

# Analiza inkluzijskih kompleksa loratadina i ciklodekstrina spektrometrijom masa visokog razlučivanja

---

Živko, Ana-Emina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:159242>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ana-Emina Živko

**Analiza inkluzijskih kompleksa loratadina i  
ciklodekstrina spektrometrijom masa visokog  
razlučivanja**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021. godina.



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



## Zahvale

*Najprije se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Nives Galić na iskazanom povjerenju, susretljivosti i savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Veliko hvala dugujem i neposrednoj voditeljici Marijani Porcnić, mag. chem. na strpljivosti, ljubaznosti, pomoći te uloženom trudu i vremenu prilikom izrade eksperimentalnog dijela, kao i samog pisanja ovog rada.*

*Hvala i svim mojim kolegama s fakulteta na bezbrižnijem studiranju. Posebno zahvaljujem Suzani, bez tebe bi jutarnja predavanja puno teže podnijela, a svi bi odlasci u menzu i na kavu bili dosadniji. Hvala i cimerici Karli, na svim razgovorima u našem malom stanu. Bez tebe život u Zagrebu ne bi bio toliko zabavan, a učenje bi bilo puno stresnije. Cure, hvala vam na svim uspomnama i prijateljstvu.*

*Veliko hvala mojoj sestri Eleni-Marii i bratu Josipu na potpori i strpljenju tijekom petogodišnjeg studiranja. Znam da vam nije bilo lako. Hvala i mojim najboljim prijateljima na bezbrojnim razgovorima i dijeljenju brige i panike.*

*Ogromno hvala zaslužuje i moj Jasmin. Ti si ipak najviše slušao sve moje probleme i zamisli, neizmjereno sam ti zahvalna na tome, kao i na vjerovanju u mene. Bio si tu u svakom trenutku i hvala ti na svakom vraćenom osmijehu na lice. Volim te.*

*Najveće hvala ide mojim roditeljima. Mama i tata, hvala vam na pruženoj mogućnosti studiranja u drugom gradu. Hvala vam na velikoj podršci, na svakoj poruci i pozivu, na svakom ohrabrenju, ali i na usađenim vrijednostima tijekom mog života. Bez vas danas ne bih bila osoba koja jesam, niti bi išta od ovoga bilo moguće. Volim vas.*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Spektrometrija masa.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Osnove tehnike.....	2
2.1.2. Ionski izvori.....	3
2.1.3. Analizatori masa.....	6
2.1.4. Tandemna spektrometrija masa.....	10
2.1.5. Detektori.....	11
<b>2.2. Reakcije fragmentacije.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Fragmentacija kationa s neparnim brojem elektrona ( $OE^{+}$ ).....	13
2.2.2. Fragmentacija kationa s parnim brojem elektrona ( $EE^{+}$ ).....	15
2.2.3. Fragmentacija aniona.....	17
<b>2.3. Loratadin.....</b>	<b>18</b>
2.3.1. Svojstva loratadina.....	18
2.3.2. Metode povećanja topljivosti lijekova.....	20
<b>2.4. Ciklodekstrini.....</b>	<b>21</b>
2.4.1. Struktura i svojstva ciklodekstrina.....	22
<b>2.5. Inkluzijski kompleksi.....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Metode pripreme inkluzijskih kompleksa.....	26
<b>2.6. Analiza ciklodekstrina te inkluzijskih kompleksa spektrometrijom masa.....</b>	<b>27</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Kemikalije.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Instrumenti.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Radni uvjeti.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4. Priprava otopina za analizu.....</b>	<b>32</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Optimizacija radnih uvjeta.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. MS analiza loratadina.....</b>	<b>36</b>
4.2.1. MS/MS analiza loratadina.....	37
<b>4.3. MS analiza <math>\beta</math>-ciklodekstrina.....</b>	<b>40</b>



---

4.3.1. MS/MS analiza $\beta$ -ciklodekstrina .....	41
<b>4.4. MS analiza nasumično metiliranog <math>\beta</math>-ciklodekstrina.....</b>	<b>44</b>
4.4.1. MS/MS analiza nasumično metiliranog $\beta$ -ciklodekstrina .....	48
<b>4.5. MS analiza inkluzijskog kompleksa loratadina i <math>\beta</math>-ciklodekstrina.....</b>	<b>51</b>
4.5.1. MS/MS analiza inkluzijskog kompleksa loratadina i $\beta$ -ciklodekstrina.....	52
<b>4.6. MS analiza inkluzijskog kompleksa loratadina i nasumično metiliranog <math>\beta</math>-ciklodekstrina</b>	<b>56</b>
4.6.1. MS/MS analiza inkluzijskog kompleksa loratadina i nasumično metiliranog $\beta$ -ciklodekstrina	58
<b>4.7. Usporedba stabilnosti analiziranih spojeva .....</b>	<b>61</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>69</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>71</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>73</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXX</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ANALIZA INKLUZIJSKIH KOMPLEKSA LORATADINA I CIKLODEKSTRINA SPEKTROMETRIJOM MASA VISOKOG RAZLUČIVANJA

Ana-Emina Živko

Inkluzijski kompleksi, nastali uslijed nekovalentnih interakcija između molekule domaćina i molekule gosta, rješenje su problema slabo topljivih lijekova. Kompleksiranje lijeka, zarobljenog u hidrofobnoj šupljini molekule domaćina, poboljšava njegova fizikalno-kemijska svojstva poput topljivosti i biodostupnosti.  $\beta$ -ciklodekstrin i njegov nasumično metilirani derivat izabrani su kao molekule domaćini, dok je molekula gost loratadin, lijek korišten u liječenju alergijskih poremećaja. Nastali inkluzijski kompleksi, također i spojevi koji ih grade, analizirani su hibridnim spektrometrom masa s kvadrupolom i analizatorom vremena leta. Tandemna spektrometrija masa provedena je nad izabranim ionima te je na temelju dobivenih rezultata predložen fragmentacijski put analiziranih spojeva. Korištena ionizacijska tehnika je elektroraspršenje, a spektri masa snimljeni su u pozitivnom i negativnom načinu snimanja.

(73 + XXX stranica, 49 slika, 27 tablica, 16 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi:  $\beta$ -ciklodekstrin, elektroraspršenje, inkluzijski kompleks, loratadin, spektrometrija masa

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

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
  2. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
- Zamjena: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 13. rujna 2021.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF LORATADINE-CYCLODEXTRINE INCLUSION COMPLEXES

Ana-Emina Živko

Inclusion complexes, formed by noncovalent interactions between host molecule and guest molecule, are the solution of the problem of poorly soluble drugs. Encapsulation of the drugs in the hydrophobic cavity of the host molecule improves its physico-chemical properties, such as solubility and bioavailability.  $\beta$ -cyclodextrin and its randomly methylated derivative were selected as host molecules, while the guest molecule was the drug loratadine, used in the treatment of allergic disorders. Inclusion complexes, as well as the compounds that form them, were analyzed by a hybrid mass spectrometer with a quadrupole and a time-of-flight analyzer. Tandem mass spectrometry was performed on the selected ions and the fragmentation pathway of the analyzed compounds was proposed based on the obtained results. Electrospray was used as the ionization technique, and the mass spectra were recorded in positive and negative mode.

(73 + XXX pages, 49 figures, 27 tables, 16 references, original in croatian)

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

Keywords:  $\beta$ -cyclodextrine, electrospray, inclusion complexes, loratadine, mass spectrometry

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor

Assistant mentor: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Professor
  3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Professor
- Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Date of exam: 13 September 2021



## § 1. UVOD

Spektrometrija masa analitička je tehnika koja se temelji na ionizaciji molekula analita, nakon čega se nastali ioni u plinovitom agregacijskom stanju razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja. Ovisno o vrsti uzorka, primjenjuju se jake ili blage ionizacijske tehnike. Postoji niz analizatora masa koji se razlikuju prema osnovnim karakteristikama poput razlučivanja i točnosti prikupljenih podataka. Ukoliko je potrebna detaljna analiza, radi se tandemna spektrometrija masa koja rezultira većim brojem signala, a time i informacija o samom analitu. Spektrometrija masa ima niz prednosti poput poboljšane osjetljivosti, nižih detekcijskih granica te brze analize zbog čega je postala široko primijenjena analitička tehnika u biokemiji, farmaciji, forenzici i mnogim drugim znanstvenim područjima.<sup>1</sup>

Loratadin se koristi za liječenje alergijskih poremećaja, a karakteriziran je kao lijek niske topljivosti te visoke permeabilnosti.<sup>2</sup> Upravo zbog potrebe za povećanjem topljivosti visoko permeabilnih lijekova, istražuje se kompleksiranje lijekova s ciklodekstrinima. Ciklodekstrini su cikličke molekule koje zbog svoje strukture mogu graditi inkluzijske komplekse s raznim molekulama, mijenjajući im time fizikalno-kemijska svojstva, kao što je topljivost. Nastali inkluzijski kompleksi koji se sastoje od molekule domaćina i molekule gosta, mogu se analizirati spektrometrijom masa pri čemu se prikupljaju informacije o strukturi spoja, dok tandemna spektrometrija masa rezultira saznanjima o stabilnosti nastalog kompleksa te fragmentacijskim putevima molekula.<sup>3</sup>

Cilj ovoga rada je detaljna analiza kompleksa loratadina s  $\beta$ -ciklodekstrinom i njegovim nasumično metiliranim derivatom. Spektri masa visokog razlučivanja snimljeni su hibridnim spektrometrom masa s kvadrupolom i analizatorom vremena leta (engl. *quadrupole time-of-flight*, Q-TOF). Određene su optimalne vrijednosti parametara pri kojima će se izvoditi mjerenja te optimalan molarni omjer loratadina i ciklodekstrina kako bi se postigao što veći intenzitet signala inkluzijskih kompleksa. Snimljeni su i MS/MS spektri na temelju kojih će se predložiti fragmentacijski putevi loratadina, ciklodekstrina i inkluzijskih kompleksa, a konstruirane su i krivulje ovisnosti intenziteta iona kompleksa o kolizijskom potencijalu, koje daju informacije o stabilnosti nastalih inkluzijskih kompleksa.

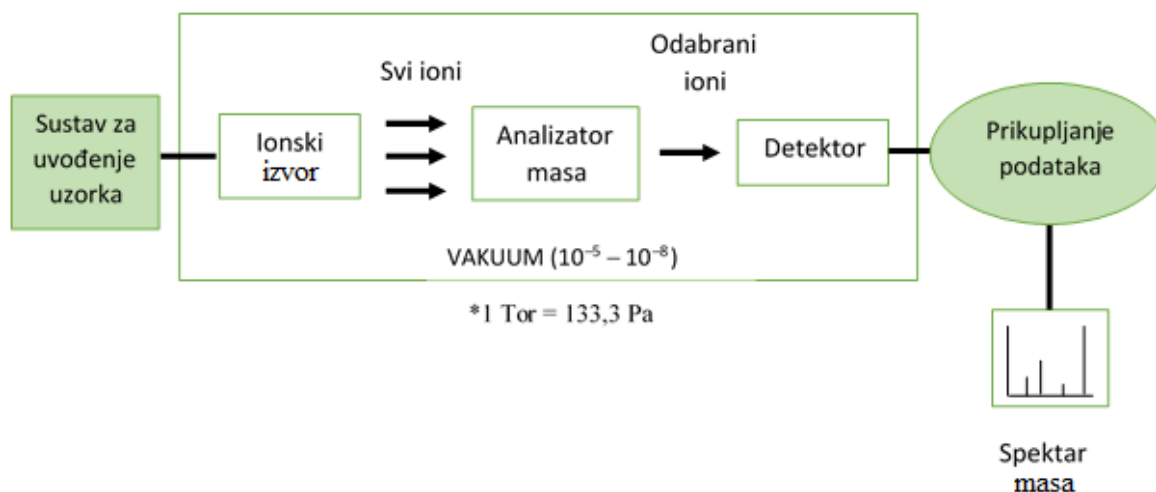
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Spektrometrija masa

#### 2.1.1. Osnove tehnike

Spektrometrija masa je analitička tehnika razvijena sredinom dvadesetog stoljeća, a danas je neophodna za mnoga znanstvena i rutinska istraživanja, primjerice u kontroli kvalitete hrane, forenzici, proteomici i metabolomici. Također se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sastava smjese, određivanje elementnog sastava uzorka, izotopnog omjera atoma u uzorku te za određivanje strukture anorganskih, organskih i bioloških molekula. Riječ je o destruktivnoj tehnici što znači da je analit razoren u svrhu prikupljanja podataka i ne može se obnoviti. Unatoč tome, unapređivanjem tehnike i instrumentacije postignuta je iznimna osjetljivost, točnost, povećana je rezolucija, dok je granica detekcije spuštена do femto- i atomola što dovodi do toga da je spektrometrija masa jedna od najkorištenijih tehnika današnjice.<sup>1</sup>

Spektrometrija masa (slika 1) u osnovi se sastoji od jednakih glavnih dijelova, no izgled spektra masa ovisi o vrsti analizatora i načinu ionizacije molekula uzorka. Spektrometar masa započinje sustavom za uvođenje uzorka koji služi dovođenju uzorka do ionizacijske komore. U ionizacijskoj komori analit je podvrgnut ionizaciji određenim ionskim izvorom te se nastali ioni dalje usmjeravaju prema analizatoru masa gdje se razdvajaju u vremenu ili prostoru prema njihovom omjeru mase i naboja te u konačnici dolaze do detektora. Cijeli sustav od ionskog izvora do detektora nalazi se u vakuumu kako bi se spriječilo nastajanje neželjenih produkata ili gubitka naboja iona analita. Spektrometar masa može se koristiti kao zaseban instrument pomoću kojeg se analizira uzorak, no često se koristi i u vezanim sustavima gdje se spaja s plinskim ili tekućinskim kromatografima. Vezani sustavi se koriste za određivanje sastojaka složenih smjesa gdje kromatograf ima ulogu sustava za uvođenje uzorka, a spektrometar masa ima ulogu detektora.<sup>1</sup>



Slika 1. Shema spektrometra masa (preuzeto i prilagođeno iz ref. 4).

Prolaskom uzorka kroz instrument i očitanjem prikupljenih podataka, dobije se spektar masa koji prikazuje ovisnost intenziteta o omjeru mase i naboja određenog iona. Najintenzivniji signal naziva se osnovni ili bazni signal, a odgovara molekulskom ionu ili fragmentnom ionu ukoliko je primijenjen jači ionski izvor. Iza osnovnog signala nalaze se izotopni signali kao posljedica prisutnosti težih izotopa elemenata, dok ostali signali slabijeg intenziteta odgovaraju fragmentima molekulskog iona ili su posljedica pregradnje molekulskog iona.<sup>1</sup>

### 2.1.2. Ionski izvori

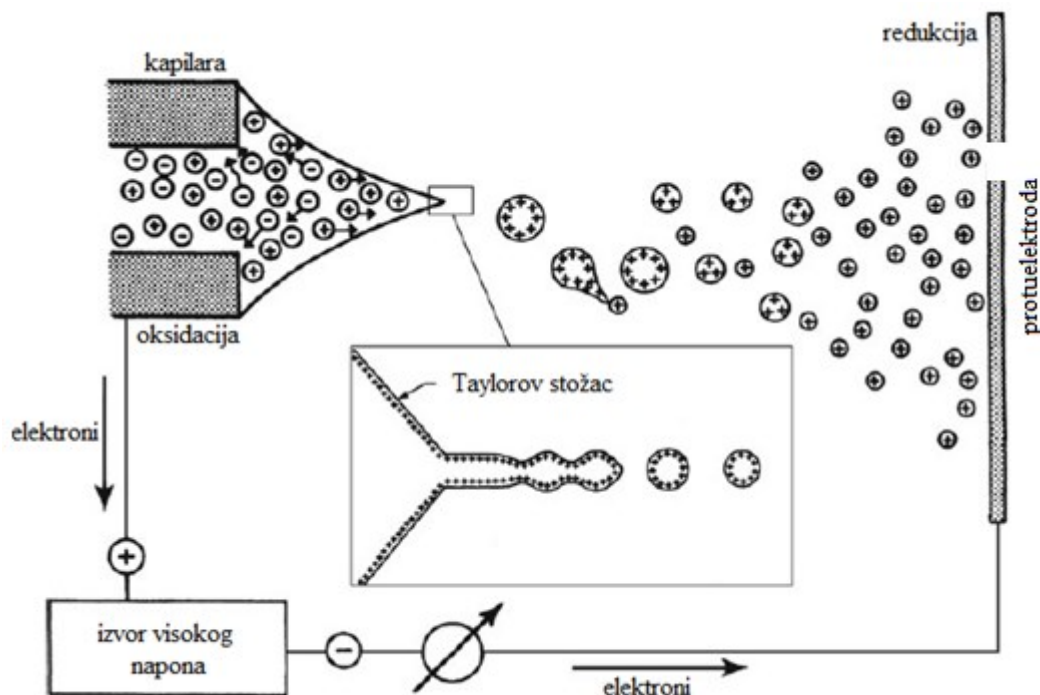
Važna komponenta spektrometra masa je ionski izvor u kojem dolazi do nastajanja iona u plinskoj fazi. Ioni u ionskom izvoru mogu nastati ionizacijom neutralne molekule, izbijanjem elektrona, protoniranjem, deprotoniranjem, stvaranjem adukata ili prijenosom nabijene vrste iz kondenzirane faze u plinsku fazu. Različiti načini ionizacije omogućuju analiziranje različitih vrsta molekula koje su različite veličine. Ionizacijske tehnike se dijele s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva analita i na količinu unutarnje energije predane tijekom ionizacijskog procesa. Što je količina predane unutarnje energije veća, dolazi do jače fragmentacije analita pri čemu često izostaje molekulski ion i prisutni su samo fragmentni ioni.<sup>1</sup>

Analiti koji su hlapljivi i termički stabilni podvrgavaju se ionizaciji elektronima (engl. *electron ionization*, EI) koja uzrokuje jaku fragmentaciju molekula, kemijskoj ionizaciji (engl. *chemical ionization*, CI) kao blagoj ionizacijskoj tehnici ili desorpcijskoj kemijskoj ionizaciji



(engl. *desorption chemical ionization*, DCI). Ukoliko je analit u tekućem ili čvrstom agregatnom stanju, koristi se ionizacija brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB), ionizacija sekundarnim ionima (engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS), desorpcija poljem (engl. *field desorption*, FD), desorpcija plazmom (engl. *plasma desorption*, PD), desorpcija laserskim zračenjem (engl. *laser desorption*, LD) ili matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI). Desorpcijske tehnike uključuju korištenje čvrstih ili tekućih matrica s čije se površine ioni desorbiraju nakon djelovanja energetskih čestica ili fotona. Termoraspršenje (engl. *thermospray ionization*, TSI), elektroraspršenje (engl. *electrospray ionization*, ESI) i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), koriste se za ionizaciju molekula direktno iz otopine analita zbog čega su prikladne kao ionizacijske tehnike u vezanim sustavima.<sup>1</sup>

Elektroraspršenje je blagi način ionizacije molekula uzorka, koji generira ione analita direktno iz otopine. U početku se koristio samo za analizu proteina, no daljnjim razvojem ionskog izvora omogućena je analiza velikih i malih molekula, nenabijenih ili ionskih spojeva te nekovalentnih kompleksa. Prednosti elektroraspršenja su visoka osjetljivost te mogućnost direktnog povezivanja tekućinske kromatografije ili kapilarne elektroforeze sa spektrometrijom masa što doprinosi točnijim i preciznijim rezultatima. Mehanizam elektroraspršenja (slika 2) temelji se na primjeni jakog električnog polja, pri atmosferskom tlaku, na metalnu kapilaru u koju se uvodi otopina analita brzinom protoka 1–10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Električno polje jačine  $10^6 \text{ V m}^{-1}$  nastaje zbog razlike u potencijalu (3–5 kV) između metalne kapilare i protuelektrode, a ključno je za odvajanje pozitivnog i negativnog naboja u otopini te stvaranja Taylorovog stošca koji nastaje pri kritičnoj jakosti polja. Taylorov stožac je naziv za deformaciju meniskusa otopine iz kojeg se generira mlaz tekućine prema protuelektrodi. Iz nestabilnog mlaza nastaju sitne kapljice koje nose pozitivno nabijene ione i otapalo. Kapljice su na putu prema analizatoru masa izložene struji inertnog plina, najčešće dušika, koji uzrokuje isparavanje preostalog otapala zbog čega se veličina kapljica smanjuje, a gustoća naboja na površini povećava. Kada se postigne Rayleighova granica stabilnosti, odnosno kada se sila elektrostatskog odbijanja izjednači s površinskom napetosti tekućine, dolazi do Coulombovog dijeljenja i nastanka manjih kapljica. Smanjivanje kapljica ponavlja se nekoliko puta uz konstantno povećanje omjera pozitivnog naboja na površini kapljice i sparenih iona elektrolita u unutrašnjosti.<sup>1,4</sup>



Slika 2. Ionizacijski proces elektroraspršenja (preuzeto i prilagođeno iz ref. 4).

Nastajanje sitnih kapljica i njihovo nesimetrično dijeljenje je uz teoriju Coulombovog dijeljenja, objašnjeno i teorijom raspada mlaza (slika 3). Budući da su kapljice roditelji deformiranog oblika zbog čega je gustoća naboja na površini kapljice nehomogena, novija istraživanja pokazala su da mikrokapljice potomci nastaju izbacivanjem s izduženog kraja kapljice roditelja gdje je gustoća naboja veća.<sup>4</sup>



Slika 3. Dijeljenje kapljice raspadom mlaza.<sup>4</sup>

Dokazano je da nesimetričnim dijeljenjem nastaju velike kapljice koje u sebi nose neželjene sparene ione elektrolita te male kapljice iz kojih nastaju ioni u plinskoj fazi, no točan

mehanizam nastajanja iona u plinskoj fazi nije poznat, već se objašnjava pomoću modela ostatka naboja i modela isparavanja iona. Prema starijem modelu ostatka naboja pretpostavlja se potpuna desolvatacija kapljica koje su radijusa oko 1 nm te sadrže samo jedan ion, gdje isparavanjem zadnje molekule otapala nastaje ion u plinskoj fazi. Noviji model isparavanja iona podrazumijeva kapljice radijusa oko 8 nm sa suviškom elementarnih naboja gdje ioni isparavaju prije nego se elektrostatsko odbijanje izjednači s površinskom napetosti.<sup>4</sup>

Usporedbom ionizacije elektroraspršenja s ostalim ionizacijskim tehnikama, može se uočiti manja tolerancija prema interferencijama, no prednosti su viša osjetljivost ionskog izvora i niža detekcijska granica što se može još dodatno poboljšati smanjenjem protoka analizirane otopine kada se govori o mikro- i nanoelektoraspršenju. Također, elektroraspršenje se može primijeniti za široki raspon biomolekula poput peptida, šećera, lipida i drugih.<sup>1</sup>

### 2.1.3. Analizatori masa

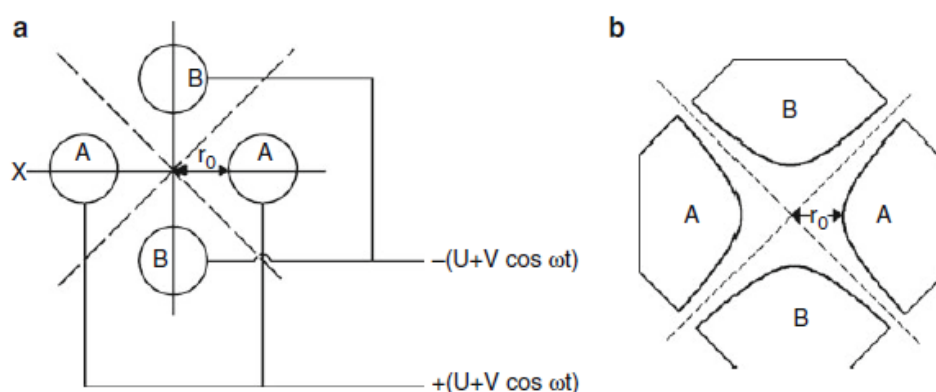
Nakon ionizacije uzorka, nastali ioni u plinskoj fazi putuju prema analizatoru masa koji ih odjeljuje na temelju omjera mase i naboja. Razvijeno je nekoliko vrsta analizatora masa koji se razlikuju prema pet osnovnih karakteristika: gornja granica mase, brzina analize, propusnost, točnost mase i razlučivanje. Kvadrupol (engl. *quadrupole*, Q) i sektorski analizatori masa sukcesivno analiziraju ione što znači da samo ioni s određenim omjerom mase i naboja prolaze kroz analizator u određeno vrijeme. Ostali analizatori masa analiziraju sve ione istovremeno, a to su: ionska stupica (engl. *ion trap*, IT), analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *time-of-flight*, TOF), Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije (engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR) i orbitrap. Često se više istih ili različitih analizatora masa spregne u hibridni instrument radi što boljih karakteristika tandemne spektrometrije masa.<sup>1</sup>

#### Kvadrupolni analizator masa

Jedan od najčešće korištenih analizatora masa je kvadrupolni analizator. Razlog tome je niža cijena, brza analiza gdje se pojedini spektar masa može snimiti za oko 100 ms te mogućnost povezivanja s kromatografskim tehnikama. Nedostatak kvadrupolnog analizatora masa je mala sposobnost razdvajanja signala iona s malom razlikom u masi zato što mu razlučivanje iznosi samo 2000, dok primjerice kod orbitrapa, koji slovi kao analizator masa s visokim

razlučivanjem, iznosi 100 000. Gornja granica mjerljivih masa iznosi 4000 Da. Odjeljivanje iona se u kvadrupolu temelji na stabilnoj putanji iona određenog omjera mase i naboja u oscilirajućem električnom polju. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri cilindričnih ili hiperboličnih elektroda (slika 4) koje moraju biti paralelne i pružaju se u smjeru z-osi. Na sve četiri elektrode primjenjuje se promjenjiv istosmjerni i izmjenični potencijal vrijednosti  $10^2$ – $10^3$  V, to jest na nasuprotne parove elektroda primjenjuje se jednaki potencijal koji sadrži izmjeničnu i istosmjernu komponentu.<sup>4</sup> Ukupni potencijal  $\Phi_0$  sastoji se od istosmjerne komponente,  $U$ , te izmjenične komponente,  $V$ , s frekvencijom  $\omega$ :

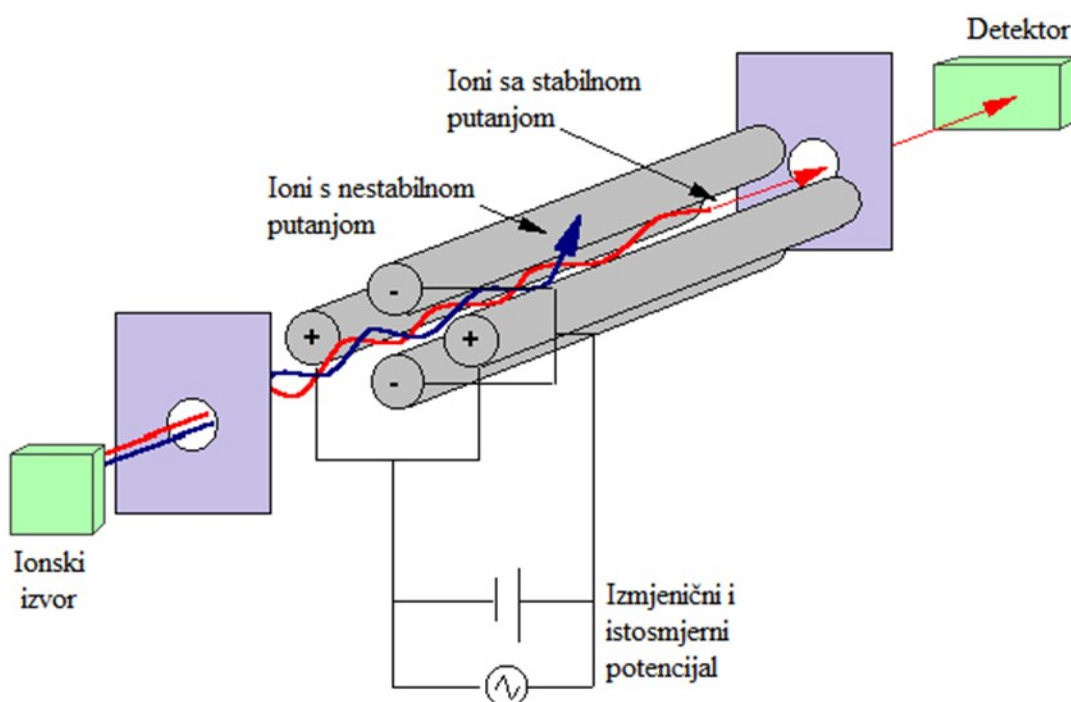
$$(1) \quad \pm \Phi_0 = \pm (U + V \cos \omega t)$$



Slika 4. Poprečni presjek a) cilindrično oblikovanih elektroda i b) hiperbolično oblikovanih elektroda kvadrupola.<sup>4</sup>

Ioni u plinskoj fazi koji dolaze iz ionizacijske komore, ubrzavaju se potencijalom 5–15 V prema kvadrupolu u kojem se kreću u smjeru z-osi (slika 5). U prvom dijelu ciklusa izmjeničnog potencijala kada su gornja i donja elektroda pozitivne, pozitivno nabijeni ioni se fokusiraju u horizontalnoj ravnini. Slijedi mijenjanje polariteta elektroda što rezultira fokusiranjem iona u vertikalnoj ravnini i njihovim složenim gibanjem. Ukoliko pozitivno nabijeni ion određenog omjera mase i naboja ima nestabilnu putanju, može doći do udara u negativnu elektrodu i neutralizacije iona zbog čega neće doći do detektora. Faktori koji utječu na neutralizaciju iona su brzina kojom se ion kreće u smjeru z-osi, omjer mase i naboja te frekvencija i jačina

primijenjenog potencijala. Na ione manjeg omjera mase i naboja više utječe promjena izmjeničnog potencijala, dok na ione većeg omjera mase i naboja više utječe promjena istosmjernog potencijala. Kombinacijom istosmjernog i izmjeničnog potencijala čije se vrijednosti povećavaju, a omjer ostaje konstantan, postiže se učinak filtra kvadrupolnog analizatora masa, koji do detektora propušta samo ione uskog raspona mase i naboja.<sup>1,4</sup>



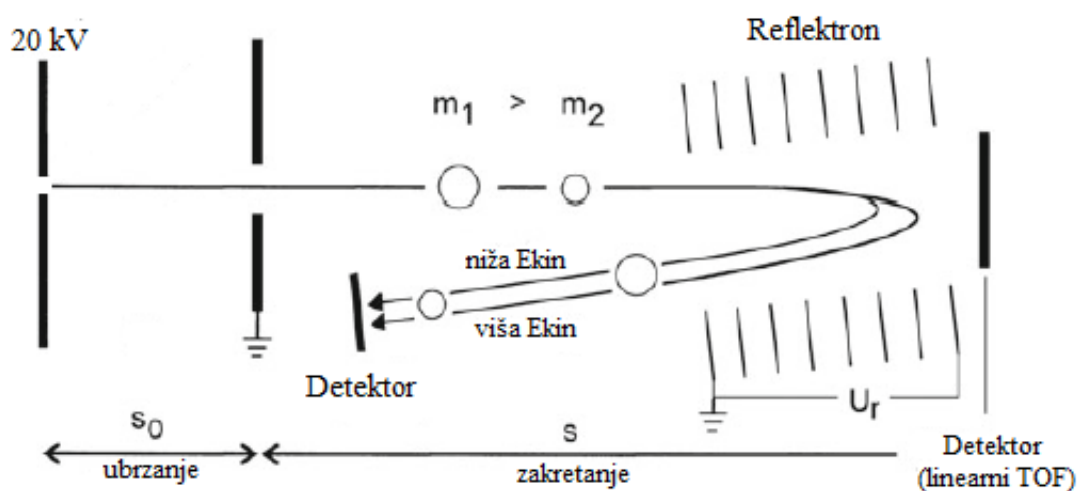
Slika 5. Shematski prikaz kvadrupolnog analizatora masa (preuzeto i prilagođeno iz ref. 5).

