

Karakterizacija inkluzijskih kompleksa cinarizina i odabranih ciklodekstrina spektrometrijom masa visokog razlučivanja

Inkret, Suzana

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:217:535135>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-09**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Suzana Inkret

**Karakterizacija inkluzijskih kompleksa
cinarizina i odabranih ciklodekstrina
spektrometrijom masa visokog razlučivanja**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2021.

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

Zahvale

Prvo se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Nives Galić te neposrednom voditelju mag. chem. Davidu Klariću na savjetima tijekom izrade diplomskog rada te strpljenju za odgovaranje na sva moja pitanja.

Zahvaljum se svim profesorima i asistentima na predanom znanju, ali i iskazanoj ljubavi prema kemiji koja je uvelike olakšala učenje.

Veliko hvala mojoj obitelji na neizmjerne podršci tijekom studiranja.

Zahvaljum se svom cijelom društvu na nezaboravnim danima i vikendima te svim zabavama koje su mi pomogle da na trenutak zaboravim na ispitne rokove.

Posebno hvala najdražoj kolegici Emini koja mi je pomogla biti boljom studenticom. Da nije bilo tebe ni jedna pauza između predavanja ne bi bila toliko zanimljiva. Studentski dani nezaboravni su zbog tebe.

Najveće hvala Darku na ogromnom strpljenju za slušanje svih mojih problema i strahova.

Hvala na svim riječima i svoj ljubavi.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Cinarizin	2
2.1.1. <i>Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari.....</i>	<i>3</i>
2.2. Ciklodekstrini	4
2.2.1. <i>Toksikologija i farmakokinetika ciklodekstrina.....</i>	<i>8</i>
2.3. Inkluzijski kompleksi.....	8
2.3.1. <i>Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju i otopini</i>	<i>10</i>
2.3.2. <i>Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina spektrometrijom masa</i>	<i>12</i>
2.4. Spektrometrija masa.....	14
2.4.1. <i>Ionski izvori.....</i>	<i>16</i>
<i>Ionizacija elektroraspršenjem</i>	<i>16</i>
2.4.2. <i>Analizatori masa</i>	<i>19</i>
<i>Analizator masa koji mjeri vrijeme leta</i>	<i>19</i>
<i>Kvadrupolni analizator masa.....</i>	<i>21</i>
2.4.3. <i>Detektori.....</i>	<i>26</i>
2.5. Tandemna spektrometrija masa.....	27
2.5.1. <i>Tandemna spektrometrija masa u vremenu i prostoru.....</i>	<i>28</i>
2.6. Reakcije fragmentacije	29
2.6.1. <i>Fragmentacija iona s neparnim brojem elektrona (OE^{+}).....</i>	<i>30</i>
2.6.2. <i>Fragmentacija iona s parnim brojem elektrona (EE^{+}).....</i>	<i>33</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	36
3.1. Kemikalije i materijali.....	36
3.2. Instrumentacija	36
3.3. Priprema ishodnih i radnih otopina	38
3.4. Priprema mjernih otopina.....	38
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. Analiza otopine cinarizina spektrometrijom masa	41
4.1.1. <i>MS/MS analiza odabranih iona cinarizina</i>	<i>43</i>
4.2. Analiza otopine β-ciklodekstrina spektrometrijom masa	48

4.2.1. MS/MS analiza odabranih iona β -ciklodekstrina.....	52
4.3. Analiza otopine hidroksipropil-β-ciklodekstrina spektrometrijom masa.....	58
4.3.1. MS/MS analiza odabranih iona hidroksipropil- β -ciklodekstrina	64
4.4. Analiza otopine cinarizina i β-ciklodekstrina spektrometrijom masa	69
4.4.1. MS/MS analiza odabranih iona kompleksa cinarizina i β -ciklodekstrina	72
4.5. Analiza otopine inkluzijskog kompleksa cinarizina i hidroksipropil-β-ciklodekstrina spektrometrijom masa	80
4.5.1. MS/MS analiza odabranih iona kompleksa cinarizina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina	84
§ 5. ZAKLJUČAK	91
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	93
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	95
§ 8. DODATAK	XIV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA INKLUZIJSKIH KOMPLEKSA CINARIZINA I ODABRANIH CIKLODEKSTRINA SPEKTROMETRIJOM MASA VISOKOG RAZLUČIVANJA

Suzana Inkret

Cinarizin je piperazinski derivat koji djeluje kao antihistaminik. Uglavnom se koristi za liječenje posljedica Meniereove bolesti (endolimfatični hidrops) i nekih drugih poremećaja vestibularnog sustava srednjeg uha, ali i za prevenciju i liječenje kinetoza. Budući da je slabo topljiv u vodi, cinarizin se prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari svrstava u lijekove skupine II. Već je ranije utvrđeno da se topljivost i bioraspoloživost cinarizina može poboljšati kompleksiranjem s ciklodekstrinima, no inkluzijski kompleksi cinarizina s ciklodekstrinima korištenjem spektrometrije masa do sada nisu proučavani. U sklopu ovog diplomskog rada spektrometrijom masa je detaljno proučeno kompleksiranje cinarizina prirodnim β -ciklodekstrinom kao i njegovim hidroksipropiliranim sintetskim derivatom, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Stabilnost izoliranih odabranih iona kompleksa cinarizina i ciklodekstrina u plinskoj fazi procijenjena je na temelju rezultata eksperimenata tandemne spektrometrije masa koji su provedeni tehnikom kolizijom izazvane disocijacije. Predložene su odgovarajuće sheme fragmentiranja te su konstruirani grafovi ovisnosti relativne zastupljenosti iona kompleksa o primijenjenom kolizijskom potencijalu. (96 + XXXIII stranica, 85 slika, 29 tablica, 23 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

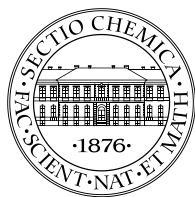
Ključne riječi: cinarizin, ciklodekstrini, inkluzijski kompleksi, spektrometrija masa

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

Ocjenitelji:

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

Datum diplomskog ispita: 16. rujna 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF INCLUSION COMPLEXES OF CINNARIZINE WITH SELECTED CYCLODEXTRINS BY HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Suzana Inkret

Cinnarizine is a piperazine derivative with antihistaminic properties. It is widely used for the treatment of Meniere's disease (endolymphatic hydrops) and a variety of other vestibular disorders but for prevention and treatment of kinetosis as well. Due to its poor aqueous solubility, cinnarizine is categorized as a class II compound according to the Biopharmaceutical Classification System. Earlier studies have shown that its solubility and bioavailability can be improved by complexation with cyclodextrins but inclusion complexes of cinnarizine with cyclodextrins have not yet been characterized by mass spectrometry. The complexation of cinnarizine by natural β -cyclodextrin and its hydroxypropylated derivative, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin was extensively studied by mass spectrometry in this thesis. The stability of selected complex ions in the gas phase was estimated by means of tandem mass spectrometry analysis which was performed by collision-induced dissociation technique. Corresponding fragmentation schemes were suggested and collision-energy breakdown curves were constructed as well.

(96 + XXXIII pages, 85 figures, 29 tables, 23 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: cinnarizine, cyclodextrins, inclusion complexes, mass spectrometry

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor

Assistant mentor: David Klarić, mag. chem.

Reviewers:

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

Date of exam: 16 September 2021

Suzana Inkret

Diplomski rad

§ 1. UVOD

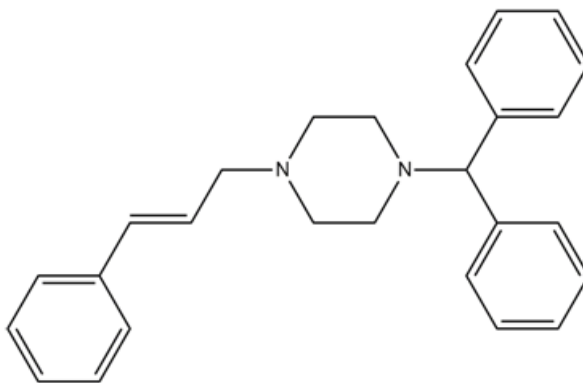
Lijekovi su uglavnom male, hidrofobne molekule, često specifično sintetizirane kako bi djelovale na svoje ciljno mjesto, no problem može stvarati njihova slaba topljivost koja je posljedica hidrofobnosti. Slaba topljivost rezultira primjenom velikih doza lijeka što često uzrokuje nespecifične interakcije molekula lijeka s drugim molekulama što može dovesti do nuspojava. Današnja istraživanja usmjerena su prema povećanju topljivosti slabo topljivih lijekova u svrhu povećanja njihove bioraspoloživosti te smanjenja nuspojava uzrokovanih velikim količinama lijeka unesenim u organizam. U posljednje se vrijeme u sklopu strategija povećanja topljivosti takvih lijekova primjenjuju ciklodekstrini kao bitne pomoćne tvari jer hidrofobne molekule s njima mogu tvoriti inkluzijske komplekse umetanjem dijela ili cijele molekule lijeka u šupljinu koju svojom karakterističnom strukturom oblikuje ciklodekstrin.¹ Uklapanjem hidrofobne molekule unutar šupljine ciklodekstrina, poboljšavaju su njena fizikalna i kemijska svojstva poput intrinzične topljivosti što je zasluga hidrofilnog karaktera vanjskog dijela molekule ciklodekstrina.²

U ovom radu proučavane su interakcije cinarizina s prirodnim β -ciklodekstrinom (β -CD) te s jednim njegovim derivatom, odnosno 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP β CD) korištenjem spektrometrije masa visokog razlučivanja. Kako supstitucija hidroksilnih skupina ciklodekstrina dovodi do povećanja topljivosti samog β -CD jer se ometa nastajanje intramolekulske mreže vodikovih veza (koja uzrokuje smanjenu topljivost)² u svrhu opsežnijeg proučavanja interakcija između cinarizina i CD odabran je i navedeni derivat. S obzirom da su interakcije lijeka i ciklodekstrina nekovalentne prirode, potrebno je prilikom karakterizacije inkluzijskih kompleksa spektrometrijom masa koristiti blage tehnike ionizacije kako bi se inkluzijski kompleks koji nastaje u otopini održao i u plinskoj fazi. U tu svrhu korištena je ionizacija elektroraspršenjem koja se provodi pri uvjetima atmosferskog tlaka. Kao analizador mase korišten je hibridni sustav analizatora masa, odnosno kvadrupolni analizador masa s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Cinarizin

Cinarizin (1-trans-cinamil-4-difenilmetilpiperazin) je hidrofobna molekula koja se široko koristi zbog antialergijskog djelovanja, inhibiranja djelovanja serotonina i dopamina te blokiranja aktivnosti kalcijevih kanala. Uglavnom se primjenjuje se za tretiranje mučnina i vrtoglavica, odnosno za tretiranje različitih poremećaja vestibularnog sustava srednjeg uha. Često se koristi za liječenje posljedica Menierove bolesti (endolimfatični hidrops) te prevencije i liječenja kinezoza.^{3,4} S obzirom na hidrofobnu strukturu (slika 1), cinarizin je slabo topljiv u vodi što posljedično vodi do njegove smanjene bioraspoloživosti. S druge strane, vrlo lako prolazi kroz biološke membrane radi svoje lipofilnosti na koju ukazuje logaritamska vrijednost koeficijenta razdjeljivanja oktanol/voda koja iznosi $\log K_{o/w} = 5,8$. Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari (engl. *biopharmaceutical classification system*, BCS) svrstava se u klasu II, koja uključuje slabo topljive, ali dobro permeabilne lijekove.



Slika 1. Strukturna formula 1-trans-cinamil-4-difenilmetilpiperazina

Cinarizin je slabo topljiv u 96 %-tnom etanolu, dok je jako dobro topljiv u diklormetanu. Osim slabe topljivosti u vodi, cinarizin je fotodegradabilan pa ga je potrebno čuvati od utjecaja svjetla. Budući da je cinarizin lipofilan, lako prelazi krvno-moždanu barijeru te potiče protok krvi u mozgu zbog čega je jako dobar kandidat za liječenje moždanih bolesti.³ Topljivosti cinarizina je pH ovisna (tablica 1), a zbog blago bazične prirode cinarizin se ne

otapa pri višim pH što rezultira nepotpunom apsorpcijom lijeka unutar gastrointestinalnog sustava. Zbog pH ovisne topljivosti, na bioraspoloživost cinarizina utječe i razina kiselosti želučanog soka. Ukoliko želučani sok osobe koja se tretira cinarizinom ima nisku razinu kiselosti (pH oko 6) primijenjena doza cinarizina neće biti u potpunosti otopljena. S druge strane, ako je razina kiselosti želučanog soka visoka (pH oko 1,2), primijenjena doza će se bolje otapati što će dovesti do potpune apsorpcije, a samim time i do izostanka mogućih nuspojava koje su uzrokovane nepotpunim otapanjem.⁴

Tablica 1. Topljivost cinarizina u ovisnosti o pH-vrijednosti vodene otopine⁴

pH-vrijednost	Topljivost (37 °C) / mg mL ⁻¹
2,0	0,29
5,0	0,017
6,5	0,002

Zbog navedenih svojstava cinarizina potrebno je dizajnirati nove strategije prilikom osmišljavanja novih farmaceutskih formulacija cinarizina koje će nadvladati probleme niske topljivosti pri uvjetima viših pH te ograničene bioraspoloživosti. U tom su se pogledu ciklodekstrini istaknuli kao pogodne pomoćne tvari koje bi se mogli iskoristiti unutar novih farmaceutskih formulacija u svrhu povećanja topljivosti cinarizina. Ustanovljeno je da se topljivost cinarizina u inkluzijskom kompleksu s β -ciklodekstrinom povećava 30 puta u odnosu na intrinzičnu topljivost samog lijeka.⁴

2.1.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari

Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari je sustav prema kojem se djelatne tvari dijele u klase s obzirom na njihovu topljivost i intestinalnu permeabilnost. Prvi put je predložen 1995. godine u sklopu istraživanja Amidona i suradnika te je kasnije prihvaćen od strane nekoliko regulatornih tijela poput Europske agencije za lijekove (engl. *The European Medicines Agency*, EMA), Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *The United States Food and Drug Administration*, USFDA) i Svjetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization*, WHO). Djelatne tvari se prema BCS sustavu dijele u četiri klase. U prvu se svrstavaju dobro topljive i dobro permeabilne, u drugu slabo topljive i dobro permeabilne, u treću dobro topljive i slabo permeabilne, a u četvrtu klasu slabo topljive i slabo permeabilne

djelatne tvari. Dobro permeabilnim lijekovima se smatraju oni kod kojih 85 % ukupno primijenjene doze biva apsorbirano (ili u usporedbi s referentnom intravenoznom dozom). Dobro topljivim se smatraju oni lijekovi kod kojih se najveća primjenjiva doza lijeka može otopiti u ≤ 250 mL vodenog medija u rasponu pH-vrijednosti od 1,0 do 6,8 pri temperaturi od 37 ± 1 °C. Ukoliko se ≥ 85 % primijenjene doze nekog lijeka otapa unutar 30 minuta, tada se taj može reći da se taj lijek brzo oslobađa.⁵

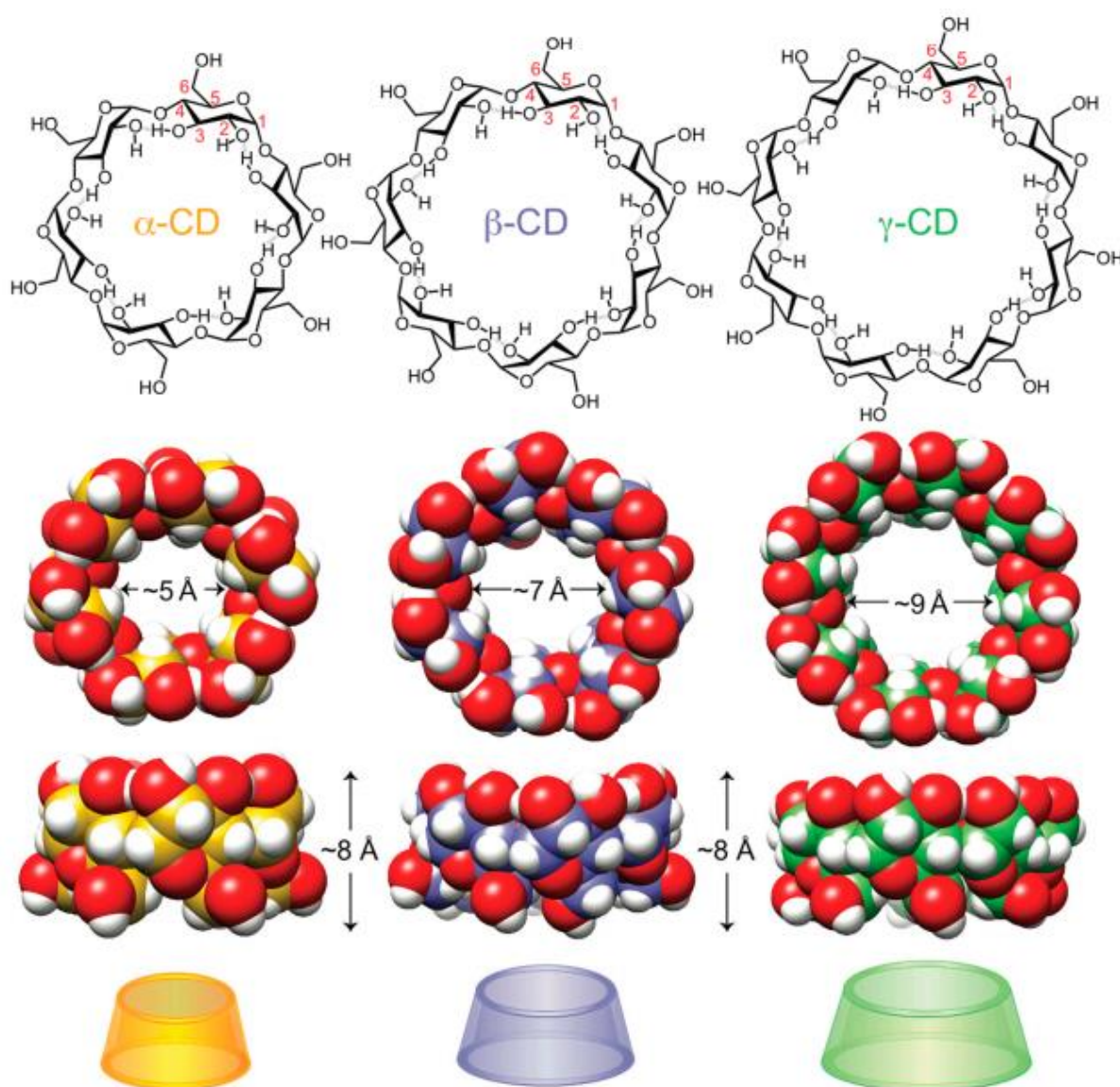
Podjela na četiri odvojene klase zapravo predstavlja četiri različita očekivanja *in-vitro/in-vivo* korelacija koje se temelje na brzini oslobađanja neke djelatne tvari. Pomoću ovog matematičkog modela moguće je predvidjeti *in-vivo* farmakokinetičke učinke nekog lijeka na temelju *in-vitro* određivanja permeabilnosti i topljivosti lijeka. Na temelju ovih korelacija lijekove prve klase (prema BCS-u) s trenutnim oslobađanjem se izuzima od obveze provođenja *in-vivo* studija bioekvivalentnosti (engl. *biowaiver*) budući da zadovoljavaju kriterije dobre topljivosti, dobre permeabilnosti i brzog oslobađanja. Uvođenje ovog načina klasificiranja djelatnih tvari dovelo je do značajnih unapređenja u farmaceutskoj industriji, a posebice u slučaju istraživanja *in-vivo* farmakokinetičkih učinaka te načina dostave na ciljna mjesta za djelatne tvari klase II.^{5,6}

Budući da oko 40 % komercijalno dostupnih lijekova te čak 90 % novih lijekova koji su u fazi razvoja pokazuju lipofilne karakteristike i slabu topljivost u vodenim otopinama, nove strategije za povećanje njihove topljivosti se u posljednje vrijeme sve više istražuju i osmišljavaju. Neke od glavnih strategija za povećanje topljivosti lijekova uključuju pH modifikacije te prevođenje lijekova u soli, upotrebu kootapala i površinski aktivnih tvari, prevođenje u amorfne forme te tvorbu čvrstih disperzija i kokristala, uklapanje u polimerne micelle, inkluziju u ciklodekstrine te neke druge strategije.⁷

2.2. Ciklodekstrini

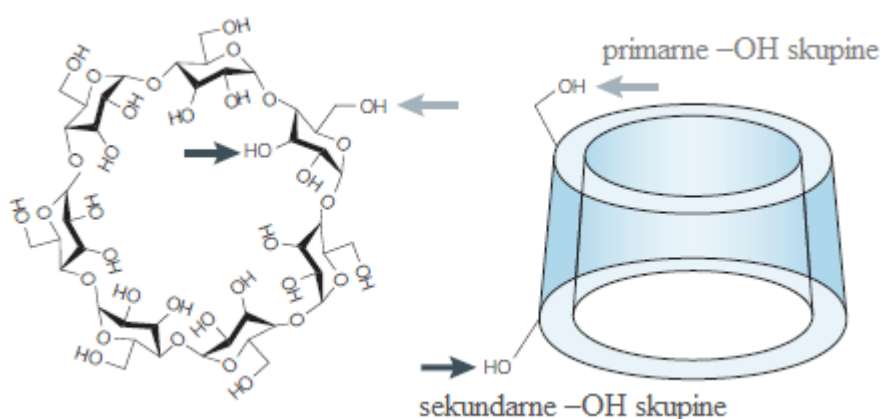
Ciklodekstrini (CD) čine skupinu cikličkih molekula građenih od različitog broja glukopiranoznih jedinica povezanih α -1,4 glikozidnom vezom. Među prirodne ciklodekstrine ubrajamo: α -CD (6 glukopiranoznih jedinica), β -CD (7 glukopiranoznih jedinica) i γ -CD (8 glukopiranoznih jedinica). Struktura prirodnih ciklodekstrina je prikazana na slici 2. S obzirom da su glukopiranozni prstenovi šesteročlani prstenovi, oni se nalaze u konformaciji stolca, pa ukupna konformacija ciklodekstrina nalikuje stošcu s krnjim vrhom. Glukopiranozne jedinice omeđuju središnju ciklodekstrinsku šupljinu koja je različitih

dimenzija ovisno o broju glukopiranoznih jedinica, pa tako α -CD ima najmanju šupljinu od tri navedena, a γ -CD ima najveću. Ciklodekstrini čiju strukturu čini veći broj glukopiranoznih jedinica (9 ili više glukopiranoznih jedinica) su također izolirani i okarakterizirani različitim tehnikama, no njihova primjena je ograničena zbog problema s niskim iskorištenjem i pročišćavanjem prilikom sinteze, a u nekim slučajevima dolazi do urušavanja tipične konformacije pa tako i središnja šupljina takvih CD ima manje dimenzije u odnosu na prirodne CD što posljedično utječe na sposobnost kompleksiranja.^{8,9}



Slika 2. Strukture i dimenzije prirodnih ciklodekstrina (α -, β - i γ -ciklodekstrin)¹⁰

Prirodni ciklodekstrini skloni su hidrolizi pri niskim pH-vrijednostima prilikom koje dolazi do otvaranja prstena i nastanka različitih linearnih oligosaharida. Stabilni su u bazičnim uvjetima, obzirom da imaju vrijednost pK_a u rasponu od 12,1 do 13,5 (ovisno o položaju hidroksilnih skupina). Raspored funkcionalnih skupina u strukturi ciklodekstrina je takav da je vanjska strana cjelokupne strukture hidrofилna zbog čega je molekula topljiva u vodi, a središnja šupljina je hidrofobnog karaktera što pogoduje inkluziji hidrofobnih molekula gosta.¹¹



Slika 3. Raspored primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina u strukturi ciklodekstrina.¹²

Kako je struktura krnjeg stošca rigidna i nije moguća rotacija oko α -(1,4) glikozidne veze, primarne i sekundarne hidroksilne skupine ciklodekstrina se nalaze na vanjskoj strani strukture na suprotnim obodima stošca. Takav raspored hidroksilnih skupina pogoduje dobroj topljivosti u vodenim otopinama, no prirodni ciklodekstrini imaju ograničenu topljivost zbog tvorenja intramolekulske mreže vodikovih veza koja cjelokupnu strukturu molekule čini stabilnijom. Sekundarne hidroksilne skupine, točnije hidroksilne skupine na susjednim ugljikovim atomima svake glukopiranozne podjedinice (C2-OH i C3-OH), na širem obodu krnjeg stošca međusobno tvore vodikove veze. U slučaju β -CD nastaje tzv. potpuni pojas intramolekulskih vodikovih veza, čime se ometa nastajanje vodikovih veza s okolnim molekulama vode, a što za posljedicu ima smanjenu topljivost u vodenim otopinama. Molekularnim modeliranjem je utvrđeno kako su molekule vode pravilno i gusto raspoređene oko otopljene molekule β -CD na temelju čega je zaključeno da te molekule vode imaju nepovoljnu entalpiju i malu entropiju, a rezultat toga je smanjena topljivost β -CD u odnosu na ostala dva prirodna CD. S druge strane, sekundarne hidroksilne skupine α -CD tvore nepotpuni pojas intramolekulskih vodikovih veza, zbog čega postoje dostupne hidroksilne skupine za

nastajanje vodikovih veza s okolnim molekulama vode. Posljedično je β -CD slabije topljiv od α -CD unatoč tome što α -CD posjeduje manji broj hidroksilnih skupina u odnosu na β -CD. Nadalje, γ -CD nema koplanarnu strukturu poput β -CD što ga također čini bolje topljivim od β -CD.^{8,11}

Derivatizacijom prirodnih ciklodekstrina pozitivno se utječe na njihovu intrinzičnu topljivost, a samim time se postiže povećan solubilizacijski potencijal te kompleksacijski kapacitet. Primarne i sekundarne hidroksilne skupine prirodnih ciklodekstrina moguće je supstituirati raznim funkcionalnim skupinama poput metilnih, hidroksipropilnih, sulfoalkil eterskih itd. Supstitucijom hidroksilnih skupina, ciklodekstrini se prevode iz pravilne kristalne forme u amorfnu formu, a rezultirajući produkt je smjesa izomera ciklodekstrina s različitim stupnjem supstitucije pri čemu stupanj supstitucije označava prosječan broj supstituenata po jednoj molekuli ciklodekstrina. U takvoj smjesi sekundarne hidroksilne skupine nisu orijentirane povoljno ili nisu dostupne za tvorenje intramolekulskih vodikovih veza, zbog čega su slobodne za vezanje okolnih molekula vode putem intermolekulskih vodikovih veza. Nasumičnom supstitucijom prirodnih ciklodekstrina njihova se topljivost u vodi povećava oko 100 puta, no ovisno o skupini kojom se CD derivatizira, može doći i do mnogo većeg poboljšanja u intrinzičnoj topljivosti. Osim povećanja topljivosti, nasumična supstitucija utječe i na dimenzije središnje šupljine CD. Hidroksipropilacija hidroksilne skupine na položaju C2-O dovodi do raširenije konfiguracije CD, dok supstitucija na C6-O položaju do smanjenja količine vode unutar središnje šupljine. Osim toga, primijećeno je da metilirani i hidroksialkilirani derivati CD smanjuju površinsku napetost vodenog medija proporcionalno stupnju supstitucije, dok polarne ionske funkcionalne skupine (npr. u slučaju alkilsulfoniranih derivata) ne pokazuju utjecaj na površinsku napetost vodenog medija.^{1,8,11}

Tablica 2. Usporedba svojstava β -ciklodekstrina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina^{8,11}

Svojstvo	β -ciklodesktrin	hidroksipropil- β -ciklodekstrin
broj glukopiranoznih jedinica	7	7
stupanj supstitucije	0	2,8 – 10,5
topljivost u vodi / mg mL ⁻¹ (25 °C)	1,85	>1200
promjer centralne šupljine / nm	0,60 – 0,65	0,60
površinska napetost / mN m ⁻¹	71	54,8 – 57,5

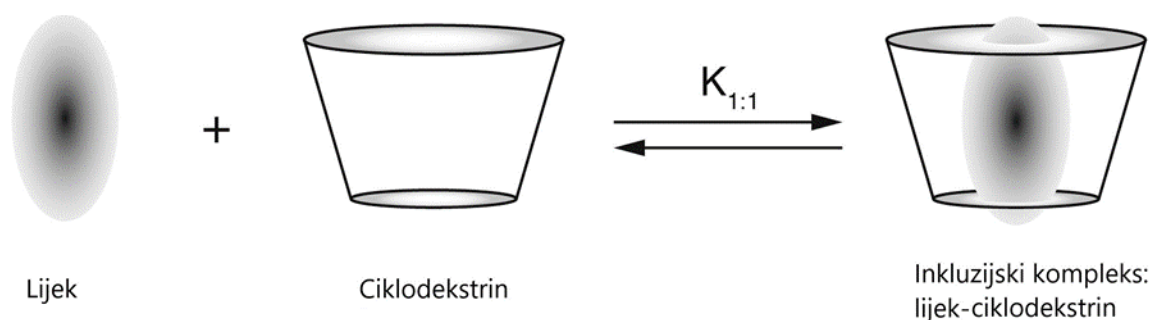
2.2.1. Toksikologija i farmakokinetika ciklodekstrina

Budući da se ciklodekstrini proučavaju u svrhu kompleksacije i poboljšanja svojstava slabo topljivih lijekova, važno je navesti njihove toksikološke učinke na čovjekov organizam. Ciklodekstrini su otporni na djelovanje β -amilaza koje hidroliziraju škrob, no primijećeno je da ih α -amilaze (prisutne u slini i u soku gušterače) sporo razgrađuju. Utvrđeno je da nakon oralne administracije ciklodekstrina, spomenute amilaze najbrže razgrađuju γ -CD, koji se u potpunosti razgradi u gastrointestinalnom traktu, dok se α -CD i β -CD razgrade u debelom crijevu pod utjecajem prisutnih bakterija. Općenito se slobodni CD mnogo brže razgrađuju u odnosu na CD koji tvore inkluzijske komplekse.¹⁶ Nakon parenteralne administracije, glavna primijenjena doza ciklodekstrina (> 90 %) izlučuje se u intaktnom obliku putem urina, dok ostatak prolazi metabolizam jetre i žuči te se izlučuje na taj način. Vrijeme potrebno da se 90 % primijenjene količine izluči iz organizma iznosi oko 6 sati, dok se 99,9 % ukupne doze izluči unutar 24 sata, što govori da ne dolazi do bioakumulacije CD u ljudskom organizmu, čak ni u slučaju primjene velikih doza.⁹

Ciklodekstrini su hidrofilne molekule niskih vrijednosti koeficijenta razdjeljivanja oktanol/voda ($K_{o/w}$) koje posjeduju velik broj donora i akceptora vodikovih veza, a to ukazuje kako nemaju sklonost permeacije kroz biološke membrane pasivnom difuzijom ili putem membranskih transportera. Iz navedenog se zaključuje kako je bioraspoloživost CD vrlo niska, a sami CD su netoksični nakon oralne administracije. Danas su prirodni ciklodekstrini i neki njihovi hidrofilni derivati odobreni kao pomoćne tvari u farmaceutskim proizvodima od strane USFDA i EMA.⁹ Osim toga, prirodni se CD koriste kao aditivi u hrani, a USFDA ih je uvrstila na popis tvari kojima je dodijeljen GRAS status (engl. *generally recognized as safe*).^{9,13}

2.3. Inkluzijski kompleksi

Prirodni ciklodekstrini i njihovi derivati mogu tvoriti inkluzijske komplekse sa širokim rasponom tekućih, krutih i plinovitih spojeva. Nastajanje kompleksa ovisi o veličini molekule gosta te o veličini šupljine koju tvori ciklodekstrin, odnosno o kompatibilnosti njihovih dimenzija. Do nastajanja kompleksa dolazi jer lipofilna šupljina ciklodekstrina tvori mikrookolinu u koju se nepolarna molekula ili dio molekule pogodne veličine može uklopiti (slika 4). Prilikom inkluzije molekule gosta u šupljinu ciklodekstrina ne dolazi do cijepanja postojećih ili nastajanja novih kovalentnih veza jer su interakcije molekule gosta i CD nekovalentne prirode.^{13,14}



Slika 4. Tvorba inkluzijskog kompleksa lijeka i ciklodekstrina u omjeru 1:1

Na tvorbu inkluzijskih kompleksa utječe nekoliko faktora od kojih je jedan sterički, odnosno kompatibilnost dimenzija molekule gosta s dimenzijama središnje šupljine ciklodekstrina. Drugi faktor koji utječe na tvorbu kompleksa čine termodinamičke interakcije između različitih komponenti sustava (molekule ciklodekstrina, molekula gosta, molekule otapala), odnosno važno je da ukupan proces nastajanja kompleksa ima povoljan energijski učinak koji privlači molekulu gosta u šupljinu ciklodekstrina. Nekoliko je bitnih procesa koji zajedno pomiču ravnotežu k nastanku inkluzijskih kompleksa. Prilikom nastajanja inkluzijskih kompleksa dolazi do istiskivanja polarnih molekula vode iz nepolarne središnje šupljine CD te se takve nepovoljne interakcije zamjenjuju povoljnim hidrofobnim interakcijama između molekule gosta i šupljine ciklodekstrina. Osim toga, uklapanje molekule gosta u šupljinu CD rezultira smanjivanjem odbojnih interakcija između hidrofobnih molekula gosta i vodene okoline.^{8,14} Prilikom nastanka kompleksa povećava se broj vodikovih veza u vodenoj okolini kao rezultat već spomenutog istiskivanja molekula vode iz središnje šupljine CD. Navedene molekule vode, prije izlaska iz šupljine CD, ne grade vodikove veze, no njihov potencijal za formiranje istih je velik, što ih čini energijski (entalpijski) bogatima. Na taj način se istiskivanjem molekula vode iz šupljine CD energija sustava smanjuje. Sve navedene interakcije utječu na nastajanje inkluzijskih kompleksa, no glavna pokretačka sila koja vodi cjelokupan proces je zamjena nepovoljnih interakcija vode i hidrofobne šupljine CD s povoljnim interakcijama hidrofobne molekule gosta i hidrofobne šupljine CD.¹⁴

Obzirom da su interakcije između molekule gosta i ciklodekstrina nevezne, inkluzijski kompleks nije konačna i trajna vrsta koja nastaje, već postoji dinamička ravnoteža između kompleksa i slobodnih komponenti.^{8,14} Prilikom inkluzije molekule gosta unutar šupljine CD, brzo dolazi do uspostave početne ravnoteže. Molekula gosta zatim prolazi kroz ponekad

dugotrajnije konformacijske promjene kako bi se maksimalno iskoristile slabe van der Waalsove interakcije zbog čega se konačna ravnoteža ne uspostavlja odmah. Disocijacija je, kao i uspostava inicijalne ravnoteže, brz proces do kojeg dolazi prilikom velikog razrjeđenja otopine (povećavanje broja molekula vode u okolini) u kojoj se nalazi kompleks.¹⁴

Kompleksiranje lijekova ciklodekstrinima provodi se za poboljšanje mnogih svojstava lijekova kao što su topljivost, loš miris, neprijatan okus, toksičnost, osjetljivost na svjetlo i hlapljivost itd.^{8,14} Poznato je da se nastajanjem inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima može povećati brzinu otapanja lijekova i sama bioraspoloživost istih, što je u današnje vrijeme važna stavka prilikom dizajna i istraživanja farmaceutskih formulacija slabo topljivih lijekova.^{1,8}

Istraživanja inkluzijskih kompleksa pokazala su kako β -CD i njegovi derivati imaju najpogodnije dimenzije središnje šupljine za tvorbu inkluzijskih kompleksa.¹¹ Ciklodekstrini od najvećeg interesa za farmaceutsku industriju jesu hidroksipropilirani derivati β - i γ -CD, nasumično metilirani derivat β -CD, natrijeva sol sulfobutileterskog derivata β -CD te tzv. razgranati ciklodekstrini poput maltozil β -CD.¹³ U sklopu ovog diplomskog rada za detaljno proučavanje kompleksiranja cinarizina odabran je upravo β -CD zajedno sa svojim hidroksipropiliranim derivatom.

2.3.1. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju i otopini

Kao što je već i ranije rečeno inkluzijski kompleksi lijekova i ciklodekstrina postali su važan predmet istraživanja prilikom osmišljavanja strategija za unapređenje nekih nepoželjnih svojstava lijekova. Kako bi se u potpunosti razumio potencijal takvih kompleksa važno ih je pravilno okarakterizirati te istražiti interakcije između molekule lijeka i ciklodekstrina. Za potpunu karakterizaciju inkluzijskih kompleksa potrebno ih je analizirati korištenjem većeg broja analitičkih tehnika čiji objedinjeni rezultati mogu dati bolji uvid u svojstva i interakcije unutar takvih kompleksa. Obzirom da je danas poznat cijeli niz sintetskih derivata prirodnih ciklodekstrina, prilikom biranja najprikladnijeg ciklodekstrina za kompleksaciju nije moguće isprva točno odrediti koji će najbolje odgovarati molekuli gosta kao domaćin. Iz tog je razloga prilikom analize kompleksa prvi korak utvrđivanje nastajanje kompleksa. U tu svrhu može se koristiti mnogo različitih tehnika kao što su spektroskopske, elektroanalitičke ili separacijske tehnike. Analiza svakom od tehnika ovisi direktno o prirodi uzorka, odnosno o proučavanoj molekuli lijeka i ciklodekstrina tako da ne postoji univerzalna tehnika za izučavanje ovakvih

sustava, no svakako valja napomenuti kako rezultati dobiveni tehnikama poput spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) mogu poslužiti kao definitivan dokaz inkluzije lijeka u ciklodekstrinsku šupljinu, dok rezultati dobiveni nekim drugim tehnikama mogu poslužiti kao dodatna nadopuna takvim analizama.⁸

Različiti efekti povezani s nastankom kompleksa ovise o njegovoj stabilnosti tako da je važna stavka određivanje konstante stabilnosti inkluzijskih kompleksa. Čitav niz spektroskopskih metoda može poslužiti u tu svrhu, a neke od njih su UV-Vis spektroskopija, cirkularni dikroizam (engl. *circular dichroism spectroscopy*), fluorescentna spektroskopija te spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije koja je prilikom analize inkluzijskih kompleksa najkorisnija i najpotpunija tehnika. Ta tehnika omogućuje određivanje konstanti stabilnosti, ali osim toga razjašnjava strukturu inkluzijskog kompleksa te daje informacije o orijentaciji molekule gosta, dok ostale spektroskopske tehnike strukturne informacije daju samo indirektno. Osim spektroskopskih tehnika, za analizu inkluzijskih kompleksa u otopini koriste se i separacijske tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) i kapilarne elektroforeze (engl. *capillary electrophoresis*, CE). Analize inkluzijskih kompleksa separacijskim tehnikama mogu dati reproducibilne vrijednosti konstanti stabilnosti, no kao ni već spomenute spektroskopske tehnike ne daju direktne strukturne informacije, a uz to zahtijevaju velike količine i ponekad dugotrajnu pripremu uzoraka, ali i strogu kontrolu eksperimentalnih uvjeta. Uz prethodno nabrojane tehnike relativno često se prilikom karakterizacije inkluzijskih kompleksa u otopini koristi čitav niz elektroanalitičkih tehnika, a u posljednje vrijeme i izotermalna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC).⁸

Inkluzijski kompleksi osim u otopini mogu nastati i u čvrstoj fazi, no potvrda nastajanja takvog kompleksa u otopini ne znači nužno i njegovo postojanje u čvrstoj fazi. Priprema inkluzijskih kompleksa u čvrstoj fazi znatno se razlikuje u odnosu na pripremu u otopini te ne postoji idealan način pripreme čvrstih kompleksa, već je potrebno tehniku prilagoditi pojedinom kompleksu. Način pripreme čvrstog inkluzijskog kompleksa u velikoj mjeri utječe na njegova svojstva zbog čega je izuzetno važno dobiveni produkt pravilno okarakterizirati. Metode pripreme inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju ugrubo možemo podijeliti na metode u čvrstom stanju, metode u polučvrstom stanju te na metode u otopini, a zaključak o idealnoj metodi pripreme se može donijeti tek nakon prikladne karakterizacije za to predviđenim analitičkim tehnikama. Nadalje, analitičke tehnike za

karakterizaciju inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju možemo podijeliti na: termoanalitičke tehnike, spektroskopske tehnike, tehnike temeljene na difrakciji rendgenskog zračenja te pretražnu elektronsku mikroskopiju (engl. *scanning electron microscopy*, SEM). Za potpunu karakterizaciju inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju iste je nužno analizirati kombiniranjem nekoliko analitičkih tehnika, a rezultate objediniti i zajednički interpretirati. Osnovne informacije o inkluzijskom kompleksu u čvrstoj fazi daju termoanalitičke tehnike, a to se posebice odnosi na razlikovnu pretražnu kalorimetriju (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) koja može potvrditi uklapanje molekule lijeka unutar šupljine ciklodekstrina te se često svrstava u fundamentalne tehnike za izučavanje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina. Za potvrdu te lakšu interpretaciju rezultata dobivenih ovom tehnikom često se s njom u kombinaciji koriste druge dvije termoanalitičke tehnike, termogravimetrijska analiza (engl. *thermogravimetric analysis*, TGA) i temperaturno ovisna mikroskopija (engl. *hot-stage microscopy*, HSM).¹⁵

Tehnike difrakcije rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (engl. *powder X-Ray diffraction*, PXRD) te na jediničnom kristalu (engl. *single crystal X-ray diffraction*, SCXRD) se uz DSC također smatraju fundamentalnim tehnikama za izučavanje inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju. Usporedbom difraktograma pojedinačnih komponenti, njihovih fizičkih smjesa te uzorka pretpostavljenog inkluzijskog kompleksa, moguće je potvrditi nastajanje inkluzijskog kompleksa u čvrstoj fazi. Spektroskopske tehnike poput infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR) kao i tehnike prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) su često korištene tehnike za upotpunjavanje podataka dobivenih termoanalitičkim tehnikama te tehnikama difrakcije rendgenskog zračenja. Pomoću navedenih tehnika moguće je identificirati karakteristične vibracijske vrpce kod kojih je došlo do određenih promjena uslijed interakcije pojedinih dijelova molekula gosta i domaćina u inkluzijskom kompleksu, no samostalno, ove spektroskopske metode ne mogu jednoznačno dokazati inkluziju molekule lijeka u ciklodekstrinsku šupljinu u čvrstoj fazi.¹⁵

2.3.2. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina spektrometrijom masa

Inkluzijski kompleksi se u teoriji mogu okarakterizirati korištenjem bilo koje tehnike kojom je moguće pratiti promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima koje prate proces inkluzije molekule lijeka u ciklodekstrinsku šupljinu. Promatranjem promjena u svojstvima kao što su

promjene u topljivosti, pK_a vrijednostima, fluorescentnoj emisiji, reaktivnosti itd. moguće je odrediti konstante stabilnosti nastalih kompleksa, no mali broj tehnika može dati strukturne informacije o nastalom nekovalentnom kompleksu. Tehnike koje mogu ponuditi takve informacije, kao što je ranije navedeno, su NMR spektroskopija, difrakcija rendgenskog zračenja, FTIR spektroskopija, no te tehnike ne daju podatke o molekularnoj masi i stehiometriji vezanja kompleksa. Upravo se zbog tog razloga spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) uz korištenje blagih načina ionizacije ističe kao prikladna tehnika za proučavanje inkluzijskih kompleksa. MS ima nekoliko prednosti u usporedbi s ostalim već nabrojanim analitičkim tehnikama, kao što je primjerice mnogo bolja osjetljivost i brzina analize te mogućnost detekcije višemolekulskih kompleksa, odnosno kompleksa građenih od tri ili više molekula. Zbog toga se MS može koristiti za analizu slabo topljivih kompleksa viših redova.¹⁶

Razvojem blagih tehnika ionizacije MS je postala vrlo važna tehnika za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa. Blage tehnike ionizacije poput ionizacije elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) i matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI) omogućuju prijenos iona inkluzijskog kompleksa iz čvrste ili tekuće u plinsku fazu bez disocijacije kompleksa te se iz takvih spektara masa može odrediti stehiometrija kompleksa. Osim toga, tandemni spektri masa mogu dati informaciju o rasporedu i položaju nekovalentno vezanih komponenti unutar kompleksa te je primjenom različitih vrijednosti kolizijskih energija moguće odrediti energiju vezanja inkluzijskog kompleksa.¹⁶

Prilikom korištenja spektrometrije masa za karakterizaciju važno je pravilno interpretirati rezultate obzirom da MS može dati lažno pozitivan ili lažno negativan rezultat o nastanku kompleksa. Prilikom prijenosa iona iz tekuće u plinsku fazu može doći do nastajanja ili disocijacije inkluzijskog kompleksa, ali isto tako može doći do nastajanja nespecifičnih adukta. Polarne interakcije poput elektrostatskih interakcija i vodikovih veza su općenito slabije u tekućoj u odnosu na plinsku fazu pa je tako neke klustere iona, koji inače nisu primijećeni u otopini, moguće detektirati u plinskoj fazi. Također, budući da su nepolarne interakcije dosta slabije u plinskoj fazi moguće je da postojanje nekih kompleksa neće biti detektirano u plinskoj fazi, iako su oni ranije potvrđeni u otopini nekim drugim tehnikama. Nespecifični adukti različitih aminokiselina s alifatskim bočnim ograncima i ciklodekstrina nastali uslijed jačanja dipol-dipol interakcija i vodikovih veza zbog njihove elektrostatske

prirode u plinskoj fazi su već ranije opisani. Potvrda o nastanku kompleksa može se dobiti strategijom usporedbe MS spektra molekule gosta i CD s MS spektrom molekule gosta i odgovarajućeg linearnog oligosaharida (kao što je primjerice maltoheksosa). Ukoliko je u takvim spektrima masa relativna zastupljenost iona kompleksa molekule gosta s CD jednaka relativnoj zastupljenosti kompleksnog iona molekule gosta s linearnim oligosaharidom to je dokaz nespecifičnog kompleksiranja. S druge strane, ukoliko je relativna zastupljenost kompleksnog iona CD s molekulom gosta veća u odnosu na relativnu zastupljenost kompleksnog iona molekule gosta s linearnim oligosaharidom, to je dokaz da zaista dolazi do inkluzije molekule gosta u ciklodekstrinsku šupljinu. Još jedan način razlikovanja inkluzijskih kompleksa od nespecifičnih adukta jest putem konstruiranja grafova ovisnosti relativne zastupljenosti iona kompleksa o primijenjenoj kolizijskog energiji (engl. *breakdown curves*) pomoću kojih je moguće usporediti energije nekovalentnih vezanja.¹⁶

2.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika kojom se kvalitativno i kvantitativno određuju ionizirane molekule ili fragmenti molekula na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z). Omjer mase i naboja je bezdimenzijska veličina jer je z definiran kao nabojni broj, a m kao maseni broj. S obzirom da spektrometrija masa može razlučiti dva izotopa, potrebno je definirati mase koje se koriste u spektrometriji masa. Razlikuju se tri vrste masa: točna (monoizotopna), nominalna i prosječna. Za točnu masu se uzima točna atomska masa najzastupljenijeg izotopa, što u slučaju vodika iznosi 1,007825 u, dok nominalna masa vodika iznosi 1 u (zaokružena na cijeli broj). Nadalje prosječna masa se definira kao relativna atomska masa iz periodnog sustava gdje su uključene zastupljenosti drugih izotopa zbog čega je prosječna masa vodika 1,00797 u. Korištena mjerna jedinica je unificirana atomska jedinica mase koja je jednaka 1/12 mase ^{12}C nuklida:

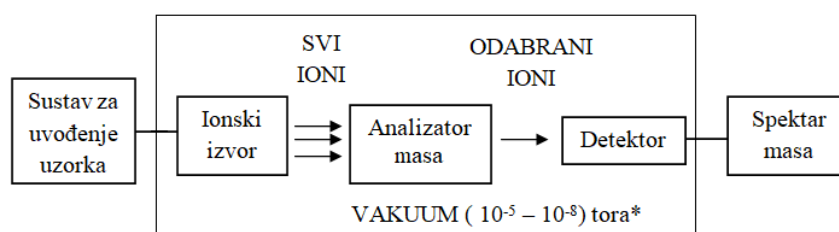
$$1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1,665402 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$$

Osim atomske jedinice mase, često se koristi Dalton (Da) kao mjerna jedinica za masu koja po vrijednosti odgovara ranije navedenoj atomskoj jedinici mase.

