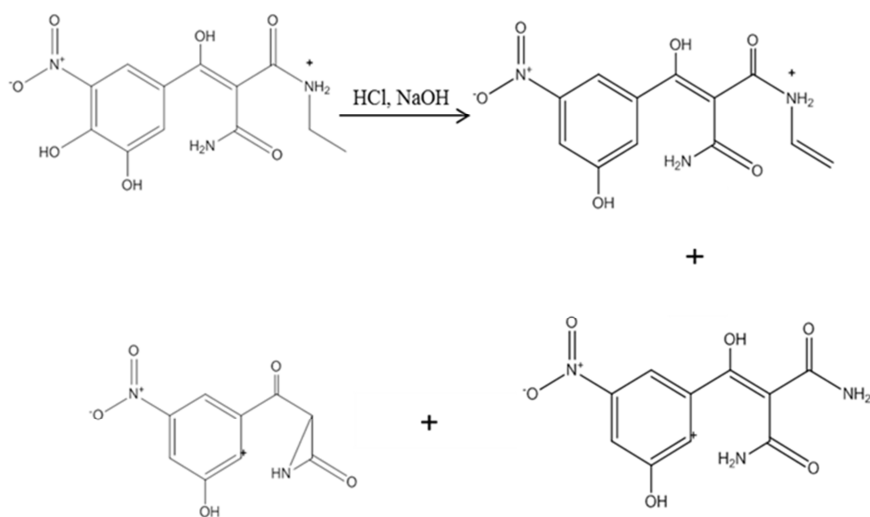
#### 4. Rezultati i rasprava



Slika 24. Fragmentacija razgradnog produkta **RP3**

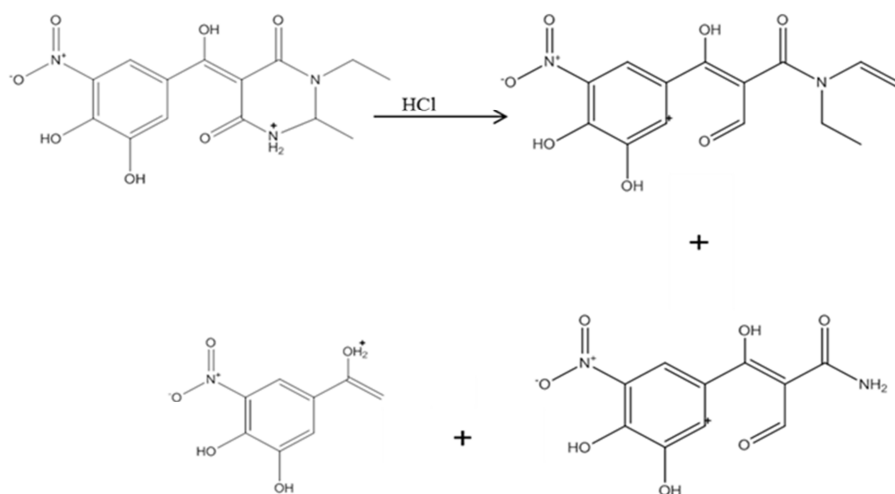


Slika 25. Fragmentacija razgradnog produkta **RP4**

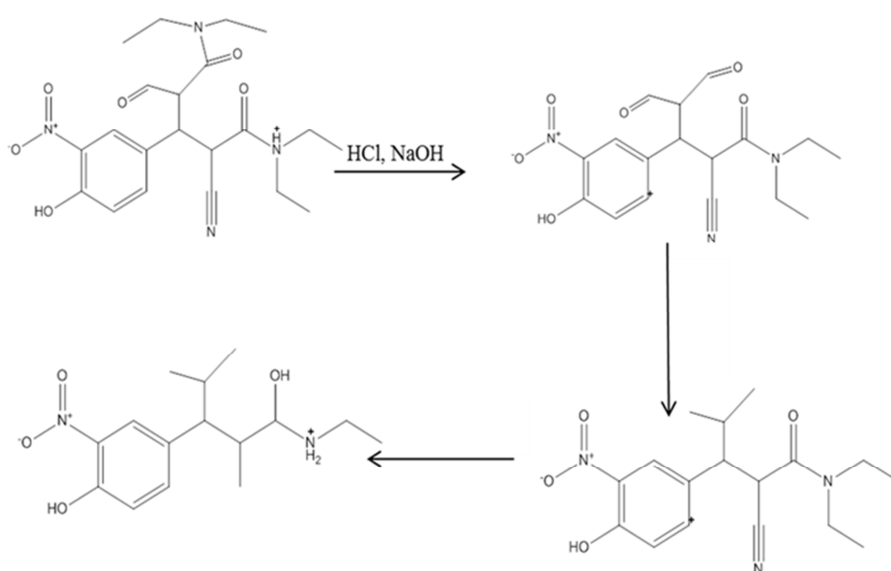


Slika 26. Fragmentacija razgradnog produkta **RP5**

#### 4. Rezultati i rasprava

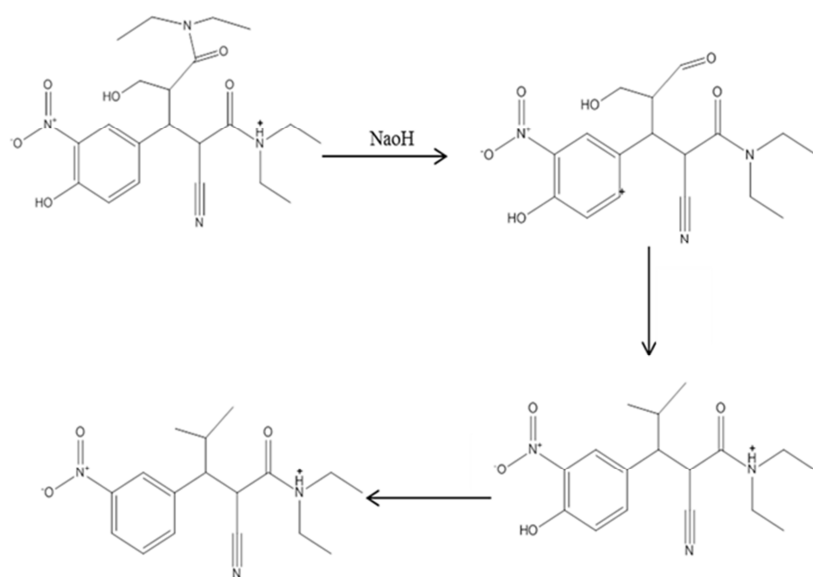


Slika 27. Fragmentacija razgradnog produkta **RP6**



Slika 28. Fragmentacija razgradnog produkta **RP7**

#### 4. Rezultati i rasprava



Slika 29. Fragmentacija razgradnog produkta **RP8**

### 4.5. Rasprava rezultata UHPLC analize

Uvjeti iz prva četiri eksperimenta (poglavlje 3.4.), koja su poslužila kao model za DryLab analizu, su najčešći uvjeti korišteni za odvajanje pikova u UHPLC analizi. Bitno je postaviti jednu kratku metodu i jednu dugu, kao i analizu pri visokoj i niskoj temperaturi. Kombinacijom ova četiri uvjeta mogu se dobiti različita odvajanja pikova. Pri nižoj temperaturi i na dužem i na kratkom gradijentu odvajanje je bilo bolje od odvajanja pri višoj temperaturi.

Kada je temperatura kolone postavljena na 65 °C u oba gradijenta dolazi do preklapanja razgradnih produkata. Zbog toga je bilo potrebno kreirati model idealnih uvjeta u programu DryLab. Nakon unošenja podataka iz prva četiri eksperimenta dobiven je grafički prikaz iz kojeg su se izvukli podaci za snimanje UHPLC-a. Bitno je da metoda bude ponovljiva, ekonomična i jednostavna. Zbog toga se uzimaju niže temperature kao i manji vremenski gradijent. U literaturi je pronađeno nekoliko istraživanja koji su opisali razvoj UHPLC metode za određene aktivne farmaceutске tvari. U ovom radu korištena temperatura je 45 °C i vrijeme od 8,2 minute, dok je u literaturi korištena temperatura 40 °C s vremenskim gradijentom od 5 minuta.<sup>34</sup>

### 4.6. Rasprava rezultata dobivenih forsiranom razgradnjom i 2D-LC-MS

Za forsiranu razgradnju **ENT**-a koristile su se vodene otopine 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mol L<sup>-1</sup> HCl i 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH, te se pripremila posebna razgradnja, **ENT**-a u diluentu. Najjača razgradnja bila je u NaOH, dok je u ostalim bila približno ista. **ENT Z**/izomer pojavio se u sve četiri reakcije i karakterizira se kao glavni razgradni produkt u sintezi entakapona.

Na 2D-LC-MS-u snimali su se uzorci pripremljeni za forsiranu razgradnju. Dobiveni su spektri masa iz kojih su se očitale mase fragmenata. U H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije došlo do razgradnje. U HCl-u bilo je manje nastalih fragmenata, za razliku od NaOH gdje se **ENT** najviše razradio. Izdvojili su se nastali fragmenti s određenim vrijednostima *m/z* i zatim su snimani MS/MS metodom. Upisane su njihove mase i retencijska vremena. Na izdvojene fragmente se djelovalo energijom sudara u jakosti od 10, 20 i 30 eV. Jedino je na 10 eV bilo jasno fragmentiranje, dok je pri većim energijama došlo do potpunog raspada i prevelikog šuma instrumenta. Na osnovu masa i fragmentacije pretpostavile su se mase razgradnih produkata, te njihova moguća fragmentacija.

#### 4. Rezultati i rasprava

Razgradnja **ENT**-a, fragmentacija i pretpostavljanje struktura rađene su po uzoru na rad objavljen na jednoj drugoj aktivnoj tvari, nepafenaku.<sup>35</sup> Razvijala se UHPLC metoda za određivanje razgradnih produkata pri različitim uvjetima stresa. Pretpostavljene su strukture na osnovu masenih spektara i njihovo moguće fragmentiranje.

## **5. ZAKLJUČAK**

## 5. Zaključak

Cilj ovog rada bio je razviti brzu, jednostavnu i ponovljivu metodu za određivanje aktivne farmaceutске tvari, entakapona i njegovih razgradnih produkata. Za odvajanje i kvantitativno određivanje razgradnih tvari i entakapona koristila se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (DAD). Za potvrdu rezultata korišten je sustav 2D-LC-MS.

DryLab računalni program služio je za optimizaciju kromatografskih uvjeta, korištenjem početna četiri eksperimenta. Analizom rezultata dobila se temperatura 45 °C i vrijeme analize od 8,2 minute, s ukupnim vremenom trajanja metode od 13 minuta. Dobiveni parametri su služili za daljnju analizu za forsiranu razgradnju i analizu 2D-LC-MS-om.

Forsirana razgradnja djelatne tvari provela se u tri medija, HCl-u, NaOH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Analizom UHPLC rezultata uvidjelo se da se najveća razgradnja odvija u lužini. Kao glavno onečišćenje u svim medijima je entakapon Z/izomer. Uspješno su detektirani pikovi razgradnih produkata, na osnovu prethodne analize UHPLC-om postavljene na nove uvjete dobivene DryLab-om.

Na 2D-LC-MS-u se se zatim snimali uzorci za forsiranju razgradnju. Dobiveni su maseni spektri razgradnih produkata. Izdvojili su se pikovi s većim masama i njihova retencijska vremena i snimljeni su MS/MS spektri. Energijom sudara u jakosti od 10 eV djelovalo se na izdvojene produkte koji su se fragmentirali. Na osnovu fragmentacije i masa nastalih fragmenta pretpostavljene su strukture razgradnih produkata kao i način fragmentacije tih produkata.

Razvijena je brza i učinkovita UHPLC metoda, s visokom osjetljivošću i kraćim trajanjem analize za odvajanje razgradnih produkata i onečišćenja u djelatnoj tvari **ENT**. Također su se odredili razgradni produkti te su pretpostavljene njihove strukture na osnovu fragmentacije. Također je pretpostavljen način fragmentacije razgradnih produkata u HCl-u i NaOH.



## **6. LITERATURA**

## 6. Literatura

1. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs, *J. of Pharmaceut. A.* **4** (2014) 159–165.
2. R. P. Riberio, J. C. Gasparetto, R. O. Vilhena, T. M. Guimaraes de Francisco, C. A. F. Martins, M. A. Cardoso, R. Pontarolo, Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-Omethyl dopa and dopamine in human plasma by an HPLC–MS/MS method, *Bioanalysis* **7** (2015) 207–220.
3. M. F. Abdel-Ghany, L. A. Hussein, M. F. Ayad, M. M. Youssef, Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture, *Mol. and Biomol. Spect.* **171** (2017) 236–245.
4. A. Vemić, B. Jančić Stojanović, I. Stamenković, A. Malenović, Chaotropic agents in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities, *J. of Pharmaceut. Biomed.* **77** (2013) 9–15.
5. N. G. Mohamed, M. S. Mohamed, Determination of antiparkinsonism drug entacapone, *NODCAR* (2009) 85–89.
6. N. Soukhova, Z. Kassymbek, S. Bradby, A. Martin-Esker, P. White, S. Wahab, Development of characterization methods for entacapone in a pharmaceutical bulk, *J. of Pharmaceut. Biomed.* **54** (2011) 860–865.
7. J. Janković, Parkinson's disease: clinical features and diagnosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* **79** (2008) 368–376.
8. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, *Školska knjiga*, Zagreb, (2003) 217–235.
9. M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, *Mentor d.o.o.*, Zagreb, (2014) 97–99.
10. M. Periša, Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu, doktorski rad, Zagreb, (2015), 37–59.
11. L. Novakova, L. Havlikova, H. Vlčkova, Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC, *TrAC Trends in Anal. Chem.* **63** (2014) 55–64.
12. K. Toppner, HPLC Analysis, The role of ultrapure water, *Sartorius*, (2014) 16–18.
13. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, *J. Wiley & Sons*, Kanada, (1979) 87–166.

14. M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, *Talanta* **70** (2006) 678–690.
15. S. Fekete, D. Guillarme, Ultra-high-performance liquid chromatography for the characterization of therapeutic proteins, *TrAC Trends in Anal. Chem.* **63** (2014) 76–84.
16. X.-S. Miao, C. D. Metcalfe, Analysis of neutral and acidic pharmaceuticals by liquid chromatography mass spectrometry *u:* M. Petrović, D. Barcelo (urednici), *Comprehensive Analytical Chemistry - Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*, Elsevier, Amsterdam (2007) 133–154.
17. A. Horvatić, M. Cindrić, Analysis of therapeutic peptides by mass spectrometry, Institut “Ruđer Bošković”, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za sistemsku biomedicinu, Zagreb, (2008) 258–263.
18. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Wiley, Third Edition (2007) 33–36.
19. N. Galić, Elektroraspršenje - blagi način ionizacije u spektrometriji masa, *Kem. u Ind.* **53** (2004) 117–123.
20. P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Pico, Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. of Chrom. A.* **1217** (2010) 2471–2483.
21. E. Garcia-Lor, M. Martinez, J. V. Sancho, G. Penuela, F. Hernandez, Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* **99** (2012) 1011–1023.
22. R. Varga, I. Somogyvari, Z. Eke, K. Torkos, Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction. liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Talanta* **83** (2011) 1447–1454.
23. M. Periša, S. Babić, Simultaneous determination of pharmaceuticals and some of their metabolites in wastewater by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. of Separation Sc.* **37** (2014) 1289–1296.
24. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* **65** (2016) 471–482.

## 6. Literatura

25. M. Petrović, D. Barcelo, LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26** (2007) 486–493.
26. W. W. Buchberger, Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge, *Analytica Chimica Acta* **593** (2007) 129–139.
27. M. W. Dong, K. Zhang, Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *Trends in Analytical Chem.* (2014) 1–15.
28. P. W. Carr, D. R. Stoll, Two-dimensional liquid chromatography, principles, practical implementation and applications, *Agilent technologies*, (2015) 1–14.
29. R. M. Krisko, K. McLaughlinb, M. J. Koenigbauer, C. E. Lunte, Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development, *J. Chromatogr. A.* **1122** (2006) 186–93.
30. *DryLab*<sup>®</sup>, V4.0, *Molnar-institute* (2014), Molnar-institute, Berlin, Njemčka
31. I. Molnár, Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: Development of DryLab software, *J. Chromatogr. A.* **965** (2002) 175–194.
32. C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *J. Chromatogr. A.* **125** (1976) 129–156.
33. J. Terzić, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, Aspekti primene DryLab<sup>®</sup> softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda, *Arh. farm.* **64** (2014) 205–219.
34. M. Gumustas, B. Uslu, S. A. Ozkan, H. Y. Aboul-Enein, Validated stability-indicating HPLC and UPLC assay methods for the determination of entacapone in pharmaceutical dosage forms, *Springer* (2014) 1–6.
35. M. Runje, S. Babić, E. Meštrović. I. Nekola, Ž. Dujmić-Vučinić, N. Vojčić, Forced degradation of nepafenac: Development and validation of stability indicating UHPLC method, *J. of Pharmaceut. Biomed.* **123** (2016) 42–52.

## **7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA**

## 7. Popis kratica, oznaka i simbola

OZNAKA	NAZIV
<b>2D-LC</b>	dvodimenzijska tekućinska kromatografija
<b><math>\alpha</math></b>	faktor odjeljivanja
<b>ACN</b>	acetonitril
<b>API</b>	aktivna farmaceutska tvar
<b>APCI</b>	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
<b>APPI</b>	ionizacija fotonima pri atmosferskom tlaku
<b>CD</b>	karbidopa
<b>COMT</b>	katehol-O-metiltransferaza
<b>DDC</b>	dopa dekraboksilaza
<b>DAD</b>	detektor s nizom dioda
<b>ENT</b>	entakapon
<b>ESI</b>	ionizacija elektroraspršenjem
<b>FAB</b>	bomardiranje brzim atomima
<b>HCl</b>	kloridna kiselina
<b>HETP</b>	visina
<b>HILIC</b>	tekućinska kromatografija s hidrofilnim interakcijama
<b>HPLC</b>	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
<b>HPLC-MS</b>	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta uz masenu spektrometriju
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	vodikov peroksid
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosforna kiselina
<b><math>k</math></b>	faktor zadržavanja
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kalijev dihidrogen-fosfat
<b>LC-MS/MS</b>	tekućinska kromatografija uz tadhedmnu masenu spektrometriju
<b>LD</b>	levodopa
<b>LSIMS</b>	ionizacija sekundarnim desorbiranim ionima
<b>MALDI</b>	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
<b>N</b>	broj odsječaka u kromatografskoj koloni
<b>NaOH</b>	natrijev hidroksid
<b><math>R_s</math></b>	razlučivanje
<b>RT</b>	sobna temperatura (engl. room temperature)

7. Popis kratica, oznaka i simbola

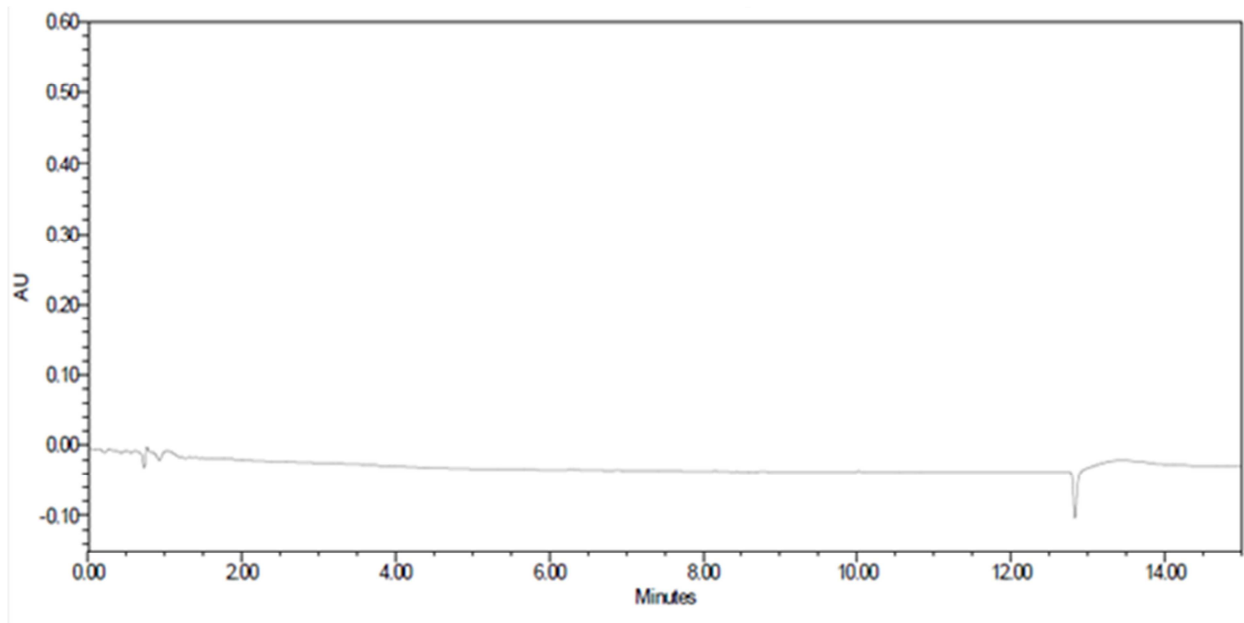
<b>OZNAKA</b>	<b>NAZIV</b>
<b>SIMS</b>	ionizacija bomardiranjem iona
$t_M$	vrijeme zadržavanja nezadržavanog sastojka
<b>TOF</b>	analizator koji mjeri vrijeme leta
$t_R$	vrijeme zadržavanja
<b>TSP</b>	toplinske ionizacije raspršenjem
<b>UHPLC</b>	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
<b>UV/VIS</b>	ultraljubičasto-vidljiva spektroskopija
$w$	širina osnovice kromatografske krivulje