#### Analizator masa koji mjeri vrijeme leta

Princip razdvajanja iona, koji se nakon izlaska iz ionizacijske komore ubrzavaju potencijalom od 20 kV, temelji se na različitim brzinama iona koji prolaze kroz cijev analizatora te dolaze do detektora u različito vrijeme. Kako bi analizator bio funkcionalan, svi ioni trebaju krenuti u isto vrijeme zbog čega se često koristi uz pulsne ionizacijske tehnike. Analizator masa koji mjeri vrijeme leta karakteriziran je visokom gornjom granicom mjerljivih masa koja iznosi 350 000 Da, ali niskim razlučivanjem koje iznosi 5000. Razlog niskog razlučivanja je taj što se kod velikih masa smanjuje razlika u vremenima dolaska iona do detektora. Također, različita je raspodjela kinetičke energije između iona s istim omjerom mase i naboja na izlasku iz ionizacijske komore zbog čega ioni s istim omjerom mase i naboja ne dolaze do detektora za

isto vrijeme. Upravo zbog toga se u sam analizator počelo umetati ionsko zrcalo ili refleatron (slika 6).<sup>4</sup>

Refleatron je građen od niza prstenastih elektroda na koje se primjenjuje potencijal,  $U_r$ , te se ponaša kao zrcalo koje fokusira ione različitih kinetičkih energija u vremenu. Ioni ulaze u refleatron sve dok im kinetička energija ne postane nula, nakon čega ih nastalo polje zakreće i odbija prema detektoru. Nakon izlaska iz refleatrona, kinetička energija iona nije promijenjena zato što ioni s većom energijom ulaze dublje u refleatron gdje se dulje zadržavaju. Takvi ioni na detektor dolaze u isto vrijeme kad i ioni s istim omjerom mase i naboja, ali s manje kinetičke energije.<sup>4</sup>



Slika 6. Shematski prikaz analizatora masa vremena leta s refletronom (preuzeto i prilagođeno iz ref. 4).

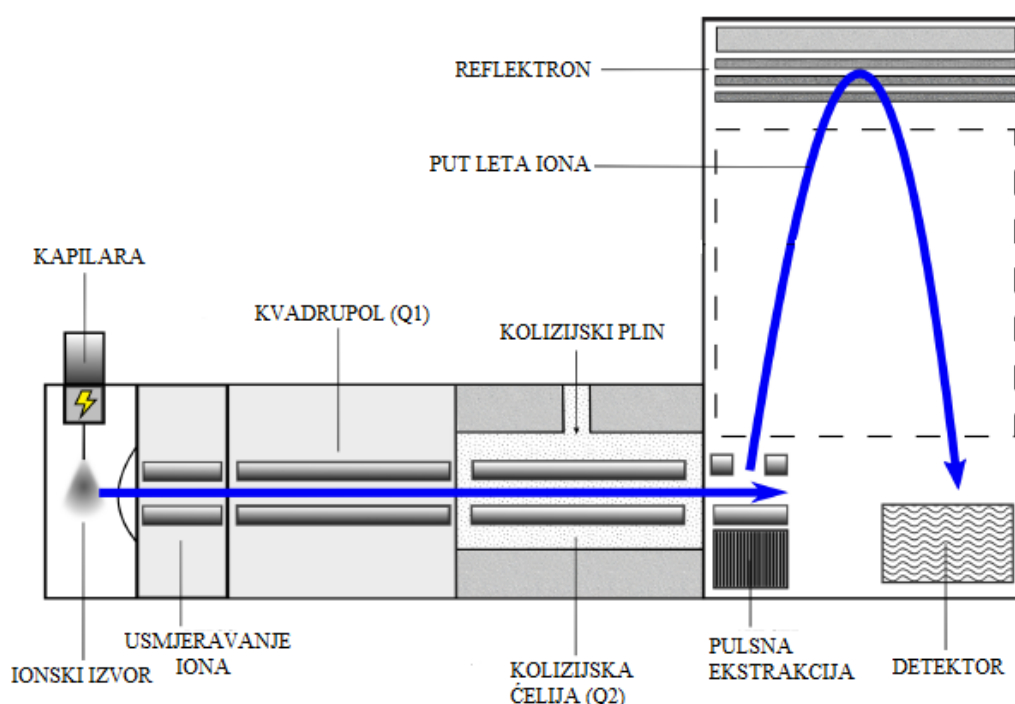
Odgodena pulsna ekstrakcija drugi je način kojim se može poboljšati nisko razlučivanje linearnog analizatora masa koji mjeri vrijeme leta. Za razliku od kontinuirane ekstrakcije gdje se na ione nastale u ionskom izvoru odmah primjenjuje potencijal, zbog čega razlika u kinetičkoj energiji između iona istog omjera mase i naboja uvelike utječe na razlučivanje, kod odgođene ekstrakcije se ioni prvo separiraju na temelju njihove kinetičke energije bez utjecaja polja. Nakon odgode od stotinjak nanosekundi i separacije iona, primijeni se puls koji daje više energije ionima koji su duže zadržani u izvoru. Na taj način ioni koji na početku imaju manje energije, dobivaju više kinetičke energije i uspijevaju doći do detektora u isto vrijeme kao ioni koji su u početku imali više energije i veću brzinu.<sup>1</sup>

#### 2.1.4. Tandemna spektrometrija masa

Tandemna spektrometrija masa podrazumijeva izlaganje iona sudarima s molekulama inertnog ili reaktivnog plina u ionskom izvoru, a može se provoditi u prostoru ili u vremenu. Tandemna spektrometrija masa u prostoru zahtijeva barem dva analizatora masa povezana kolizijskom ćelijom. Ioni dolaze do prvog analizatora masa gdje se selektiraju, nakon čega ulaze u kolizijsku ćeliju u koju se uvodi kolizijski plin. Ioni u kolizijskoj ćeliji podliježu sudarima, fragmentiraju se te konačno dolaze do drugog analizatora masa gdje se ponovno razdvajaju na temelju omjera mase i naboja. Primjer analizatora masa za tandemnu spektrometriju masa u prostoru je kvadrupolni analizator u tandemu s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta, Q-TOF. Kod tandemne spektrometrije masa u vremenu dovoljan je jedan analizator, primjerice linearna ionska stupica, u kojem se jasno mogu odvojiti koraci uzastopne analize na jednom mjestu, ali vremenski moraju biti odvojeni. Nakon prvog razdvajanja, uklanjaju se svi ioni iz analizatora masa, osim željenih iona koji ostaju zarobljeni. Oni se tada podvrgavaju fragmentiranju, a nastali fragmenti se zatim analiziraju.<sup>4</sup>

Q-TOF je primjer spajanja više različitih analizatora masa u tandem čiji je cilj dobivanje instrumenta sa što boljim karakteristikama (slika 7). Započinje kvadrupolom koji može služiti kao filter masa i selektira specifične ione prema omjeru mase i naboja ili samo propušta ione ako se na kvadrupol primjenjuje samo izmjenični potencijal. Drugi kvadrupol predstavlja kolizijsku ćeliju u koju se uvode molekule kolizijskog plina, na primjer dušika ili argona, koje bombardiraju prisutne ione. Procesom disocijacije inducirane kolizijom (engl. *collision-induced dissociation*, CID), nastaju fragmentni ioni koji se usmjeravaju i ubrzavaju prema analizatoru masa koji mjeri vrijeme leta. Drugi kvadrupol također može raditi na način da se primjenjuje samo izmjenični potencijal i u tom slučaju se ioni samo propuštaju bez fragmentiranja. U analizatoru masa koji mjeri vrijeme leta, na ione se primjenjuje pulsna ekstrakcija te se ubrzavaju ortogonalno u odnosu na prvobitni smjer. Pulsna ekstrakcija i prisutnost reflektiona omogućavaju ionima istog omjera mase i naboja da dođu do detektora u isto vrijeme, a reflektori dodatno produljuju put leta iona što poboljšava razlučivanje masa. Budući da se koriste dvije vrste analizatora masa, postoji više načina na koji se mogu prikupiti podaci o uzorku. Prvi način rada služi samo za dobivanje MS spektara pri čemu se na prvi i drugi kvadrupol ne primjenjuje istosmjerni potencijal, već samo izmjenični, što omogućuje prikupljanje informacija o nefragmentiranom prekursor ionu. U drugom načinu rada, središnji

kvadrupol se ponaša kao kolizijska ćelija, dolazi do disocijacije uzrokovane kolizijom, ioni prekursori koji su selektirani u prvom kvadrupolu se fragmentiraju i provodi se MS/MS analiza. Postojanje mogućnosti dobivanja i MS i MS/MS spektara, prednost je spregnutog Q-TOF-MS analizatora jer se mogu prikupljati podaci o prekursor ionima te produktim ionima.<sup>6</sup> Disocijacija inducirana kolizijom povećava broj iona koji se fragmentiraju te se sastoji od dva koraka. Prvi korak je brz i uključuje koliziju iona i mete pri čemu dolazi do pobude iona jer se dio translacijske energije pretvara u unutrašnju, a drugi korak je raspadanje pobuđenih iona i nastanak fragmenata koji se potom detektiraju.<sup>1</sup>



Slika 7. Shematski prikaz Q-TOF-MS (preuzeto i prilagođeno iz ref. 6).

### 2.1.5. Detektori

Detektori se nalaze na samom kraju spektrometra masa i služe pretvorbi detektiranih iona u mjerljiv signal. Odabir detektora temelji se na masi i naboju iona, njihovoj brzini kao i o cjelokupnom dizajnu instrumenta te svrsi analize koja će se na njemu odvijati. Najčešće korišteni detektori su fotomultiplikatori te elektronski multiplikatori.

Elektronski multiplikatori temelje se na ubrzavanju iona iz analizatora masa primjenom visokog potencijala na konverzijsku dinodu. Primijenjeni potencijal suprotnog je predznaka od



naboja iona pa će tako pozitivno nabijeni ioni udarati u negativno nabijenu konverzijsku dinodu pri čemu će nastati sekundarne čestice, elektroni. Slijedi ubrzavanje elektrona i usmjeravanje prema sljedećoj konverzijskoj dinodi te povećanje čime nastaje mjerljiva struja. Tip elektronskog multiplikatora s diskretnim dinodama sadrži 12–20 dinoda koje karakterizira optimalna emisija sekundarnih čestica. Ukoliko se radi o tipu elektronskog multiplikatora s kontinuiranim dinodama, umjesto diskretnih, potencijal se primjenjuje duž detektora te kako elektroni udaraju u stijenke multiplikatora, tako nastaje kaskada elektrona koja se prevodi u mjerni signal.<sup>1</sup>

Fotomultiplikator je druga vrsta često korištenih detektora koji pretvara detektirane ione u elektrone, a zatim u fotone. Uz fotomultiplikator, detektor sadrži i dvije konverzijske dinode te fluorescentni zastor. Mogu se detektirati kationi i anioni pri čemu se kationi iz analizatora masa ubrzavaju i usmjeravaju prema negativno nabijenoj dinodi, dok se anioni usmjeravaju prema pozitivno nabijenoj dinodi. Udarom u dinodu nastaju elektroni koji se pak ubrzavaju prema fluorescentnom zastoru koji će emitirati fotone. Nastali fotoni se detektiraju fotomultiplikatorom čime se dobiva mjerljiva struja. Prednost fotomultiplikatora pred elektronskim multiplikatorima je duže trajanje te manja prisutnost interferencija.<sup>1</sup>

## 2.2. Reakcije fragmentacije

Spektar masa dobiva se pretvaranjem prikupljenih podataka u digitalni oblik koji se pomoću različitih softvera i računala uspješno dovode do analitičara. Spektar masa sadrži informacije o molekulskoj formuli i strukturi analita te informacije o masi. Uz glavni signal molekulskog iona, može sadržavati niz drugih signala koji pripadaju fragmentnim ionima nastalim reakcijama fragmentacije ili pregradnje. Fragmentiranje se proučava nakon određivanja molekulske mase te molekulske formule analita, a određeno je stabilnošću iona prekursora i iona produkta. Kod interpretacije spektra masa i dobivenih signala, veliku pomoć predstavljaju postojeće baze podataka poput NIST/EPA/NIH (engl. *National Institute of Standards and Technology/Environmental Protection Agency/National Institute of Health*, NIST/EPA/NIH).<sup>1</sup>

Ukoliko se kao ionizacijska tehnika koriste elektroraspršenje ili kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku, spektar masa može sadržavati signal protoniranog,  $[M+H]^+$ , ili deprotoniranog molekulskog iona,  $[M-H]^-$ , te signale iona adukata s natrijem, kalijem i slično. Takvi molekulski ioni sadrže paran broj elektrona (engl. *even-electron ion*,  $EE^+$ ), dok

molekulski ion ( $M^{\bullet+}$ ), dobiven ionizacijom elektronima, sadrži neparan broj elektrona (engl. *odd-electron ion*,  $OE^{\bullet+}$ ). To se može odrediti prema pravilu dušika koje određuje da će ion s parnim brojem dušikovih atoma ili bez dušikovih atoma, imati parnu vrijednost omjera mase i naboja kada ima neparan broj elektrona, tako da se radi o radikalnom kationu ili radikalnom anionu. Ukoliko je omjer mase i naboja neparan broj, radi se o ionu s parnim brojem elektrona, to jest kationu ili anionu. Suprotno vrijedi za ion s neparnim brojem dušikovih atoma.<sup>1</sup>

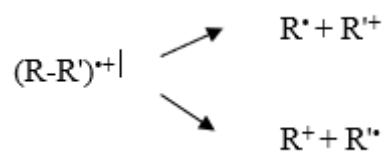
### 2.2.1. Fragmentacija kationa s neparnim brojem elektrona ( $OE^{\bullet+}$ )

Kationski radikali, odnosno kationi s neparnim brojem elektrona imaju naboj delokaliziran po cijeloj molekuli. Budući da naboj nastaje gubitkom elektrona najniže energije ionizacije u molekuli, prilikom pisanja se najčešće lokalizira na heteroatomu s niskom energijom ionizacije. Simbol  $\bullet+$  koji označava ion s neparnim brojem elektrona, može se pisati na kraju molekule pri čemu se ne navodi specifična lokalizacija radikala ili naboja, dok simbol  $\bullet$  ili  $+$  unutar molekule označava točno mjesto s nedostatkom elektrona, odnosno lokalizaciju radikala ili kationa.<sup>1</sup>

Reakcija cijepanja može biti potaknuta mjestom s pozitivnim nabojem koje označava gubitak jednog elektrona te uključuje privlačenje elektronskog para. Premještanje elektronskog para uzrokuje heterolitičko cijepanje i pomak mjesta gdje je lokaliziran pozitivan naboj. Mjesto radikala također može potaknuti reakciju cijepanja jer postoji jaka tendencija prema sparivanju elektrona. Nespareni elektron donira se mjestu radikala kako bi se stvorila veza pa zbog prijenosa jednog elektrona dolazi do homolitičkog cijepanja s promjenom mjesta radikala. Slijedi da fragmentacija kationskih radikala bez pregradnje, već cijepanjem jedne veze, rezultira nastankom iona s parnim brojem elektrona i radikala.<sup>1</sup>

#### Direktna disocijacija ( $\sigma$ )

Direktna disocijacija ili  $\sigma$ -fragmentacija događa se zbog izbacivanja elektrona iz  $\sigma$ -veze kationskog radikala pri čemu nastaje fragment koji zadržava svoj naboj i radikal:

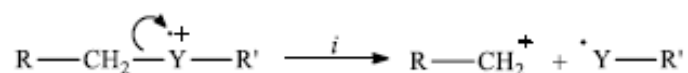


Kao što govori Stevensonovo pravilo, prilikom kompeticije dvaju kationa za odvlačenjem elektrona i stvaranjem neutralnog radikala, nastat će onaj radikal koji ima najvišu energiju

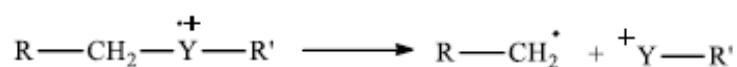
ionizacije. Drugi ion koji teži stvaranju neutralnog radikala s nižom energijom ionizacije, zadržat će pozitivan naboj i dat će signal u spektru masa sukladno tome.<sup>1</sup>

#### Cijepanje $\alpha$ -veze uz heteroatom

Reakcija cijepanja veze uz heteroatom potaknuta je mjestom naboja. Dolazi to heterolitičkog cijepanja veze zbog privlačenja elektronskog para iz te veze:

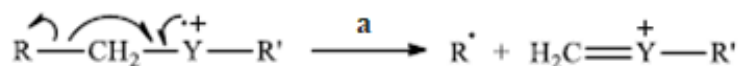


Cijepanje veze uz heteroatom može se objasniti procesom direktne disocijacije koja je, u ovom slučaju, potpomognuta induciranim odvlačenjem elektrona zbog razlike u elektronegativnosti atoma, no to se može dogoditi nakon ionizacije. Slijedeći Stevensonovo pravilo, ion  $^+\text{Y}-\text{R}'$  će nastati ako radikal  $\cdot\text{Y}-\text{R}'$  ima nižu energiju ionizacije od radikala  $\text{R}-\text{CH}_2^{\cdot}$  pri čemu dolazi do premještanja mjesta radikala i zadržavanja naboja što se smatra posebnim slučajem  $\sigma$ -fragmentacije<sup>1</sup>:



#### Cijepanje $\beta$ -veze uz heteroatom

Reakcija cijepanja  $\beta$ -veze uz heteroatom potaknuta je mjestom radikala pri čemu istovremeno dolazi do homolitičkog cijepanja  $\beta$ -veze i nastanka nove  $\alpha$ -veze. Do toga dolazi zbog jednolike raspodjele elektrona između atoma te premještanja nesporenog elektrona na  $\alpha$ -atom. Na taj način, nastajanje nove veze energetski nadomješta cijepanje  $\beta$ -veze:

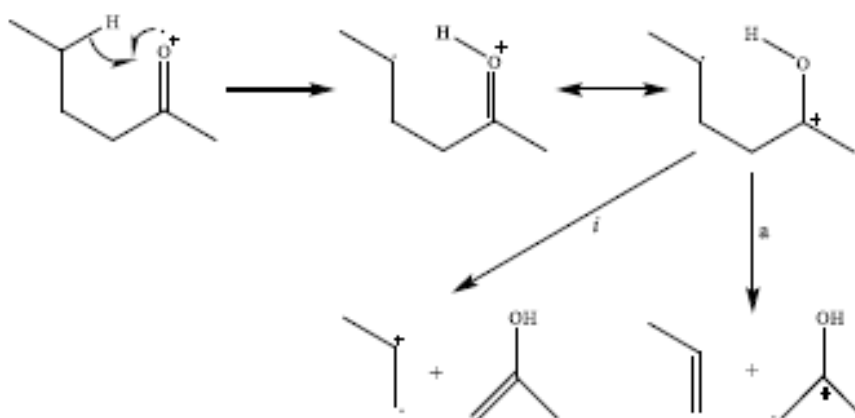


Moguće je više različitih reakcija cijepanja od kojih je nastanak radikala s najvišom energijom ionizacije najčešće. Unatoč tome, ukoliko se spoj sastoji od alkilnih lanaca, tada će preferentno nastati radikal najduljeg lanca. Pozivanjem na Stevensonovo pravilo, ako je energija ionizacije  $\cdot\text{CH}_2-\text{Y}-\text{R}'$  viša od energije ionizacije  $\text{R}^{\cdot}$ , onda će doći do zadržavanja radikala i premještanja naboja pa nastaje  $\text{R}^+$  što također spada u poseban slučaj  $\sigma$ -fragmentacije<sup>1</sup>:



### Fragmentacije OE<sup>+</sup> uz pregradnju

Reakcije pregradnje često predstavljaju problem u analizi spektra masa zato što ih ima mnogo, a samo neke od njih su dovoljno proučene i specifične kako bi se mogle identificirati u spektru. Jedna od njih je McLaffertyjeva pregradnja koja se sastoji od prijenosa vodikovog atoma na mjesto kationskog radikala pomoću šesteročlanog prstena koji ima ulogu intermedijera. Nastaje novi kationski radikal, takozvani distonski kationski radikal kojeg karakterizira udaljeno mjesto radikala od mjesta pozitivnog naboja. Nakon pregradnje, slijedi fragmentacija inducirana mjestom radikala ili mjestom pozitivnog naboja pri čemu, u oba slučaja, dolazi do nastajanja neutralne molekule i novog kationskog radikala. Ukoliko se početni spoj ne sastoji ni od jednog atoma dušika, molekularni ion i fragmentni ioni nastali iz molekularskog iona imat će parnu vrijednost mase.<sup>1</sup>

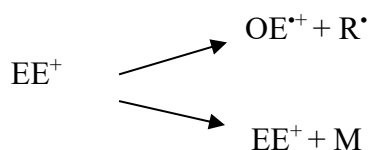


#### 2.2.2. Fragmentacija kationa s parnim brojem elektrona (EE<sup>+</sup>)

Korištenjem jake ionizacijske tehnike, na primjer ionizacije elektronima, nastaju kationski radikali koji sadrže neparan broj elektrona. Ukoliko se žele dobiti molekularni ioni koji imaju paran broj elektrona, mora se koristiti blaga ionizacijska tehnika poput ESI, MALDI, APCI i slično. Kationi s parnim brojem elektrona stabilniji su od kationskih radikala, no dobiveni spektar masa može biti kompliciraniji jer je reakcija pregradnje vrlo česta. Takvi spektri su vrlo osjetljivi na promjene u strukturi pa se analizom izomera s primjenom ionizacije elektronima

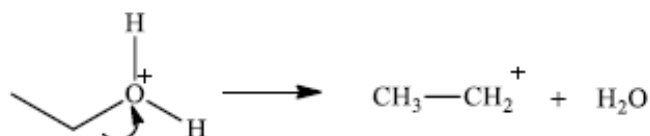
dobivaju isti spektri masa, dok se primjenom elektroraspršenja mogu dobiti vrlo različiti spektri.<sup>1</sup>

Fragmentacijom kationa s parnim brojem elektrona najčešće (95%) ponovno nastaje kation s parnim brojem elektrona, dok u preostalim slučajevima (5%) može nastati radikal. Vjerojatnost da nastane radikal je vrlo mala zbog toga što su reakcije pregradnje vrlo složene, a k tome je reakcija nastanka radikala vrlo endotermna zbog homolitičkog cijepanja veze.<sup>1</sup>

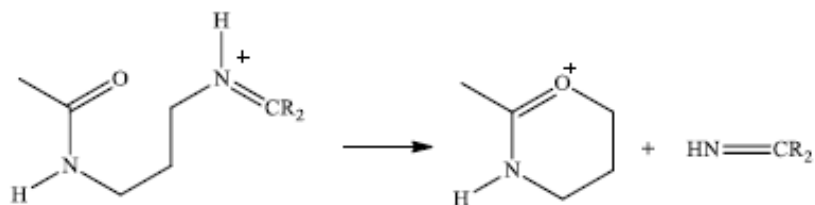


Postoji McLaffertyjev klasifikacijski sistem reakcija fragmentacije iona s parnim brojem elektrona, koje zadovoljavaju pravilo parnosti što znači da iz kationa s parnim brojem elektrona nastaju novi kationi s parnim brojem elektrona uz nastanak neutralnog fragmenta. McLaffertyjev klasifikacijski sistem podrazumijeva četiri glavne reakcije<sup>1</sup>:

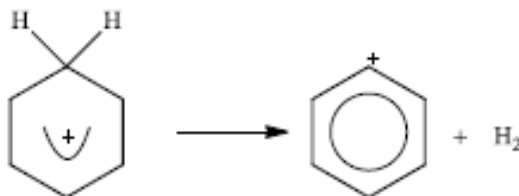
1) Cijepanje veze uz premještanje naboja



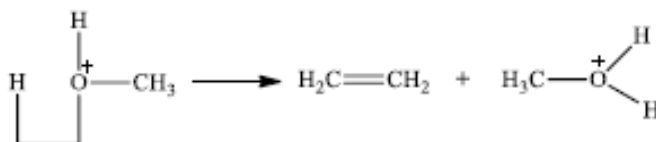
2) Cijepanje veze uz ciklizaciju i premještanje naboja



3) Cijepanje dvije veze cikličkog iona uz zadržavanje naboja



4) Cijepanje dvije veze uz pregradnju i zadržavanje naboja



Prvi i drugi tip reakcija se najčešće pojavljuju. Prvi tip reakcije se odvija ako su protonirana mjesta manje bazična, a stabilnost kationskog produkta olakšava gubitak neutralne molekule. Drugi tip reakcije je sličan prvom, uz mogućnost ciklizacije ako je prisutan heteroatom na određenom položaju.<sup>1</sup>

### 2.2.3. Fragmentacija aniona

Općenito, snimanje spektara uz negativnu ionizaciju i praćenje reakcija fragmentacije iona negativnog naboja manje se koristilo kod analiza spektrometrijom masa zbog toga što je takav način snimanja kasnije razvijen te je prinos negativno nabijenih iona u ionizacijskom izvoru bio manji nego što je slučaj za pozitivno nabijene ione. Daljnjim razvojem instrumentacije, snimanje u negativnom načinu snimanja značajno je poboljšano te se uspješno postići visoka osjetljivost. Najčešće se promatra deprotonirani molekulski ion,  $[M-H]^-$ , s parnim brojem elektrona koji sadrži manje energije nego pozitivno nabijeni ioni s parnim brojem elektrona, što na kraju rezultira slabijom fragmentacijom i često zahtijeva analizu tandemnom spektrometrijom masa kako bi se mogao primijeniti jači kolizijski potencijal.<sup>1</sup>

U reakcijama fragmentacije aniona s parnim brojem elektrona dolazi do homolitičkog cijepanja veze, nastajanja alkilnih radikala i nastanka jednog ili više  $H^{\bullet}$  radikala. Može doći i do nastajanja kompleksa aniona i neutralne molekule što je popraćeno premještanjem naboja, deprotonacijom i eliminacijom. Također, moguće su i reakcije pregradnje koje se pojavljuju zbog nastajanja kompleksa iona i molekule, intramolekulske supstitucije i slično.<sup>1</sup>

Anionski radikali ( $OE^{\bullet-}$ ) nastaju vrlo rijetko, a kod fragmentiranja dolazi do cijepanja veze na  $\alpha$ -položaju u odnosu na atom koji nosi naboj ili pak na  $\alpha$ -položaju u odnosu na atom koji je konjugiran s mjestom negativnog naboja.<sup>1</sup>

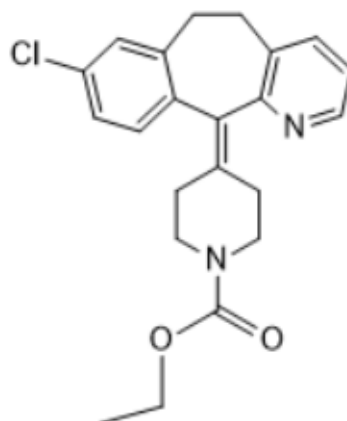
### 2.3. Loratadin

Loratadin je lijek sa smanjenim sedativnim učinkom koji se svrstava u skupinu druge generacije antihistaminika koji se pripisuju pacijentima s raznim alergijskim poremećajima. Oko 30% ljudi obolijeva od urtikarije, alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa te im je nužna pravilna terapija i liječenje radi normalnog funkcioniranja i obavljanja svakodnevnih obaveza. Glavni uzročnik alergijskih reakcija je histamin, biogeni amin koji je medijator u mnogim biološkim reakcijama. Preko svojih receptora sudjeluje u kontrakciji mišića, povećava permeabilnost krvnih žila te sudjeluje i u neurotransmisiji. Može uzrokovati probleme u probanom traktu, jaku glavobolju, umor, crvenilo i osip. Loratadin djeluje kao inhibitor histamina vezanjem na H1-receptore koji se nalaze na površini epitelnih i endotelnih stanica, stanicama dišnih puteva i vaskularnih glatkih mišića i drugih. H1-receptori pripadaju većoj skupini receptora povezanih s G-proteinima te se nalaze u stanju ravnoteže između aktivnog i neaktivnog oblika. Histamin koji može doći u organizam putem konzumiranja hrane i pića, olakšava vezanje transmembranskih domena i time stabilizira aktivan oblik receptora, dok se loratadin veže na drugo mjesto u receptoru i preferira neaktivan oblik. Vezanjem loratadina na receptor, smanjuje se težina simptoma koje histamin može izazvati pri čemu ne utječe na središnji živčani sustav s obzirom na to da ne može prijeći krvno-moždanu barijeru.<sup>7</sup>

#### 2.3.1. Svojstva loratadina

Kemijska formula loratadina je  $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$ , a poznat je i pod nazivima klaritin te alavert. Pronalazimo ga u čvrstom stanju, molarne mase  $382,9 \text{ g mol}^{-1}$ , dok je talište loratadina između  $134\text{--}136 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Struktura loratadina (slika 8) odgovara tricikličkom, piperidinskom derivatu

antihistaminika koji ne sadrži donore za stvaranje vodikovih veza, ali zato sadrži akceptore. Radi se o slaboj bazi čija  $pK_a$  vrijednost pri 25 °C iznosi 4,85–6,00. Loratadin je slabo topljiv lijek ( $< 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pa je važno znati da se topljivost baza povećava sa smanjenjem pH pri pH vrijednostima manjima od  $pK_a$ .<sup>2,7</sup>



Slika 8. Struktura loratadina.