Rezultat analize spektrometrijom masa je spektar masa koji je grafički (ili tablični) prikaz ovisnosti intenziteta signala pojedinih iona o njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Najintenzivniji signal odgovara osnovnom signalu, odnosno baznom signalu, kojem se

pridružuje relativna zastupljenost od 100 %, dok svi ostali imaju manje relativne zastupljenosti koje se izražavaju u odnosu na bazni signal. Obično osnovni signal odgovara molekulskom ionu, no ovisno o načinu ionizacije i analitu, može odgovarati i nekom fragmentnom ionu. Signal molekulskog iona nalazi se pri najvećim vrijednostima m/z te se pri većim vrijednostima m/z mogu naći samo izotopni signali molekulskog iona. Takvi signali su posljedica prisutnosti težih izotopa sastavnih elemenata analizirane molekule te je zbog njihove manje zastupljenosti u prirodi, relativni intenzitet izotopnih signala manji u odnosu na relativni intenzitet molekulskog iona. Primjerice, ako u molekuli postoji jedan atom ugljika, u spektru mase će osim molekulskog iona M^+ biti vidljiv i manji signal molekulskog iona uvećan za 1 Da zbog prisutnosti izotopa ugljika ^{13}C . Relativni intenzitet signala iona $(M+1)^+$ će iznositi 1,1 % intenziteta signala M^+ jer relativna zastupljenost izotopa ugljika ^{13}C u odnosu na ^{12}C iznosi 1,1 %. Osim tih signala, u spektru masa se nalaze i signali iona fragmenata koji nastaju disocijacijom molekule na dijelove zbog velike energije prisutne u ionskom izvoru. Spektar mase se prikazuje grafički i tablično, pri čemu se u tabličnom prikazu mogu lakše iščitati točne mase i intenziteti dobivenih signala.^{17,18}

Spektrometar masa je instrument koji ima nekoliko osnovnih dijelova: sustav za uvođenje uzorka, izvor za ionizaciju molekula analita, analizator masa te detektor (slika 5). Analizator masa i detektor uvijek se nalaze u uvjetima visokog vakuuma kako bi se spriječile kolizije iona i molekula, dok ionizacijski izvor nije nužno pod visokim vakuumom što ovisi o tehnici ionizacije. Sustav za uvođenje uzorka može biti direktan, preko preciznih šprica te pumpi koje lagano ubrizgavaju uzorak bez remećenja vakuuma, no spektrometar masa se također može vezati i s različitih kromatografskim sustavima koji tada služe za uvođenje uzoraka u instrument. Ovisno o uzorku te načinu ionizacije istog odabire se sustav za uvođenje uzorka.^{17,18}



* 1 Tor = 1 mmHg = 1,333 mbar = 133,3 Pa

Slika 5. Shematski prikaz osnovnih dijelova spektrometra masa

2.4.1. Ionski izvori

Ionski izvori služe za ionizaciju molekula analita te njihovo prevođenje u plinsku fazu. Ionizacija predstavlja početni korak u analizi spektrometrijom masa te postoje različite tehnike koje se dijele obzirom na količinu prenesene unutarnje energije tijekom procesa ionizacije te obzirom na fizičko-kemijska svojstva analita. Ioni u ionskom izvoru obično nastaju izbijanjem elektrona, protoniranjem, deprotoniranjem ili prijenosom nabijene vrste iz kondenzirane u plinsku fazu. Jedna od osnovnih tehnika ionizacije je ionizacija elektronima (engl. *electron ionization*, EI) koja se primjenjuje na hlapljive i termički stabilne uzorke koji se bombardiraju brzim elektronima. Tijekom kolizija molekula analita i brzih elektrona dolazi do prijenosa velikih količina energije, zbog čega molekule analita fragmentiraju pa se ova tehnika smatra grubim načinom ionizacije. S druge strane postoje blage tehnike ionizacije kao što su kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*, CI), matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, ionizacija elektroraspršenjem te kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Osim podjele ionskih izvora prema količini prenesene energije tijekom ionizacije, ionizacijske tehnike se dijele i prema agregacijskom stanju uzorka kojeg se ionizira i prema kemijskim svojstvima analita od interesa. Tako se za hlapljive i termički stabilne spojeve koristi već ranije spomenuta ionizacija elektronima te kemijska ionizacija jer te dvije tehnike mogu ionizirati samo plinovite uzorke. Nadalje, za nehlapljive spojeve poput tetrasaharida ili nukleinskih kiselina koristi se desorpcijska kemijska ionizacija (engl. *desorption chemical ionization*, DSI), dok se za polarne spojeve koristi ionizacija brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB) i spektrometrija masa sekundarnih iona (engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS) ako masa analita nije veća od 10 000 Da. Za spojeve mase veće od 10 000 Da koristi se desorpcija plazmom (engl. *plasma desorption*, PD) te MALDI koji ju je danas uvelike zamijenio. Nadalje, za tekuće uzorke se koristi ionizacija termoraspršenjem (engl. *thermospray ionization*, TSP) te ESI ili APCI pri čemu navedene tri tehnike omogućavaju direktno spajanje tekućinskog kromatografa i spektrometra masa što je vrlo korisno.^{17,18}

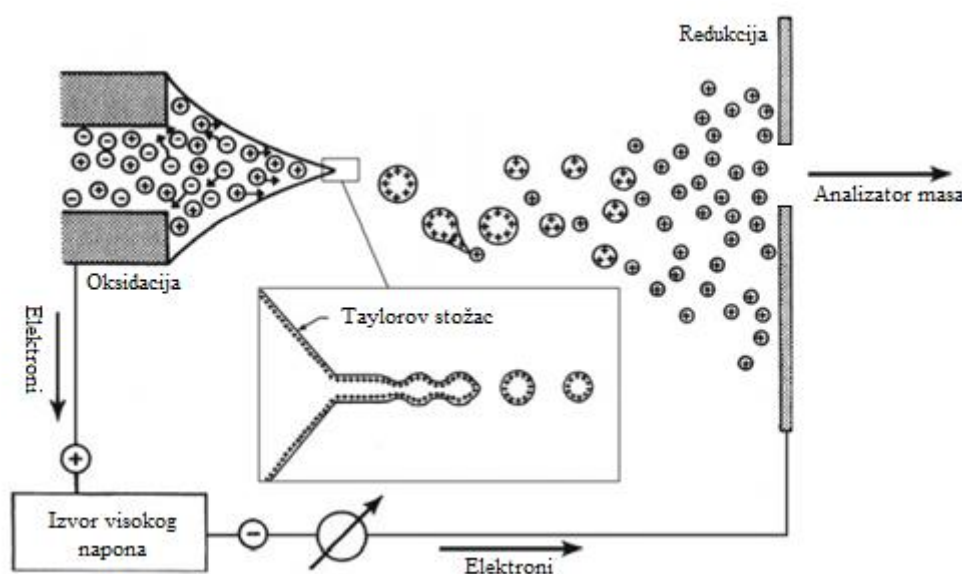
Ionizacija elektroraspršenjem

Elektroraspršenje je blagi način ionizacije pri atmosferskom tlaku kojim se generirani ioni prevode iz tekuće faze u plinsku fazu. Generira jednostruko te višestruko nabijene ione, zbog

čega ova ionizacijska tehnika čini spektrometriju masa pogodnom i za analizu velikih molekula. Osim za ionizaciju velikih molekula analita kao što su proteini, nukleinske kiseline, polimeri, primjenjuje se i na manje polarne molekule i metalne komplekse. Ionski izvor omogućava direktno dovođenje uzorka iz tekućinskog kromatografa jer se nalazi pod atmosferskim tlakom te je moguće korištenje gotovo svih otapala. Budući da se elektroraspršenjem molekule ne mogu ionizirati, ovaj ionski izvor zapravo i nije ionski izvor u pravom smislu, već samo način prevođenja postojećih iona iz kondenzirane u plinsku fazu. Nenabijene molekule dobivaju naboj na način da se postojeća nabijena vrsta u otopini, poput vodikovih, natrijevih, kalijevih ili amonijevih iona, veže na njih te tako nastali ioni prelaze u plinsku fazu. Pozitivno nabijene ione može tvoriti gotovo svaka molekula, dok je za negativno nabijene potrebno da molekula ima elektronegativne elemente ili kisele skupine.^{17,18}

Prilikom ionizacije elektroraspršenjem uzorak se uvodi u metalnu kapilaru, pri čemu je protok otopine uzorka mali, obično između 1 i 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. U samom ionskom izvoru nastaje jako električno polje zbog primjene razlike potencijala od 2 do 4 kV na kapilaru i protuelektrodu koja je udaljena 0,3 – 2 cm od kapilare. Nastaje električno polje čija je jačina reda veličine 10^6 V m^{-1} te ovisno o polaritetu, mogu se dobiti pozitivno ili negativno nabijeni ioni. Priključivanjem na pozitivan kraj izvora napona, pozitivni ioni iz otopine se nakupljaju na vrhu same kapilare tvoreći tzv. Taylorov stožac pri kritičnoj jakosti polja. S obzirom da se kapljice s pozitivnim nabojem nalaze na vrhu nastalog stošca, dolazi do odvajanja kapljica koje dalje putuju prema protuelektrodi, odnosno prema uzlazu u analizator masa. Na vrhu kapilare se koaksijalno dodaje plin slabog protoka koji ograničava disperziju nastalih kapljica u prostoru. Početne kapljice su velike i nose mnogo naboja, a njihova veličina ovisi o protoku otopine i svojstvima otapala. Izlaskom iz kapilare, kapljice se uvode u odjeljak s plinom za sušenje koji je obično grijani inertni plin poput dušika. Osim uporabe grijanog plina, moguće je i provođenje kapljica kroz grijanu kapilaru kako bi došlo do uklanjanja otapala. Grijanjem otapalo počinje isparavati te dolazi do Coulombovog dijeljenja kapljica uslijed prevelikog elektrostatskog odbijanja naboja u manjem volumenu otopine, odnosno nadvladava se površinska napetost otopine koja čini kapljice. Zbog velike količine naboja i jakog električnog polja, kapljice se dijele asimetrično, tako da jedna sadrži sve nusprodukte sparenih iona elektrolita, a druga, koja je ujedno i manja, ione analita koji iz nje prelaze u plinsku fazu. Kako prelazak iona iz kapljice u plinsku fazu nije potpuno jasan, postoje dva modela prema

kojima se taj proces tumači. Smatra se da ioni velikih molekula (primjerice proteina) nastaju dijeljenjem kapljice sve dok u njoj ne ostane jedan ion koji prelazi u plinsku fazu isparavanjem zadnje molekule otapala što opisuje tzv. model ostatka naboja (engl. *charge residue model*, CRM). S druge strane ioni malih molekula, prema drugom modelu, nastaju isparavanjem iona iz kapljice prije nego dođe do dijeljenja kapljice kako govori tzv. model isparavanja naboja (engl. *ion evaporation model*, IEM).^{17,18}



Slika 6. Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem¹⁷

Elektroraspršenjem se generiraju jednostruko i višestruko nabijeni ioni što spektar masa čini dosta kompliciranijim od spektra koji prikazuje samo jednostruko nabijene ione. U nekim slučajevima povoljno je generirati višestruko nabijene ione jer mogu povećati osjetljivost detektora te omogućiti analizu molekula velikih masa pomoću analizatora masa s manjim mjernim područjem vrijednosti m/z . Višestruko nabijeni ioni obično nastaju višestrukim protoniranjem molekula analita ili vezanjem drugih iona prisutnih u otopini što je moguće kod molekula čija struktura posjeduje više ionizabilnih mjesta.¹⁸

Budući da ESI radi pri atmosferskom tlaku, spajanje ionskog izvora s ostalim dijelovima spektrometra masa koji se nalaze pod visokim vakuumom je bitno provesti na pravilan način. Protok iona od izvora do analizatora masa, koji ne remeti visoki vakuum (odnosno nizak tlak) analizatora masa, postiže se uvođenjem sustava diferencijalnog pumpanja. Takvim se sustavom ionski izvor odvađa od analizatora masa pomoću nekoliko

odjeljaka koji su međusobno povezani lećama s malim otvorima za prolaz iona. U svakom takvom odjeljku postupno se smanjuje tlak, gledano od ionskog izvora prema analizatoru masa, kako prijelaz iz područja atmosferskog tlaka u područje visokog vakuuma ne bi bio prenapao.¹⁸

Elektroraspršenje je pogodno za proučavanje nekovalentnih interakcija, što je u konačnici i omogućilo izradu ovog diplomskog rada u kojem su se analizirali inkluzijski kompleksi odabranih ciklodekstrina i cinarizina.

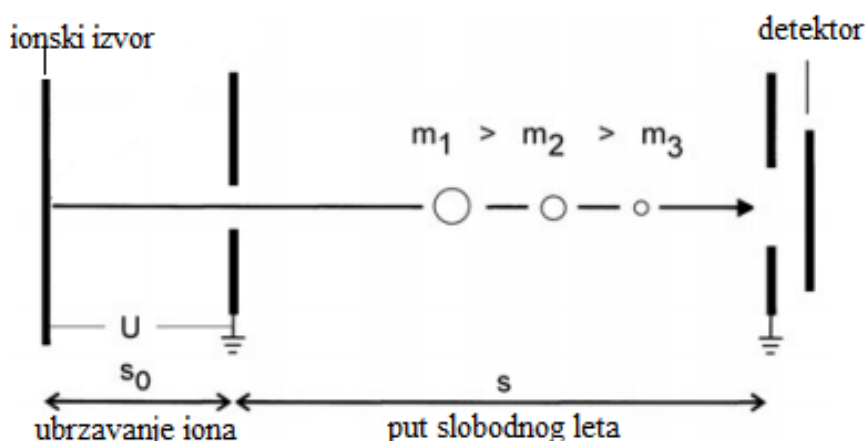
2.4.2. Analizatori masa

Analizatori masa služe za odjeljivanje iona koji su generirani u ionskom izvoru prema njihovoj vrijednosti m/z . Svi analizatori masa u tu svrhu koriste statično ili dinamično električno polje te magnetsko polje u kombinacijama ili zasebno te je upravo razlika među analizatorima način korištenja navedenih polja u svrhu odjeljivanja iona obzirom na m/z . Analizatore masa možemo podijeliti u dvije skupine, a ta podjela se temelji na transmisiji iona u vremenu. U prvu skupinu spadaju analizatori masa koji u jedinici vremena propuštaju samo ione usko određenog m/z kakvi su analizatori masa s magnetskim sektorom te kvadrupolni analizator masa (engl. *quadrupole*, Q). Analizatori masa koji spadaju u drugu skupinu mogu simultano propuštati ione različitog omjera m/z te su takvi analizatori masa koji mjere vrijeme leta (engl. *time of flight*, TOF), ionske stupice (engl. *ion trap*, IT), elektrostatske stupice (engl. *orbitrap*) i analizatori masa ionsko ciklotronske rezonancije. U svrhu unapređenja analize, koriste se kombinacije jednakih ili različitih analizatora masa (hibridni instrumenti) čime se omogućava provođenje eksperimenata tandemne spektrometrije masa. Jedan od primjera hibridnih instrumenata je Q-TOF koji ima vezan kvadrupolni i analizator masa koji mjeri vrijeme leta.¹⁸

Analizator masa koji mjeri vrijeme leta

Analizator masa koji mjeri vrijeme leta, kao što mu i samo ime govori, mjeri vrijeme koje je potrebno ionu da dođe do detektora. Razvio se nakon pojave pulsni tehnika ionizacije (poput laserske desorpcije te desorpcije poljem i plazmom) kao analizator masa za analizu iona koji u pulsevima dolaze iz ionskog izvora. U teoriji ima neograničen mjerni raspon m/z , no u praksi može analizirati ione mase do 350 000 Da.

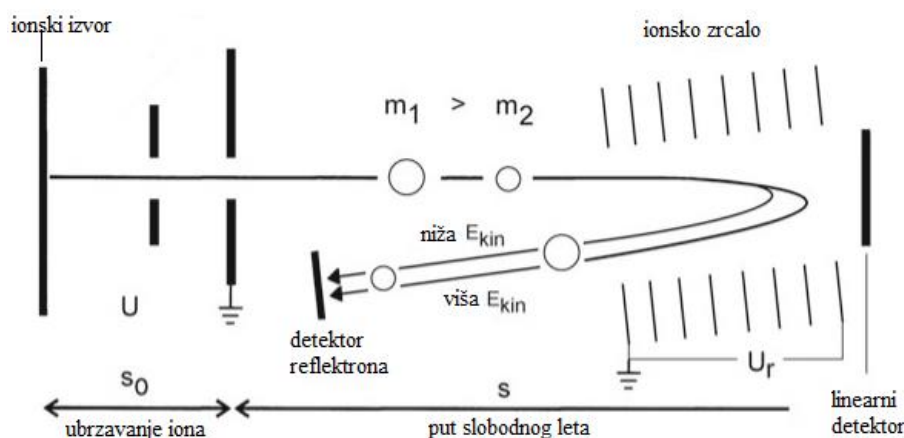
Nakon generiranja iona u ionskom izvoru oni ulaze u cijev analizatora masa koji ih ubrzava potencijalom od minimalno 20 kV. Ubrzani ioni prevaljuju put poznate duljine pri čemu na njih ne djeluje više nikakav potencijal tako da se gibaju određenom brzinom prema detektoru na suprotnom kraju cijevi. Primjenom početnog potencijala, kojim se ioni ubrzavaju, svaki ion dobiva podjednaku kinetičku energiju tako da brzina putovanja do detektora ovisi o njihovoj masi. Budući da ovaj analizator mjeri vrijeme leta, važno je da svi ioni krenu prema detektoru u istom trenutku, a zbog toga je TOF prikladan za korištenje u sklopu instrumenata s pulsnim tehnikama ionizacije. Ukoliko se pak u instrumentu nalazi ionski izvor koji kontinuirano generira ione (poput ESI), ioni se tada ekstrahiraju u pulsevima. Vrijeme potrebno da pojedini ion dođe do detektora je proporcionalno korijenu omjera masenog broja i nabojnog broja pa će ioni veće vrijednosti m/z putovati duže od iona manje vrijednosti m/z .^{17,18}



Slika 7. Shematski prikaz analize iona u linearnom analizatoru masa koji mjeri vrijeme leta pri čemu U označava početni napon kojim se ioni ubrzavaju prema detektoru¹⁷

Glavna mana analizatora masa koji mjeri vrijeme leta je slabo razlučivanje koje je uzrokovano činjenicom da ioni jednakog omjera m/z dobivaju različite količine kinetičke energije primjenom početnog potencijala. Radi nejednake distribucije kinetičke energije, na detektoru dolazi do prekrivanja vremenskog intervala dolaska iona jednakih m/z , a različite energije, s ionima različitog m/z . U svrhu unapređenja razlučivanja u analizator masa koji mjeri vrijeme leta se uvodi reflektor, odnosno ionsko zrcalo. Ioni se u takvom, poboljšanom analizatoru masa, ubrzavaju i usmjeravaju prema ionskom zrcalu koje ih odbija prema detektoru.

Razlučivanje je poboljšano jer ion koji posjeduje veću količinu kinetičke energije dublje prodire u ionsko zrcalo u odnosu na ion jednake vrijednosti m/z koji posjeduje manju količinu kinetičke energije. Na taj se način postiže da ioni jednake vrijednosti m/z , neovisno o početnoj količini kinetičke energije, jednako dugo putuju od ionskog izvora do detektora te ne dolazi do prekrivanja s ionima različite vrijednosti m/z .^{17,18}



Slika 8. Shematski prikaz analize iona analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta s ionskim zrcalom. E_{kin} označava kinetičku energiju, U označava početni napon kojim se ubrzavaju ioni, a U_r napon koji se primjenjuje u ionskom zrcalu

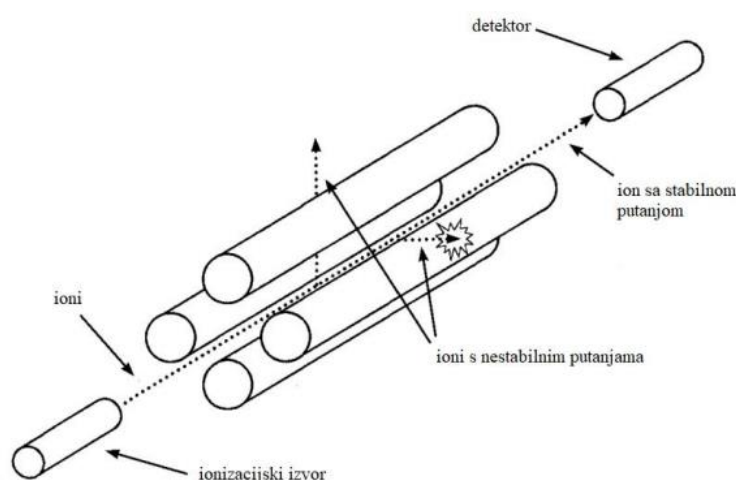
Osim korištenjem ionskog zrcala, razlučivanje je moguće poboljšati i odgođenom pulsnom ekstrakcijom iona. Prilikom izlaska iz ionskog izvora ioni se u prostoru odjeljuju prema energiji bez primjene električnog polja, a nakon toga se primjenom ekstrakcijskog pulsa ioni jednakih vrijednosti m/z izjednačavaju prema količini kinetičke energije koju posjeduju, čime se postiže njihov istovremeni dolazak na detektor.^{17,18}

Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupolni analizator masa je jedan od najčešće korištenih analizatora masa te je prvi analizator masa uvršten u neki komercijalni instrument. U samim začetima kvadrupoli su mogli mjeriti tek uske raspone vrijednosti m/z , a uz to su imali i slabu moć razlučivanja, no napretkom tehnologije unaprijeđeni su i kvadrupolni analizatori masa koji danas mogu mjeriti vrijednosti m/z i iznad 2000 s vrlo dobrom moći razlučivanja. Kvadrupolni analizatori masa se danas koriste zbog pristupačne cijene, kompaktnosti te jer ne zahtijevaju upotrebu velikih napona za ubrzanje iona. Osim toga, omogućavaju brzo snimanje spektara masa zbog

jednostavnosti načina rada koji se temelji na jednostavnim promjenama električnog potencijala. Radi navedenih svojstava, kvadrupolni analizator masa se najčešće koristi u vezanim sustavima poput LC-MS-a.¹⁸

Kvadrupoli se sastoje od 4 cilindrične ili hiperbolične elektrode paralelno složene u smjeru z -osi, dok raspored elektroda u x - y ravnini čini obliku kvadrata (slika 9 i 10). Odvajanje iona se temelji na primjeni istosmjernog te izmjeničnog napona na elektrode kako bi, pri određenim uvjetima, analizator propustio samo ione uskog raspona vrijednosti m/z .^{17,18}



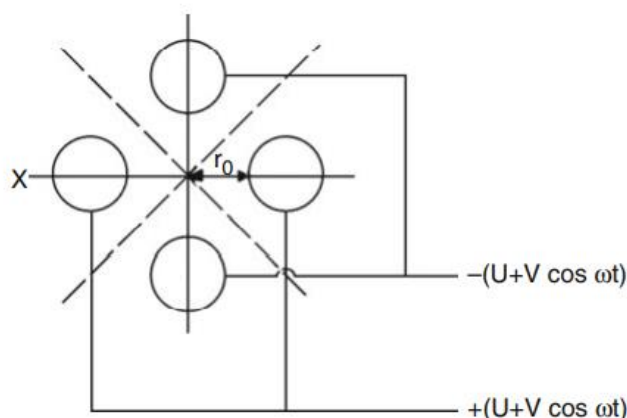
Slika 9. Shematski prikaz kvadrupolnog analizatora masa¹⁷

Ioni koji dolaze iz ionskog izvora se ubrzavaju naponom od 5 do 15 V nakon čega se usmjeravaju prema kvadrupolnom analizatoru masa. Nasuprotne elektrode se drže na jednakoj vrijednosti potencijala, koji ima izmjeničnu i istosmjernu komponentu, a ukupan se potencijal može označiti kao:

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

pri čemu U označava istosmjernu komponentu napona, V izmjeničnu komponentu napona, ω frekvenciju izmjenične komponente napona, a t vrijeme. Primjenom promjenjivog istosmjernog i izmjeničnog potencijala na elektrode, nastaje oscilirajuće električno polje koje omogućava prolazak iona određenog raspona m/z . Promjenjiv potencijal znači promjenu iznosa komponenti napona te njihova predznaka na način da njihov omjer ostaje isti. Promjene iznosa komponenti napona su periodične što rezultira promjenom predznaka

električne sile u vremenu, a to znači kako će se u jednom smjeru privlačenje i odbijanje iona naizmjenice mijenjati usporedno promjeni predznaka električne sile. Kako bi ion došao do detektora, potrebno mu je osigurati stabilnu putanju duž z -osi, odnosno u smjeru ionizacijskog izvora duž elektroda analizatora masa prema detektoru uz ograničene amplitude njegovih oscilacija u x - z i y - z ravninama, kako ne bi došlo do neutralizacije iona na elektrodama. Hoće li se ion neutralizirati na stijenkama elektroda ili imati stabilnu putanju ovisi o njegovoj vrijednosti m/z , odnosno jačini primijenjenog izmjeničnog napona te omjeru U i V . Ioni određene vrijednosti m/z stabilne putanje, pri točno određenoj vrijednosti U i V te frekvenciji ω osciliraju unutar vrijednosti $2r_0$ koja definira udaljenost između dvije elektrode (slika 10).^{17,18}



Slika 10. Shematski prikaz poprečnog presjeka kvadrupolnog analizatora masa te način spajanja na naponski izvor. U označava istosmjerni napon, V izmjenični napon, ω frekvenciju izmjeničnog polja, a r_0 udaljenost središta kvadrupolnog analizatora masa od elektrode¹⁷

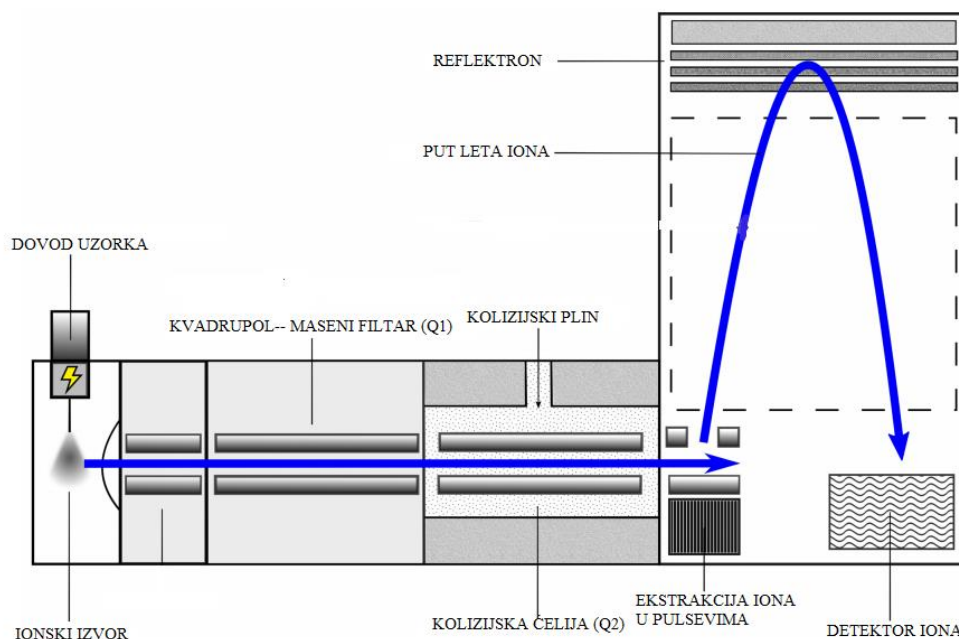
Budući da se predznak primijenjenog napona na elektrode mijenja periodično, dobiva se složeno gibanje iona. Uzimamo za primjer gibanje pozitivnih iona. Primjerice, ako su gornja i donja elektroda isprva pozitivno nabijene, dobiva se fokusiranje iona u horizontalnoj ravnini, nakon čega se promjenom polariteta ovih elektroda dobiva fokusiranje iona u vertikalnoj ravnini. Takvom promjenom polariteta se osigurava da samo ioni sa stabilnom putanjom prolaze kroz analizator mase te dolaze do detektora.^{17,18}

Kako ioni različite mase drugačije odgovaraju na promjenu pojedine komponente primijenjenog potencijala, gibanje iona manjih, odnosno većih vrijednosti m/z određeno je jednom od komponenti potencijala. Gibanje iona male vrijednosti m/z određeno je

izmjeničnim potencijalom jer oni brže reagiraju na njegovu promjenu, dok je gibanje iona velikih vrijednosti m/z određeno istosmjernim potencijalom. Kombinacijom obiju komponenti potencijala postiže se stabilna putanja za ione uskog raspona vrijednosti m/z koji mogu proći kroz kvadrupolni analizator masa do detektora.^{17,18}

Hibridni kvadrupolni analizator masa - analizator masa koji mjeri vrijeme leta (Q-TOF)

Q-TOF je analizator masa koji se razvio 80-ih godina prošlog stoljeća, no tek je kasnije u 90-im godinama, ugradnjom u komercijalne spektrometre masa, postao važan analizator masa za analizu s vrlo niskim detekcijskim granicama. Q-TOF je hibridni analizator masa sastavljen od dva kvadrupolna analizatora masa i analizatora masa koji mjeri vrijeme leta u seriji pa možemo reći da zapravo posjeduje QqTOF konfiguraciju. Kao takav pogodan je za korištenje prilikom provođenja eksperimenata tandemne spektrometrije masa, ali i snimanja jednostavnih spektara masa pune ionske struje kod kojih cilj nije fragmentacija molekula analita.¹⁹



Slika 11. Shematski prikaz Q-TOF hibridnog analizatora masa (kvadrupolni analizator masa - analizator masa koji mjeri vrijeme leta)¹⁹

Prvi kvadrupolni analizator masa (Q1) se prilikom tandemne spektrometrije masa koristi kao filtar masa, odnosno za odabir iona željenog m/z koji će biti podvrgnut fragmentaciji u

kolizijskoj ćeliji (q). Prilikom takvog načina rada primjenjuje se kombinacija istosmjernog i izmjeničnog napona na elektrode kvadrupola (kako je već i prethodno objašnjeno) kako bi se izolirao željeni ion. U ovom slučaju kažemo da prvi kvadrupol djeluje kao filter masa. Osim ovakvog načina rada, na Q1 i q se može primjenjivati samo određen iznos izmjeničnog napona. Rezultat toga je fokusiranje iona kroz kvadrupolne analizatore masa prema idućem analizatoru, odnosno onom koji mjeri vrijeme leta kako bi se dobio spektar masa nefragmentiranih roditeljskih, odnosno iona prekursora iz kojeg se može iščitati njihova točna masa (snimanje pune ionske struje).^{18,19}

Drugi kvadrupolni analizator masa prilikom snimanja tandemnih spektara masa služi kao kolizijska ćelija, kako je već i objašnjeno te zapravo nema funkciju analizatora masa. U nekim instrumentima (kao što je i u slučaju *Agilent 6550 iFunnel Q-TOF* instrumenta) drugi kvadrupolni analizator masa je zamijenjen heksapolom, no princip rada ostaje jednak. U q se lateralno uvodi kolizijski plin, obično inertni plin poput dušika ili argona koji sudaranjem s izoliranim željenim ionom dovodi do kolizijom inducirane disocijacije iona (engl. *collision-induced dissociation*, CID) ili kolizijom aktivirane disocijacije iona (engl. *collision-activated dissociation*, CAD). Fragmenti nastali na taj način dalje se analiziraju analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta. Kolizijska ćelija, također kao i Q1, može biti u radiofrekventnom načinu rada primjenom samo izmjeničnog napona V na elektrode kvadrupola te se tako postiže fokusiranje iona prema idućem analizatoru masa prilikom snimanja jednostavnih spektara mase, kako je već i ranije navedeno.^{18,19}

Treći analizator masa u seriji je analizator masa koji mjeri vrijeme leta pri čemu on služi kao analizator masa kojim se bilježe točne mase prekursorskih ili fragmentnih iona, ovisno o primijenjenom načinu rada instrumenta. Princip rada mu se ne razlikuje od onog koji je opisan u prethodnom poglavlju ovog rada.¹⁹

Q-TOF je hibridni analizator masa koji se često ugrađuje u spektrometre masa visokog razlučivanja. Kombinira veliku efikasnost fragmentacije kvadrupolnog analizatora masa te veliku brzinu i visoku rezoluciju analizatora masa koji mjeri vrijeme leta zbog čega je jako prigodan za komercijalnu uporabu.¹⁹

2.4.3. Detektori

Kao zadnju, ali neizostavnu komponentu spektrometra masa moramo spomenuti detektore. Svrha im je detekcija iona koji dolaze iz analizatora masa te generiranje električnog signala koji je proporcionalan zastupljenosti iona. Postoji nekoliko vrsta detektora, no detekcija se uvijek temelji na jednom od triju fizikalnih svojstava iona, a to su brzina, naboj ili masa.⁸

U prvim spektrometrima masa kao detektori su se koristile su fotografske ploče zbog mogućnosti detekcije više različitih masa simultano. S druge strane, postoje detektori koji u jedinici vremena mogu detektirati samo određenu masu. Nadalje, kako je broj iona koji dolaze do detektora u jedinici vremena mali, potrebno je kod nekih detektora pojačati signal kako bi se dobio spektar masa kojeg je lakše interpretirati.¹⁸

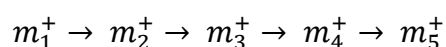
Dvije najčešće korištene vrste detektora su elektronski multiplikatori i elektro-optički ionski detektori. U elektronskom multiplikatoru se ioni koji dolaze s analizatora masa ubrzavaju do visokih brzina radi bolje efikasnosti detekcije. Ubrzanje se postiže držanjem elektrode zvane pretvorbena dinoda, na potencijalu od 3 kV do 30 kV suprotnog naboja u odnosu na naboj dolaznih iona. Udaranjem pozitivnih ili negativnih iona u navedenu dinodu dolazi do emisije različitih sekundarnih čestica kao što su elektroni te negativno ili pozitivno nabijeni ioni. Prilikom analize pozitivnih iona, dolazi do udara istih u negativnu dinodu te do izbijanja elektrona ili negativnih iona koji se potom ubrzavaju i usmjeruju prema sljedećoj dinodi. Kako se proces emisije i ubrzavanja elektrona ponavlja, na kraju se kaskadno dobiva snop elektrona koji se pretvara u električni signal. Elektronski multiplikator može se dizajnirati u diskretnoj i kontinuiranoj verziji, pri čemu se pojmovi diskretno i kontinuirano odnose na potencijal na dinodi. Diskretna izvedba ima niz dinoda u seriji, gdje svaka iduća ima niži negativni potencijal u odnosu na prethodnu. U takvoj izvedbi prilikom svakog udara u sljedeću dinodu u nizu emitira se više elektrona. S druge strane postoje i kontinuirani elektronski multiplikatori koji su konstruirani u obliku zaobljene cijevi, pri čemu se krajevi cijevi drže na različitom potencijalu tako da se generira električno polje koje sve više ubrzava elektrone koji su nastali u obliku sekundarnih čestica kao posljedica udara iona u dinode koje se nalaze na početku cijevi. Svakim udarom takvih elektrona o stijenke cijevi multiplikatora kaskadno se generira još elektrona, a njihova struja se bilježi na kraju cijevi na metalnoj anodi.¹⁸

Elektro-optičke ionske detektore čine dvije dinode, scintilator ili fosforescentni zaslon i fotomultiplikator. Prilikom udara iona u dinodu, dolazi do emisije sekundarnih elektrona

koji se ubrzavaju prema fosforescentnom zaslonu te se tako prevode u fotone. Fotoni se detektiraju fotomultiplikatorom nakon čega se dobiva mjerljivi signal. U odnosu na elektronske multiplikatore ovi detektori imaju dulji vijek trajanja te sličnu osjetljivost.¹⁸

2.5. Tandemna spektrometrija masa

Tandemna spektrometrija masa (MS/MS, MSⁿ) označava višestruko analiziranje iona generiranih pomoću ionskih izvora, a može se provoditi u vremenu ili u prostoru. Takva spektrometrija masa ima nekoliko upotreba. Moguće je analizirati ion produkta, provesti analizu iona prekursora za fragment određenog m/z ili analizirati ion prekursor za određeni fragment nakon gubitka neutralne molekule. Tandemna spektrometrija masa može biti višestruka, odnosno moguće je više puta fragmentirati pojedine ione, a ukupna analiza nosi naziv ovisno o broju provedenih fragmentacija. MS/MS ili MS² označava eksperiment uz primijenjenu jednu fragmentaciju, no moguće je provesti i MS³, MS⁴ pa sve do MSⁿ eksperimenata. Općenito eksponent u eksperimentu MSⁿ označava generaciju iona koji nastaje prema fragmentacijskoj shemi:



pri čemu je m_4^+ prekursor iona m_5^+ i prva generacija produkta iona m_3^+ , druga generacija produkta iona m_2^+ te treća generacija produkta iona m_1^+ . MSⁿ eksperimenti se najčešće koriste za dobivanje fragmenata pojedinih iona, no moguće je i tijekom ovakvih eksperimenata uvesti u sustav i neku neutralnu molekulu koja će reagirati s ionom od interesa i dati produkt veće mase.¹⁷

Fragmentacija iona može biti spontana ili izazvana kolizijom s neutralnim plinom (He, N₂, Ar). Spontana disocijacija događa se u slučaju metastabilnih iona koji su dovoljno stabilni da izađu nedisocirani iz ionskog izvora, ali dovoljno nestabilni kako bi došlo do fragmentacije tijekom analize. Metastabilni ioni imaju vijek života između 10⁻⁶ i 10⁻⁷ s te malu unutarnju energiju, tek dovoljno veliku kako ne bi došlo do disocijacije u samom ionskom izvoru te ih nastaje jako malo. S druge strane, ioni koji imaju nešto dulji životni vijek (10⁻⁶ s) u odnosu na metastabilne ione, ne disociraju spontano, već je njihovu fragmentaciju potrebno inducirati kolizijom. Namjernom kolizijom iona s inertnim plinom moguće je provoditi kolizijom induciranu disocijaciju, odnosno kolizijom aktiviranu disocijaciju. Disociranjem pojedinog

iona moguće je detaljnije analizirati strukture iona malih unutarnjih energija dobivenih blagim načinima ionizacije kao što je elektroraspršenje.¹⁷

Proces disocijacije iona se odvija u dva koraka. U prvom dolazi do nastanka pobuđenog iona pri čemu je njegova početna unutarnja energija uvećana za primljenu energiju tijekom kolizije. U drugom koraku pobuđena vrsta fragmentira i nastaju ioni fragmenata. Količina predane energije pri CID eksperimentima razlikuje se ovisno o analizatoru masa u kojem se fragmentacija provodi. U slučaju kvadrupolnog analizatora masa, energija predana kolizijom iznosi do oko 100 eV (niskoenergetske kolizije) te se kao plin koji se uvodi u kolizijsku ćeliju najčešće koristi N₂, Ar ili Xe. U slučaju korištenja analizatora mase koji mjeri vrijeme leta ta energija iznosi do nekoliko keV (visokoenergetske kolizije), a plin koji se tipično koristi je He.¹⁷

2.5.1. Tandemna spektrometrija masa u vremenu i prostoru

Tandemna spektrometrija masa se provodi ovisno o instrumentnim postavkama, odnosno ovisno o upotrijebljenim analizatorima masa pa razlikujemo tandemnu spektrometriju masa u vremenu i tandemnu spektrometriju masa u prostoru.¹⁸

Prilikom provođenja eksperimenata tandemne spektrometrije masa u vremenu (engl. *tandem mass spectrometry in time*) koristi se jedan analizator masa, obično linearna kvadrupolna ionska stupica (engl. *linear quadrupole ion trap*, LIT), trodimenzijska ionska stupica (QIT) ili pak elektrostatska stupica. Različiti koraci ovakvog eksperimenta, poput odabira početnog iona, aktivacije ili disocijacije te analize iona produkata provode se u istom prostoru, ali sekvencijalno u vremenu. Prednost ovakvih instrumenata je mogućnost provođenja MSⁿ eksperimenata viših redova jer nije potrebno dodavanje više analizatora masa, tako da je teoretski moguće provesti i MS⁶ eksperiment koristeći tandemnu spektrometriju masa u vremenu.¹⁸

Tandemna spektrometrija masa u prostoru (engl. *tandem mass spectrometry in space*) podrazumijeva korištenje više analizatora masa, pri čemu svaki služi za jedan korak u eksperimentu. Za MS/MS eksperiment su potrebna najmanje dva analizatora masa. Postoji više različitih izvedbi ovakvih spektrometara masa, a najčešći je onaj s tri serijski povezana kvadrupola (QqQ) kod kojeg prvi služi za odabir željenog iona, nakon čega ion ulazi u drugi analizator masa gdje dolazi do kolizije s inertnim plinom radi fragmentacije. Drugi analizator masa se iz toga razloga naziva kolizijskom ćelijom. Treći analizator masa ima svrhu običnog

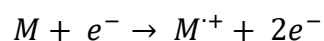
analizatora masa, odnosno odvaja i analizira dobivene ione obzirom na njihovu vrijednost m/z . Uz već spomenuti trostruki kvadrupol moguće je vezati dva analizatora masa koji mjere vrijeme leta (TOF/TOF) ili pak kvadrupolni analizator masa i analizator masa koji mjeri vrijeme leta (QqTOF).¹⁸

2.6. Reakcije fragmentacije

Reakcije fragmentacije su često korišten alat prilikom analize nepoznatih spojeva spektrometrijom masa. U svrhu olakšanja analize takvih spojeva, oformljene su baze podataka koje sadrže spektre masa fragmentiranih molekula, no u tim baza postoje podaci koji se odnose samo na spektre dobivene ionizacijom elektronima. Analite je moguće identificirati usporedbom dobivenog spektra masa s onim u bazi podataka, no uvjeti snimanja spektara masa moraju biti jednaki, odnosno tehnika ionizacije analita mora biti jednaka. Spektri masa koji su dobiveni ionizacijom elektronima pohranjeni su u baze jer daju kvalitetne podatke obzirom da je ta ionizacijska tehnika vrlo reproducibilna. Ostale tehnike ionizacije, u odnosu na ionizaciju elektronima, usko ovise o pojedinom instrumentu te ne daju jednake spektre masa korištenjem više različitih instrumenata.¹⁸

Postojeće baze podataka koje sadrže spektre masa za fragmentirane molekule su NIST/EPA/NIH (engl. *National Institute of Standards and Technology*, NIST; *Environmental Protection Agency*, EPA; *National Institutes of Health*, NIH), Wiley-ev registar podataka spektara masa (engl. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*) i *The Eight-Peak Index of Mass Spectra* koja pripada Kraljevskom kemijskom društvu (engl. *The Royal Society of Chemistry*, RSC). Od triju navedenih Wileyev registar podataka spektara masa je najveća baza podataka.¹⁸

Prilikom analize spektrometrijom masa susrećemo se s nenabijenim molekulama, ionima s parnim brojem elektrona koji su učestali i u klasičnoj kemiji, no isto tako se susrećemo s ionima s neparnim brojem elektrona, odnosno s ionima radikalima. Ionizacija molekule analita elektronima je brz proces koji traje oko 10^{-16} s. Sudarom brzog elektrona s molekulom dolazi do nastanka nabijene vrste $M^{+\cdot}$, odnosno kationskog radikala, zbog izbijanja elektrona iz molekule M:



Takav kationski radikal sadrži neparan broj elektrona (engl. *odd-electron ion*, OE^{*+}). Molekula prilikom sudara s brzim elektronom prima određenu količinu energije, koja je često veća od količine potrebne za ionizaciju, budući da se elektroni ubrzavaju naponom od 70 V nakon čega može doći do fragmentacije molekule, no ne nužno. Nakon primitka energije elektrona, unutarnja energija molekule se statistički raspodjeljuje na stupnjeve slobode: vibracijsku energiju, translacijsku energiju i rotacijsku energiju i tek pretvorbom u vibracijsku energiju može doći do fragmentacije molekule.¹⁸

Prilikom ionizacije molekula elektroraspršenjem, nastaju ioni s parnim brojem elektrona (engl. *even-electron ion*, EE^+) jer su to obično protonirane vrste $[M+H]^+$, deprotonirane vrste $[M-H]^-$ te ioni adukta poput $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ te $[M+K]^+$.¹⁸

Prilikom interpretacije spektara te za razlikovanje iona s neparnim i parnim brojem elektrona važno je dušikovo pravilo. Ono se temelji na zakonu pariteta mase i zakonu pariteta elektrona za građevne jedinice organskih molekula, kojim se smatraju atomi C, O, N, H, S, P te atomi halogenih elemenata. Svakom atomu koji gradi organske molekule paritet mase jednak je paritetu valentnih elektrona, osim dušikovom atomu. Primjerice, nominalna masa najzastupljenijeg ugljikovog izotopa je 12 u, dok je broj njegovih valentnih elektrona jednak 4 što govori kako su njegovi pariteti mase i valentnih elektrona jednaki jer su oba broja parna. S druge strane, nominalna masa dušikovog atoma iznosi 14 u, a posjeduje 5 valentnih elektrona. Tako će ion s neparnim brojem elektrona (OE^{*+}) koji u svojoj strukturi posjeduje neparan broj dušikovih atoma imati i neparnu vrijednost m/z , dok će onaj s parnim brojem elektrona (EE^+) koji također posjeduje neparan broj dušikovih atom imati parnu vrijednost m/z . Drugi način interpretacije dušikovog pravila govori da će ion s parnim masenim brojem i s parnim brojem (ili bez) dušikovih atoma imati neparan broj elektrona te biti kationski radikal (OE^{*+}).¹⁸

2.6.1. Fragmentacija iona s neparnim brojem elektrona (OE^{*+})

Oznake i terminologija za reakcije fragmentacije iona s neparnim brojem elektrona (OE^{*+}) i iona s parnim brojem elektrona (EE^+) dane su prema McLafferty-u te se u daljnjem tekstu diplomskog rada koriste kao univerzalne.