## **8. DODATAK**

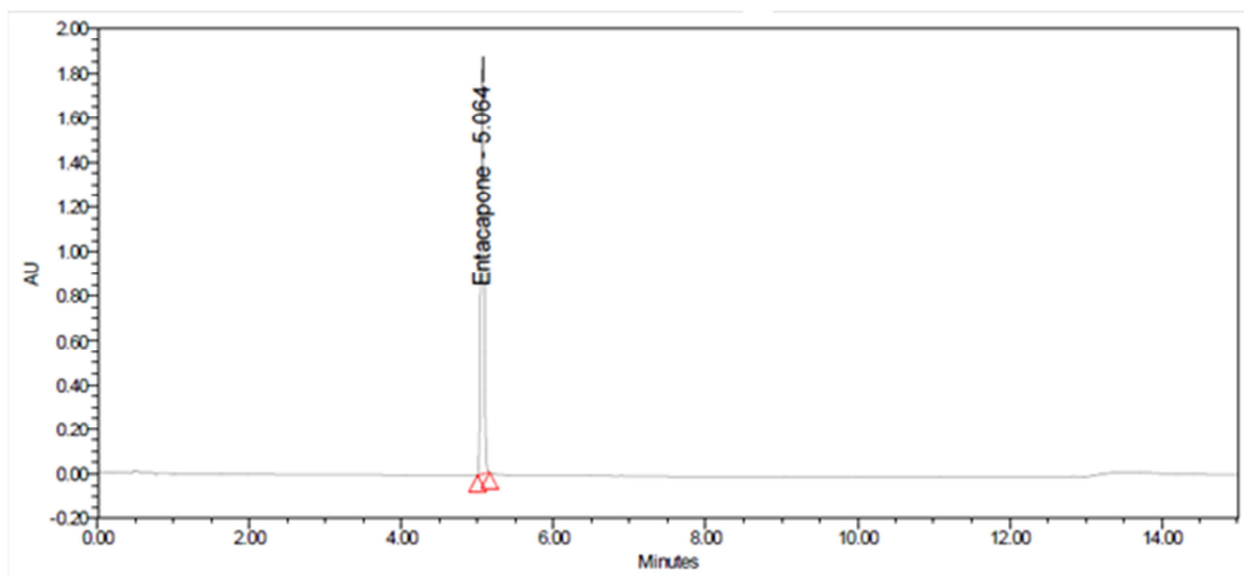


## 8.1. Rezultati UHPLC analize

### 8.1.1. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 30 i tg 10

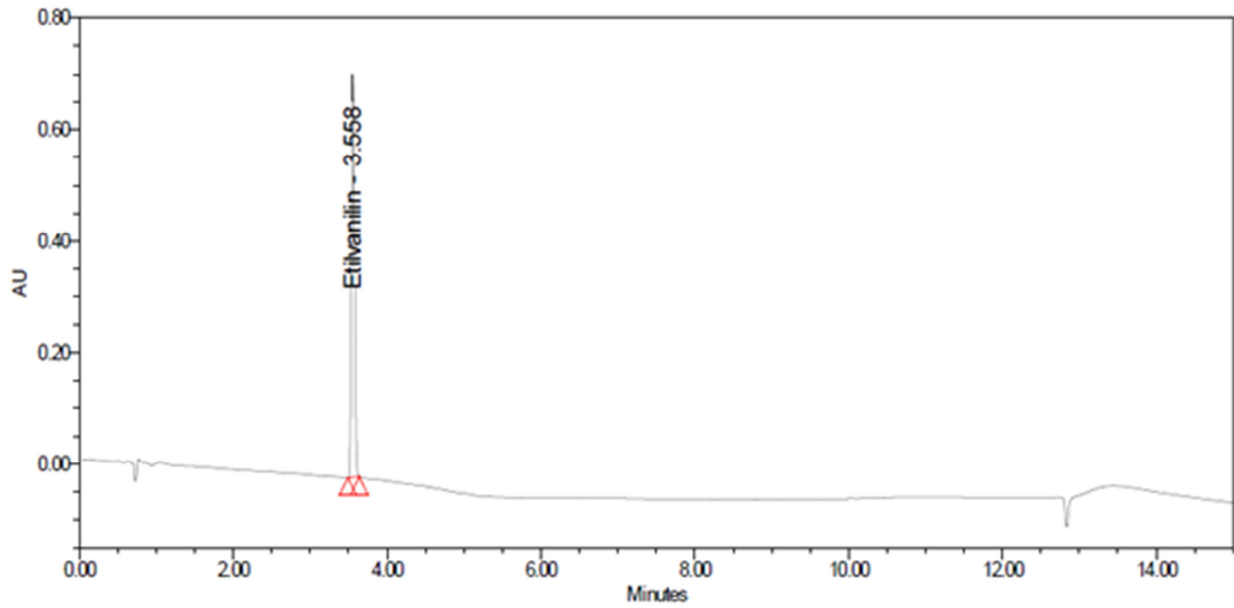


Slika 30. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima Tg 30 i tg 10

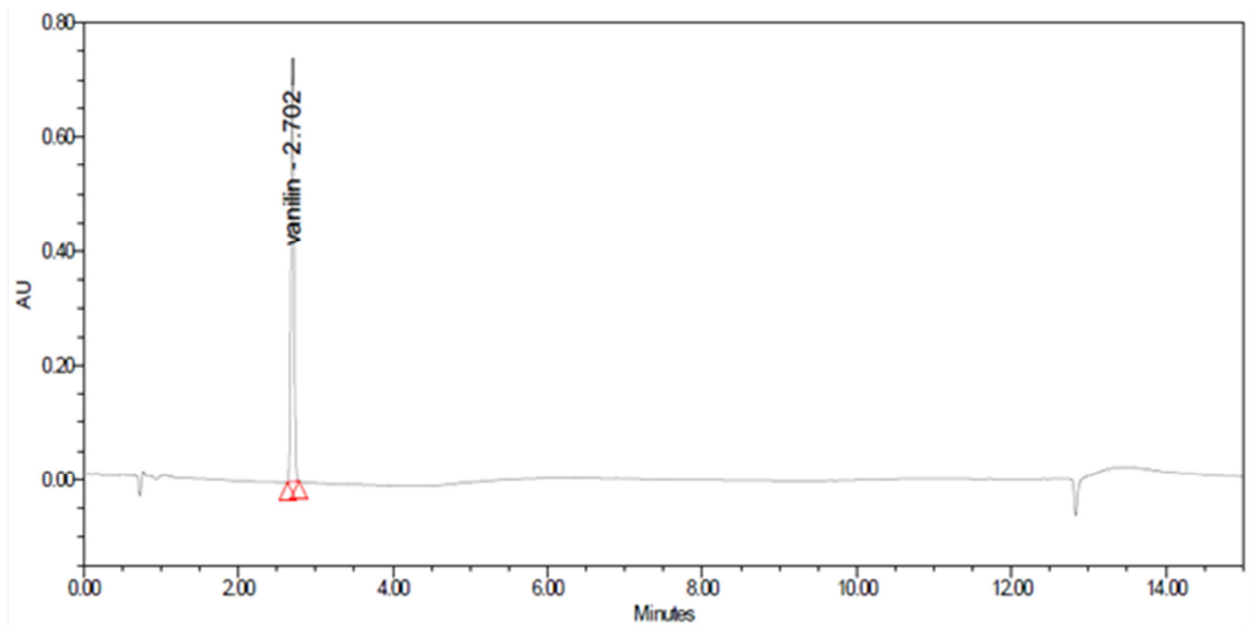


Slika 31. Kromatogram ENT pri uvjetima Tg 30 i tg 10

8. Dodatak

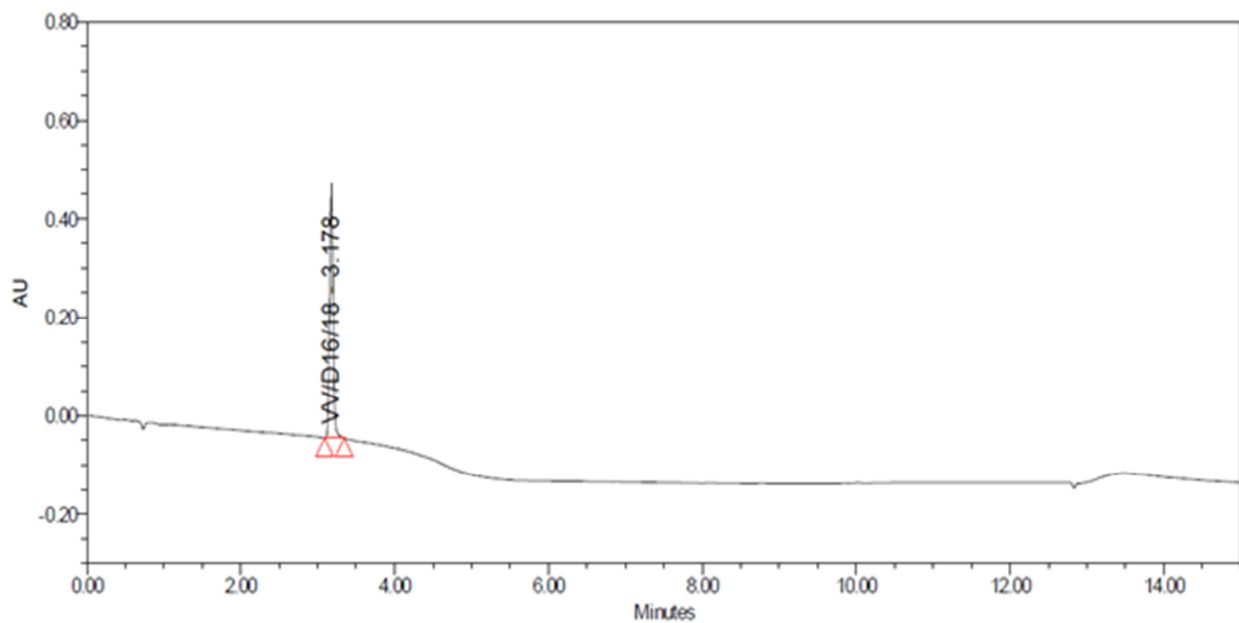


Slika 32. Kromatogram etilvanilina pri uvjetima Tg 30 i tg 10

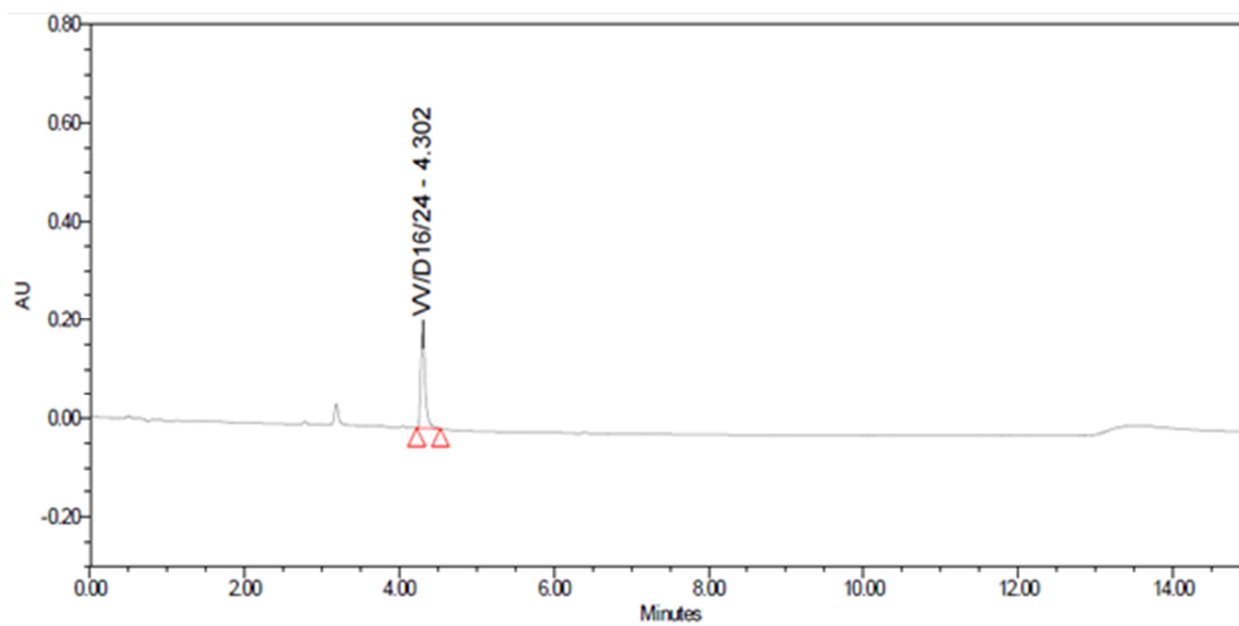


Slika 33. Kromatogram vanilina pri uvjetima Tg 30 i tg 10

8. Dodatak

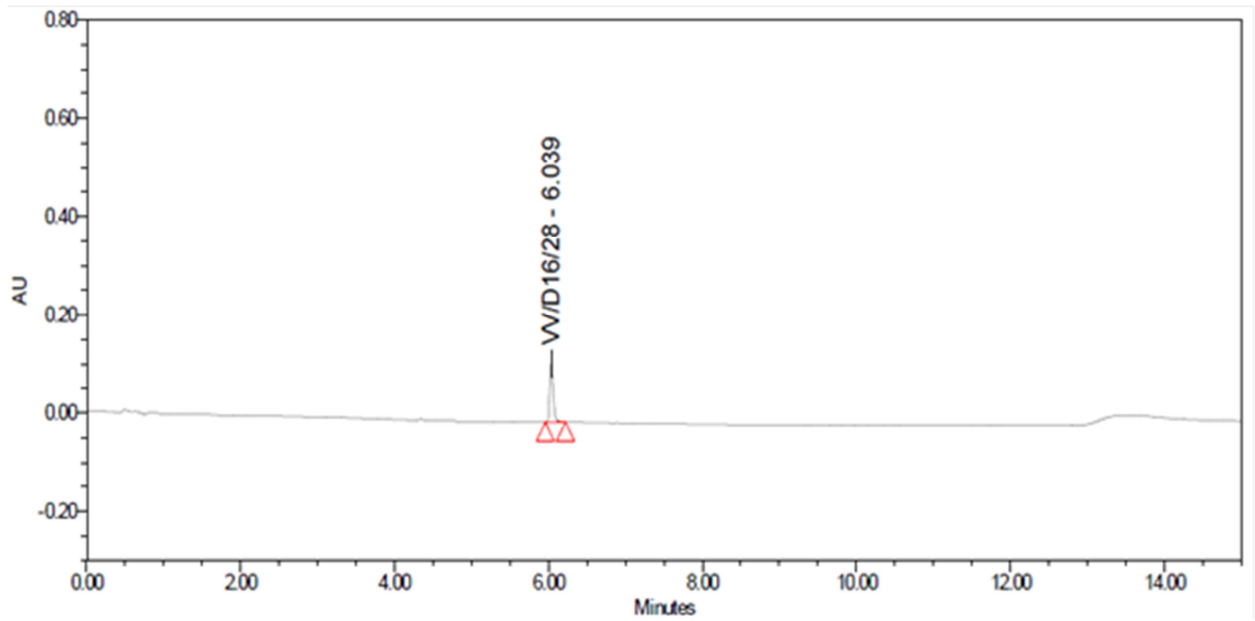


Slika 34. Kromatogram VV/D16/18 pri uvjetima Tg 30 i tg 10

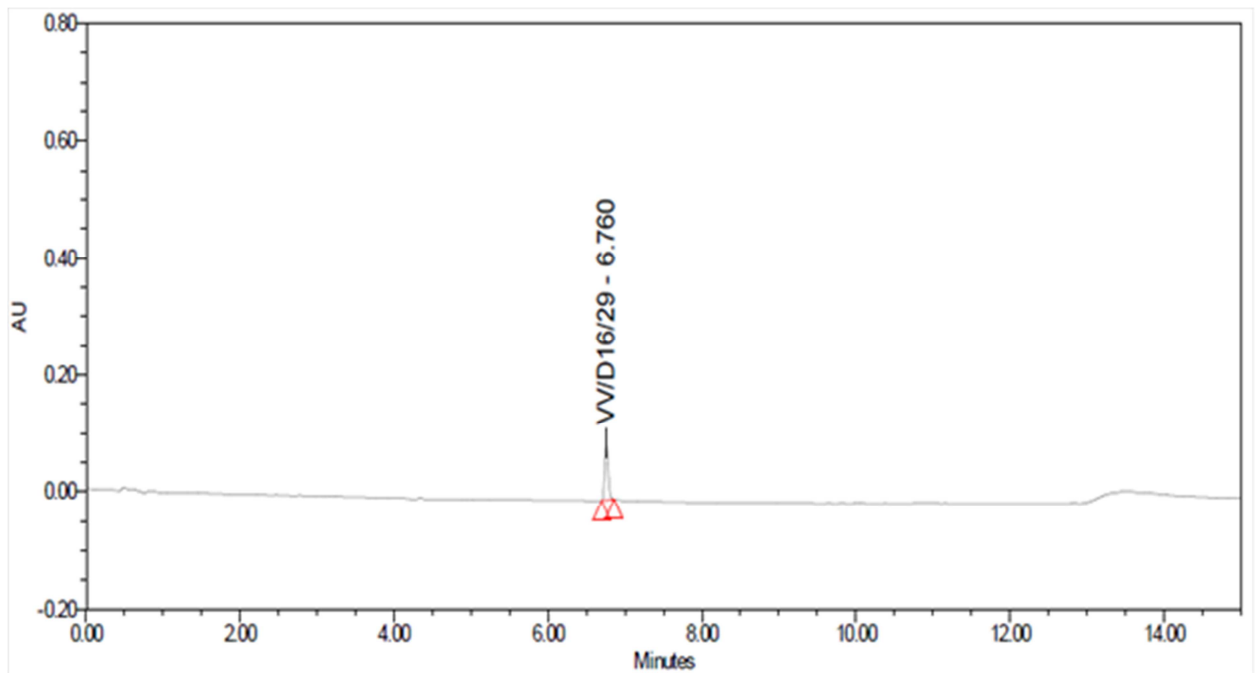


Slika 35. Kromatogram VV/D16/24 pri uvjetima Tg 30 i tg 10

8. Dodatak

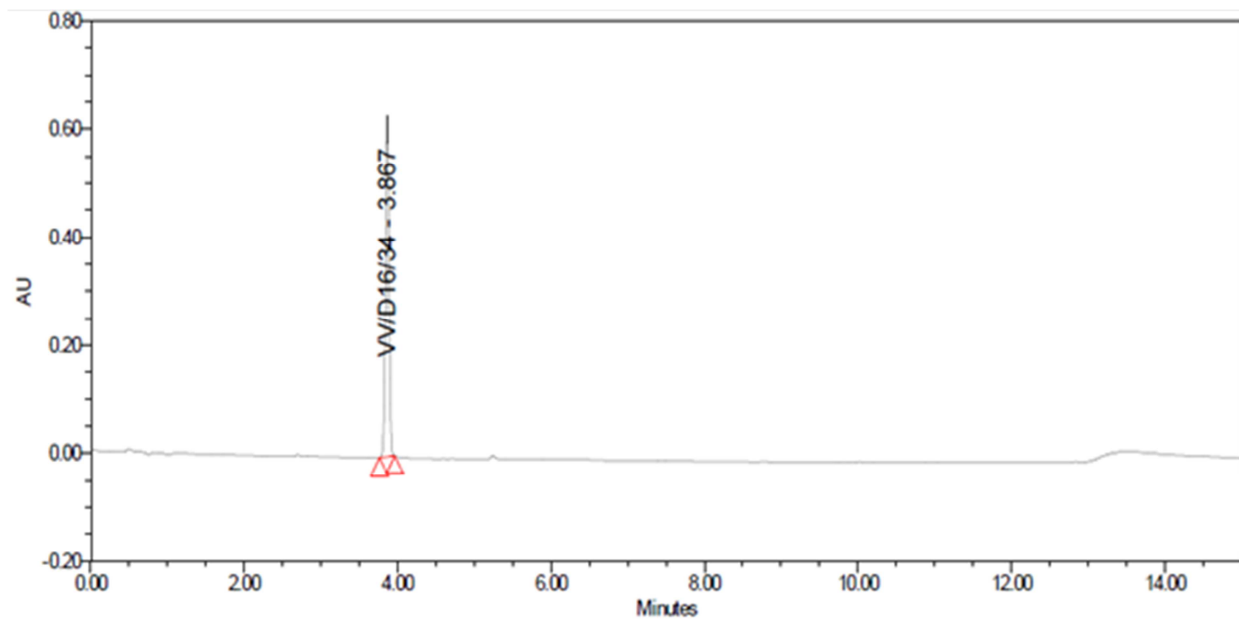


Slika 36. Kromatogram VV/D16/28 pri uvjetima Tg 30 i tg 10

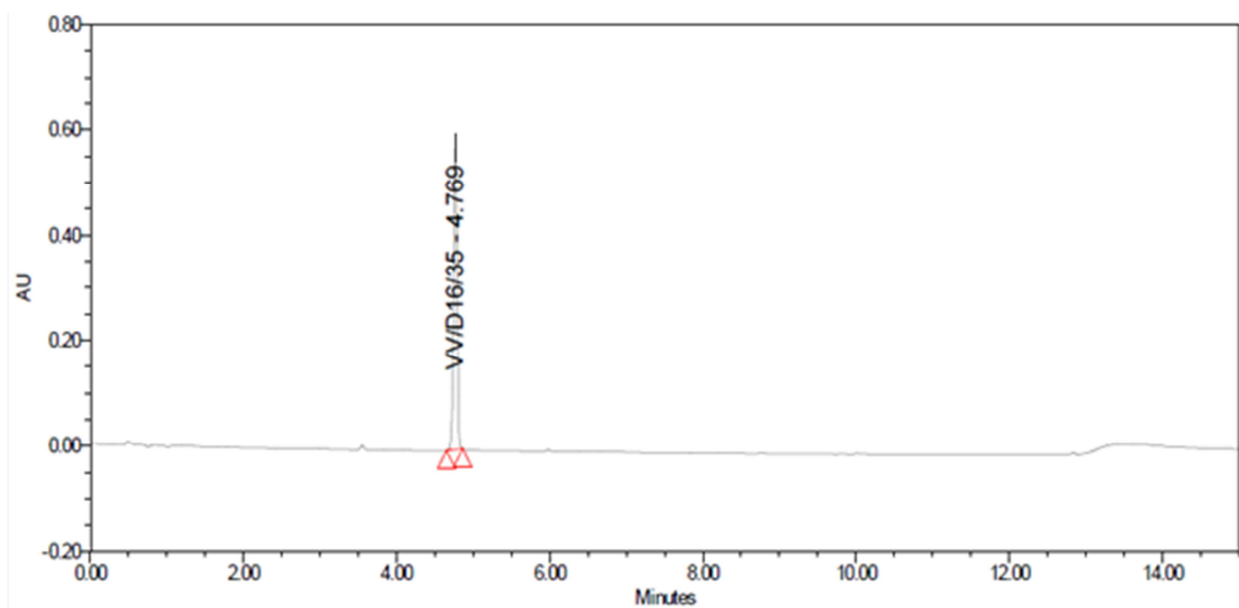


Slika 37. Kromatogram VV/D16/29 pri uvjetima Tg 30 i tg 10

8. Dodatak

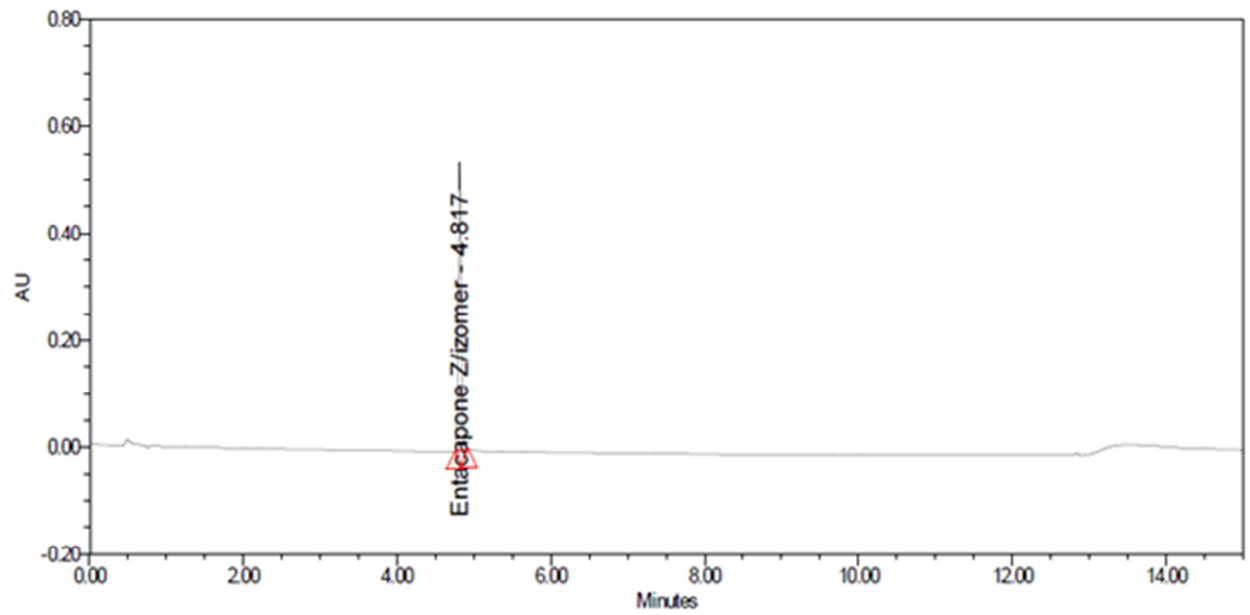


Slika 38. Kromatogram VV/D16/34 pri uvjetima Tg 30 i tg 10



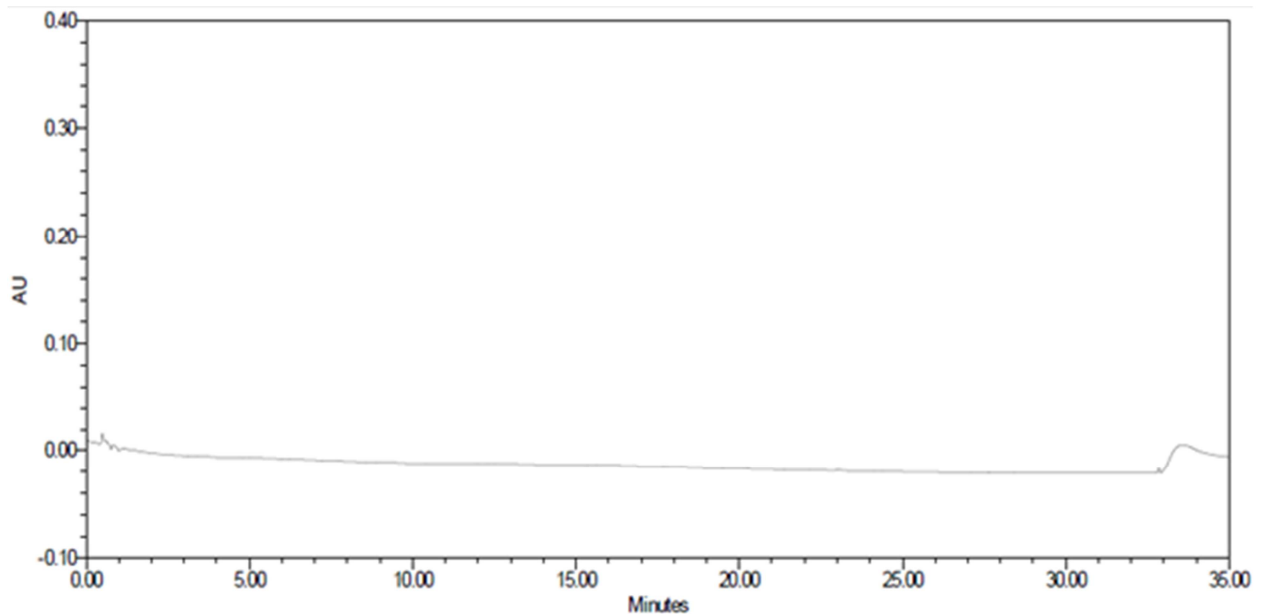
Slika 39. Kromatogram VV/D16/35 pri uvjetima Tg 30 i tg 10

## 8. Dodatak



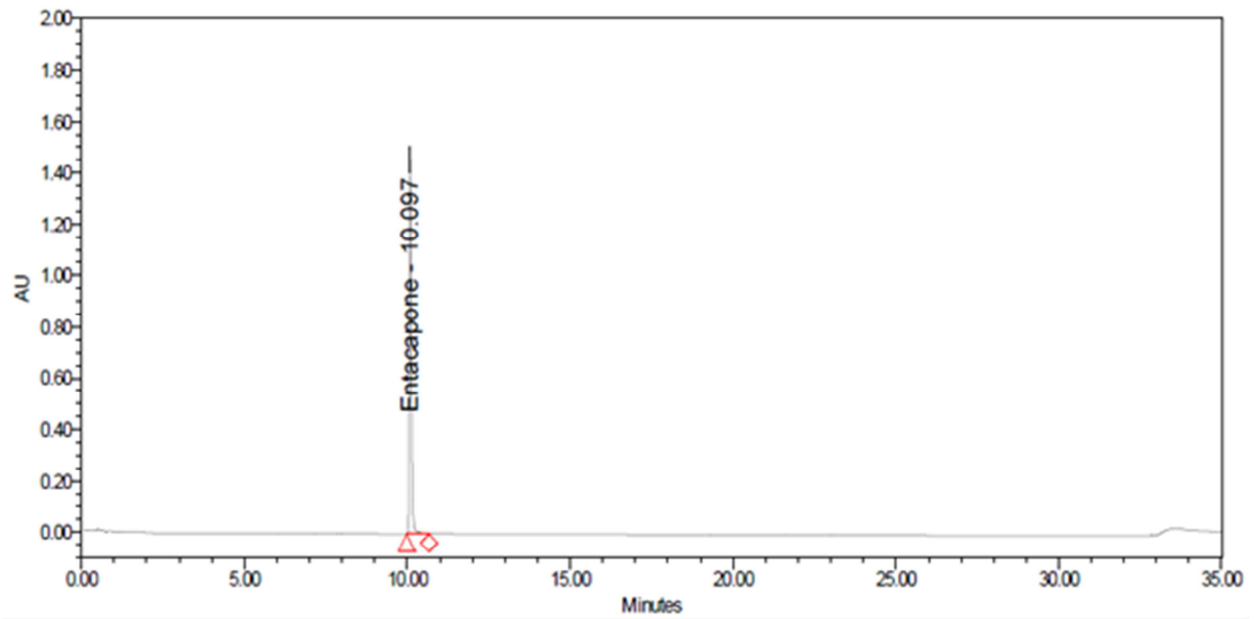
Slika 40. Kromatogram ENT Z/izomera pri uvjetima Tg 30 i tg 10