Biofarmaceutski klasifikacijski sistem (engl. *biopharmaceutical classification system*, BCS) smatra se vrlo korisnim kod donošenja odluka prilikom razvoja novog lijeka. Sastoji se od četiri kategorije u koje se svrstava pojedini lijek prema svojstvima koja ga karakteriziraju. U prvu klasu spojeva spadaju lijekovi koji su visoko topljivi i visoko permeabilni poput metoprolola, koji ne limitiraju brzinu apsorpcije. Druga klasa spojeva sastoji se od slabo topljivih, ali visoko permeabilnih lijekova, na primjer itrakonazol. Biodostupnost lijekova druge klase, ograničena je brzinom otapanja pa i najmanji porast topljivosti može značajno utjecati na biodostupnost. Treća klasa spojeva je visoko topljiva, ali nisko permeabilna zbog čega je biodostupnost ograničena putovanjem od lumena crijeva do krvotoka. Slabo topljivi i nisko permeabilni lijekovi spadaju u četvrtu klasu spojeva, gdje i topljivost i mala brzina prijenosa kroz membranu u crijevima, ograničavaju apsorpciju.<sup>8</sup>

Upravo zbog slabe topljivosti, loratadin je svrstan u II. skupinu prema BCS klasifikacijskom sistemu. Lijek se može ionizirati te mu topljivost jako ovisi o gastrointestinalnom pH što rezultira varijabilnom biodostupnosti. Slaba topljivost lijeka u vodi predstavlja veliki problem prilikom njegovog razvoja zato što topljivost određuje brzinu otapanja i početak djelovanja lijeka. Nadalje, potrebno je povećati dozu lijeka kako bi koncentracija lijeka u krvi postigla razinu koncentracije dovoljne za terapijsko djelovanje i suzbijanje simptoma, što pak dovodi



do problema toksičnosti u gastrointestinalnom sustavu nakon oralne primjene. Povećanje doze i korištenje veće količine farmaceutski aktivne tvari, nužno će dovesti i do povećanja cijene samog proizvoda te do problema u proizvodnji. Ukoliko se želi tabletirati velika količina lijeka, može doći do lijepljenja čestica pa je potrebno dobro razmisliti o razvoju, dizajnu i formulaciji lijeka.<sup>8</sup>

Loratadin se, pravilno korišten i doziran, može primjenjivati za liječenje alergijskih reakcija. Ipak, povezuje se i s niskim postotkom pojave povišenja jetrenih enzima. Vrlo rijetko i u vrlo malom broju prijavljenih slučajeva, loratadin i njegov metabolit desloratadin mogu uzrokovati određena oštećenja jetre što može nalikovati virusnom hepatitisu. Ni u jednom od prijavljenih slučajeva, nije postojala jasna povezanost oštećenja s loratadinom, već su oštećenja jetre mogla nastati i zbog drugih uzroka koji nisu povezani s uzimanjem lijeka.<sup>7</sup>

### 2.3.2. Metode povećanja topljivosti lijekova

Fizikalno-kemijski čimbenici koji određuju topljivost spoja i brzinu otapanja su efektivna površina, koeficijent difuzije, debljina difuzijskog sloja, zasićenje, količina otopljenog spoja i volumen medija za otapanje. Razvijeno je nekoliko metoda kojima se uspješno povećava topljivost lijekova u vodi i koje su se pokazale financijski učinkovitima s poboljšanim konačnim produktom. Neke od tih metoda su stvaranje soli, redukcija veličine čestica lijeka, stvaranje metastabilnih polimorfa, stvaranje inkluzijskih kompleksa te modifikacija pH.<sup>8</sup>

Poznato je da se postupak stvaranja soli često koristi za povećanje topljivosti ioniziranog lijeka gdje se sol stvara preko prijenosa protona s kiseline na bazu. Soli kiselih ili bazičnih lijekova više su topljive od slobodnih oblika odgovarajuće kiseline ili baze zato što se mijenja pH na površini čestice soli te dolazi do povećanja topljivosti u vodenom difuzijskom sloju koji okružuje krutinu.<sup>8</sup>

Druga tehnika koja se koristi je sinteza metastabilnog kristalnog polimorfa koji ima isti kemijski sastav, ali drugačiju kristalnu strukturu i različita fizikalno-kemijska svojstva. Pokazano je da metastabilni polimorfi imaju veću topljivost od termodinamički stabilnih polimorfa, no potrebno ih je pažljivo pratiti jer je moguć prelazak iz metastabilnog u termodinamički stabilno stanje prilikom proizvodnje i skladištenja.<sup>8</sup>

Topljivost se može povećati i smanjenjem veličine čestica lijeka. Mehaničkim usitnjavanjem većih čestica lijeka ili pak stvaranjem nanokristala, povećava se brzina otapanja

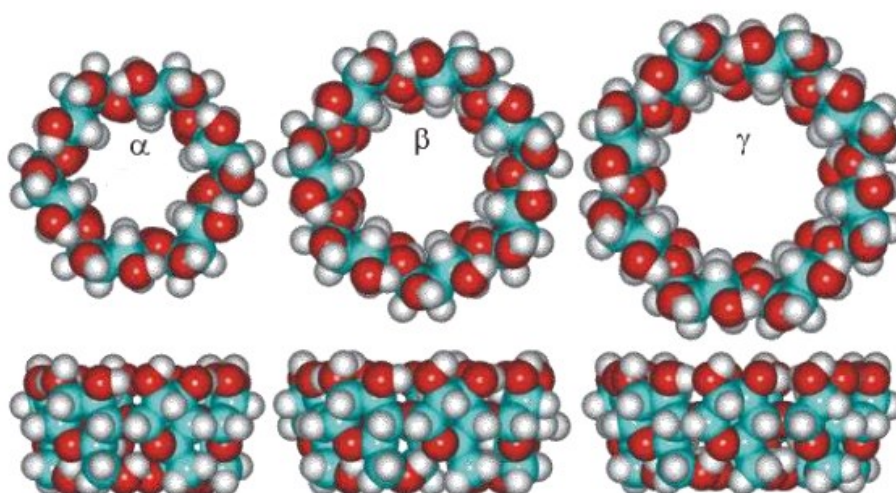
zato što se smanjenjem veličine čestice, smanjuje i debljina difuzijskog sloja. Nedostatak smanjenja čestica je mogućnost aglomeracije čestica i smanjenje površine koja se može otopiti.<sup>8</sup>

Ciklodekstrini i njihovi derivati su široko primjenjivani u farmaciji zbog mogućnosti stvaranja inkluzijskih kompleksa s lijekovima. Pokazano je da se stvaranjem inkluzijskih kompleksa, može povećati topljivost lijeka zarobljenog u hidrofobnoj šupljini ciklodekstrina.<sup>8</sup>

Zadnja spomenuta metoda, modifikacija pH, se odnosi na promjenu zasićenosti i ugradnju pH modifikatora u određeni oblik doziranja lijeka. Time se može utjecati na pH mikroskopskog sloja koji okružuje krutinu pri čemu krutina stvara zasićenu otopinu s adsorbiranim molekulama vode.<sup>8</sup>

## 2.4. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi građeni od glukopiranoznih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama. Broj glukopiranoznih jedinica može varirati pa je poznato više različitih ciklodekstrina koji su široko primjenjivani u industriji (slika 9). Šest povezanih glukopiranoznih jedinica čini  $\alpha$ -ciklodekstrin ( $\alpha$ -CD), sedam glukopiranoznih jedinica ima  $\beta$ -ciklodekstrin ( $\beta$ -CD), dok se  $\gamma$ -ciklodekstrin ( $\gamma$ -CD) sastoji od njih osam. U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, najčešće se koristi  $\beta$ -ciklodekstrin jer je lako dostupan, jeftin te ne zahtijeva složen način priprave.



Slika 9. Strukture  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina (preuzeto i prilagođeno iz ref. 9).

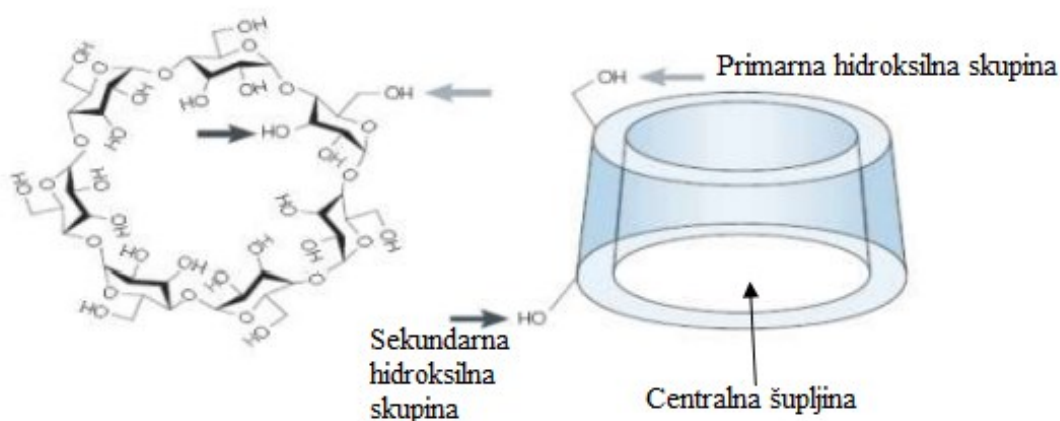
Ciklodekstrin je prvi puta otkriven 1891. godine kada je prilikom razgradnje škroba bakterijom *Bacillus amylobacter*, nastala mala količina kristalnog produkta zbog korištenja onečišćenih kultura. Autor Villiers je taj produkt nazvao „celobiozin“. Nadalje, Schardinger je 1904. godine izolirao novi organizam koji je bio sposoban proizvoditi aceton i etanol iz biljnog materijala koji je sadržavao šećer i škrob. 1911. godine je soj organizma nazvao *Bacillus macerans* te je pokazao da taj soj također proizvodi i velike količine kristalnih ciklodekstrina iz škroba, koje je Schradinger nazvao „kristalni dekstrin  $\alpha$ “ i „kristalni dekstrin  $\beta$ “. Kasnije se zaključilo da su Villiersove kulture vjerojatno bile onečišćene upravo sojem *Bacillus macerans* te da je celobiozin zapravo ciklodekstrin. Strukture  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina određene su rendgenskom kristalografijom 1942. godine, dok je  $\gamma$ -ciklodekstrin izoliran tek 1935. godine, a struktura mu je određena 1948. godine također pomoću rendgenske kristalografije. Na samim počecima razvoja, izolacija čistih ciklodekstrina je bila vrlo teška zbog toga što se razgradnjom škroba dobivaju i linearni i ciklički dekstrini te ostali produkti. Mali prinosi čistih ciklodekstrina sprječavali su njihovu primjenu u industriji pa je tek 1970-ih, zajedno s biotehnološkim napretkom, započela značajnija proizvodnja i korištenje ciklodekstrina u farmaceutskoj industriji.<sup>3,10</sup>

Dekstrini su produkti hidrolitičke razgradnje škroba, polisaharida biljnog podrijetla koji služi kao pričuva glukoze, to jest energije. Daljnjom razgradnjom dekstrina i djelovanjem enzima ciklodekstrin-glukoziltransferaze, kojeg proizvode mikroorganizmi roda *Bacillus*, dobivaju se linearni oligosaharidi. Intramolekularnom ciklizacijom linearnih oligosaharida, bez prisutnosti vode, nastaju ciklodekstrini. Budući da razgradnjom škroba nastaje smjesa  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina, prema potrebi reakcija se može usmjeriti prema dobivanju većeg udjela željenog produkta kontrolom temperature i pH ili pak dodatkom određenih tvari. Na primjer, toluen se dodaje za veći prinos  $\beta$ -ciklodekstrina, dekan za  $\alpha$ -ciklodekstrin, a metilketon i  $\alpha$ -naftol za veće prinose  $\gamma$ -ciklodekstrina.<sup>9</sup>

#### 2.4.1. Struktura i svojstva ciklodekstrina

Ciklodekstrini se često primjenjuju u farmaceutskoj industriji radi njihove strukture i mogućnosti stvaranja inkluzijskih kompleksa u kojima se ponašaju kao molekule domaćini. Budući da su ciklodekstrini građeni od glukopiranoznih jedinica koje se nalaze u konformaciji stolca, molekule ciklodekstrina su oblikovane kao krnji stožac s centralnom šupljinom (slika 10). Primarne i sekundarne hidroksilne skupine nalaze se na suprotnim krajevima šupljine zbog

rigidnosti strukture i nemogućnosti rotacije oko  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze. Orijentirane su prema vanjskoj strani, primarne hidroksilne skupine na manjem otvoru, a sekundarne na većem otvoru molekule.



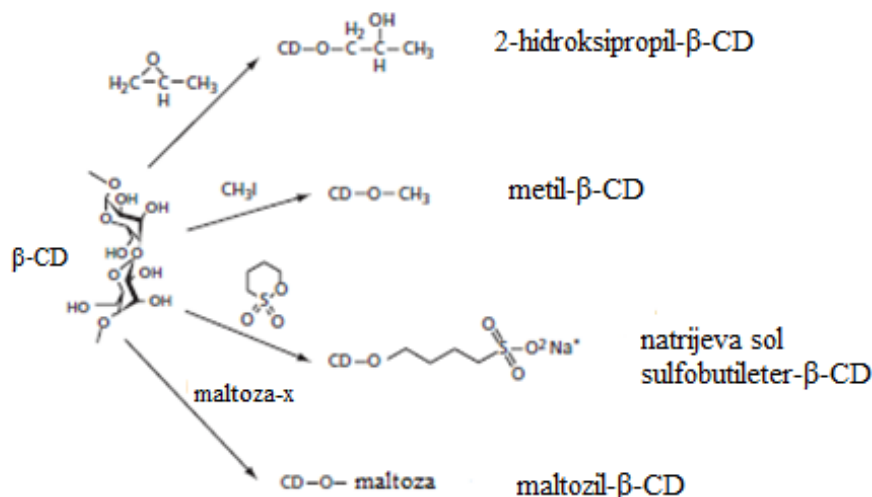
Slika 10. Struktura  $\beta$ -ciklodekstrina te prikaz oblika krnjeg stošca (preuzeto i prilagođeno iz ref. 9).

Opisana struktura osigurava hidrofilnu vanjsku površinu i dobru topljivost u vodi (tablica 1), dok centralna šupljina ima lipofilni karakter i može zarobiti hidrofobne molekule. Iako im je vanjska površina hidrofilna, prirodni ciklodekstrini mogu graditi intramolekulske vodikove veze između hidroksilnih skupina čime se pridonosi stabilizaciji kristalne rešetke molekule, ali i slabijoj topljivosti jer se smanjuje broj slobodnih hidroksilnih skupina koje mogu interagirati s molekulama vode. Kako bi se povećala topljivost prirodnih ciklodekstrina, često se hidroksilne skupine supstituiraju drugim skupinama (tablica 2). Time se sintetiziraju razni derivati ciklodekstrina (slika 11) poput nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin*, RM $\beta$ CD), hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin*, HP $\beta$ CD), natrijeva sol sulfobutyleter- $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin sodium salt*, SBE $\beta$ CD) i razgranati ciklodekstrini poput maltozil- $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin*, M $\beta$ CD). Prema podacima u prikazanim tablicama, topljivost prirodnog  $\beta$ -ciklodekstrina se može povećati za čak dvadeset puta ukoliko se supstituira barem jedna hidroksilna skupina.<sup>3,9</sup>

Tablica 1. Svojstva  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina (preuzeto i prilagođeno iz ref. 3).

Svojstvo	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Molekulska masa	972,84	1134,98	1297,12
Broj glukopiranoznih jedinica	6	7	8
Unutarnji promjer / nm	0,50	0,62	0,80
Vanjski promjer / nm	1,46	1,54	1,75
Topljivost u vodi pri 25 °C / mg mL <sup>-1</sup>	129,5 ± 0,7	18,4 ± 0,2	249,2 ± 0,2

Uvidom u prikazane rezultate, može se zaključiti kako topljivost ciklodekstrina u vodi ne ovisi o broju hidroksilnih skupina u molekuli, već o cijeloj strukturi molekule i mogućnosti stvaranja intramolekulskih vodikovih veza.  $\beta$ -ciklodekstrin je najslabije topljiv u vodi zato što stvara veći broj intramolekulskih vodikovih veza, čak njih sedam, koje povećavaju rigidnost molekule, dok  $\alpha$ -ciklodekstrin, koji ima manje hidroksilnih skupina, zbog steričkih smetnji može stvoriti samo pet intramolekulskih vodikovih veza čime se povećava njegova topljivost.  $\gamma$ -ciklodekstrin ima najveću vrijednost topljivosti u vodi zato što mu je struktura neplanarna te fleksibilnija.<sup>9</sup>

Slika 11. Derivati  $\beta$ -ciklodekstrina (preuzeto i prilagođeno iz ref. 3).

Tablica 2. Svojstva derivata  $\beta$ -ciklodekstrina (preuzeto i prilagođeno iz ref. 3).

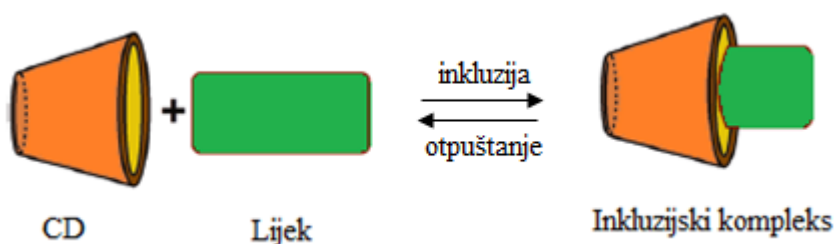
Svojstvo	RM $\beta$ CD	HP $\beta$ CD	SBE $\beta$ CD	M $\beta$ CD
Molekulska masa	1312	1400	2163	1459
Topljivost u vodi pri 25 °C/ mg mL <sup>-1</sup>	>600	>600	>500	>500
Molarni stupanj supstitucije	1,8	0,65	0,9	0,14

Ciklodekstrini ne izazivaju imunološku reakciju organizma prilikom konzumiranja te su nisko toksični zato što zbog svoje hidrofilne površine vrlo teško prolaze kroz lipofilne membrane što ograničava njihovu apsorpciju. Time postaju idealni za stvaranje inkluzijskih kompleksa sa slabo topljivim lijekovima i predstavljaju rješenje problema slabe topljivosti lijekova koji su visoko permeabilni.<sup>9</sup>

## 2.5. Inkluzijski kompleksi

Inkluzijski kompleksi (slika 12) su nekovalentni kompleksi koji se sastoje od molekule domaćina i molekule gosta koja se smjesti u centralnu šupljinu molekule domaćina uz stvaranje Van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija. Ciklodekstrini zbog svoje hidrofobne šupljine stvaraju inkluzijske komplekse s velikim brojem hidrofobnih lijekova, bez obzira je li lijek u čvrstom, tekućem ili plinovitom agregacijskom stanju. Upravo zbog toga su široko primjenjivani u farmaceutskoj industriji jer se nastajanjem inkluzijskih kompleksa uspješno povećava topljivost lijekova, a time i lijek postaje učinkovitiji i služi svojoj svrsi.<sup>9</sup>

Kompleksiranje lijeka ograničeno je veličinom šupljine ciklodekstrina pa bi veličina molekule lijeka trebala biti manja kako bi se uspješno smjestila unutar ciklodekstrina. Također, važna je i polarnost molekule gosta, odnosno inkluzijske komplekse s ciklodekstrinima uspješno stvaraju samo one molekule gosta koje imaju manju polarnost od vode. Molekula gost ima visoki afinitet prema hidrofobnoj unutrašnjosti ciklodekstrina pa ulaskom u šupljinu ciklodekstrina dolazi do oslobađanja molekula vode bogatih energijom iz hidrofobne šupljine. Otpuštanjem uređenih molekula vode, povećava se entropija sustava, a smanjuje entalpija i to se smatra termodinamičkim pokretačem nastajanja inkluzijskih kompleksa.<sup>9</sup>



Slika 12. Nastajanje inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina i lijeka (preuzeto i prilagođeno iz ref. 11).

Kompleksiranje molekule gosta, to jest molekule lijeka ciklodekstrinom, poboljšava njegovu topljivost, stabilnost i biodostupnost. Stabilnost molekule gosta se povećava zbog toga što se nalazi unutar ciklodekstrina pa je relativno zaštićena od vanjskih utjecaja. Ulaskom lijeka u šupljinu ciklodekstrina, ne dolazi do cijepanja ili nastajanja veza unutar molekule lijeka pa njegova struktura ostaje identična onoj prije kompleksiranja.  $\beta$ -ciklodekstrin se najčešće koristi za stvaranje inkluzijskih kompleksa zbog optimalnog promjera hidrofobne šupljine, stvaranja inkluzijskih kompleksa visoke stabilnosti i niže cijene od drugih spomenutih ciklodekstrina.<sup>9,11</sup>

### 2.5.1. Metode priprave inkluzijskih kompleksa

Metoda gnječenja (engl. *kneading method*) je pogodna za stvaranje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina i slabo topljivih lijekova u vodi gdje se lijek u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju prvo otopi, a zatim se doda u suspenziju otopine ciklodekstrina. Slijedi gnječenje u tarioniku, nakon čega se smjesa suši. Na kraju se dobivena krutina ispere otapalom kako bi se uklonio suvišak čestica adsorbiranih na ciklodekstrin te posuši korištenjem vakuuma. Ovom metodom se ostvaruje dobar prinos inkluzijskog spoja, ali nije praktična za veće skale proizvodnje.<sup>12</sup>

Metoda koprecipitacije (engl. *co-precipitation method*) uključuje otapanje molekule gosta u organskom otapalu poput metanola ili kloroforma, nakon čega se doda određena količina ciklodekstrina koji se otapa u vodi. Ukoliko se želi dobiti iskristalizirani produkt, otopina se stavlja u ledenu kupelj, a potom se dobiveni kristali ispiru s organskim otapalom i suše na 50 °C.<sup>12</sup>

Metoda zamrzavanja i sušenja, odnosno liofilizacije, (engl. *freeze-drying method*) je prikladna za termički nestabilne molekule gosta topljive u vodi. Prvo se molekula gosta i

ciklodekstrin otope u vodi uz miješanje, a nakon zamrzavanja i sušenja dobiva se praškasti materijal koji se ispere otapalom i suši korištenjem vakuuma.<sup>12</sup>

Sušenje raspršivanjem (engl. *spray drying*) je također jednostavna metoda pripreme inkluzijskih kompleksa. Ciklodekstrin i molekula gosta se otope u deioniziranoj vodi, nakon čega se dobivena otopina suši u uređaju za raspršivanje pri temperaturi 50–70 °C. Budući da se koristi viša temperatura, ova metoda može se koristiti samo za termički stabilne molekule.<sup>12</sup>

## 2.6. Analiza ciklodekstrina te inkluzijskih kompleksa spektrometrijom masa

Ciklodekstrini i njihovi derivati najčešće postoje u obliku cikličkih heksamera, heptamera ili oktamera te mogu vezati male hidrofobne molekule u svoju šupljinu. Zbog potencijalne biološke primjene, ciklodekstrini su tema istraživanja u znanstvenim radovima koji pojašnjavaju njihovu strukturu i svojstva pomoću tehnike spektrometrije masa.

Sforza i sur. istraživali su nesupstituirane i disupstituirane  $\beta$ -ciklodekstrine spektrometrijom masa uz elektroraspršenje kao ionizacijsku tehniku, u prisutnosti natrijevog klorida u suvišku. Kako bi mogli pretpostaviti fragmentacijske puteve kompliciranih spojeva i različitih regioizomera, istraživači su proučavali fragmentaciju najjednostavnijeg spoja, adukta  $\beta$ -ciklodekstrina s natrijem što je relevantno za ovaj diplomski rad u kojem se proučava fragmentacija nesupstituiranog protoniranog  $\beta$ -ciklodekstrina. U dobivenom spektru najintenzivniji je signal molekulskog iona pri  $m/z$  1157,  $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ , dok se primjenom većeg kolizijskog potencijala uočava smanjenje intenziteta signala molekulskog iona, a povećanje intenziteta signala fragmentnih iona. Signali fragmentnih iona se pojavljuju u seriji s razlikom od 162 Da ( $m/z$  1157/995/833/671/509/347) pa se može zaključiti kako  $\beta$ -ciklodekstrin postepeno gubi svoje glukopiranozne podjedinice. Signal pri  $m/z$  995 odgovara aduktu natrija sa šest povezanih glukopiranoznih podjedinica, odnosno odgovara gubitku jedne glukopiranozne podjedinice od 162 Da. Signal pri  $m/z$  833 odgovara aduktu s pet povezanih podjedinica,  $m/z$  671 četiri,  $m/z$  509 tri, a  $m/z$  347 odgovara aduktu natrija s dvije povezane glukopiranozne podjedinice.<sup>13</sup>

Peptu i Harabagiu koristili su tandemnu spektrometriju masa za analizu derivata ciklodekstrina, nasumično esterificiranog  $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *randomly esterified 6-O-(3-hydroxybutyryl)- $\beta$ -cyclodextrin*, HBCD) te triacetil- $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *triacyetyl- $\beta$ -*



*cyclodextrin*, TABCD). Cilj rada bio je predložiti fragmentacijske puteve navedenih derivata koji mogu poslužiti u budućnosti za određivanje struktura novih sličnih spojeva. Prema dobivenim rezultatima predložili su tri moguća fragmentacijska puta za molekulski ion  $[\text{TABCD}+\text{H}]^+$  kojem odgovara signal  $m/z$  2017. Predloženi fragmentacijski putevi uključivali su gubitak cijele neutralne esterificirane glukopiranozne podjedinice ciklodekstrina ili cijepanje esterske veze na alkilnoj ili acilnoj strani supstituenta uz gubitak neutralnih dijelova molekule različitih masa. Fragmentacijski putevi za molekulski ion  $[\text{HBCD}+\text{H}]^+$  kojem odgovara signal  $m/z$  1565, bili su vrlo slični. Predložen je gubitak cijele glukopiranozne podjedinice ili cijepanje esterske veze na ranije spomenutim mjestima. U ovom radu se dokazalo da spektrometrija masa može biti vrlo korisna tehnika s pouzdanim rezultatima za analizu ciklodekstrina i njihovih derivata.<sup>14</sup>

Budući da je pokazano da ciklodekstrini uvelike doprinose poboljšanju topljivosti lijekova vezanih u hidrofobnu šupljinu, široko su primjenjivani u farmaceutskoj industriji, a inkluzijski kompleksi temeljeni na ciklodekstrinima su istraženi i analizirani spektrometrijom masa u nizu objavljenih znanstvenih radova. Primjerice, Silion i sur.<sup>11</sup> objavili su revijalni rad analize inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina i antifungalnih spojeva, antioksidansa te fluorescentnih boja, za što se koristila spregnuta tehnika tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa, uz Q-TOF kao hibridni analizator masa.

Postoje brojni antifungalni spojevi čije je djelovanje ograničeno slabom topljivosti, a Marangoci i sur.<sup>15</sup> u svojem su radu istraživali inkluzijski kompleks  $\beta$ -ciklodekstrina i derivata lijeka propikonazola, odnosno protoniranog propikonazol nitrata, koji ima veću antifungalnu aktivnost i manje je toksičan. Spektrometrijom masa, uz elektroraspršenje kao ionizacijsku tehniku, analizirali su se  $\beta$ -CD, PCZ te  $\text{NO}_3\text{PCZ}$  u pozitivnom načinu snimanja. U dobivenom spektru  $\beta$ -ciklodekstrina uočeni su signali protoniranog  $\beta$ -ciklodekstrina,  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$ , te adukt  $\beta$ -ciklodekstrina s natrijem,  $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ . Signali su uočeni pri  $m/z$  1135 za  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  te pri  $m/z$  1157 za  $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ , a dvostruko protoniranom ciklodekstrinu,  $[\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$ , pripada signal pri  $m/z$  568. Analiza lijeka propikonazola rezultirala je spektrom u kojem su uočeni signali koji pripadaju monomeru  $[\text{PCZ}+\text{Na}]^+$  pri  $m/z$  364 i dimeru  $[2\text{PCZ}+\text{Na}]^+$  pri  $m/z$  707. Prema dobivenim rezultatima, zaključilo se kako postoji mogućnost dimerizacije propikonazola u otopini ili u plinskoj fazi. Signal protoniranog propikonazol nitrata,  $[\text{NO}_3\text{PCZ}+\text{H}]^+$ , pak je uočen pri  $m/z$  405. Unatoč dobrim rezultatima za pojedinačne spojeve, najvažnije je potvrditi nastajanje inkluzijskog kompleksa, a on je u dobivenom spektru uočen pri  $m/z$  1540, što

odgovara signalu protoniranog iona kompleksa,  $[\beta\text{-CD/NO}_3\text{PCZ+H}]^+$ . Nadalje, proveda se i tandemna spektrometrija masa kako bi se prikupile informacije o stabilnosti i jačini vezanja nekovalentnog kompleksa primjenom različitih kolizijskih potencijala. Intenzitet molekulskog iona pri  $m/z$  1540 smanjivao se s povećanjem vrijednosti kolizijskog potencijala, a dodatno su uočeni signali koji pripadaju gubitku propikonazola iz inkluzijskog kompleksa te fragmentnim ionima raspadnutog  $\beta$ -ciklodekstrina.<sup>15</sup>

Szabados-Nacsa i sur. objavili su rad u kojem određuju fizikalno-kemijska svojstva inkluzijskog kompleksa loratadina i dimetil- $\beta$ -ciklodekstrina (DIMEB) pa su uz NMR spektroskopiju, provedi i analizu spektrometrijom masa uz elektroraspršenje kao ionizacijsku tehniku. Inkluzijski kompleks LOR/DIMEB je pripremljen metodom gnječenja u molarnom omjeru 1:1 i 1:2, a potom je analiziran spektrometrijom masa u pozitivnom načinu snimanja. U dobivenim MS spektrima uočeni su svi željeni signali, protonirani loratadin,  $[\text{LOR+H}]^+$ , pri  $m/z$  383, protonirani dimetil- $\beta$ -ciklodekstrin,  $[\text{DIMEB+H}]^+$ , pri  $m/z$  1331 te nastali protonirani inkluzijski kompleks,  $[\text{LOR/DIMEB+H}]^+$ , pri  $m/z$  1730. Kod analiziranja inkluzijskih kompleksa pripremljenih u različitim molarnim omjerima, uočen je samo kompleks omjera 1:1, prema čemu su istraživači mogli zaključiti kako DIMEB stvara inkluzijske komplekse u plinskoj fazi prema određenoj stehiometriji.<sup>2</sup>

Prema opisanim objavljenim radovima te podudaranjem rezultata dobivenih spektrometrijom masa, NMR spektroskopijom te UV-VIS spektroskopijom, pokazalo se kako je spektrometrija masa uz elektroraspršenje odlična tehnika za karakterizaciju različitih inkluzijskih kompleksa u plinskoj fazi. MS te MS/MS analizom može se dokazati nastajanje inkluzijskog kompleksa te se mogu prikupiti informacije o strukturi kompleksa, stehiometriji, fragmentacijskom putu, stabilnosti te jačini vezanja molekule gosta i molekule domaćina.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije

- mravlja kiselina (FoA), Agilent Technologies, SAD
- Metanol (MeOH), Carlo Erba, Španjolska
- Ultračista voda (H<sub>2</sub>O), dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sustava za pročišćavanje, Merck, Njemačka
- Loratadin (LOR), Carbosynth, Ujedinjeno Kraljevstvo
- β-ciklodekstrin (β-CD), Cyclolab, Mađarska
- nasumično metilirani β-ciklodekstrin (RMβCD) s prosječnim stupnjem supstitucije 12 (engl. *degree of substitution*, DS), Cyclolab, Mađarska
- filteri – Chromafil, veličina pora 0,20 μm, Macherey-Nagel, Njemačka

### 3.2. Instrumenti

Analiza inkluzijskih kompleksa, loratadina, β-ciklodekstrina i njegovog derivata provedena je na spektrometru masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupol Time-of-Flight (Q-TOF) uz direktno uvođenje uzoraka pomoću Agilent 1290 Infinity II HPLC sustava uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor. Otopine uzoraka bile su uvedene u instrument injektiranjem 5 μL otopine uzorka uz protok mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Mobilna faza sastojala se od 0,1% mravlje kiseline u vodi (A) i u metanolu (B), u omjeru A:B 50:50 (v/v). Spektri su snimani u pozitivnom i negativnom načinu snimanja.

### 3.3. Radni uvjeti

Određene su optimalne vrijednosti parametara za snimanje u pozitivnom načinu snimanja, čiji je cilj postizanje što većeg intenziteta signala inkluzijskog kompleksa. Pratila se temperatura i protok protočnog plina (N<sub>2</sub>), tlak raspršivača, potencijal kapilare, potencijal mlaznice te temperatura i protok plina za desolvataciju. Nakon snimanja spektra inkluzijskog kompleksa

LOR/ $\beta$ -CD u omjeru 1:1 pri početnim vrijednostima parametara, vrijednosti su varirane u određenom rasponu preporučenom od strane proizvođača instrumenta. Dobiveni intenziteti signala inkluzijskog kompleksa međusobno su uspoređeni te je vrijednost parametra s najvišim intenzitetom određena kao optimalna. Početna temperatura protočnog plina iznosila je 200 °C pri protoku od 11 L min<sup>-1</sup>. Početni tlak raspršivača iznosio je 25 psi, potencijal kapilare 3500 V, dok je potencijal mlaznice iznosio 0 V. Početne vrijednosti temperature i protoka plina za desolvataciju iznosile su 200 °C, odnosno 17 L min<sup>-1</sup>.

Nadalje, u tablici 3 prikazani su parametri snimanja MS te MS/MS spektara za pojedini spoj nad kojim se provodila analiza. Kod provođenja tandemne spektrometrije masa korišteni su potencijali od 10 V, 20 V i 40 V. Na temelju dobivenih rezultata MS/MS analizom, određeni su rasponi kolizijskih potencijala koji se koriste za konstruiranje krivulja ovisnosti relativnog intenziteta o kolizijskom potencijalu (engl. *breakdown curves*). Za lijek LOR raspon kolizijskih potencijala iznosio je 5–46 V, za  $\beta$ -CD 2–28 V, za RM $\beta$ CD 2–32 V, za inkluzijski kompleks LOR/ $\beta$ -CD 2–30 V te za inkluzijski kompleks LOR/RM $\beta$ CD 2–44 V.

Tablica 3. Parametri snimanja spektara metodom spektrometrije masa i tandemne spektrometrije masa.

Spoj	Analiza	Raspon <i>m/z</i>	Brzina	Vrijeme	Prijelazi / spektar
			prikupljanja podataka / spektar s <sup>-1</sup>	prikupljanja podataka / ms spektar <sup>-1</sup>	
LOR	MS	100–1000	7	142,9	808
	MS/MS	50–400	5	200,0	1115
$\beta$ -CD	MS	100–1500	7	142,9	793
	MS/MS	50–1200	5	200,0	1084
RM $\beta$ CD	MS	100–2000	7	142,9	780
	MS/MS	50–1400	5	200,0	1078
LOR+ $\beta$ -CD	MS	100–2000	7	142,9	780
	MS/MS	50–1550	5	200,0	1074
LOR+RM $\beta$ CD	MS	100–2000	7	142,9	780
	MS/MS	50–1750	5	200,0	1069

### 3.4. Priprava otopina za analizu

Ishodne otopine loratadina,  $\beta$ -ciklodekstrina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina pripremljene su otapanjem pojedinog spoja u metanolu (LOR), odnosno vodi (CD), tako da je konačna masena koncentracija iznosila  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Radne otopine LOR ( $17,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\beta$ -CD ( $50,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i RM $\beta$ CD ( $57,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pripremljene su razrjeđivanjem ishodnih otopina u smjesi metanola i vode, omjera MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v).

Istražen je utjecaj različitih molarnih omjera LOR i CD na intenzitet signala inkluzijskog kompleksa tako da je pripremljen niz otopina LOR i CD različitih molarnih omjera (5:1, 2:1, 1:1, 1:2 i 1:5) gdje je koncentracija LOR iznosila  $1,7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (tablica 4). Snimljeni su MS spektri otopina te je određen optimalan omjer koji daje signal inkluzijskog kompleksa najvećeg intenziteta.