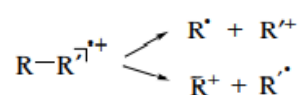
Kod tzv. kationskih radikala naboj je delokaliziran preko cijele molekule, iako se prilikom skiciranja fragmentacije predstavlja da je naboj lokaliziran na jednom mjestu. Prilikom nastajanja takvog kationa dolazi do otpuštanja elektrona s atoma koji ima najnižu

ionizacijsku energiju u molekuli zbog čega se i u svrhu shematskog prikaza nastali naboj prikazuje na tom mjestu.¹⁸

Do reakcije cijepanja inicirane mjestom pozitivnog naboja dolazi zbog nedostatka negativnog naboja, odnosno elektrona zbog čega tako izazvana fragmentacija uključuje privlačenje elektronskog para. Cijepanjem kationa dolazi do promjene mjesta naboja jer je proces heterolitički. S druge strane reakciju cijepanja iniciranu radikalskim mjestom molekule uzrokuje sklonost kationskog radikala prema sparivanju elektrona pri čemu se veza cijepa homolitički, elektron se donira kako bi nastala nova veza, a mjesto gdje se nalazi nespareni elektron se mijenja.¹⁸

Direktna disocijacija (σ)

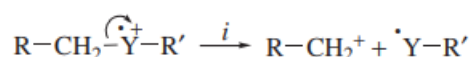
Izbijanjem elektrona direktno iz σ –veze dolazi do direktne disocijacije, odnosno nastanka dvaju fragmenata od kojih je jedan radikal, a drugi kation:



Izlaskom elektrona iz veze dolazi do kompeticije dva dijela molekule za taj elektron. Elektron ostaje kao dio fragmenta molekule koji ima veću ionizacijsku energiju, tako da drugi fragment zadržava pozitivan naboj te se on promatra s obzirom da se spektrometrijom masa uočavaju samo nabijene vrste.¹⁸

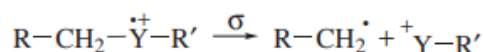
Cijepanje veze uz heteroatom (i)

Cijepanje veze uz heteroatom obično je izazvano lokalizacijom naboja na heteroatomu koji privlači elektronski par:



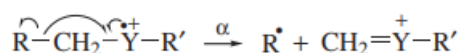
Takvo cijepanje se naziva induciranim te se može promatrati kao direktna disocijacija veze uz asistenciju privlačenja elektrona od strane heteroatoma. Takvo privlačenje je posljedica razlike u elektronegativnosti, ali do istoga dolazi tek nakon ionizacije. Ovisno o ionizacijskoj

energiji fragmenta s heteroatomom i onog bez heteroatoma može doći i do retencije naboja na heteroatomu. Takva fragmentacija smatra se posebnim slučajem direktne disocijacije te se prikazuje kao niže navedena jednadžba pri čemu Y označava heteroatom.⁸



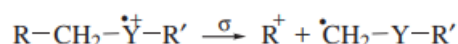
Cijepanje alfa veze (α)

Cijepanje alfa veze u odnosu na radikalsko mjesto uzrokovano je samim radikalskim mjestom, pri čemu dolazi do prijenosa nesprenog elektrona iz radikala tako da dođe do nastajanja veze sa susjednim atomom nakon homolitičkog cijepanja druge veze tog atoma:



S obzirom da se radi o cijepanju veze na način da se jedan elektron prenosi na jedan fragment, taj prijenos se označava polovičnom strelicom. Prilikom fragmentacija nekih iona postoji mogućnost nekoliko kompetitivnih cijepanja α veza, pri čemu prednost ima cijepanje alfa veze kod kojeg se gubi radikal s najvećom energijom ionizacije. S druge strane, ako postoji mogućnost gubitka radikala na nekoliko alkilnih lanaca, gubi ga najduži takav lanac.¹⁸

Nadalje, prilikom cijepanja α veze može doći i do migracije naboja, odnosno do retencije radikala ukoliko R^{\cdot} ima nižu ionizacijsku energiju u odnosu na $CH_2=Y^+-R$, pa će produkti cijepanja α veze biti drugačiji:



Ovakav način cijepanja smatra se posebnim slučajem direktne disocijacije, zbog čega stoji oznaka σ .¹⁸

Fragmentacija kationskih radikala uz pregradnju

Pregradnja iona prilikom fragmentacije je vrlo česta te postoji mnogo različitih načina na koji se neki ion može pregraditi, od kojih svi nisu do kraja objašnjeni, a to interpretaciju spektara masa može znatno otežati. Jedan način pregradnje je vrlo dobro objašnjen te se naziva *McLafferty*-jev način pregradnje, prilikom kojeg dolazi do prijenosa vodikovog atoma na

mjesto kationskog radikala uz šesteročlani prsten kao međuprodukt. Nakon pregradnje ion ostaje kationski radikal, no mjesto radikala je udaljeno od mjesta naboja zbog čega se takav ion naziva distonskim kationskim radikalom. Takvoj pregradnji dalje slijedi fragmentacija inducirana ili mjestom naboja ili mjestom radikala te u oba slučaja kao produkt fragmentacije nastaje neutralna molekula i novi kationski radikal. Ako novonastali kationski radikal nema dušikovih atoma, imati će parni maseni broj tako da je lako prepoznatljiv u spektru masa.¹⁸

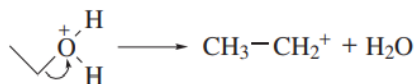
2.6.2. Fragmentacija iona s parnim brojem elektrona (EE^+)

Ioni s parnim brojem elektrona obično nastaju blagim tehnikama ionizacije kao što su MALDI, TSP, CI, APCI, FAB i ESI, dok ranije navedeni ioni s neparnim brojem elektrona (OE^+) nastaju ionizacijom elektronima. Takve vrste najčešće nastaju protoniranjem, pri čemu nastaje $[M+H]^+$, ili oduzimanjem protona, gdje nastaje $[M-H]^+$. EE^+ su učestali u klasičnoj kemiji i nisu specifični samo za MS poput kationskih radikala. Mnogo su stabilniji u odnosu na kationske radikale, no prilikom fragmentacije takvih iona češće dolazi do pregradnji. Kao posljedica tih pregradnji dobivaju se kompliciraniji spektri masa koji nose manje informacija u odnosu na spektre dobivene nakon ionizacije elektronima.¹⁸

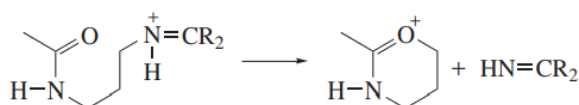
Već je ranije navedeno kako prilikom α te σ cijepanja iona s neparnim brojem elektrona (OE^+) može doći do nastanka iona s parnim brojem elektrona (EE^+) i radikala, no prilikom fragmentacije iona s parnim brojem elektrona (EE^+) u najvećem broju slučajeva (no ne isključivo) ne postoji takav put gdje bi produkt bio kationski radikal. OE^+ , osim iona s parnim brojem elektrona, daje i kationske radikale uz neutralne molekule kao produkte fragmentacije, dok EE^+ prilikom fragmentacije u 95 % slučajeva daju fragmentne ione s parnim brojem elektrona te neutralne molekule.¹⁸

Fragmentacija kationa s parnim brojem elektrona (EE^+) je klasificirana prema *McLaffery*-ju te se smatra univerzalnom, ali nije toliko detaljno opisana kao fragmentacija iona s neparnim brojem elektrona (OE^+). Klasifikacija se odnosi na reakcije fragmentacije iona s parnim brojem elektrona koje podliježu zakonu pariteta mase i postoje 4 skupine reakcija fragmentacije koje su navedene u nastavku.¹⁸

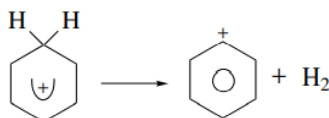
Prvu skupinu reakcija fragmentacije EE^+ čine reakcije cijepanja veze nakon koje slijedi migracija naboja:



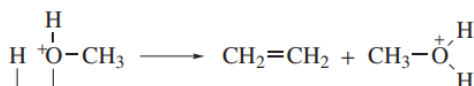
Druga skupina reakcija se temelji na cijepanju veze uz ciklizaciju te migraciju naboja:



Treća skupina reakcija fragmentacije se sastoji od cijepanja dviju veza cikličkog iona uz zadržavanje naboja:

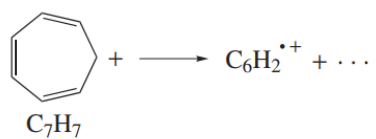


Četvrtu skupinu reakcija čini cijepanje dviju veza uz pregradnju i zadržavanje naboja:



Reakcije prve i druge skupine su najčešće prilikom fragmentacije iona bez uporabe kolizijske aktivacije (CID). Reakcija prve skupine vrlo često se događa kad je mjesto protoniranja manje bazično, dok su reakcije druge skupine gotovo jednake onima iz prve skupine, samo što je preferirana mogućnost ciklizacije ako postoji heteroatom na povoljnom mjestu.¹⁸

Osim reakcija fragmentacije koje podliježu pravilu pariteta mase, postoje i one koje ne podliježu tom pravilu. Fragmentacije iona s parnim brojem elektrona (EE) koje ne podliježu pravilu pariteta mase su mnogo rjeđe i teže ih je predvidjeti u odnosu na ranije opisane fragmentacije koje su klasificirane po *McLafferty*-ju. Do njih dolazi kod iona s proširenim π sustavima te fragmentaciju obično slijedi kompleksna pregradnja iona kao u slučaju tropilij kationa:



Prilikom ovakvih reakcija fragmentacije stabilnost radikala ima vrlo važnu ulogu.¹⁸

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i materijali

- 1-trans-cinamil-4-difenilmetilpiperazin, cinarizin ($C_{26}H_{28}N_2$), Biosynth Carbosynth, Staad, St Gallen, Švicarska
- β -ciklodekstrin, β -CD ($C_{42}H_{70}O_{35}$), CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, HP β CD ($C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_3H_7O)_n$) CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- metanol, LC-MS stupanj čistoće, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska
- deionizirana (ultračista) voda, LC-MS stupanj čistoće, Honeywell Burdick & Jackson, Charlotte, SAD
- mravlja kiselina, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD

3.2. Instrumentacija

- vezani sustav tekućinska kromatografija (*Agilent 1290 infinity II*) i spektrometrija masa (*Agilent 6550 iFunnel Q-TOF*)

Snimanje svih spektara masa pripremljenih otopina provedeno je uz injektiranja otopina u protok mobilne faze (engl. *flow injection analysis*, FIA) bez upotrebe kromatografske kolone. Sustav za uvođenje uzorka u spektrometar masa bio je tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti *Agilent 1290 infinity II* pri čemu se kao pokretna faza koristio sustav: 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (MF_A) i 0,1 % otopinom mravlje kiseline u metanolu (MF_B) u omjeru $MF_A:MF_B = 50:50$ uz protok od $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. Volumen injektiranja uzorka iznosio je $5,0 \text{ }\mu\text{L}$. Iako se analiza provodila bez upotrebe kolone, temperatura odjeljka za kolonu je podešena na $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Svi spektri masa snimani su u rasponu m/z 100 – 3200 pri rezoluciji od 2 GHz u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije. Početni parametri ionskog izvora su podešeni prema preporuci proizvođača instrumenta (tablica 3), a nakon toga su podešavani uz praćenje zastupljenosti jednostruko protoniranog iona kompleksa cinarizina s β -CD (m/z 1503,6023) analizom otopine molarnog omjera $n_{Cin}:n_{\beta-CD} = 1:1$, kako bi se utvrdili optimalni parametri ionskog izvora (tablica 4) koji su kasnije korišteni za snimanje svih spektara masa koji će biti prikazani u ovom diplomskom radu.

Tablica 3. Početni parametri ionskog izvora preporučeni od strane proizvođača instrumenta

Temperatura protočnog plina	250 °C
Protok protočnog plina	11 dm ³ min ⁻¹
Tlak raspršivača	25 psi
Potencijal kapilare	3 500 V
Potencijal mlaznice	0 V
Temperatura plina za desolvataciju	200 °C
Protok plina za desolvataciju	17 dm ³ min ⁻¹
Potencijal fragmentora	50 V

Tablica 4. Optimalni parametri utvrđeni nakon optimizacije ionskog izvora korištenjem otopine cinarizina i β-CD u molarnom omjeru $n_{\text{Cin}}:n_{\beta\text{-CD}} = 1:1$, pri koncentraciji obiju komponenti od $4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³

Temperatura protočnog plina	250 °C
Protok protočnog plina	11 dm ³ min ⁻¹
Tlak raspršivača	25 psi
Potencijal kapilare	3 500 V
Potencijal mlaznice	1000 V
Temperatura plina za desolvataciju	200 °C
Protok plina za desolvataciju	17 dm ³ min ⁻¹
Potencijal fragmentora	50 V

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa (MS/MS) provedeni su tehnikom CID u pozitivnom načinu rada ionskog izvora (te u manjem broju slučajeva u negativnom načinu rada) na identificiranim ionima od interesa (tablica 5) pri čemu se kao kolizijski plin koristio N₂, uz korištenje kolizijskih potencijala pri vrijednostima od 5,0 10,0, 20,0 i 40,0 V.

Tablica 5. Identificirani ioni od interesa na kojima su provedeni eksperimenti tandemne spektrometrije masa

Analit	m/z	Asignacija	t_R / min
Cinarizin (Cin)	369,2415	[Cin+H] ⁺	0,189
β-CD	1135,3783	[β-CD+H] ⁺	0,092
HPβCD	1483,6248	[DS6+H] ⁺	0,143
Kompleksi Cin+β-CD	1503,6042	[Cin+β-CD+H] ⁺	0,099
	752,3075	[Cin+β-CD+2H] ²⁺	0,099
	1319,4750	[Cin+2β-CD+2H] ²⁺	0,099
Kompleksi Cin+HPβCD	1851,8526	[Cin+DS6+H] ⁺	0,092
	1667,7377	[Cin+2DS6+2H] ²⁺	0,092

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

Za konstruiranje *breakdown* krivulja MS/MS spektri su snimani na identičan način, no uz korištenje većeg broja vrijednosti kolizijskih potencijala uz sukcesivno povećavanje. Prilikom snimanja MS/MS spektara za konstruiranje *breakdown* krivulje koja odgovara jednostruko protoniranom ionu cinarizina korišten je raspon kolizijskih potencijala od 0 do 26,0 V. U slučaju jednostruko protoniranog iona β -CD korišten je raspon kolizijskih potencijala od 0 do 30,0 V. U slučaju jednostruko protoniranog iona HP β CD DS 6 korišten je raspon kolizijskih potencijala od 0 do 42,0 V. U slučaju jednostruko protoniranog iona kompleksa cinarizina s β -CD korišten je raspon kolizijskih potencijala od 0 do 52,0 V, a u slučaju jednostruko protoniranog iona kompleksa cinarizina s HP β CD DS 6 korišten je raspon kolizijskih potencijala od 0 do 58,0 V.

Svi spektralni podaci obrađeni su korištenjem računalnog programa *Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0*. Sheme fragmentacija koje su pretpostavljene na temelju odgovarajućih MS/MS spektara izrađene su korištenjem računalnog programa *Chemdraw*, a odgovarajuće *breakdown* krivulje korištenjem računalnog programa *Microsoft Excel*.

3.3. Priprema ishodnih i radnih otopina

Pripremljena je ishodna otopina cinarizina u tikvici volumena 5 cm³ vaganjem 5,02 mg cinarizina te otapanjem u metanolu LC-MS stupnja čistoće pri čemu je konačna masena koncentracija dobivena otopine iznosila 1,004 mg cm⁻³. Iz ishodne otopine pripremljena je radna otopina cinarizina masene koncentracije 100 μ g cm⁻³ pipetiranjem 49,80 mm³ ishodne otopine u tikvicu volumena 5 cm³ koja je nadopunjena metanolom LC-MS stupnja čistoće do oznake.

Ishodna otopina β -ciklodekstrina pripremljena je otapanjem 5,0 mg u 5 cm³ deionizirane vode čime je dobivena otopina masene koncentracije 1,00 mg cm⁻³. Ishodna otopina hidroksipropil- β -ciklodekstrina pripremljena je otapanjem 4,99 mg spoja u 5 cm³ deionizirane vode čime je dobivena otopina masene koncentracije 0,998 mg cm⁻³.

3.4. Priprema mjernih otopina

Za potrebe podešavanja parametara ionskog izvora te za provjeru utjecaja molarnog omjera komponenti na zastupljenost kompleksa u plinskoj fazi pripremljene su otopine cinarizina s odabranim ciklodekstrinima (ukupnog volumena 1 cm³) u različitim molarnim omjerima uz održavanje koncentracije cinarizina konstantnom pri $4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³. Molarni omjeri

cinarizina i pojedinog ciklodekstrina ($n_{\text{Cin}}:n_{\text{CD}}$) u pripremljenim mjernim otopinama iznosili su 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5 u sustavu otapala metanol:voda = 1:1, pri čemu su korištena otapala LC-MS stupnja čistoće. Otopine pojedinačnih komponenti volumena 1 cm^3 su također pripremljene u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Prilikom pripreme mjernih otopina korištena je radna otopina cinarizina u metanolu masene koncentracije $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ te ishodne otopine odabranih ciklodekstrina u deioniziranoj vodi. Podrobniji opis pripreme otopina različitih molarnih omjera prikazan je u tablicama 6 i 7.

Tablica 6. Priprema mjernih otopina različitih molarnih omjera cinarizina i β -CD ($n_{\text{Cin}}:n_{\beta\text{-CD}}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 uz održavanje koncentracije cinarizina konstantnom pri $4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

molarni omjer $n_{\text{Cin}}:n_{\beta\text{-CD}}$	$c(\beta\text{-CD}) / \text{mol dm}^{-3}$	$V(\text{cinarizin}) / \text{mm}^3$	$V(\text{MeOH}) / \text{mm}^3$	$V(\beta\text{-CD}) / \text{mm}^3$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \text{mm}^3$
5:1	$8,80 \cdot 10^{-6}$	162,0	338,0	10,0	490,0
2:1	$2,20 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	25,0	475,0
1:1	$4,40 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	50,0	450,0
1:2	$8,80 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	100,0	400,0
1:5	$2,20 \cdot 10^{-4}$	162,0	338,0	250,0	250,0

Tablica 7. Priprema mjernih otopina različitih molarnih omjera cinarizina i HP β CD ($n_{\text{Cin}}:n_{\text{HP}\beta\text{CD}}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 uz održavanje koncentracije cinarizina konstantnom pri $4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

molarni omjer $n_{\text{Cin}}:n_{\text{HP}\beta\text{CD}}$	$c(\text{HP}\beta\text{CD}) / \text{mol dm}^{-3}$	$V(\text{cinarizin}) / \text{mm}^3$	$V(\text{MeOH}) / \text{mm}^3$	$V(\text{HP}\beta\text{CD}) / \text{mm}^3$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \text{mm}^3$
5:1	$8,80 \cdot 10^{-6}$	162,0	338,0	12,0	488,0
2:1	$2,20 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	31,0	469,0
1:1	$4,40 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	61,0	439,0
1:2	$8,80 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	123,0	377,0
1:5	$2,20 \cdot 10^{-4}$	162,0	338,0	307,0	193,0

Budući da je MS analizom navedenih otopina odlučeno da će se otopine cinarizina i odabranih ciklodekstrina pripremati u molarnom omjeru 1:1, otopine identičnog molarnog omjera, ali različitih koncentracija komponenti su pripremljene u sustavu otapala metanol:voda = 1:1, kako bi se provjerilo hoće li povećavanje ili smanjivanje koncentracija pojedinačnih komponenti imati značajan utjecaj na zastupljenost iona kompleksa u plinskoj fazi. Pripremljene su otopine cinarizina i odabranih ciklodekstrina u kojima su koncentracije

komponenti iznosile: $4,40 \cdot 10^{-6}$, $8,80 \cdot 10^{-6}$, $2,20 \cdot 10^{-5}$, $4,40 \cdot 10^{-5}$ i $8,80 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³. Uz njih su pripremljene i odgovarajuće otopine pojedinačnih komponenti. Prilikom pripreve mjernih otopina korištena je radna otopina cinarizina u metanolu masene koncentracije 100 µg cm⁻³ te ishodne otopine odabranih ciklodekstrina u deioniziranoj vodi. Podrobniji opis pripreme otopina molarnog omjera 1:1, ali različitih koncentracija cinarizina i odabranih ciklodekstrina prikazan je u tablicama 8 i 9.

Tablica 8. Priprema otopina mjernih otopina cinarizina i β-CD u molarnom omjeru $n_{\text{Cin}}:n_{\beta\text{-CD}}=1:1$ pri različitim koncentracijama obje komponente

c (cinarizin) / mol dm ⁻³	c (β-CD) / mol dm ⁻³	V (cinarizin) / mm ³	V (MeOH) / mm ³	V (β-CD) / mm ³	V (H ₂ O) / mm ³
$4,40 \cdot 10^{-6}$	$4,40 \cdot 10^{-6}$	16,0	484,0	5,0	495,0
$8,80 \cdot 10^{-6}$	$8,80 \cdot 10^{-6}$	32,0	468,0	10,0	490,0
$2,20 \cdot 10^{-5}$	$2,20 \cdot 10^{-5}$	81,0	419,0	25,0	475,0
$4,40 \cdot 10^{-5}$	$4,40 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	50,0	450,0
$8,80 \cdot 10^{-5}$	$8,80 \cdot 10^{-5}$	324,0	176,0	100,0	400,0

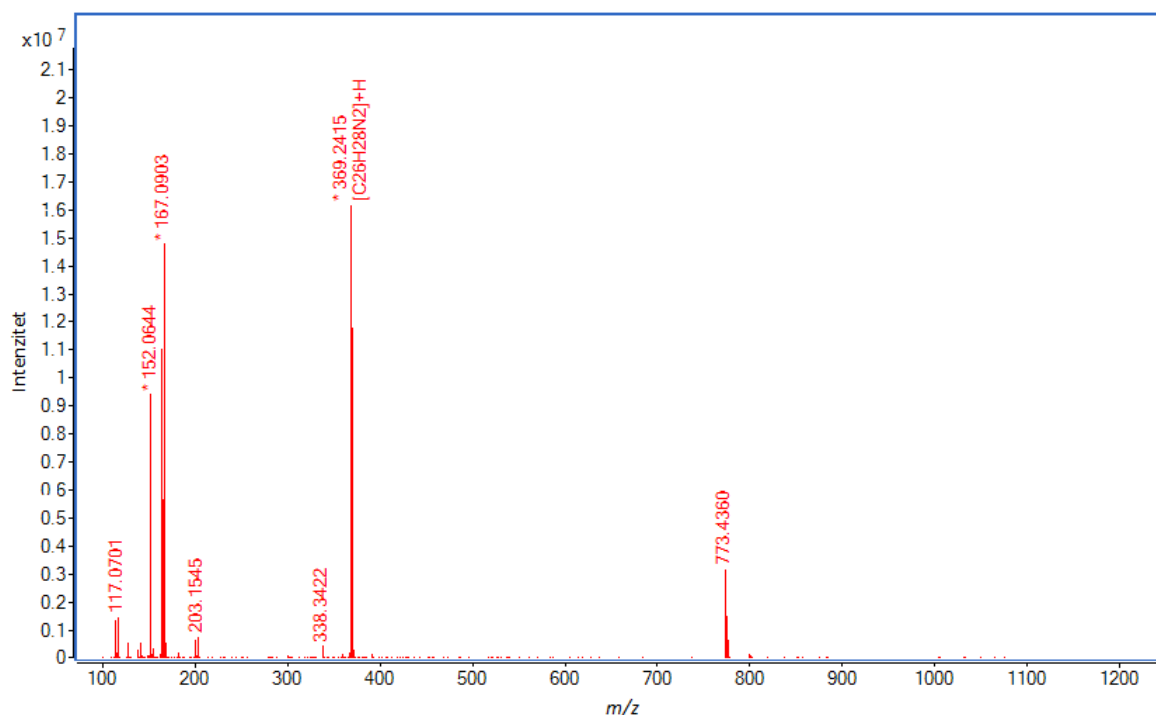
Tablica 9. Priprema otopina mjernih otopina cinarizina i HPβCD u molarnom omjeru $n_{\text{Cin}}:n_{\text{HP}\beta\text{CD}}=1:1$ pri različitim koncentracijama obje komponente

c (cinarizin) / mol dm ⁻³	c (HPβCD) / mol dm ⁻³	V (cinarizin) / mm ³	V (MeOH) / mm ³	V (HPβCD) / mm ³	V (H ₂ O) / mm ³
$4,40 \cdot 10^{-6}$	$4,40 \cdot 10^{-6}$	16,0	484,0	6,0	496,0
$8,80 \cdot 10^{-6}$	$8,80 \cdot 10^{-6}$	32,0	468,0	12,0	488,0
$2,20 \cdot 10^{-5}$	$2,20 \cdot 10^{-5}$	81,0	419,0	31,0	469,0
$4,40 \cdot 10^{-5}$	$4,40 \cdot 10^{-5}$	162,0	338,0	61,0	439,0
$8,80 \cdot 10^{-5}$	$8,80 \cdot 10^{-5}$	324,0	176,0	123,0	377,0

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza otopine cinarizina spektrometrijom masa

Spektr masa otopine cinarizina u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 snimljen je u području vrijednosti m/z od 100 do 3200. Dobiveni spektr masa prikazan je grafički (Slika 12) i tablično (Tablica 10). U tablici se nalaze izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti signala te njihova asignacija. Spektri su snimljeni korištenjem ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada, a kao analizator masa korišten je već spomenuti hibridni kvadrupolni analizator masa s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta. Najintenzivniji signal, odnosno bazni signal u spektru masa cinarizina pripada jednostruko protoniranoj molekuli cinarizina pri vrijednosti m/z 369,2415. Signal pri vrijednosti m/z 167,0903 koji odgovara jednostruko nabijenom fragmentnom ionu, odnosno difenilmetilnom kationu $[C_{13}H_{11}]^+$ ima približno jednak intenzitet. Moguće je da je ovaj ion posljedica fragmentacije molekule cinarizina unutar ionskog izvora. Signal vidljiv pri vrijednosti m/z 152,0644 nije uspješno asigniran, iako je uočen i prilikom fragmentacije molekule cinarizina prilikom provođenja eksperimenata tandemne spektrometrije masa. Pretpostavlja se da bi mogao potjecati od difenilmetilnog dijela molekule budući da je ovaj signal primijećen u spektru masa difenilmetana koji je dobiven ionizacijom elektronima, a odgovarao je kationskom radikalumu bifenilena $[C_{12}H_8]^{+\cdot}$.²⁰ Signal jednostruko nabijenog iona pri vrijednosti m/z 773,4360 također nije asigniran, iako je kasnije nakon analize tandemnom spektrometrijom masa pretpostavljeno kako se radi o dimeru cinarizina. Isprva je ovaj signal pripisan jednostruko protoniranom aduktu dimera cinarizina s dvije molekule vode, no naknadnom usporedbom eksperimentalno određenih i teorijskih točnih masa utvrđena je prevelika razlika u masi. Osim navedenih intenzivnih signala, u spektru masa vidljivi su i manje intenzivni signali koji odgovaraju ionima fragmenata molekule cinarizina.



Slika 12. Spektar masa otopine cinarizina ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 50 %:50 %. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

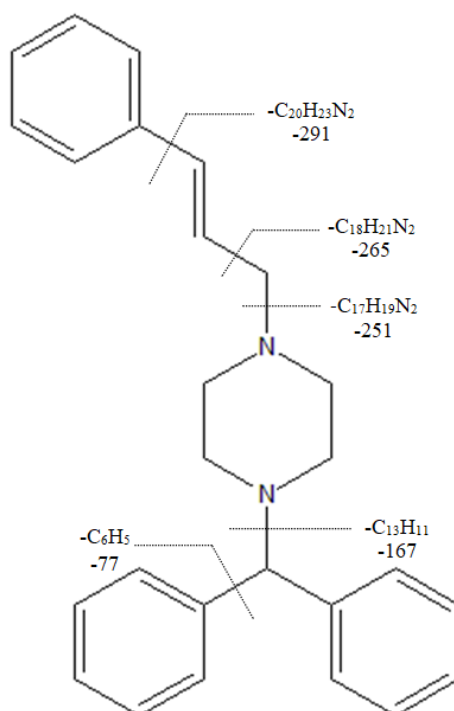
Tablica 10. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopine cinarizina ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

Izmjeren m/z	Točan m/z	Relativan intenzitet / %	Asignacija
773,4360	/	19,51	Nije asigniran
369,2415	365,2325	100,00	$[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2+\text{H}]^+$
203,1545	203,1543	4,67	$[\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2+\text{H}]^+$
201,1389	201,1386	3,97	$[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2]^+$
167,0903	167,0855	91,39	$[\text{C}_{13}\text{H}_{11}]^+$
152,0644	/	58,21	Nije asigniran
117,0701	117,0699	8,99	$[\text{C}_9\text{H}_9]^+$

4.1.1. MS/MS analiza odabranih iona cinarizina

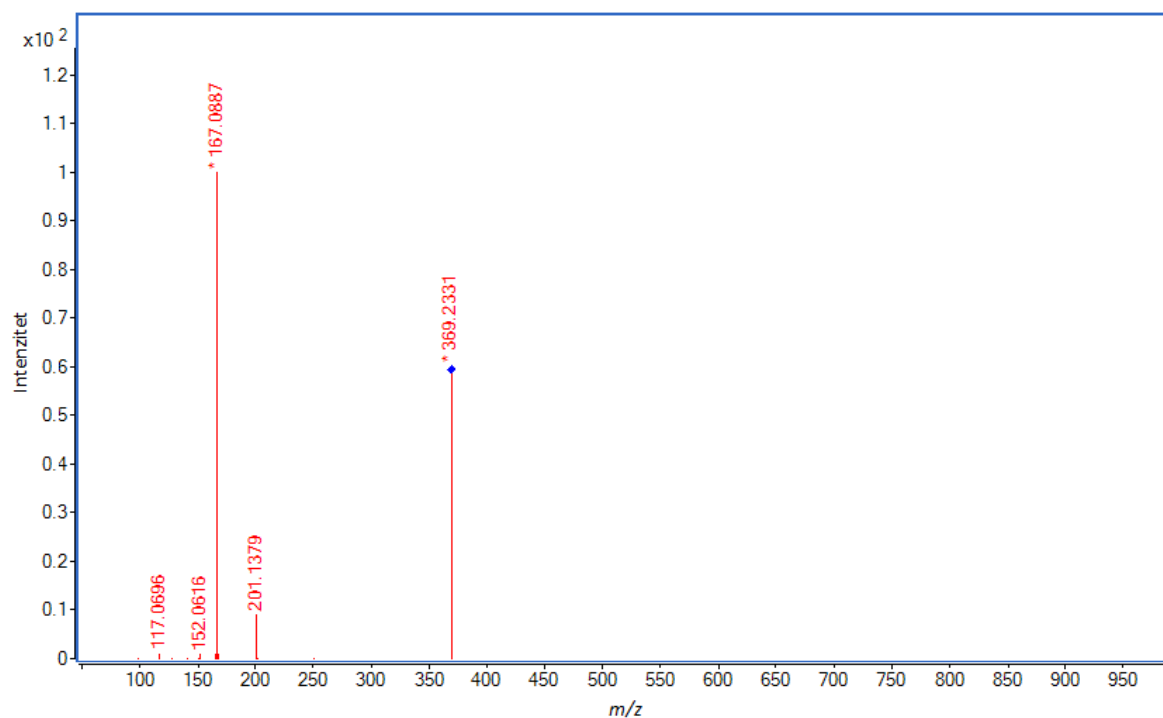
Na temelju MS analize otopine cinarizina odabrani su ioni na kojima su provedeni eksperimenti tandemne spektrometrije masa. MS/MS spektri odabranih iona snimani su u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 1000 jedinica. Ioni analizirani prilikom eksperimenata tandemne spektrometrije masa generirani su ionizacijom elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

Odabrana su dva iona za provedbu eksperimenata tandemne spektrometrije masa, a radi se o jednostruko protoniranom molekulskom ionu cinarizina m/z vrijednosti 369,2415 te o neidentificiranom ionu koji je uočen pri m/z vrijednosti 773,4360. Teorijski moguća cijepanja molekule cinarizina prikazana su na slici 13. Na navedenoj slici nije prikazano cijepanje dvostruke veze ni bezenskih prstenova jer je takva fragmentacija malo vjerojatna obzirom na stabilnost navedenih veza. Iako su MS/MS spektri koji odgovaraju jednostruko protoniranom molekulskom ionu cinarizina pronađeni prilikom pretrage relevantnih znanstvenih publikacija^{21,22}, detaljna shema fragmentacije ovog spoja nije navedena.



Slika 13. Teorijski moguća cijepanja molekule cinarizina te pridružene nominalne mase

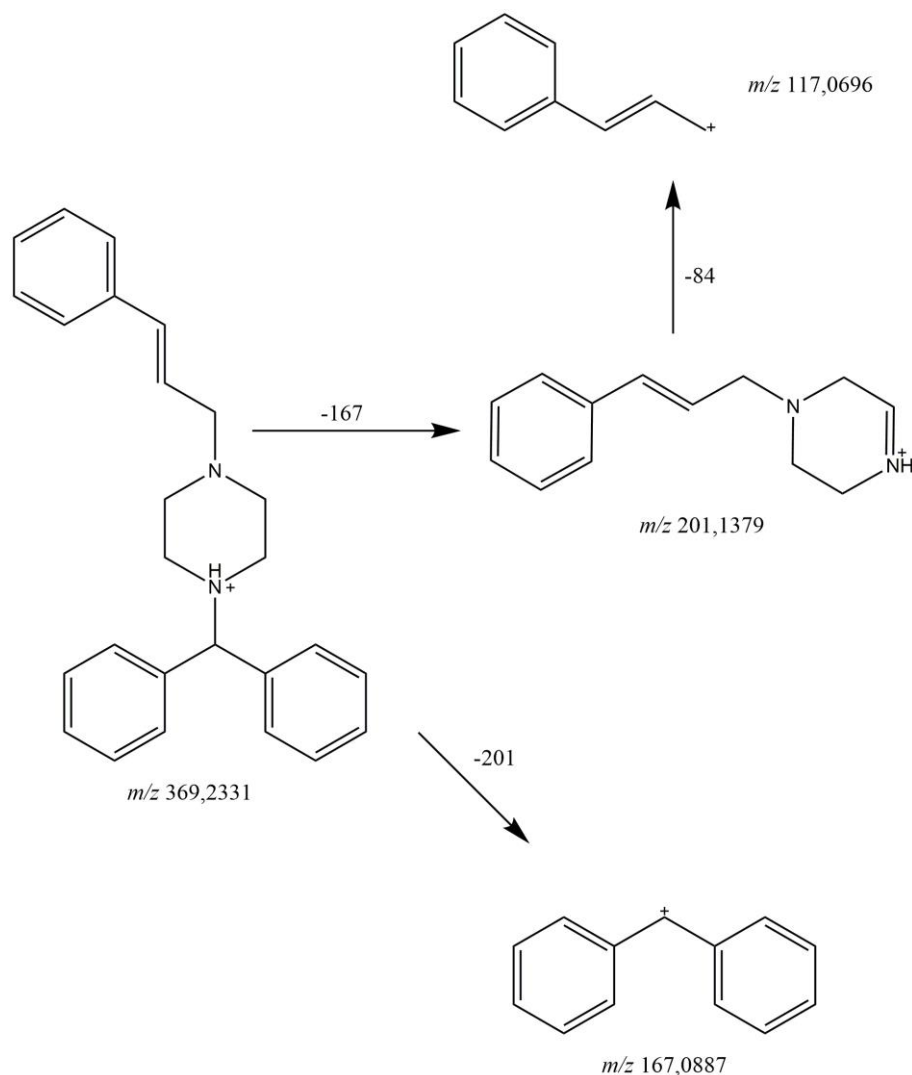
Primjenom više različitih kolizijskih potencijala provedena je fragmentacija jednostruko protoniranog molekuskog iona cinarizina, a spektar masa dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 10,0 V prikazan je na slici 14. Spektri masa generirani primjenom kolizijskih potencijala u iznosu od 5,0, 20,0 i 40 V prikazani su u dodatku na slikama D1, D2 i D3. Svi spektari masa prikazani su i u tabličnom obliku (tablica 11). Primjenom potencijala od 10,0 V dolazi do fragmentiranja molekule cinarizina pri čemu se najintenzivniji signal u MS/MS nalazi pri vrijednosti m/z od 167,0887, a odgovara difenilmetilnom kationu $[C_{13}H_{11}]^+$, dok signal roditeljskog iona pri vrijednosti m/z 369,2331 ima manji relativni intenzitet. Signal iona koji je uočen pri vrijednosti m/z od 201,1379 pripada fragmentnom ionu molekule cinarizina koji zaostaje nakon fragmentacije već spomenutog difenilmetilnog dijela molekule, a njegov relativni intenzitet je u svim MS/MS nizak. Osim navedenih signala u tandemnom spektru masa vidljivi su i manji signali fragmentnih iona pri vrijednostima m/z 152,0616 te 117,1696 čiji relativni intenziteti povećanjem iznosa kolizijskog potencijala na 20,0 V, odnosno 40,0 V raste. S druge strane relativni intenzitet roditeljskog iona pada te pri najvećem korištenom iznosu kolizijskog potencijala postaje zanemariv što je vidljivo na već spomenutim MS/MS spektrima u dodatku. Navedeni fragmentni ion pri vrijednosti m/z 152,0616 nije u potpunosti assigniran, kao što je već napomenuto. Nadalje signal pri vrijednosti m/z 117,0696 pripada jednostruko nabijenom fragmentu molekule cinarizina $[C_9H_9]^+$ koji nastaje cijepanjem veze između ugljika i dušika koji pripada piperazinskom prstenu, odnosno molekula cinarizina je izgubila difenilmetilni dio te piperazinski prsten pri čemu je nastao navedeni jednostruko nabijeni fragment. Odgovarajuća shema fragmentacije molekule cinarizina prikazana je na slici 15.