### 8.1.2. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 30 i tg 30

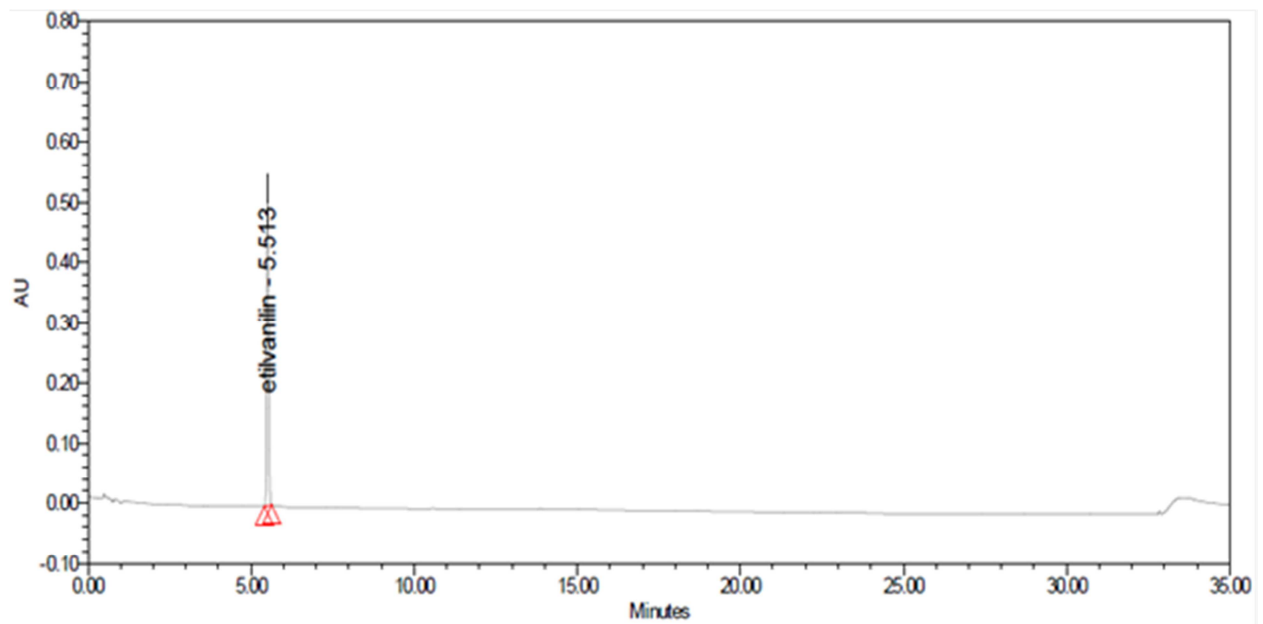


Slika 41. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima Tg 30 i tg 30

8. Dodatak

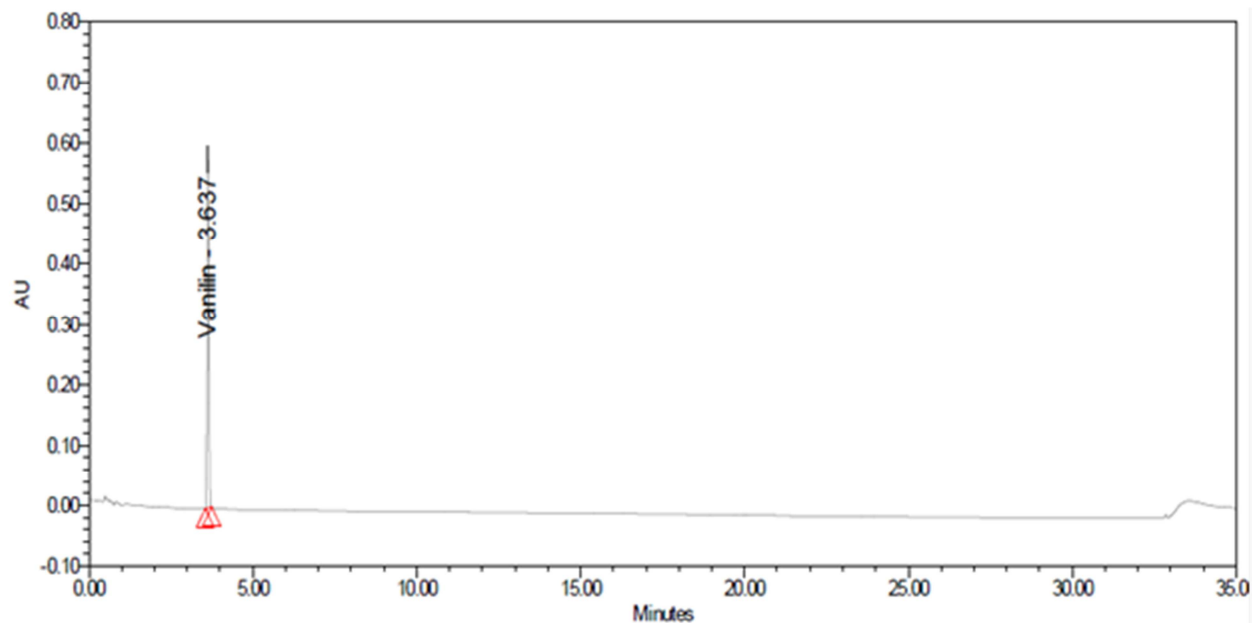


Slika 42. Kromatogram ENT pri uvjetima Tg 30 i tg 30

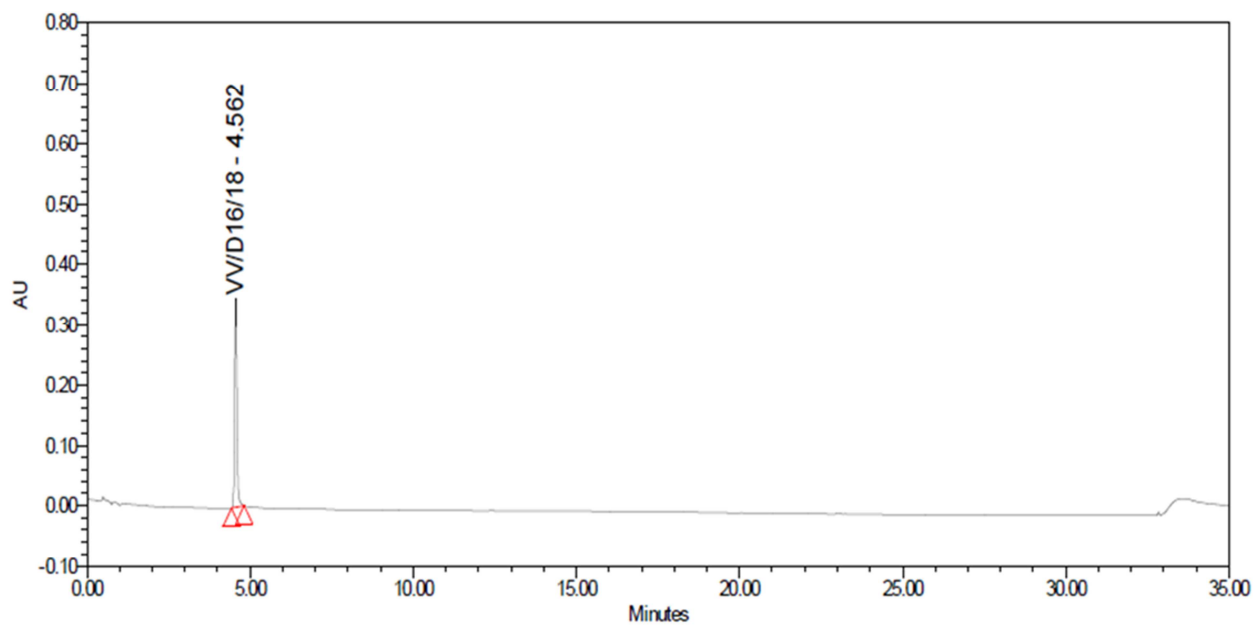


Slika 43. Kromatogram etilvanilina pri uvjetima Tg 30 i tg 30

8. Dodatak



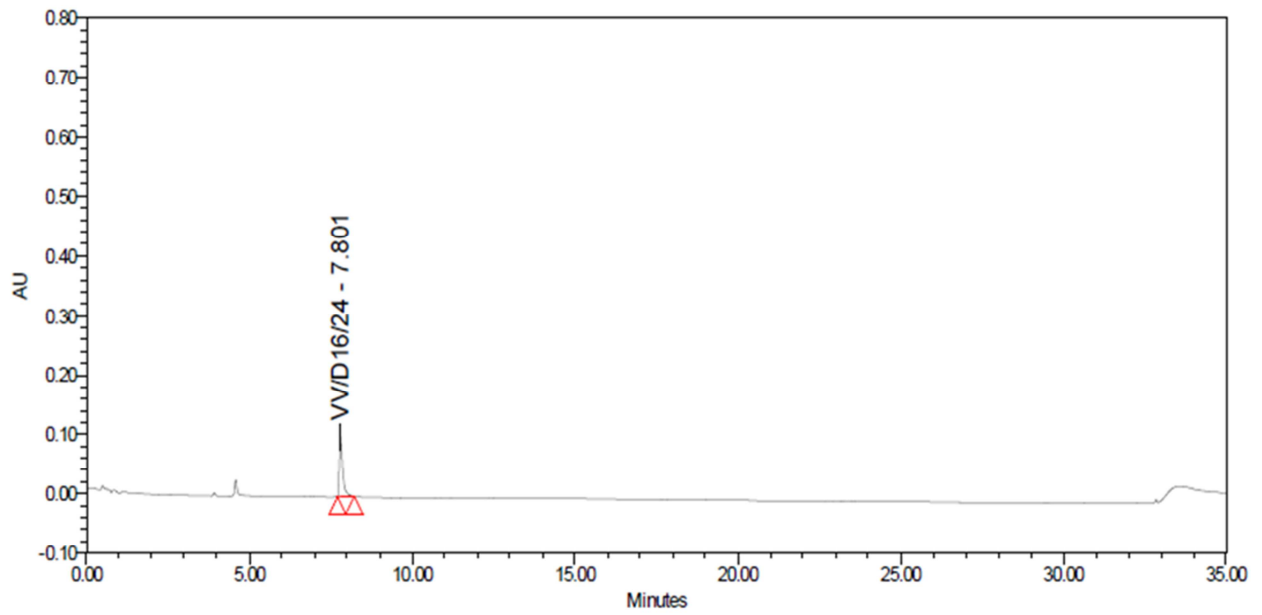
Slika 44. Kromatogram vanilina pri uvjetima Tg 30 i tg 30



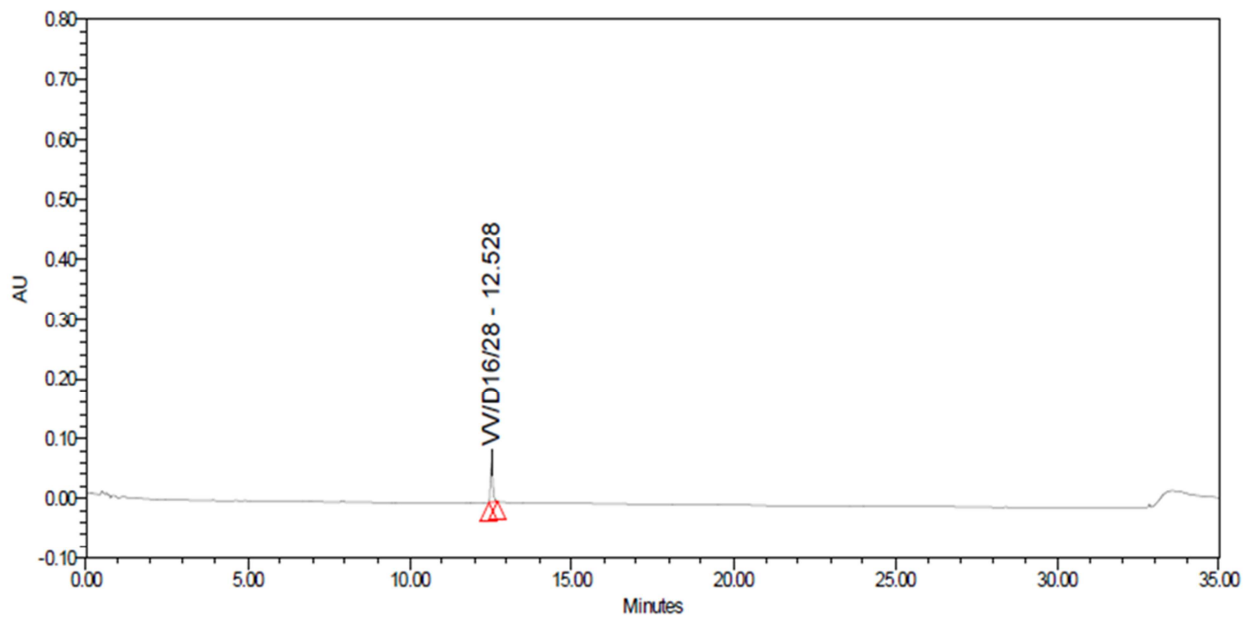
Slika 45. Kromatogram VV/D16/18 pri uvjetima Tg 30 i tg 30