Tablica 4. Priprema otopina LOR/ $\beta$ -CD i LOR/RM $\beta$ CD različitih molarnih omjera LOR:CD.

LOR + $\beta$ -CD				
LOR: $\beta$ -CD	$\gamma_2(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\text{LOR}) / \mu\text{L}$	$\gamma_2(\beta\text{-CD}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\beta\text{-CD}) / \mu\text{L}$
5:1			10,0	10
2:1			25,0	25
1:1	1,7	17	49,9	50
1:2			99,9	100
1:5			249,7	250
LOR + RM $\beta$ CD				
LOR:RM $\beta$ CD	$\gamma_2(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\text{LOR}) / \mu\text{L}$	$\gamma_2(\text{RM}\beta\text{CD}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\text{RM}\beta\text{CD}) / \mu\text{L}$
5:1			11,5	11
2:1			28,7	29
1:1	1,7	17	57,3	57
1:2			114,7	115
1:5			286,7	287

Nakon što se odredio optimalan omjer za pojedini kompleks, pripremljene su otopine inkluzijskih kompleksa različitih masenih koncentracija LOR,  $\beta$ -CD i RM $\beta$ CD pri izabranom omjeru (tablica 5).

Tablica 5. Priprema otopina LOR/ $\beta$ -CD i LOR/RM $\beta$ CD različitih koncentracija, u molarnom omjeru 1:2.

<b>LOR:<math>\beta</math>-CD 1:2</b>			
$\gamma_2(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\text{LOR}) / \mu\text{L}$	$\gamma_2(\beta\text{-CD}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\beta\text{-CD}) / \mu\text{L}$
1,7	1,7	10	10
3,4	3,4	20	20
8,4	8,4	50	50
17,0	17,0	100	100
33,7	33,7	200	200
84,2	84,2	500	500
<b>LOR:RM<math>\beta</math>CD 1:2</b>			
$\gamma_2(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\text{LOR}) / \mu\text{L}$	$\gamma_2(\text{RM}\beta\text{CD}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V_1(\text{RM}\beta\text{CD}) / \mu\text{L}$
1,7	1,7	11	11
3,4	3,4	23	23
8,4	8,4	57	57
17,0	17,0	115	115
33,7	33,7	229	229
84,2	84,2	573	573

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

Detaljno su analizirani inkluzijski kompleksi loratadina s  $\beta$ -ciklodekstrinom i njegovim nasumično metiliranim derivatom, kao i pojedinačni spojevi koji grade inkluzijski kompleks. Signali su pripisani određenim detektiranim ionima na temelju usporedbe teorijskih i eksperimentalnih vrijednosti  $m/z$  te izotopne raspodjele. Tandemna spektrometrija masa provodila se nad određenim ionima prekursorima (engl. *targeted MS/MS*), a prema dobivenim rezultatima predloženi su fragmentacijski putevi pojedinih analiziranih spojeva. Konstruiranjem krivulja ovisnosti relativnog intenziteta o kolizijskom potencijalu, uspoređivala se stabilnost spojeva (LOR,  $\beta$ -CD, RM $\beta$ CD, LOR/ $\beta$ -CD i LOR/RM $\beta$ CD).

### 4.1. Optimizacija radnih uvjeta

Na samom početku analize spojeva spektrometrijom masa visokog razlučivanja, određeni su optimalni parametri snimanja spektra masa u pozitivnom načinu snimanja, kako bi se povećao intenzitet signala inkluzijskih kompleksa. Radi navedenog razloga, analizirani su inkluzijski kompleksi različitih molarnih omjera LOR i CD. Također, određene su optimalne koncentracije LOR i CD za nastajanje inkluzijskih kompleksa.

U tablici D1 detaljno su prikazane sve istražene vrijednosti određenih parametara snimanja u pozitivnom načinu snimanja, kao i pripadajući intenziteti signala. Optimalna temperatura protočnog plina iznosi 250 °C, dok je optimalni protok protočnog plina 10 L min<sup>-1</sup>. Temperatura i protok plina za desolvaciju iznose 225 °C, odnosno 15 L min<sup>-1</sup>. Optimalni potencijal kapilare je 4000 V, dok potencijal mlaznice iznosi 500 V. Spektri su snimljeni pri tlaku raspršivača od 25 psi.

Najviši intenziteti signala inkluzijskih kompleksa pripadaju uzorku LOR/CD u omjeru 1:5 (tablica 6). Unatoč tome, tandemnoj spektrometriji masa su podvrgnuti inkluzijski kompleksi LOR/CD pripremljeni u omjeru 1:2, kako bi se izbjegla previsoka koncentracija ciklodekstrina za korištenje instrumenta te narušila točnost prikupljenih podataka.

Tablica 6. Ovisnost intenziteta i relativnog intenziteta kompleksa LOR/ $\beta$ -CD i LOR/RM $\beta$ CD o molarnom omjeru LOR i CD.

Kompleks	Omjer koncentracije	Ekperimentalna vrijednost $m/z$	Intenzitet	Relativan intenzitet / %
LOR/ $\beta$ -CD	5:1	-	0	0
	2:1	1517,5212	29014	0,16
	1:1	1517,5189	44657	0,24
	1:2	1517,5220	64931	0,35
	1:5	1517,5219	106780	0,58
LOR/RM $\beta$ CD	5:1	1685,7095	157697	0,86
	2:1	1685,7109	367511	2,00
	1:1	1685,7128	635382	3,45
	1:2	1685,7114	936456	5,34
	1:5	1685,7106	1200259	8,04

Prema rezultatima prikazanim u tablici 7, može se uočiti da intenziteti signala inkluzijskih kompleksa rastu s povećanjem koncentracije LOR i CD te da su intenziteti signala kompleksa s derivatom  $\beta$ -CD veći, nego što je slučaj s nesupstituiranim  $\beta$ -CD. Sukladno tome, optimalna koncentracija spojeva koji grade inkluzijski kompleks određena je uzimajući u obzir vrijednost intenziteta signala te utjecaj previsoke koncentracije na instrument. Budući da su relativni intenziteti kompleksa LOR/ $\beta$ -CD vrlo niski (< 1%), koristila se najveća koncentracija LOR, 84,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , te  $\beta$ -CD, 500,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . S druge strane, relativni intenzitet kompleksa LOR/RM $\beta$ CD iznosi i do 18% pri najvećoj koncentraciji RM $\beta$ CD, koja potencijalno može biti previsoka za instrument. Iz navedenog razloga, u pripremi inkluzijskog kompleksa LOR/RM $\beta$ CD, korištena je masena koncentracija LOR 17,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  te RM $\beta$ CD 115,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



Tablica 7. Ovisnost intenziteta i relativnog intenziteta kompleksa LOR/ $\beta$ -CD i LOR/RM $\beta$ CD o masenim koncentracijama LOR i CD, pri omjeru LOR/CD 1:2.

$\gamma_2(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$\gamma_2(\beta\text{-CD}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	Eksperimentalna vrijednost $m/z$	Intenzitet	Relativan intenzitet / %
1,7	10	-	0	0
3,4	20	-	0	0
8,4	50	1517,5196	44012	0,24
17,0	100	1517,5210	73543	0,40
33,7	200	1517,5251	129414	0,71
84,2	500	1517,5202	186702	1,02

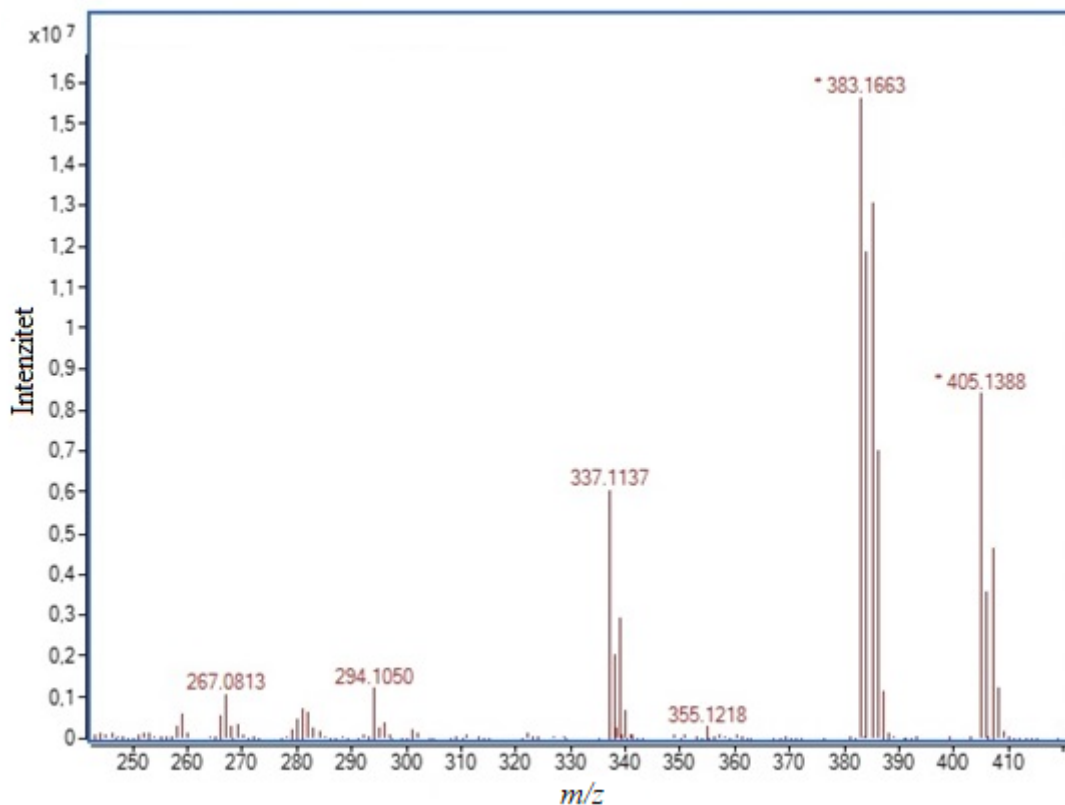
$\gamma_2(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$\gamma_2(\text{RM}\beta\text{CD}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	Eksperimentalna vrijednost $m/z$	Intenzitet	Relativan intenzitet / %
1,7	11	1685,7110	149276	0,88
3,4	23	1685,7110	298176	1,70
8,4	57	1685,7128	854701	4,80
17,0	115	1685,7099	1574912	8,85
33,7	229	1685,7119	2345472	13,22
84,2	573	1685,7122	3222799	18,32

#### 4.2. MS analiza loratadina

Otopina LOR masene koncentracije  $17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  analizirana je spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu snimanja (tablica D2).

Analiza otopine LOR u pozitivnom načinu snimanja rezultirala je spektrom s jasnim signalom protoniranog LOR pri  $m/z$  383,1663 (slika 13). Osim molekulskog iona,  $[\text{LOR}+\text{H}]^+$ , zbog korištenja staklenog posuđa uočen je i signal adukta LOR s natrijem pri  $m/z$  405,1388,  $[\text{LOR}+\text{Na}]^+$  s relativnim intenzitetom 3,89%. U spektru dobivenom analizom LOR u negativnom načinu snimanja (slika D3) izostao je signal deprotoniranog LOR, prema čemu se može zaključiti kako se za analizu inkluzijskih kompleksa LOR/CD mora koristiti pozitivan način snimanja. To objašnjava i optimiziranje prethodno opisanih parametara samo u pozitivnom načinu snimanja, u kojem će signali inkluzijskih kompleksa sigurno biti vidljivi.

Proučavanjem MS spektra, uz signal molekuskog iona, uočeni su i signali fragmentnih iona protonirane molekule LOR ( $m/z$  337,1137,  $m/z$  294,1050,  $m/z$  267,0813).



Slika 13. Uvećani prikaz spektra masa otopine LOR ( $\gamma = 17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  250–410. Ionizacijska tehnika ESI+.

#### 4.2.1. MS/MS analiza loratadina

Tandemna spektrometrija masa provodila se nad molekulskim ionom  $[\text{LOR}+\text{H}]^+$ , primjenom kolizijskog potencijala od 10 V, 20 V i 40 V. Svrha MS/MS analize je proučavanje raspada te konstruiranje fragmentacijskog puta.

Usporedbom relativnih intenziteta signala molekuskog iona te fragmentnih iona, može se uočiti kako relativni intenziteti fragmentnih iona rastu s povećanjem vrijednosti kolizijskog potencijala (tablica 8). Molekula LOR počinje se raspadati već pri kolizijskom potencijalu od 10 V, no još uvijek najintenzivniji signal pripada molekulskom ionu. Također, isto vrijedi i za kolizijski potencijal od 20 V, dok relativan intenzitet molekuskog iona pri 40 V pada ispod 3%

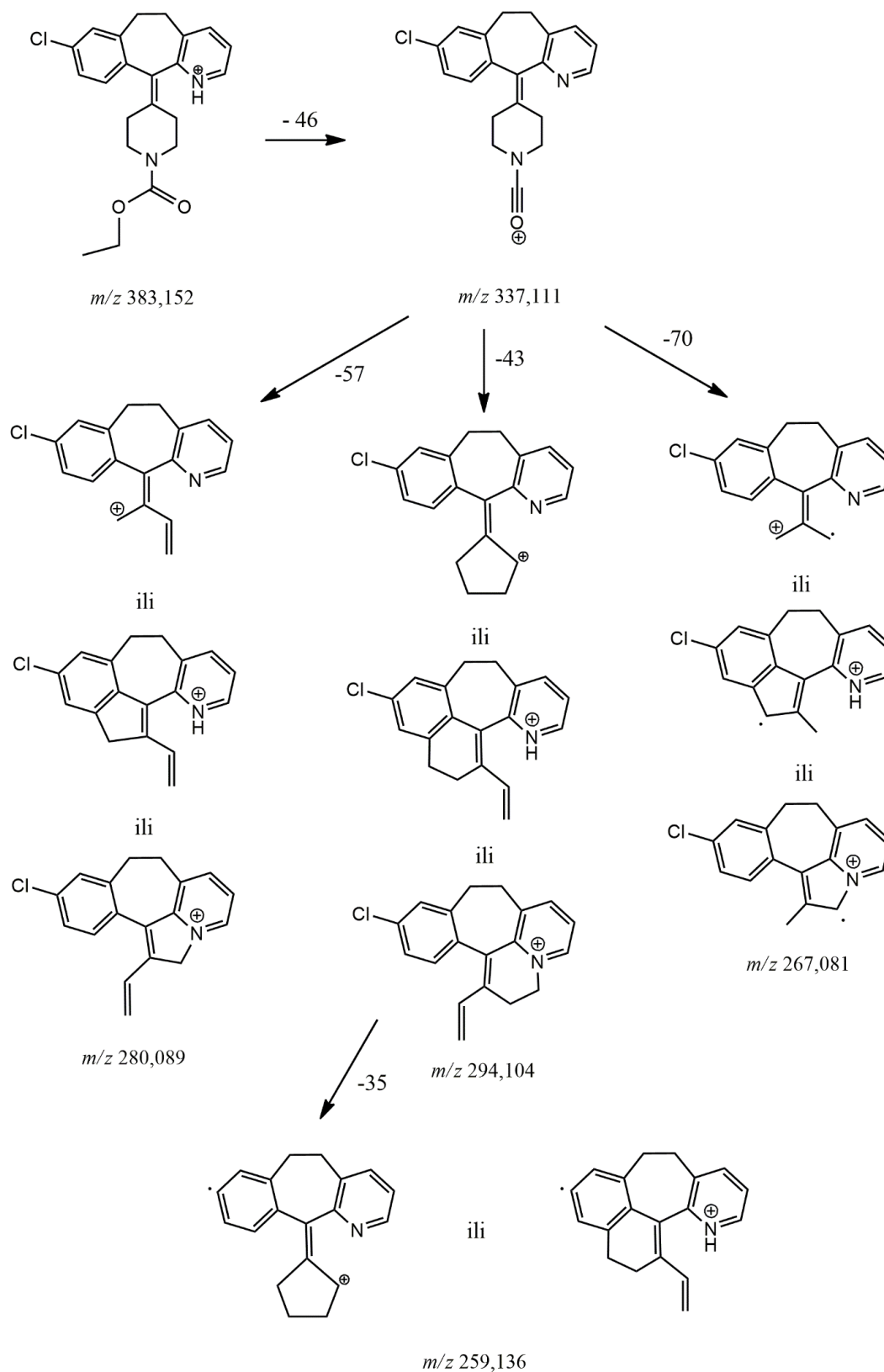
što znači da se gotovo u potpunosti fragmentirao. Najintenzivniji signal pri kolizijskom potencijalu od 40 V pripada fragmentnom ionu  $[C_{17}H_{14}ClN]^+$  pri  $m/z$  267,0826.

Tablica 8. Usporedba relativnih intenziteta signala molekuskog iona te fragmentnih iona loratadina ( $\gamma = 17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dobivenih MS/MS analizom uz primijenjen kolizijski potencijal od 10 V, 20 V i 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

Asignacija signala	Teor. vrijednost $m/z$	Kolizijski potencijal / V					
		10		20		40	
		Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
$[C_{22}H_{24}ClN_2O_2]^+$	383,1521	383,1634	100	383,1599	100	383,1516	2,09
$[C_{20}H_{18}ClN_2O]^+$	337,1108	337,1101	16,31	337,1138	81,36	337,1105	47,58
$[C_{19}H_{17}ClN]^+$	294,1044	294,1040	1,31	294,1039	9,03	294,1045	38,26
$[C_{18}H_{15}ClN]^+$	280,0893	280,0887	0,39	280,0886	1,52	280,0888	40,28
$[C_{17}H_{14}ClN]^+$	267,0815	267,0808	1,59	267,0805	7,77	267,0826	100
$[C_{19}H_{17}N]^+$	259,1361	259,1355	1,19	259,1352	7,15	259,1363	71,39

Prema informacijama prikupljenim MS/MS analizom, predložen je fragmentacijski put protonirane molekule LOR (shema 1). Protonirana molekula LOR,  $m/z$  383,152, primjenom kolizijskog potencijala prelazi u oksonijev ion (-46 Da) koji daje signal pri  $m/z$  337,111. Nadalje, piperidinski prsten oksonijevog iona može se cijepati na tri moguća načina pri čemu nastaju fragmentni ioni  $m/z$  280,089 (-57 Da),  $m/z$  294,104 (-43 Da) te  $m/z$  267,081 (-70 Da). Gubitkom klora (-35 Da) na ionu  $m/z$  294,104, dobiva se signal pri  $m/z$  259,136. Spektri masa koji potkrepljuju navedene rezultate, nalaze se u poglavlju Dodatak (slike D4–D6).

Strukture fragmentnih iona i dobivene vrijednosti  $m/z$  gotovo su jednake rezultatima u znanstvenom radu Jung-Ah Do-a i sur.<sup>16</sup> što je dodatna potvrda navedenih rezultata i predloženog fragmentacijskog puta.

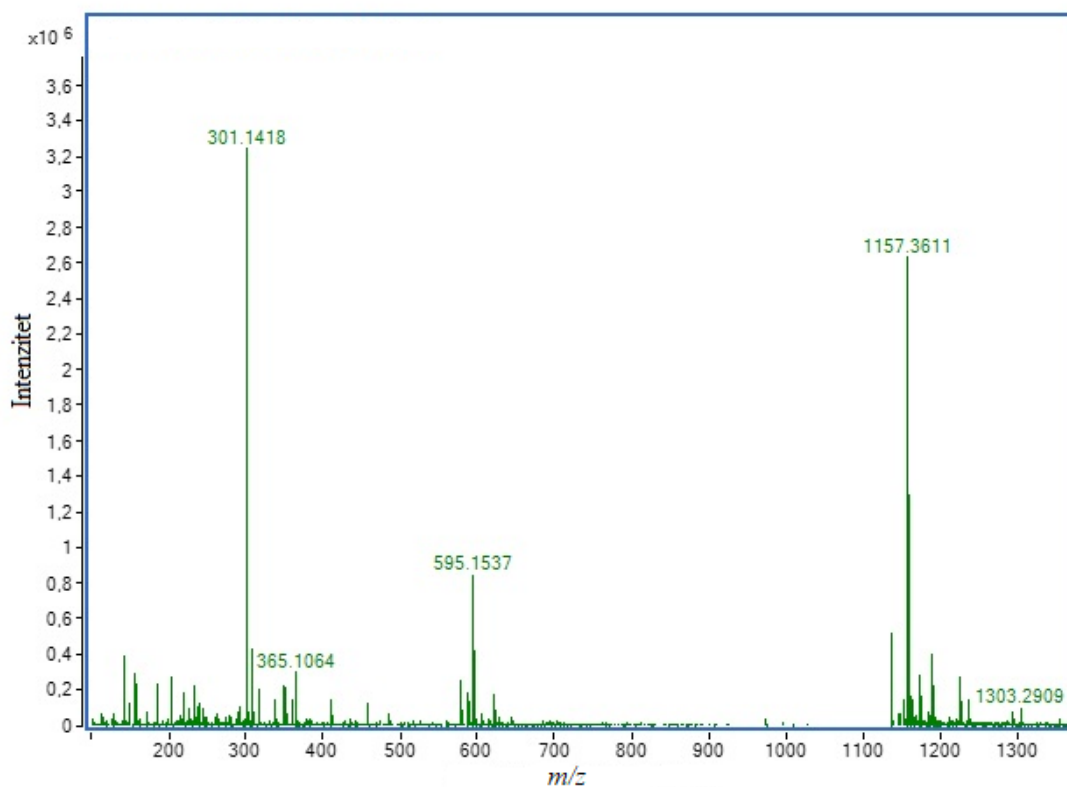


Shema 1. Predloženi fragmentacijski put molekuskog iona  $[LOR+H]^+$  ( $m/z$  383,152).

### 4.3. MS analiza $\beta$ -ciklodekstrina

Spektar masa otopine  $\beta$ -CD masene koncentracije  $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  snimljen je uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu snimanja (tablica D3).

Pozitivan način snimanja rezultirao je spektrom masa na slici 14, dok je uvećani prikaz spektra masa u rasponu  $m/z$  1120–1400 prikazan na slici D7. Najintenzivniji signal pripada  $m/z$  301,1418, koji se javlja zbog interferencija u otopini što je dokazano snimanjem slijepe probe (slika D1). Drugi signal od interesa je adukt  $\beta$ -CD s natrijem,  $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ , pri  $m/z$  1157,3611 s relativnim intenzitetom 96,97%, dok je signal protonirane molekule  $\beta$ -CD pri  $m/z$  1135,3802,  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$ , uočljiv samo na uvećanom prikazu zbog niskog relativnog intenziteta koji iznosi 18,05%.



Slika 14. Spektar masa otopine  $\beta$ -CD ( $\gamma = 50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI+.

Za razliku od LOR koji ne daje signal prilikom snimanja u negativnom načinu snimanja, deprotonirana molekula  $\beta$ -CD,  $[\beta\text{-CD-H}]^-$ , daje signal pri  $m/z$  1133,3609 te se javlja i signal pri  $m/z$  1179,3697 koji se pripisuje aduktu  $\beta$ -CD s mravljom kiselinom prisutnoj u mobilnoj fazi,  $[\beta\text{-CD+HCOO}]^-$  (slika D8).

#### 4.3.1. MS/MS analiza $\beta$ -ciklodekstrina

Za analizu tandemnom spektrometrijom masa izabran je molekularni ion protonirane molekule  $\beta$ -CD,  $[\beta\text{-CD+H}]^+$ , zbog toga što se želio pratiti raspad  $\beta$ -CD i gubitak podjedinica u ovisnosti o kolizijskom potencijalu od 10 V, 20 V i 40 V (tablica 9, slike D9–D11).

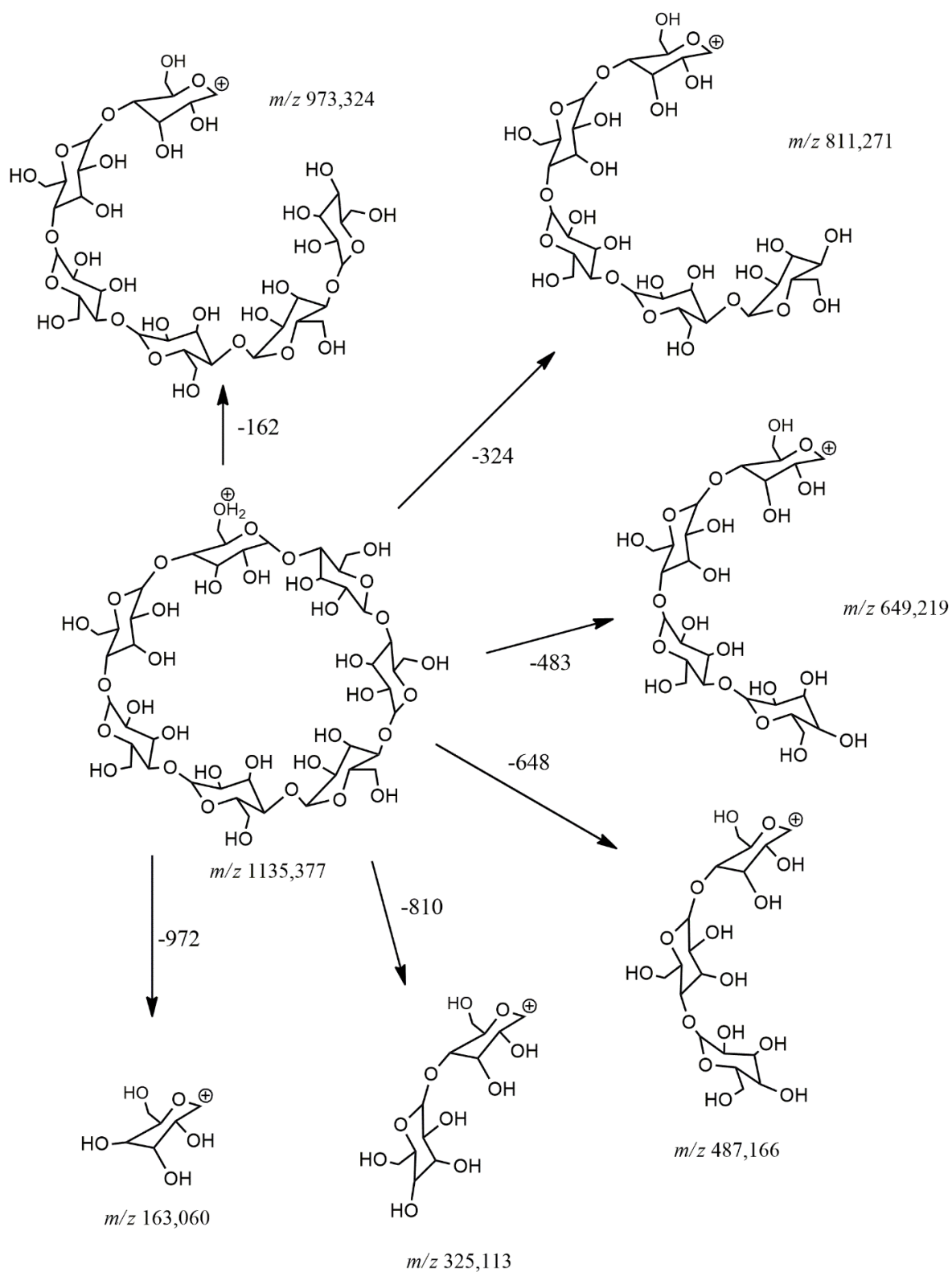
Tablica 9. Usporedba relativnih intenziteta signala molekularnog iona te fragmentnih iona  $\beta$ -ciklodekstrina ( $\gamma = 50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dobivenih MS/MS analizom uz primijenjen kolizijski potencijal od 10 V, 20 V i 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

Asignacija signala	Teor. vrijednost $m/z$	Kolizijski potencijal / V					
		10		20		40	
		Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
$[\text{C}_{42}\text{H}_{71}\text{O}_{35}]^+$	1135,3770	1135,3775	100	1135,3756	3,71	-	-
$[\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{O}_{30}]^+$	973,3242	973,3229	34,75	973,3220	9,55	-	-
$[\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_{25}]^+$	811,2714	811,2702	35,76	811,2713	18,45	811,2755	0,20
$[\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{O}_{20}]^+$	649,2186	649,2186	25,48	649,2182	29,05	649,2146	0,58
$[\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_{15}]^+$	487,1657	487,1650	22,96	487,1660	39,50	487,1651	3,31
$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{10}]^+$	325,1129	325,1128	43,35	325,1132	100	325,1134	100
$[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$	163,0601	163,0600	10,87	163,0601	30,46	163,0603	49,68

Signal molekularnog iona  $\beta$ -CD najintenzivniji je pri kolizijskom potencijalu od 10 V. Primjenom kolizijskog potencijala od 20 V, relativni intenzitet molekularnog iona pada ispod 4%, dok primjenom 40 V signal molekularnog iona nije uočen što znači da je u potpunosti fragmentiran. Također, primjenom kolizijskog potencijala od 40 V, u potpunosti se raspao i fragmentni ion pri  $m/z$  973,324. Usporedbom relativnog intenziteta molekularnog iona LOR i  $\beta$ -CD, može se pretpostaviti kako je  $\beta$ -CD nestabilniji spoj jer se raspada pri nižem kolizijskom potencijalu. Navedena hipoteza još jednom će se razmatrati u nastavku ovog rada, kada će se

konstruirati krivulje ovisnosti relativnog intenziteta o kolizijskom potencijalu. Najzastupljeniji fragmentni ion, nakon raspada  $\beta$ -CD, nalazi se pri  $m/z$  325,113, a struktura iona odgovara gubitku pet glukopiranoznih podjedinica.

Predložen fragmentacijski put  $\beta$ -CD (shema 2) koji je građen od sedam glukopiranoznih podjedinica, uključuje cijepanje  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze na određenom mjestu što može rezultirati gubitkom različitog broja glukopiranoznih podjedinica. Ukoliko dođe do gubitka jedne podjedinice (-162 Da), uočava se signal pri  $m/z$  973,324. Gubitak dvije podjedinice (-324 Da) odgovara signalu pri  $m/z$  811,271, gubitak tri podjedinice (-483 Da) daje signal pri  $m/z$  649,219, gubitak četiri podjedinice (-648 Da) odgovara signalu  $m/z$  487,166, dok gubitak pet podjedinica (-810 Da) odgovara signalu  $m/z$  325,113. Ako  $\beta$ -CD izgubi svih šest podjedinica (-972 Da), na kraju ostane samo jedna protonirana glukopiranozna podjedinica koja odgovara signalu pri  $m/z$  163,060. Iako su Sforza i sur.<sup>13</sup> pratili raspad iona  $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ , predložili su isti fragmentacijski put, to jest  $\beta$ -CD se najvjerojatnije raspada tako da se primjenom kolizijskog potencijala cijepa  $\alpha$ -1,4-glikozidna veza i dolazi do gubitka određenog broja glukopiranoznih podjedinica koje se odvajaju u cjelini.

Shema 2. Predloženi fragmentacijski put molekularnog iona  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  1135,377).



#### 4.4. MS analiza nasumično metiliranog $\beta$ -ciklodekstrina

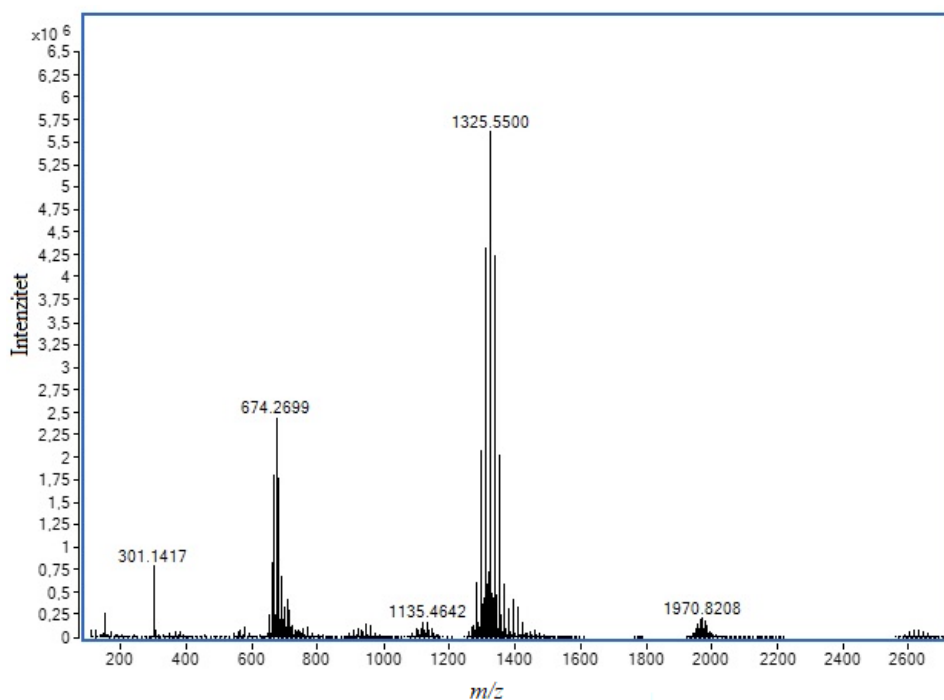
Uz  $\beta$ -CD kao molekulu domaćina u inkluzijskim kompleksima, detaljno se analizirao i njegov derivat, RM $\beta$ CD, s prosječnim stupnjem supstitucije 12. Provedena je spektrometrija masa otopine RM $\beta$ CD, masene koncentracije 57,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu snimanja.