Slika 14. MS/MS spektar jednostruko nabijenog molekuskog iona cinarizina, $[M+H]^+$ (m/z 369,2415). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V

Tablica 11. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M+H]^+$ (m/z 369,2415). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

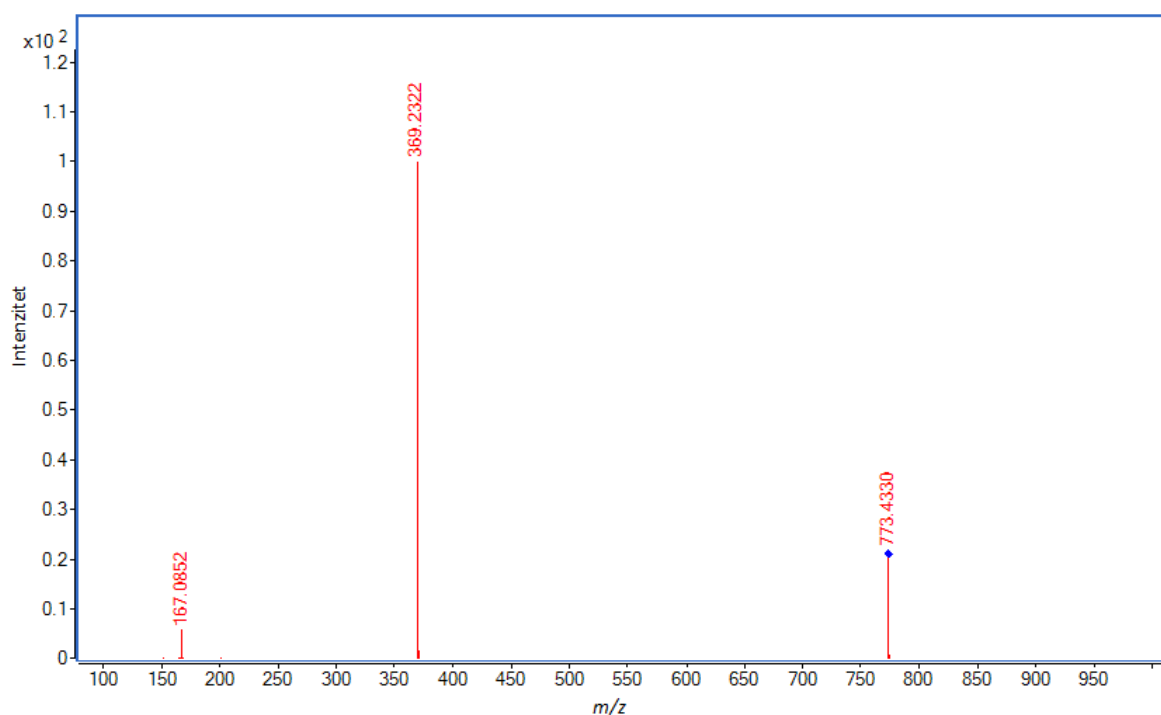
Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
369,2331	100,00	60,40	0,26	0,00	$[M+H]^+$
201,1379	4,08	9,19	2,52	0,14	$[C_{13}H_{17}N_2]^+$
167,0887	66,59	100,00	100,00	100,00	$[C_{13}H_{11}]^+$
152,0616	0,50	1,03	2,63	31,91	Nije asigniran
117,0696	0,34	1,15	3,60	3,92	$[C_9H_9]^+$



Slika 15. Shema fragmentiranja jednostruko protoniranog molekuskog iona cinarizina ($[M+H]^+$, $m/z=369,2415$)

Nakon fragmentacije jednostruko protoniranog molekuskog iona cinarizina, proveden je eksperiment tandemne spektrometrije masa na ionu vrijednosti m/z od 773,4360 uz korištenje više različitih iznosa kolizijskog potencijala, a dobiveni spektri masa prikazani su tablično (tablica 12). Grafički prikaz MS/MS spektra koji je dobiven uz korištenje kolizijskog potencijala od 10,0 V prikazan je na slici 16, dok se MS/MS spektri dobiveni korištenjem kolizijskih potencijala od 5,0, 20,0 i 40,0 nalaze u dodatku (slike D4, D5 te D6). Već i primjenom malog iznosa kolizijskog potencijala dolazi do fragmentacije roditeljskog iona pri čemu je najizraženiji signal u spektru pri vrijednosti m/z od 369,2322 što odgovara jednostruko protoniranom ionu cinarizina. Nadalje, vidljiv je signal iona pri vrijednosti m/z od 167,0852 koji odgovara već ranije opisanom fragmentnom ionu karakterističnom za cinarizin.

Povećanjem iznosa kolizijskog potencijala u MS/MS spektru uočava se i signal pri vrijednosti m/z od 201,1379 koji također odgovara jednom od opisanih fragmentnih iona molekule cinarizina. Obzirom da fragmentacija roditeljskog iona daje kao najzraženiji signal jednostruko protonirani ion cinarizina te njegove fragmente, pretpostavljeno je kako se radi o dimeru cinarizina, no roditeljski ion primijećen pri vrijednosti m/z 773,4360 nije egzaktno asigniran.

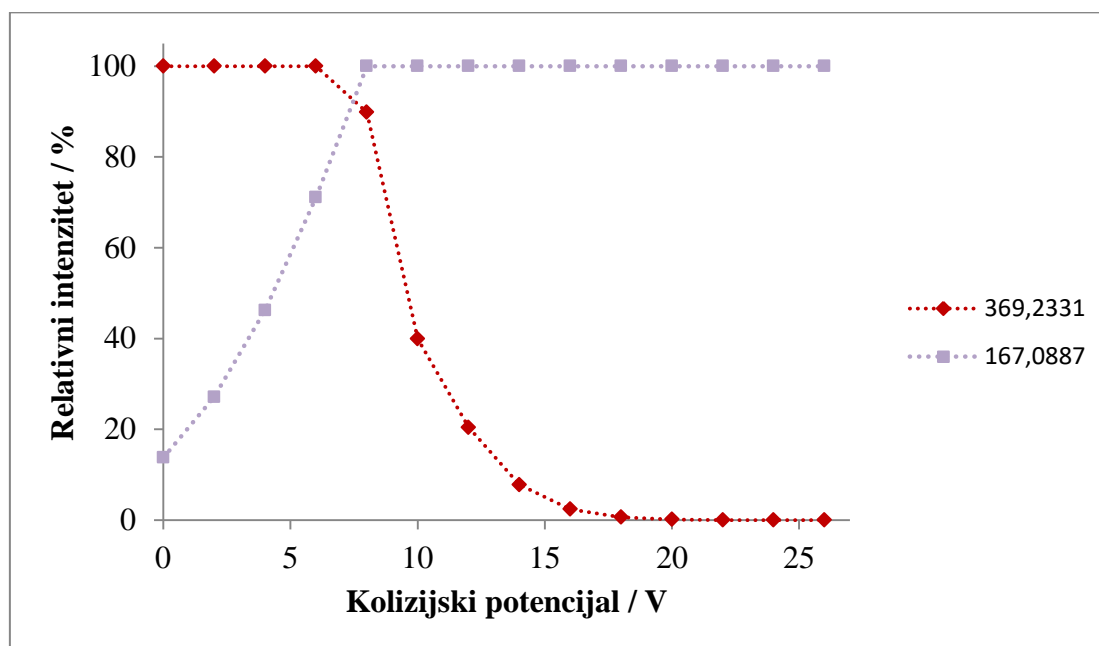


Slika 16. MS/MS spektar iona m/z 773,4360. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V

Tablica 12. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektara iona vrijednosti m/z 773,4360. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
773,4330	100,00	21,93	0,00	0,00	Nije asigniran
369,2322	68,50	100,00	100,00	4,32	$[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2+\text{H}]^+$
201,1379	0,19	0,29	1,59	2,55	$[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2]^+$
167,0852	4,49	5,67	23,99	100,00	$[\text{C}_{13}\text{H}_{11}]^+$

Nakon provedbe MS/MS eksperimenata na jednostruko protoniranom molekulskom ionu cinarizina, proveden je još jedan eksperiment tandemne spektrometrije masa uz sukcesivno povećavanje kolizijskog potencijala u rasponu od 0 do 26,0 V. Iz dobivenih MS/MS spektara očitani su relativni intenziteti signala jednostruko protoniranog molekulskog iona cinarizina te signala najzastupljenijeg fragmentnog iona pri vrijednosti m/z od 167,0887 te je iz navedenih podataka konstruiran graf ovisnosti relativne zastupljenosti navedenih iona o primijenjenom kolizijskom potencijalu, odnosno tzv. *breakdown* krivulja (slika 17). Iz *breakdown* krivulje vidljivo je kako povećanjem iznosa kolizijskog potencijala dolazi do potpune fragmentacije molekule cinarizina pri čemu dominantno nastaje već opisani fragment difenilmetilnog kationa, $[C_{13}H_{11}]^+$. Navedeni fragment predstavlja glavni ion produkt fragmentacije molekule cinarizina.

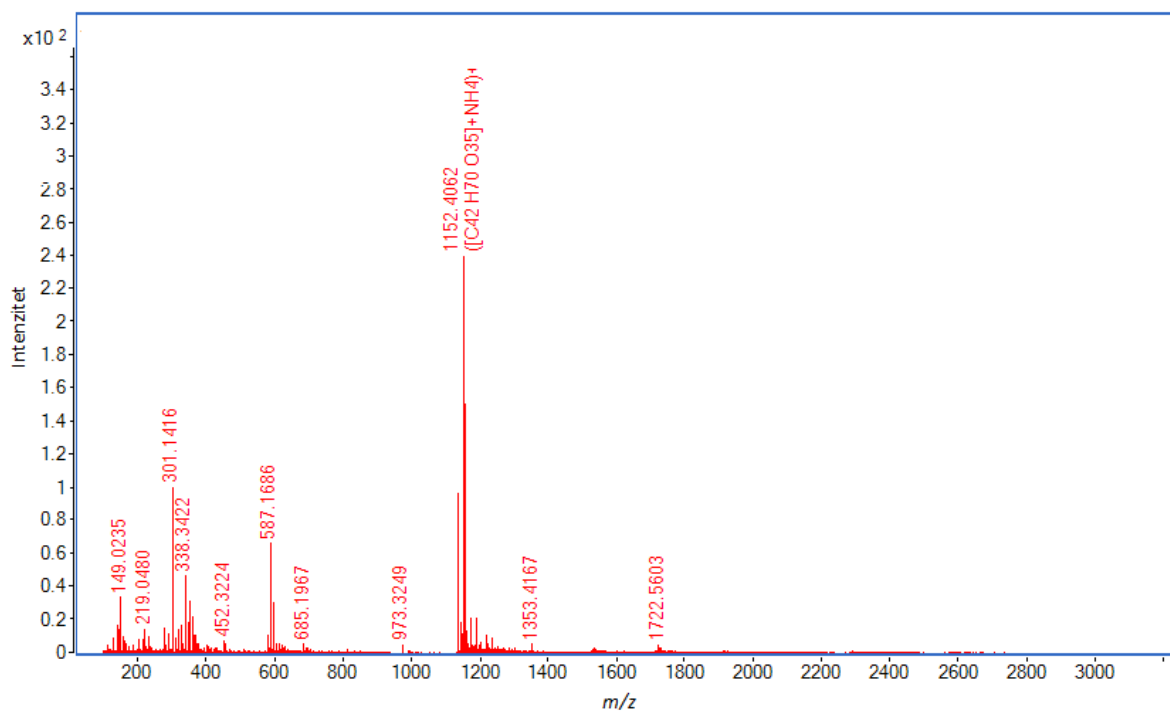


Slika 17. *Breakdown* krivulja jednostruko protoniranog molekulskog iona cinarizina ($m/z = 369,2331$) i krivulja nastanka iona fragmentnog iona ($m/z = 167,0887$)

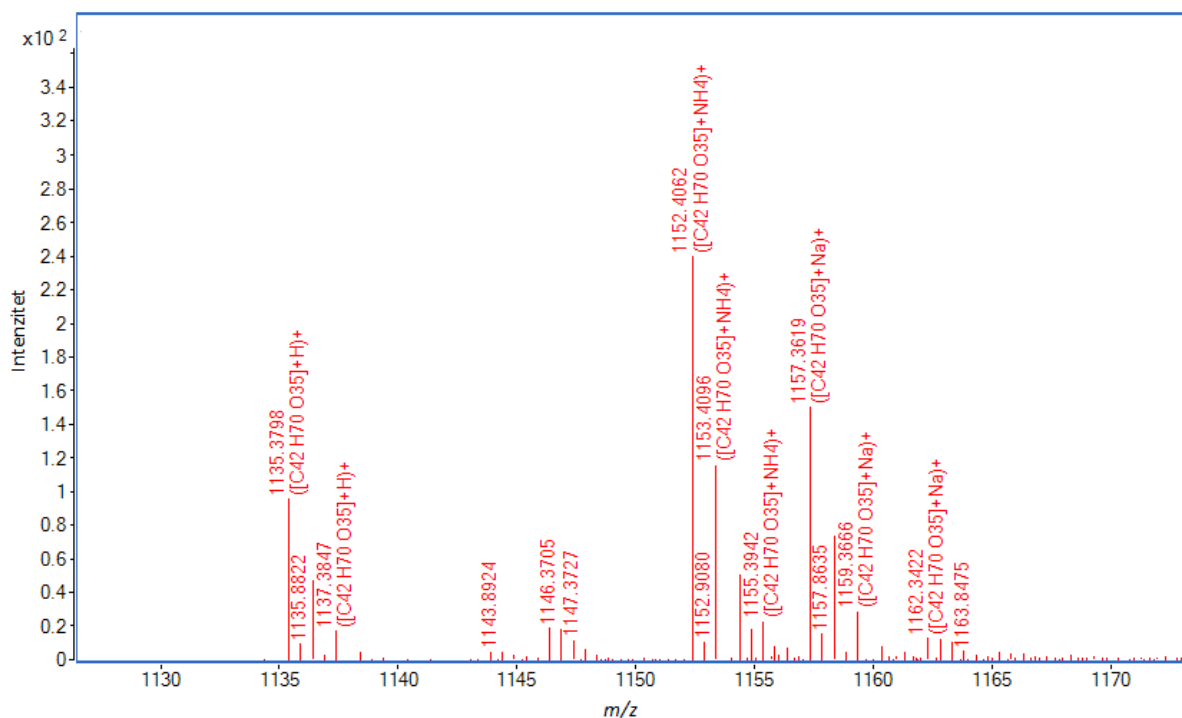
4.2. Analiza otopine β -ciklodekstrina spektrometrijom masa

Spektar masa otopine β -ciklodekstrina u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 snimljen je u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 3200. Otopina β -CD analizirana je korištenjem ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom i u negativnom načinu rada. Spektar masa snimljen korištenjem ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada prikazan je grafički na

slici 18 i tablično u tablici 13, a na slici 19 prikazan je uvećani dio spektra u rasponu vrijednosti m/z od 1130 do 1170. Kao bazni signal ističe se signal pozitivno nabijenog molekuskog iona koji naboj dobiva od vezanog amonijevog iona $[M+NH_4]^+$ pri m/z 1152,4062. Uz bazni signal, izražen je i signal dvostruko nabijenog molekuskog iona pri vrijednosti m/z 587,1686 u obliku adukta s kalijem i protonom, $[M+K+H]^{2+}$. Nadalje, vidljivi su signali manjih relativnih intenziteta koji odgovaraju molekulskim ionima u obliku adukta s protonom (m/z 1135,3798), natrijem (m/z 1157,3619) i kalijem (m/z 1173,3333) te fragmentni ioni molekule β -ciklodekstrina. Osim signala koji potječu od molekule β -ciklodekstrina, vidljivi su i signali uobičajenih nečistoća MS spektara poput onog pri vrijednosti m/z 301,1416 koji odgovara natrijevom aduktu diizobutil ftalata, $[C_{16}H_{22}O_4+Na]^+$ ili jednostruko protoniranog iona ftalnog anhidrida pri, $[C_8H_4O_3+H]^+$ pri m/z 149,0235.



Slika 18. Spektar masa otopine β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

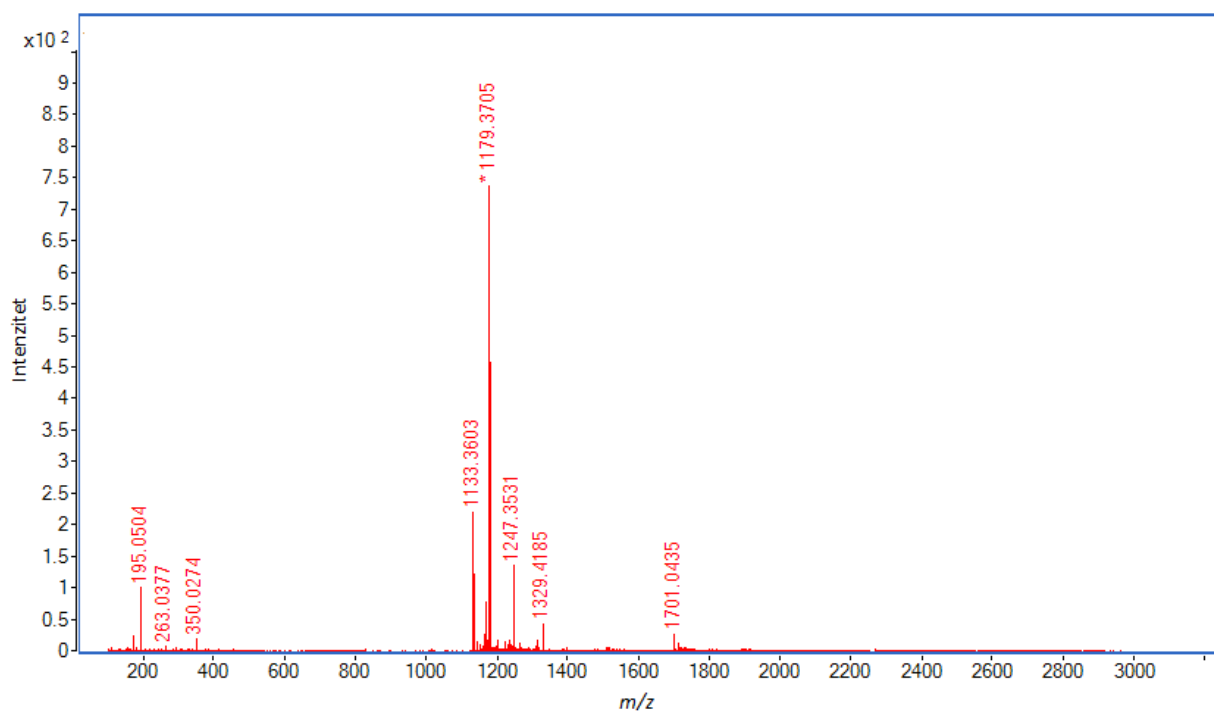


Slika 19. Spektar masa otopine β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u području m/z 1130,0000 – 1170,0000

Tablica 13. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopine β -ciklodekstrina ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI⁺, napon fragmentora 50,0 V

Izmjeren m/z	Točan m/z	Relativan intenzitet / %	Asignacija
1219,3310	1219,3384	4,27	[M+HCOOH+K] ⁺
1173,3333	1173,3329	8,82	[M+K] ⁺
1157,3619	1157,3590	62,48	[M+Na] ⁺
1152,4051	1152,4036	100,00	[M+NH ₄] ⁺
1146,3705	1146,3680	7,75	[2M+Na+H] ²⁺
1135,3783	1135,3770	39,99	[M+H] ⁺
973,3249	973,3242	2,08	[M-C ₆ H ₁₀ O ₅ +H] ⁺
606,1426	606,1480	2,14	[M+2K] ²⁺
598,1572	598,1611	1,54	[M+K+Na] ²⁺
587,1672	587,1701	27,51	[M+K+H] ²⁺
579,1785	579,1831	4,27	[M+Na+H] ²⁺

Spektar masa otopine β -ciklodekstrina dobiven korištenjem ionizacije elektroraspršenjem u negativnom načinu prikazan je grafički na slici 20 i tablično u tablici 14. Ovako dobiven spektar masa sadrži nekoliko značajnih signala od kojih treba izdvojiti signal molekulskog iona u obliku adukta s formijatnim anionom, $[M+HCOO]^-$ koji je ujedno i bazni signal ovog MS spektra. Pored baznog signala vidljiv je i signal deprotoniranog molekulskog iona $[M-H]^-$, dok su ostali signali u spektru masa manjeg intenziteta.



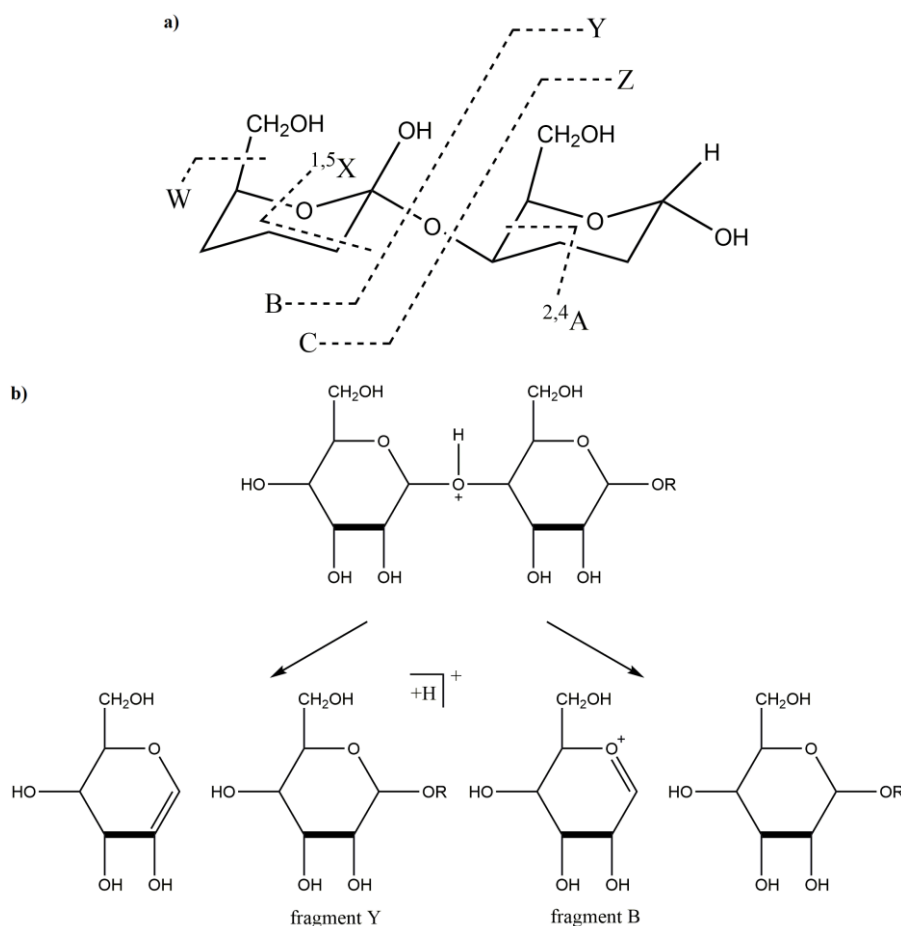
Slika 20. Spektar masa otopine β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V

Tablica 14. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopine β -ciklodekstrina ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V

Izmjeren m/z	Točan m/z	Relativan intenzitet / %	Asignacija
1179,3705	1179,3680	100,00	$[M+HCOO]^-$
1169,3381	1169,3392	10,37	$[M+Cl]^-$
1133,3603	1133,3625	25,98	$[M-H]^-$

4.2.1. MS/MS analiza odabranih iona β -ciklodekstrina

Općenito prihvaćenu nomenklaturu za opisivanje fragmentacije oligosaharidnih molekula prilikom provođenja eksperimenata tandemne spektrometrije masa dali su Damon i Costello.¹⁸ Kod oligosaharida je prilikom cijepanja glikozidne veze moguće identificirati reducirajući i nereducirajući kraj molekule. Damon i Costello su u skladu s tim predložili nomenklaturu prema kojoj se fragmenti kod kojih naboj zaostaje na nereducirajućem kraju nazivaju A, B i C fragmentima, a fragmenti kod kojih naboj zaostaje na reducirajućem kraju nazivaju X, Y i Z fragmentima, ovisno o tome cijepa li se glikozidna veza ili dolazi do fragmentacije prstena (slika 20). Broj u indeksu označava fragmentiranu glikozidnu vezu, dok broj u eksponentu A ili X fragmenta označava odgovarajuće cijepanje veze prstena.



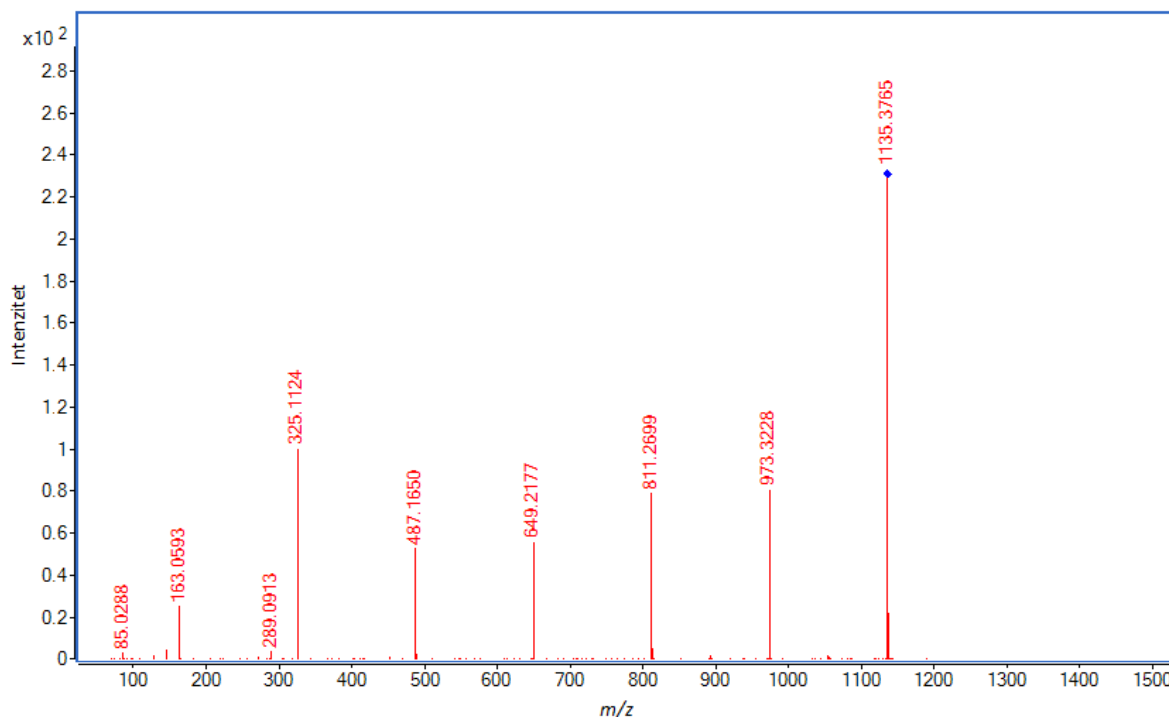
Slika 20. – a) Nomenklatura fragmentacije oligosaharida prema Domonu i Costellu, b) mehanizam nastajanja iona fragmenata tipa Y i B

Budući da su ciklodekstrini cikličke oligosaharidne molekule, reducirajući i nereducirajući kraj molekule je nemoguće identificirati (ne postoji početak ni kraj prstena). Stoga je uobičajenu nomenklaturu koju su predložili Domon i Costello u ovom slučaju nemoguće primijeniti. Uobičajen način fragmentacije β -CD uključuje cijepanje glikozidne veze i gubitak glukopiranoznih jedinica (162 Da), što će biti primjetno i u MS/MS spektrima koji će biti kasnije prikazani. Prema tome, jasno je kako je nemoguće identificirati je li gubitak glukopiranozne podjedinice zapravo rezultat cijepanja koje vodi do nastanka B, C, Y ili Z fragmenata. Trenutno još uvijek ne postoji neka prikladna i općenito prihvaćena nomenklatura koja bi opisivala karakteristične fragmente koji nastaju cijepanjem cikličkih oligosaharida poput ciklodekstrina.²³

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa provedeni su u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije i to na jednostruko nabijenim molekulskim ionima: $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ i $[M+HCOO]^-$ pri vrijednostima kolizijskih potencijala od 5,0 do 40,0 V.

Primjenom više iznosa kolizijskog potencijala na jednostruko protonirani molekulski ion dobiveni su tandemni spektri masa pri čemu je spektar masa uz korištenje kolizijskog potencijala od 10,0 V prikazan grafički na slici 21, dok su spektri masa dobiveni primjenom ostalih iznosa kolizijskog potencijala prikazani u dodatku (slika D7 i slika D8). Navedeni MS/MS spektri su prikazani i u tablici 15. Fragmentacijom molekulskog iona β -ciklodekstrina uočavaju se ioni fragmenti čije se vrijednosti m/z razlikuju za 162 Da, odnosno za cjelobrojni umnožak ove vrijednosti što je posljedica gubitaka određenog broja glukopiranoznih jedinica. Bazni signal u MS/MS spektru koji je dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 10,0 V odgovara jednostruko protoniranom ionu β -CD, $[M+H]^+$, dok najintenzivniji signal iona fragmenta odgovara jednostruko nabijenom dimeru glukopiranoze. Povećanjem iznosa kolizijskog potencijala relativni intenzitet signala navedenog fragmenta raste te postaje bazni signal prilikom primjene kolizijskih potencijala od 20,0 i 40,0 V, dok relativni intenzitet signala molekulskog iona opada, što je vidljivo iz već spomenutih MS/MS spektara u dodatku. Uz već spomenute karakteristične fragmente koji odgovaraju gubicima od 162 Da, u MS/MS spektrima koji su dobiveni pri višim iznosima kolizijskih potencijala uočavaju se ioni pri m/z 145,0492 i 127,0388 koji odgovaraju gubicima jedne, odnosno dvije molekule vode od iona m/z 163,0593 koji odgovara jednoj glukopiranoznoj jedinici. MS/MS eksperimenti prema tome ukazuju kako je jednostruko nabijeni dimer glukoze kao glavni ion produkt

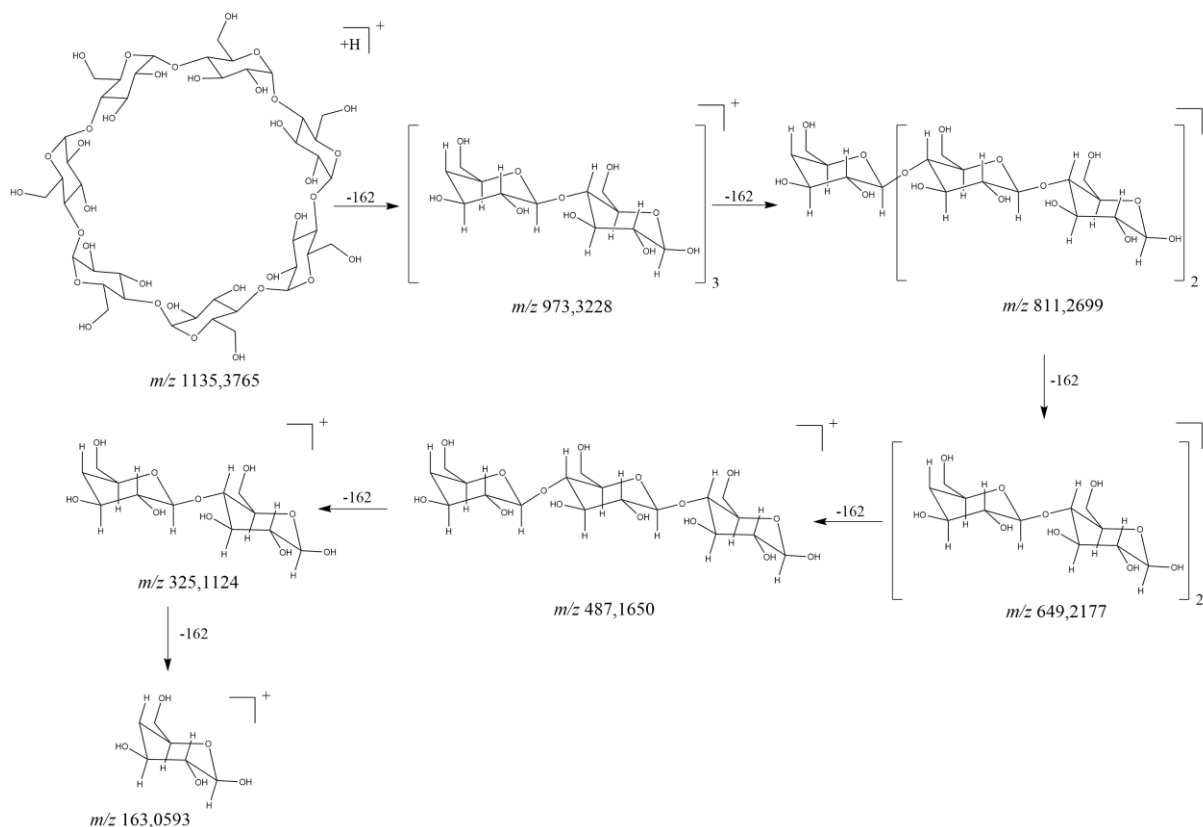
fragmentacije molekuskog iona β -CD. Pretpostavljena shema fragmentacije je prikazana na slici 22.



Slika 21. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1135,3783). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V

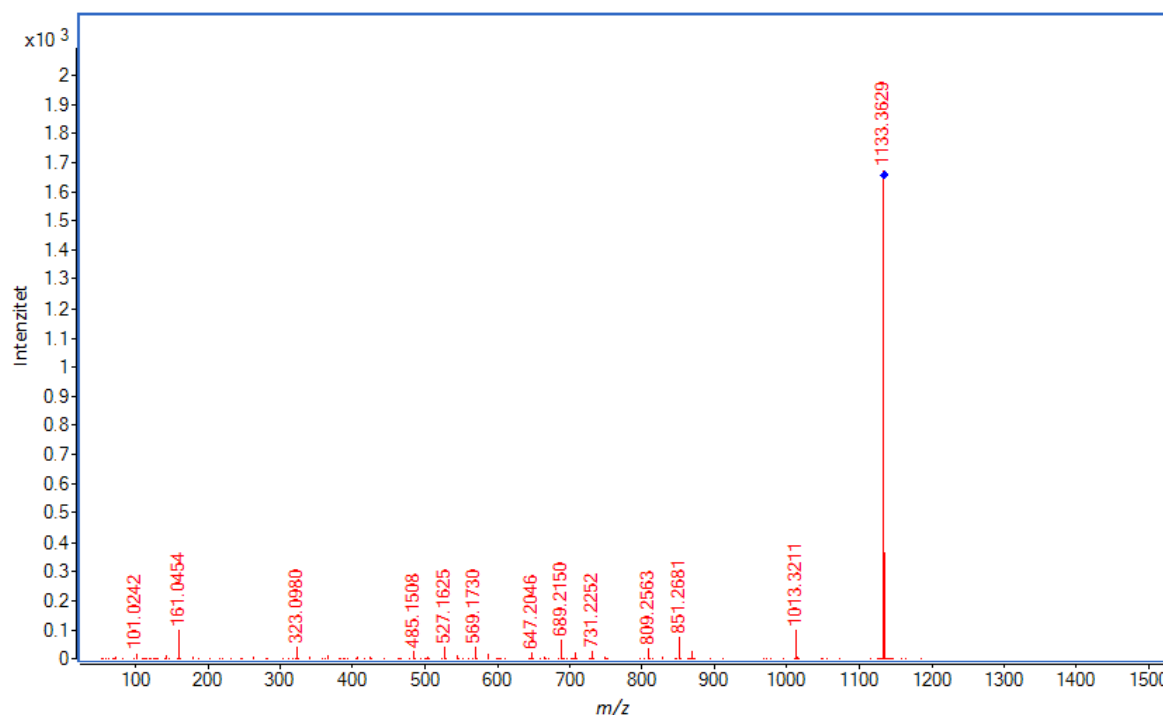
Tablica 15. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M+H]^+$ (m/z 1135,3783). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %			Asignacija signala
	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
1135,3765	100,00	4,17	0,00	$[M+H]^+$
973,3228	34,58	9,46	0,00	$[1135,3765-C_6H_{10}O_5]^+$
811,2699	33,86	18,09	0,00	$[973,3228-C_6H_{10}O_5]^+$
649,2177	24,03	27,81	0,54	$[811,2699-C_6H_{10}O_5]^+$
487,1650	22,52	35,54	3,43	$[649,2177-C_6H_{10}O_5]^+$
325,1124	42,91	100,00	100,00	$[487,1650-C_6H_{10}O_5]^+$
163,0593	10,83	29,20	50,47	$[325,1124-C_6H_{10}O_5]^+$



Slika 22. Pretpostavljena shema fragmentacije jednostruko protoniranog molekuskog iona β -CD

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa provedeni su i u negativnom načinu ioniziranja na deprotoniranom molekuskom ionu, $[M-H]^-$, a MS/MS spektar dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 40,0 V je prikazan grafički na slici 23, dok su MS/MS spektri dobiveni korištenjem kolizijskih potencijala od 5,0, 10,0 i 20,0 V prikazani u dodatku (slika D9, slika D10 i slika D11). Svi MS/MS spektri su prikazani i u tabličnom obliku (tablica 16). Unatoč primjeni visoke vrijednosti kolizijskog potencijala bazni signal u prikazanom MS/MS spektru je signal deprotoniranog molekuskog iona $[M-H]^-$, dok su relativni intenziteti iona fragmenata izuzetno niski. Signali iona fragmenata, slično kao i u slučaju opisane fragmentacije protoniranog molekuskog iona β -CD, se razlikuju za 162 Da, odnosno za cjelobrojni umnožak ove vrijednosti što je posljedica gubitaka određenog broja glukopiranoznih jedinica.



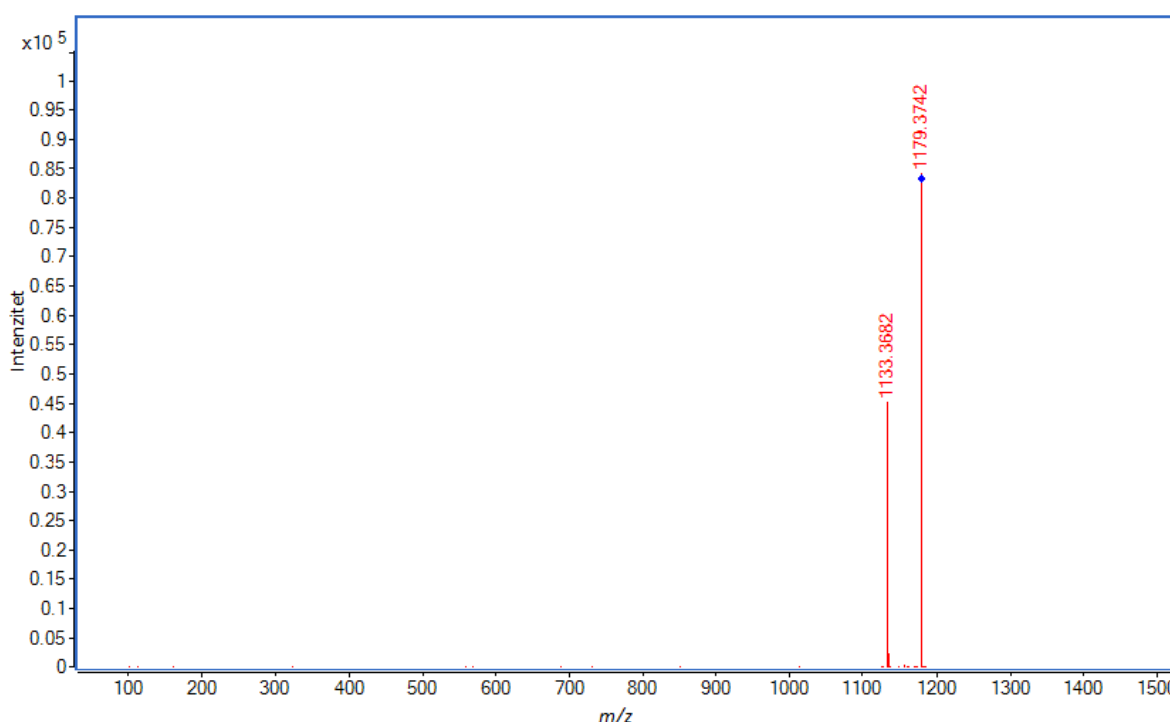
Slika 23. MS/MS spektrar iona $[M-H]^-$ (m/z 1133,3603). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V

Tablica 16. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M-H]^-$ (m/z 1133,3603). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
1133,3629	100,00	100,00	100,00	100,00	$[M-H]^-$
971,3082	0,00	0,00	0,12	0,22	$[1133,3629-C_6H_{10}O_5]^-$
809,2563	0,00	0,00	0,28	2,22	$[971,3082-C_6H_{10}O_5]^-$
647,2046	0,00	0,00	0,00	1,22	$[809,2563-C_6H_{10}O_5]^-$
485,1508	0,00	0,00	0,00	1,56	$[647,2046-C_6H_{10}O_5]^-$
323,0980	0,00	0,00	0,18	2,35	$[485,1508-C_6H_{10}O_5]^-$
161,0454	0,15	0,17	0,57	5,98	$[323,0980-C_6H_{10}O_5]^-$

Nadalje je eksperiment tandemne spektrometrije masa proveden na molekulskom ionu u obliku adukta s formijatnim anionom, $[M+HCOO]^-$, a MS/MS spektrar dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 10,0 V prikazan je grafički na slici 24, dok su MS/MS spektri dobiveni primjenom ostalih iznosa kolizijskog potencijala prikazani u dodatku (slika D12, slika D13 i slika D14). Navedeni MS/MS spektri prikazani su i u tabličnom obliku (tablica 17). U prikazanom MS/MS spektru kao bazni signal ističe se signal molekulskog iona koji

fragmentira na način da gubi mravlju kiselinu ostavljajući zapravo deprotoniranu molekulu β -CD pri m/z 1133,3682. Povećavanjem kolizijskog potencijala na 40,0 V dolazi do potpunog iščezavanja molekulskog iona, a deprotonirana molekula β -CD dalje fragmentira na identičan način kao i ranije opisano. Provođenjem eksperimenata tandemne spektrometrije masa u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije utvrđeno je kako molekula β -CD pokazuje veću stabilnost u negativnom načinu ionizacije te je potrebno primijeniti mnogo veće vrijednosti kolizijskih potencijala kako bi se potaknula fragmentacija molekulskog iona.

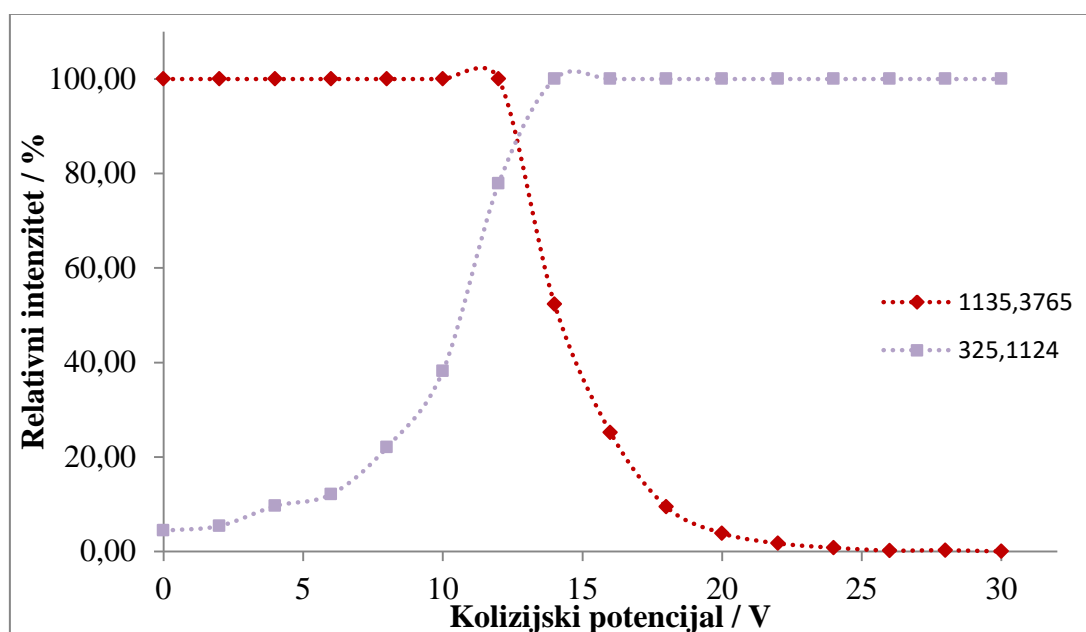


Slika 24. MS/MS spektar iona $[M+HCOO]^-$ (m/z 1179,3705). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V

Tablica 17. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M+HCOO]^-$ (m/z 1179,3705). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
1179,3742	100,00	100,00	17,77	0,00	$[M+HCOO]^-$
1133,3682	22,86	53,74	100,00	100,00	$[1179,3742-HCOOH]^-$

Nakon provedbe MS/MS eksperimenata na jednostruko protoniranom molekulskom ionu β -CD, proveden je još jedan eksperiment tandemne spektrometrije masa uz sukcesivno povećavanje kolizijskog potencijala u rasponu od 0 do 30,0 V. Iz dobivenih MS/MS spektara očitani su relativni intenziteti signala jednostruko protoniranog molekulskog iona β -CD te signala najzastupljenijeg fragmentnog iona pri vrijednosti m/z od 167,0887 te je iz navedenih podataka konstruiran graf ovisnosti relativne zastupljenosti navedenih iona o primijenjenom kolizijskom potencijalu, odnosno tzv. *breakdown* krivulja (slika 25). Eksperiment tandemne spektrometrije masa proveden na molekulskim ionima β -CD ukazuje na dimer glukopiranoze kao glavni produkt fragmentacije navedenog iona.