8. Dodatak

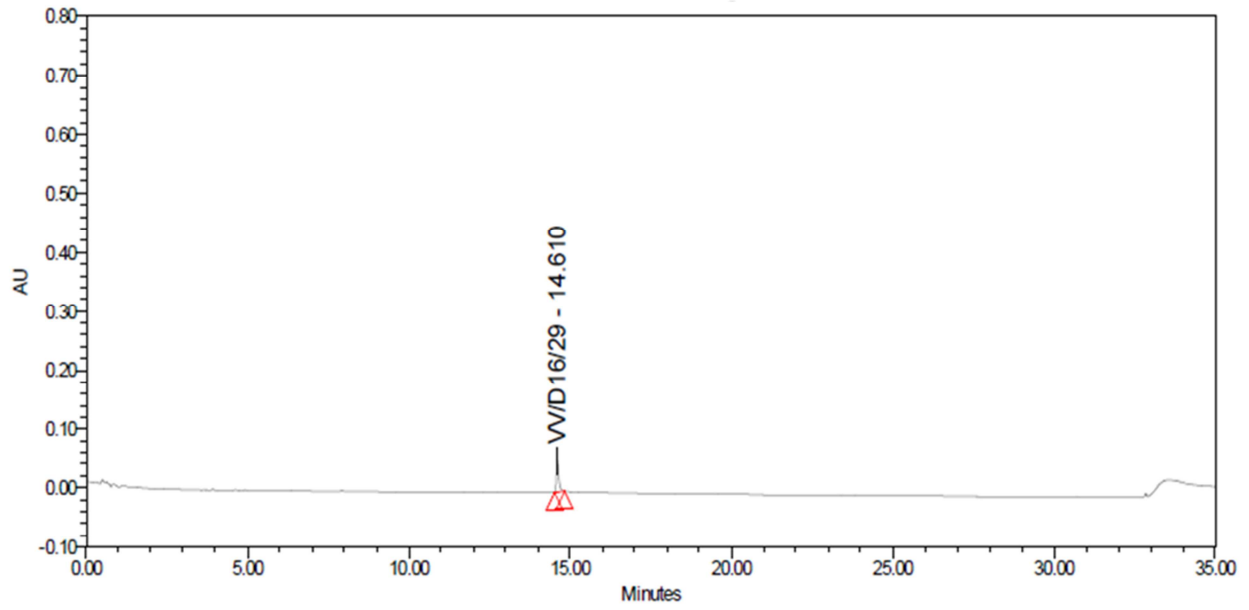


Slika 46. Kromatogram VV/D16/24 pri uvjetima Tg 30 i tg 30

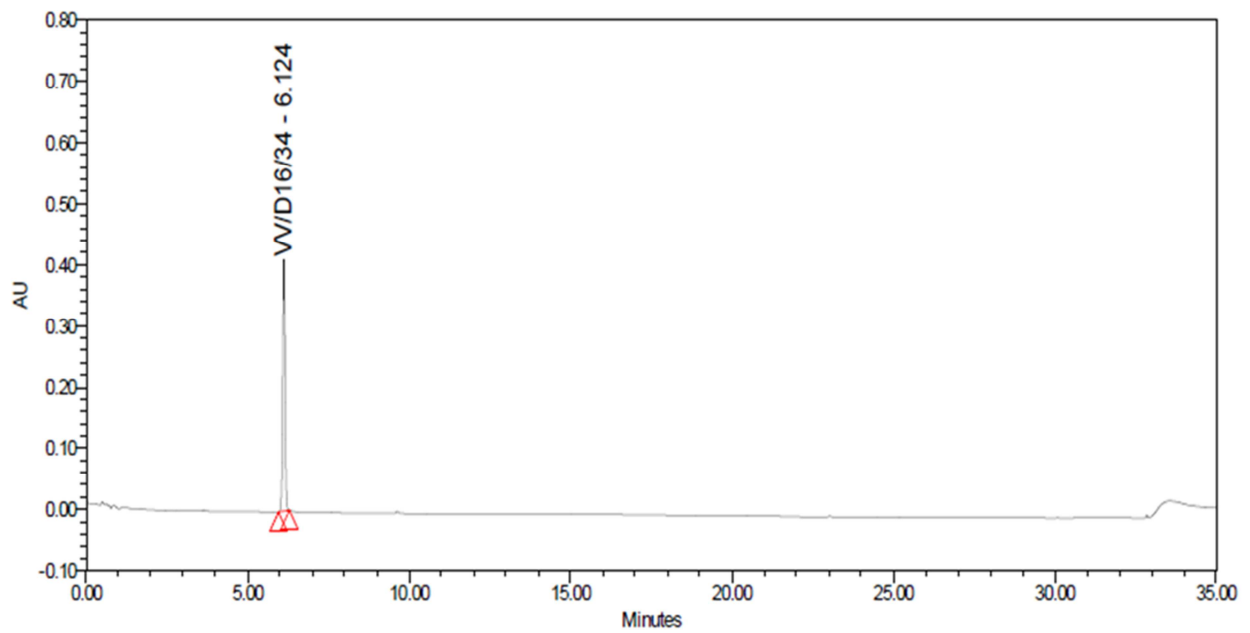


Slika 47. Kromatogram VV/D16/28 pri uvjetima Tg 30 i tg 30

8. Dodatak

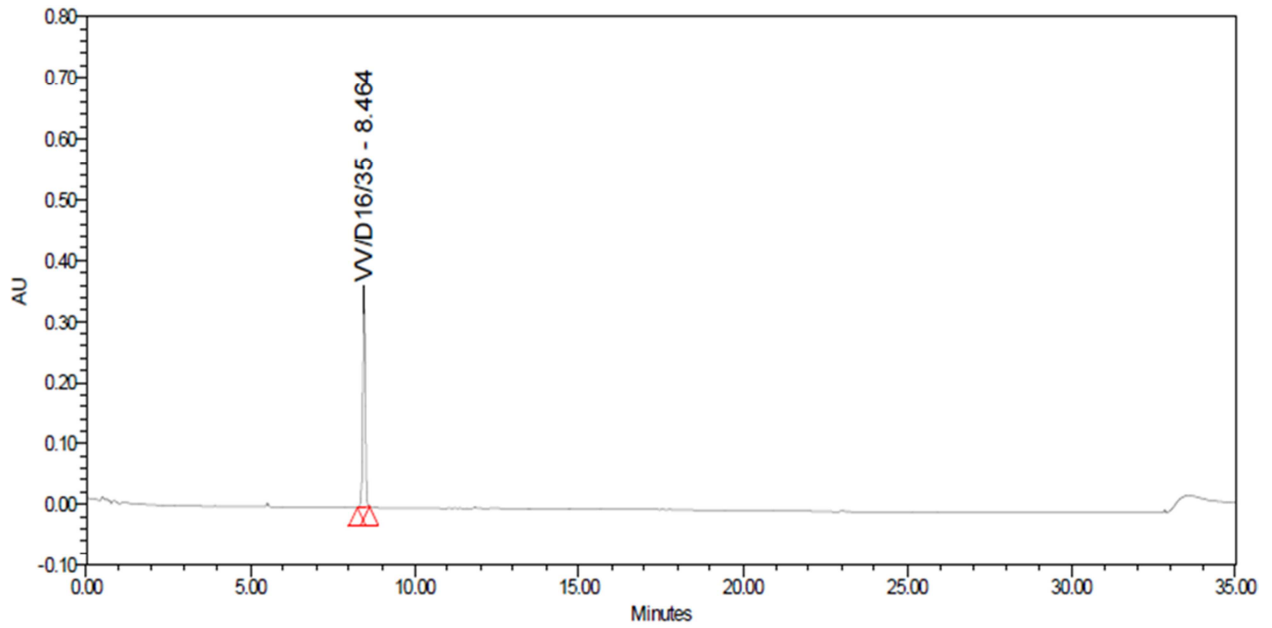


Slika 48. Kromatogram VV/D16/29 pri uvjetima Tg 30 i tg 30

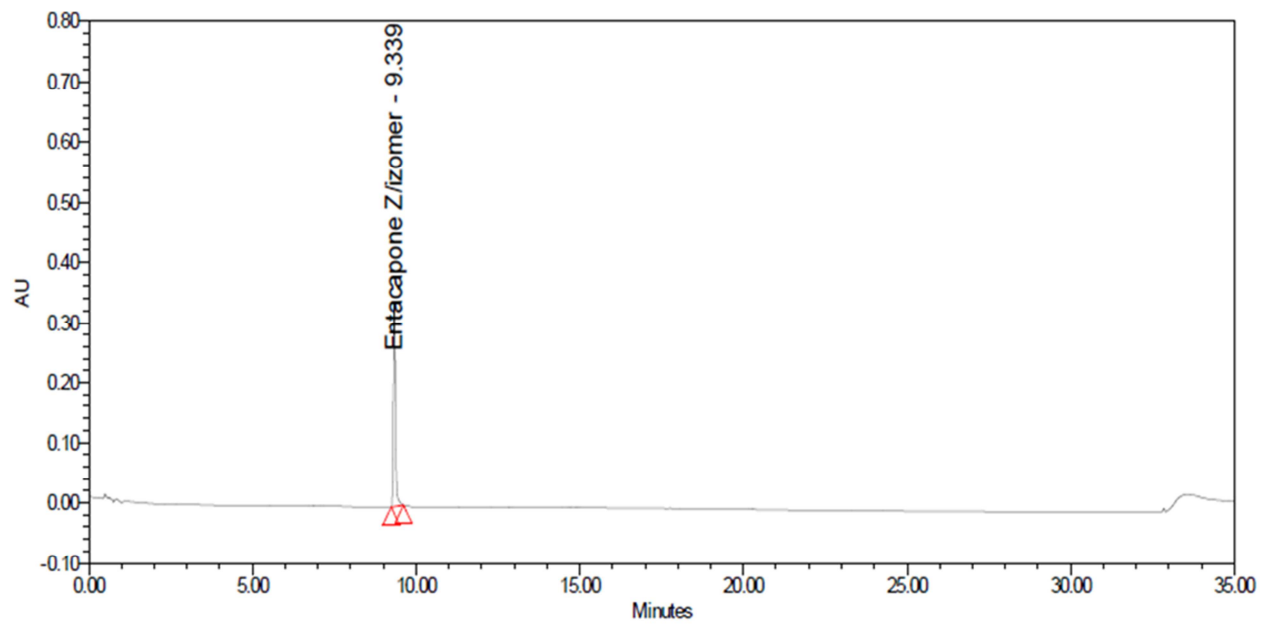


Slika 49. Kromatogram VV/D16/34 pri uvjetima Tg 30 i tg 30

8. Dodatak

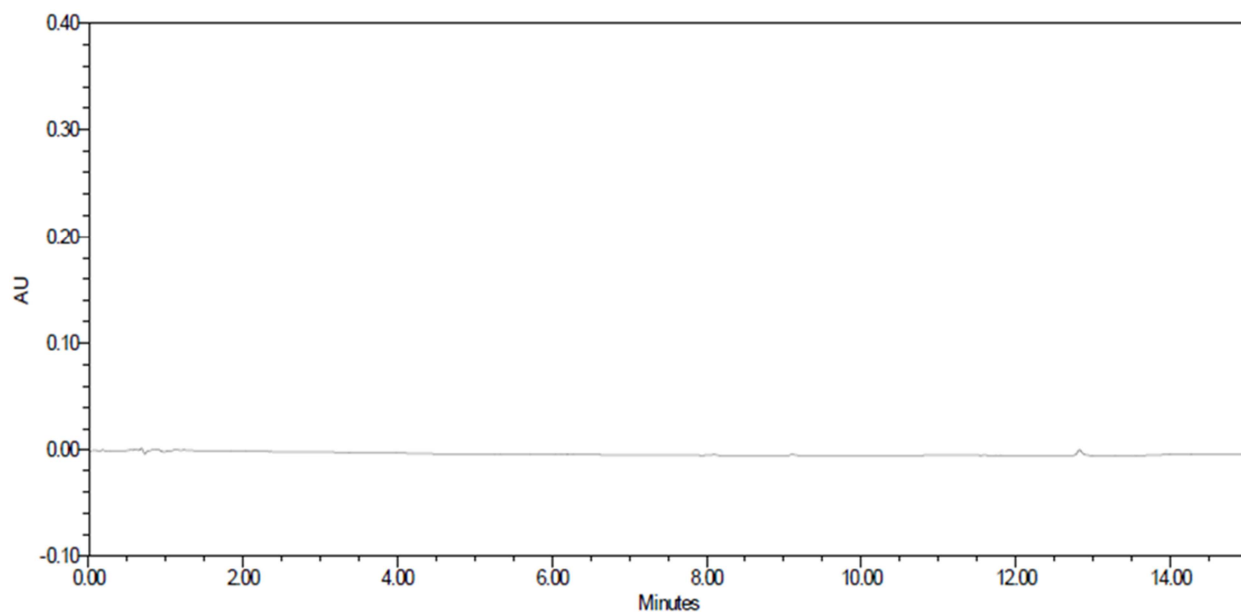


Slika 50. Kromatogram VV/D16/35 pri uvjetima Tg 30 i tg 30

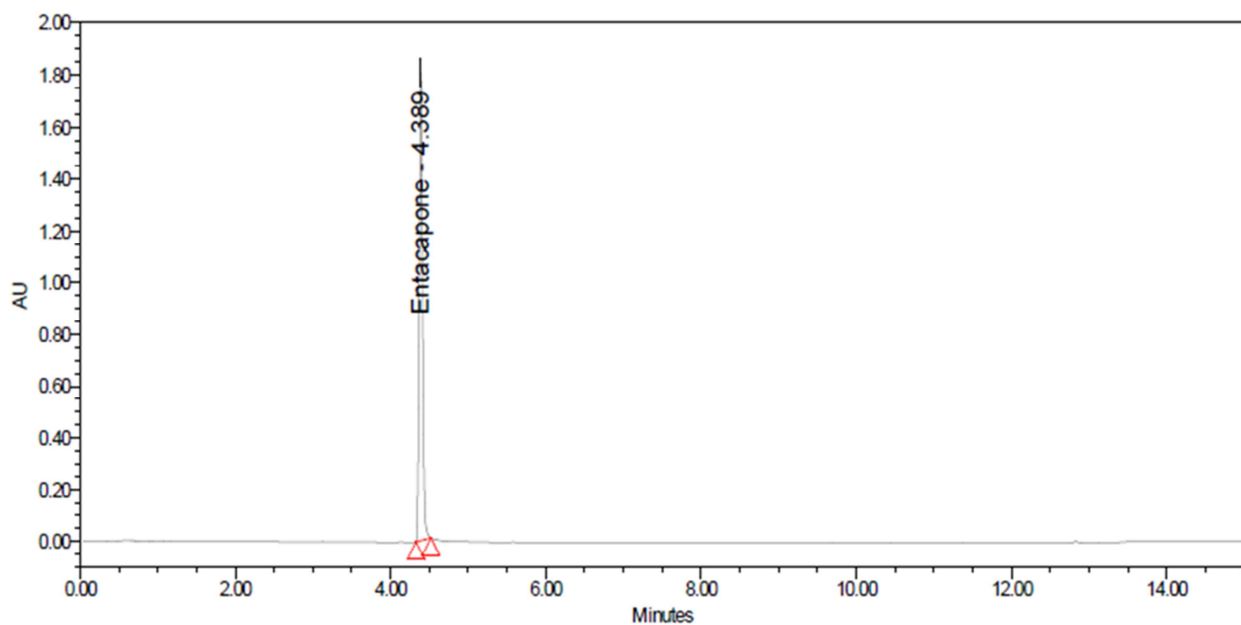


Slika 51. Kromatogram ENT Z/izomera pri uvjetima Tg 30 i tg 30

### 8.1.3. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 65 i tg 10

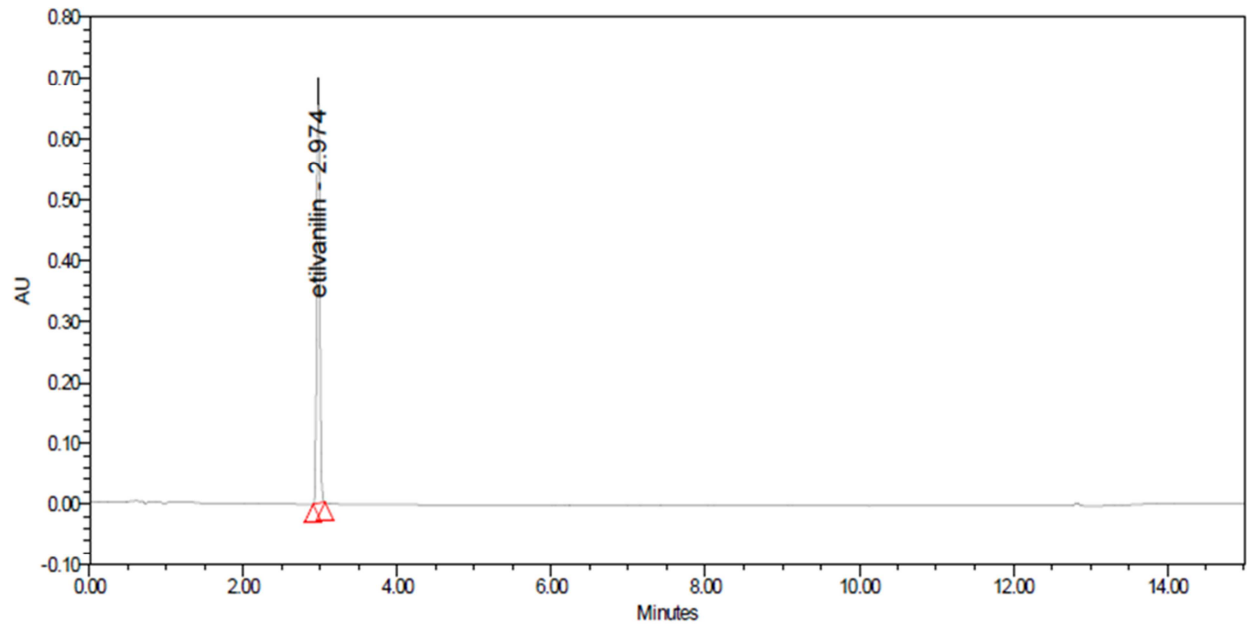


Slika 52. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima Tg 65 i tg 10

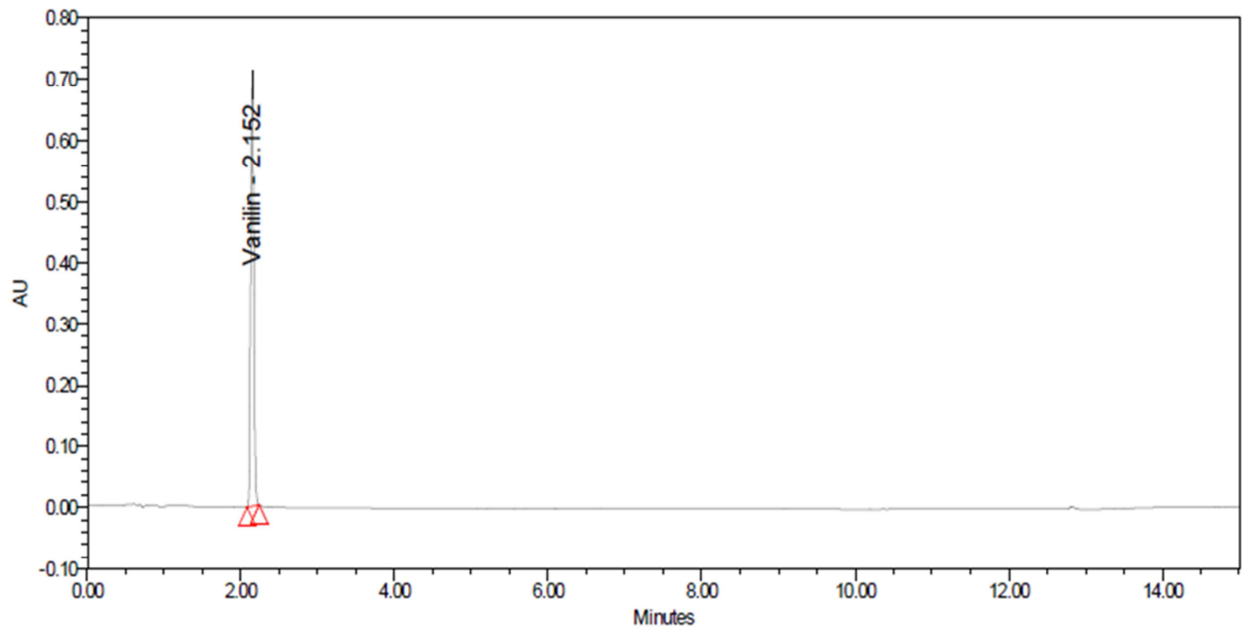


Slika 53. Kromatogram ENT pri uvjetima Tg 65 i tg 10

8. Dodatak

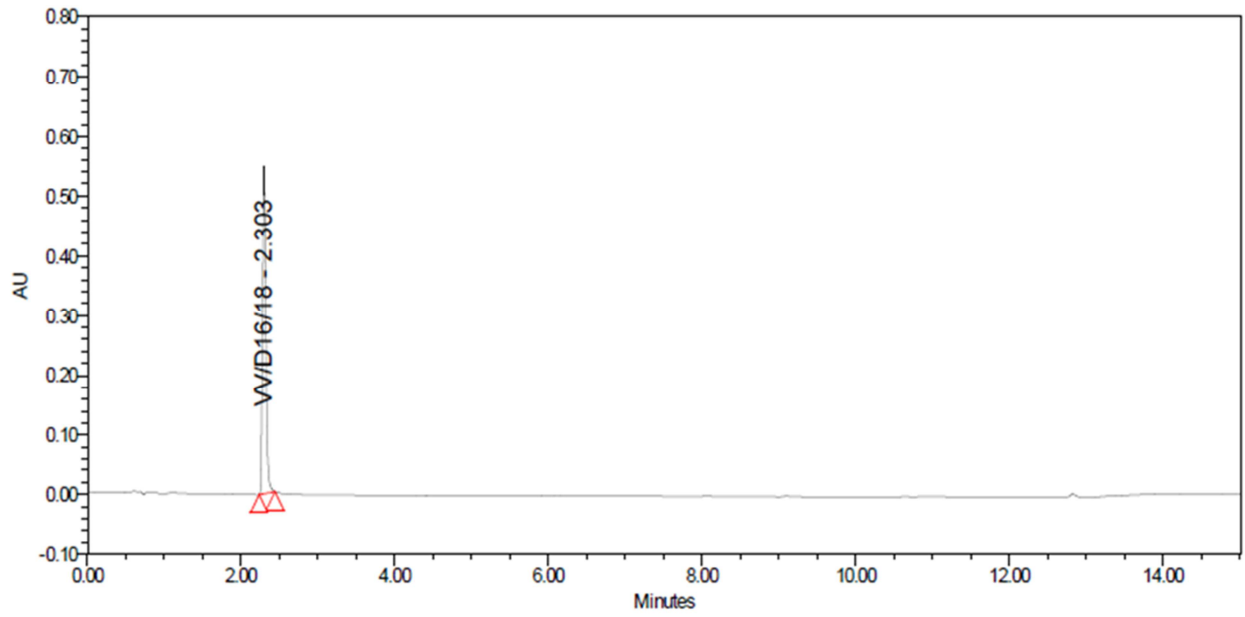


Slika 54. Kromatogram etilvanilina pri uvjetima Tg 65 i tg 10

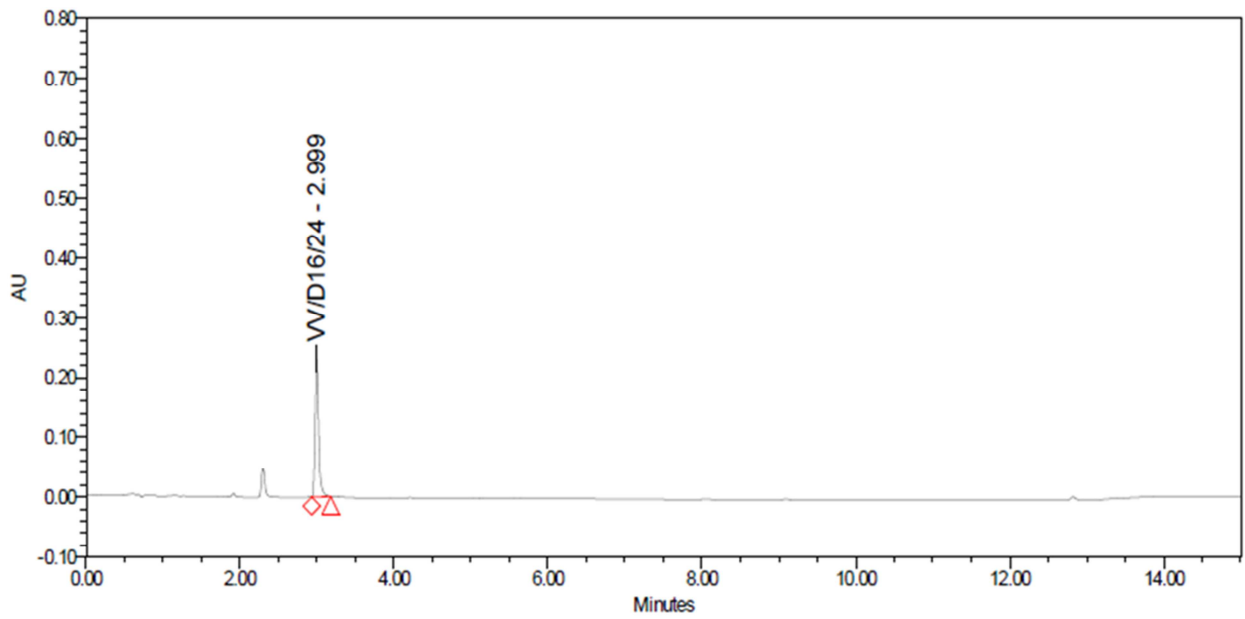


Slika 55. Kromatogram vanilina pri uvjetima Tg 65 i tg 10

8. Dodatak

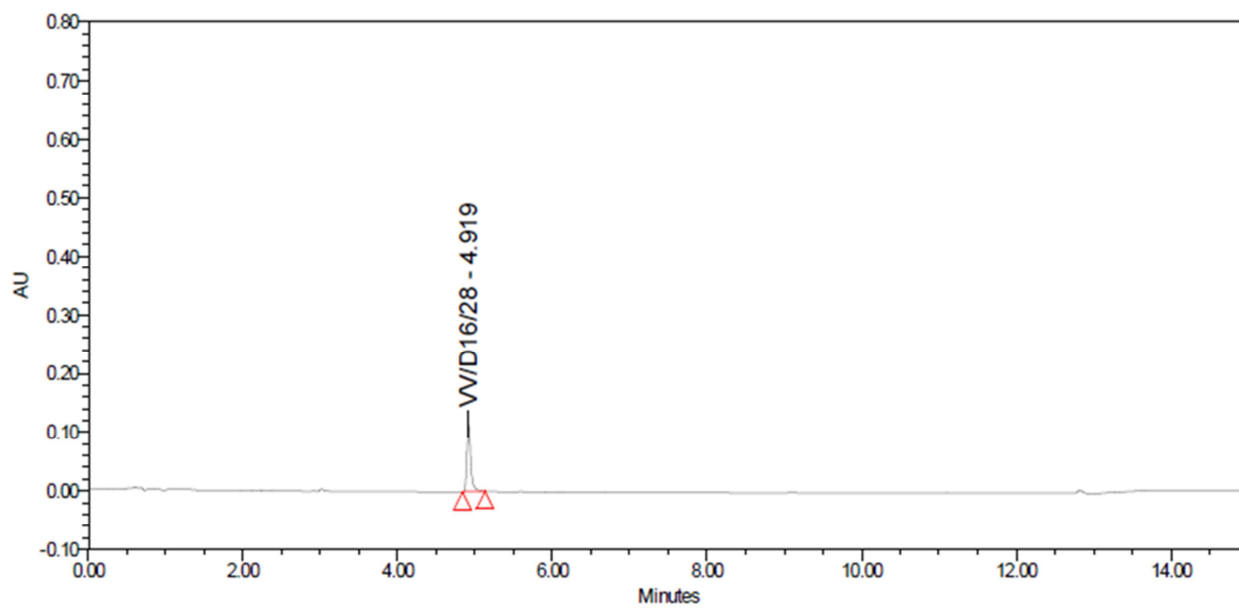


Slika 56. Kromatogram VV/D16/18 pri uvjetima Tg 65 i tg 10

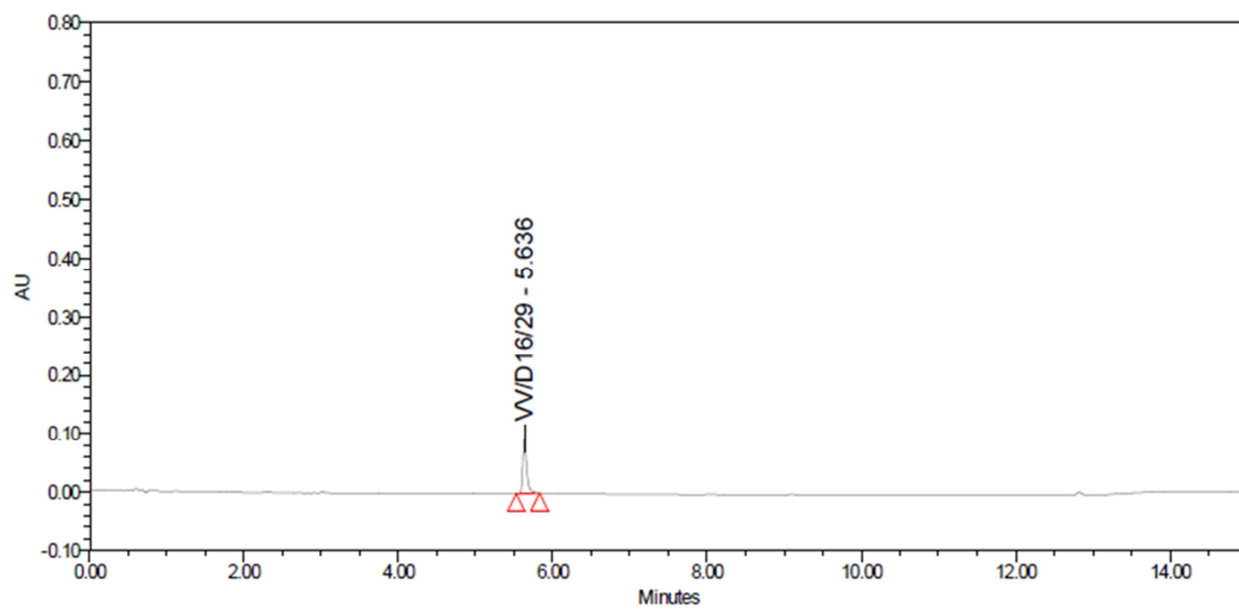


Slika 57. Kromatogram VV/D16/24 pri uvjetima Tg 65 i tg 10

8. Dodatak

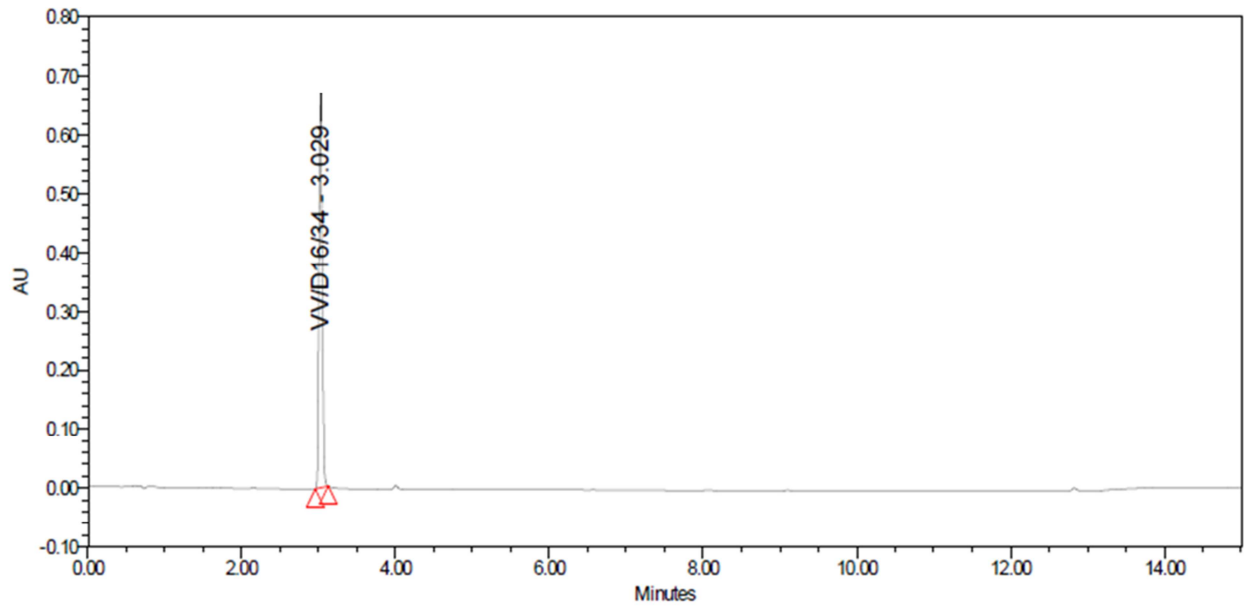


Slika 58. Kromatogram VV/D16/28 pri uvjetima Tg 65 i tg 10

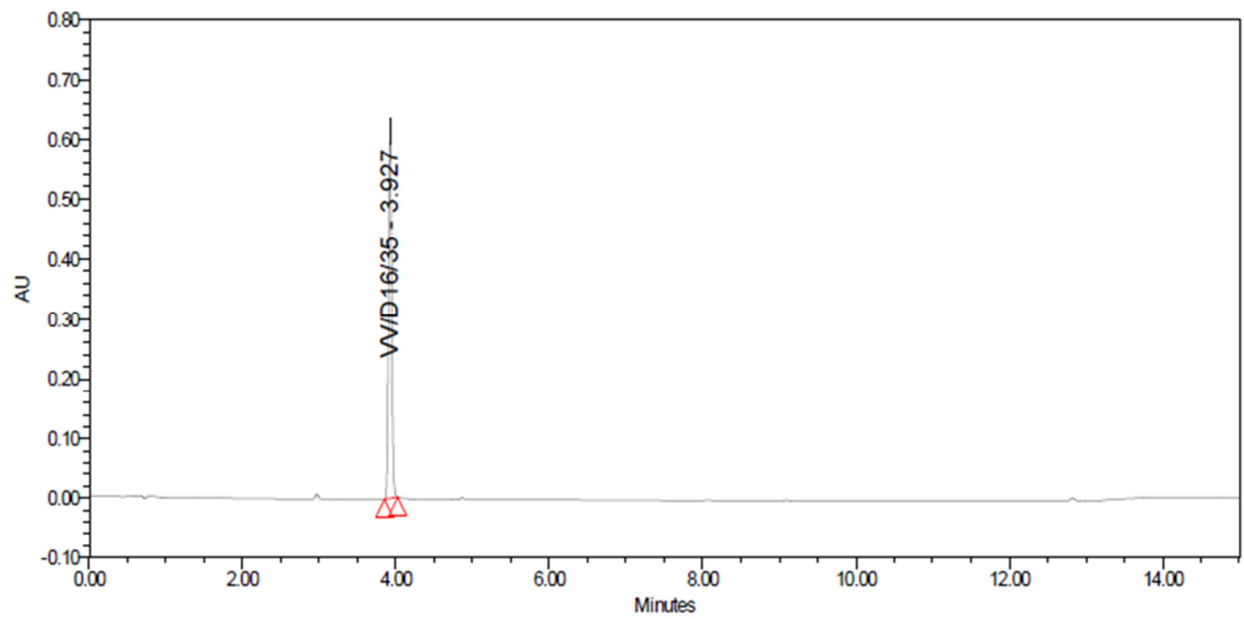


Slika 59. Kromatogram VV/D16/29 pri uvjetima Tg 65 i tg 10

8. Dodatak



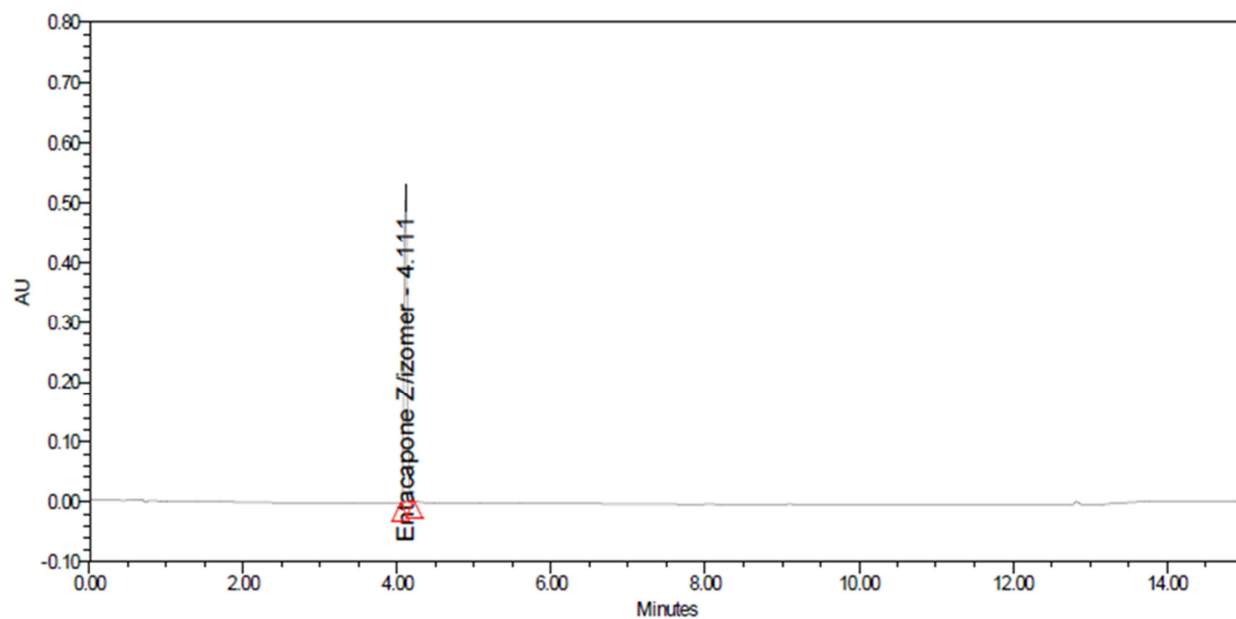
Slika 60. Kromatogram VV/D16/34 pri uvjetima Tg 65 i tg 10



Slika 61. Kromatogram VV/D16/35 pri uvjetima Tg 65 i tg 10

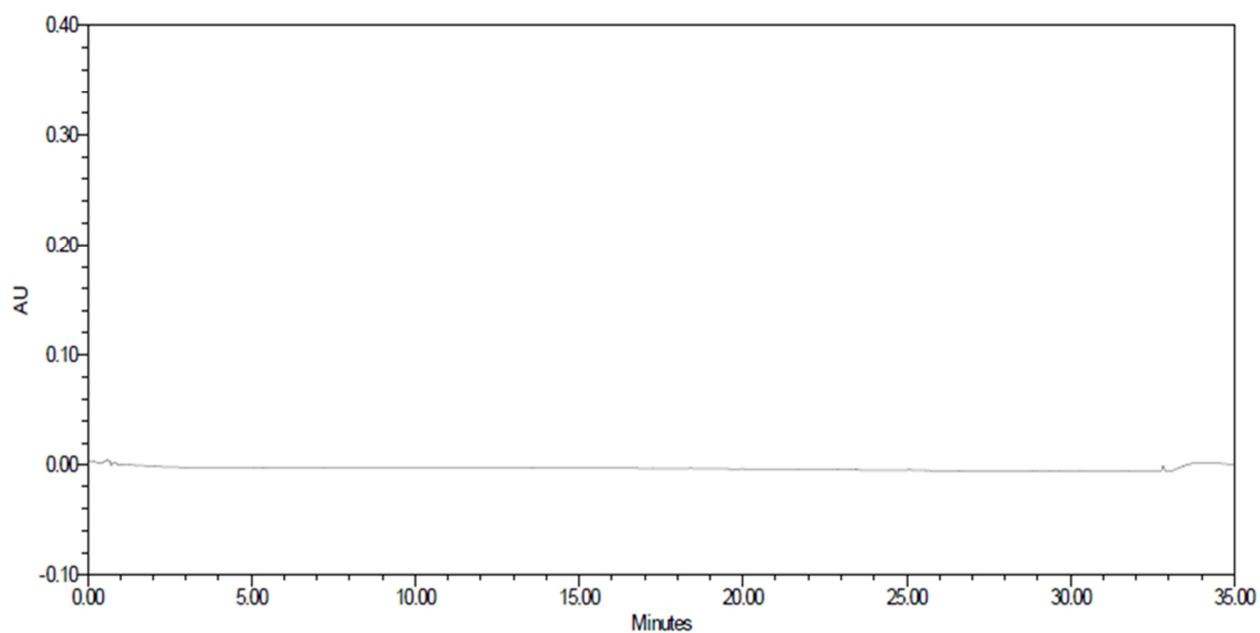


## 8. Dodatak



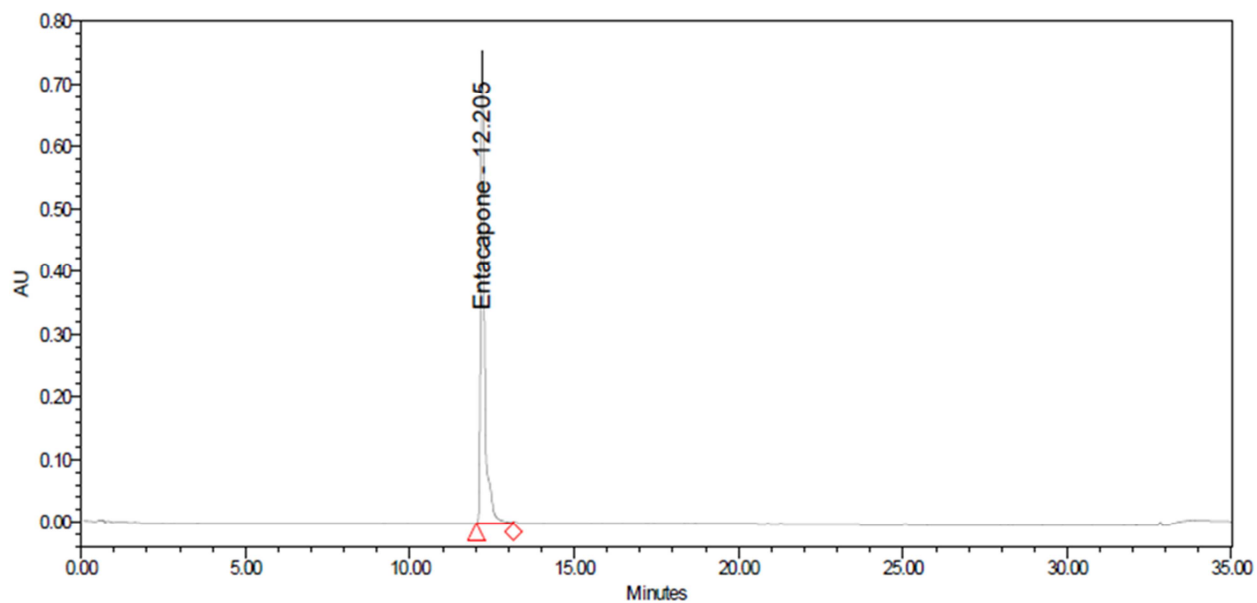
Slika 62. Kromatogram ENT Z/izomera pri uvjetima Tg 65 i tg 10