U otopini koja se podvrgava analizi prisutne su molekule RM $\beta$ CD sa stupnjevima supstitucije 9–15, što rezultira kompleksnijim spektrima nego što je u slučaju nesupstituiranog  $\beta$ -CD. Svakom od pojedinih derivata može se pripisati signal koji odgovara protoniranom spoju, aduktu derivata s natrijem te dvostruko nabijenom aduktu s natrijem. Prikupljene informacije u pozitivnom načinu snimanja prikazane su u tablici 10, dok su spektri masa koji potkrepljuju rezultate prikazani na slikama 15 i 16. Također, u području  $m/z$  1928–2000 uočeni su signali trimera ciklodekstrina. Trimeri su građeni od jednako supstituiranih ili različito supstituiranih RM $\beta$ CD (tablica D4, slika D12). Spektar masa dobiven u negativnom načinu snimanja, rezultirao je signalima deprotoniranih derivata  $\beta$ -CD te signalima adukata derivata s mravljom kiselinom (tablica D5, slika D13).

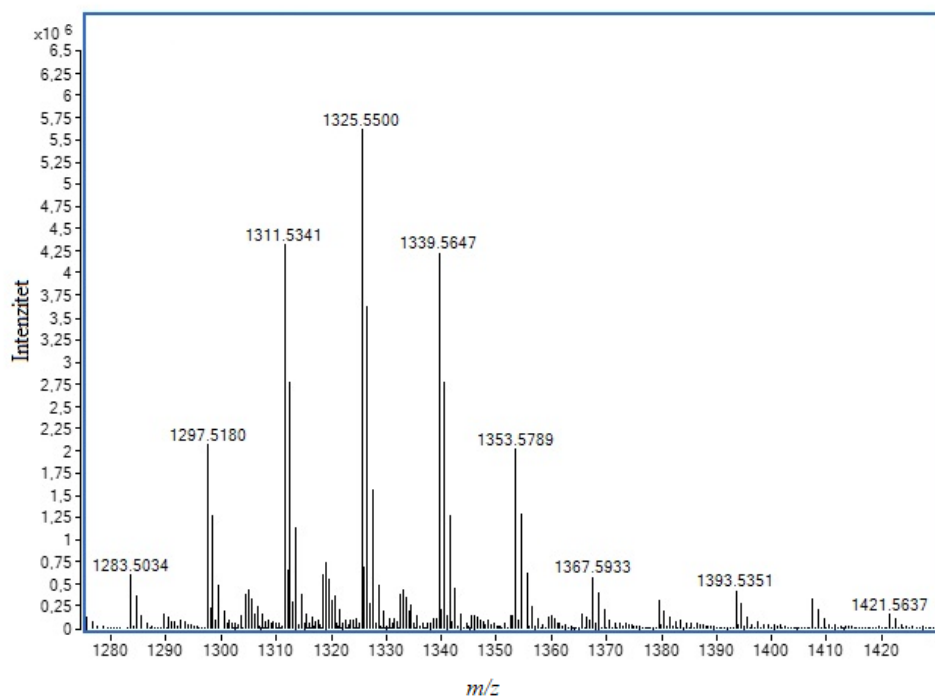
Usporedbom intenziteta signala molekulskih iona u pozitivnom i negativnom načinu snimanja za  $\beta$ -CD te njegove derivate, može se uočiti kako se u negativnom načinu snimanja dobivaju signali većeg intenziteta u oba slučaja (tablica 11). Unatoč tome, kako je već spomenuto, signal koji pripada deprotoniranoj molekuli LOR se ne vidi pa će se inkluzijski kompleksi morati snimati u pozitivnom načinu, što dolazi do izražaja prilikom snimanja MS/MS spektara kada se prati raspad inkluzijskog kompleksa, pri čemu je cilj dobivanje signala pojedinačnih spojeva od kojih je inkluzijski kompleks građen.

Tablica 10. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti  $m/z$  dobivene spektrometrijom masa RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI+.

		RM $\beta$ CD								
DS	Mol. formula	[M+H] <sup>+</sup>			[M+Na] <sup>+</sup>			[M+2Na] <sup>2+</sup>		
		Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
9	C <sub>42</sub> H <sub>61</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>9</sub>	1261,5179	1261,5139	0,69	1283,4998	1283,5034	10,12	653,2445	653,2440	3,76
10	C <sub>42</sub> H <sub>60</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>	1275,5335	1275,5311	1,68	1297,5155	1297,5180	37,38	660,2524	660,2531	12,66
11	C <sub>42</sub> H <sub>59</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>11</sub>	1289,5492	1289,5457	2,27	1311,5311	1311,5341	75,16	667,2602	667,2606	29,39
12	C <sub>42</sub> H <sub>58</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>12</sub>	1303,5648	1303,5542	2,02	1325,5468	1325,5500	100	674,2680	674,2699	42,25
13	C <sub>42</sub> H <sub>57</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>13</sub>	1317,5805	1317,5356	1,73	1339,5624	1339,5647	74,39	681,2758	681,2760	30,81
14	C <sub>42</sub> H <sub>56</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>14</sub>	1331,5961	1331,5225	2,16	1353,5781	1353,5789	34,31	688,2837	688,2843	11,94
15	C <sub>42</sub> H <sub>55</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>15</sub>	1345,6118	1345,5225	3,18	1367,5937	1367,5933	10,04	695,2915	695,2882	3,37



Slika 15. Spektar masa otopine RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 16. Uvećani prikaz spektra masa otopine RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  1280–1500. Ionizacijska tehnika ESI+.

Tablica 11. Usporedba intenziteta dobivenih spektrometrijom masa određenih iona  $\beta$ -CD ( $\gamma = 50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u pozitivnom i negativnom načinu snimanja.

ESI+			ESI-		
Ion	Eksp. vrijednost $m/z$	Intenzitet	Ion	Eksp. vrijednost $m/z$	Intenzitet
$[\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$	1135,3802	588391	$[\beta\text{-CD} - \text{H}]^-$	1133,3609	1445275
$[\text{C}_{42}\text{H}_{61}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_9 + \text{H}]^+$	1261,5139	4496	$[\text{C}_{42}\text{H}_{61}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_9 - \text{H}]^-$	1259,5027	18234
$[\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{10} + \text{H}]^+$	1275,5311	11187	$[\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{10} - \text{H}]^-$	1273,5192	48653
$[\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{11} + \text{H}]^+$	1289,5457	15076	$[\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{11} - \text{H}]^-$	1287,5341	59409
$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{12} + \text{H}]^+$	1303,5542	13441	$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{12} - \text{H}]^-$	1301,5485	43054
$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{13} + \text{H}]^+$	1317,5356	11520	$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{13} - \text{H}]^-$	1315,5580	17616
$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{14} + \text{H}]^+$	1331,5225	14385	$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{14} - \text{H}]^-$	1329,5282	10987
$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{15} + \text{H}]^+$	1345,5225	21142	$[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_{35}(\text{CH}_3)_{15} - \text{H}]^-$	1343,5350	15993

#### 4.4.1. MS/MS analiza nasumično metiliranog $\beta$ -ciklodekstrina

Uz MS analizu, provedena je i MS/MS analiza iona  $m/z$  1303,5579 što odgovara protoniranoj molekuli RM $\beta$ CD sa stupnjem supstitucije 12,  $[C_{42}H_{58}O_{35}(CH_3)_{12}+H]^+$ , u svrhu proučavanja raspada istog. Primijenio se kolizijski potencijal od 10 V, 20 V i 40 V (slike D14–D16), a dobiveni signali i pripadajući relativni intenziteti prikazani su u tablici 12. Fragmentni ioni su, nakon primjene kolizijskog potencijala, nastali gubitkom nesupstituirane glukopiranozne podjedinice ili glukopiranoznih podjedinica s različitim brojem metiliranih skupina. Gubitak pojedinih glukopiranoznih podjedinica pri kolizijskom potencijalu od 10 V, detaljno je prikazan u tablici D6.

Raspad molekule RM $\beta$ CD odvija se cijepanjem glukopiranoznih podjedinica s različitim brojem metiliranih skupina pri čemu nastaju klasteri signala grupirani prema broju podjedinica. Raspon  $m/z$  1099–1142 odgovara gubitku jedne podjedinice,  $m/z$  909–966 odgovara gubitku dvije podjedinice,  $m/z$  705–776 daju ioni s izgubljene tri podjedinice, signali iona s izgubljene četiri podjedinice nalaze se u rasponu  $m/z$  507–586, dok  $m/z$  339–396 odgovara gubitku pet podjedinica. Na posljetku, cijepanjem šest glukopiranoznih podjedinica, preostaje jedna protonirana podjedinica koja daje signal u rasponu  $m/z$  141–206 ovisno o broju metiliranih skupina.

Usporedbom rezultata MS/MS analize otopina  $\beta$ -CD i RM $\beta$ CD, može se uočiti vrlo sličan fragmentacijski put navedenih spojeva. Ipak, kod molekule RM $\beta$ CD nije moguće precizno odrediti fragmentacijski put, zbog toga što ne posjedujemo informaciju o tome koje su točno glukopiranozne podjedinice metilirane, niti koliko metilnih skupina sadrži pojedinačna podjedinica.

Tablica 12. Usporedba relativnih intenziteta signala dobivenih MS/MS analizom otopine RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pri  $m/z$  1303,5579 dobivenih uz primijenjen kolizijski potencijal od 10 V, 20 V i 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

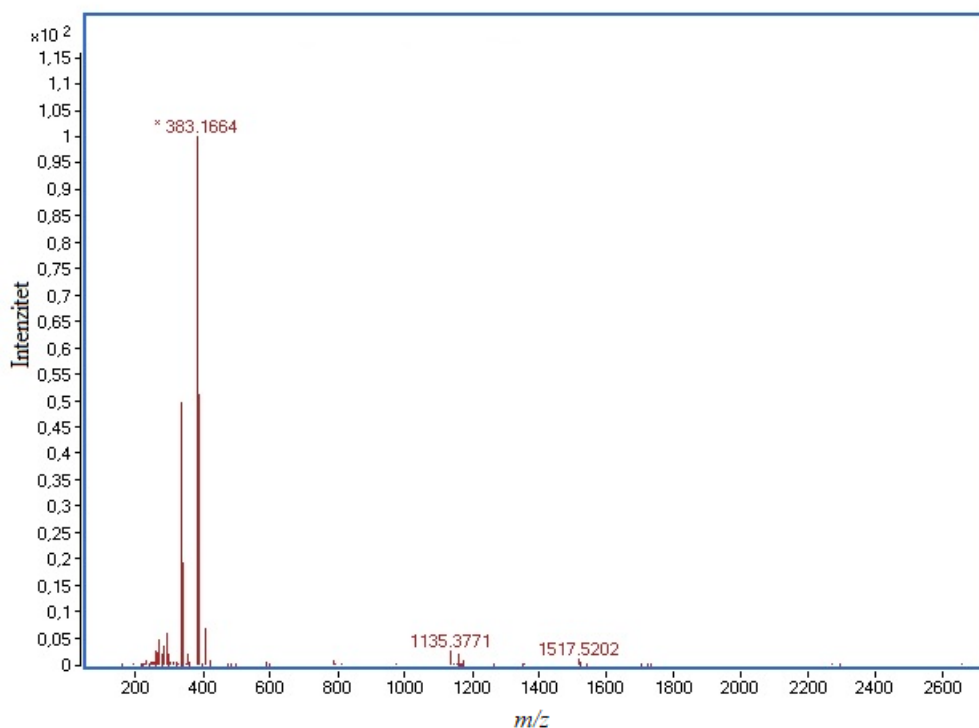
Kolizijski potencijal / V					
10		20		40	
Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
1303,5579	100	-	-	-	-
1141,5141	6,50	-	-	-	-
1127,4929	19,39	1127,4929	2,11	-	-
1113,4764	42,20	1113,4780	3,68	-	-
1099,4611	26,93	1099,4678	4,66	-	-
965,4425	0,28	-	-	-	-
951,4238	13,11	-	-	-	-
937,4111	28,31	937,4129	8,47	-	-
923,3968	36,18	923,3953	12,83	-	-
909,3780	16,71	909,3809	8,53	-	-
775,3602	1,24	775,3671	0,95	-	-
761,3375	13,08	761,3380	8,65	-	-
747,3240	28,87	747,3282	20,15	-	-
733,3103	36,63	733,3122	24,91	733,3103	0,34
719,2941	11,34	719,2938	14,57	719,2901	0,15

711,2963	1,73	-	-	-	-
705,2780	3,26	705,2824	2,24	-	-
585,2749	5,21	585,2748	1,49	-	-
571,2585	23,85	571,2592	24,67	571,2578	0,33
557,2441	51,34	557,2438	71,98	557,2418	2,09
543,2275	39,10	543,2281	57,19	543,2254	2,23
535,2309	1,32	535,2326	0,55	-	-
529,2094	9,40	529,2122	13,56	529,2074	1,06
521,2177	2,65	521,2200	5,27	-	-
515,1970	2,14	515,1944	2,24	-	-
507,2096	4,65	507,2068	5,56	507,2069	0,68
493,1920	3,68	493,1919	5,70	493,1896	1,09
395,1896	8,61	395,1899	11,69	395,1923	1,38
381,1751	33,96	381,1749	76,71	381,1739	14,31
367,1599	38,95	367,1590	85,90	367,1597	17,27
353,1440	13,41	353,1434	37,84	353,1427	9,62
345,1503	2,69	345,1553	4,29	345,1534	2,11
339,1293	0,58	339,1279	3,62	339,1233	0,65
205,1065	17,54	205,1060	47,40	205,1069	12,21
191,0901	20,30	191,0911	51,32	191,0910	22,25
177,0744	3,77	177,0740	7,98	177,0745	3,98
155,0700	36,55	155,0698	100	155,0698	100
141,0538	6,09	141,0544	22,31	141,0543	34,41

#### 4.5. MS analiza inkluzijskog kompleksa loratadina i $\beta$ -ciklodekstrina

Izabrani optimalni molarni omjer za inkluzijski kompleks LOR/ $\beta$ -CD iznosi 1:2. Inkluzijski kompleks nastao je ulaskom molekule LOR u hidrofobnu šupljinu molekule  $\beta$ -CD te je detaljno analiziran spektrometrijom masa (tablica D7, slika D17) i tandemnom spektrometrijom masa u pozitivnom i negativnom načinu snimanja, uz ionizaciju elektroraspršenjem.

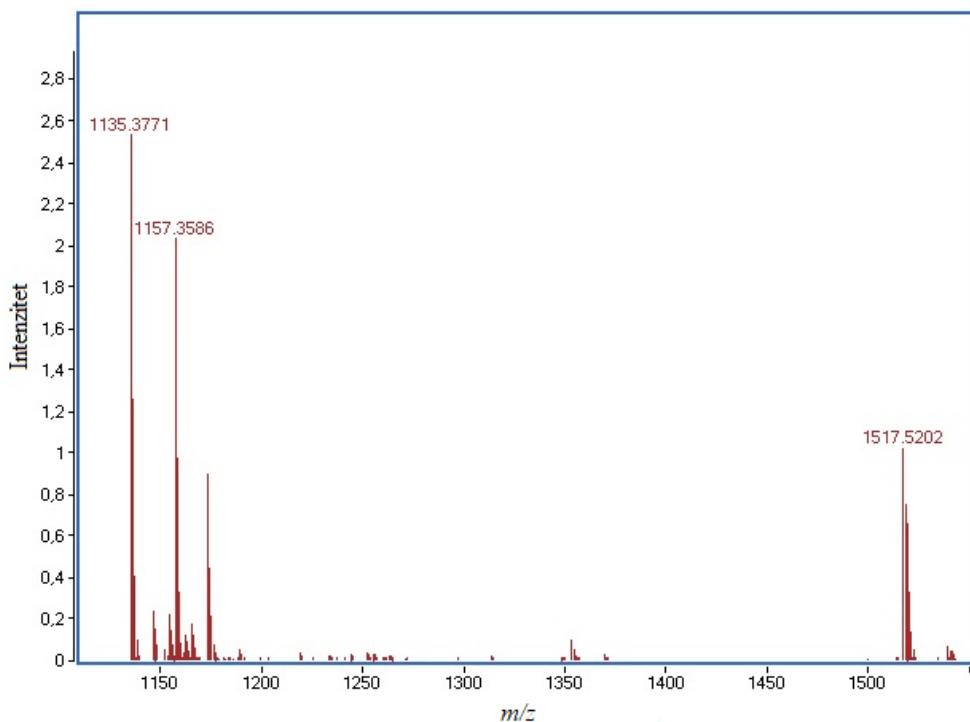
U spektru masa dobivenom snimanjem u pozitivnom načinu snimanja, mogu se uočiti tri glavna signala od interesa (slike 17 i 18). Signal pri  $m/z$  1517,5202 pripada protoniranom inkluzijskom kompleksu,  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  s relativnim intenzitetom 1,02%. Također, u spektru masa uočava se i najintenzivniji signal iona  $[\text{LOR}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  383,1664 te iona  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  1135,3771 s relativnim intenzitetom 2,54%. Na uvećanom prikazu spektra masa u rasponu  $m/z$  1130–1600 dodatno se uočava signal iona  $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$  pri  $m/z$  1157,3586 s relativnim intenzitetom 2,04%. U negativnom načinu snimanja uočeni su signali iona  $[\beta\text{-CD}-\text{H}]^-$  pri  $m/z$  1133,3635 te  $[\beta\text{-CD}+\text{HCOO}]^-$  pri  $m/z$  1179,3740, dok signal deprotoniranog inkluzijskog kompleksa nije uočen.



Slika 17. MS spektar inkluzijskog kompleksa LOR/ $\beta$ -CD u omjeru 1:2 ( $\gamma_{\text{LOR}} = 84,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Ionizacijska tehnika ESI+.





Slika 18. Uvećani prikaz MS spektra inkluzijskog kompleksa LOR/ $\beta$ -CD u omjeru 1:2 ( $\gamma_{\text{LOR}} = 84,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  1130–1600. Ionizacijska tehnika ESI+.

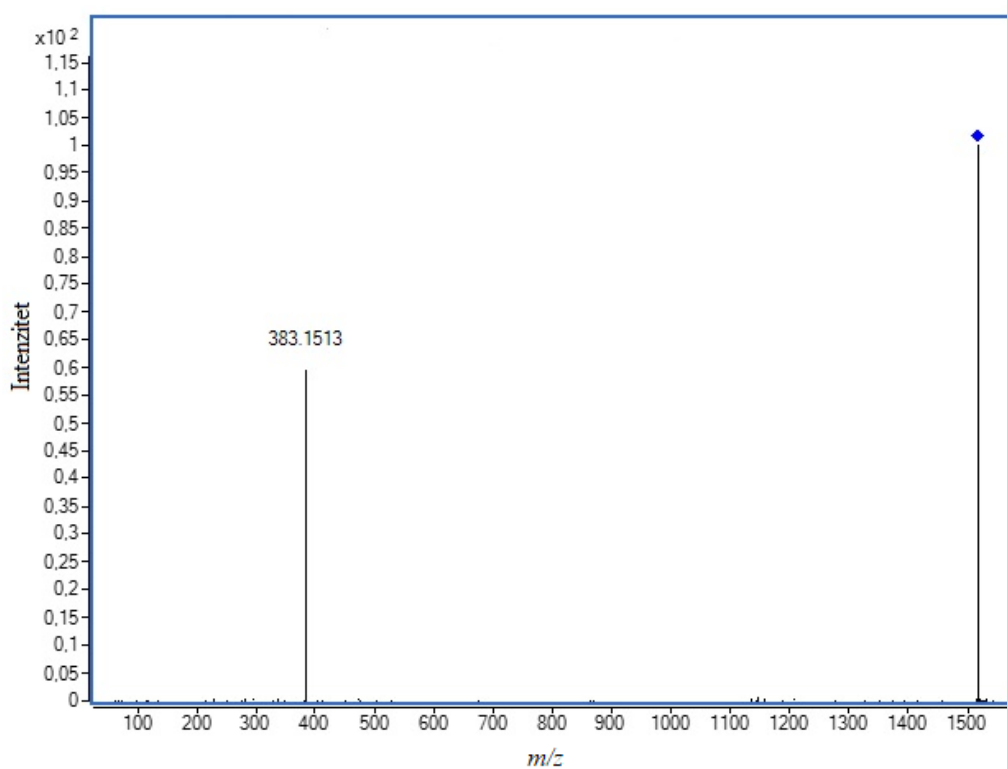
#### 4.5.1. MS/MS analiza inkluzijskog kompleksa loratadina i $\beta$ -ciklodekstrina

Tandemna spektrometrija masa se, kao i kod ostalih spojeva, provodila primjenom kolizijskog potencijala od 10 V, 20 V i 40 V (tablica 13). Pratio se raspad iona inkluzijskog kompleksa,  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$ , pri  $m/z$  1517,5219.

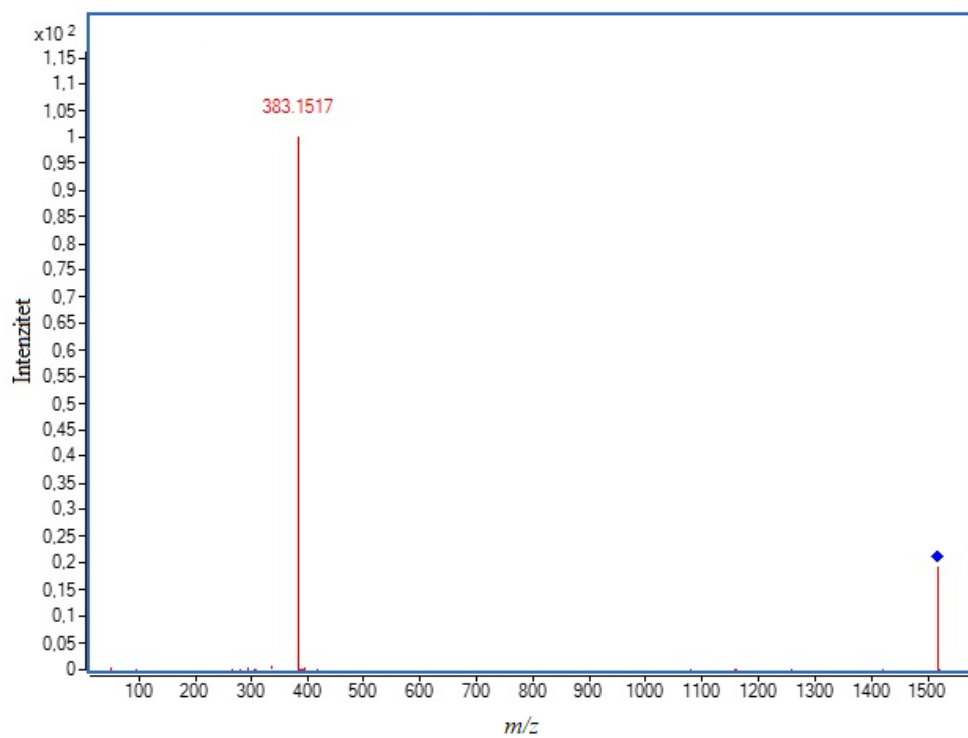
Kao što je vidljivo na slikama 19–21, LOR izlazi iz hidrofobne šupljine  $\beta$ -CD, već nakon primjene kolizijskog potencijala od 10 V. Unatoč tome, primjenom većeg kolizijskog potencijala ne dolazi do značajnije fragmentacije molekule LOR pa je uočeni signal fragmentnog iona pri  $m/z$  337,1117 vrlo niskog relativnog intenziteta ( $< 2\%$ ). Također, ne dolazi niti do fragmentacije  $\beta$ -CD, čiji se signal ne pojavljuje u spektrima masa. Dakle, može se pretpostaviti kako je  $\beta$ -CD u neutralnom obliku, koji ne daje signal zbog toga što se metodom spektrometrije masa analiziraju ioni.

Tablica 13. Usporedba relativnih intenziteta signala dobivenih MS/MS analizom iona [LOR/ $\beta$ -CD+H]<sup>+</sup>, pri m/z 1517,5219 uz primijenjen kolizijski potencijal od 10 V, 20 V i 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

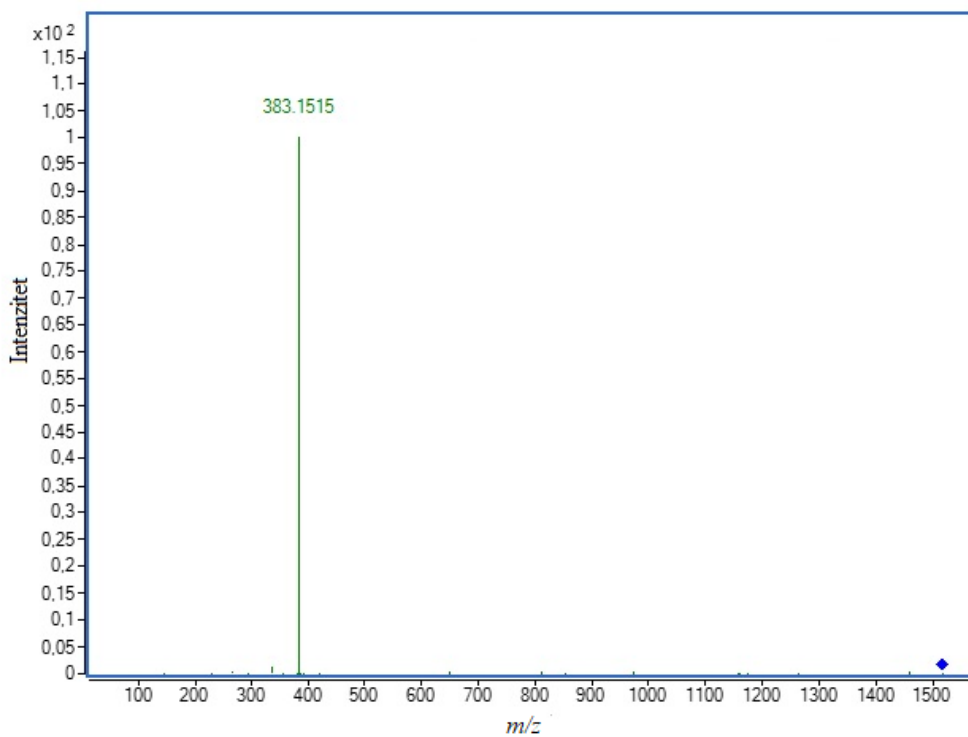
Asignacija signala	Teor. m/z	Kolizijski potencijal / V					
		10		20		40	
		Eksp. m/z	Rel. int. / %	Eksp. m/z	Rel. int. / %	Eksp. m/z	Rel. int. / %
[C <sub>64</sub> H <sub>94</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub> ] <sup>+</sup>	1517,5219	1517,5205	100	1517,5177	19,38	-	-
[C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	383,1521	383,1513	59,43	383,1517	100	383,1515	100
[C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	337,1102	-	-	337,1117	0,53	337,1095	1,20



Slika 19. MS/MS spektar masa iona [LOR/ $\beta$ -CD+H]<sup>+</sup> pri kolizijskom potencijalu od 10 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

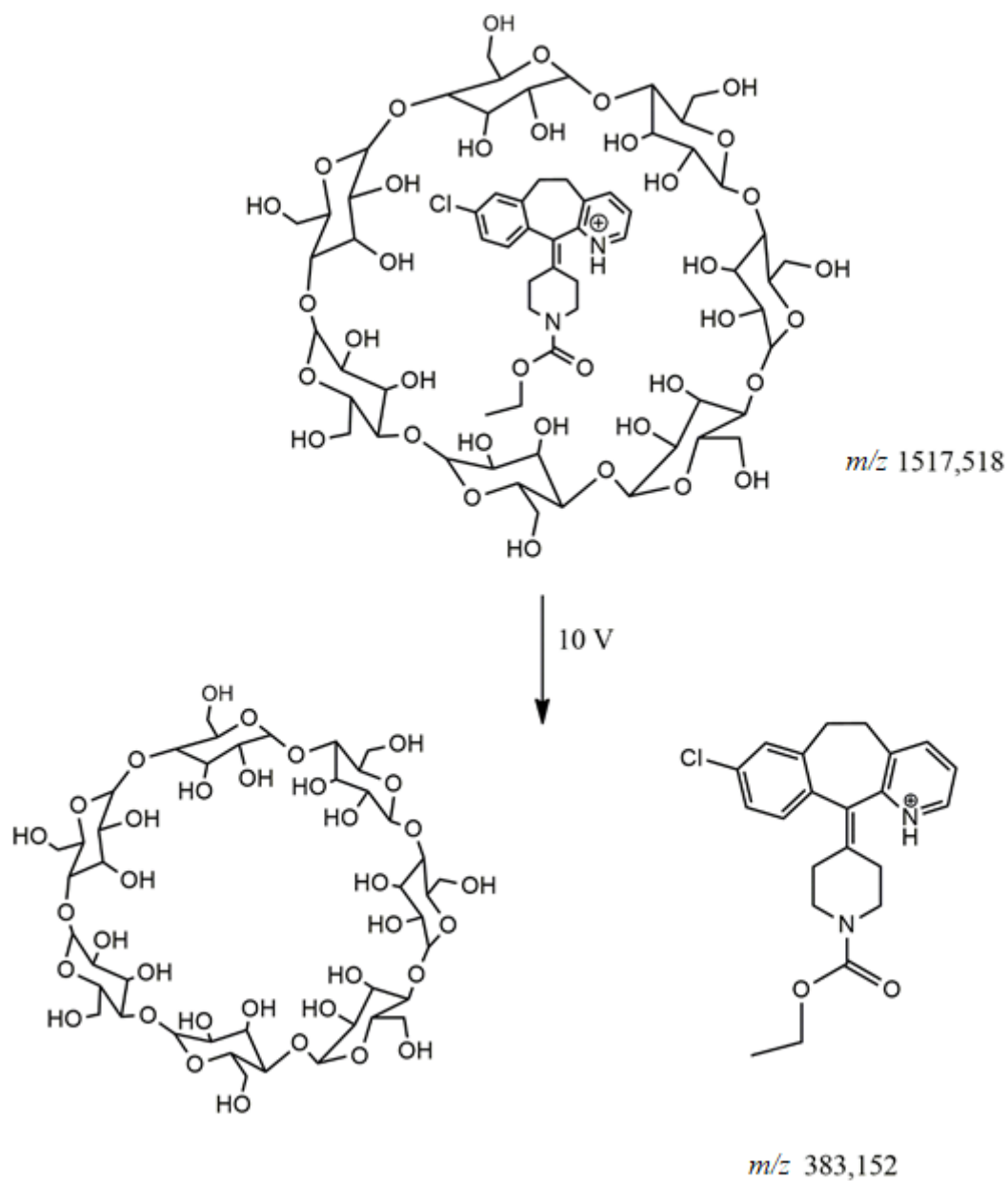


Slika 20. MS/MS spektar masa iona  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 20 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 21. MS/MS spektar masa iona  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

Predloženi fragmentacijski put inkluzijskog kompleksa LOR/ $\beta$ -CD prikazan je na shemi 3.



Shema 3. Predloženi fragmentacijski put molekuskog iona [LOR/ $\beta$ -CD + H]<sup>+</sup> ( $m/z$  1517,518).