Slika 25. *Breakdown* krivulja molekulskog iona β -CD ($m/z = 1135,3765$) i krivulja nastanka iona produkta ($m/z = 325,1124$)

4.3. Analiza otopine hidroksipropil- β -ciklodekstrina spektrometrijom masa

Spektri masa otopine hidroksipropil- β -ciklodekstrina u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 snimljen je u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 3200. Spektri masa snimljeni su korištenjem ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu rada. Spektar masa dobiven korištenjem ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu prikazan je grafički na slici 26 pri čemu je dio spektra masa u rasponu vrijednosti m/z od 1300 do 1750 te od 680 do 890

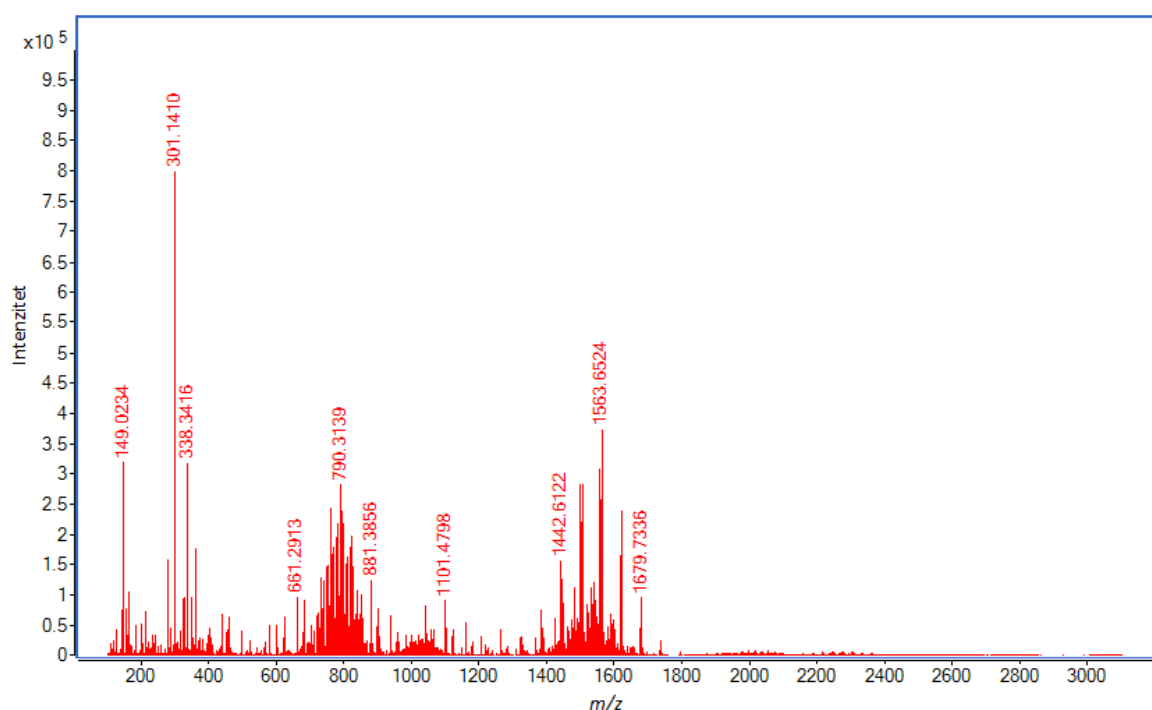
prikazan grafički na slici 27, odnosno na slici 28. Spektar masa je prikazan i tablično (tablica 18, tablica D1 i tablica D2). Navedeni derivat β -CD je nasumično supstituirani produkt, stoga je u spektru masa očekivana prisutnost signala molekulskih iona koji su supstituirani različitim brojem hidroksipropilnih funkcionalnih skupina. Najizraženiji signal molekulskog iona odnosi se na ion ciklodekstrina sa sedam hidroksipropilnih supstituenata u obliku adukta s natrijem, $[\text{DS7}+\text{Na}]^+$, pri čemu DS označuje stupanj supstitucije odnosno broj hidroksipropilnih supstituenata. Bazni signal u spektru masa ima vrijednost m/z od 301,1410 jedinica, no taj signal je posljedica prisutnosti diizobutil ftalata u obliku adukta s natrijem, $[\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4+\text{Na}]^+$, kako je već i ranije spomenuto. U spektru masa vidljiv je niz signala molekulskih iona ciklodekstrina različitih stupnjeva supstitucije u obliku adukata s vrstama poput Na^+ , K^+ , NH_4^+ i H^+ , od kojih najveći relativni intenzitet imaju oni sa stupnjem supstitucije od 6 do 8. Relativni intenziteti signala molekulskih iona sa stupnjem supstitucije od 3, 4, 5, 9 i 10 su puno niži u odnosu na signale ranije navedenih molekulskih iona. Nadalje, u spektru masa primjetno je kako su ioni adukata s natrijem izraženiji od iona adukata s amonijakom ili pak jednostruko protoniranih iona. Osim jednostruko nabijenih molekulskih iona prisutni su i signali dvostruko nabijenih molekulskih iona. Najizraženiji signali dvostruko nabijenih molekulskih iona također pripadaju molekulama sa stupnjem supstitucije od 6 do 8, a neki od njih su $[\text{DS6}+\text{H}+\text{K}]^+$, $[\text{DS7}+\text{H}+\text{K}]^+$ te $[\text{DS7}+2\text{Na}]^+$.

Spektar masa nasumično supstituiranog hidroksipropilnog derivata β -ciklodekstrina, osim molekulskih iona sadrži i klastere, odnosno agregate većeg broja molekula HP β CD koji su jednako ili različito supstituirani. Kao primjer možemo navesti signal jednog takvog klastera koji ima vrijednost m/z od 1592,6736 te odgovara ionu aduktu koji sadrži jednu molekulu CD sa sedam hidroksipropilnih supstituenata i jednu s osam supstituenata te dva iona natrija koja daju dvostruko nabijen ion $[\text{DS7}+\text{DS8}+2\text{Na}]^{2+}$.

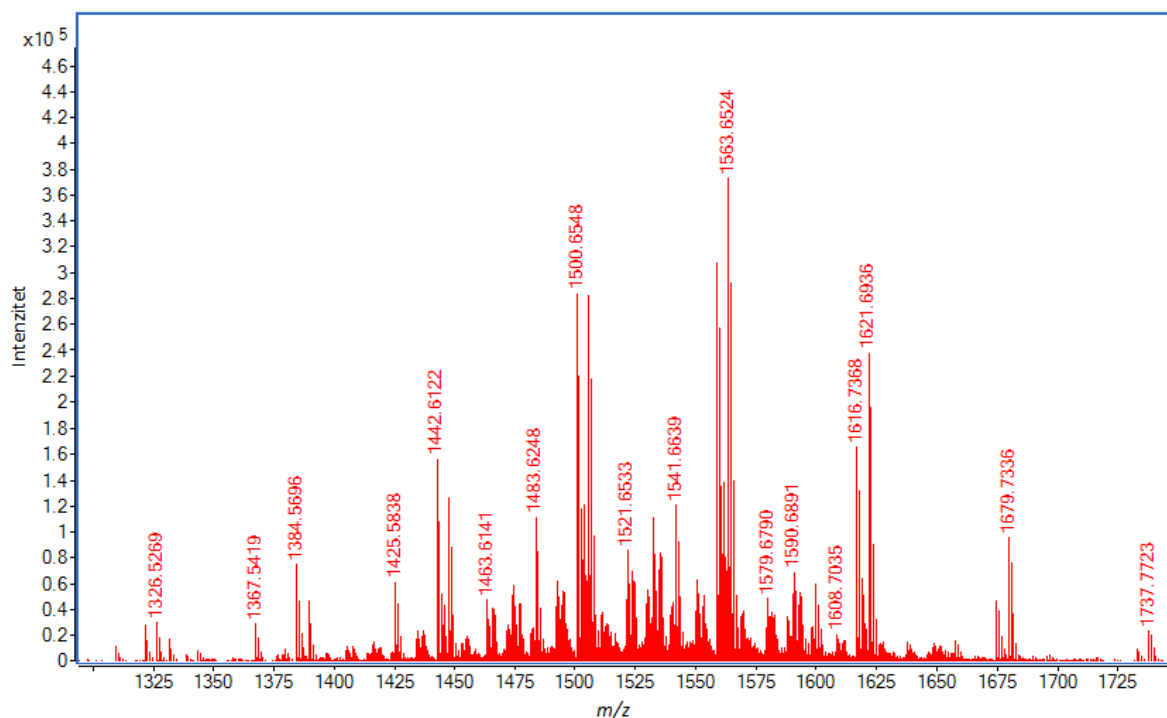
Nadalje, u spektru masa vidljivi su fragmenti koji nastaju gubitkom glukoznih podjedinica. Fragment pri vrijednosti m/z od 1101,4798 odgovara ionu koji sadrži lanac od pet glukopiranoznih jedinica s pet hidroksipropilnih supstituenata pri čemu proton daje naboj ionu, $[\text{DS5}-2\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5+\text{H}]^+$. Fragment pri vrijednosti m/z od 1043,4381 odgovara identičnoj vrsti, ali s četiri hidroksipropilna supstituenta, $[\text{DS4}-2\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5+\text{H}]^+$. Osim navedenih, izražen je i signal fragmenta pri vrijednosti m/z od 1159,5209 jedinica koji sadrži lanac od pet glukopiranoznih podjedinica sa šest hidroksipropilnih supstituenata pri čemu proton daje naboj ionu, $[\text{DS6}-2\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5+\text{H}]^+$. U slučaju sva tri spomenuta fragmentna iona

pretpostavljeno je da su fragmenti Y tipa, iako je moguće i da nastaju u obliku B tipa pri čemu naboj više ne bi potjecao od protona.

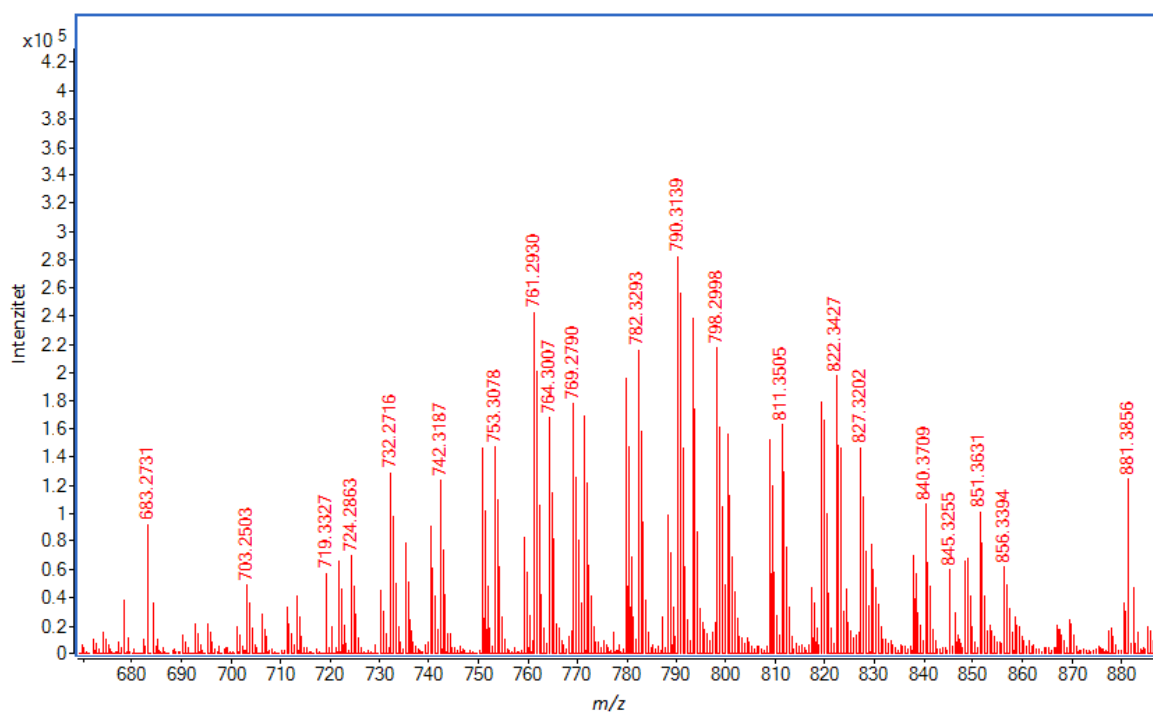
Na temelju svega navedenog, ali i na temelju izgleda grafičkih prikaza MS spektara na slici 26, a posebice na slikama 27 i 28 može se zaključiti kako su MS spektri hidroksipropiliranog derivata β -CD dobiveni u pozitivnom načinu ionizacije veoma kompleksni. U spektru prevladavaju dvije skupine signala, tj. signali koji potječu od dvostruko nabijenih te signali koji potječu od jednostruko nabijenih iona. Osim signala molekulskih iona različito supstituiranih molekula β -CD, u spektrima su prisutni i signali klastera ovih vrsta kao i fragmentni ioni što dodatno otežava analizu.



Slika 26. Spektar masa otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V



Slika 27. Spektar masa otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u području m/z 1300 – 1750



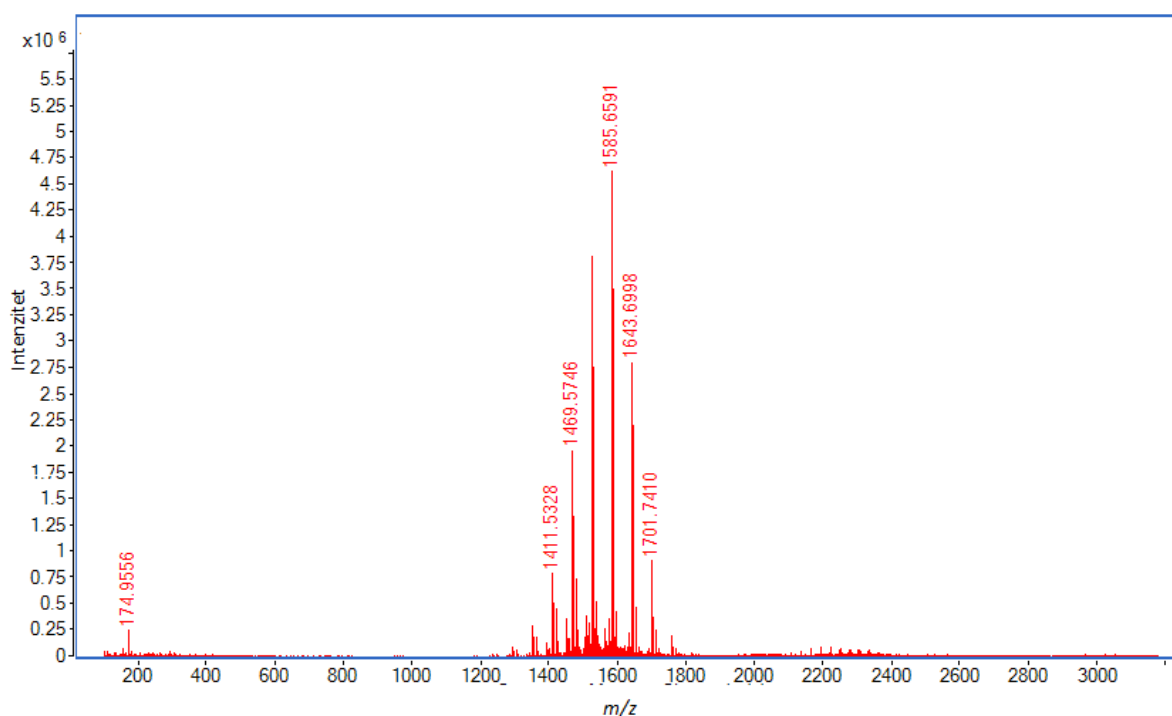
Slika 28. Spektar masa otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u području m/z 680 – 890

Tablica 18. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala jednostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

Molekulska formula:	[M+H] $^{+}$			[M+NH $_4$] $^{+}$			[M+Na] $^{+}$		
	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %
C $_{51}$ H $_{88}$ O $_{38}$, DS 3	1309,4998	1309,5026	1,43	1326,5269	1326,5292	3,80	1331,4825	1331,4846	2,11
C $_{54}$ H $_{94}$ O $_{39}$, DS 4	1367,5419	1367,5445	3,57	1384,5696	1384,5710	9,40	1389,5251	1389,5264	5,76
C $_{57}$ H $_{100}$ O $_{40}$, DS 5	1425,5838	1428,5864	7,67	1442,6122	1442,6129	19,60	1447,5684	1447,5683	15,75
C $_{60}$ H $_{106}$ O $_{41}$, DS 6	1483,6248	1483,6282	13,93	1500,6548	1500,6548	35,54	1505,6113	1505,6102	35,31
C $_{63}$ H $_{112}$ O $_{42}$, DS 7	1541,6639	1541,6701	15,09	1558,6964	1558,6966	38,54	1563,6524	1563,6520	46,72
C $_{66}$ H $_{118}$ O $_{43}$, DS 8	1599,7031	1599,7120	7,44	1616,7368	1616,7385	20,75	1621,6936	1621,6939	29,81
C $_{69}$ H $_{124}$ O $_{44}$, DS 9	1657,7424	1657,7538	1,99	1674,7764	1674,7804	5,80	1679,7336	1679,7358	12,00
C $_{72}$ H $_{130}$ O $_{45}$, DS 10	/	1715,7957	/	1732,8156	1732,8222	1,18	1737,7723	1737,7776	2,96

*DS – stupanj supstitucije HP β CD (engl. *degree of substitution*, DS)

Spektar masa otopine hidroksipropil- β -ciklodekstrina u identičnom sustavu otapala snimljen je također i ionizacijom elektroraspšanjem u negativnom načinu te je prikazan grafički na slici 29 te tablično u tablici 19. Ovaj spektar masa jednostavniji je u odnosu na spektar masa koji je snimljen u pozitivnom načinu rada na čiju smo kompleksnost već ranije ukazali. Bazni signal spektra masa odgovara molekulskom ionu sa sedam hidroksipropilnih supstituenata u obliku adukta s formijatnim anionom, $[M+HCOO]^-$. Osim toga, izraženi su i signali molekulskih iona sa šest, odnosno osam hidroksipropilnih supstituenata u obliku identičnog adukta. Nadalje, spektar masa sadrži signale molekulskih iona sa stupnjem supstitucije 4, 5, 9, 10 u obliku adukata s formijatnim anionom, no relativni intenziteti tih molekulskih iona su manji u odnosu na ranije navedene. Na temelju spektara masa dobivenih u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije elektroraspšanjem moguće je zaključiti kako je prosječan stupanj supstitucije molekule ciklodekstrina hidroksipropilnim funkcionalnim skupinama približno jednak sedam.



Slika 29. Spektar masa otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V

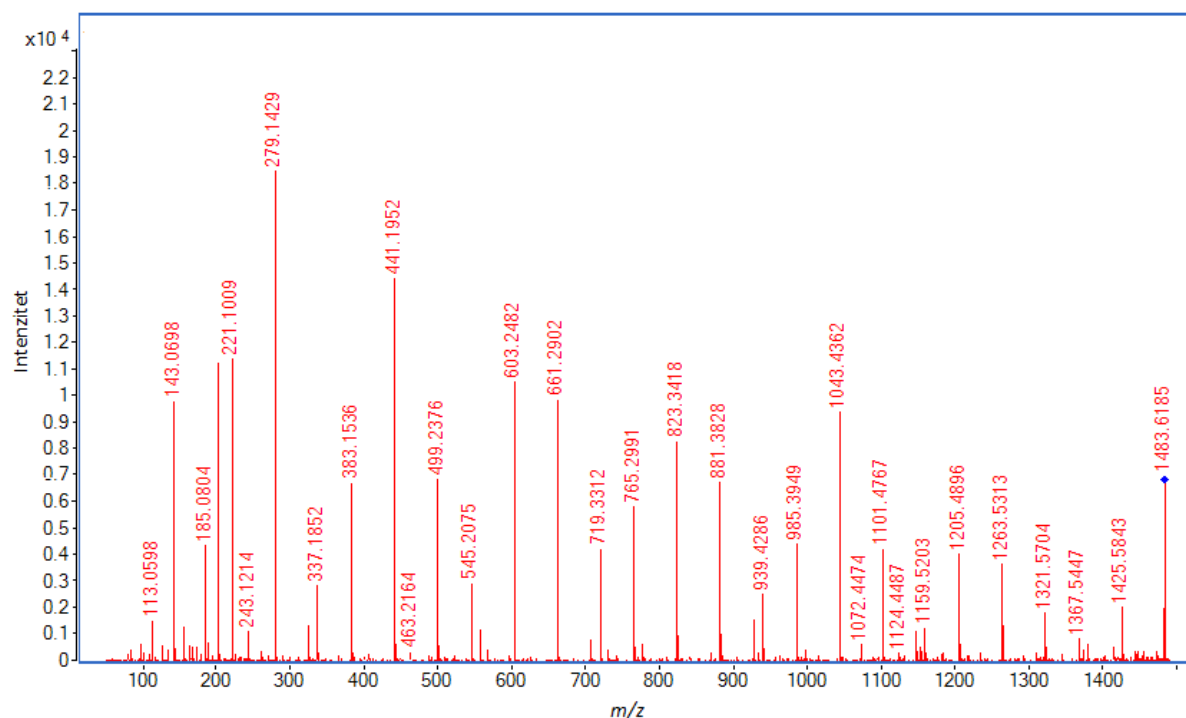
Tablica 19. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI $^{-}$, napon fragmentora 50,0 V

Izmjeren m/z	Točan m/z	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
1411,5328	1411,5354	17,09	[DS4+HCOO] $^{-}$
1423,5685	1423,5718	9,74	[DS5-H] $^{-}$
1469,5746	1469,5773	42,33	[DS5+HCOO] $^{-}$
1527,6171	1527,6192	82,34	[DS6+HCOO] $^{-}$
1585,6591	1585,6610	100,00	[DS7+HCOO] $^{-}$
1643,6998	1643,7029	60,58	[DS8+HCOO] $^{-}$
1701,7465	1701,7448	19,64	[DS9+HCOO] $^{-}$
1759,7825	1759,7866	4,12	[DS10+HCOO] $^{-}$

*DS – stupanj supstitucije HP β CD (engl. *degree of substitution*, DS)

4.3.1. MS/MS analiza odabranih iona hidroksipropil- β -ciklodekstrina

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa provedeni su na jednostruko nabijenim molekulskim ionima hidroksipropil- β -ciklodekstrina, [DS6+H] $^{+}$ i [DS6+HCOO] $^{-}$, primjenom vrijednosti kolizijskih potencijala od 10,0 do 40,0 V. Tandemni spektri masa snimljeni su u rasponu vrijednosti m/z od 100 od 3200. Teorijska cijepanja veza unutar hidroksipropil- β -ciklodekstrina uključuju cijepanja glikozidne veze između glukopiranoznih podjedinica te cijepanja veza unutar glukopiranoznih prstenova te veza između glukopiranoznih jedinica i hidroksipropilnog supstituenta ($-C_3H_6O$, 58 Da). Tandemni spektar masa snimljen u pozitivnom načinu ionizacije elektroraspršenjem uz primjenu kolizijskog potencijala od 20,0 V prikazan je grafički na slici 30 i tablično u tablici 20. Navedeni spektar masa sadrži niz fragmenata između kojih se u velikom broju slučajeva uočavaju uniformne razlike u m/z vrijednostima, a koje se posljedica cijepanja supstituiranih ($C_9H_{16}O_6$, -220 Da), odnosno nesupstituiranih glukopiranoznih jedinica ($C_6H_{10}O_5$, -162 Da). Relativni intenzitet molekulskog iona smanjuje se povećanjem iznosa kolizijskog potencijala što je vidljivo nakon usporedbe s tandemnim spektrom masa koji je dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 10,0 V (slika D15) gdje bazni signal pripada molekulskom ionu [DS6+H] $^{+}$. U tandemnom spektru masa prikazanom na slici 30. navedeni ion nije najizraženiji, već je najizraženiji signal dvostruko supstituirane molekule glukopiranoze s vezanim protonom koji daje jednostruki naboj pri vrijednosti m/z od 279,1429. Osim navedenog velik relativni intenzitet ima ion pri vrijednosti m/z od 441,1952 koji odgovara dvostruko supstituiranom dimeru glukoze s protonom koji daje naboj ionu.

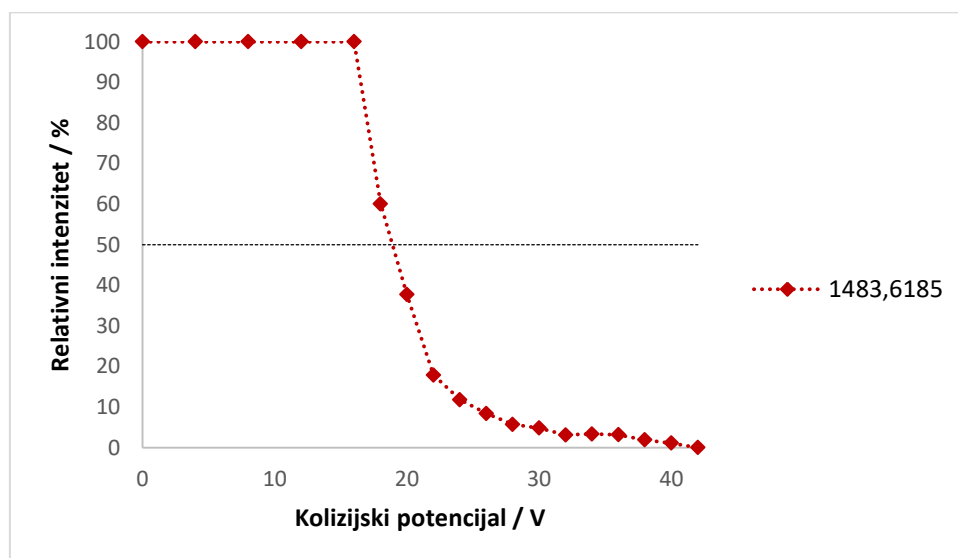


Slika 30. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1483,6248); M=HP β CD DS6. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V

Nakon provedbe MS/MS eksperimenata na jednostruko protoniranom molekulsom ionu, $[DS6+H]^+$, proveden je još jedan eksperiment tandemne spektrometrije masa uz sukcesivno povećavanje kolizijskog potencijala u rasponu od 0 do 42,0 V. Iz dobivenih MS/MS spektara očitani su relativni intenziteti signala jednostruko protoniranog molekuskog iona te je iz navedenih podataka konstruiran graf ovisnosti relativne zastupljenosti navedenog iona o primijenjenom kolizijskom potencijalu, odnosno tzv. *breakdown* krivulja (slika 31). Ion koji nastaje fragmentiranjem ima vrijednost m/z od 279,1429 te odgovara dvostruko supstituiranoj jedinici glukopiranoze. Povećanjem iznosa kolizijskog potencijala dolazi do daljnje fragmentacije tog iona produkta, primjerice na način da se uz jedan hidroksipropilni supstituent eliminira jedna molekula vode čime nastaje jednostruko nabijeni ion pri vrijednosti m/z od 203,0903.

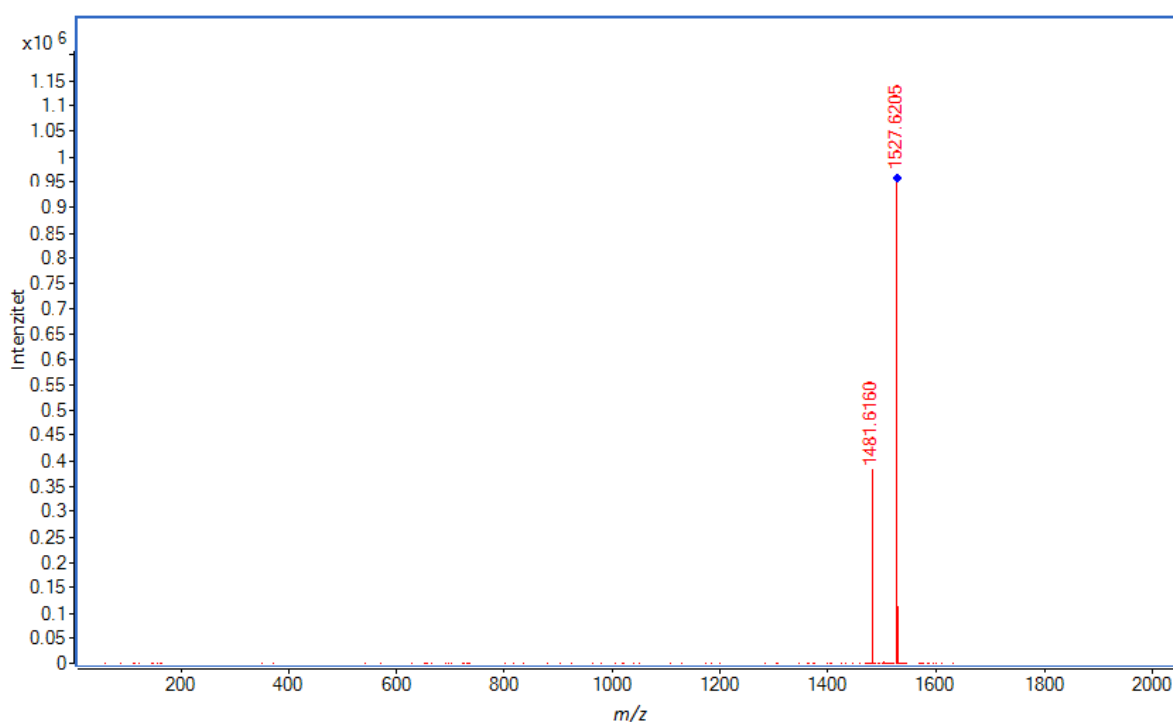
Tablica 20. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M+H]^+$ (m/z 1483,6248); M=HP β CD DS6. Ionizacija ESI+, napon fragmentatora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Molekulska formula:	Izmjeren m/z	$[M+H]^+$		
		Relativni intenzitet / %		
		10,00 V	20,00 V	40,00 V
$C_{60}H_{106}O_{41}, [M+H]^+$	1483,6185	100,00	37,69	1,14
$[M+H]^+ - C_3H_6O$	1425,5843	3,68	10,87	0,13
$[M+H]^+ - C_6H_{10}O_5$	1321,5704	4,64	9,55	/
$[M+H]^+ - C_9H_{16}O_6$	1263,5313	9,08	19,67	0,17
$[M+H]^+ - C_9H_{16}O_6 - C_3H_6O$	1205,4896	9,25	21,63	0,18
$[M+H]^+ - C_9H_{16}O_6 - C_6H_{10}O_5$	1101,4767	7,08	22,76	0,12
$[M+H]^+ - (2 \cdot C_9H_{16}O_6)$	1043,4362	11,63	50,65	0,58
$[M+H]^+ - (2 \cdot C_9H_{16}O_6) - C_3H_6O$	985,3949	4,05	23,78	0,51
$[M+H]^+ - (2 \cdot C_9H_{16}O_6) - C_6H_{10}O_5$	881,3828	6,08	36,32	1,21
$[M+H]^+ - (3 \cdot C_9H_{16}O_6)$	823,3418	7,34	44,70	2,22
$[M+H]^+ - (3 \cdot C_9H_{16}O_6) - C_3H_6O$	765,2991	3,63	31,39	1,61
$[M+H]^+ - (2 \cdot C_9H_{16}O_6) - (2 \cdot C_6H_{10}O_5)$	719,3312	2,42	22,71	1,58
$[M+H]^+ - (3 \cdot C_9H_{16}O_6) - C_6H_{10}O_5$	661,2902	6,02	53,18	5,14
$[M+H]^+ - (4 \cdot C_9H_{16}O_6)$	603,2482	4,77	56,93	10,02
$[M+H]^+ - (3 \cdot C_9H_{16}O_6) - (2 \cdot C_6H_{10}O_5)$	499,2376	5,53	36,99	9,40
$[M+H]^+ - (4 \cdot C_9H_{16}O_6) - C_6H_{10}O_5$	441,1952	7,97	78,00	32,83
$[M+H]^+ - (5 \cdot C_9H_{16}O_6)$	383,1536	3,52	36,15	25,14
$[M+H]^+ - (4 \cdot C_9H_{16}O_6) - (2 \cdot C_6H_{10}O_5)$	279,1429	11,78	100,00	74,52
$[C_9H_{16}O_6+H]^+$	221,1009	7,00	61,53	50,83



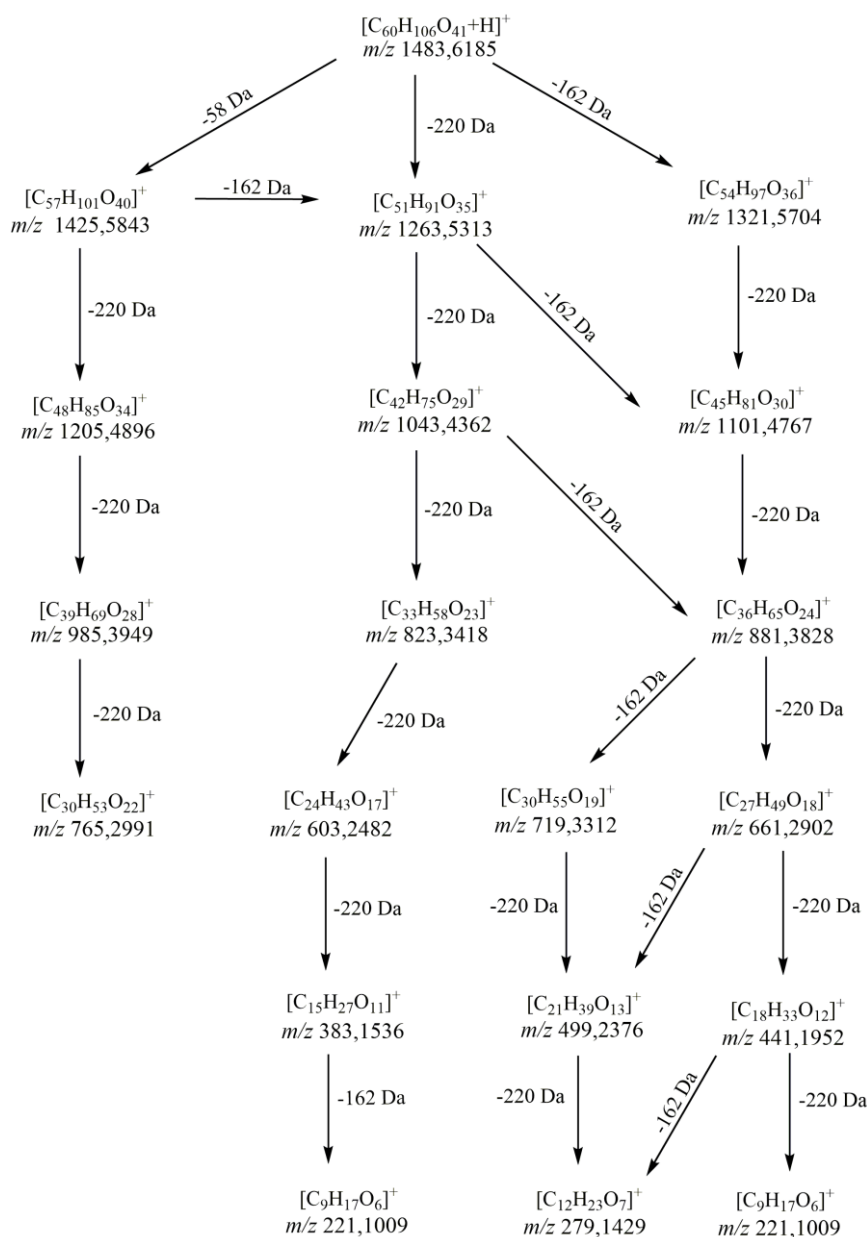
Slika 31. Breakdown krivulja molekuskog iona hidroksipropil- β -ciklodekstrina sa šest hidroksipropilnih supstituenata (m/z = 1483,6185)

Eksperimentima tandemne spektrometrije masa u negativnom načinu ionizacije analiziran je molekularni ion u obliku adukta s formijatnim anionom, $[\text{DS6}+\text{HCOO}]^-$, a MS/MS spektar dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 10,0 V prikazan je grafički na slici 32, dok su spektri masa dobiveni korištenjem kolizijskih potencijala u iznosima od 20,0 V i 40,0 V prikazani u dodatku (slika D17 i slika D18). Spektar masa sadrži dva signala pri čemu bazni signal odgovara navedenom molekularnom ionu, $[\text{DS6}+\text{HCOO}]^-$ pri vrijednosti m/z od 1527,6205 jedinica. Upola manji relativni intenzitet ima deprotonirani molekularni ion $[\text{DS6}-\text{H}]^-$ pri vrijednosti m/z od 1481,6160 koji nastaje nakon cijepanja mravlje kiseline. Povećanjem iznosa kolizijskog potencijala povećava se relativni intenzitet deprotoniranog molekularnog iona te u MS/MS spektru dobivenom korištenjem kolizijskog potencijala od 20,0 V navedeni ion ima bazni signal. S druge strane, relativni intenzitet molekularnog iona u obliku adukta s formijatnim anionom opada te u spektru masa dobivenom uz korištenje kolizijskog potencijala od 40,0 V potpuno izostaje.



Slika 32. MS/MS spektar iona $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ (m/z 1527,6171); M=HP β CD DS6. Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V

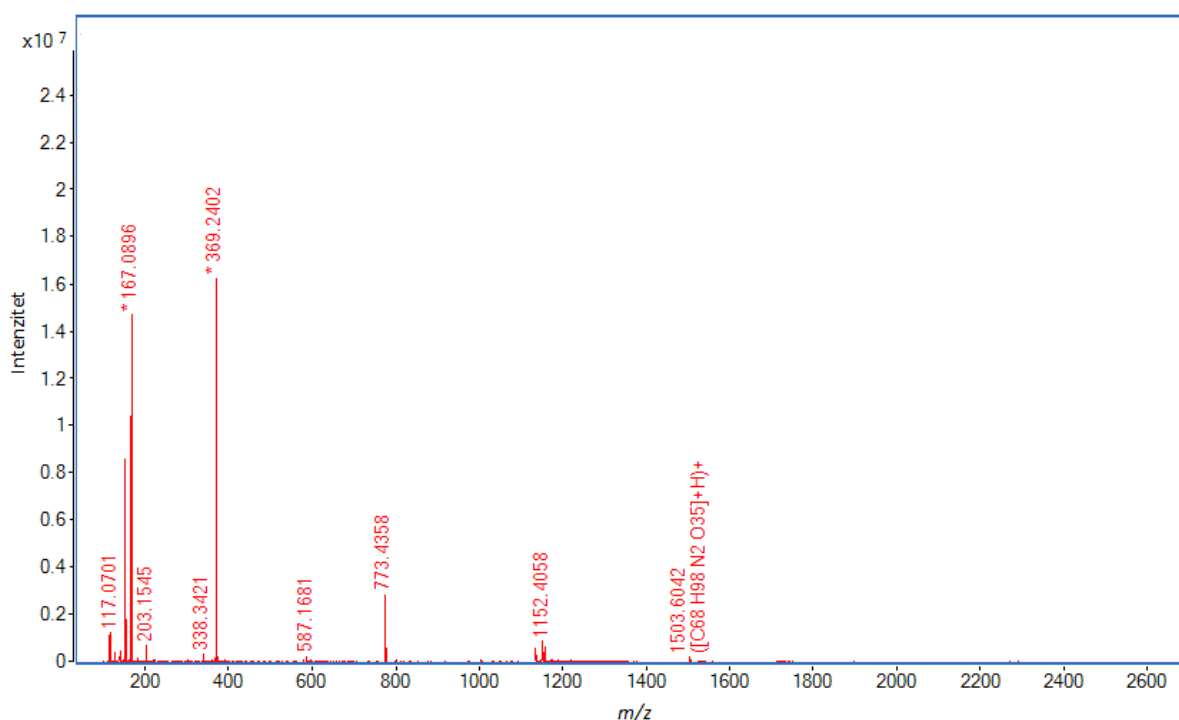
Obzirom na dobivene MS/MS spektre moguće je zaključiti kako ne dolazi do svih cijepanja veza koja su teorijski moguća, već samo nekih. Produkti fragmentacije molekule hidroksipropil- β -ciklodekstrina prikazani su na slici 33. Fragmentacija molekule ide postepeno, odnosno gubitkom po jedne molekule glukoze ili jedne hidroksipropilne skupine. Iako molekula fragmentira gotovo do molekule glukoze, dvostruko supstituirana glukoza predstavlja najstabilniji produkt fragmentacije obzirom da je relativni intenzitet navedenog signala najveći.



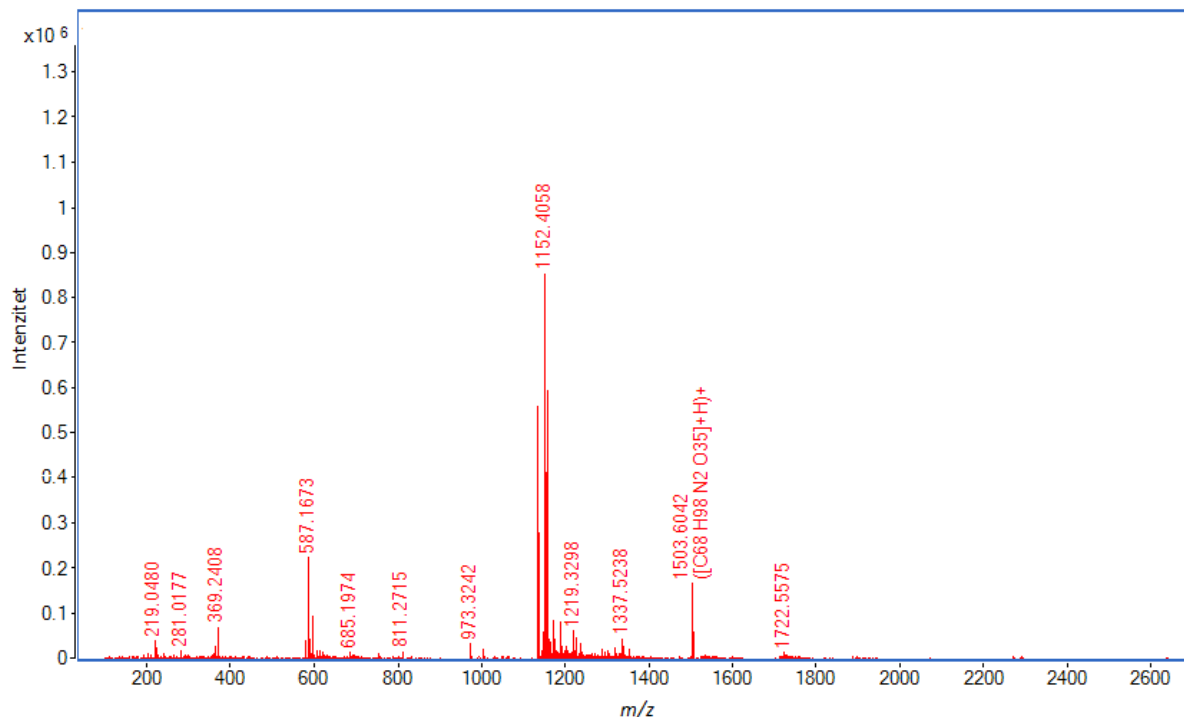
Slika 33. Pojednostavljena shema fragmentacije jednostruko protoniranog molekulskog iona HP β CD

4.4. Analiza otopine cinarizina i β -ciklodekstrina spektrometrijom masa

Spektrometrijom masa analizirana je otopina inkluzijskog kompleksa u sustavu otapala metanol:voda = 1:1, a spektri masa snimljeni su u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 3200. Prilikom snimanja korištena je ionizacija elektroraspršenjem, pri čemu su generirani samo pozitivno nabijeni ioni (ESI+). Spektar masa prikazan je grafički na slici 34, ali i tablično u tablici 21. U spektru masa najizraženiji signali potječu od molekulskog iona cinarizina te njegovih fragmentnih iona zbog čega je od navedenog spektra masa oduzet spektar masa cinarizina te je dobiveni spektar prikazan na slici 35. Iako je signal koji potječe od prisutnosti kompleksa cinarizina i β -CD vidljiv pri m/z 1503,6042, oduzimanjem spektra masa cinarizina (slika 35), a naknadno i spektra masa β -CD (slika 36) dobiven je spektar masa u kojemu se mnogo jasnije vide signali koji su se mogli pripisati kompleksima koji nastaju interakcijama lijeka i ciklodekstrina.