### 8.1.4. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 65 i tg 30

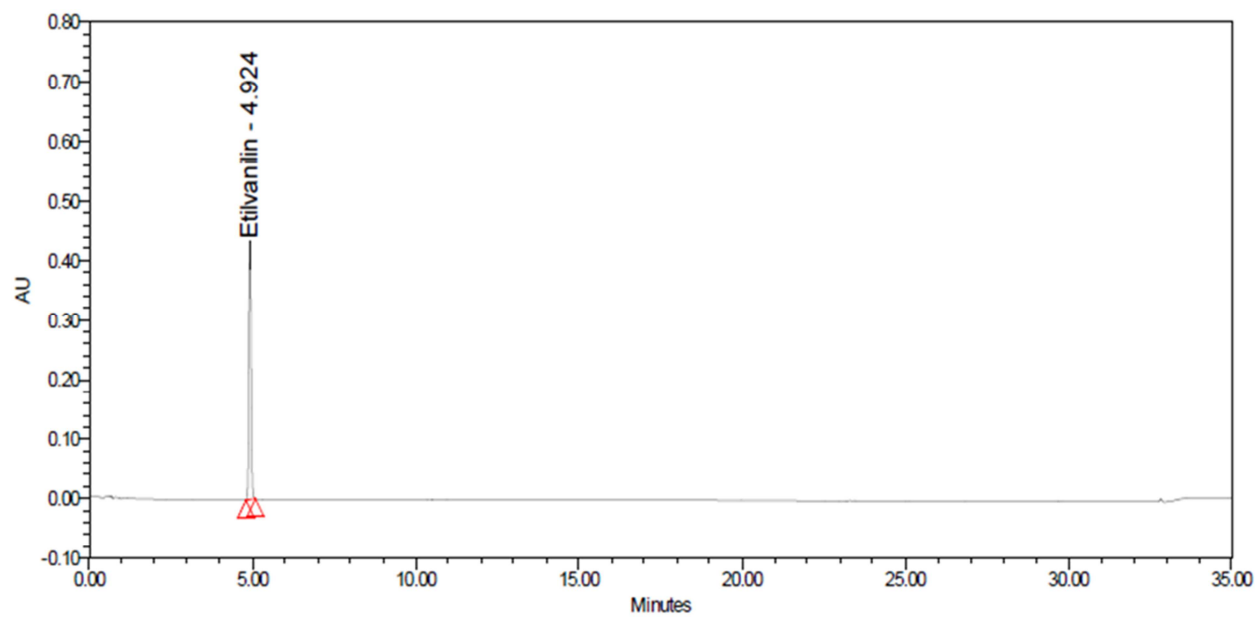


Slika 63. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima Tg 65 i tg 30

8. Dodatak

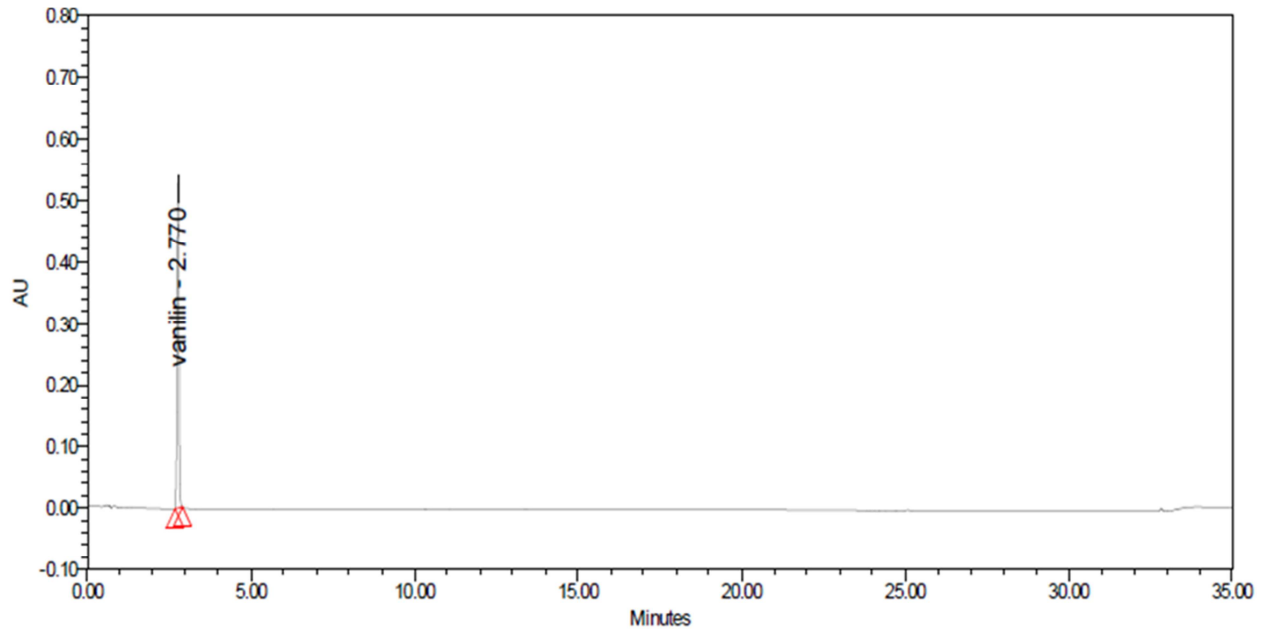


Slika 64. Kromatogram ENT pri uvjetima Tg 65 i tg 30

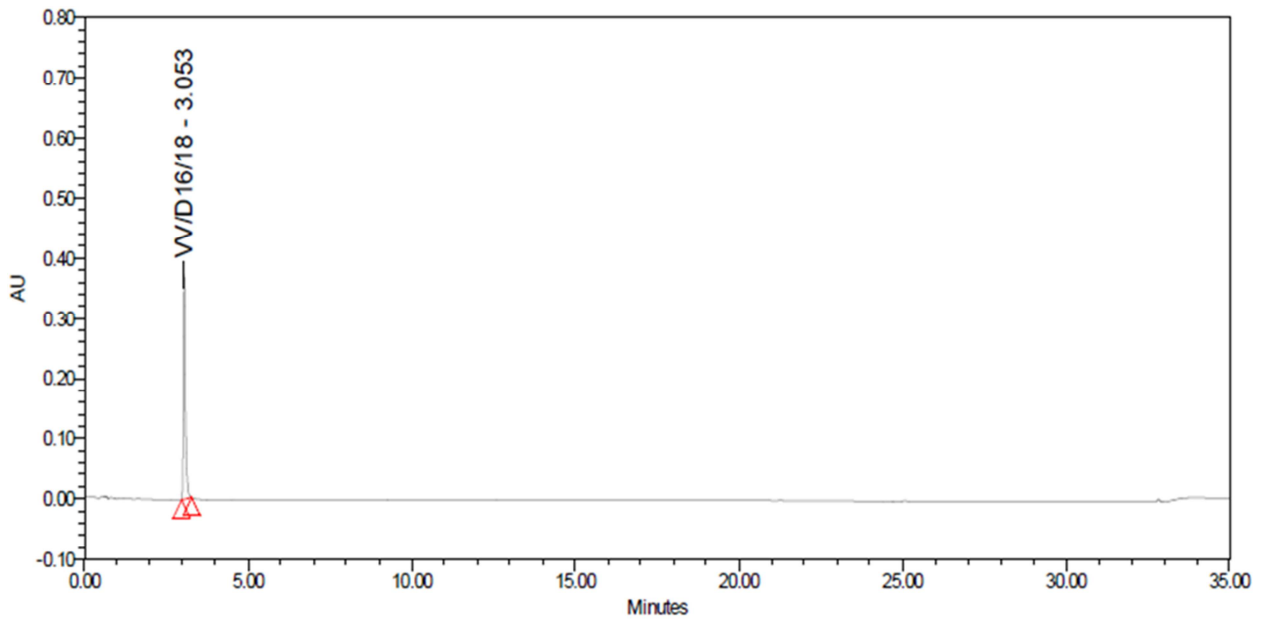


Slika 65. Kromatogram etilvanilina pri uvjetima Tg 65 i tg 30

8. Dodatak

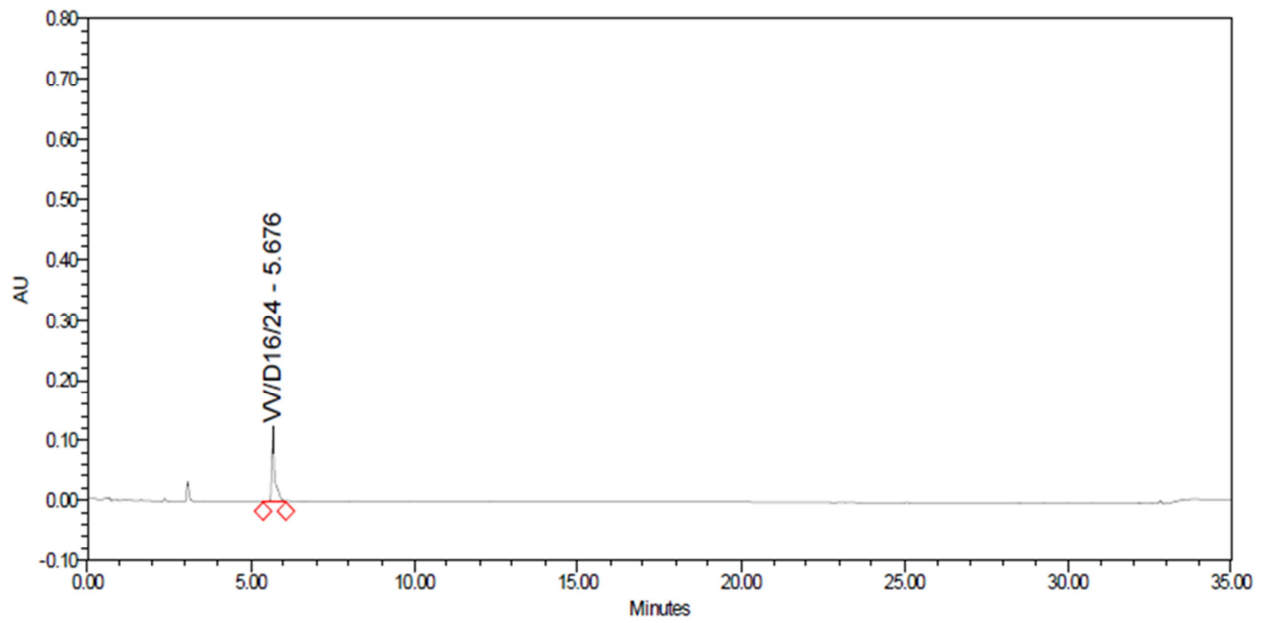


Slika 66. Kromatogram vanilina pri uvjetima Tg 65 i tg 30

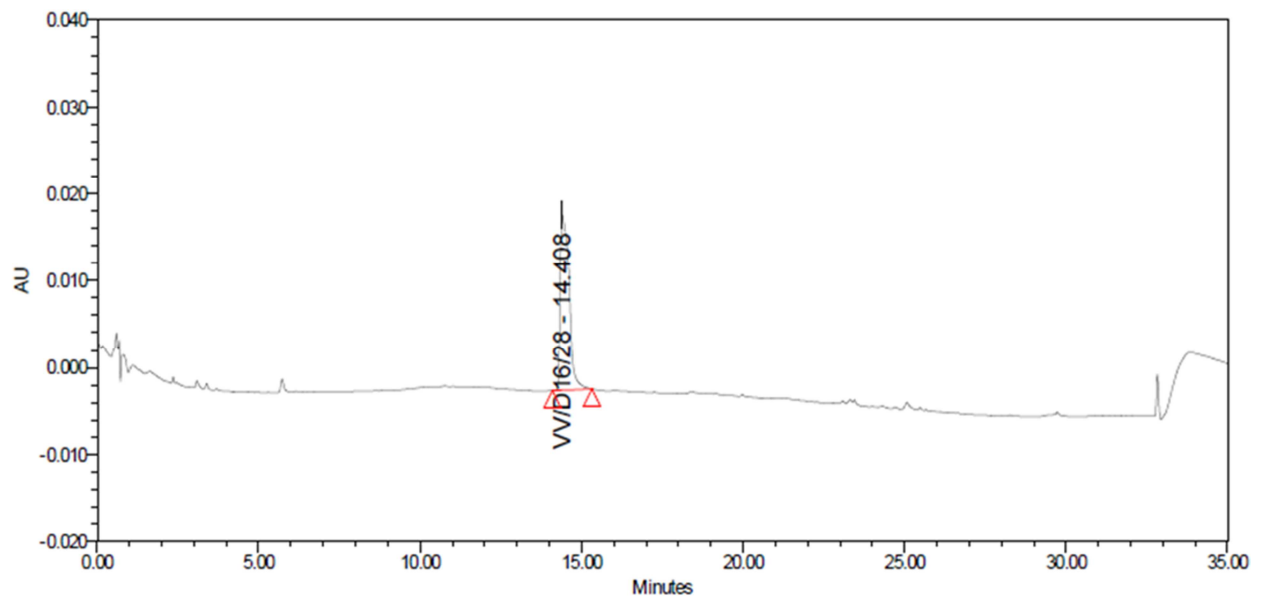


Slika 67. Kromatogram VV/D16/18 pri uvjetima Tg 65 i tg 30

8. Dodatak

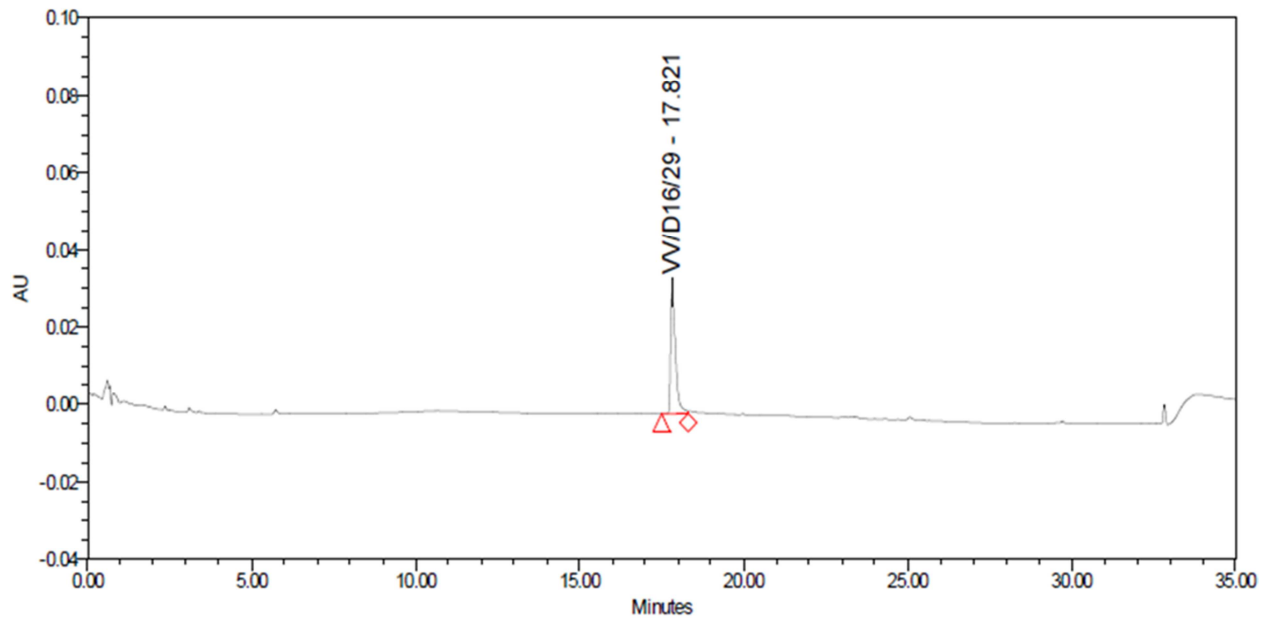


Slika 68. Kromatogram VV/D16/24 pri uvjetima Tg 65 i tg 30

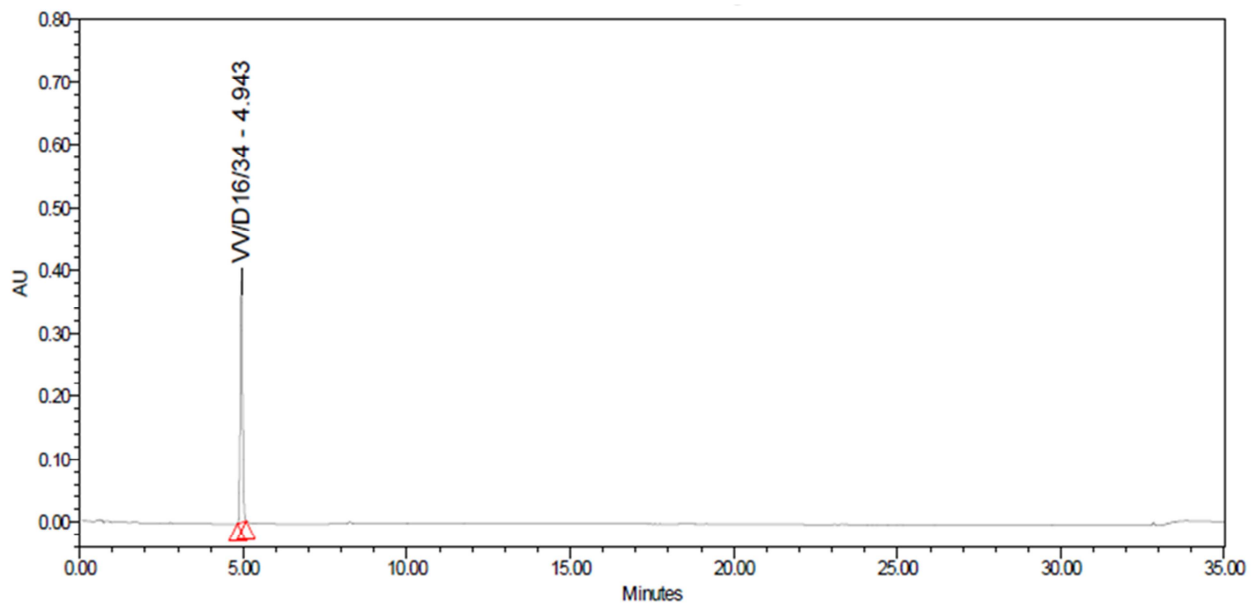


Slika 69. Kromatogram VV/D16/28 pri uvjetima Tg 65 i tg 30

8. Dodatak

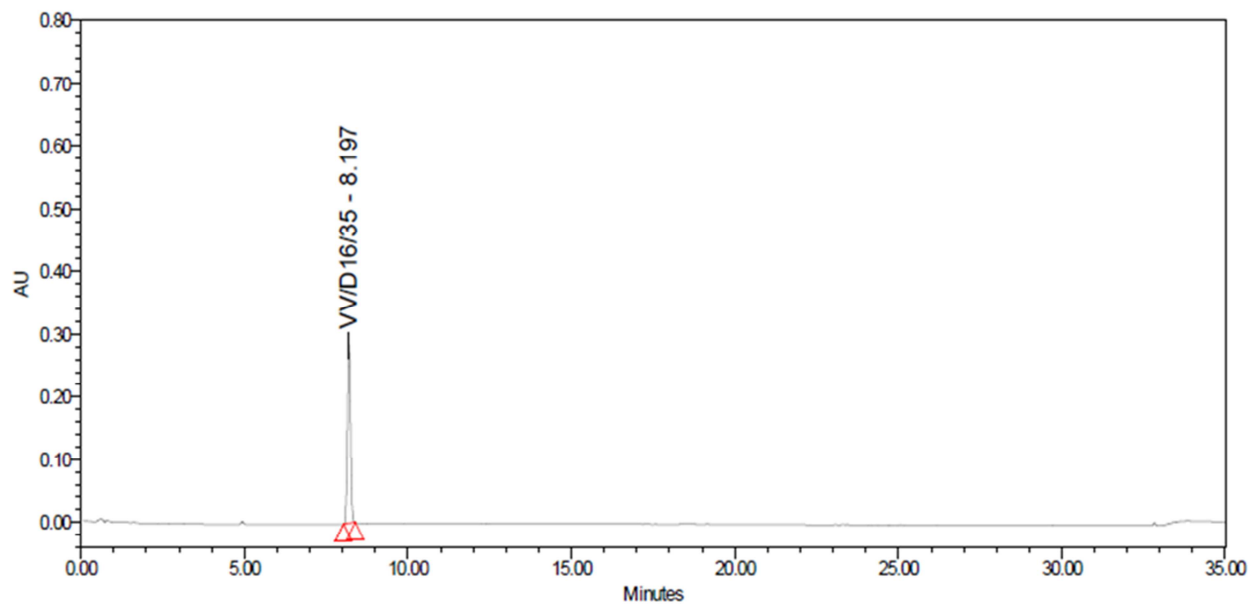


Slika 70. Kromatogram VV/D16/29 pri uvjetima Tg 65 i tg 30

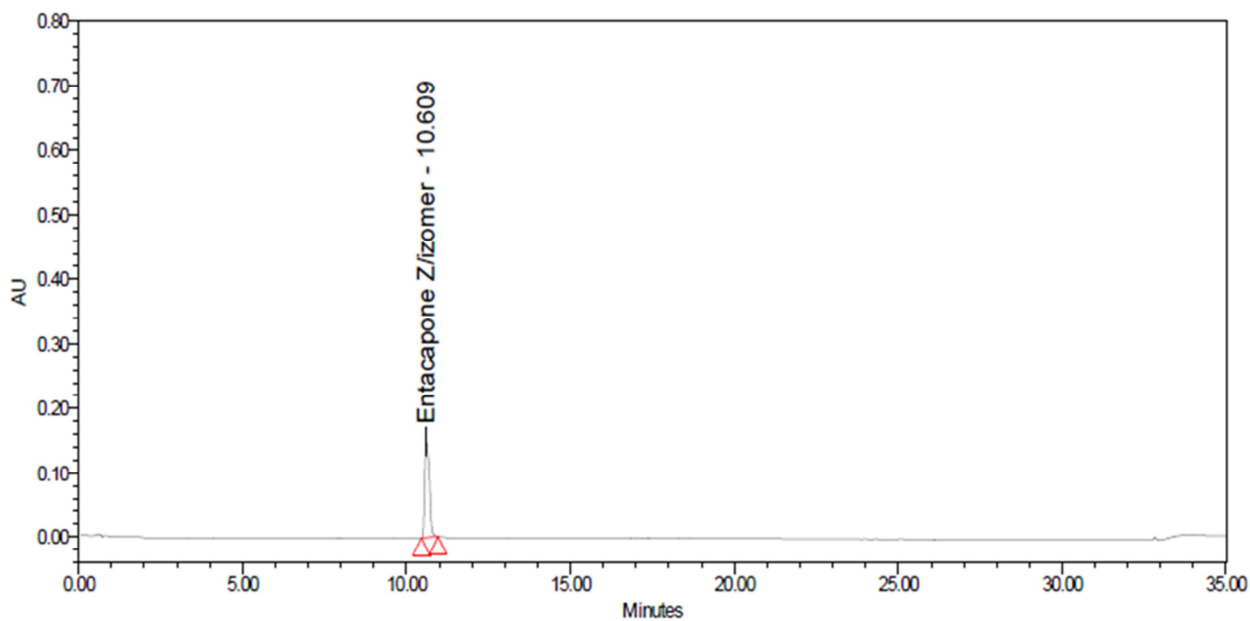


Slika 71. Kromatogram VV/D16/34 pri uvjetima Tg 65 i tg 30

8. Dodatak

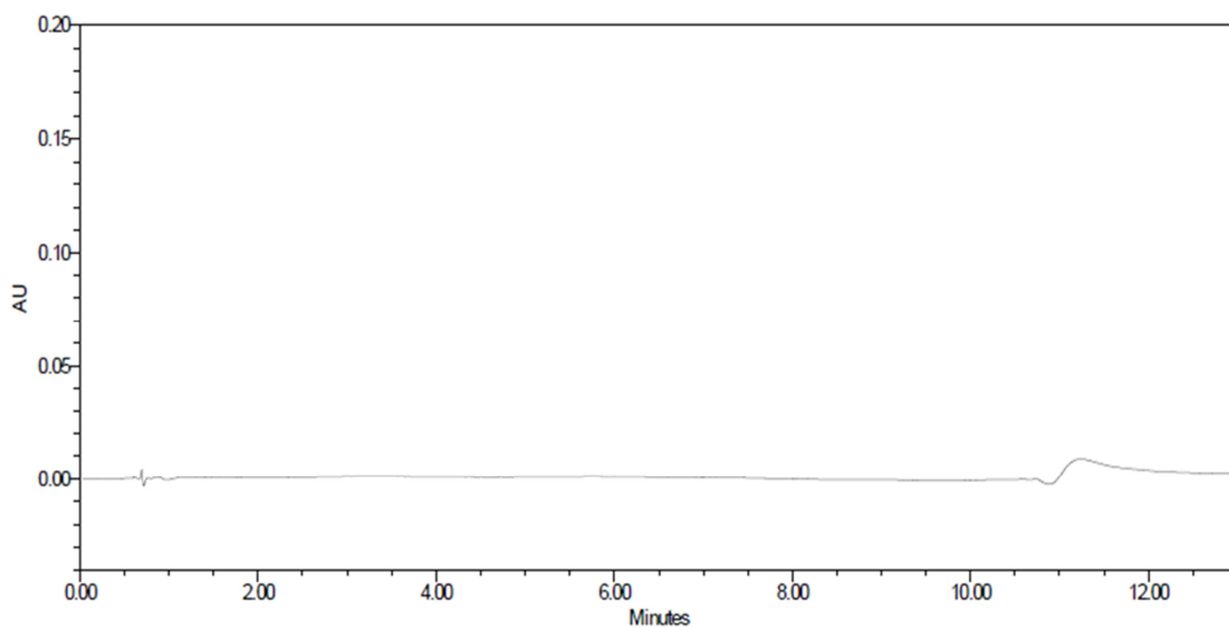


Slika 72. Kromatogram VV/D16/35 pri uvjetima Tg 65 i tg 30

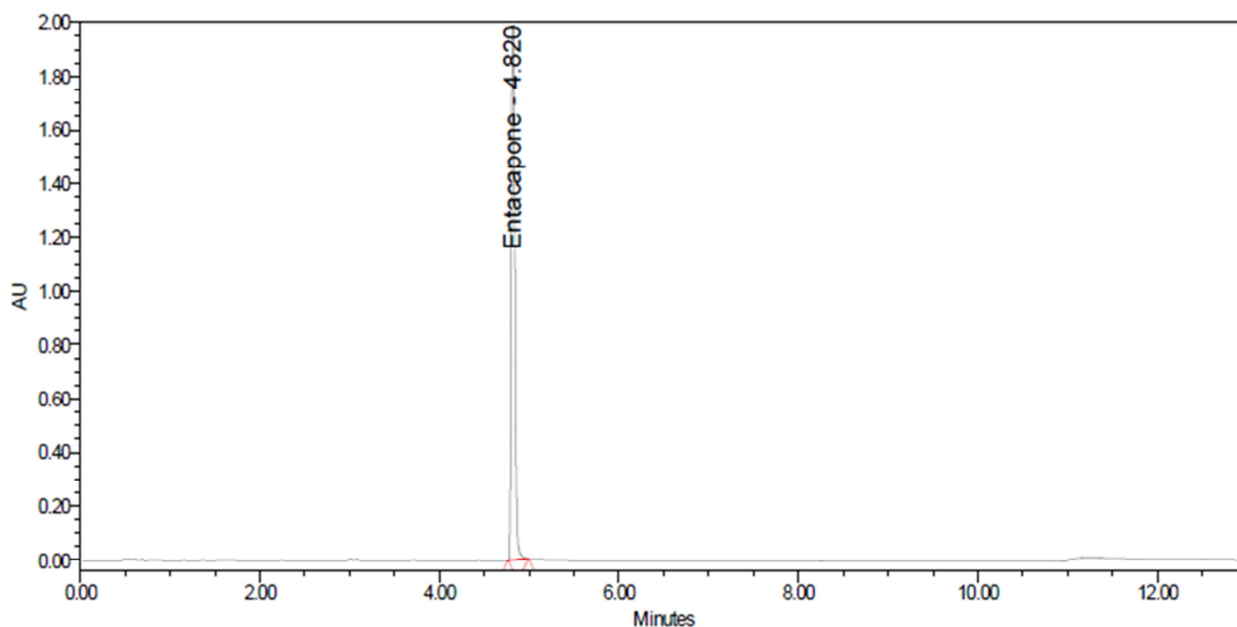


Slika 73. Kromatogram ENT Z/izomera pri uvjetima Tg 65 i tg 30

### 8.1.5. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

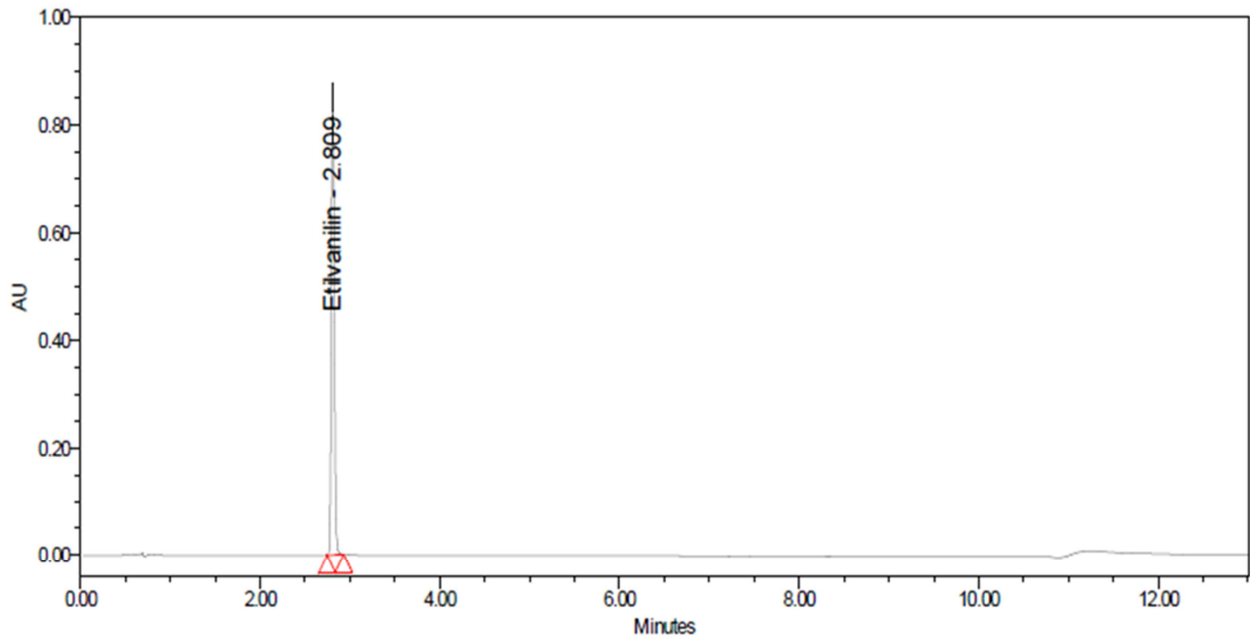