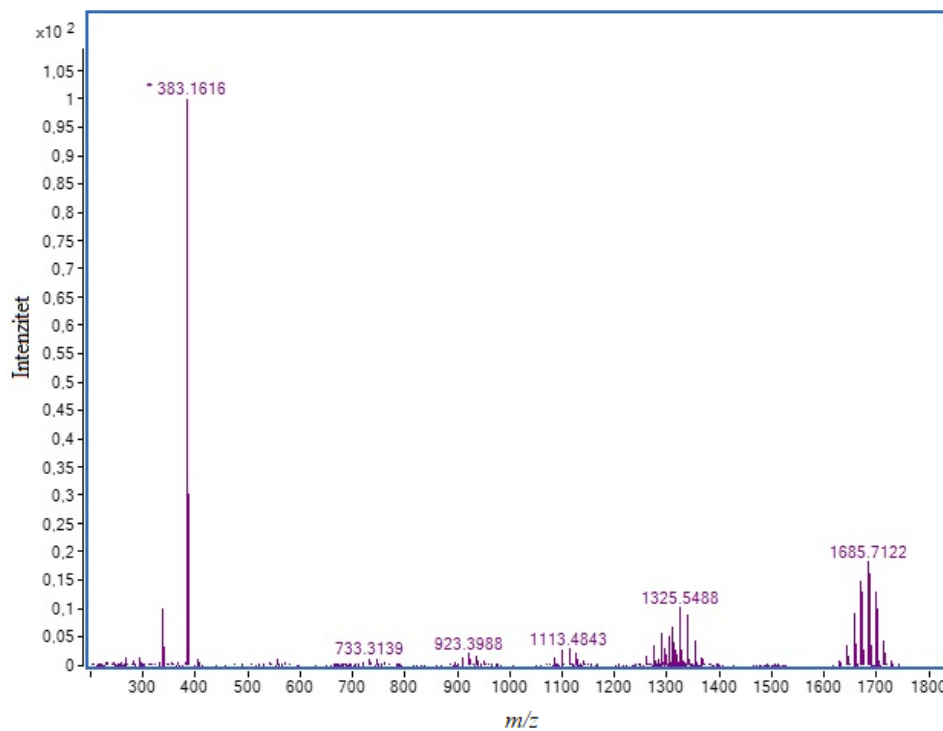
#### 4.6. MS analiza inkluzijskog kompleksa loratadina i nasumično metiliranog $\beta$ -ciklodekstrina

Inkluzijski kompleks LOR/RM $\beta$ CD, također je pripremljen u omjeru koncentracija 1:2. Pripremljena otopina analizirana je spektrometrijom masa u pozitivnom (slika 22, 23) i negativnom načinu snimanja (slika D18), uz ionizaciju elektroraspršenjem.

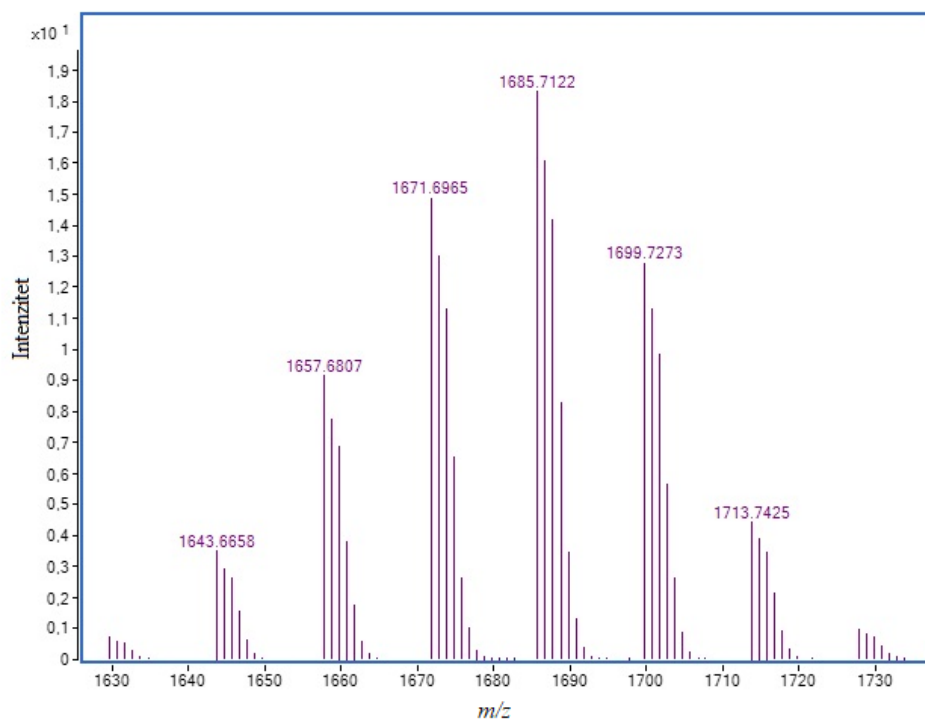
Svaki derivat  $\beta$ -CD sa stupnjem supstitucije 9–15 ponaša se kao molekula domaćin te gradi inkluzijski kompleks smještanjem molekule LOR u svoju hidrofobnu šupljinu (tablica 14). Protonirani inkluzijski kompleks LOR/RM $\beta$ CD sa stupnjem supstitucije 12, [LOR/RM $\beta$ CD+H]<sup>+</sup>, daje signal s najvećim relativnim intenzitetom od 8,85% pri  $m/z$  1685,7122. Uz klastere signala protoniranih inkluzijskih kompleksa, u rasponu  $m/z$  1283–1368 uočavaju se signali adukata CD s natrijem, [RM $\beta$ CD+Na]<sup>+</sup>, dok signal pri  $m/z$  383,1616 pripada ionu [LOR+H]<sup>+</sup>. Unutar MS spektra javljaju se i signali fragmentnih iona u rasponu  $m/z$  705–1141. Fragmentni ioni nastali su raspadom molekule RM $\beta$ CD, to jest gubitkom glukopiranoznih podjedinica s različitim brojem metiliranih skupina. Spektar masa dobiven u negativnom načinu snimanja ne pokazuje signale deprotoniranih inkluzijskih kompleksa.

Tablica 14. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti  $m/z$  dobivene MS analizom kompleksa LOR i različito supstituiranih RM $\beta$ CD. Ionizacijska tehnika ESI+.

		LOR + RM $\beta$ CD		
DS	Mol. formula	[M+H] <sup>+</sup>		
		Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
9	C <sub>73</sub> H <sub>111</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub>	1643,6627	1643,6658	2,59
10	C <sub>74</sub> H <sub>113</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub>	1657,6783	1657,6807	5,64
11	C <sub>75</sub> H <sub>115</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub>	1671,6940	1671,6965	8,15
12	C <sub>76</sub> H <sub>117</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub>	1685,7096	1685,7122	8,85
13	C <sub>77</sub> H <sub>119</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub>	1699,7253	1699,7273	5,26
14	C <sub>78</sub> H <sub>121</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub>	1713,7409	1713,7425	1,75
15	C <sub>79</sub> H <sub>123</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>37</sub>	1727,7566	1727,7534	0,32



Slika 22. MS spektar otopine LOR/RM $\beta$ CD u omjeru 1:2 ( $\gamma_{\text{LOR}} = 17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 23. Uvećani MS spektar otopine LOR/RM $\beta$ CD u omjeru 1:2 ( $\gamma_{\text{LOR}} = 17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  1620–1750. Ionizacijska tehnika ESI+.

#### 4.6.1. MS/MS analiza inkluzijskog kompleksa loraratdina i nasumično metiliranog $\beta$ -ciklodekstrina

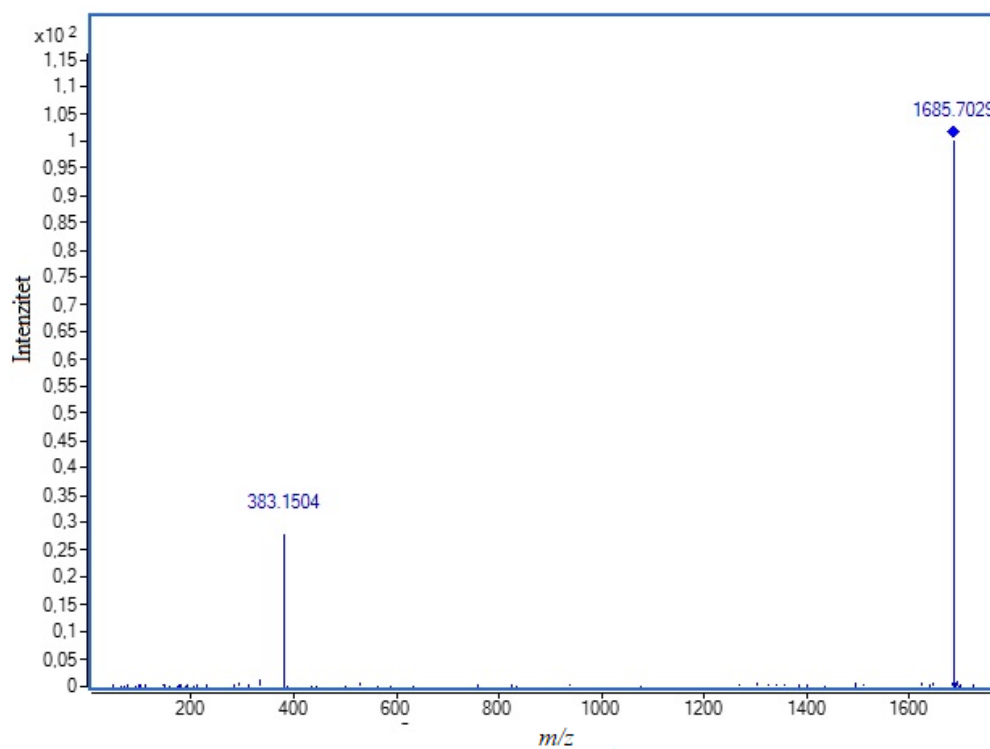
Za analizu tandemnom spektrometrijom masa izabran je ion  $[\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  1685,7122 (tablica 15). Primjenom kolizijskog potencijala od 10 V i 20 V (slika 24, 25), najintenzivniji ion u dobivenim spektrima masa je ion  $[\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$ , dok oslobođeni LOR daje signal pri  $m/z$  383,1504 s relativnim intenzitetom 27,65%, odnosno pri  $m/z$  383,1507 s relativnim intenzitetom 81,52%. Pri kolizijskom potencijalu od 20 V, javlja se i signal  $[\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  1303,5494. Povećanjem vrijednosti kolizijskog potencijala na 40 V (slika 26), relativni intenzitet iona  $[\text{LOR}+\text{H}]^+$  raste na 100%, dok relativni intenzitet iona  $[\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pada ispod 2%.

Navedenom inkluzijskom kompleksu nije moguće predložiti fragmentacijski put, kao što je bio slučaj i kod  $\text{RM}\beta\text{CD}$ , zbog nedovoljnog poznavanja strukture samih molekula domaćina. Ipak, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako je fragmentacijski put inkluzijskog kompleksa  $\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}$ , vrlo sličan fragmentacijskom putu kompleksa  $\text{LOR}/\beta\text{-CD}$ . Primjenom kolizijskog potencijala dolazi do oslobađanja molekule LOR iz hidrofobne šupljine  $\text{RM}\beta\text{CD}$ , no ne uočava se značajna daljnja fragmentacija LOR. Molekula domaćina pri tome može biti u neutralnom obliku zbog čega ne daje signal u MS/MS spektru masa, a postoji mogućnost da bude pozitivno nabijena kada se može uočiti signal  $[\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$ , kao što je slučaj kod primjene kolizijskog potencijala od 20 V.

Usporedbom relativnih intenziteta iona  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  te  $[\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri različitim kolizijskim potencijalima, dobiva se informacija o stabilnosti iona. Dok intenzitet signala iona  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  pri 20 V pada ispod 20%, signal iona  $[\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri istom kolizijskom potencijalu, je i dalje 100%. Prema navedenim podacima, može se pretpostaviti kako je inkluzijski kompleks  $\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}$  stabilniji, nego što je kompleks  $\text{LOR}/\beta\text{-CD}$ .

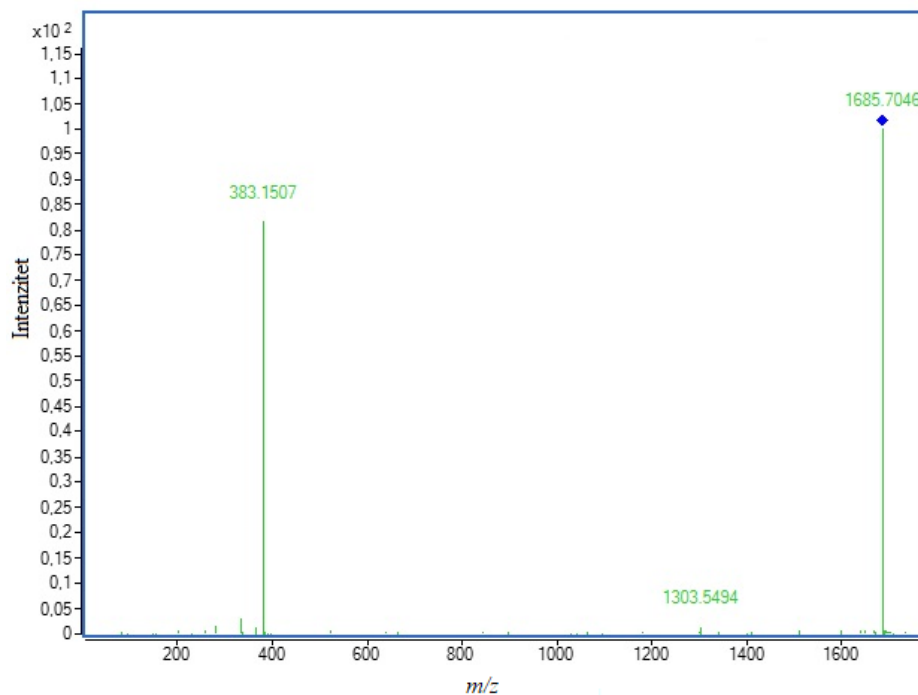
Tablica 15. Usporedba relativnih intenziteta signala dobivenih MS/MS analizom iona  $[\text{LOR/RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  1685,7029 uz primijenjen kolizijski potencijal od 10 V, 20 V i 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

Asignacija signala	Teor. $m/z$	Kolizijski potencijal / V					
		10		20		40	
		Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
$[\text{LOR/RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$	1685,7097	1685,7029	100	1685,7046	100	1685,6912	1,97
$[\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$	1303,5648	-	-	1303,5494	1,06	-	-
$[\text{LOR}+\text{H}]^+$	383,1521	383,1504	27,65	383,1507	81,52	383,1522	100
$[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}]^+$	337,1102	337,1029	1,15	337,1097	3,03	337,1085	1,53

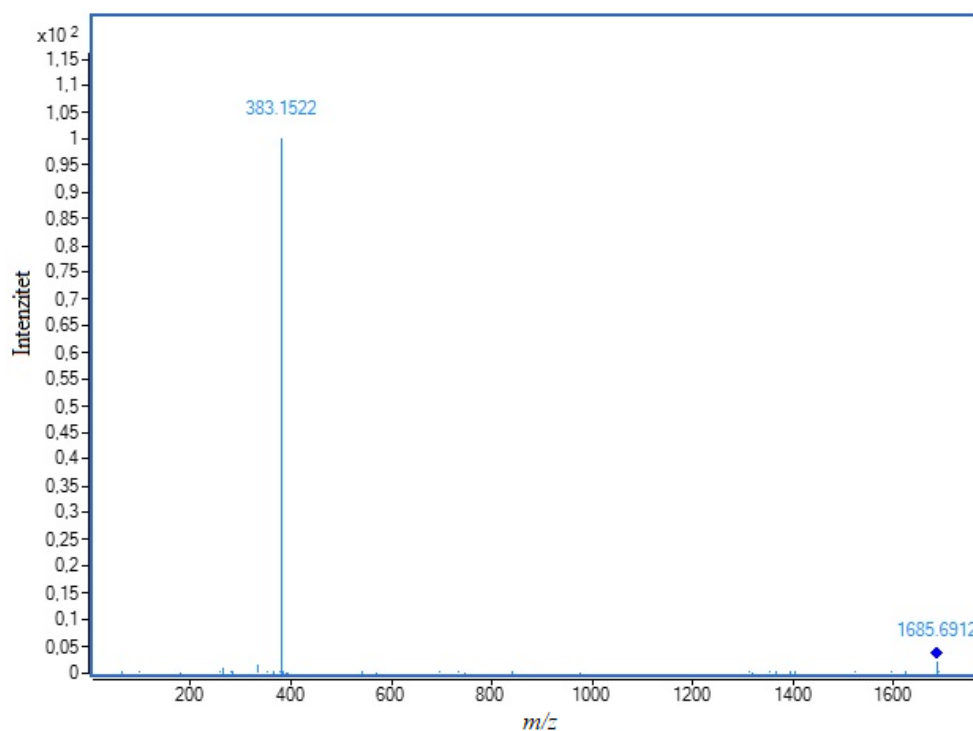


Slika 24. MS/MS spektar masa iona  $[\text{LOR/RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 10 V. Ionizacijska tehnika ESI+.





Slika 25. MS/MS spektar masa iona  $[\text{LOR/RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 20 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 26. MS/MS spektar masa iona  $[\text{LOR/RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

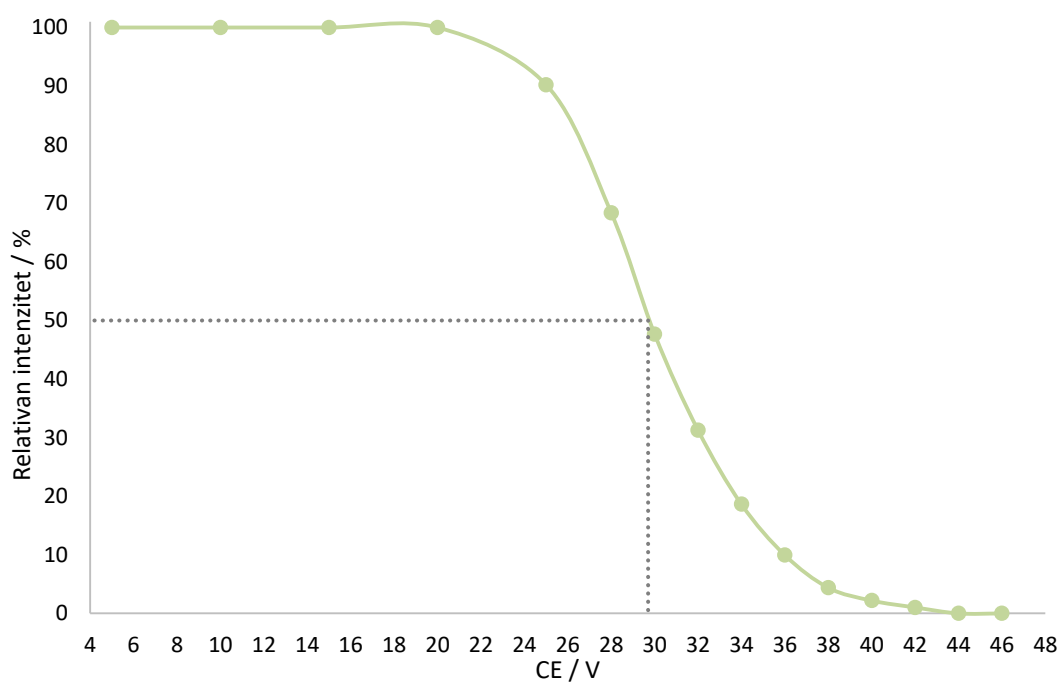
#### 4.7. Usporedba stabilnosti analiziranih spojeva

Stabilnost LOR,  $\beta$ -CD, RM $\beta$ CD sa stupnjem supstitucije 12 te inkluzijskih kompleksa LOR/ $\beta$ -CD i LOR/RM $\beta$ CD, međusobno se uspoređivala konstruiranjem krivulja ovisnosti relativnog intenziteta odabranog iona o kolizijskom potencijalu. Za svaki navedeni spoj dobivena je sigmoidalna krivulja za prekursor ion u spektru masa s padajućim relativnim intenzitetom, uz konstantno povećanje vrijednosti kolizijskog potencijala. Očitanjem vrijednosti kolizijskog potencijala pri relativnom intenzitetu od 50%, odredila se optimalna vrijednost kolizijskog potencijala za analizirani spoj, koja daje informaciju o stabilnosti istog.

Stabilnost protonirane molekule LOR, [LOR+H]<sup>+</sup>, analizirala se primjenom kolizijskog potencijala 5–46 V (tablica 16, slika 27). Vrijednost kolizijskog potencijala pri 50% relativnog intenziteta za ion [LOR+H]<sup>+</sup>, iznosi 29,7 V.

Tablica 16. Ovisnost relativnog intenziteta iona [LOR+H]<sup>+</sup> o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

<b>Eksperimentalna vrijednost <i>m/z</i></b>	<b><i>CE</i> / V</b>	<b>Relativan intenzitet / %</b>
383,1624	5	100
383,1622	10	100
383,1614	15	100
383,1586	20	100
383,1556	25	90,24
383,1531	28	68,38
383, 1524	30	47,67
383,1524	32	31,28
383,1519	34	18,63
383,1519	36	9,95
383,1525	38	4,39
383,1517	40	2,19
383,1510	42	1,03
-	44	-
-	46	-

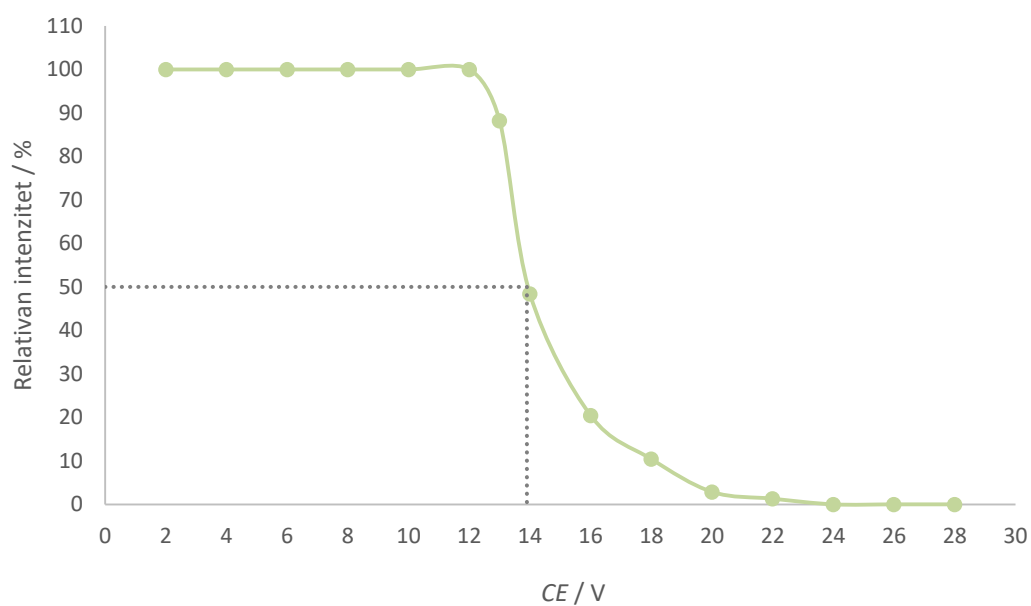


Slika 27. Ovisnost relativnog intenziteta iona  $[\text{LOR}+\text{H}]^+$  o kolizijskom potencijalu.  
Ionizacijska tehnika ESI+.

Stabilnost protonirane molekule  $\beta\text{-CD}$ ,  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$ , analizirala se primjenom kolizijskog potencijala 2–28 V (tablica 17, slika 28). Vrijednost kolizijskog potencijala pri 50% relativnog intenziteta za ion  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$ , iznosi 13,9 V.

Tablica 17. Ovisnost relativnog intenziteta iona  $[\beta\text{-CD+H}]^+$  o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

Eksperimentalna vrijednost $m/z$	$CE / V$	Relativan intenzitet / %
1135,3753	2	100
1135,3764	4	100
1135,3763	6	100
1135,3760	8	100
1135,3757	10	100
1135,3768	12	100
1135,3798	13	88,22
1135,3838	14	48,4
1135,3834	16	20,44
1135,3819	18	10,42
1135,3811	20	2,87
1135,3783	22	1,3
-	24	-
-	26	-
-	28	-

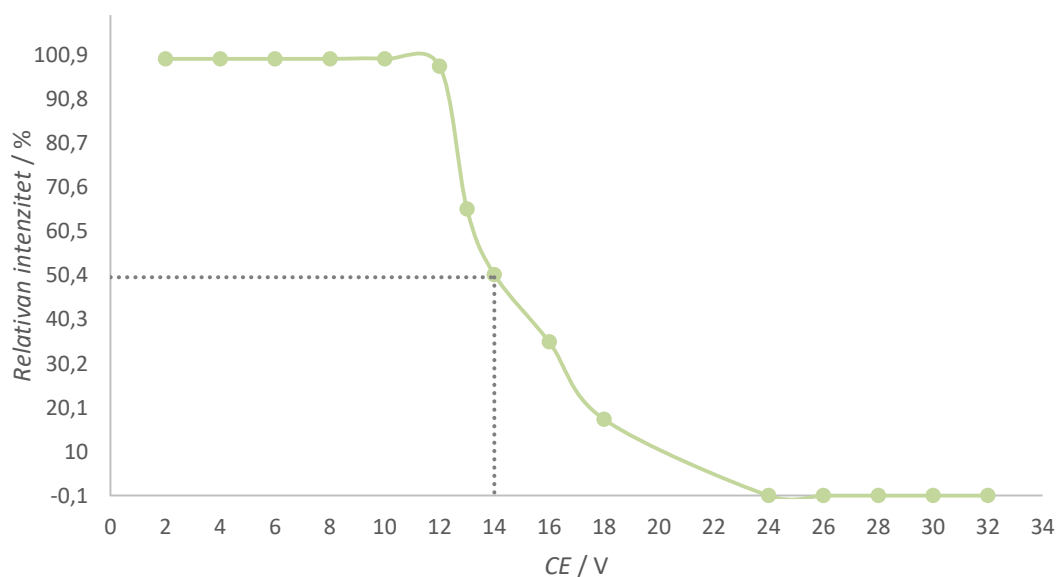


Slika 28. Ovisnost relativnog intenziteta iona  $[\beta\text{-CD+H}]^+$  o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

Stabilnost protonirane molekule RM $\beta$ CD sa stupnjem supstitucije 12, [RM $\beta$ CD+H]<sup>+</sup>, analizirala se primjenom kolizijskog potencijala 2–32 V (tablica 18, slika 29). Vrijednost kolizijskog potencijala pri 50% relativnog intenziteta za ion [RM $\beta$ CD+H]<sup>+</sup> iznosi 14,0 V.

Tablica 18. Ovisnost relativnog intenziteta iona [RM $\beta$ CD+H]<sup>+</sup> o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

<b>Eksperimentalna vrijednost <i>m/z</i></b>	<b><i>CE</i> / V</b>	<b>Relativan intenzitet / %</b>
1303,5600	2	100
1303,5586	4	100
1303,5587	6	100
1303,5585	8	100
1303,5538	10	100
1303,5502	12	98,32
1303,5382	13	65,65
1303,5194	14	50,62
1303,5062	16	35,18
1303,5100	18	17,48
-	24	-
-	26	-
-	28	-
-	30	-
-	32	-

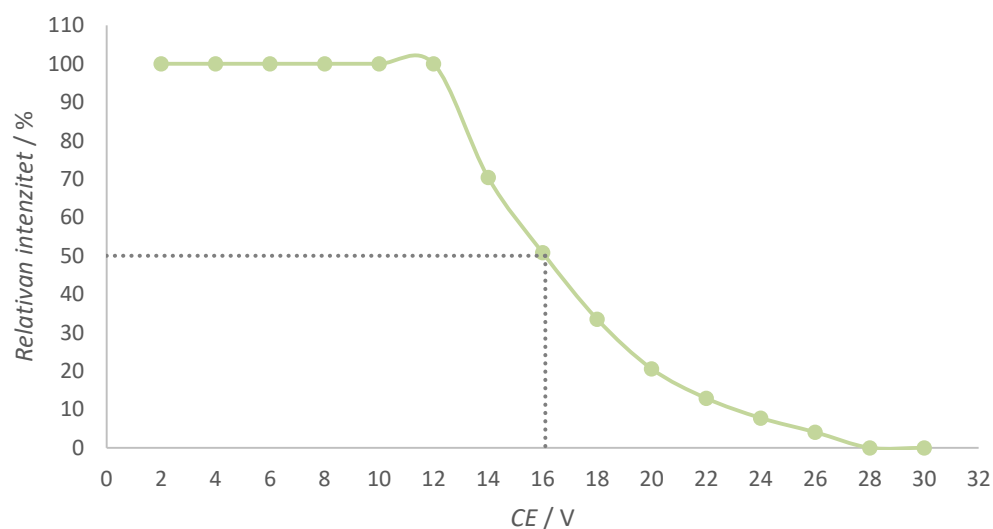


Slika 29. Ovisnost relativnog intenziteta iona  $[\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

Stabilnost protoniranog inkluzijskog kompleksa,  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$ , analizirala se primjenom kolizijskog potencijala 2–30 V (tablica 19, slika 30). Vrijednost kolizijskog potencijala pri 50% relativnog intenziteta za ion  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  iznosi 16,1 V.

Tablica 19. Ovisnost relativnog intenziteta iona  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

<b>Ekperimentalna vrijednost <math>m/z</math></b>	<b><math>CE/V</math></b>	<b>Relativan intenzitet / %</b>
1517,5177	2	100
1517,5174	4	100
1517,5176	6	100
1517,5175	8	100
1517,5171	10	100
1517,5179	12	100
1517,5170	14	70,4
1517,5169	16	50,8
1517,5153	18	33,49
1517,5166	20	20,57
1517,5153	22	12,9
1517,5159	24	7,76
1517,5145	26	4,06
-	28	-
-	30	-



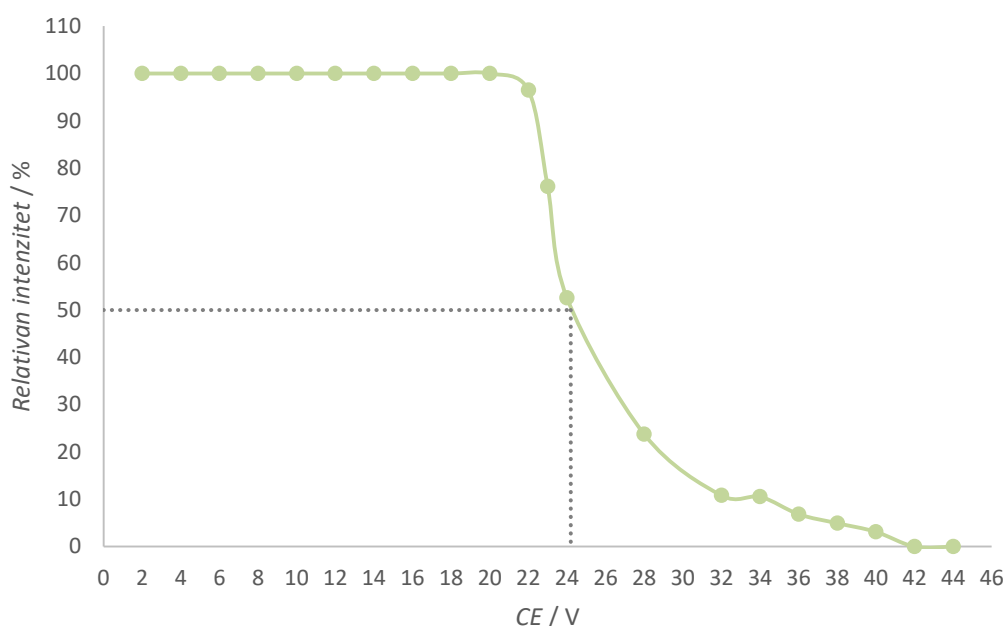
Slika 30. Ovisnost relativnog intenziteta iona  $[\text{LOR}/\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

Stabilnost protoniranog inkluzijskog kompleksa LOR/RM $\beta$ CD, [LOR/RM $\beta$ CD+H]<sup>+</sup>, analizirala se primjenom kolizijskog potencijala 2–44 V (tablica 20, slika 31). Vrijednost kolizijskog potencijala pri 50% relativnog intenziteta za ion [LOR/RM $\beta$ CD+H]<sup>+</sup> iznosi 24,2 V.

Tablica 20. Ovisnost relativnog intenziteta iona [LOR/RM $\beta$ CD+H]<sup>+</sup> o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

<b>Ekperimentalna vrijednost <math>m/z</math></b>	<b><math>CE/V</math></b>	<b>Relativan intenzitet / %</b>
1685,7019	2	100
1685,7039	4	100
1685,7034	6	100
1685,6994	8	100
1685,7019	10	100
1685,7009	12	100
1685,7038	14	100
1685,7023	16	100
1685,7004	18	100
1685,7011	20	100
1685,7024	22	96,49
1685,7027	23	76,16
1685,7000	24	52,58
1685,7031	28	23,77
1685,7046	32	10,81
1685,7023	34	10,54
1685,6917	36	6,84
1685,6979	38	4,94
1685,7081	40	3,12
-	42	0
-	44	0





Slika 31. Ovisnost relativnog intenziteta iona  $[\text{LOR}/\text{RM}\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  o kolizijskom potencijalu. Ionizacijska tehnika ESI+.

Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti kako je ion LOR najstabilniji od svih analiziranih spojeva, odnosno potrebno je primijeniti najveći kolizijski potencijal od 29,7 V kako bi se polovica raspala. Potvrđena je i hipoteza da derivat  $\beta$ -CD gradi stabilniji inkluzijski kompleks s LOR, nego što je slučaj s nesupstituiranim  $\beta$ -CD, jer je potrebno primijeniti veći kolizijski potencijal koji iznosi 24,2 V. Optimalne vrijednosti kolizijskog potencijala za  $\beta$ -CD te RM $\beta$ CD su vrlo slične što znači da su u slobodnom obliku, spomenuti spojevi približno iste stabilnosti.

## § 5. ZAKLJUČAK

Spektrometrijom masa detaljno su analizirani loratadin,  $\beta$ -ciklodekstrin i nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin s prosječnim stupnjem supstitucije 12, te njihovi inkluzijski kompleksi. Pokazano je da loratadin i ciklodekstrini zaista grade inkluzijske komplekse čiji su signali vidljivi u dobivenim spektrima masa u pozitivnom načinu snimanja pri  $m/z$  1517 te  $m/z$  1685, dok se u negativnom ne uočavaju zbog loratadina koji ne stvara negativno nabijeni ion. MS analizom loratadina,  $\beta$ -ciklodekstrina i njegovog derivata, osim protoniranih iona, uočena je i tendencija prema stvaranju adukata s natrijem u pozitivnom načinu snimanja, štoviše ciklodekstrini stvaraju i adukate s mravljom kiselinom u negativnom načinu snimanja.

Budući da su signali inkluzijskih kompleksa vrlo niskog relativnog intenziteta, optimizirani su parametri snimanja uz pozitivnu ionizaciju kako bi signali bili što intenzivniji, što se uspješno postiglo. Većem intenzitetu signala inkluzijskih kompleksa, doprinosi i optimalni molarni omjer LOR:CD 1:2 te korištenje optimalnih koncentracija loratadina i ciklodekstrina.

Tandemnom spektrometrijom masa analizirani su izabrani ioni te su na temelju prikupljenih rezultata predloženi fragmentacijski putevi. Fragmentacijski put iona loratadina započinje prelaskom u oksonijev ion. Zatim, postoje tri moguća načina cijepanja piperidinskog prstena koji rezultiraju dobivanjem različitih struktura nastalih fragmentnih iona. Ukoliko na kraju dođe do gubitka klora iz strukture fragmentnog iona, vrijednost  $m/z$  se dodatno umanjuje za masu klora. Fragmentacijski put iona  $\beta$ -ciklodekstrina uključuje cijepanje različitog broja glukopiranoznih podjedinica čime nastaju pozitivno nabijeni fragmentni ioni pri različitim vrijednostima  $m/z$  (973/811/649/487/325/163). Na poslijetku, predložen je i fragmentacijski put inkluzijskog kompleksa loratadina i  $\beta$ -ciklodekstrina, pri čemu dolazi do oslobađanja loratadina iz hidrofobne šupljine  $\beta$ -ciklodekstrina što je zaključeno zbog uočavanja signala iona loratadina pri  $m/z$  383, dok  $\beta$ -ciklodekstrin prelazi u neutralan oblik zbog čega ne daje signal u spektru masa. Fragmentacijski putevi nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina i inkluzijskog kompleksa loratadina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina nisu predloženi u ovom radu, zbog toga što je potrebno sakupiti dodatne informacije o strukturi navedenih spojeva.

Konstruiranjem krivulja ovisnosti relativnog intenziteta o kolizijskom potencijalu, uspoređena je stabilnost analiziranih spojeva. Pokazano je kako je ion loratadina najstabilniji

jer je za smanjenje relativnog intenziteta na 50%, potrebno primijeniti najveći kolizijski potencijal. Stabilnost  $\beta$ -ciklodekstrina i njegovog derivata je približno ista, dok se nastankom inkluzijskih kompleksa s različitim molekulama domaćina, stabilnost mijenja. Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti kako derivat  $\beta$ -ciklodekstrina stvara stabilnije inkluzijske komplekse, nad kojima je potrebno primijeniti veću vrijednost kolizijskog potencijala, nego što je vrijednost kolizijskog potencijala za inkluzijske komplekse s nesupstituiranim  $\beta$ -ciklodekstrinom kao molekulom domaćina.

Prikupljene informacije o inkluzijskim kompleksima u ovom radu, slažu se s, do sada, objavljenim rezultatima u znanstvenim radovima te se još jednom može zaključiti kako se metodom spektrometrije masa mogu uspješno analizirati inkluzijski kompleksi jer je metoda karakterizirana visokom osjetljivošću, a korištenjem hibridnog analizatora masa s kvadrupolom i analizatorom vremena leta, i visokim razlučivanjem.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

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

BCS – biofarmaceutski klasifikacijski sistem (engl. *biopharmaceutical classification system*)

CD – ciklodekstrin (engl. *cyclodextrin*)

$\alpha$ -CD –  $\alpha$ -ciklodekstrin (engl.  *$\alpha$ -cyclodextrin*)

$\beta$ -CD –  $\beta$ -ciklodekstrin (engl.  *$\beta$ -cyclodextrin*)

$\gamma$ -CD –  $\gamma$ -ciklodekstrin (engl.  *$\gamma$ -cyclodextrin*)

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

DCI – desorpcijska kemijska ionizacija (engl. *desorption chemical ionization*)

DIMEB – dimetil- $\beta$ -ciklodekstrin (engl. *dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin*)

DS – stupanj supstitucije (engl. *degree of substitution*)

EI – ionizacija elektronima (engl. *electron ionization*)

Eksp. – eksperimentalna

ESI – elektroraspršenje (engl. *electrospray ionization*)

EE<sup>+</sup> – ioni s parnim brojem elektrona (engl. *even-electron ion*)

FAB – ionizacija brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*)

FD – desorpcija poljem (engl. *field desorption*)

FT-ICR – Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije (engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance*)

HBCD – nasumično esterificirani  $\beta$ -ciklodekstrin (engl. *randomly esterified 6-O-(3-hydroxybutyryl)- $\beta$ -cyclodextrin*)

HP $\beta$ CD – hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin (engl. *hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin*)

IT – ionska stupica (engl. *ion trap*)

LD – desorpcija laserskim zračenjem (engl. *laser desorption*)

LOR – loratadin (engl. *loratadine*)

LOR/ $\beta$ -CD – inkluzijski kompleks loratadina i  $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *inclusion complex of loratadine and  $\beta$ -cyclodextrin*)

LOR/RM $\beta$ CD – inkluzijski kompleks loratadina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina (engl. *inclusion complex of loratadine and randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin*)

MALDI – matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*)

M $\beta$ CD – maltozil- $\beta$ -ciklodekstrin (engl. *maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin*)

*m/z* – omjer mase i naboja

NIST/EPA/NIH – baza podataka (engl. *National Institute of Standards and Technology/Environmental Protection Agency/National Institute of Health*)

NMR – nuklearna magnetska rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*)

OE<sup>+</sup> – kation s neparnim brojem elektrona (engl. *odd-electron cation*)

OE<sup>-</sup> – anion s neparnim brojem elektrona (engl. *odd-electron anion*)

PCZ – propikonazol (engl. *propiconazole*)

PD – desorpcija plazmom (engl. *plasma desorption*)

Q – kvadrupol (engl. *quadrupole*)

RM $\beta$ CD – nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin (engl. *randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin*)

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

SIMS – ionizacija sekundarnim ionima (engl. *secondary ion mass spectrometry*)

TABCD – triacetil- $\beta$ -ciklodekstrin (engl. *triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin*)

Teor. – teorijska

TOF – analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *time-of-flight*)

TSI – termoraspršenje (engl. *thermospray ionization*)

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

•+ – simbol iona s neparnim brojem elektrona

• – simbol lokalizacije radikala

+ – simbol lokalizacije kationa

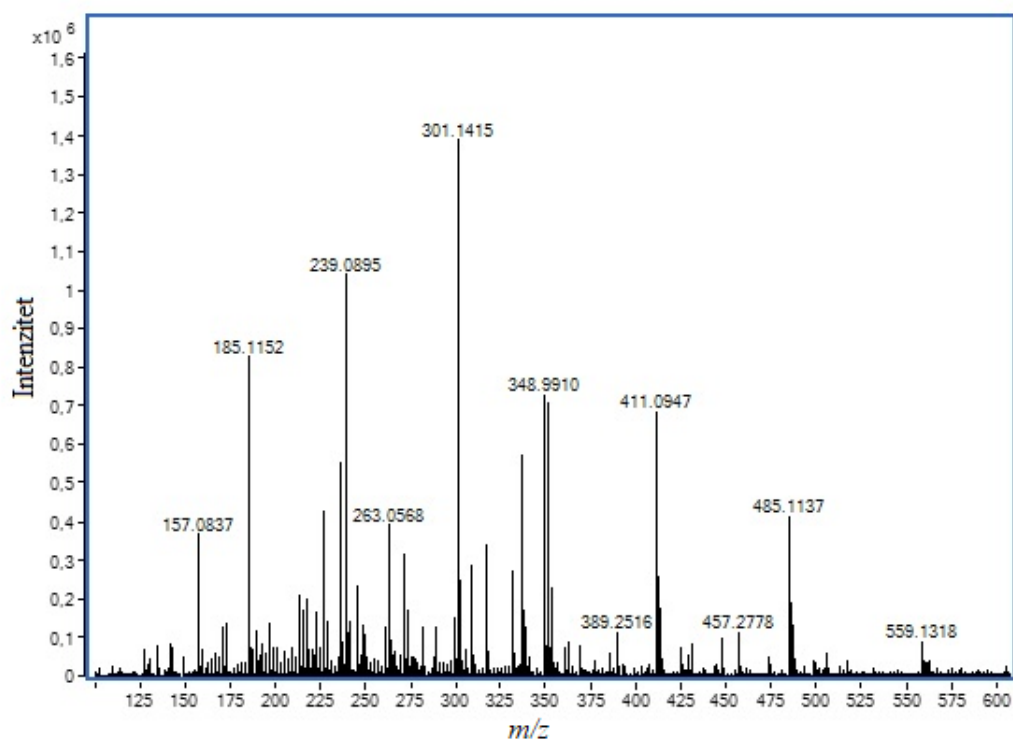
## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Third Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2007
2. Á. Szabados-Nacsa, P. Sipos, T. Martinek, I. Mándity, G. Blazsó, Á. Balogh, P. Szabó-Révész, Z. Aigner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55** (2011) 294–300.
3. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607–1621.
4. J. H. Gross, *Mass Spectrometry*, Third Edition, Springer International Publishing, Cham, 2017
5. <http://life.nthu.edu.tw/~labcjw/BioPhyChem/Mass/quadrupo.htm> (datum pristupa 12.4.2021.)
6. D. R. Allen, B. C. McWhinney, *Clin. Biochem. Rev.* **40** (2019) 135–146.
7. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Loratadine#section=Hepatotoxicity> (datum pristupa 28.4.2021.)
8. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 1–10.
9. J. Jablan, *Oblikovanje i vrednovanje ciklodekstrinskih terapijskih sustava za oralnu primjenu zaleplona*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 19–30.
10. E. M. M. de Valle, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
11. M. Sillion, A. Fifere, A.L. Lungoci, N. L. Marangoci, S.A. Ibanescu, R. Zonda., A. Rotaru, M. Pinteala, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1140** (2019) 685–701.
12. B. Cheirsilp, J. Rakmai, *Biology, Engineering and Medicine* **2** (2017)
13. S. Sforza, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **14** (2003) 124–135.
14. C. Peptu, V. Harabagiu, *Dig. J. Nanomater. Bios.* **8** (2013) 1551–1561.
15. N. Marangoci, M. Mares, M. Sillion, A. Fifere, C. Varganici, A. Nicolescu, C. Deleanu, A. Coroaba, M. Pinteala, B.C. Simionescu, *Results. Pharma. Sci.* **1** (2011) 27–37.
16. J. A. Do, E. Noh, S. B. Yoon, J. H. Lee, S. K. Park, S. Mandava, S. Y. Baek, J. Lee, *Arch. Pharm. Res.* **40** (2017) 736–745.

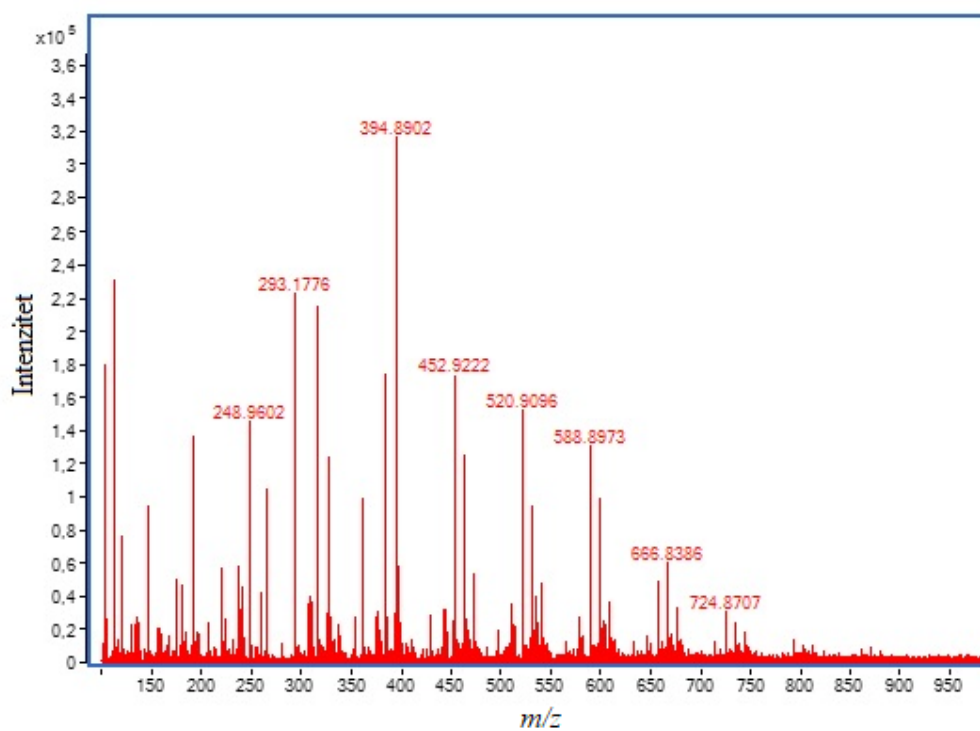
## § 8. DODATAK

Tablica D1. Ovisnost intenziteta kompleksa LOR/ $\beta$ -CD o vrijednosti određenog parametra prilikom snimanja otopine LOR i  $\beta$ -CD u omjeru 1:1. Ionizacijska tehnika ESI+.

Parametar	Vrijednost parametra	Eksperimentalna vrijednost $m/z$	Intenzitet
Temperatura protočnog plina / °C	225	1517,5179	38268
	250	1517,5179	39013
	300	1517,5183	38468
	350	1517,5179	33185
Protok protočnog plina / L min <sup>-1</sup>	10	1517,5185	40512
	11	1517,5179	39013
	12	1517,5189	39855
Tlak raspršivača / psi	25	1517,5179	39013
	30	1517,5186	37080
	35	1517,5183	34486
	40	1517,5194	28139
Potencijal kapilare / V	3000	1517,5198	38113
	3500	1517,5179	39013
	4000	1517,5197	48262
Potencijal mlaznice / V	0	1517,5179	39013
	500	1517,5190	48938
	1000	1517,5195	40748
	1500	1517,5207	43237
	2000	1517,5198	42045
Temperatura plina za desoaltaciju / °C	200	1517,5179	39013
	225	1517,5198	40613
Protok plina za desolvataciju / L min <sup>-1</sup>	15	1517,5199	43996
	16	1517,5198	37373
	17	1517,5179	39013
	18	1517,5198	36045
	19	1517,5193	36449
	20	1517,5198	36050



Slika D1. Spektar masa slijepe probe. Ionizacijska tehnika ESI+.

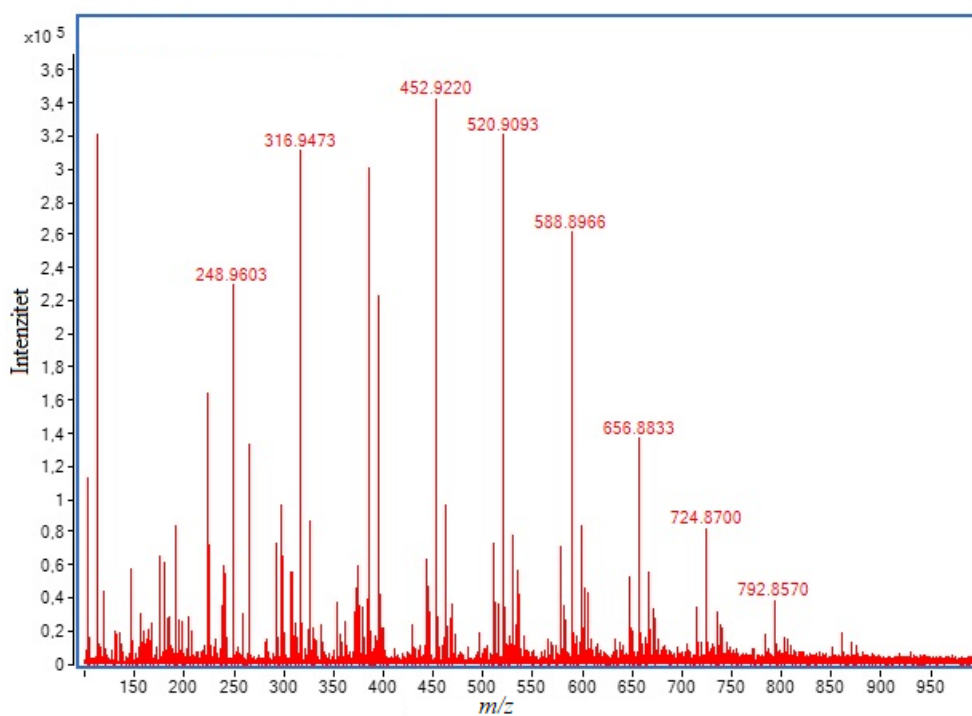


Slika D2. Spektar masa slijepe probe. Ionizacijska tehnika ESI-.

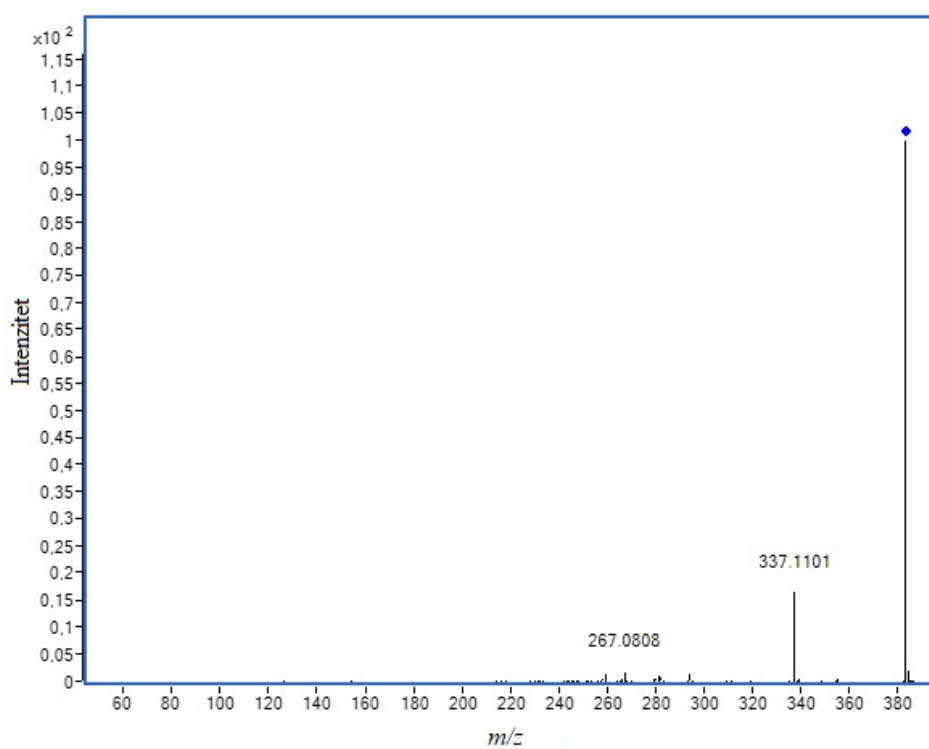


Tablica D2. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti  $m/z$  dobivene spektrometrijom masa otopine loratadina ( $\gamma = 17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI+ i ESI-.

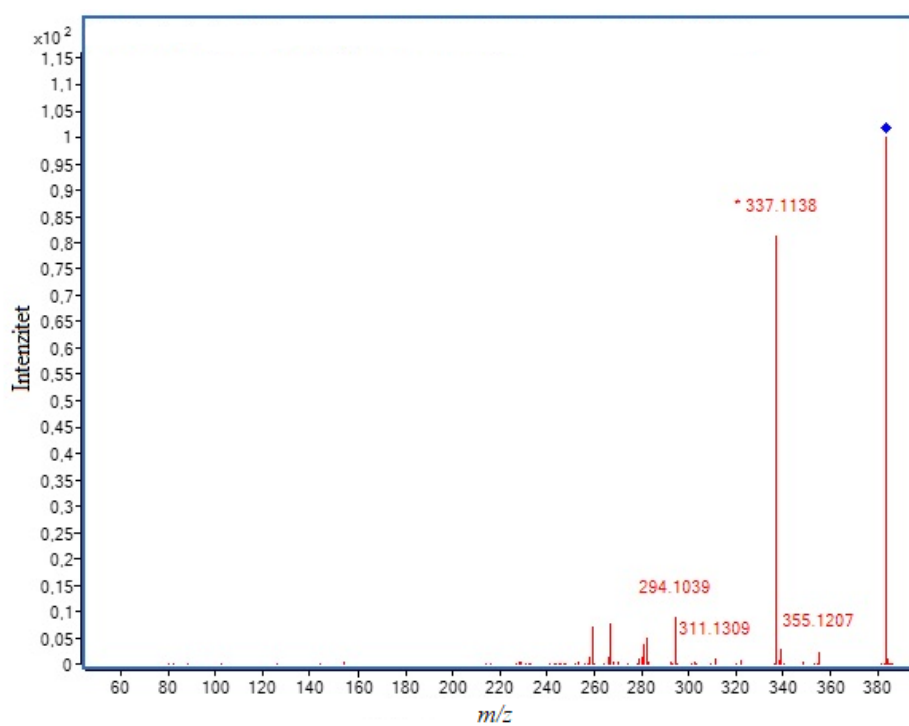
ESI+			
Teorijska vrijednost $m/z$	Eksperimentalna vrijednost $m/z$	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
405,1340	405,1338	3,89	[LOR+Na] <sup>+</sup>
383,1521	383,1663	100	[LOR+H] <sup>+</sup>
214,0616	214,0890	0,14	[LOR+2Na] <sup>2+</sup>
ESI-			
Teorijska vrijednost $m/z$	Eksperimentalna vrijednost $m/z$	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
381,1375	-	-	[LOR-H] <sup>-</sup>
190,0651	-	-	[LOR-2H] <sup>2-</sup>



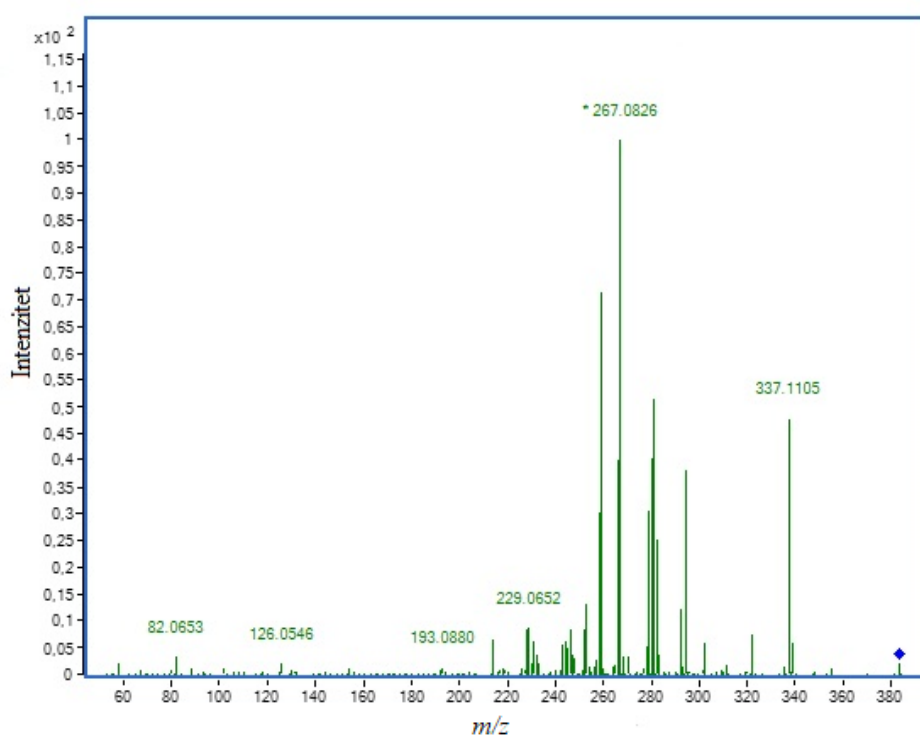
Slika D3. Spektar masa otopine LOR ( $\gamma = 17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI-.



Slika D4. MS/MS spektar masa iona  $[\text{LOR}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 10 V.  
Ionizacijska tehnika ESI+.



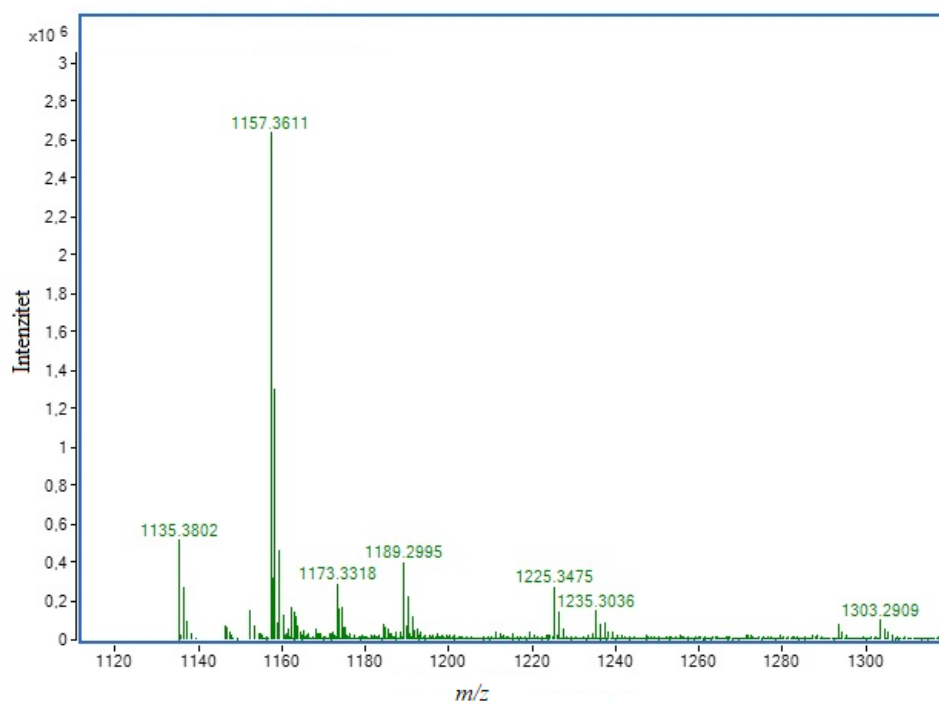
Slika D5. MS/MS spektar masa iona  $[\text{LOR}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 20 V.  
Ionizacijska tehnika ESI+.



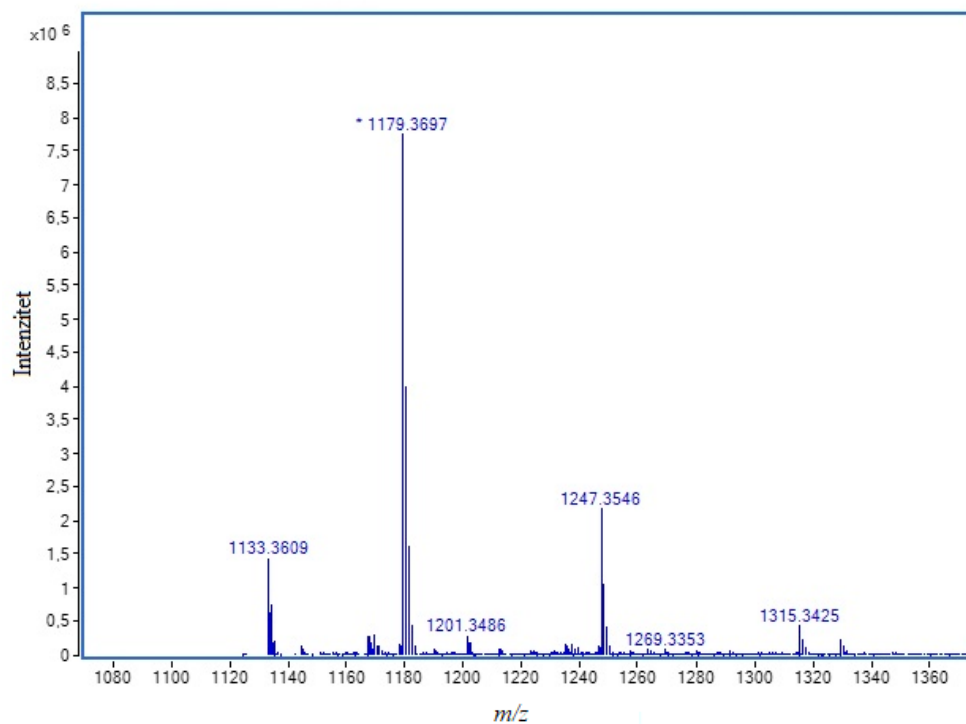
Slika D6. MS/MS spektar masa iona  $[LOR+H]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 40 V.  
Ionizacijska tehnika ESI+.

Tablica D3. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti  $m/z$  dobivene spektrometrijom masa otopine  $\beta$ -CD ( $\gamma = 50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI+ i ESI-.