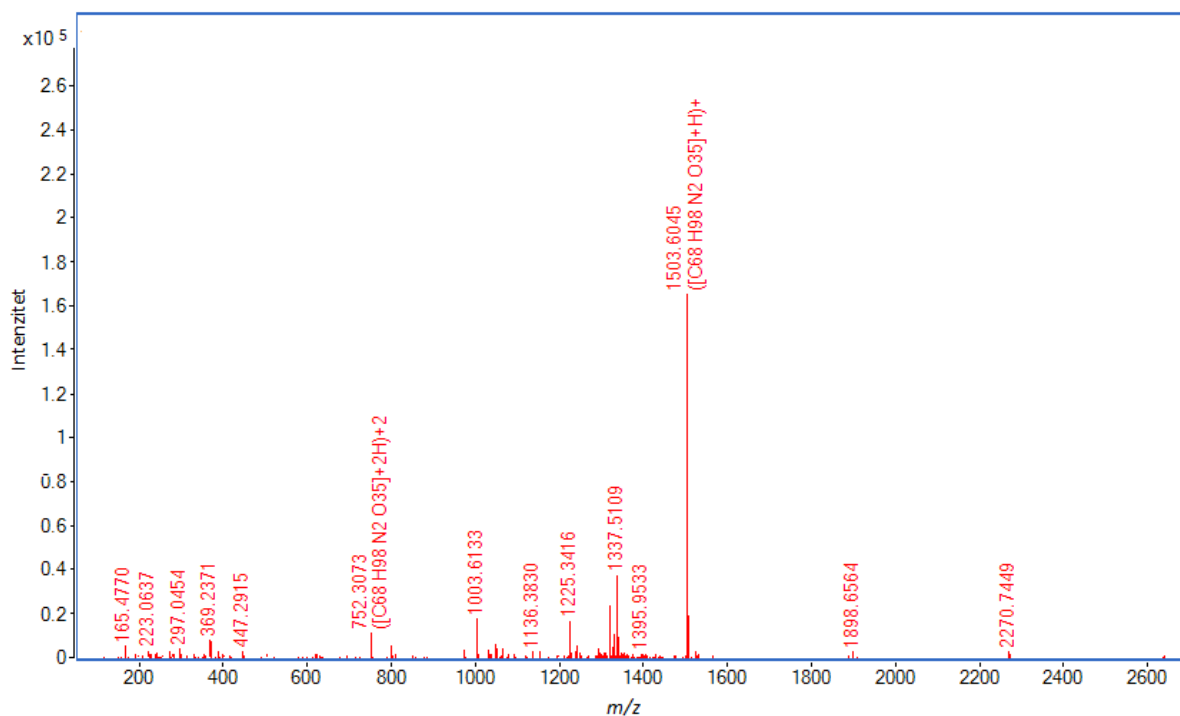


Slika 34. Spektar masa otopine cinarizina s β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V



Slika 35. Spektar masa otopine cinarizina s β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 nakon oduzimanja spektra masa cinarizina. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

U konačnom spektru masa, nakon oduzimanja pojedinačnih spektara masa cinarizina i β -ciklodekstrina, najizraženiji je signal protoniranog molekulskog iona koji se sastoji od jedne molekule β -ciklodekstrina i jedne molekule cinarizina, $[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2 + \text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{H}]^+$ što potvrđuje postojanje kompleksa u plinskoj fazi. Naravno, navedena vrijednost m/z ni na koji način ne može davati potvrdu inkluzije molekule cinarizina u ciklodekstrinsku šupljinu. Nadalje, u spektru masa vidljiv je i dvostruko nabijeni, odnosno dvostruko protonirani molekulski ion pri vrijednosti m/z od 752,3073 jedinica. Osim toga, nakon oduzimanja pojedinačnih spektara u MS spektru je vidljiv signal iona koji odgovara molekuli β -ciklodekstrina s vezanim fragmentom cinarizina pri m/z od 1337,5109. Navedeni fragment cinarizina nastaje nakon cijepanja C–N veze uslijed čega molekula cinarizina gubi svoj difenilmetilni dio. Ipak, relativni intenzitet navedenog iona u MS spektru prije oduzimanja pojedinačnih spektara je izuzetno nizak. U spektru masa je osim molekulskih iona kompleksa vidljiv ion pri vrijednosti m/z od 1319,4900 jedinica koji odgovara klasteru građenom od kompleksa cinarizina s β -CD i jedne molekule β -CD ili kompleksa cinarizina s β -CD u omjeru 1:2.



Slika 36. Spektar masa otopine cinarizina s β -CD ($c = 4,40 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 nakon oduzimanja pojedinačnih spektara masa cinarizina i β -CD.

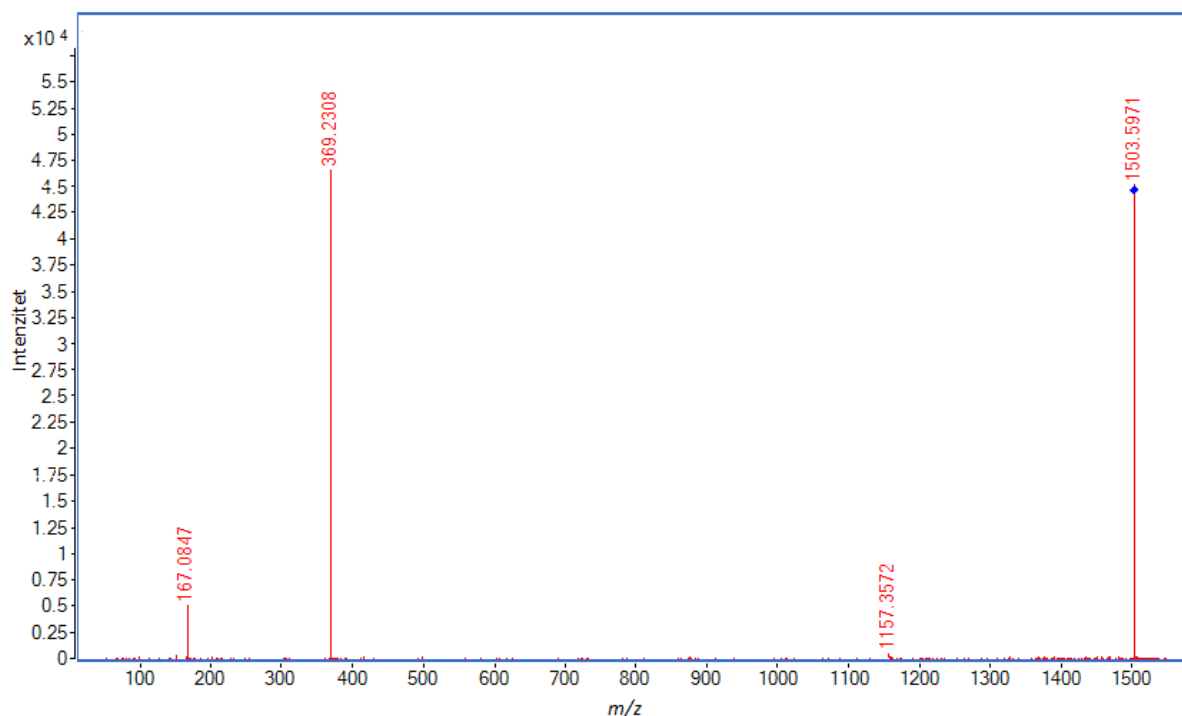
Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

Tablica 21. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopine cinarizina ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) i β -ciklodekstrina ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

Izmjeren m/z	Točan m/z	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
1503,6042	1503,6023	1,02	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2 + \text{H}]^+$
1319,4900	1319,4849	0,13	$[(2 \cdot \text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}) + \text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2 + 2\text{H}]^+$
1157,3612	1157,3575	3,65	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{Na}]^+$
1152,4058	1152,4021	5,26	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{NH}_4]^+$
1135,3793	1135,3756	3,45	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{H}]^+$
752,3075	752,3048	0,07	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2 + 2\text{H}]^{2+}$
587,1681	587,1704	1,40	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{K} + \text{H}]^{2+}$
579,1788	579,1834	0,23	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} + \text{Na} + \text{H}]^{2+}$
369,2402	369,2325	100,00	$[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2 + \text{H}]^+$
201,1388	201,1392	3,32	$[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2]^+$
167,0896	167,0849	90,50	$[\text{C}_{13}\text{H}_{11}]^+$

4.4.1. MS/MS analiza odabranih iona kompleksa cinarizina i β -ciklodekstrina

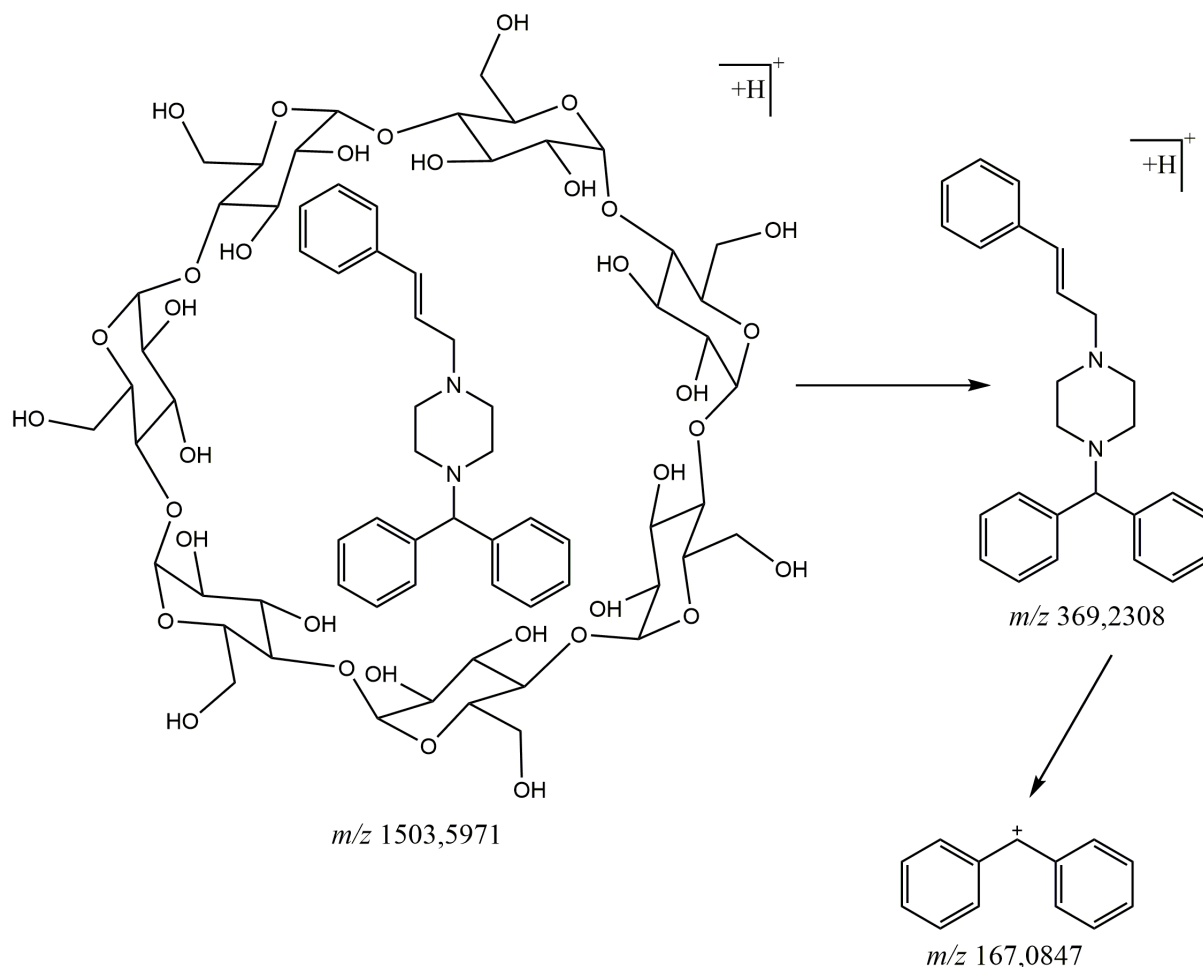
Tandemni spektri masa snimljeni su za nekoliko odabranih iona kompleksa β -ciklodekstrina i cinarizina u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 3200 jedinica uz primjenu kolizijskih potencijala u iznosima od 5,0 do 40,0 V. Teorijska cijepanja veza tijekom provedbe MS/MS eksperimenata uključuju disocijaciju kompleksa cinarizina i β -ciklodekstrina te fragmentaciju obiju molekula kako je navedeno u ranijim poglavljima. Za eksperiment tandemne spektrometrije masa izabrani su jednostruko i dvostruko nabijeni molekulski ioni kompleksa cinarizina i β -CD u omjeru 1:1, $[C_{42}H_{70}O_{35}+C_{26}H_{28}N_2+H]^+$ i $[C_{42}H_{70}O_{35}+C_{26}H_{28}N_2+2H]^{2+}$ te ion pri vrijednosti m/z 1319,4900 koji može pripadati kompleksu cinarizina i β -CD u omjeru 1:2 ili pak klasteru koji je građen od kompleksa cinarizina i β -CD u omjeru 1:1 i jedne molekule β -CD. Tandemni spektar masa molekulskog iona pri vrijednosti m/z od 1503,6045 dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 20,0 V prikazan je grafički na slici 37, dok su spektri masa dobiveni uz primjenu kolizijskog potencijala od 5,0, 10,0 i 40,0 V prikazani u dodatku (slika D19, slika D20, slika D21). Tandemni spektri masa dobiveni primjenom svih iznosa kolizijskog potencijala prikazani su i tablično (tablica 22). U tandemnom spektru masa jednostruko nabijenog molekulskog iona kompleksa izražena su dva signala, od koji je jedan molekulski ion kompleksa, a drugi jednostruko protonirani molekulski ion cinarizina. Osim navedenih iona, u spektru masa u vidljivi i signali fragmenata molekule cinarizina poput signala pri m/z 167,0847 koji pripada difenilmetilnom kationu $[C_{13}H_{11}]^+$. Daljnjim povećavanjem iznosa kolizijskog potencijala dolazi do smanjivanja intenziteta roditeljskog iona pri m/z 1503,5971 koji pri primjeni potencijala od 40,0 V u potpunosti iščezava, dok relativni intenzitet jednostruko protoniranog iona cinarizina raste, odnosno dolazi do daljnje disocijacije kompleksa pri čemu se naboj zadržava na molekuli cinarizina. Pretpostavljena shema fragmentacije iona kompleksnog spoja je predstavljena na slici 38.



Slika 37. MS/MS spektrar iona $[M+H]^+$ (m/z 1503,6045); $M=CIN+\beta$ -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V

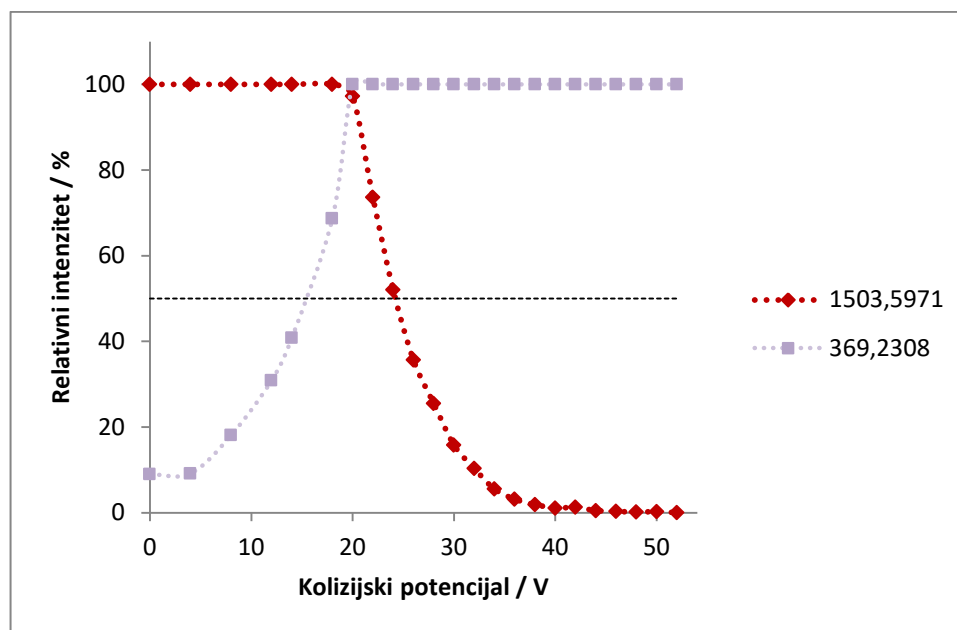
Tablica 22. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[C_{42}H_{70}O_{35}+C_{26}H_{28}N_2+H]^+$ (m/z 1503,6045). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
1503,5971	100,00	100,00	96,84	1,53	$[M+H]^+$
369,2308	11,95	29,03	100,00	100,00	$[C_{26}H_{28}N_2+H]^+$
167,0847	0,18	4,04	10,86	24,67	$[C_{13}H_{11}]^+$



Slika 38. Pretpostavljena shema fragmentacije jednostruko nabijenog iona kompleksa cinarizina i β -ciklodekstrina, $[C_{42}H_{70}O_{35}+C_{26}H_{28}N_2+H]^+$

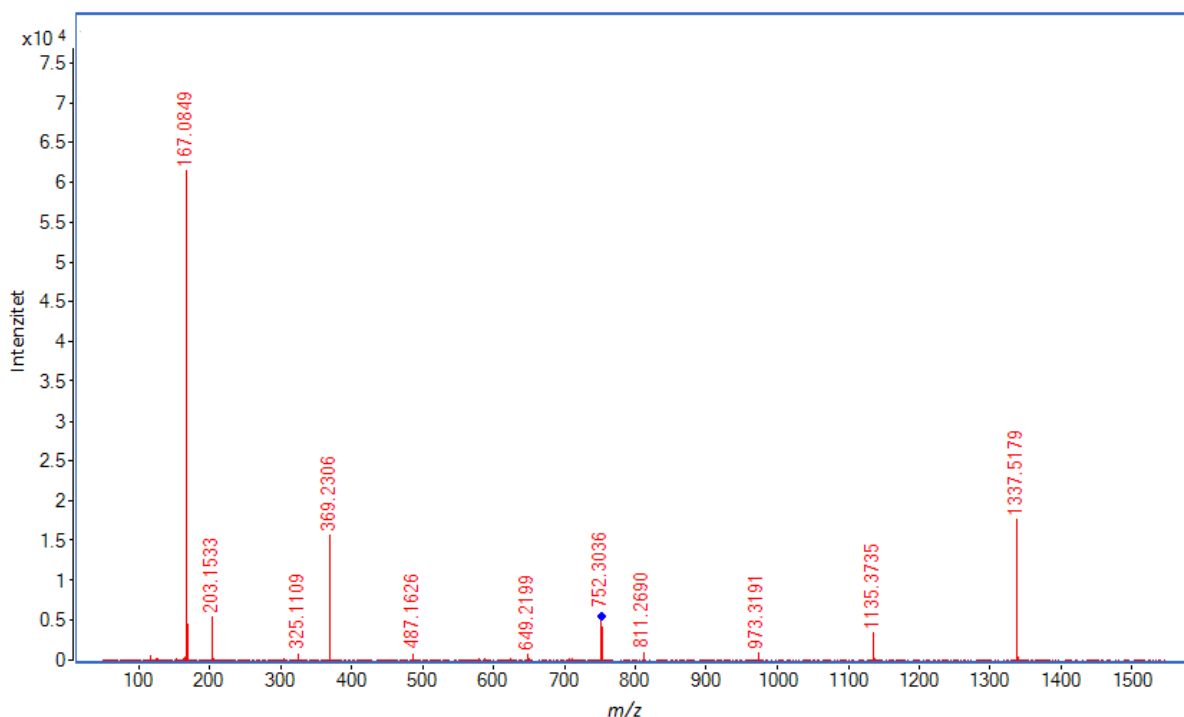
Pomoću rezultata MS/MS analize navedenog iona uz sukcesivno povećanje kolizijskog potencijala u rasponu od 0 do 52,0 V konstruirana je *breakdown* krivulja molekuskog iona kompleksa cinarizina i β -ciklodekstrina (slika 39). Osim *breakdown* krivulje prikazana je i krivulja nastanka iona produkta, odnosno molekuskog iona cinarizina koji predstavlja glavni produkt ove fragmentacije. Obzirom da fragmentacijom molekuskog iona kompleksa dolazi do povećanja relativnog intenziteta signala molekuskog iona cinarizina, moguće je zaključiti kako kompleks cinarizina i β -ciklodekstrina nastaje, no nije moguće dobiti dodatne informacije, odnosno nastaje li inkluzijski kompleks ili je kompleks rezultat nespecifičnog vezanja navedenih dviju molekula.



Slika 39. Breakdown krivulja molekuskog iona kompleksa cinarizina i β -ciklodekstrina ($m/z = 1503,5971$) i krivulja nastanka iona produkta ($m/z = 369,2308$)

Eksperiment tandemne spektrometrije masa proveden je i na dvostruko nabijenom molekuskom ionu, $[C_{42}H_{70}O_{35}+C_{26}H_{28}N_2+2H]^{2+}$, koji je u MS spektru uočen pri m/z 752,3075. Tandemni spektar masa dobiven primjenom kolizijskog potencijala u iznosu od 5,0 V je grafički prikazan na slici 40, dok su spektri masa dobiveni primjenom kolizijskog potencijala u iznosu od 10,0 V, 20,0 V i 40,0 V prikazani u dodatku (slika D22, slika D23, slika D24) i tablično u tablici 23. Bazni signal pripada jednostruko nabijenom difenilmetilnom fragmentu cinarizina, $[C_{13}H_{11}]^+$. Već pri ovako niskom iznosu kolizijskog potencijala intenzitet iona prekursora jako opada. U spektru masa uočava se i signal molekule β -CD pri m/z 1135,3735, ali i signali karakterističnih fragmenata ove molekule koji su već ranije opisani u ovom diplomskom radu (m/z 973,3191, 811,2690, 649,2199, 487,1626 i 325,1109). Signal koji je primijećen pri vrijednosti m/z od 1337,5179 je svakako najzanimljiviji od svih uočenih u ovom MS/MS spektru. Naime, pretpostavlja se da ovaj signal nastaje prilikom fragmentacije kompleksa na način da se gubi difenilmetilni dio cinarizina dok karakteristični fragment cinarizina (sličan onomu koji je opisan prilikom fragmentacije jednostruko protoniranog iona cinarizina, a uočen pri m/z 201,1379) ostaje u kompleksu s β -CD. Pretpostavljena shema fragmentacije prikazana je na slici 41. Očekivano je da će dvostruko protonirani molekularni ion kompleksa fragmentirati pri nižim vrijednostima kolizijskih potencijala u odnosu na istovjetni jednostruko protonirani ion, no

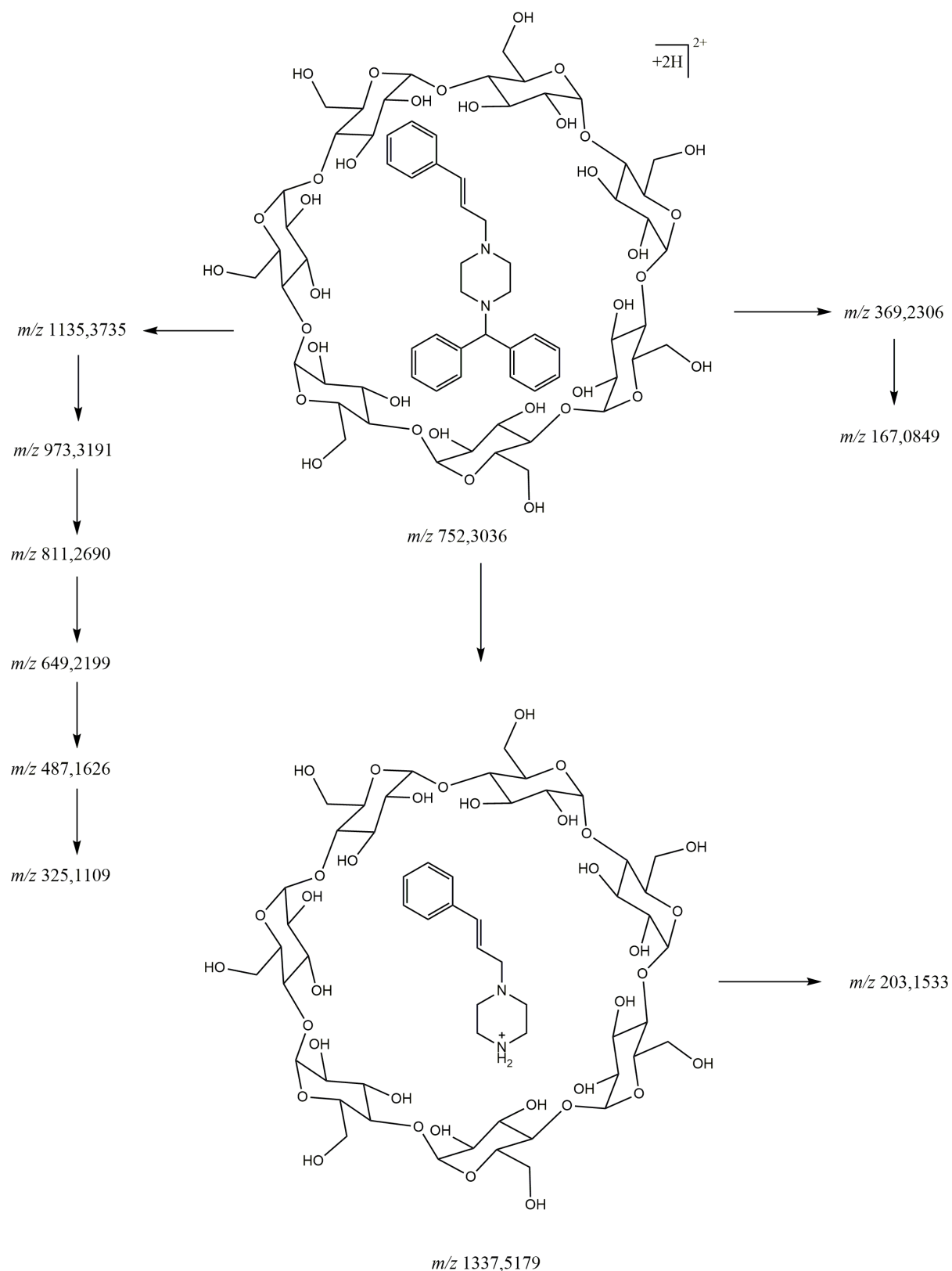
ono što nije u potpunosti jasno je činjenica da se uočavaju različiti fragmenti. Iako signal koji je primijećen pri vrijednosti m/z 1337,5179 ne može jednoznačno potvrditi inkluziju molekule cinarizina u ciklodekstrinsku šupljinu, on svakako ide u prilog takvoj pretpostavci.



Slika 40. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 752,3075); M=CIN+ β -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V

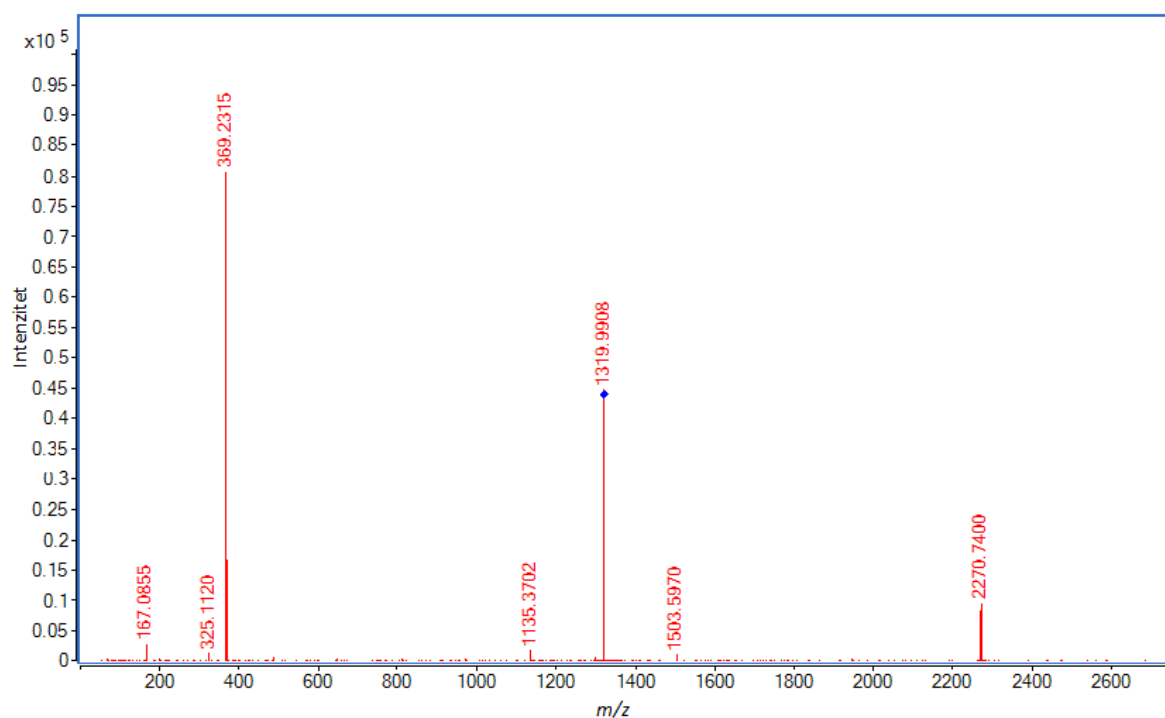
Tablica 23. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[C_{42}H_{70}O_{35}+C_{26}H_{28}N_2+2H]^{2+}$ (m/z 752,3075). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
1337,5179	28,81	26,36	1,48	/	$[752,3036-C_{13}H_{11}]^+$
1135,3735	5,56	0,79	0,11	/	$[C_{42}H_{70}O_{35}+H]^+$
973,3191	1,48	0,73	/	/	$[1135,3735-C_6H_{10}O_5]^+$
811,2690	1,65	1,22	0,12	/	$[973,3191-C_6H_{10}O_5]^+$
752,3036	6,73	2,71	2,92	1,80	$[M+2H]^{2+}$
649,2199	1,18	1,55	0,16	/	$[811,2690-C_6H_{10}O_5]^+$
487,1626	1,32	2,41	0,71	/	$[649,2199-C_6H_{10}O_5]^+$
369,2306	25,50	19,39	10,61	0,83	$[C_{26}H_{28}N_2+H]^+$
325,1109	1,32	7,57	4,84	1,11	$[487,1626-C_6H_{10}O_5]^+$
203,1533	8,78	20,84	88,92	48,49	$[C_{13}H_{18}N_2+H]^+$
167,0849	100,00	100,00	100,00	100,00	$[C_{13}H_{11}]^+$



Slika 41. Shema fragmentacije dvostruko nabijenog iona kompleksa cinarizina i β -ciklodekstrina, $[C_{42}H_{70}O_{35}+C_{26}H_{28}N_2+2H]^{2+}$

Tandemnom spektrometrijom masa analiziran je i ion pri vrijednosti m/z od 1319,4900 jedinica koji odgovara klasteru građenom od kompleksa cinarizina s β -CD i jedne molekule β -CD ili kompleksa cinarizina s dvije molekule β -CD. Tandemni spektar masa dobiven uz primjenu kolizijskog potencijala od 5,0 V prikazan je grafički na slici 42, dok su spektri masa dobiveni uz primjenu kolizijskih potencijala od 10,0, 20,0 i 40,0 V prikazani u dodatku (slike D25, D26 i D27). Tandemni spektri masa dobiveni uz primjenu svih iznosa kolizijskog potencijala prikazani su i tablično (tablica 24). Najizraženiji signal u MS/MS spektru pripada jednostruko protoniranom molekulskom ionu cinarizina, dok relativni intenzitet iona prekursora već pri malom iznosu kolizijskog potencijala pada u odnosu na bazni signal. Nadalje, vidljiv je signal pri vrijednosti m/z od 2270,7400 koji odgovara jednostruko nabijenom ionu građenom od dvije molekule β -CD. Prisutnost klastera dvije molekule β -ciklodekstrina upućuje na to da samo jedna molekula β -CD interagira s cinarizinom. Spektar masa također sadrži signal kompleksa građenog od jedne molekule β -ciklodekstrina i jedne molekule cinarizina (m/z 1503,5970). Osim toga u spektru masa vidljiv je signal molekulskog iona β -CD i signal njegovog najstabilnijeg fragmenta pri m/z 325,1120 te karakteristični signal difenilmetilnog kationa koji potječe od cinarizina pri m/z 167,0855.

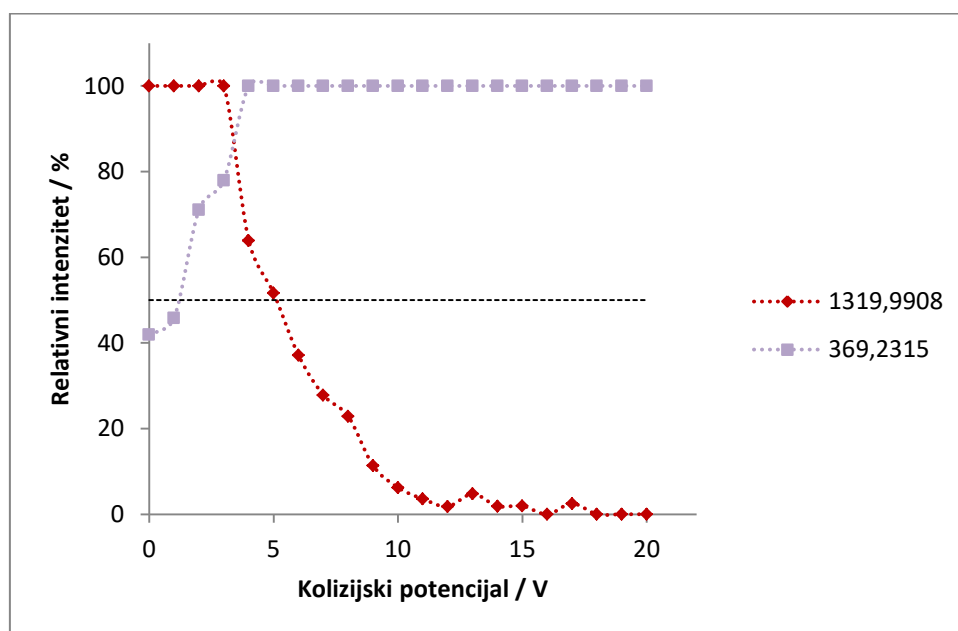


Slika 42. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1319,4900); $M=CIN+2\beta$ -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V

Tablica 24. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1319,9908). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
2269,7384	10,27	9,71	2,61	/	$[(2 \cdot C_{42}H_{70}O_{35})+H]^+$
1503,5970	1,27	1,18	2,21	0,26	$[C_{68}H_{98}O_{35}N_2+H]^+$
1319,9908	55,38	3,48	1,31	0,35	$[M+2H]^{2+}$
1135,3702	2,18	2,62	4,72	2,15	$[C_{42}H_{70}O_{35}+H]^+$
369,2315	100,00	100,00	100,00	100,00	$[C_{26}H_{28}N_2+H]^+$
325,1120	1,47	1,04	5,09	68,91	$[C_{12}H_{20}O_{10}+H]^+$
167,0855	3,52	3,07	10,61	75,52	$[C_{13}H_{11}]^+$

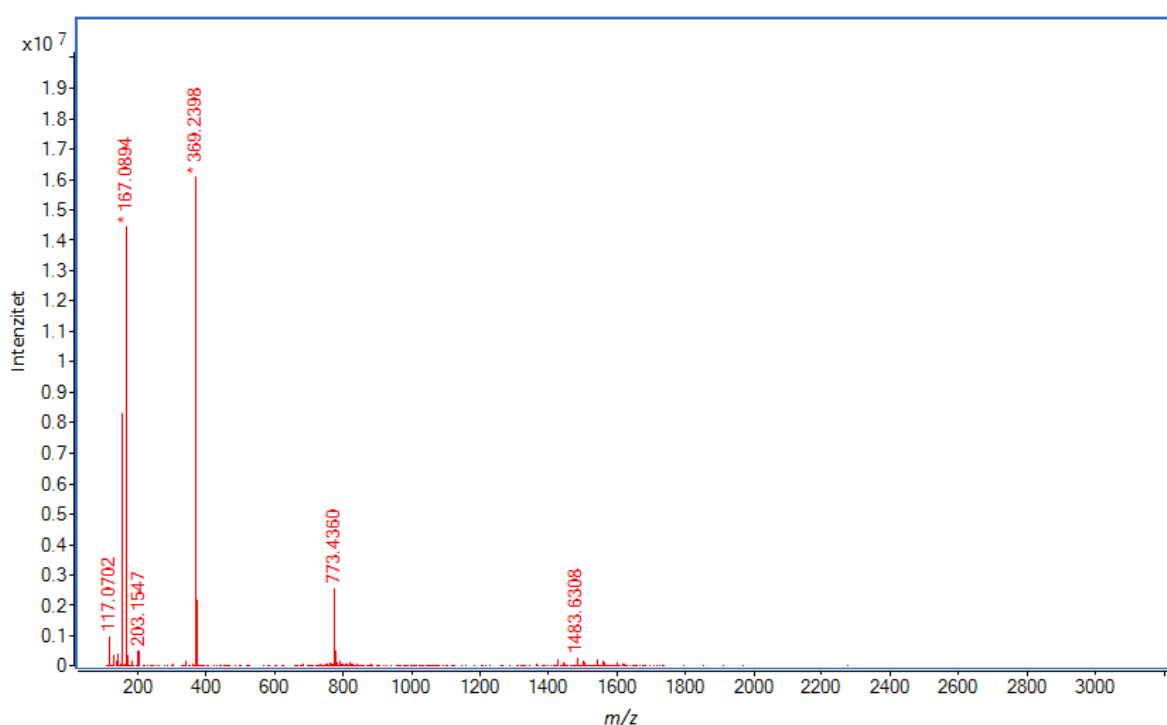
Korištenjem rezultata dobivenih nakon provedbe MS/MS eksperimenata na navedenom ionu uz sukcesivno povećanje kolizijskog potencijala u rasponu od 0 do 20,0 V konstruirana je *breakdown* krivulja iona klastera te krivulja nastanka glavnog produkta fragmentacije. Navedene krivulje prikazane su na slici 43. Glavni produkt fragmentacije je jednostruko protonirani molekularni ion cinarizina pri vrijednosti m/z od 369,2315.



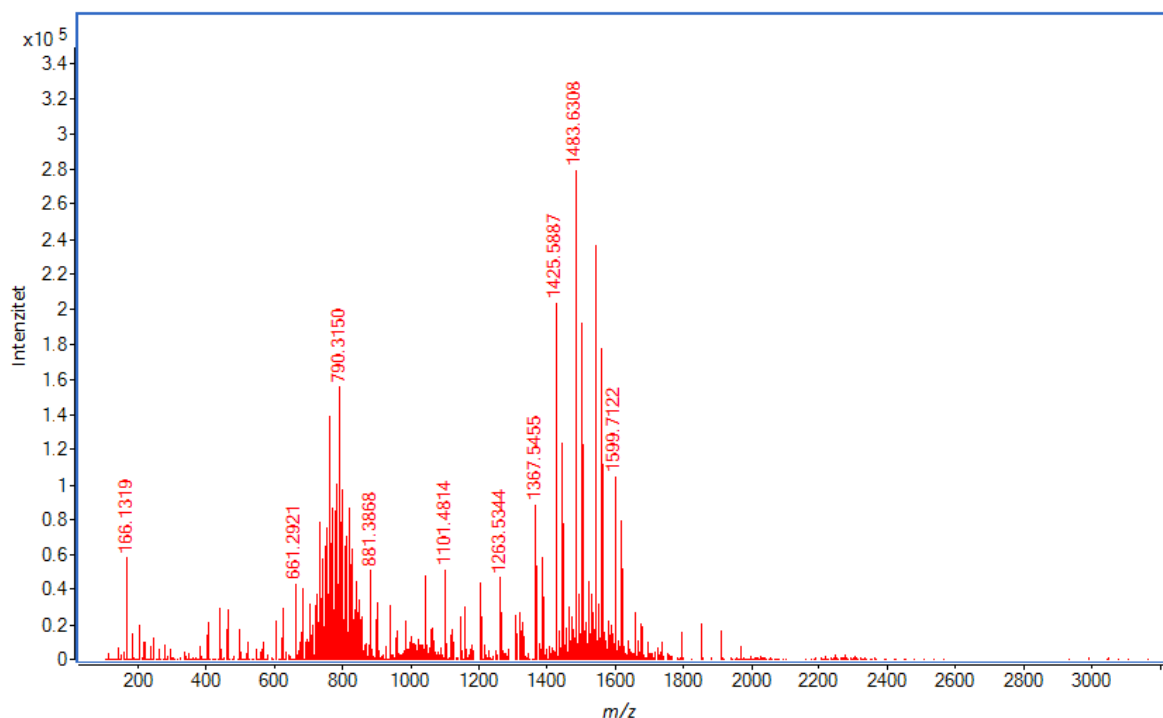
Slika 43. *Breakdown* krivulja iona klastera ($m/z = 1319,9908$) i krivulja nastanka iona produkta ($m/z = 369,2315$)

4.5. Analiza otopine inkluzijskog kompleksa cinarizina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina spektrometrijom masa

Spektri masa otopine cinarizina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 snimljeni su u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 3200. Spektri masa dobiveni su korištenjem ionizacije elektroraspšanjem u pozitivnom načinu rada. Spektar masa prikazan je grafički na slici 44 i tablično u tablici 25, pri čemu su u tablici prikazani samo oni ioni koji potječu od kompleksa cinarizina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina. U spektru masa bazni signal pripada jednostruko protoniranoj molekuli cinarizina zbog čega je od spektra masa oduzet spektar masa cinarizina zbog lakšeg pregleda, a prikazan je grafički na slici 45. U dobivenom spektru masa slabo su vidljivi ioni koji pripadaju kompleksu jer signali s najvećim intenzitetom pripadaju molekuli hidroksipropil- β -ciklodekstrina tako da je od navedenog spektra masa dodatno oduzet i spektar masa HP β CD te je rezultirajući spektar masa prikazan na slici 46.