Slika 74. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

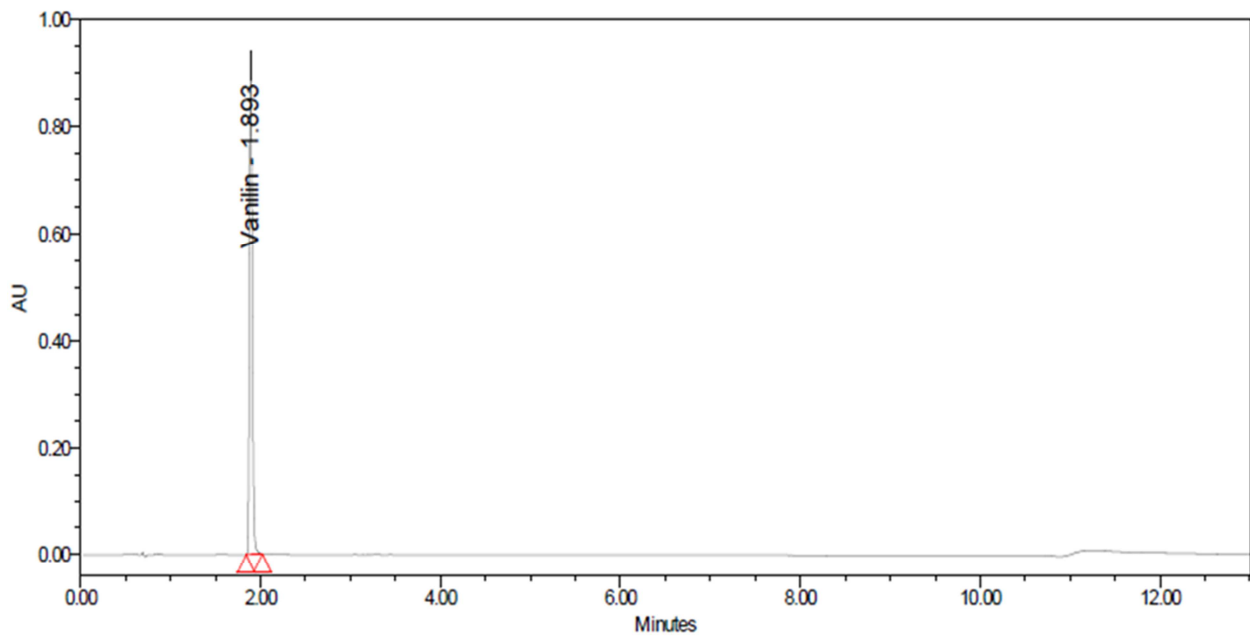


Slika 75. Kromatogram ENT pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

8. Dodatak



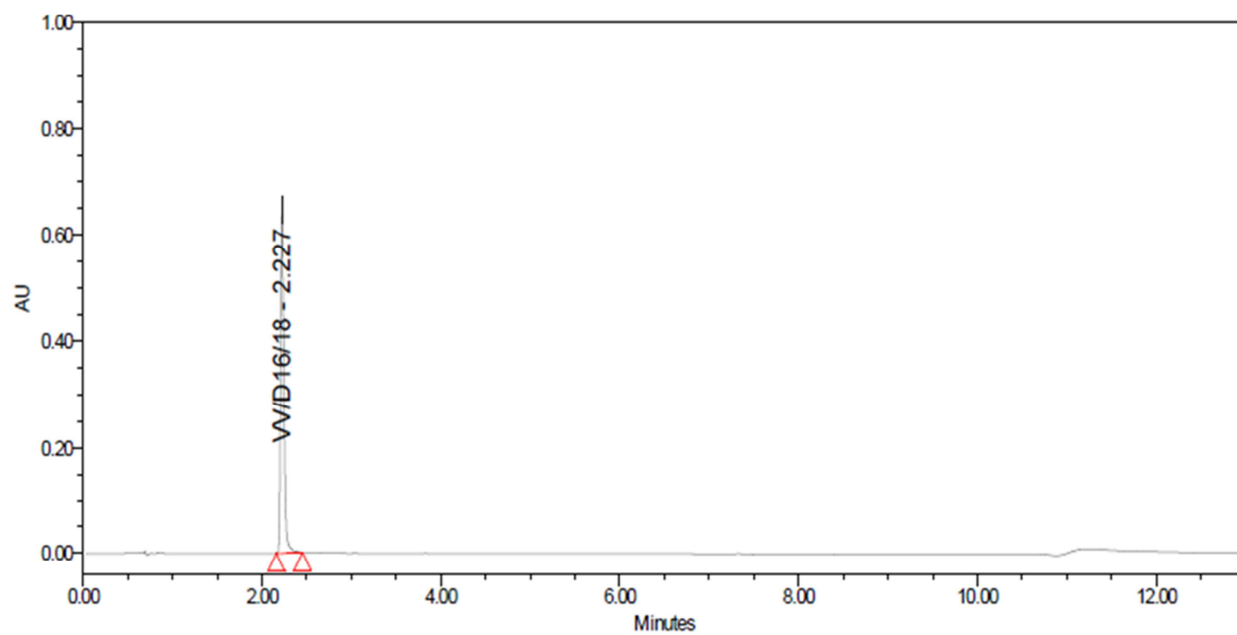
Slika 76. Kromatogram etilvanilina pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2



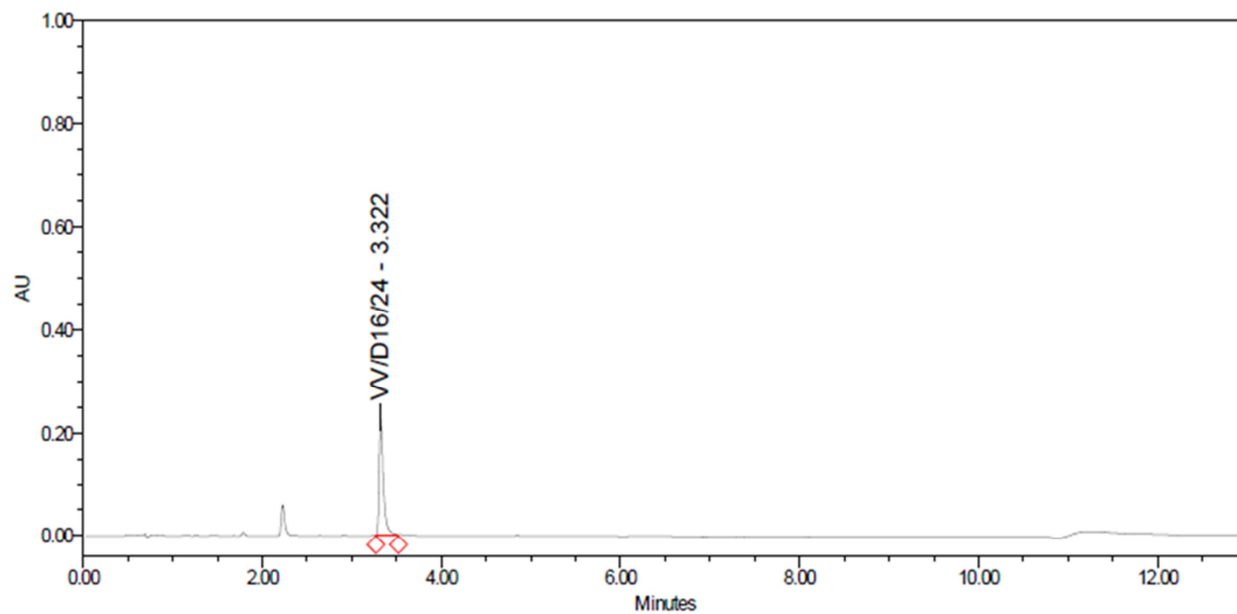
Slika 77. Kromatogram vanilina pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2



8. Dodatak

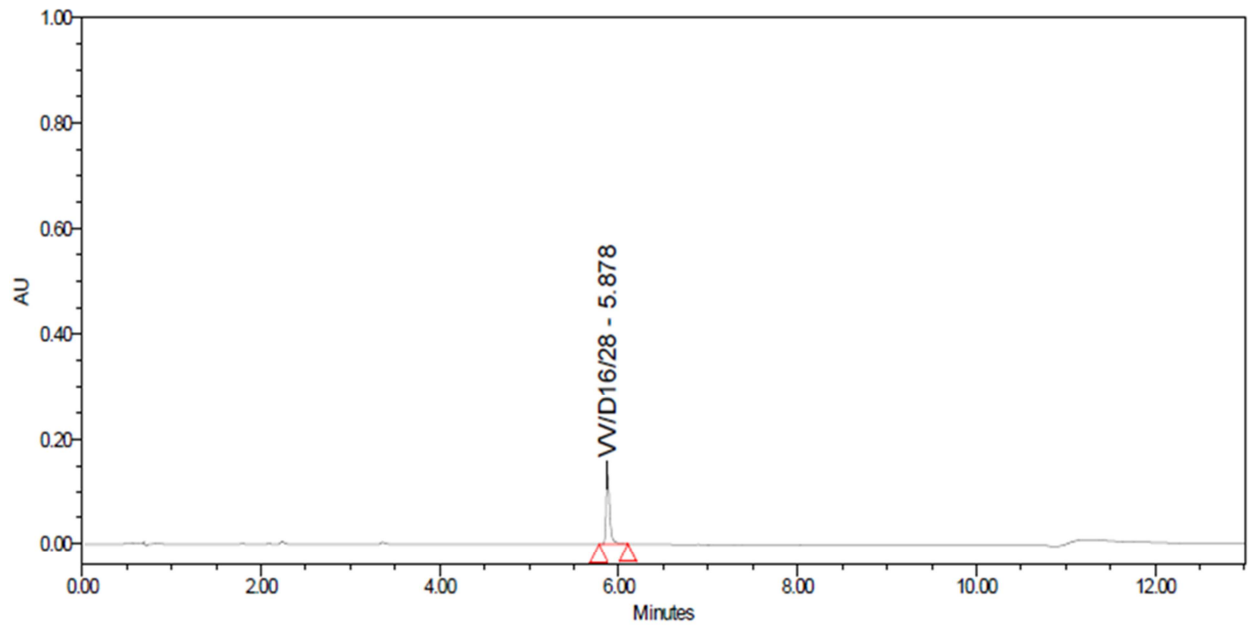


Slika 78. Kromatogram VV/D16/18 pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

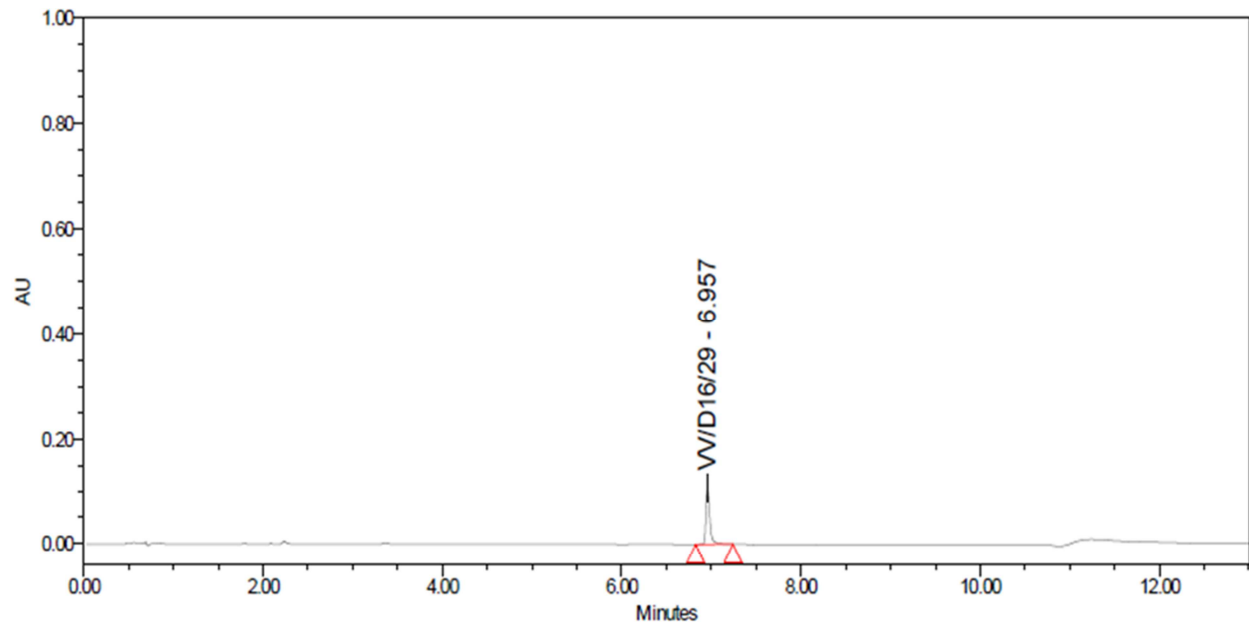


Slika 79. Kromatogram VV/D16/24 pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

8. Dodatak

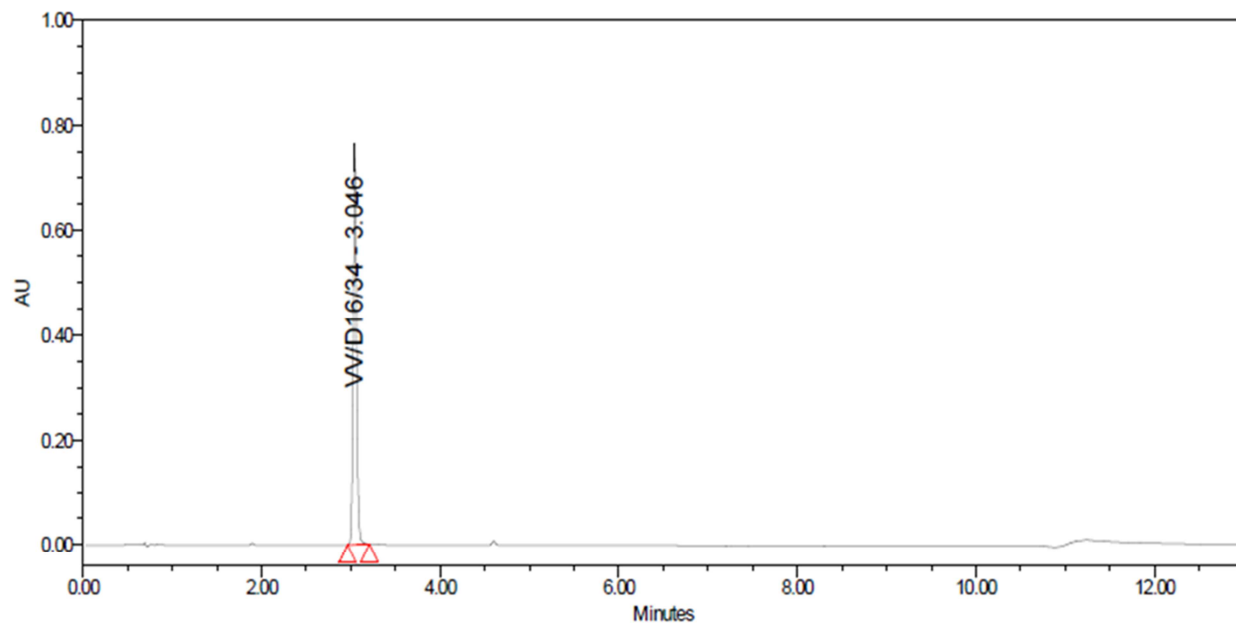


Slika 80. Kromatogram VV/D16/28 pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

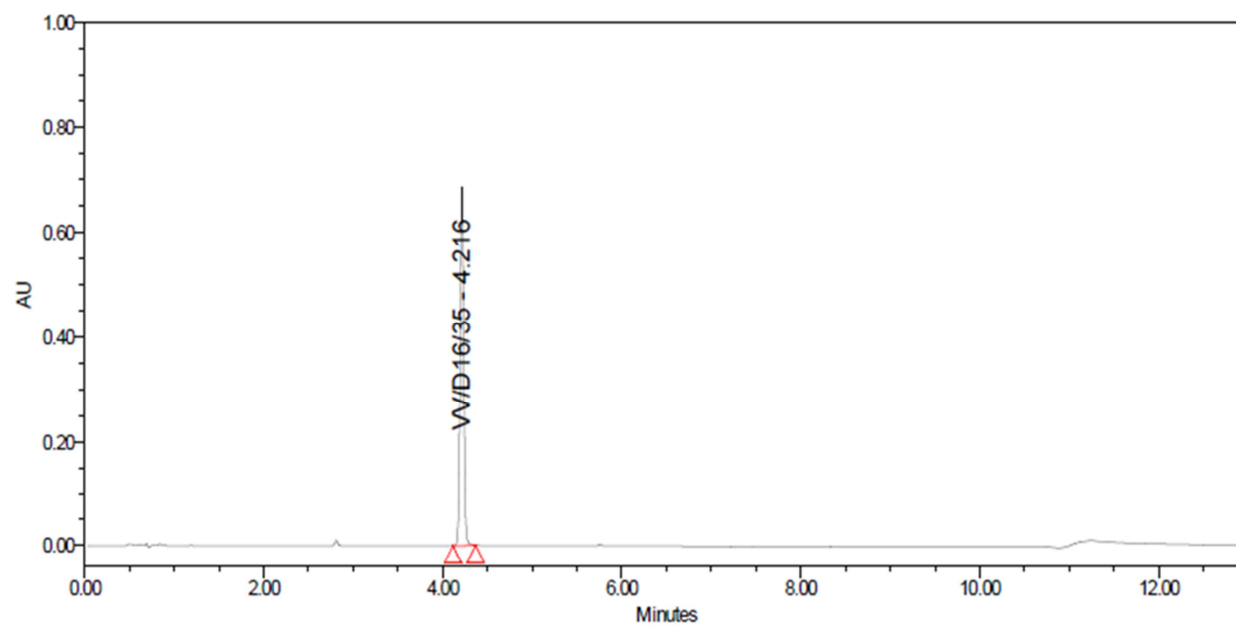


Slika 81. Kromatogram VV/D16/29 pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

8. Dodatak

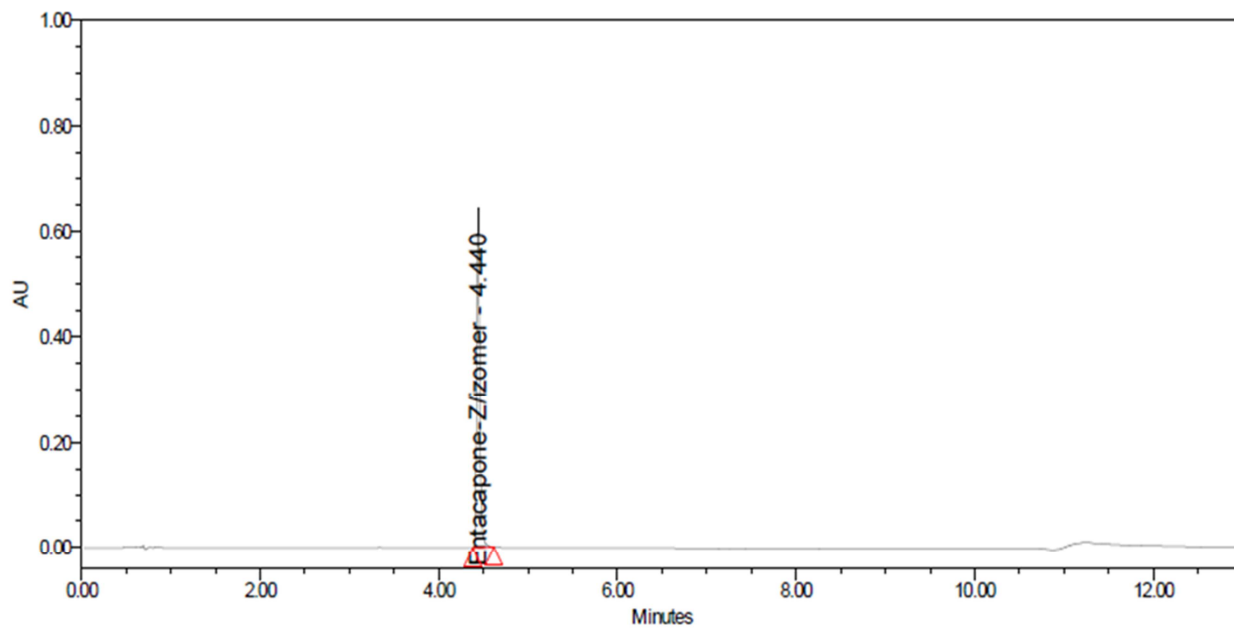


Slika 82. Kromatogram VV/D16/34 pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2



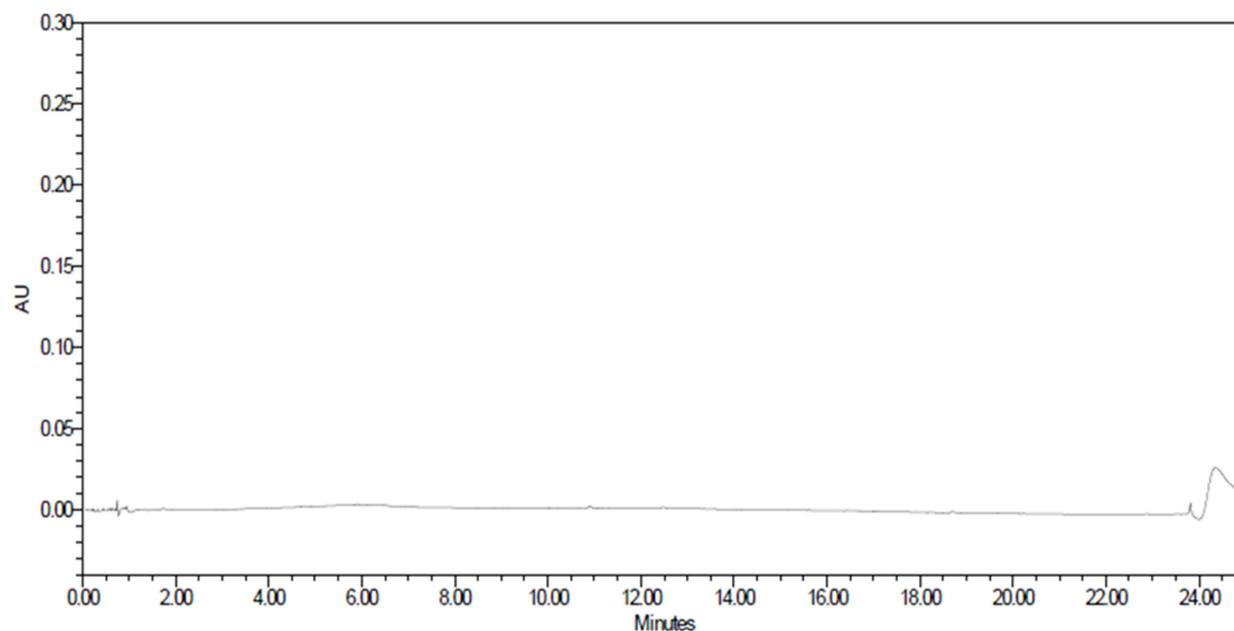
Slika 83. Kromatogram VV/D16/35 pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

## 8. Dodatak



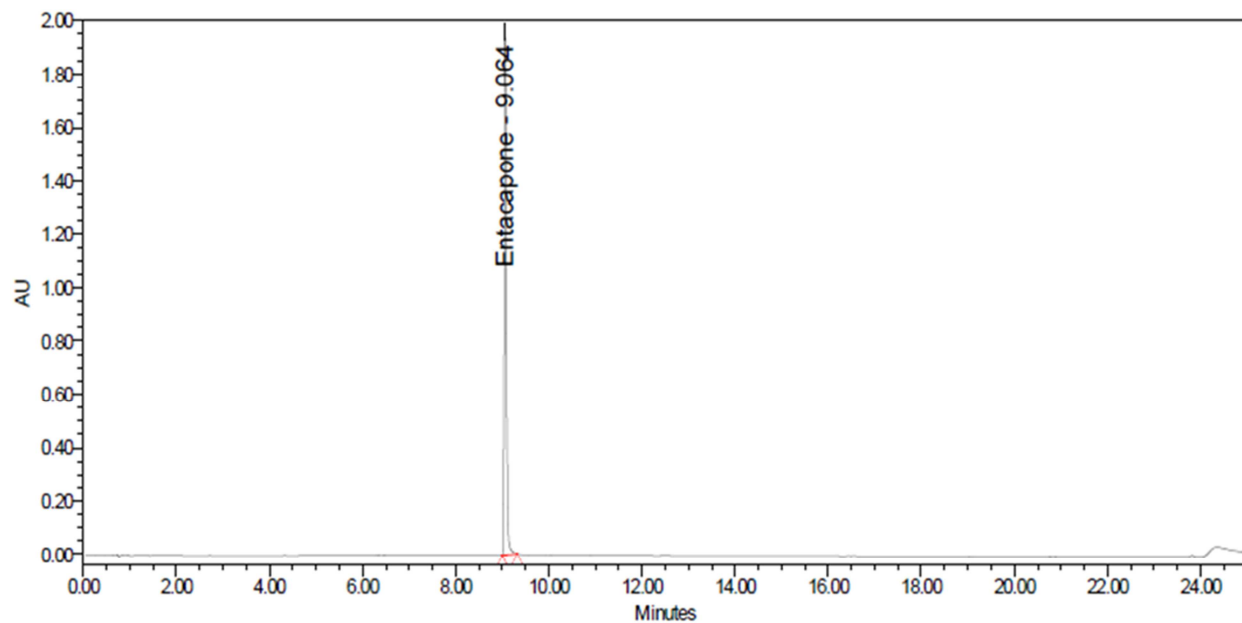
Slika 84. Kromatogram ENT Z/izomera pri uvjetima Tg 45 i tg 8,2