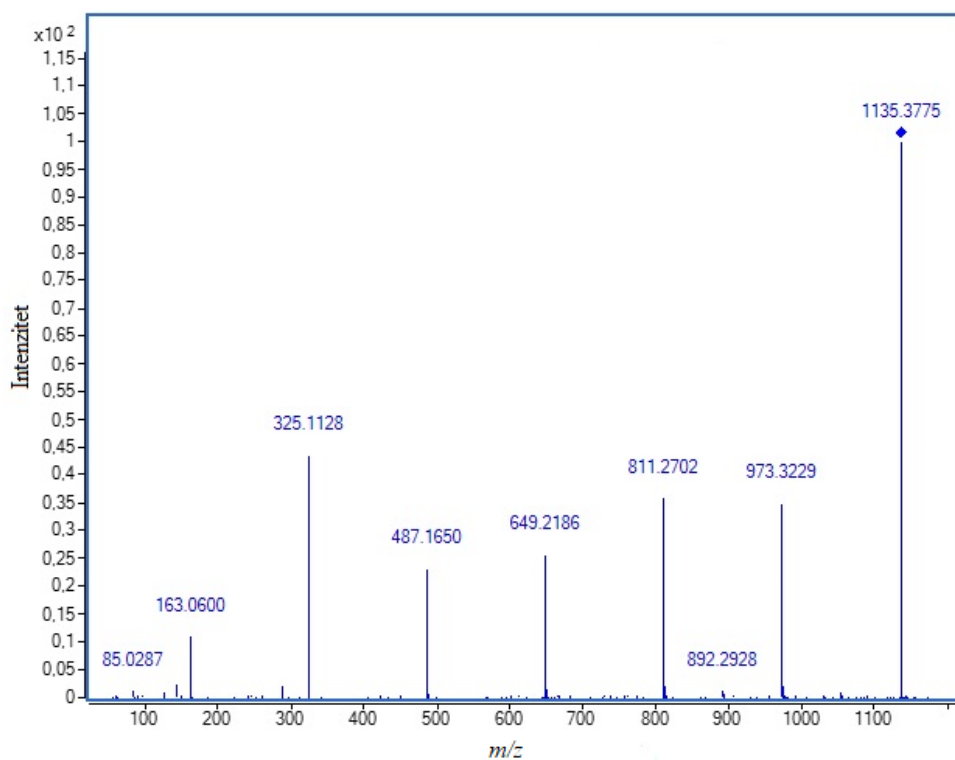
ESI+			
Teorijska vrijednost $m/z$	Eksperimentalna vrijednost $m/z$	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
1157,3590	1157,3611	96,97	$[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$
1135,3770	1135,3802	18,05	$[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$
590,1741	590,1754	5,94	$[\beta\text{-CD}+2\text{Na}]^{2+}$
ESI-			
Teorijska vrijednost $m/z$	Eksperimentalna vrijednost $m/z$	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
1179,3699	1179,3697	100	$[\beta\text{-CD}+\text{HCOO}]^-$
1133,3625	1133,3609	20,85	$[\beta\text{-CD}-\text{H}]^-$



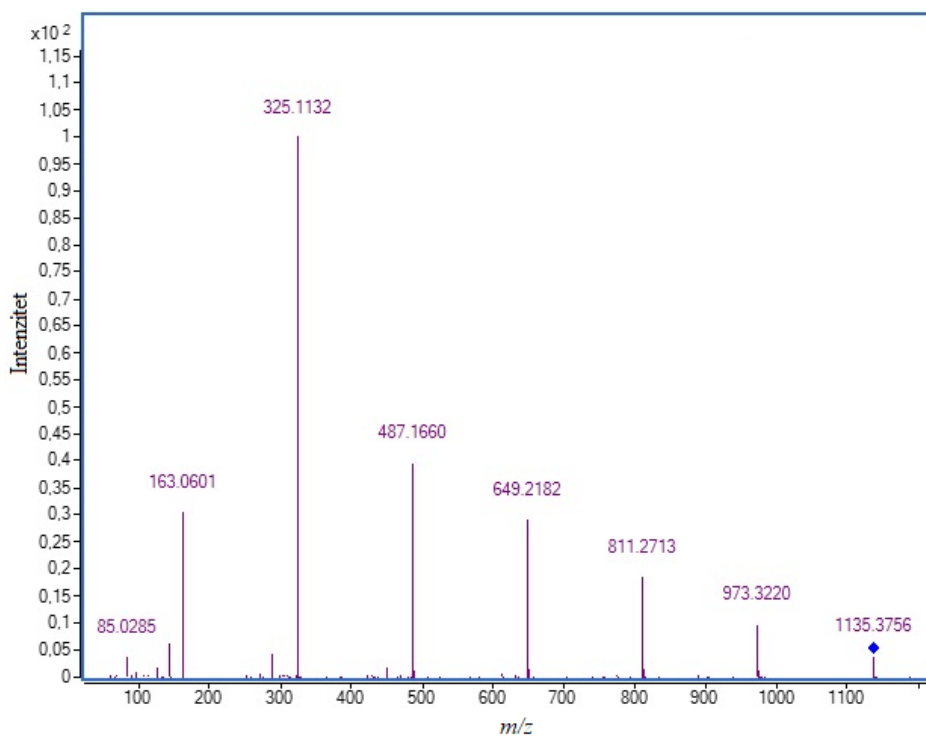
Slika D7. Uvećani prikaz spektra masa otopine  $\beta$ -CD ( $\gamma = 50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  1120–1400. Ionizacijska tehnika ESI+.



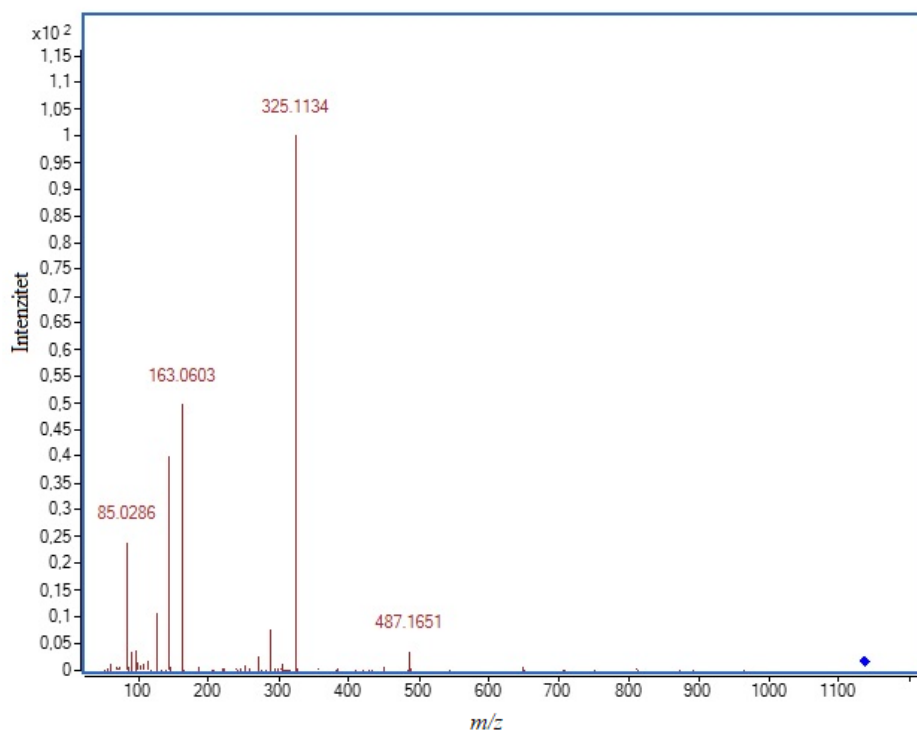
Slika D8. Spektar masa otopine  $\beta$ -CD ( $\gamma = 50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI-.



Slika D9. MS/MS spektar masa iona  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 10 V.  
Ionizacijska tehnika ESI+.



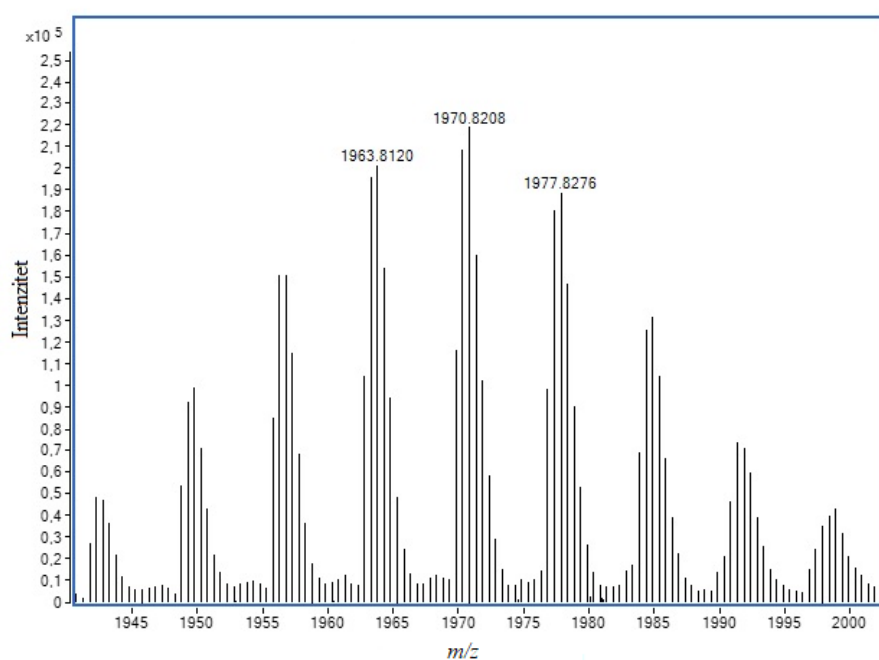
Slika D10. MS/MS spektar masa iona  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 20 V.  
Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika D11. MS/MS spektar masa iona  $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 40 V.  
Ionizacijska tehnika ESI+.

Tablica D4. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti  $m/z$  dobivene spektrometrijom masa otopine RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  1928–2000. Ionizacijska tehnika ESI+.

Mol.formula	DS	RM $\beta$ CD					
		[M+2H] <sup>2+</sup>			[M+2Na] <sup>2+</sup>		
		Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
C <sub>156</sub> H <sub>270</sub> O <sub>105</sub>	9+9+12	-	-	-	1934,7786	1934,7732	0,25
	9+10+11						
C <sub>157</sub> H <sub>272</sub> O <sub>105</sub>	9+9+13	-	-	-	1941,7864	1941,7814	0,36
	9+11+11						
	9+10+12						
	10+10+11						
C <sub>159</sub> H <sub>276</sub> O <sub>105</sub>	9+9+15	1933,8201	1933,8228	0,30	1955,8021	1955,7992	1,24
	9+12+12						
	9+10+14						
	9+11+13						
	10+10+13						
	10+11+12						
	3 × 11						
C <sub>160</sub> H <sub>278</sub> O <sub>105</sub>	9+10+15	-	-	-	1962,8099	1962,8052	1,57
	9+11+14						
	9+12+13						
	10+10+14						
	10+12+12						
	10+11+13						
	11+11+12						
C <sub>161</sub> H <sub>280</sub> O <sub>105</sub>	9+13+13	-	-	-	1969,8177	1969,8107	1,48
	9+11+15						
	9+12+14						
	10+10+15						
	10+11+14						
	10+12+13						
	11+11+13						
	11+12+12						

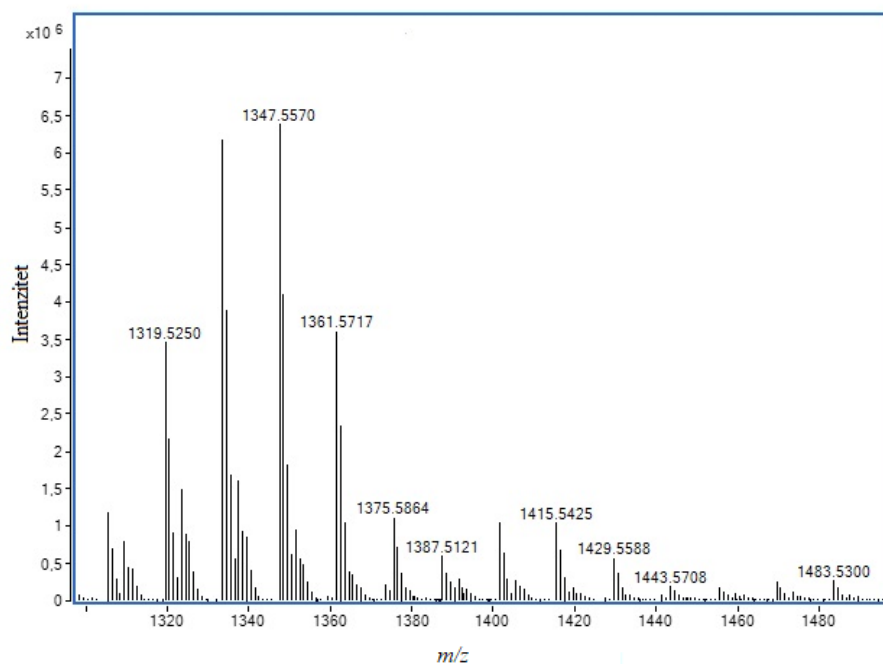


Slika D12. Uvećani prikaz MS spektra otopine RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  1928–2000. Ionizacijska tehnika ESI+.

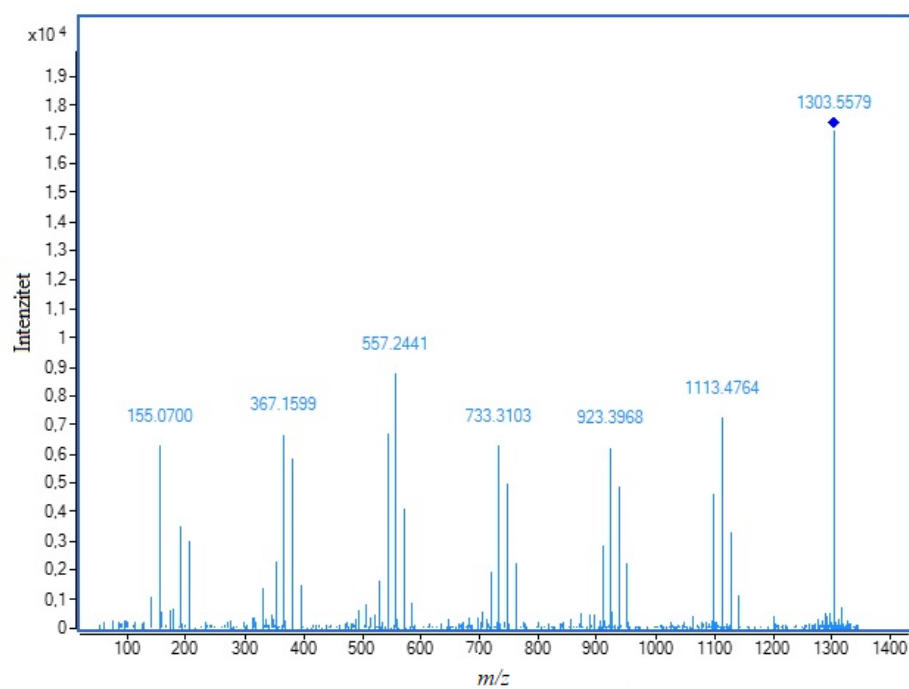
Tablica D5. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti  $m/z$  dobivene spektrometrijom masa otopine RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI-.

RM $\beta$ CD							
DS	Mol. formula	[RM $\beta$ CD – 1H] <sup>-</sup>			[RM $\beta$ CD + HCOO] <sup>-</sup>		
		Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %	Teor. $m/z$	Eksp. $m/z$	Rel. int. / %
9	C <sub>42</sub> H <sub>61</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>9</sub>	1259,5033	1259,5027	0,29	1305,5077	1305,5085	18,38
10	C <sub>42</sub> H <sub>60</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>	1273,5190	1273,5192	0,76	1319,5234	1319,5250	54,19
11	C <sub>42</sub> H <sub>59</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>11</sub>	1287,5346	1287,5341	0,93	1333,5390	1333,5413	96,60
12	C <sub>42</sub> H <sub>58</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>12</sub>	1301,5503	1301,5485	0,67	1347,5547	1347,5570	100
13	C <sub>42</sub> H <sub>57</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>13</sub>	1315,5659	1315,5580	0,28	1361,5703	1361,5717	56,46
14	C <sub>42</sub> H <sub>56</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>14</sub>	1329,5816	1329,5282	0,17	1375,5860	1375,5864	17,38
15	C <sub>42</sub> H <sub>55</sub> O <sub>35</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>15</sub>	1343,5972	1343,5350	0,25	1389,6016	1389,6007	3,87

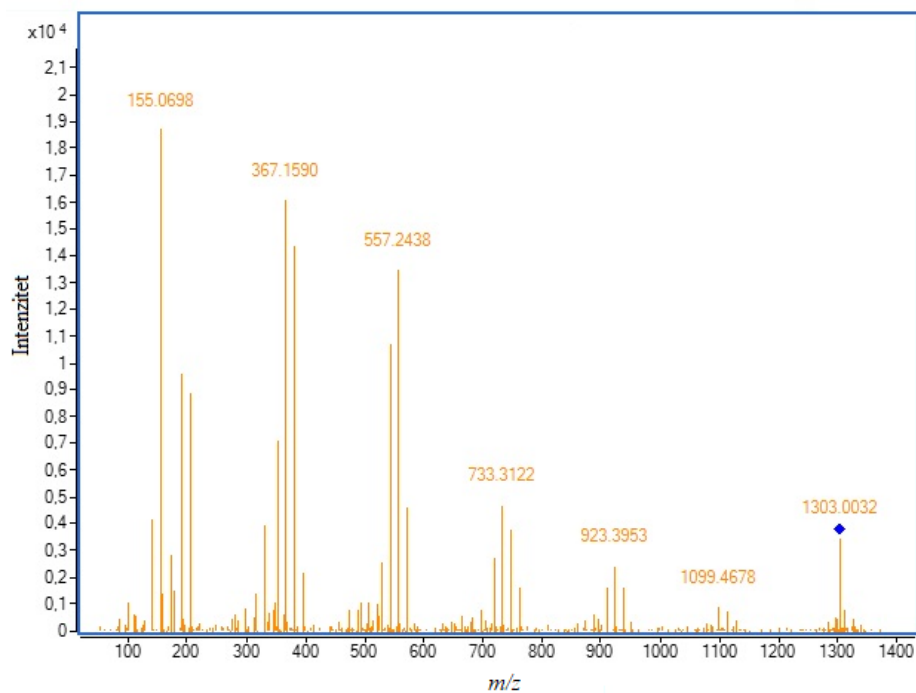




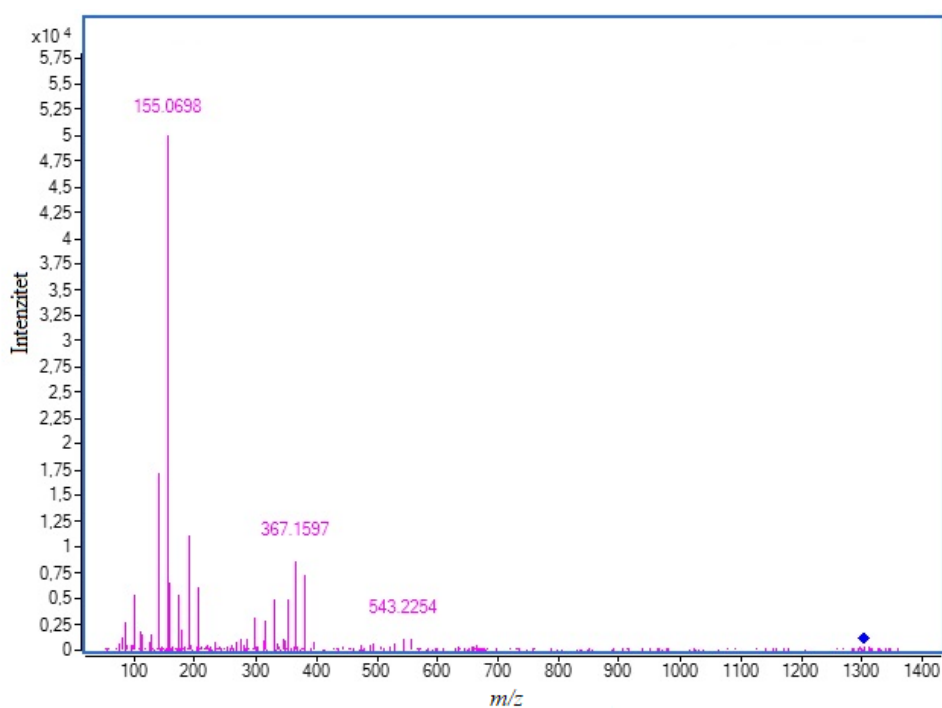
Slika D13. Uvećani prikaz MS spektra otopine RM $\beta$ CD ( $\gamma = 57,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u rasponu  $m/z$  1300–1500. Ionizacijska tehnika ESI-.



Slika D14. MS/MS spektar masa iona [RM $\beta$ CD+H] $^+$  pri kolizijskom potencijalu od 10 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika D15. MS/MS spektar masa iona  $[RM\beta CD+H]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 20 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika D16. MS/MS spektar masa iona  $[RM\beta CD+H]^+$  pri kolizijskom potencijalu od 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

Tablica D6. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti  $m/z$  dobivene tandemnom spektrometrijom masa iona  $[C_{54}H_{94}O_{35}+H]^+$  pri  $m/z$  1303,5579.

Primijenjen je kolizijski potencijal od 10V. Ionizacijska tehnika ESI+.

		-162 (-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	-176 (-C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> )	-190 (-C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> )	-204 (-C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> )	-218 (-C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> )	-232 (-C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> )
<b>7 podjedinica</b>							
<b>1303,5579</b> $[C_{54}H_{94}O_{35}+H]^+$	Teor. $m/z$	1141,5120	1127,4963	1113,4807	1099,4650	1085,4494	1071,4337
	Eksp. $m/z$	1141,5141	1127,4929	1113,4764	1099,4611	-	-
<b>6 podjedinica</b>							
<b>1141,5141</b>	Teor. $m/z$	979,4592	965,4435	951,4279	937,4122	923,3966	909,3809
	Eksp. $m/z$	-	965,4425	951,4238	937,4111	923,3968	909,3780
<b>1127,4929</b>	Teor. $m/z$	965,4435	951,4279	937,4122	923,3966	909,3809	895,3652
	Eksp. $m/z$	965,4425	951,4238	937,4111	923,3968	909,3780	-
<b>1113,4764</b>	Teor. $m/z$	951,4279	937,4122	923,3966	909,3809	895,3653	881,3496
	Eksp. $m/z$	951,4238	937,4111	923,3968	909,3780	-	-
<b>1099,4611</b>	Teor. $m/z$	937,4122	923,3966	909,3809	895,3653	881,3496	867,3339
	Eksp. $m/z$	937,4111	923,3968	909,3780	-	-	-
<b>5 podjedinica</b>							
<b>965,4425</b>	Teor. $m/z$	803,3907	789,3750	775,3594	761,3437	747,3281	733,3124
	Eksp. $m/z$	-	-	775,3602	761,3375	747,3240	733,3103
<b>951,4238</b>	Teor. $m/z$	789,3751	775,3594	761,3437	747,3281	733,3124	719,2968
	Eksp. $m/z$	-	775,3602	761,3375	747,3240	733,3103	719,2941

## § 8. Dodatak

xxvi

<b>937,4111</b>	Teor. m/z	775,3594	761,3437	747,3281	733,3124	719,2968	705,2811
	Eksp. m/z	775,3602	761,3375	747,3240	733,3103	719,2941	705,2780
<b>923,3968</b>	Teor. m/z	761,3438	747,3281	733,3125	719,2968	705,2812	691,2655
	Eksp. m/z	761,3375	747,3240	733,3103	719,2941	705,2780	-
<b>909,3780</b>	Teor. m/z	747,3281	733,3125	719,2968	705,2812	691,2655	677,2498
	Eksp. m/z	747,3240	733,3103	719,2941	705,2780	-	-
<b>4 podjedinice</b>							
<b>775,3602</b>	Teor. m/z	613,3066	599,2909	585,2753	571,2596	557,2440	543,2283
	Eksp. m/z	-	-	585,2749	571,2585	557,2441	543,2275
<b>761,3375</b>	Teor. m/z	599,2910	585,2753	571,2596	557,2440	543,2283	529,2127
	Eksp. m/z	-	585,2749	571,2585	557,2441	543,2275	529,2094
<b>747,3240</b>	Teor. m/z	585,2753	571,2596	557,2440	543,2283	529,2127	515,1970
	Eksp. m/z	585,2749	571,2585	557,2441	543,2275	529,2094	515,1970
<b>733,3103</b>	Teor. m/z	571,2597	557,2440	543,2284	529,2127	515,1971	501,1814
	Eksp. m/z	571,2585	557,2441	543,2275	529,2094	515,1970	-
<b>719,2941</b>	Teor. m/z	557,2440	543,2284	529,2127	515,1971	501,1814	487,1657
	Eksp. m/z	557,2441	543,2275	529,2094	515,1970	-	-
<b>711,2963</b>	Teor. m/z	549,2542	535,2385	521,2229	507,2072	493,1919	479,1759
	Eksp. m/z	-	535,2309	521,2177	507,2096	493,1920	-
<b>705,2780</b>	Teor. m/z	543,2284	529,2127	515,1971	501,1814	487,1657	473,1501
	Eksp. m/z	543,2275	529,2094	515,1970	-	-	-

**3 podjedinice**

<b>585,2749</b>	Teor. m/z	423,2225	409,2068	395,1912	381,1755	367,1599	353,1442
	Eksp. m/z	-	-	395,1896	381,1751	367,1599	353,1440
<b>571,2585</b>	Teor. m/z	409,2068	395,1912	381,1755	367,1599	353,1442	339,1285
	Eksp. m/z	-	395,1896	381,1751	367,1599	353,1440	339,1293
<b>557,2441</b>	Teor. m/z	395,1912	381,1755	367,1599	353,1442	339,1286	325,1129
	Eksp. m/z	395,1896	381,1751	367,1599	353,1440	339,1293	-
<b>543,2275</b>	Teor. m/z	381,1756	367,1599	353,1442	339,1286	325,1129	311,0973
	Eksp. m/z	381,1751	367,1599	353,1440	339,1293	-	-
<b>529,2094</b>	Teor. m/z	367,1599	353,1442	339,1286	325,1129	311,0973	297,0816
	Eksp. m/z	367,1599	353,1440	339,1293	-	-	-
<b>515,1970</b>	Teor. m/z	353,1442	339,1286	325,1129	311,0973	297,0816	283,0659
	Eksp. m/z	353,1440	339,1293	-	-	-	-

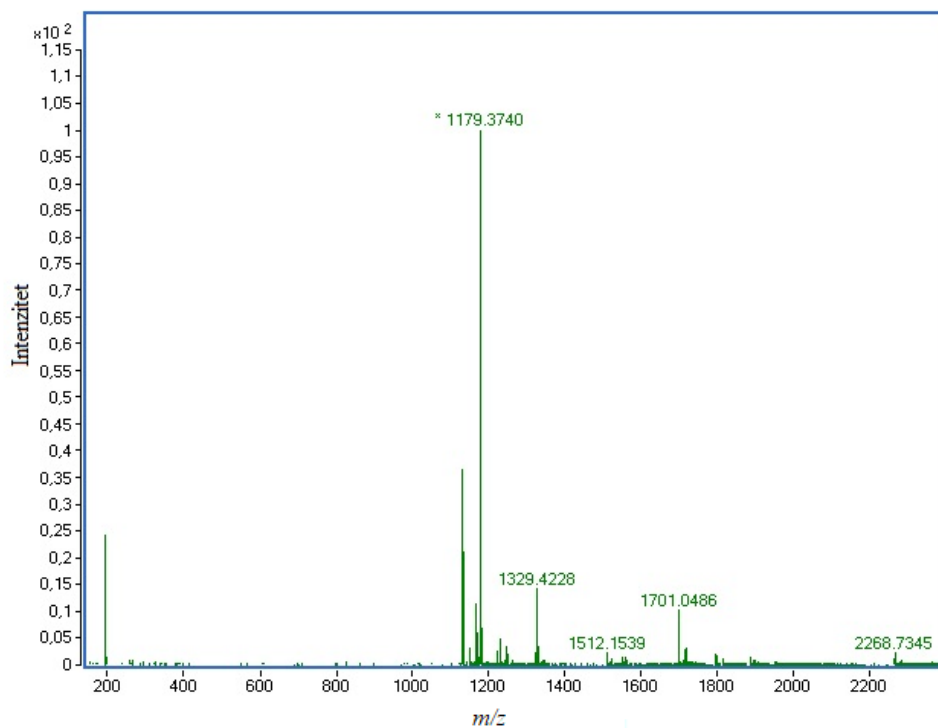
**2 podjedinice**

<b>395,1896</b>	Teor. m/z	233,1384	219,1227	205,1071	191,0914	177,0758	163,0601
	Eksp. m/z	-	-	205,1065	191,0901	177,0744	-
<b>381,1751</b>	Teor. m/z	219,1228	205,1071	191,0915	177,0758	163,0602	149,0445
	Eksp. m/z	-	205,1065	191,0901	177,0744	-	-
<b>367,1599</b>	Teor. m/z	205,1071	191,0914	177,0758	163,0445	149,0445	135,0288
	Eksp. m/z	205,1065	191,0901	177,0744	-	-	-

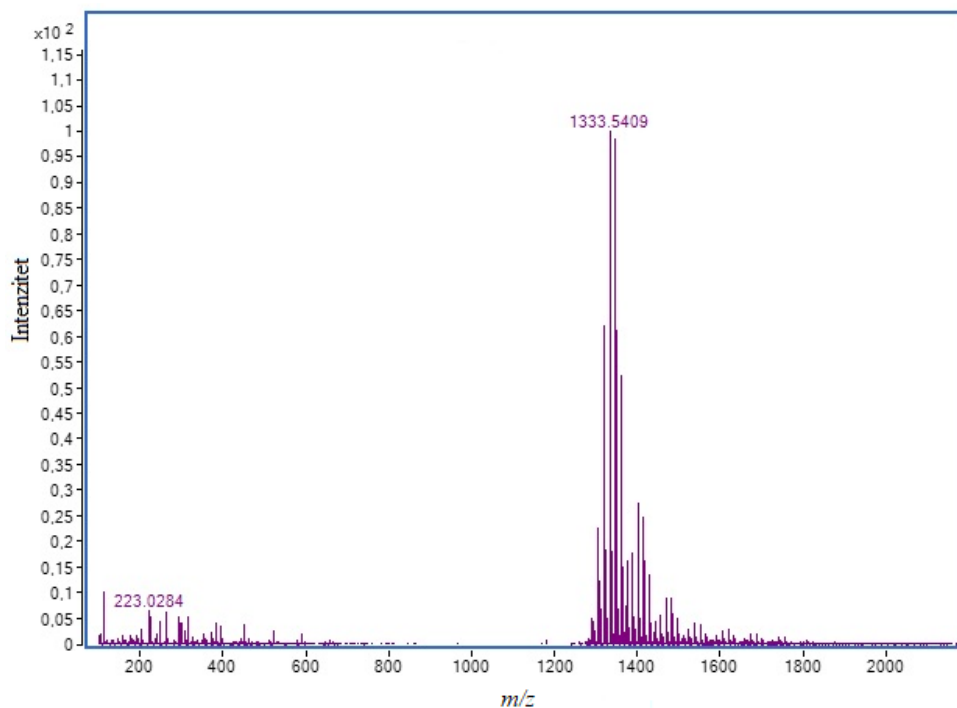
<b>353,1440</b>	Teor. <i>m/z</i>	191,0914	177,0758	163,0445	149,0445	135,0288	121,0131
	Eksp. <i>m/z</i>	191,0901	177,0744	-	-	-	-
<b>345,1503</b>	Teor. <i>m/z</i>	183,1016	169,0859	155,0703	141,0546	127,0390	113,0233
	Eksp. <i>m/z</i>	-	-	155,0700	141,0538	-	-
<b>339,1293</b>	Teor. <i>m/z</i>	177,0758	163,0445	149,0445	135,0288	121,0131	106,9975
	Eksp. <i>m/z</i>	177,0744	-	-	-	-	-

Tablica D7. Teorijske i eksperimentalne vrijednosti *m/z* dobivene MS analizom otopine LOR/ $\beta$ -CD u omjeru 1:2 ( $\gamma_{\text{LOR}} = 84,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ionizacijska tehnika ESI+ i ESI-.

ESI+			
Teorijska vrijednost <i>m/z</i>	Eksperimentalna vrijednost <i>m/z</i>	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
1517,5218	1517,5202	1,02	[LOR/ $\beta$ -CD+H] <sup>+</sup>
1157,3590	1157,3586	2,04	[ $\beta$ -CD+Na] <sup>+</sup>
1135,3770	1135,3771	2,54	[ $\beta$ -CD+H] <sup>+</sup>
383,1521	383,1664	100	[LOR+H] <sup>+</sup>
ESI-			
Teorijska vrijednost <i>m/z</i>	Eksperimentalna vrijednost <i>m/z</i>	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
1179,3699	1179,3740	100	[ $\beta$ -CD+HCOO] <sup>-</sup>
1133,3625	1133,3635	36,66	[ $\beta$ -CD-H] <sup>-</sup>



Slika D17. Spektar masa iona otopine LOR/ $\beta$ -CD u omjeru 1:2 ( $\gamma_{\text{LOR}} = 84,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).  
Ionizacijska tehnika ESI-.



Slika D18. Spektar masa otopine LOR/RM $\beta$ CD u omjeru 1:2 ( $\gamma_{\text{LOR}} = 17,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).  
Ionizacijska tehnika ESI-.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ana-Emina Živko

Datum rođenja: 19. svibnja 1997.

Mjesto rođenja: Čakovec

### Obrazovanje

2004–2012	Osnovna škola „Petar Zrinski“ Šenkovec, Šenkovec
2012–2016	Srednja škola Čakovec; smjer: opća gimnazija, Čakovec
2016–2019	Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2019-2021	Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: istraživački, grane: analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Iskustvo

11/2020	Stručna praksa u tvrtki Bioinstitut d.o.o., Čakovec
---------	---

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016	Otvoreni dan kemije
2019	Otvoreni dan kemije