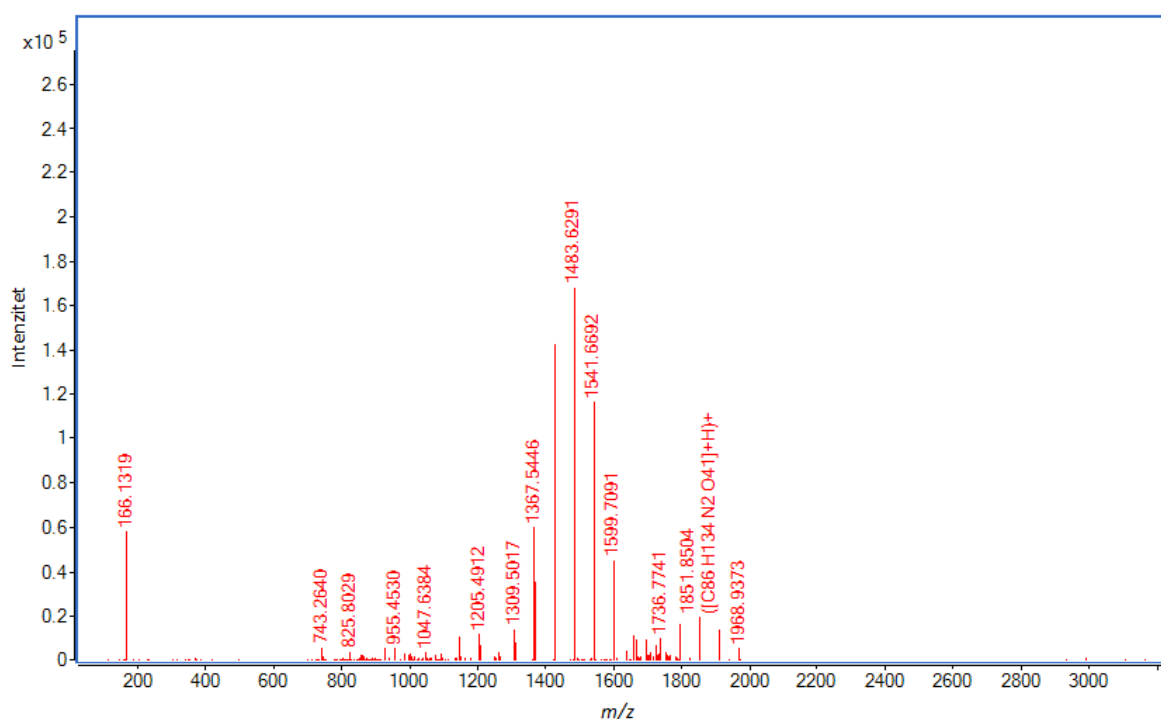
Slika 44. Spektar masa otopine cinarizina s HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V



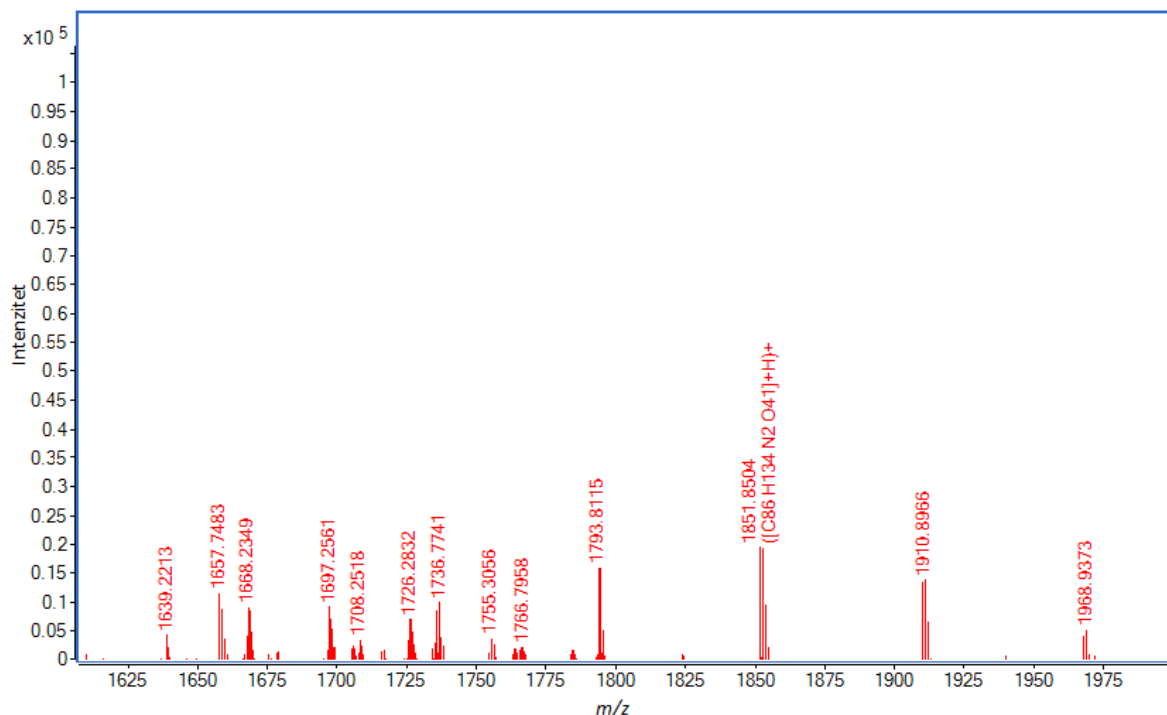
Slika 45. Spektar masa otopine cinarizina s HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 nakon oduzimanja spektra masa cinarizina. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

U spektru masa koji je prikazan na slici 46. čak i nakon oduzimanja pojedinačnih spektara cinarizina i HP β CD bazni signal pripada molekulskom ionu šesterostruko supstituiranog HP β CD (DS 6), $[\text{C}_{60}\text{H}_{106}\text{O}_4+\text{H}]^+$. Osim navedenog iona vidljivi su vrlo izraženi signali ostalih molekulskih iona HP β CD različitih stupnjeva supstitucije. Signal molekulskog iona kompleksa cinarizina i šesterostruko supstituiranog HP β CD, $[\text{DS}6+\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2+\text{H}]^+$, ima manji relativni intenzitet u odnosu na navedene ione te se nalazi pri vrijednosti m/z od 1851,8504, no on je najintenzivniji signal koji potječe od nekog kompleksnog spoja cinarizina i HP β CD. Radi bolje preglednosti spektar masa u rasponu vrijednosti m/z od 1600 do 2000 prikazan je na slici 47. U spektru masa prisutni su i signali kompleksa cinarizina s HP β CD kod kojih je broj supstituenata na ciklodekstrinu u rasponu od 4 do 8, no njihovi relativni intenziteti su manji u odnosu na ranije navedeni molekulski ion kompleksa pri vrijednosti m/z 1851,8504. Nadalje, u MS spektru su prisutni signali iona klastera koji su građeni od kompleksa cinarizina s HP β CD i jedne molekule HP β CD. Također, ovi signali mogu pripadati i kompleksima cinarizina i HP β CD u omjeru 1:2, slično kao što je bilo u slučaju otopina cinarizina s β -CD. Jedan takav signal se nalazi pri vrijednosti m/z od 1754,7957, a taj ion

građen je od molekule HP β CD sa sedam hidroksipropilnih supstituenata, molekule HP β CD s osam hidroksipropilnih supstituenata te molekule cinarizina, [DS7+DS8+C₂₆H₂₈N₂+2H]²⁺. Nadalje, vidljiv je signal pri vrijednosti m/z od 1696,7531 koji pripada ionu građenom od 2 molekule HP β CD (DS7+DS6) i molekule cinarizina. U spektru masa vidljivi su i signali iona koji su građeni od jedne molekule cinarizina i dvije molekule HP β CD istih stupnjeva supstituiranosti (6 do 7). Ukoliko promotrimo relativne intenzitete tih signala, može se primjetiti kako su signali koji pripadaju ionima koji sadrže dvije molekule HP β CD jednakih stupnjeva supstitucije imaju veći intenzitet u odnosu ione koji su građeni od različito supstituiranih HP β CD molekula.



Slika 46. Spektar masa otopine cinarizina s HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1 nakon oduzimanja pojedinačnih spektara masa cinarizina i HP β CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V



Slika 47. Spektar masa otopine cinarizina s HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$) u području m/z 1600 – 2000

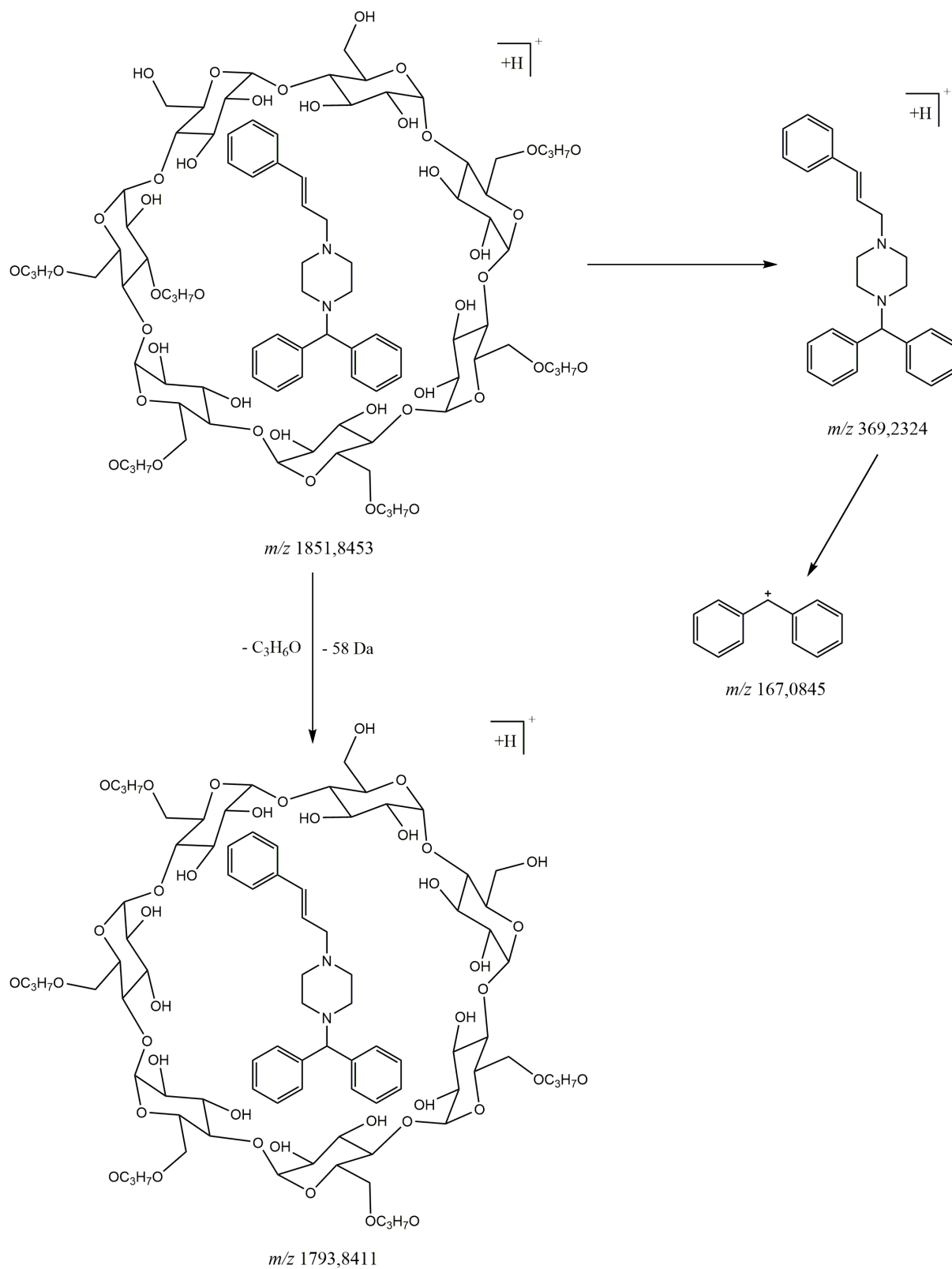
Tablica 25. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopine cinarizina ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$) i HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

Izmjeren m/z	Točan m/z	Relativan intenzitet / %	Asignacija signala
1667,7377	1667,7409	0,05	[2DS6+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +2H] ²⁺
1696,7531	1696,7622	0,04	[DS7+DS6+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +2H] ²⁺
1725,7798	1725,7827	0,03	[2DS7+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +2H] ²⁺
1735,7747	1735,7697	0,06	[DS4+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +H] ⁺
1754,7957	1754,8037	0,02	[DS7+DS8+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +2H] ²⁺
1763,3166	1763,3169	0,01	[DS7+DS8+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +NH ₄ +H] ²⁺
1765,7965	1765,7946	0,01	[DS7+DS8+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +Na+H] ²⁺
1793,8115	1793,8116	0,10	[DS5+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +H] ⁺
1851,8526	1851,8535	0,13	[DS6+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +H] ⁺
1909,8940	1909,8953	0,10	[DS7+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +H] ⁺
1967,9341	1967,9372	0,04	[DS8+C ₂₆ H ₂₈ N ₂ +H] ⁺

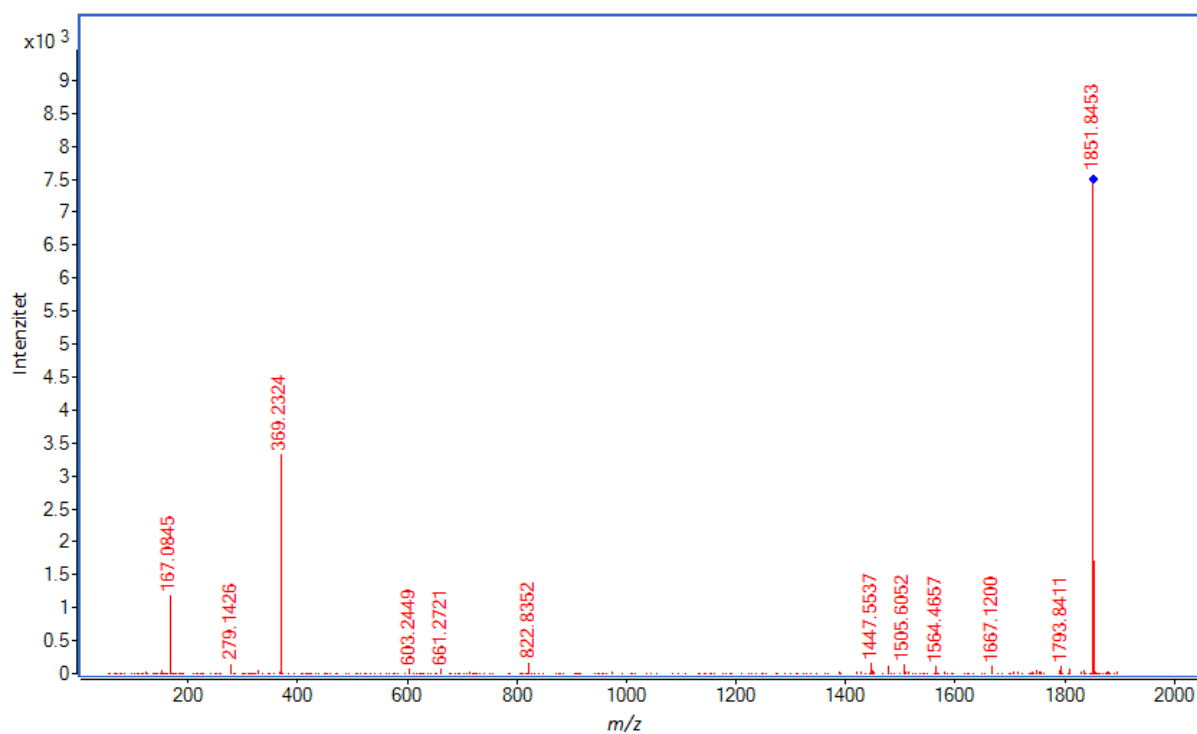
*DS – stupanj substitucije HP β CD (engl. *degree of substitution*, DS)

4.5.1. *MS/MS analiza odabranih iona kompleksa cinarizina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina*

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa provedeni su na nekoliko odabranih iona kompleksa cinarizina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Tandemni spektri masa snimljeni su u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 3200 te primjenom kolizijskih potencijala u rasponu vrijednosti od 5,0 do 40,0 V. Tandemni spektar masa molekuskog iona kompleksa građenog od cinarizina i šesterostruko supstituiranog HP β CD dobiven uz primjenu kolizijskog potencijala od 20,0 V prikazan je na slici 48, dok su MS/MS spektri dobiveni uz primjenu kolizijskog potencijala od 5,0, 10,0 i 40,0 V prikazani u dodatku (slika D28, slika D29, slika D30). Spektri masa dobiveni uz primjenu svih navedenih iznosa kolizijskog potencijala prikazani su i tablično (tablica 26). U MS/MS spektru prikazanom na slici 48 bazni signal pripada molekulskom ionu kompleksa, $[DS6+C_{26}H_{28}N_2+H]^+$. Osim navedenog, vrlo je izražen signal molekuskog iona cinarizina, $[C_{26}H_{28}N_2+H]^+$, a uz njega i signal karakterističnog fragmenta cinarizina tj. difenilmetilnog kationa, $[C_{13}H_{11}]^+$. Nadalje, vidljivi su i signali s manjim relativnim intenzitetom koji odgovaraju fragmentnim ionima HP β CD te fragmentima kompleksa. Tako primjerice dolazi do gubitka jedne hidroksipropilne skupine HP β CD unutar kompleksa pri čemu nastaje ion (m/z 1793,8411) koji je građen od molekule cinarizina i HP β CD s 5 hidroksipropilnih skupina, $[DS5+C_{26}H_{28}N_2+H]^+$. Signali uočeni pri m/z 661,2721 i 603,2449 pripadaju fragmentima HP β CD koji su već ranije opisani u poglavlju koje se odnosi na MS/MS analizu odabranih iona HP β CD. Ion pri vrijednosti m/z 661,2721 nastaje nakon gubitka tri supstituirane ($3 \cdot 220$ Da) i jedne nesupstituirane jedinice glukopiranoze (162 Da), dok ion pri vrijednosti m/z 603,2449 nastaje nakon gubitka četiri supstituirane jedinice. U spektru je prisutan i signal iona fragmenta koji predstavlja najstabilniji produkt fragmentacije HP β CD, $[C_{12}H_{22}O_7+H]^+$ (m/z 279,1426). Obzirom da fragmentacijom roditeljskog iona kao glavni produkt nastaje molekulski ion cinarizina moguće je zaključiti kako cinarizin tvori kompleks sa šesterostruko supstituiranim HP β CD koji pod utjecajem kolizijskog potencijala disocira, no nije moguće odrediti radi li se o inkluzijskom kompleksu. Pretpostavljena shema fragmentiranja navedenog iona prikazana je na slici 49.



Slika 49. Pretpostavljena shema fragmentacije jednostruko nabijenog iona kompleksa cinarizina i šesterostruko supstituiranog HPβCD, $[DS6+C_{26}H_{28}N_2+H]^+$

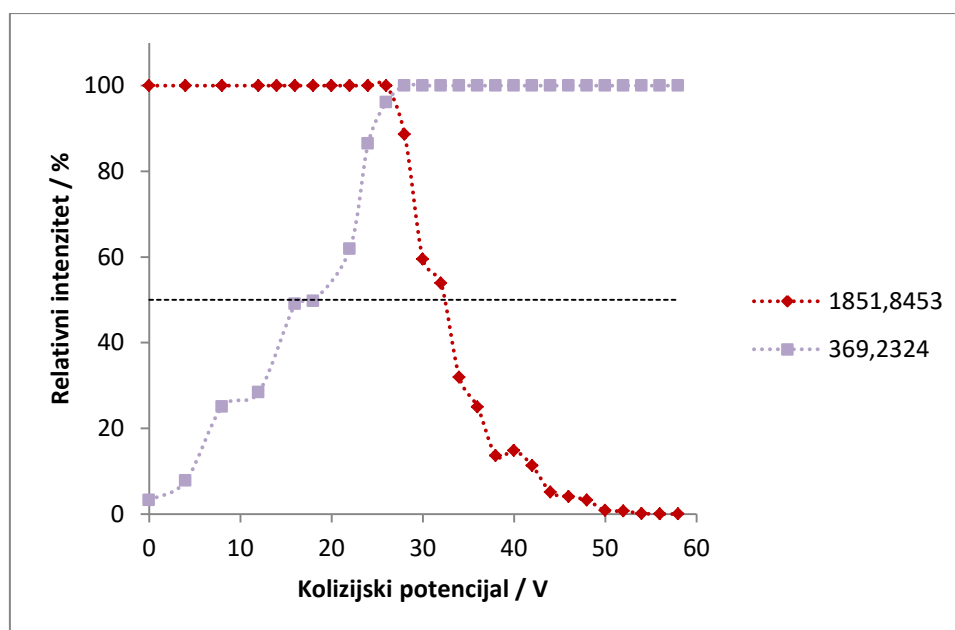


Slika 48. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1851,8526); M=CIN+HP β CD DS 6. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V

Tablica 26. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M+H]^+$ (m/z 1851,8526). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
1851,8453	100,00	100,00	100,00	11,64	$[M+H]^+$
1793,8411	/	1,14	1,54	/	$[M+H]^+ - C_3H_6O$
1447,5337	/	2,38	2,17	2,49	Nije asigniran
661,2721	/	/	1,05	/	$[C_{27}H_{48}O_{18}+H]^+$
603,2449	/	/	1,03	/	$[C_{24}H_{42}O_{17}+H]^+$
369,2324	12,47	19,82	43,90	100,00	$[C_{26}H_{28}N_2+H]^+$
279,1426	2,19	/	2,04	/	$[C_{12}H_{22}O_7+H]^+$
167,0845	11,23	3,18	15,72	16,54	$[C_{13}H_{11}]^+$

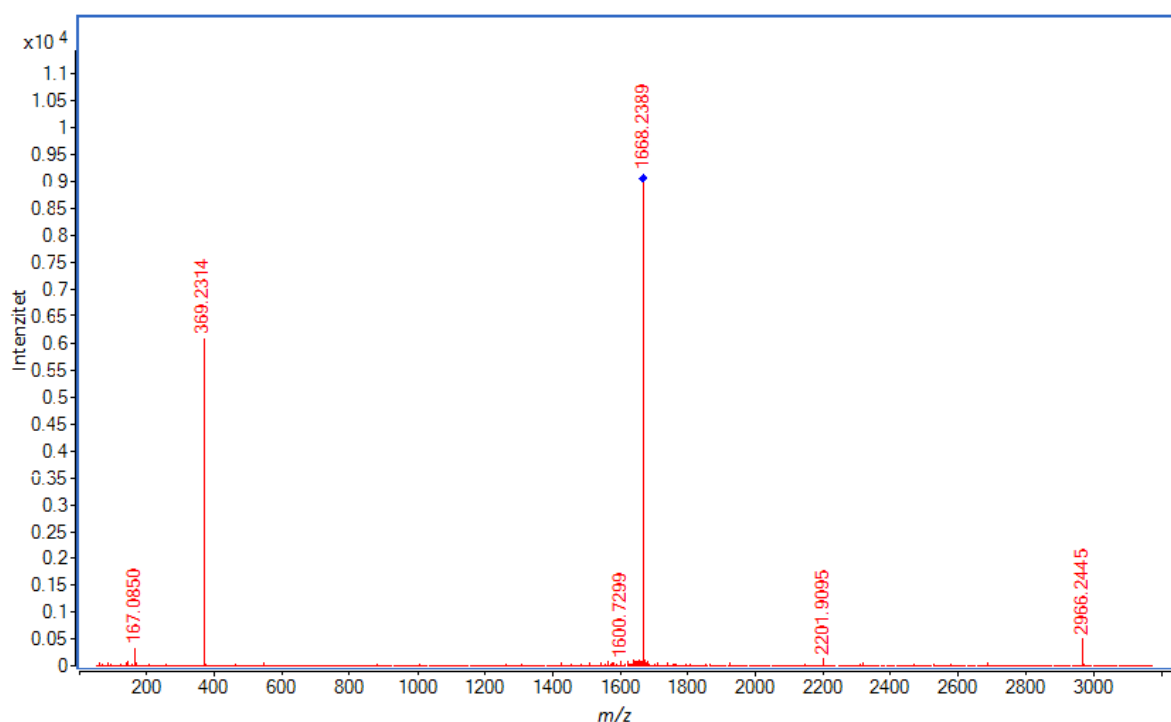
Pomoću rezultata MS/MS analize navedenog iona uz sukcesivno povećanje kolizijskog potencijala u rasponu od 0 do 58,0 V konstruirana je *breakdown* krivulja molekuskog iona kompleksa cinarizina i šesterostruko supstituirane molekule HP β CD te krivulja nastanka glavnog produkta fragmentacije, odnosno jednostruko protoniranog molekuskog iona cinarizina. Navedene krivulje prikazane su na slici 50.



Slika 50. *Breakdown* krivulja molekuskog iona kompleksa cinarizina i šesterostruko supstituiranog hidroksipropil- β -ciklodekstrina ($m/z = 1851,8453$) te krivulja nastanka molekuskog iona cinarizina ($m/z = 369,2324$)

Ukoliko usporedimo izgled *breakdown* krivulje iona kompleksa cinarizina i šesterostruko supstituiranog HP β CD i analogne *breakdown* krivulje iona kompleksa cinarizina i β -CD možemo pokušati izvesti zaključak o stabilnostima iona kompleksa s obzirom na primijenjeni kolizijski potencijal. Relativni intenzitet signala iona kompleksa CIN+ β -CD doseže vrijednost od 50 % pri primjeni kolizijskog potencijala od $\approx 25,0$ V (slika 39), dok relativni intenzitet signala iona kompleksa CIN+HP β CD DS6 vrijednost od 50 % doseže pri primjeni kolizijskog potencijala u vrijednosti između 30,0 i 40,0 V (slika 50). Iz navedenog je jasno kako ion kompleksa CIN+ β -CD disocira pri nižim vrijednostima kolizijskog potencijala u odnosu na ion kompleksa CIN+HP β CD, a prema čemu se može zaključiti kako cinarizin gradi stabilniji kompleks s odabranim sintetskim derivatom β -CD u odnosu na kompleks s prirodnim β -CD.

Eksperiment tandemne spektrometrije masa proveden je i na ionu pri m/z 1667,7377 za koji smo već naglasili da može pripadati klasteru kompleksa cinarizina s HP β CD i jedne molekule HP β CD ili pak kompleksu cinarizina i HP β CD u omjeru 1:2. MS/MS spektar dobiven primjenom kolizijskog potencijala od 5,0 V prikazan je na slici 51, dok su MS/MS spektri dobiveni primjenom kolizijskih potencijala u iznosu od 10,0, 20,0 i 40,0 V prikazani u dodatku (slika D31, slika D32 i slika D33). Tandemni spektri masa prikazani su i tablično (tablica 27). Najizraženiji signal, odnosno bazni signal odgovara roditeljskom ionu izabranom za fragmentaciju, $[2C_{60}H_{106}O_{41}+C_{26}H_{28}N_2+2H]^{2+}$, no vrlo je izražen i signal molekulskog iona cinarizina koji predstavlja glavni produkt fragmentacije. Osim ova dva navedena signala, primjetan je i signal klastera dvije molekule šesterostruko supstituiranog HP β CD pri m/z 2966,2445 što je istovjetno rezultatima tandemne spektrometrije masa koja je provedena na ionu m/z 1319,9908 u sklopu analize kompleksa cinarizina s β -CD. Prisutnost signala navedenog iona u MS/MS spektru upućuje na to da samo jedna od molekula HP β CD interagira s molekulom cinarizina.



Slika 51. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1667,7377); $M=CIN+2HP\beta CD$ DS 6.

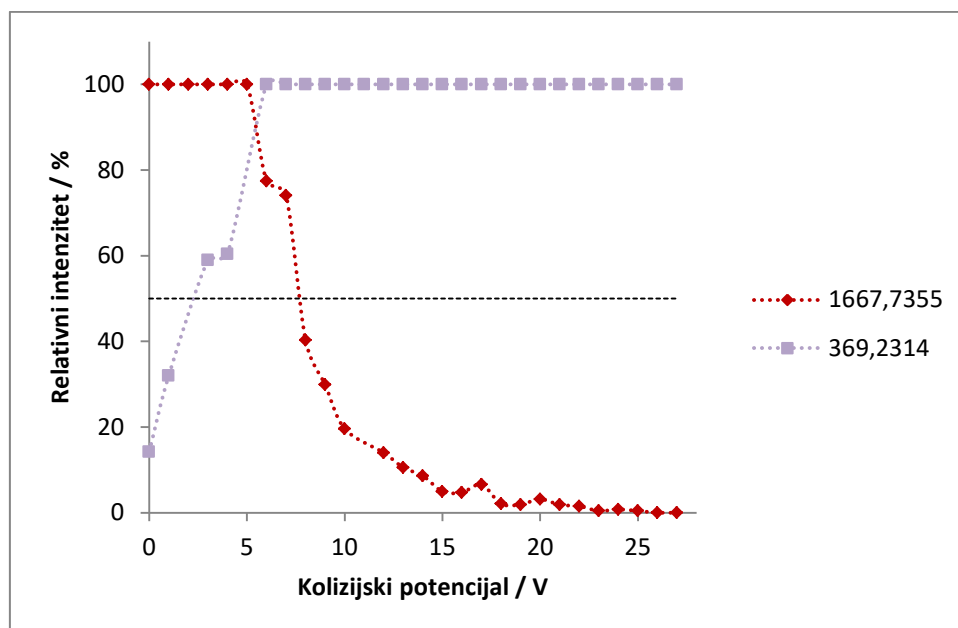
Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V

Tablica 27. Izmjerene vrijednosti m/z te relativni intenziteti signala iz MS/MS spektra iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1667,7377). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijali 5,0, 10,0, 20,0 i 40,0 V

Izmjeren m/z	Relativan intenzitet / %				Asignacija signala
	5,0 V	10,0 V	20,0 V	40,0 V	
2966,2445	5,70	6,02	1,70	0,20	$[2C_{60}H_{106}O_{41}+H]^+$
1667,7355	77,54	31,10	3,47	0,97	$[2C_{60}H_{106}O_{41}+C_{26}H_{28}N_2+2H]^{2+}$
369,2314	66,58	100,00	100,00	100,00	$[C_{26}H_{28}N_2+H]^+$
167,0850	3,85	2,80	3,38	30,27	$[C_{13}H_{11}]^+$

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa uz sukcesivno povećavanje kolizijskog potencijala u rasponu od 0 do 27,0 V provedeni su na navedenom ionu. Korištenjem podataka dobivenih eksperimentima tandemne spektrometrije masa konstruirana je *breakdown* krivulja iona klastera te krivulja nastanka produkta fragmentacije, odnosno jednostruko protoniranog molekuskog iona cinarizina. Navedene krivulje prikazane su na slici 52.

Usporedbom izgleda *breakdown* krivulje navedenog iona klastera i analogne *breakdown* krivulje iona klastera kojeg čini kompleks CIN+ β -CD i molekula β -CD možemo procijeniti i usporediti njihovu stabilnost. Relativni intenzitet signala iona klastera koji uključuje β -CD doseže vrijednost od 50 % pri primjeni kolizijskog potencijala od \approx 5,0 V (slika 43), dok relativni intenzitet signala iona klastera koji uključuje njegov sintetski derivat vrijednost od 50 % doseže pri primjeni kolizijskog potencijala od \approx 7,0 V (slika 52). Iz navedenog se može zaključiti kako ion klastera koji gradi β -CD disocira pri nižim vrijednostima kolizijskog potencijala u odnosu na stabilniji ion klastera koji gradi HP β CD.



Slika 52. Breakdown krivulja iona klastera ($m/z = 1667,7355$) i krivulja nastanka iona produkta ($m/z = 369,2314$)

§ 5. ZAKLJUČAK

Spektrometrijom masa visokog razlučivanja uz ionizaciju elektroraspršenjem analizirane su otopine pojedinačnih komponenti: cinarizina, β -ciklodekstrina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina te smjese otopina cinarizina i nabrojanih ciklodekstrina. Cilj diplomskog rada bio je potvrda postojanja kompleksa cinarizina i odabranih ciklodekstrina u plinskoj fazi.

U spektrima masa otopina pojedinačnih komponenti koji su dobiveni ionizacijom u pozitivnom načinu rada uočeni su signali jednostruko protoniranih molekulskih iona te u slučaju spektara masa otopina ciklodekstrina signali jednostruko i dvostruko nabijenih adukata s Na^+ , K^+ i NH_4^+ . U spektrima masa otopina ciklodekstrina koji su dobiveni ionizacijom u negativnom načinu rada uočeni su signali jednostruko deprotoniranih molekulskih iona te intenzivni signali adukata s formijatnim anionom koji su posljedica prisutnosti mravlje kiseline u korištenoj mobilnoj fazi. U spektrima masa smjesa otopina cinarizina i β -CD koji su dobiveni pozitivnim načinom ionizacije uočeni su signali jednostruko (m/z 1503,6042) i dvostruko protoniranih iona (m/z 752,3075) koji su upućivali na postojanje kompleksa u omjeru 1:1 u plinskoj fazi. Uočen je i signal koji je prema omjeru mase i naboja (m/z 1319,4900) odgovarao kompleksu u omjeru 1:2 za koji je nakon MS/MS analize pretpostavljeno da je zapravo klaster kompleksa cinarizina i β -CD u omjeru 1:1 te jedne molekule CD. U spektrima masa smjesa otopina cinarizina i HP β CD uočeni su signali kompleksa koje su tvorili cinarizin i molekule CD različitog stupnja supstituiranosti u omjeru 1:1 od koji su najintenzivniji bili oni kod kojih je molekula CD bila supstituirana s 5 (m/z 1793,8115), 6 (m/z 1851,8526) te 7 hidroksipropilnih skupina (m/z 1909,8940). U spektrima masa smjesa otopina cinarizina i odabranih CD koji su dobiveni negativnim načinom ionizacije nisu uočeni signali koji bi se mogli asignirati kompleksima.

Analizom tandemnom spektrometrijom masa pokušalo se dobiti više informacije o načinu vezanja cinarizina i CD, ali i procijeniti te usporediti stabilnost kompleksa cinarizina s odabranim CD u plinskoj fazi. U MS/MS spektrima jednostruko protoniranih iona kompleksa cinarizina s β -CD te s HP β CD najintenzivniji signal pripisan je jednostruko protoniranom molekulskom ionu cinarizina iz čega je zaključeno kako kompleks disocira pod utjecajem kolizijskog potencijala. Na temelju izgleda *breakdown* krivulja koje su konstruirane korištenjem MS/MS rezultata ovih jednostruko protoniranih iona kompleksa zaključeno je

kako cinarizin s HP β CD tvori nešto stabilniji kompleks u odnosu na kompleks s β -CD u plinskoj fazi. Prilikom MS/MS analize dvostruko protoniranog iona kompleksa cinarizina s β -CD uočen je signal pri m/z 1337,5179 koji upućuje, no ne potvrđuje inkluziju molekule cinarizina u ciklodekstrinsku šupljinu. Naime, ovaj signal posljedica je fragmentacije molekule cinarizina (i gubitka difenilmetilnog dijela) pri čemu zaostali dio molekule cinarizina ostaje vezan za β -CD.

Kako bi se nedvojbeno potvrdila inkluzija molekule cinarizina u ciklodekstrinsku šupljinu na koju spomenuti rezultat upućuje, analiza smjesi otopina cinarizina i ciklodekstrina NMR spektroskopijom svakako bi bila sljedeći logičan korak u sklopu karakterizacije ovih kompleksa, budući da se spomenuta tehnika još uvijek smatra najkompletnijom i najkorisnijom za izučavanje interakcija ciklodekstrina i molekula gosta. Analiza NMR spektroskopijom omogućila bi uvid u strukturu kompleksa u otopini, a na temelju rezultata bi se dobile specifične informacije o orijentaciji molekule cinarizina u šupljini CD te bi bilo moguće provjeriti korelaciju s rezultatima MS i MS/MS analize u plinskoj fazi koji su predstavljeni u sklopu ovog diplomskog rada.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

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

ATR – tehnike prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*)

BCS – biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari (engl. *biopharmaceutical classification system*)

CAD – kolizijom aktivirana disocijacija iona (engl. *collision-activated dissociation*)

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

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

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

CRM – model ostatka naboja (engl. *charge residue model*)

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

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

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

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

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

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation*)

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

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

GRAS – engl. *generally recognized as safe*

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

HPβCD – 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin

HSM – temperaturno ovisna mikroskopija (engl. *hot-stage microscopy*)

IEM – model isparavanja naboja (engl. *ion evaporation model*)

ITC – izotermalna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*)

LC-MS – vezani sustav tekućinska kromatografija – spektrometrija masa

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

MS – spektrometrija masa, spektar masa

MS/MS – eksperimenti tandemne spektrometrije masa, tandemni spektri masa

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

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

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

PXRD – difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (engl. *powder X-Ray diffraction*)

Q – kvadrupolni analizator masa (engl. *quadrupole*)

Q-TOF – hibridni instrument koji ima vezan kvadrupolni i analizator masa koji mjeri vrijeme leta

SCXRD – difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu (engl. *single crystal X-ray diffraction*)

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

SIMS – spektrometrija masa sekundarnih iona (engl. *secondary ion mass spectrometry*)

TGA – termogravimetrijska analiza (engl. *thermogravimetric analysis*)

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

TSP – ionizacija termoraspršenjem (engl. *thermospray ionization*)

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

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

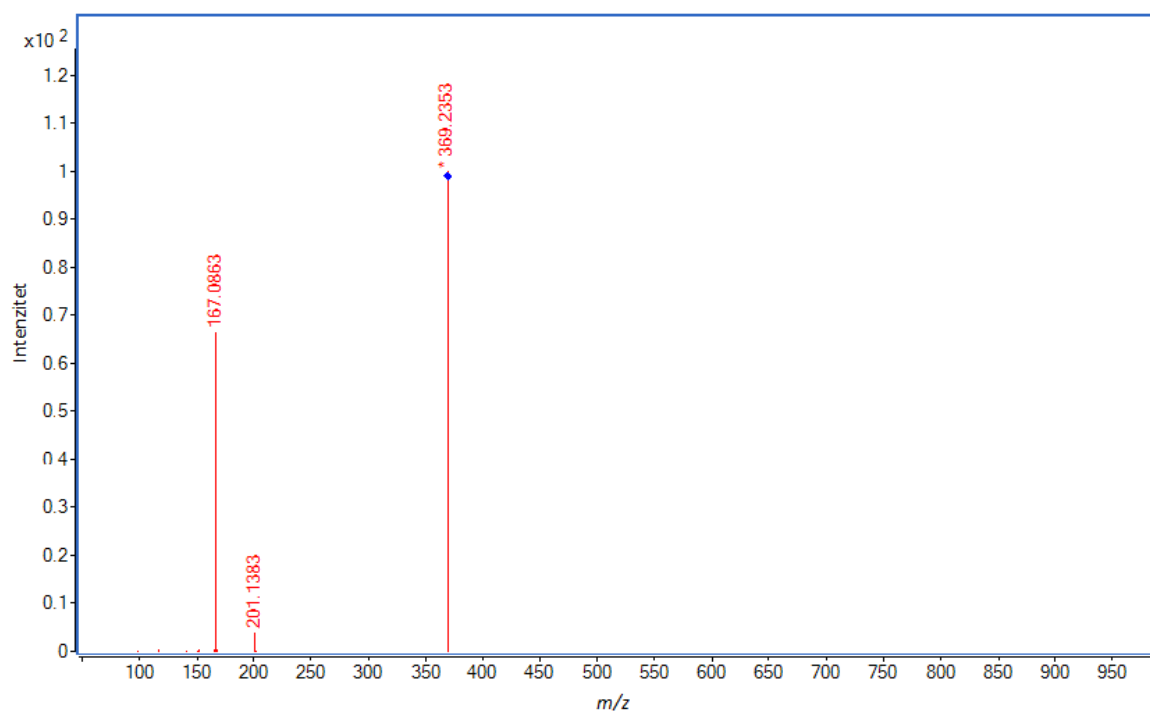
β-CD – β-ciklodekstrin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

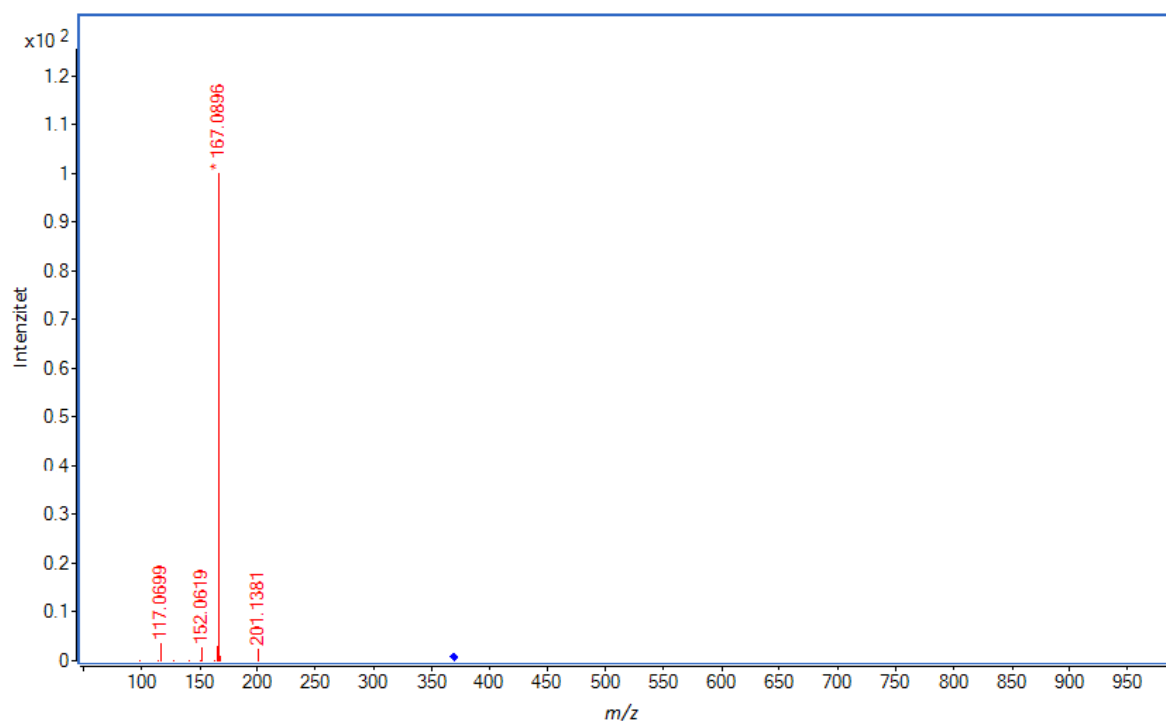
1. R. Singh, N. Bharti, J. Madan, S. N. Hiremath, *J. Pharm. Sci. Technol.* **1** (2010) 171–183.
2. S. Formentin, G. Crini, E. Lichtfouse, *Cyclodextrine Fundamentals, Reactivity and Analysis*, Springer International Publishing AG, Cham, 2018, str. 3–6.
3. N. G. Haress u H. G. Brittain (ur.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Vol. 40, Academic Press, Elsevier Inc., Cambridge, 2015, str. 1.
4. S. Raghuvanshi, K. Pathak, *J. Drug Delivery* **2014** (2014) 1–14.
5. A. Charalabadis, M. Sfouni, C. Bergström, P. Macheras, *Int. J. Pharm.* **566** (2019) 264–281.
6. H. V. Chavda, C. N. Patel, I. S. Anand, *Syst. Rev. Pharm.* **1** (2010) 62–69.
7. S. Kalepu, V. Nekkanti, *Acta Pharm. Sin. B* **5** (2015) 442–453.
8. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 238–250.
9. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 272–284.
10. C. J. Bruns, *Symmetry* **11** (2019) 1249.
11. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, T. Loftsson, *Molecules* **23** (2018) 1161.
12. M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discovery* **3** (2004) 1023–1035.
13. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607–1621.
14. E. Martin del Valle, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
15. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 226–238.
16. M. Sillion, A. Fifere, A. L. Lungoci, N. L. Marangoci, S. A. Ibanescu, R. Zonda, A. Rotaru, M. Pinteală, u A. G. Woods, C. C. Darie (ur.), *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research (Adv. Exp. Med. Biol.)*, Vol 1140, Springer Nature Switzerland AG, Cham, 2019, str. 685.
17. J. H. Gross, *Mass spectrometry: a textbook*, Springer International Publishing AG, Cham, 2017, str. 1–769.
18. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, str. 1–291.
19. D. R. Allen, B. C. McWhinney, *Clin. Biochem. Rev.* **40** (2019) 135–146.
20. M. C. Dumasia, *Xenobiotica* **32** (2002) 809–821.

21. P. Mandal, S. Dan, A. Bose, S. Bag, A. Biswas, J. Khanam, T. Kumar Pal, *Pharm. Pharmacol. Int. J.* **6** (2018) 475–482.
22. A. A.-W. Shahba, F. K. Alanazi, S. I. Abdel-Rahman, *PLoS One* **13** (2018) 1–26.
23. A. O. Chizhov, Y. E. Tsvetkov, N. E. Nifantiev, *Molecules* **24** (2019) 2226.