### 8.1.6. Kromatogrami pojedinačnih uzoraka pri uvjetima Tg 42 i tg 23

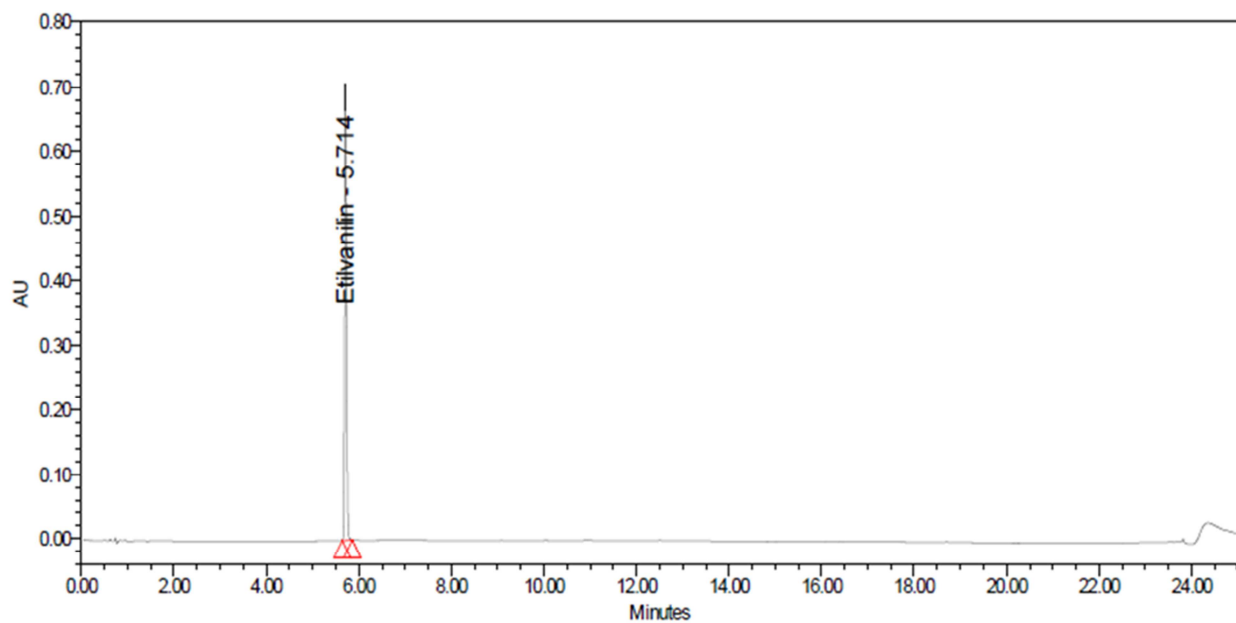


Slika 85. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima Tg 42 i tg 23

8. Dodatak

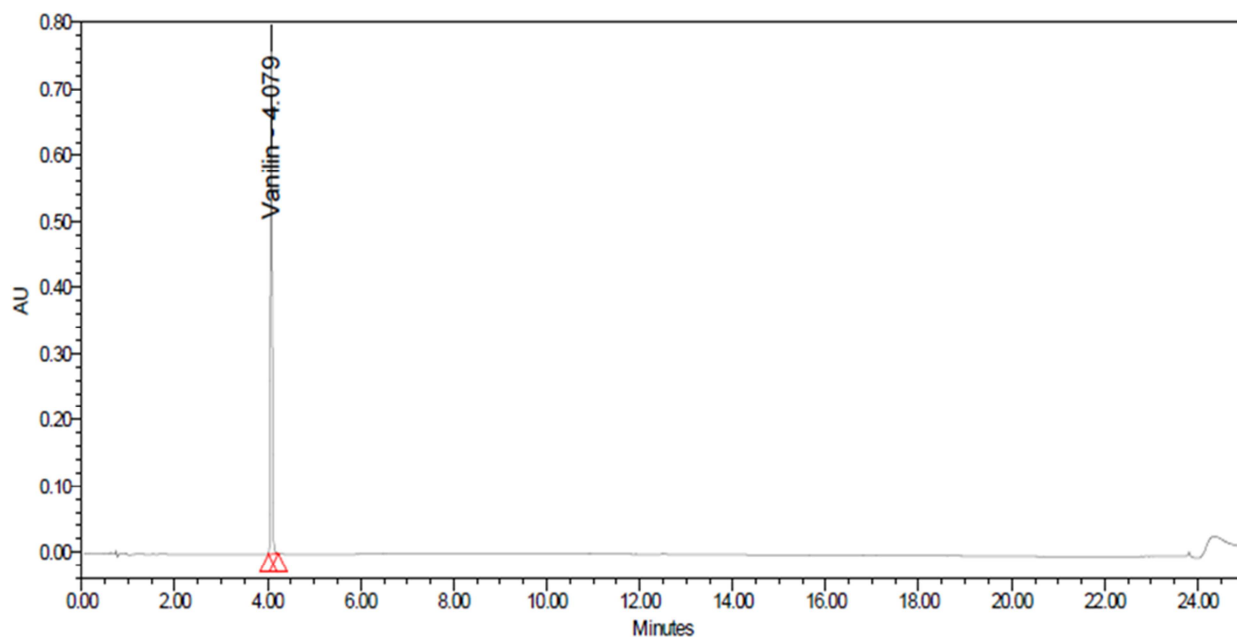


Slika 86. Kromatogram ENT pri uvjetima Tg 42 i tg 23

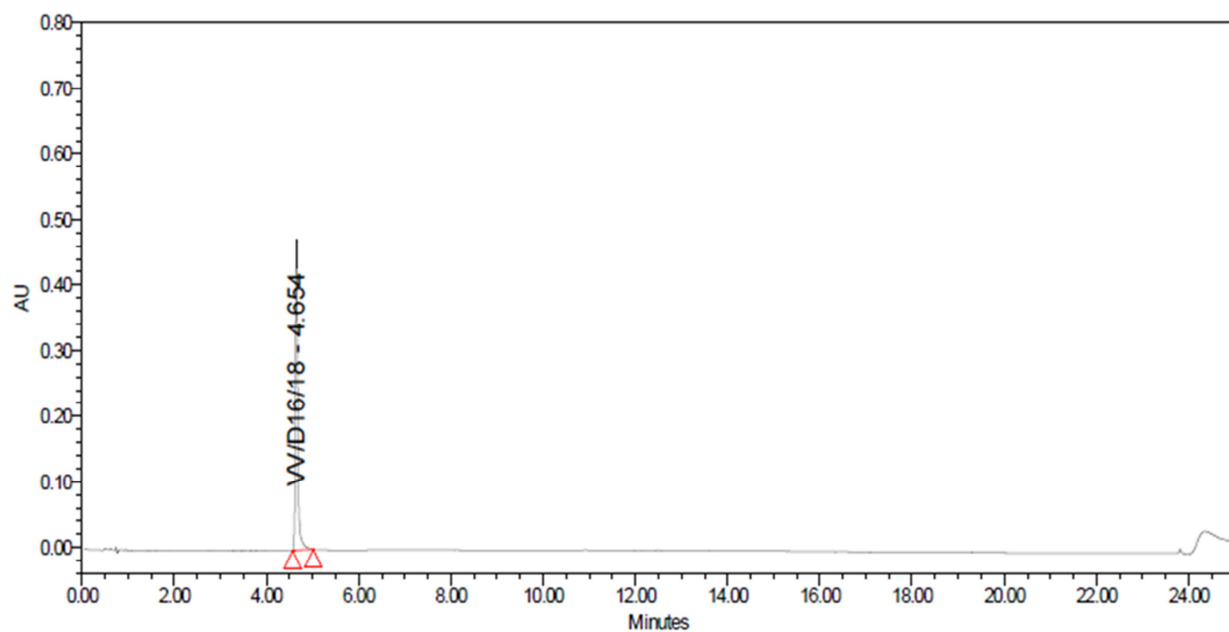


Slika 87. Kromatogram etilvanilina pri uvjetima Tg 42 i tg 23

8. Dodatak

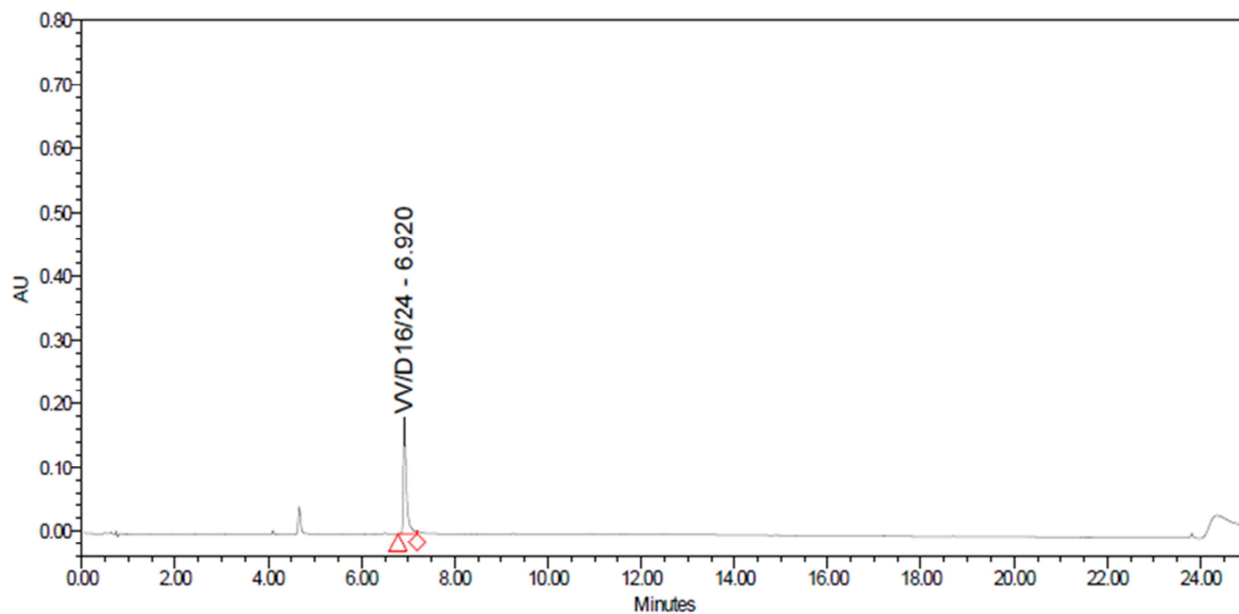


Slika 88. Kromatogram vanilina pri uvjetima Tg 42 i tg 23

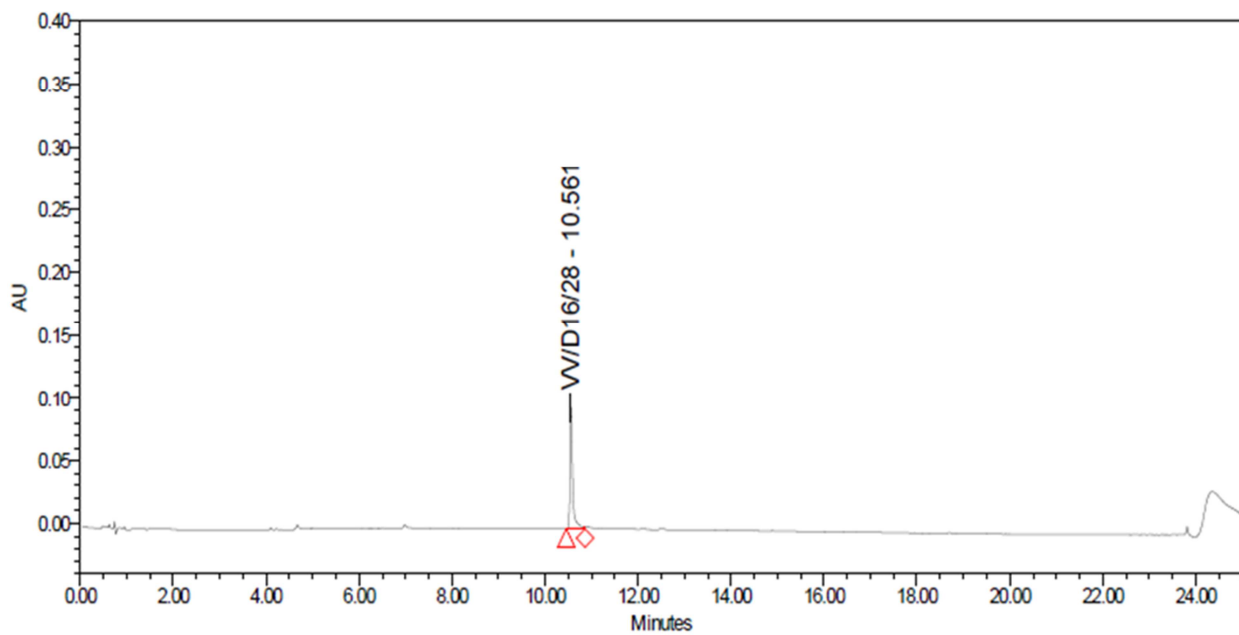


Slika 89. Kromatogram VV/D16/18 pri uvjetima Tg 42 i tg 23

8. Dodatak

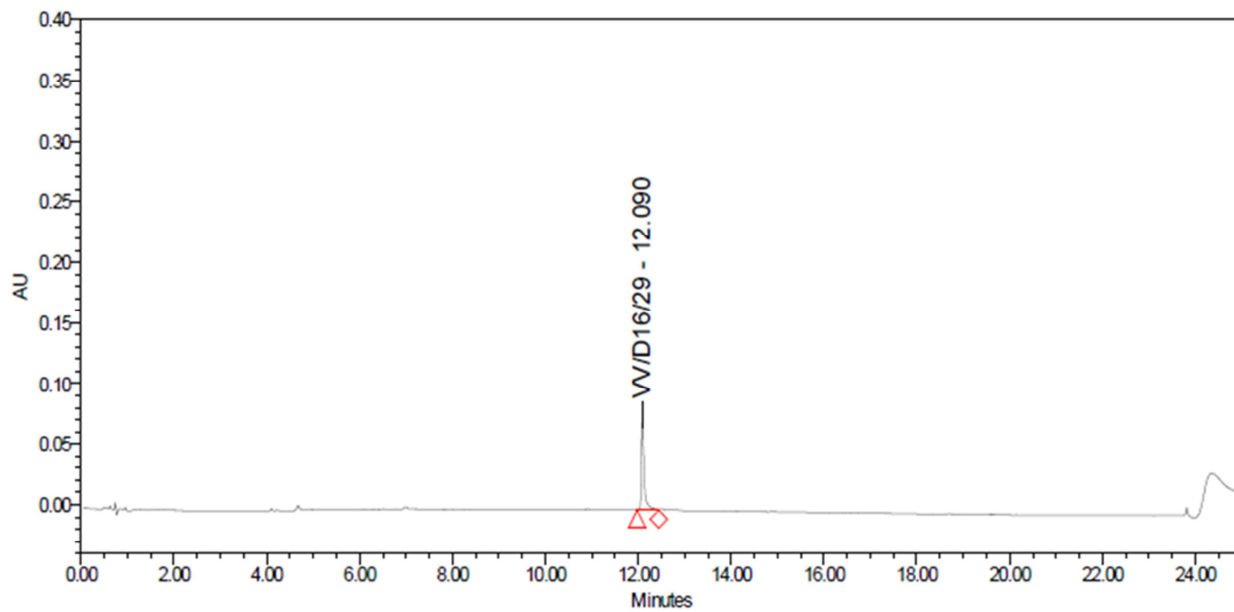


Slika 90. Kromatogram VV/D16/24 pri uvjetima Tg 42 i tg 23

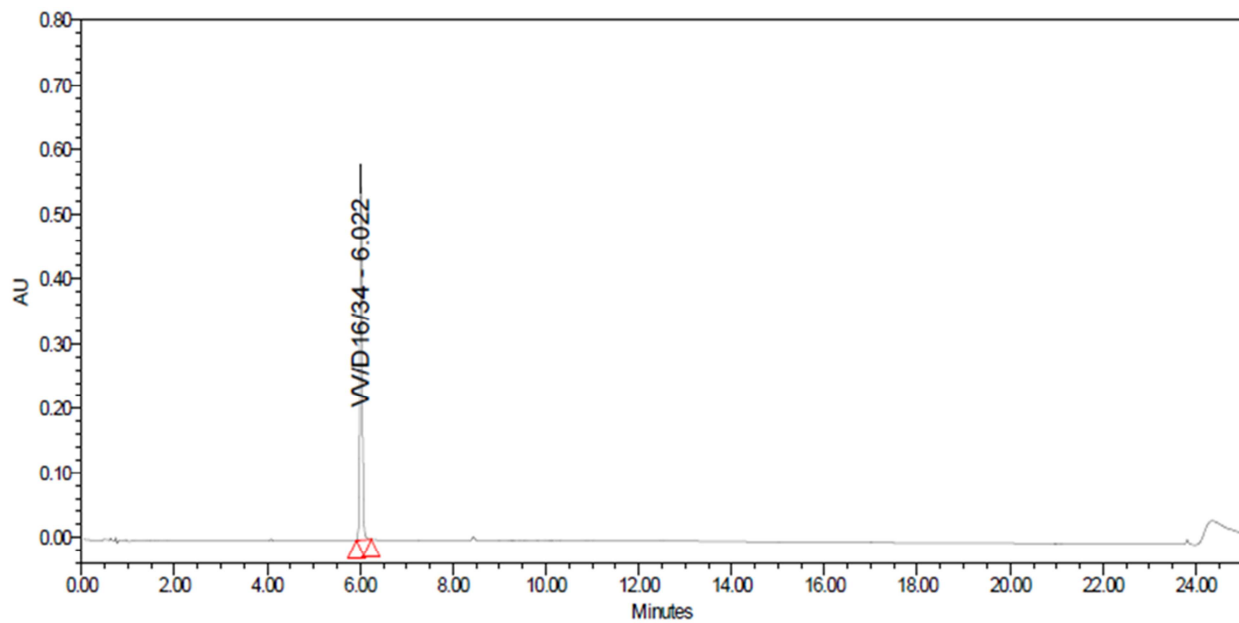


Slika 91. Kromatogram VV/D16/28 pri uvjetima Tg 42 i tg 23

8. Dodatak



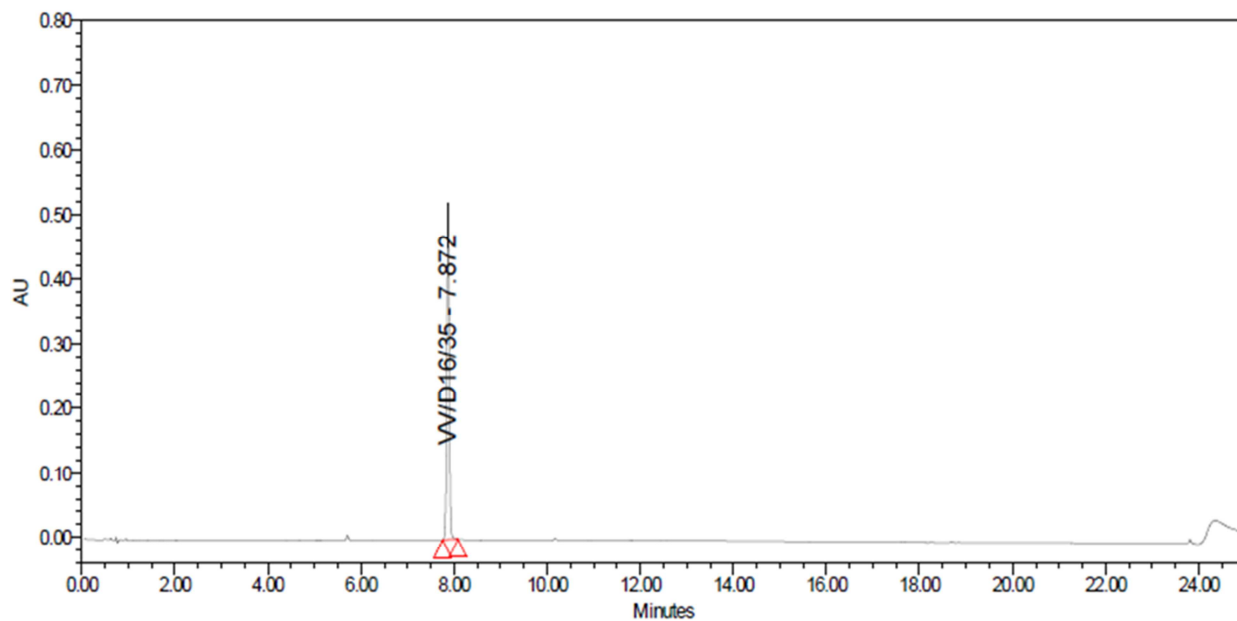
Slika 92. Kromatogram VV/D16/29 pri uvjetima Tg 42 i tg 23



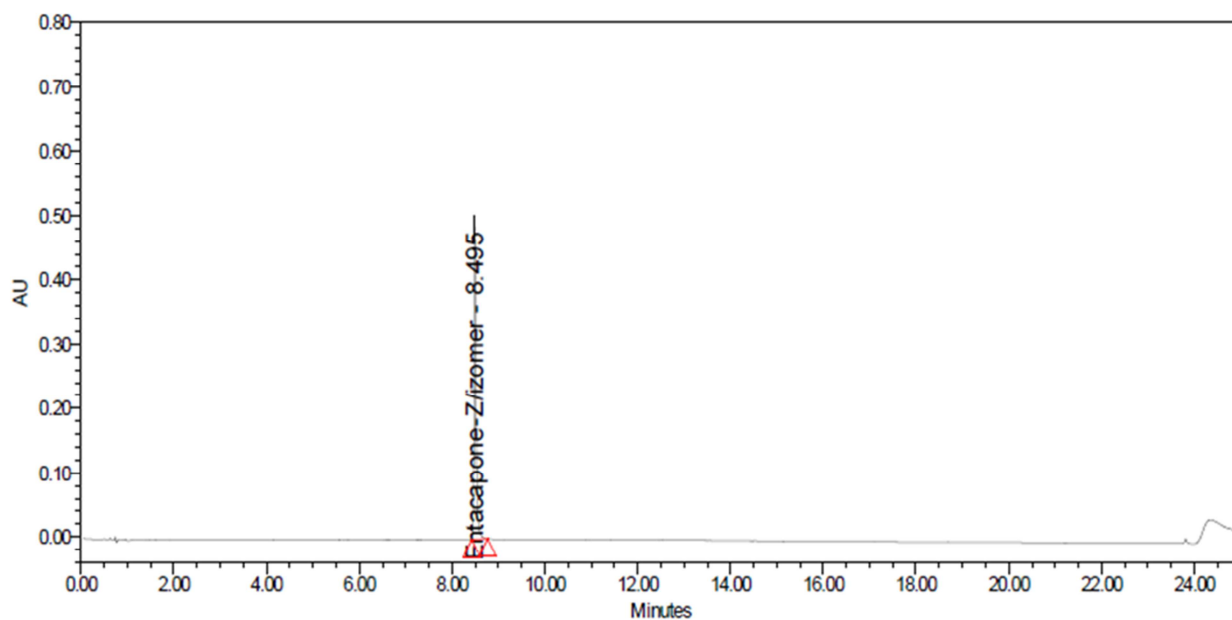
Slika 93. Kromatogram VV/D16/34 pri uvjetima Tg 42 i tg 23



8. Dodatak

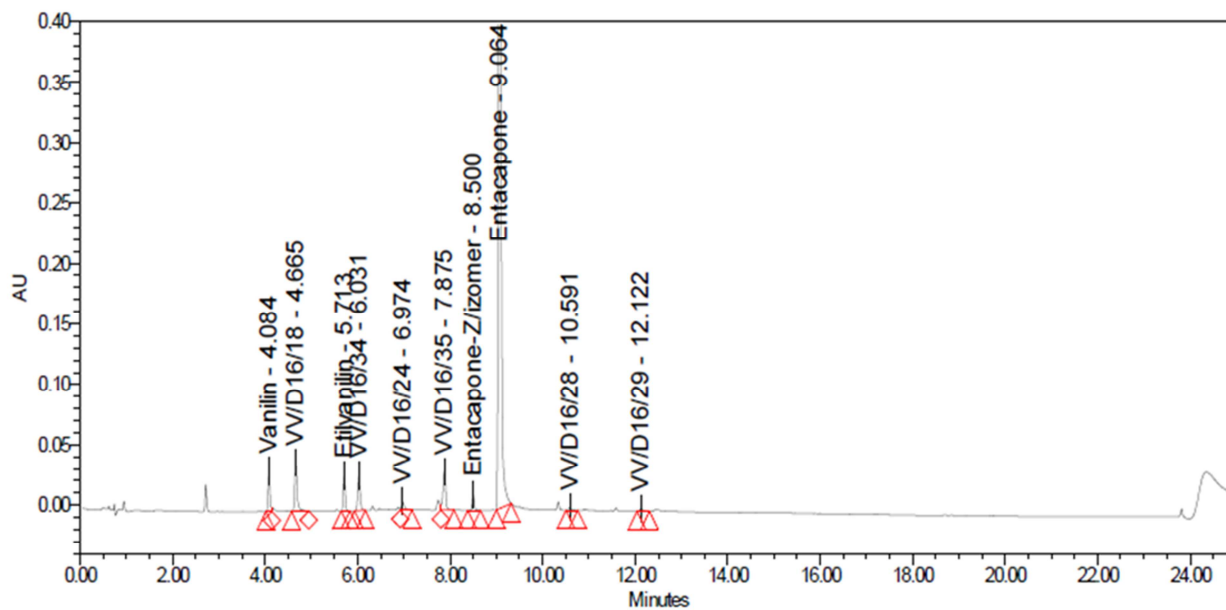


Slika 94. Kromatogram VV/D16/35 pri uvjetima Tg 42 i tg 23

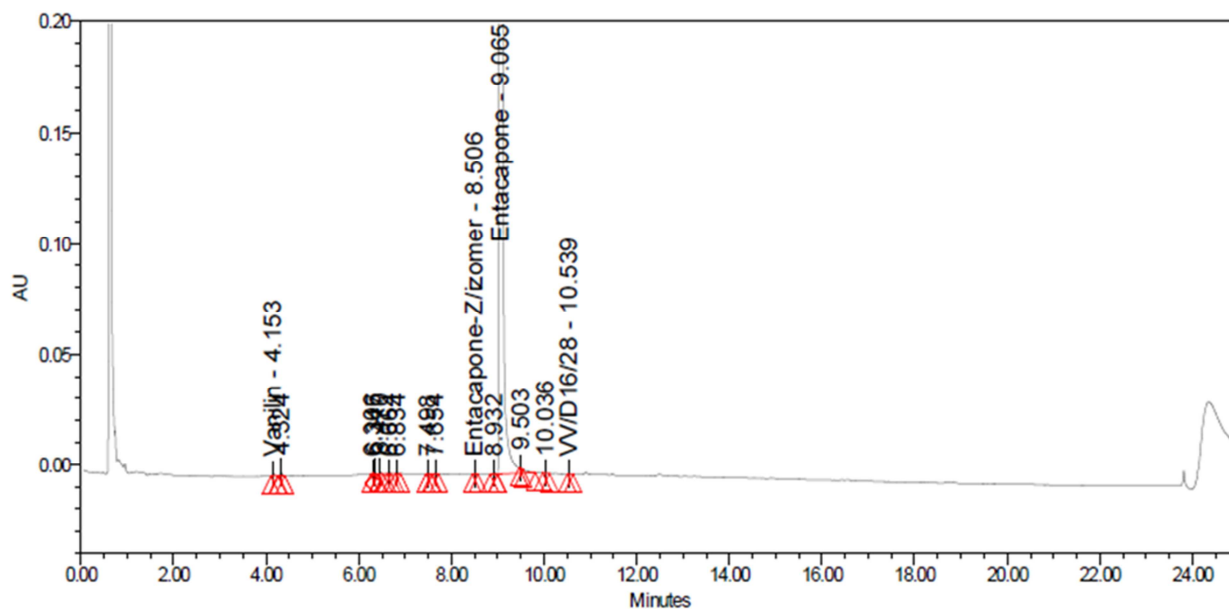


Slika 95. Kromatogram ENT Z/izomera pri uvjetima Tg 42 i tg 23

8. Dodatak

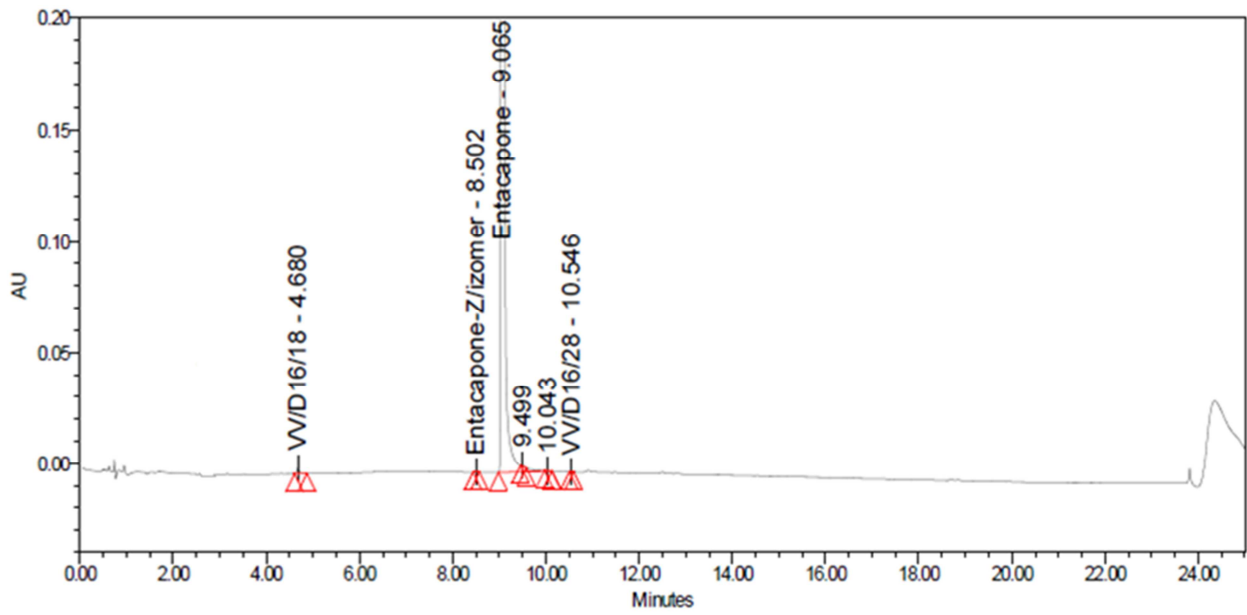


Slika 96. Kromatogram ENT i devet razgradnih produkata pri uvjetima Tg 42 i tg 23

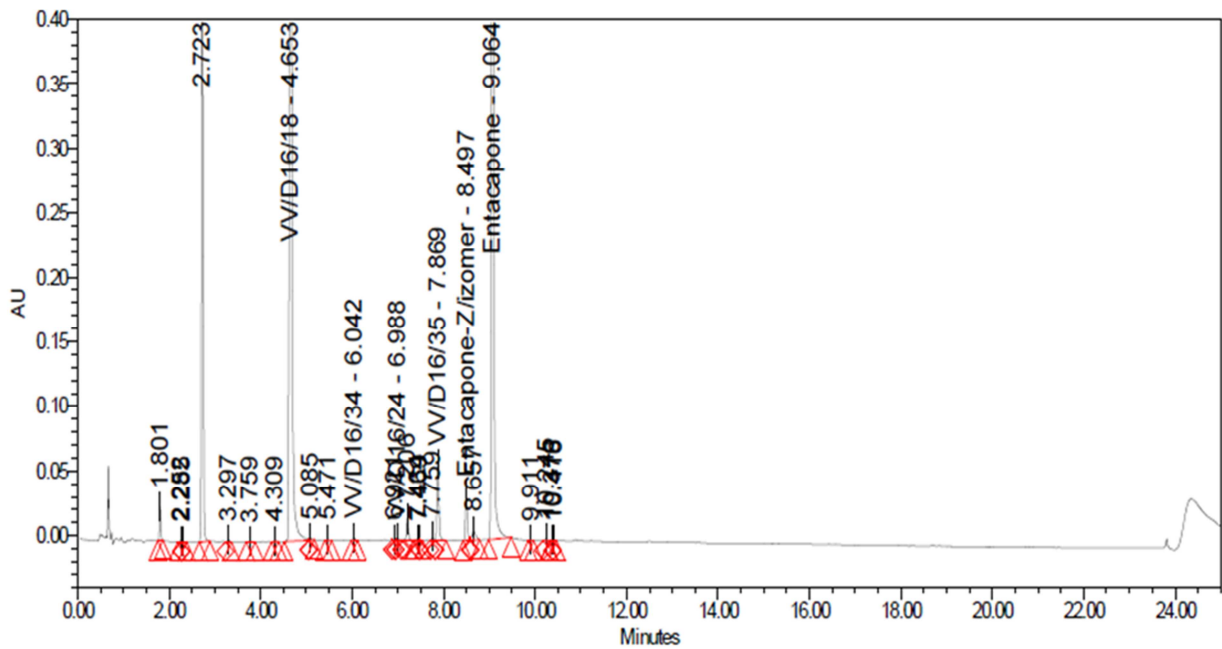


Slika 97. Kromatogram forsirane razgradnje ENT u 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri uvjetima Tg 42 i tg 23 (4h, RT)

8. Dodatak

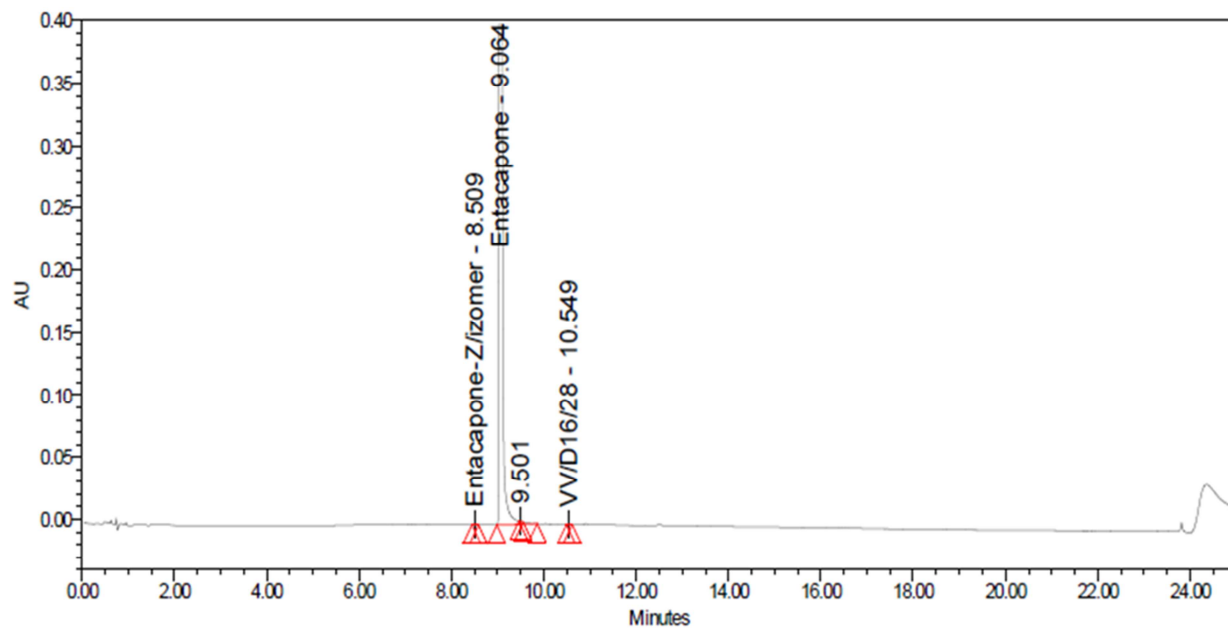


Slika 98. Kromatogram forsirane razgradnje ENT u  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  HCl pri uvjetima Tg 42 i tg 23 (4h, RT)

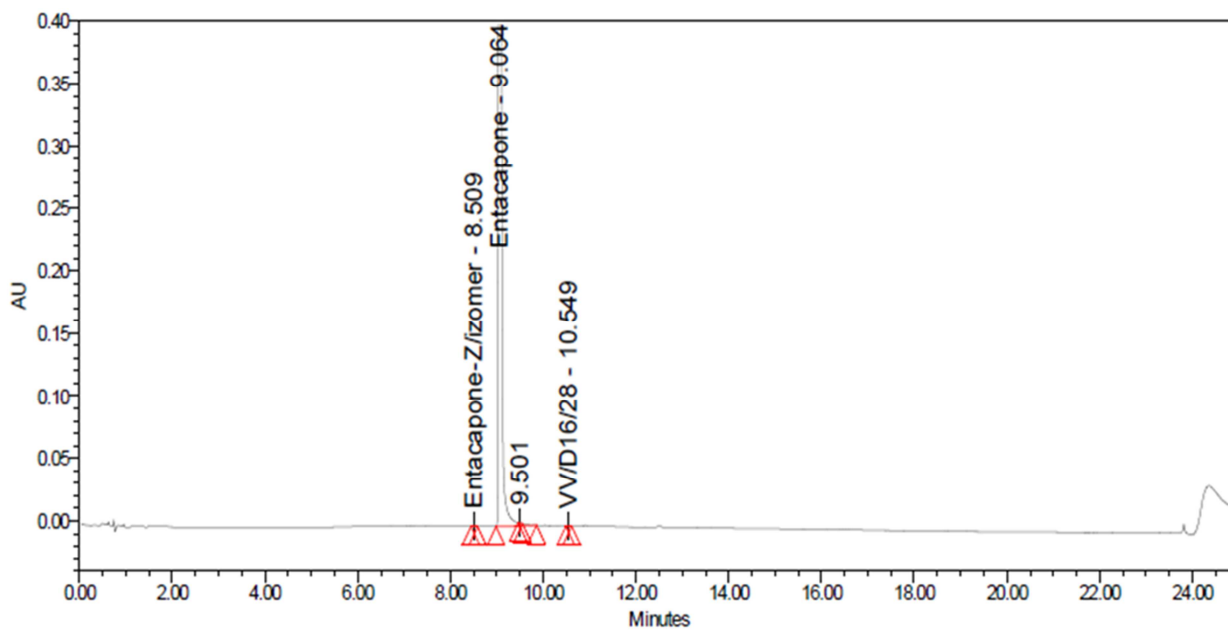


Slika 99. Kromatogram forsirane razgradnje ENT u  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaOH pri uvjetima Tg 42 i tg 23 (4h, RT)

8. Dodatak

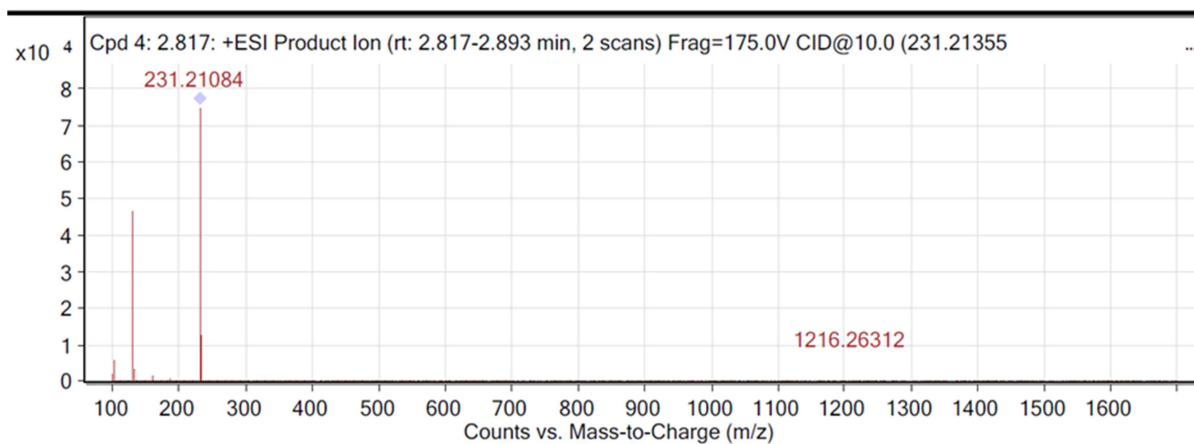


Slika 100. Kromatogram forsirane razgradnje ENT pri uvjetima Tg 42 i tg 23 (4h, RT)

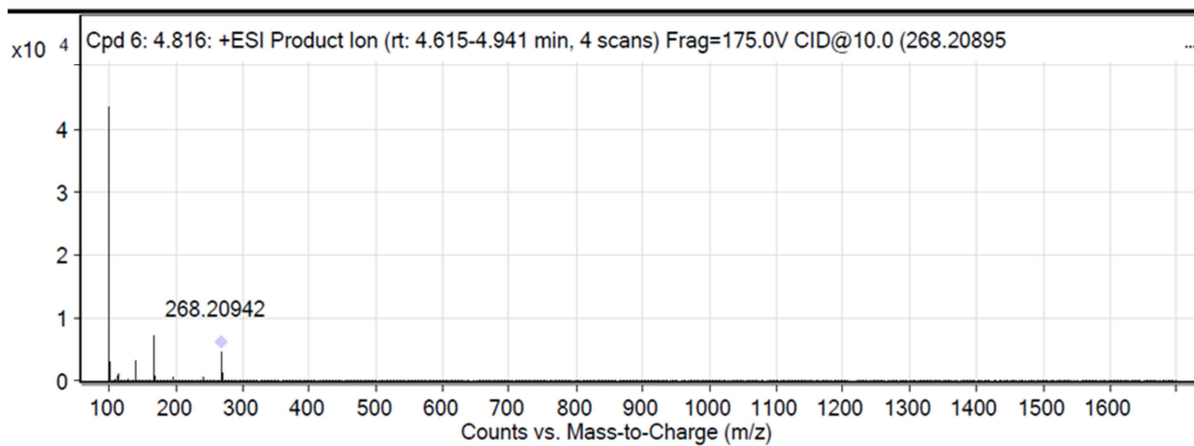


Slika 101. Kromatogram razgradnje ENT pri uvjetima Tg 42 i tg 23 (4h, RT)

### 8.1.7 MS/MS spektri razgradnih produkata ENT-a

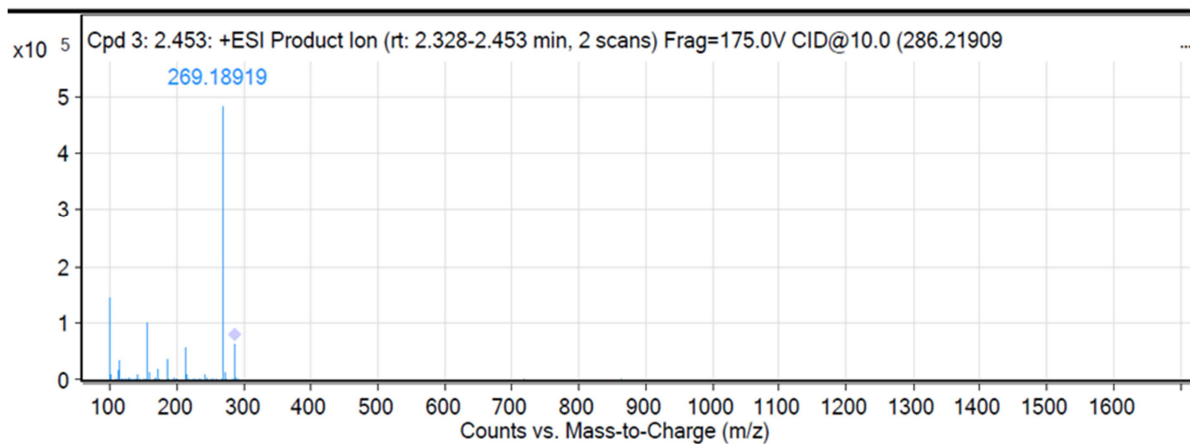


Slika 102. MS/MS spektar RP1 pri energiji sudara jakosti 10 eV

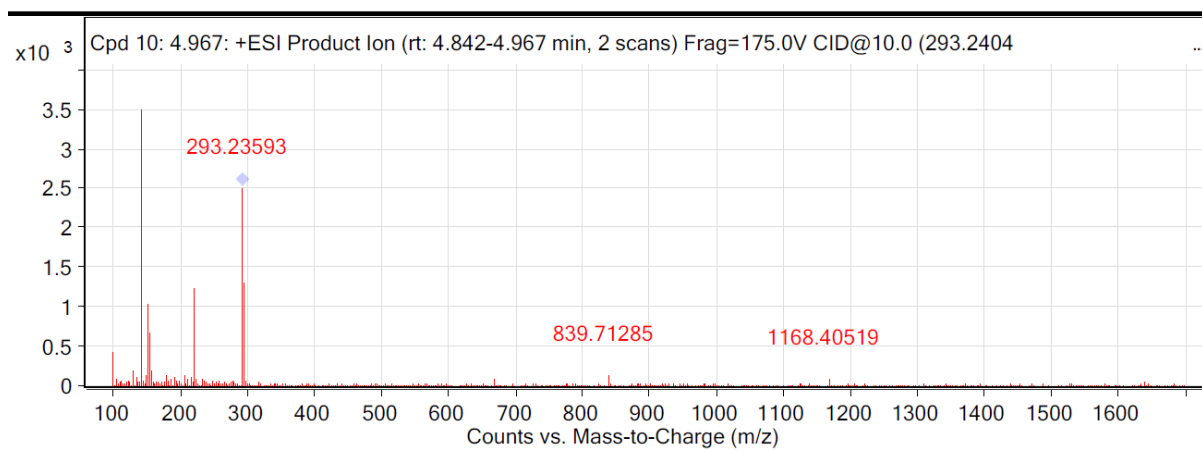


Slika 103. MS/MS spektar RP2 pri energiji sudara jakosti 10 eV

## 8. Dodatak

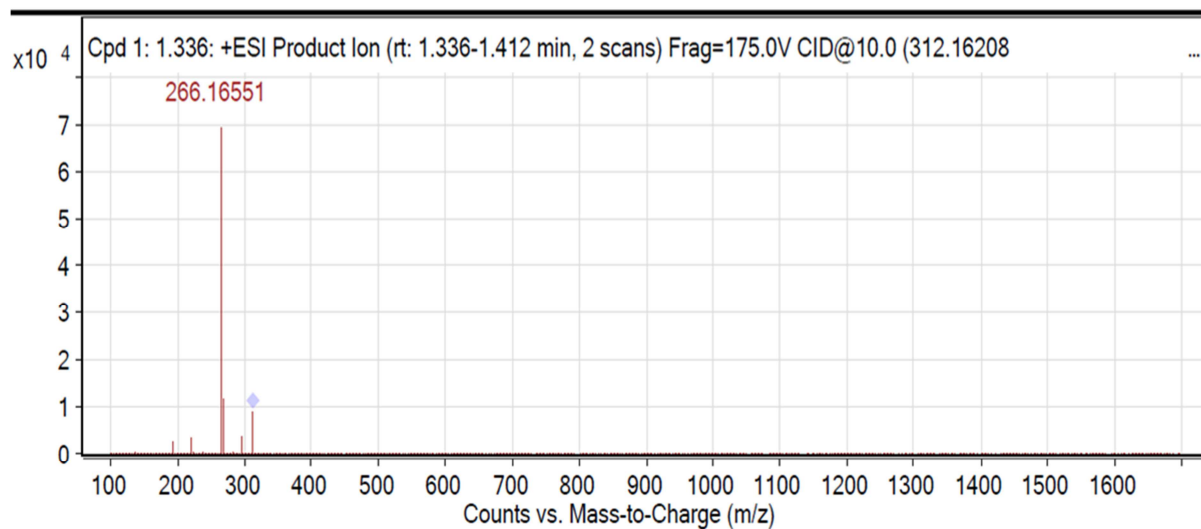


Slika 104. MS/MS spektar RP3 pri energiji sudara jakosti 10 eV

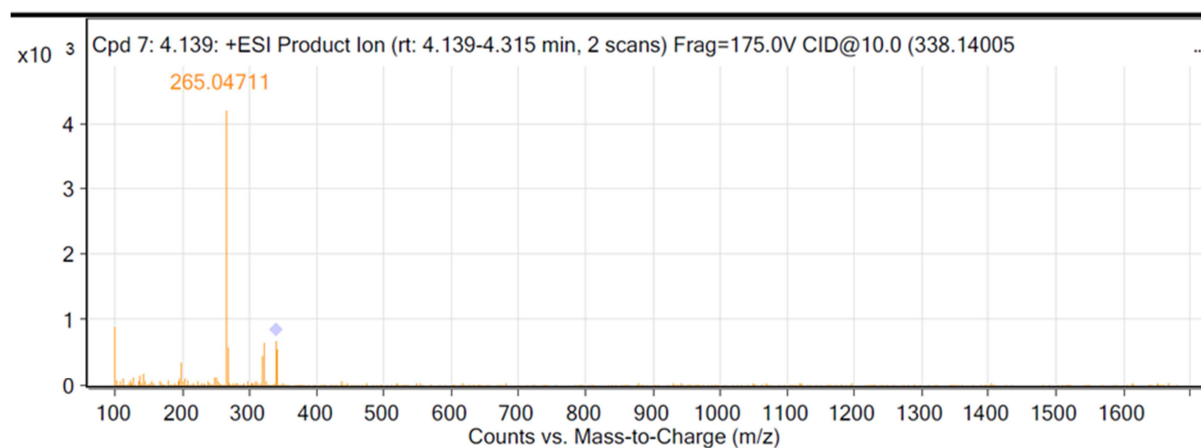


Slika 105. MS/MS spektar RP4 pri energiji sudara jakosti 10 eV

## 8. Dodatak

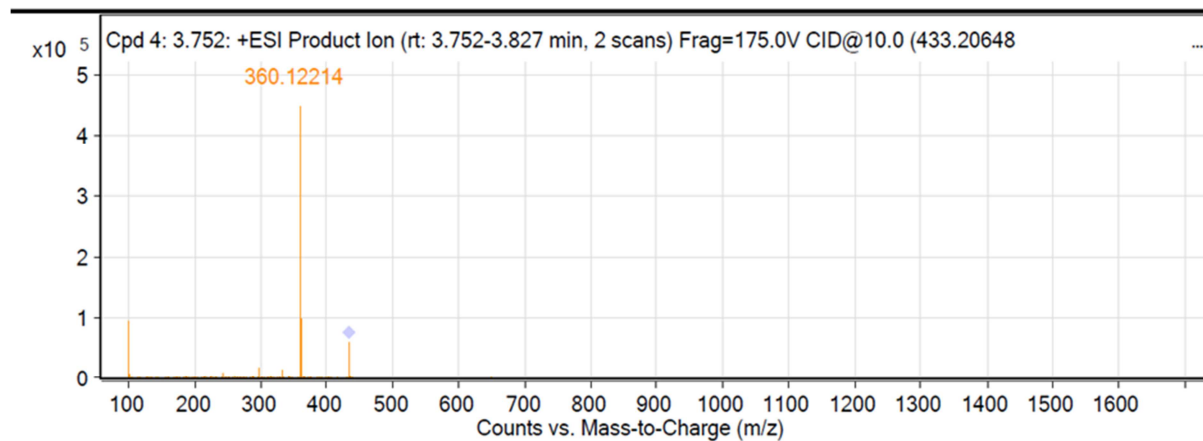


Slika 106. MS/MS spektar RP5 pri energiji sudara jakosti 10 eV

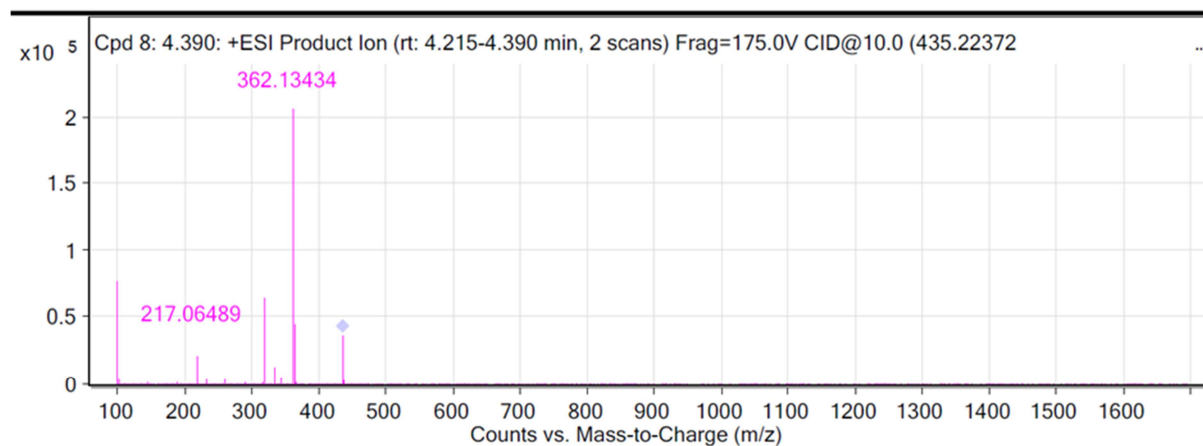


Slika 107. MS/MS spektar RP6 pri energiji sudara jakosti 10 eV

## 8. Dodatak



Slika 108. MS/MS spektar RP7 pri energiji sudara jakosti 10 eV



Slika 109. MS/MS spektar RP8 pri energiji sudara jakosti 10 eV



## **9. ŽIVOTOPIS**

## 9. Životopis

### **Ani Knežević**

e-mail: aniknezevic@hotmail.com

#### **Osobni podatci:**

*Datum rođenja:* 17. veljače 1993.

*Mjesto rođenja:* Fojnica, Bosna i Hercegovina

#### **Poznavanje jezika:**

*Materinski:* hrvatski

*Aktivno:* engleski

*Pasivno:* njemački

#### **Članstva u strukovnim udrugama:**

Hrvatsko kemijsko društvo (od 2015.)

#### **Obrazovanje**

2014. - 2016. **Diplomski studij - istraživački smjer** (smjer analitička kemija i biokemija i kemija), Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

2014. **Sveučilišna prvostupnica kemije** sa završnim radom *Karotenoidi- arome mirisa i okusa*

2011. - 2014. **Preddiplomski studij kemije**, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split Hrvatska

2007. - 2011. Opća gimnazija „Ivan Goran Kovačić“, Kiseljak, Bosna i Hercegovina

1999. - 2007. Osnovna škola Gromiljak, Kiseljak, Bosna i Hercegovina

## 9. Životopis

### **Radno iskustvo - popularizacija znanosti**

travanj, 2016. *Otvoreni dan PMF-a*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska

veljača, 2016. *Čarolije u kemiji*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska

rujan, 2015. *Znanstveni piknik*, Zagreb, Hrvatska

\* kao ponosni član Znanstvenih čarolija

rujan, 2014. *Europska noć istraživača*, Split, Hrvatska

### **Radno iskustvo - ostalo**

od svibnja 2016. Rad u laboratoriju na odjelu Fizikalna karakterizacija, PLIVA HRVATSKA d.o.o.