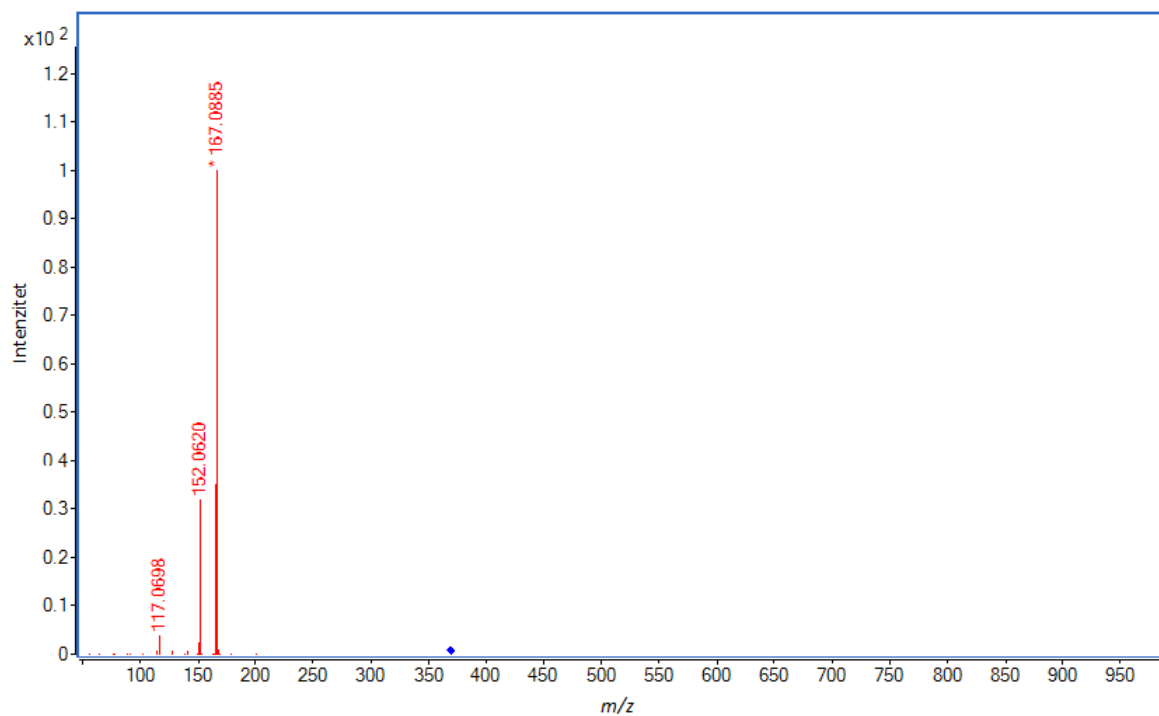
§ 8. DODATAK



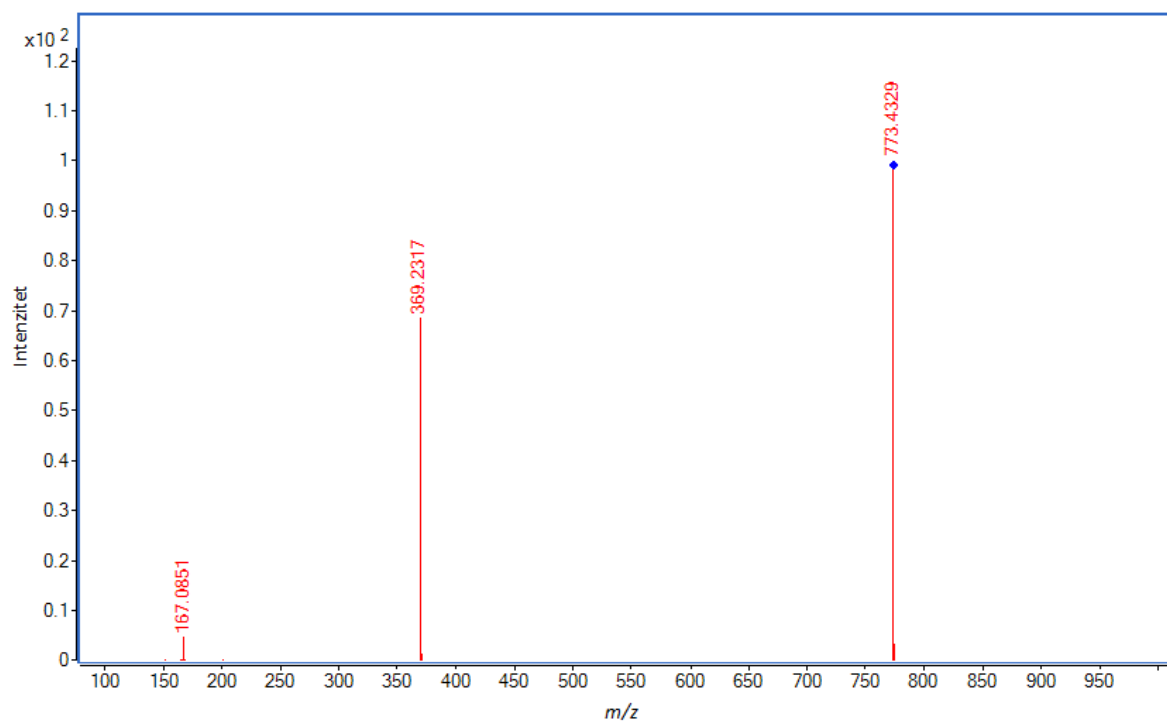
Slika D1. MS/MS spektar jednostruko nabijenog molekuskog iona cinarizina, $[M+H]^+$ (m/z 369,2415). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V



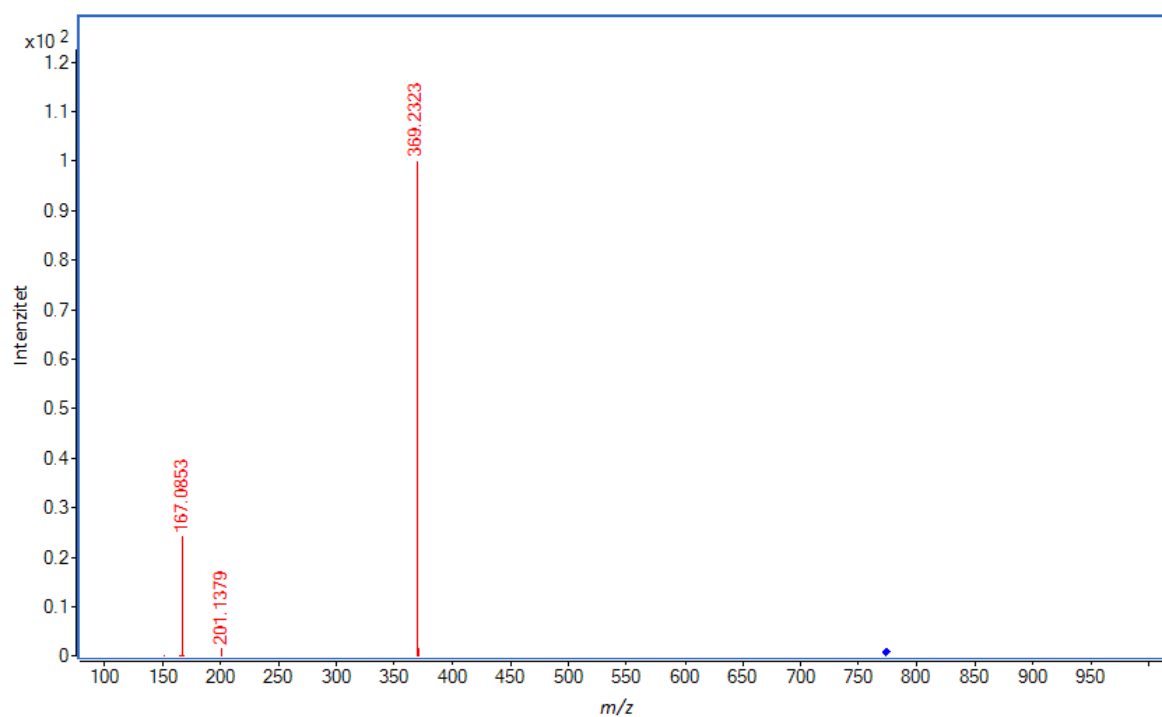
Slika D2. MS/MS spektar jednostruko nabijenog molekuskog iona cinarizina, $[M+H]^+$ (m/z 369,2415). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



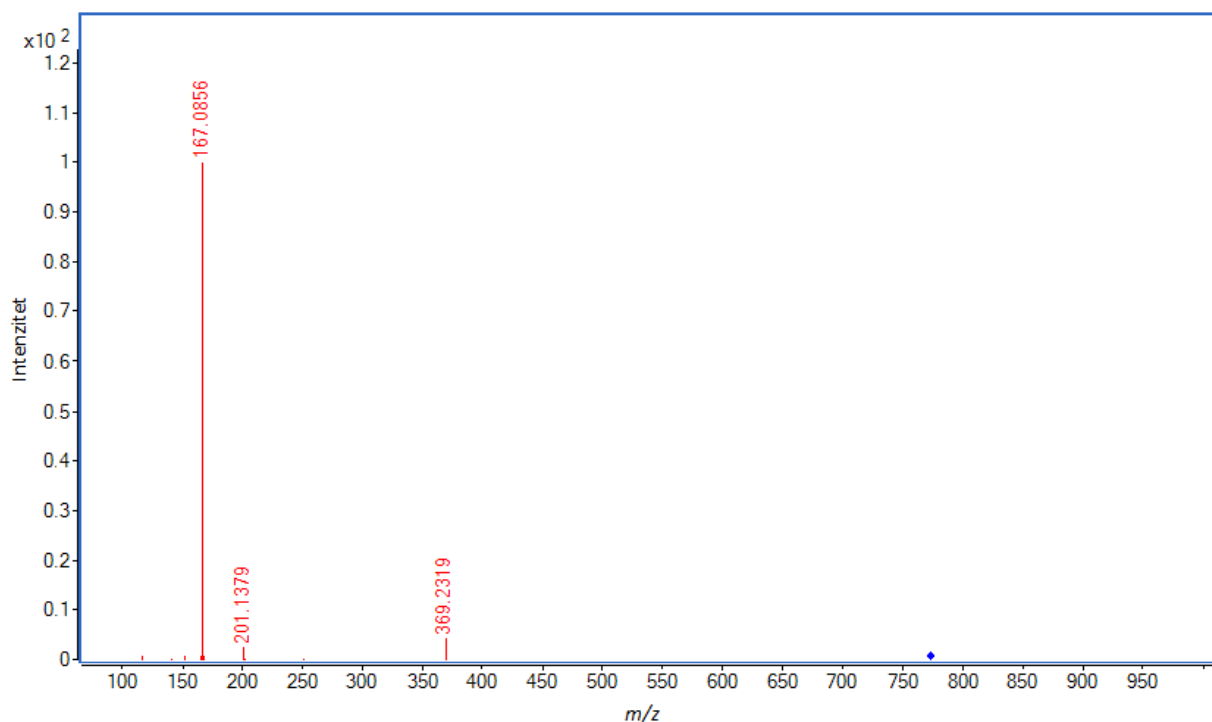
Slika D3. MS/MS spektar jednostruko nabijenog molekuskog iona cinarizina, $[M+H]^+$ (m/z 369,2415). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



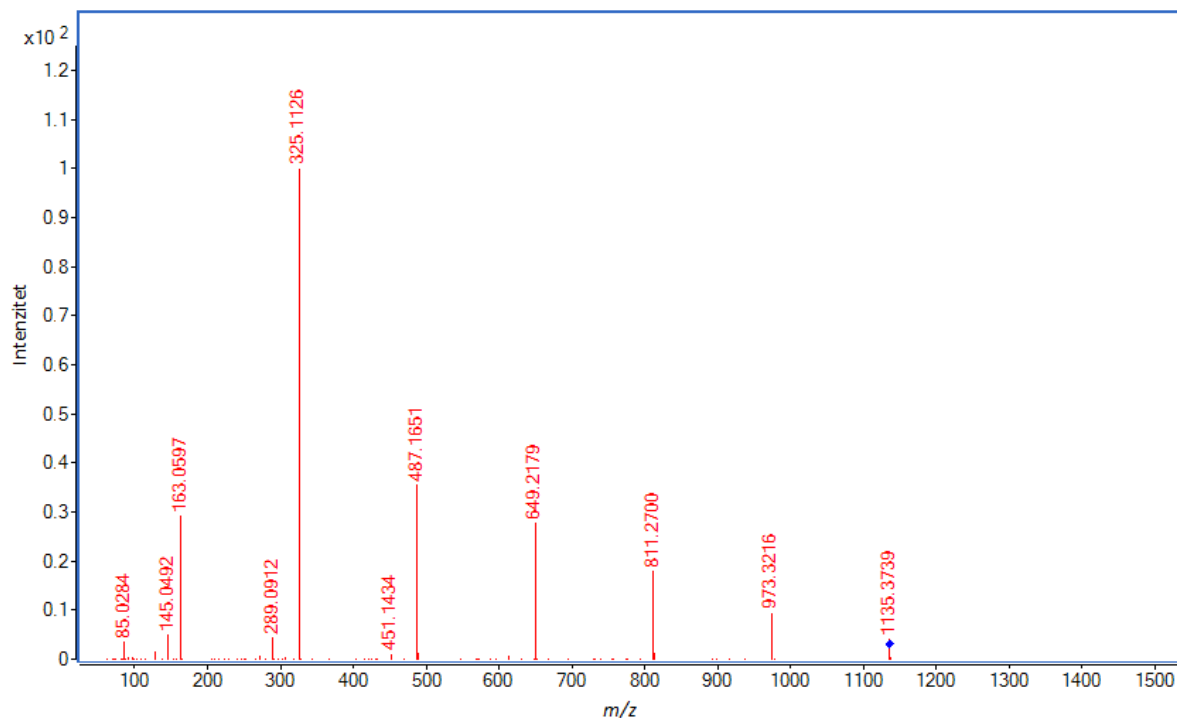
Slika D4. MS/MS spektar iona m/z 773,4360. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V



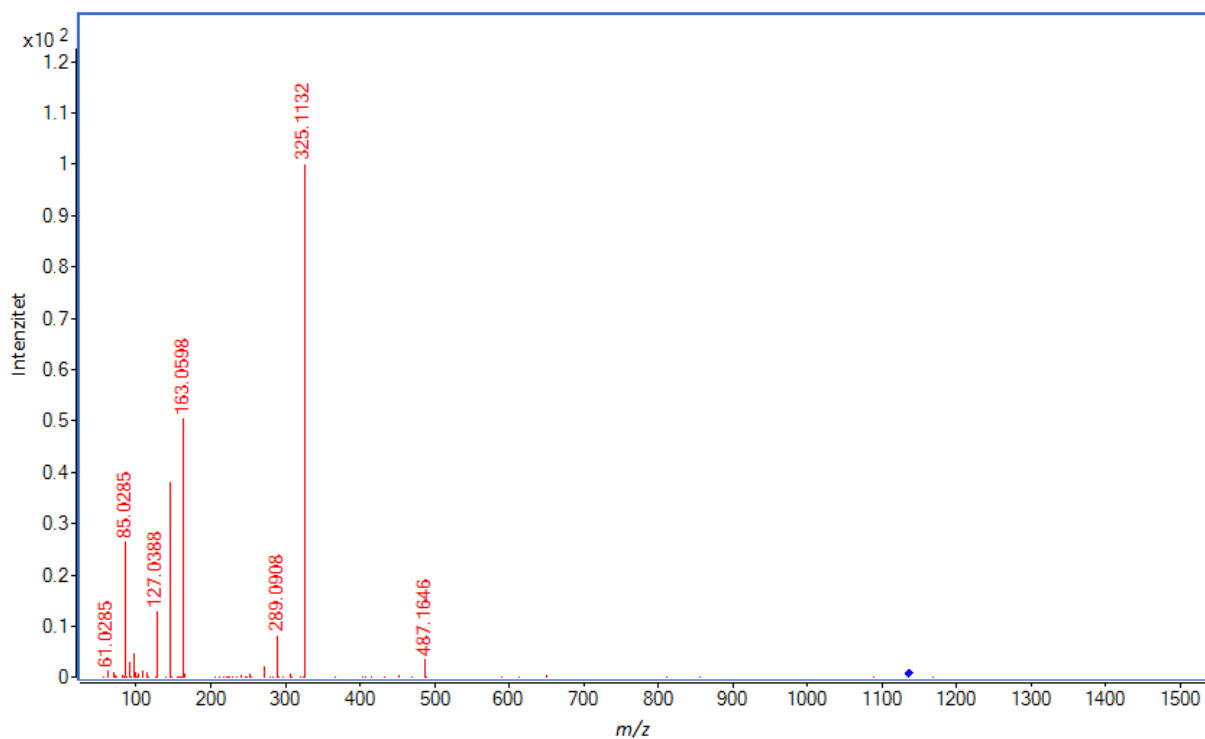
Slika D5. MS/MS spektar iona m/z 773,4360. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



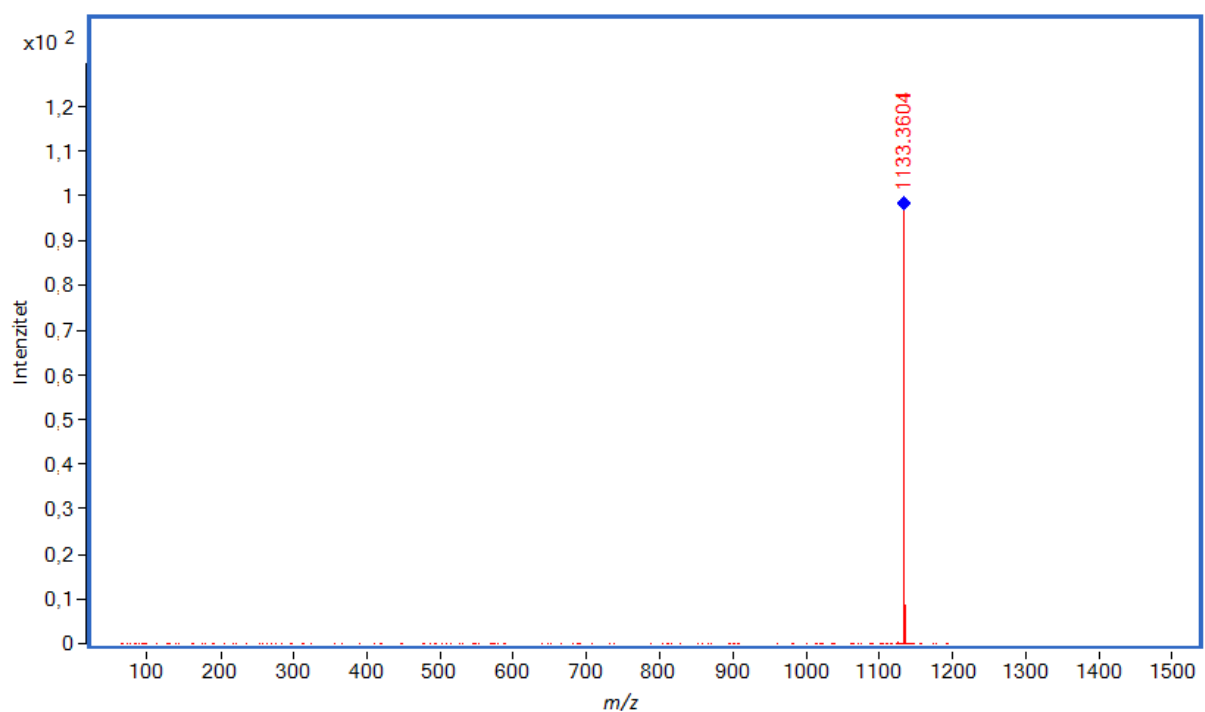
Slika D6. MS/MS spektar iona m/z 773,4360. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



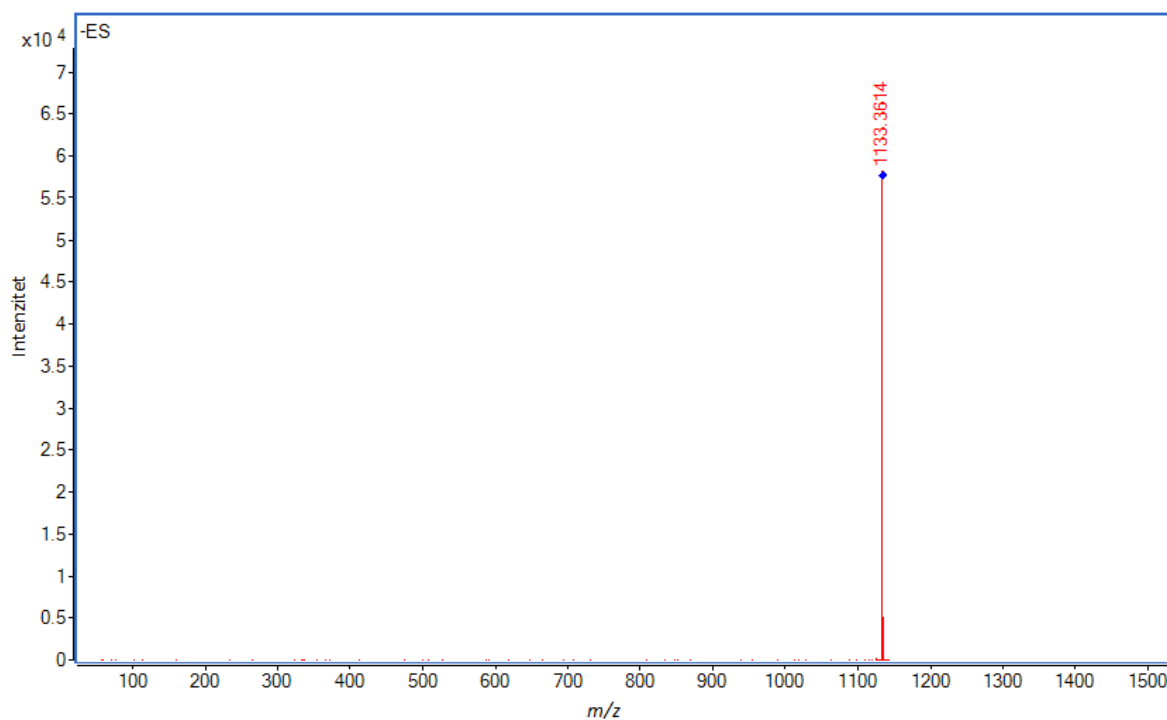
Slika D7. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1135,3783). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



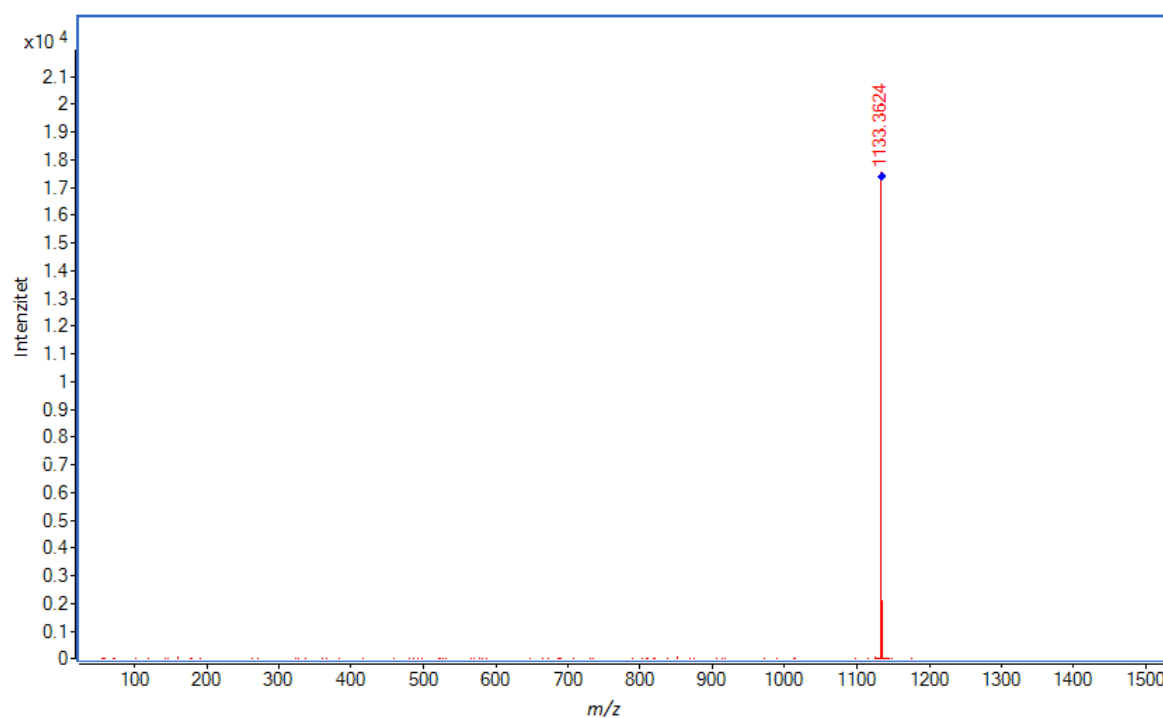
Slika D8. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1135,3783). Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



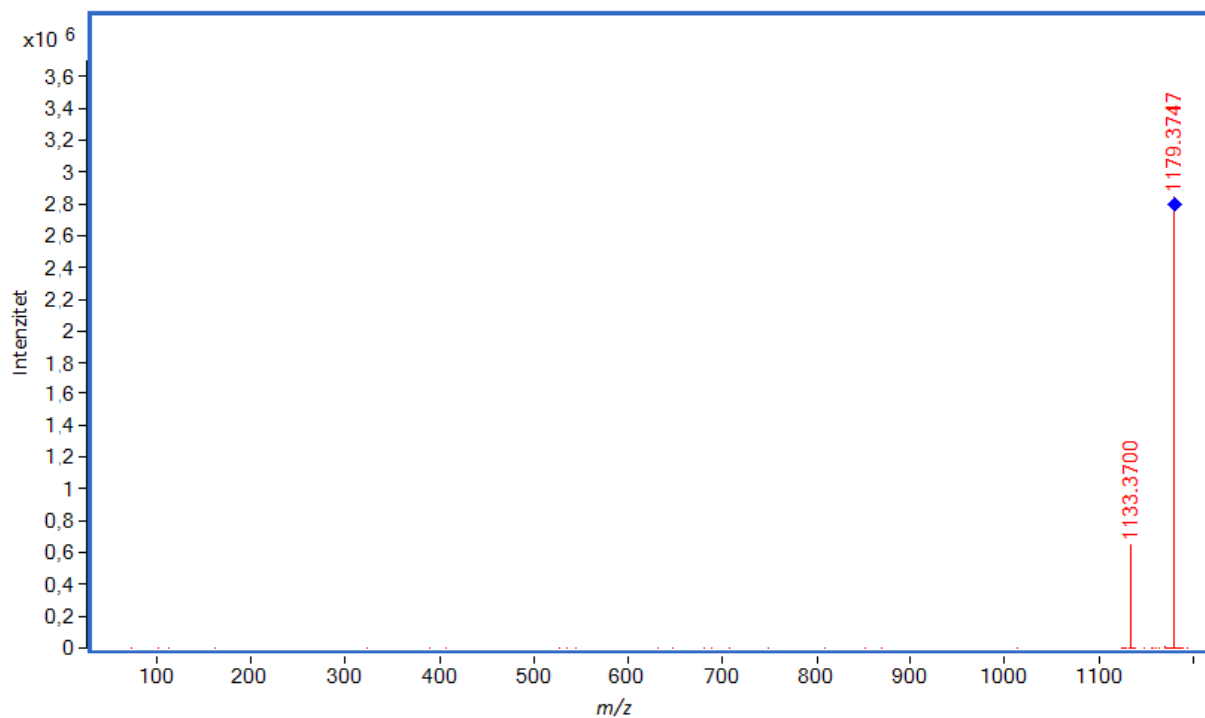
Slika D9. MS/MS spektar iona $[M-H]^-$ (m/z 1133,3603). Ionizacija ESI-, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V



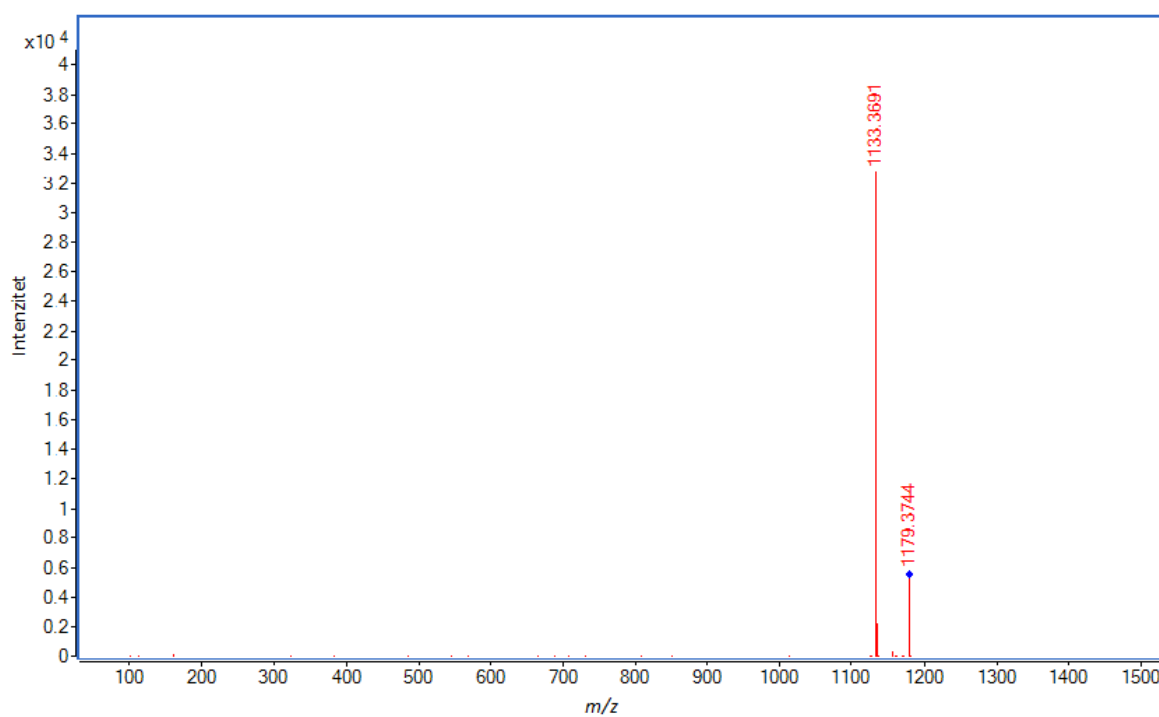
Slika D10. MS/MS spektar iona $[M-H]^-$ (m/z 1133,3603). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V



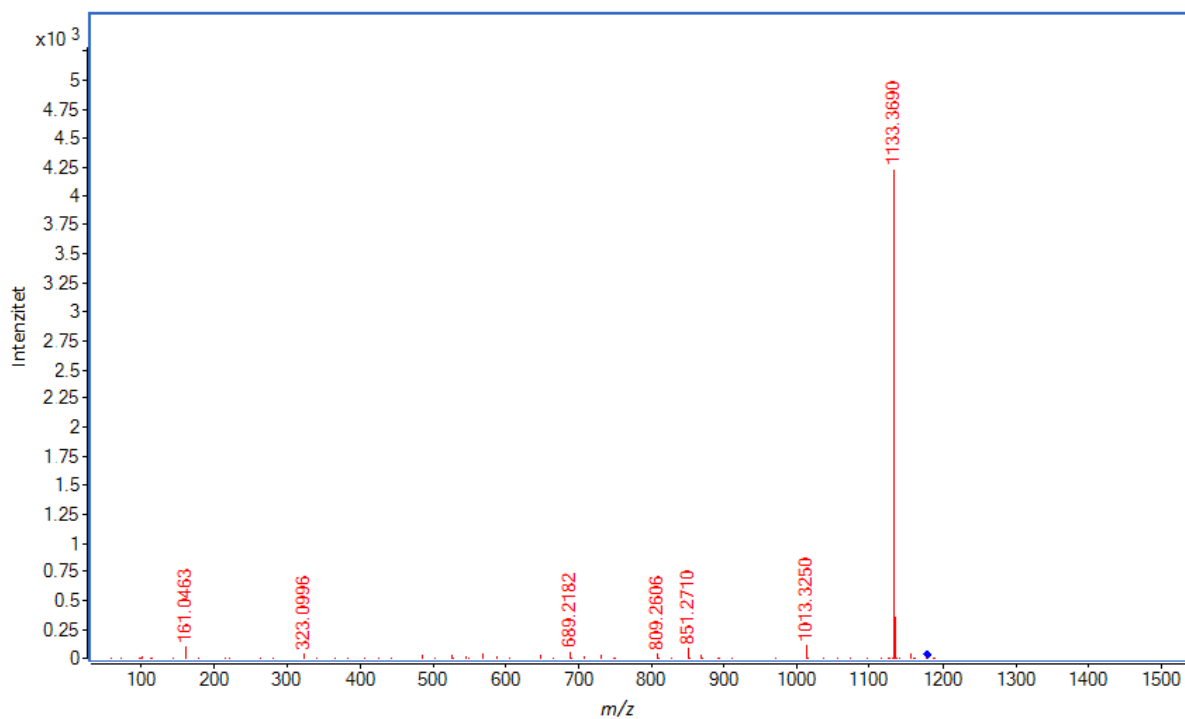
Slika D11. MS/MS spektar iona $[M-H]^-$ (m/z 1133,3603). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



Slika D12. MS/MS spektar iona $[M+HCOO]^-$ (m/z 1179,3705). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V



Slika D13. MS/MS spektar iona $[M+HCOO]^-$ (m/z 1179,3705). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



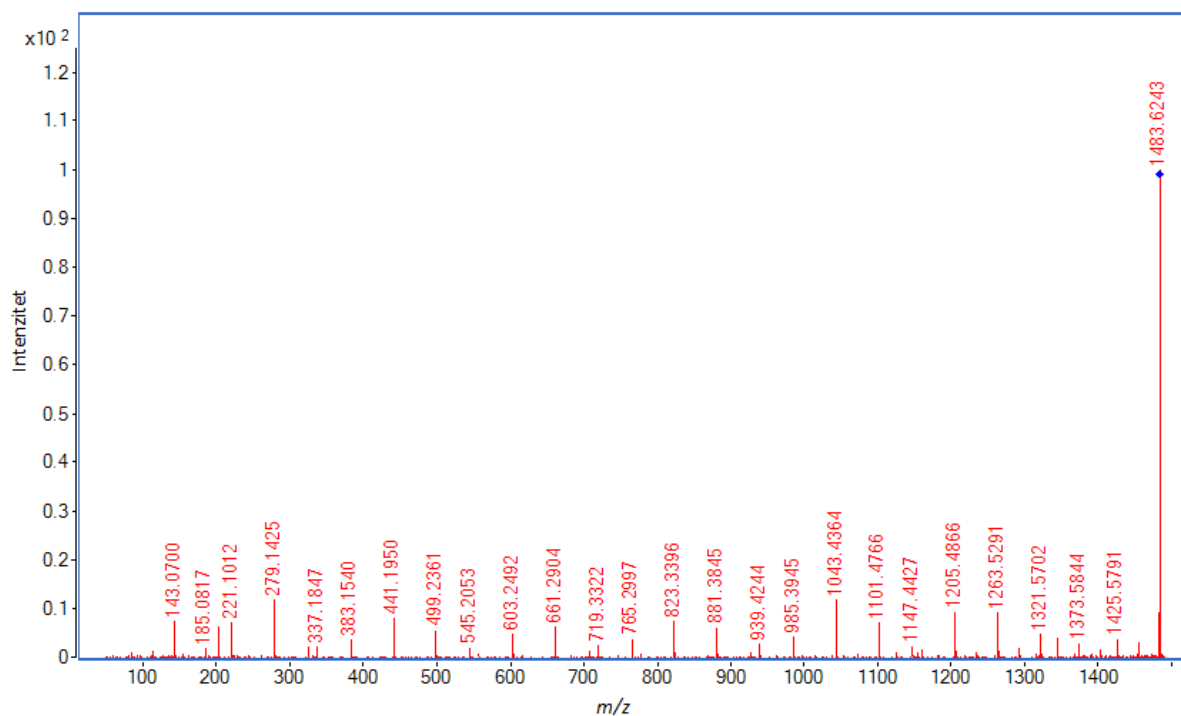
Slika D14. MS/MS spektar iona $[M+HCOO]^-$ (m/z 1179,3705). Ionizacija ESI⁻, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V

Tablica D1. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala dvostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

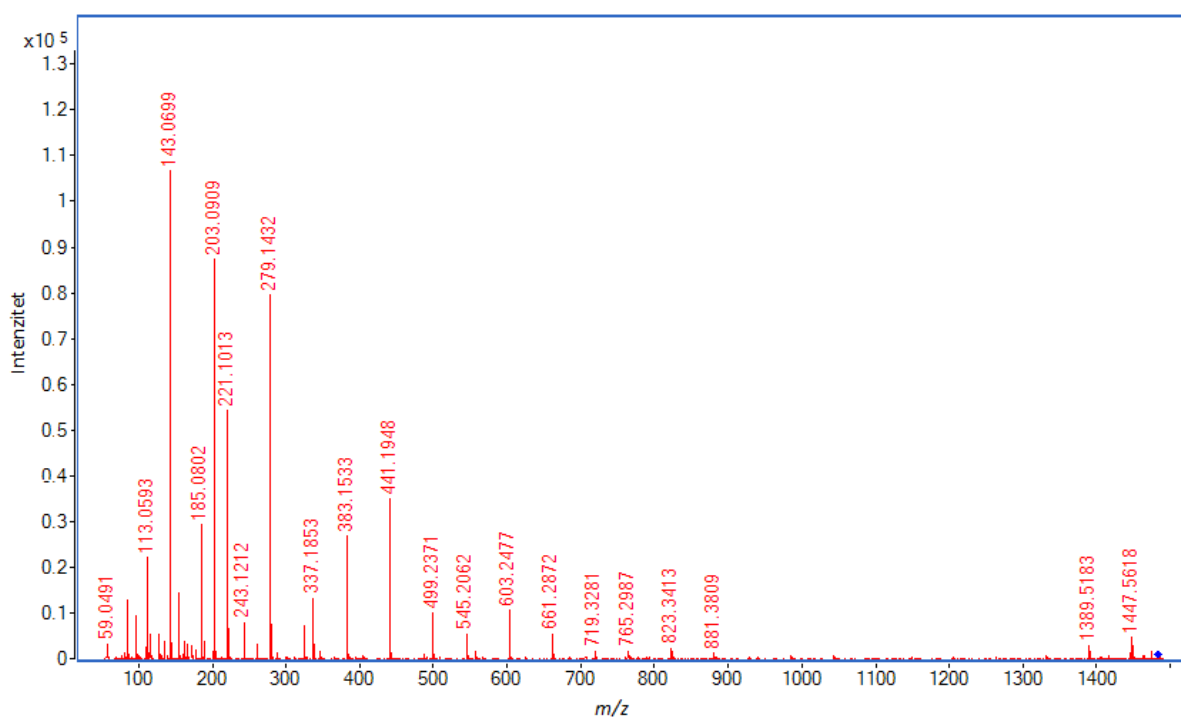
Molekulska formula:	[M+2H] $^{+}$			[M+2NH $_4$] $^{+}$			[M+2Na] $^{+}$		
	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %
C $_{54}$ H $_{94}$ O $_{39}$, DS 4	/	684,2759	/	701,3036	701,3024	2,50	706,2580	706,2578	3,50
C $_{57}$ H $_{100}$ O $_{40}$, DS 5	713,2976	713,2968	5,11	730,3245	730,3234	5,73	735,2796	735,2788	9,81
C $_{60}$ H $_{106}$ O $_{41}$, DS 6	742,3187	742,3178	15,47	759,3456	759,3443	10,44	764,3007	764,2997	21,00
C $_{63}$ H $_{112}$ O $_{42}$, DS 7	771,3391	771,3387	21,17	788,3663	788,3652	12,33	793,3220	793,3206	39,87
C $_{66}$ H $_{118}$ O $_{43}$, DS 8	800,3594	800,3596	19,52	817,3875	817,3862	5,90	822,3427	822,3416	24,79
C $_{69}$ H $_{124}$ O $_{44}$, DS 9	829,3797	829,3806	9,73	/	846,4071	/	851,3631	851,3625	12,66

Tablica D2. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala ostalih dvostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine HP β CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V

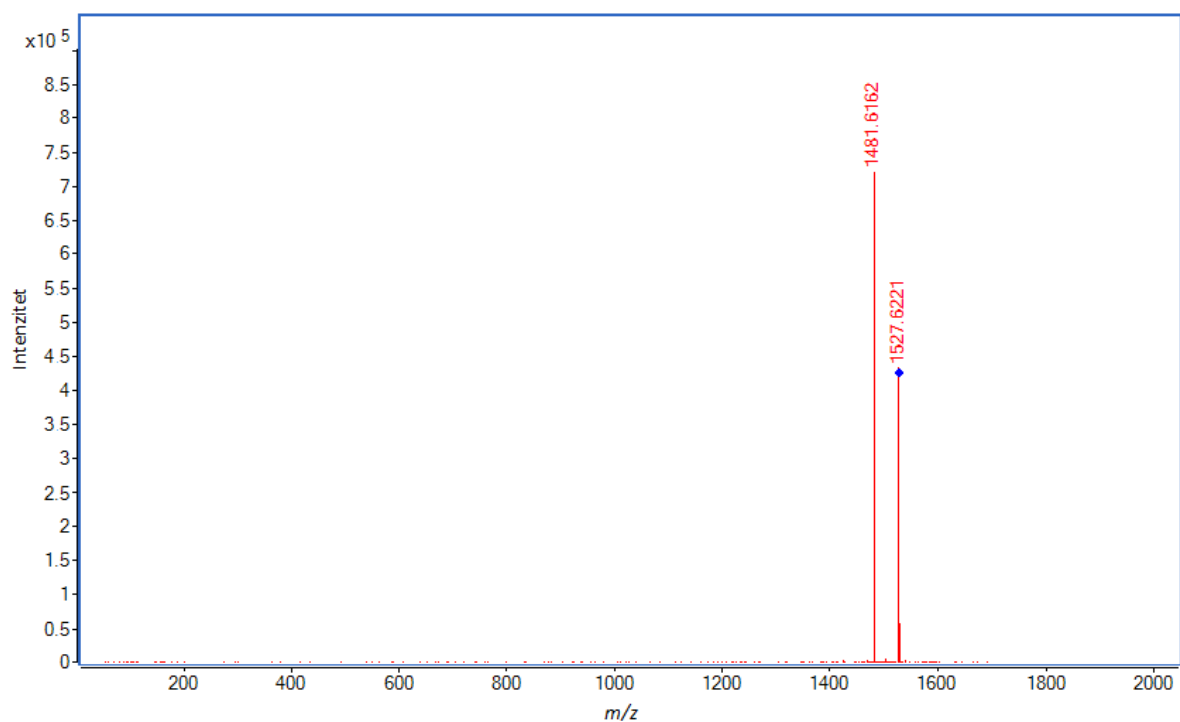
Molekulska formula:	[M+H+NH $_4$] $^{+}$			[M+H+Na] $^{+}$			[M+H+K] $^{+}$		
	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %
C $_{51}$ H $_{88}$ O $_{38}$, DS 3	/	663,7682	/	666,2422	666,2459	0,77	674,2292	674,2329	2,01
C $_{54}$ H $_{94}$ O $_{39}$, DS 4	692,7899	692,7892	2,64	695,2646	695,2669	2,69	703,2503	703,2538	6,14
C $_{57}$ H $_{100}$ O $_{40}$, DS 5	721,8112	721,8101	8,24	724,2863	724,2878	8,69	732,2716	732,2748	16,12
C $_{60}$ H $_{106}$ O $_{41}$, DS 6	750,8326	750,8310	18,32	753,3078	753,3087	18,45	761,2930	761,2957	30,38
C $_{63}$ H $_{112}$ O $_{42}$, DS 7	779,8536	779,8520	24,53	782,3283	782,3297	27,07	790,3139	790,3166	35,26
C $_{66}$ H $_{118}$ O $_{43}$, DS 8	808,8745	808,8729	19,10	811,3505	811,3506	20,39	819,3345	819,3376	22,36
C $_{69}$ H $_{124}$ O $_{44}$, DS 9	837,8947	837,8938	8,70	840,3709	840,3715	13,34	848,3536	848,3585	8,23
C $_{72}$ H $_{130}$ O $_{45}$, DS 10	866,9147	866,9148	2,57	869,3901	869,3925	3,14	877,3726	877,3794	2,35



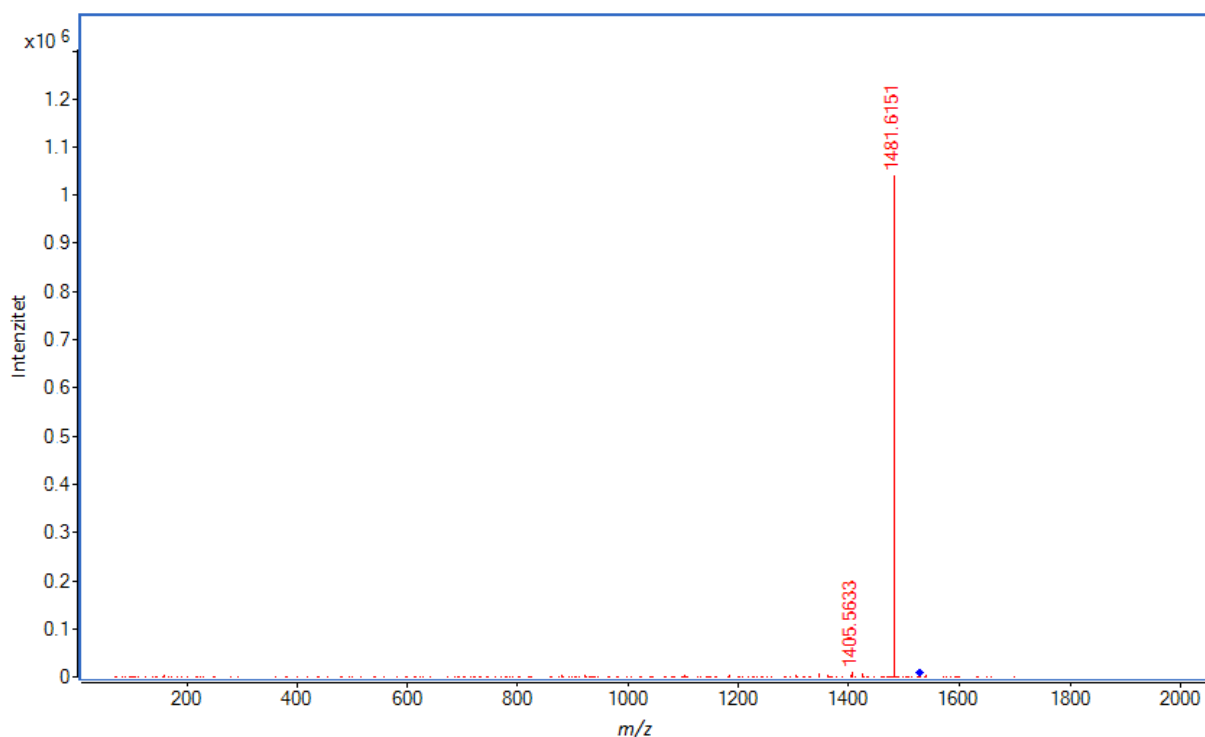
Slika D15. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1483,6248); M=HP β CD DS6. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V



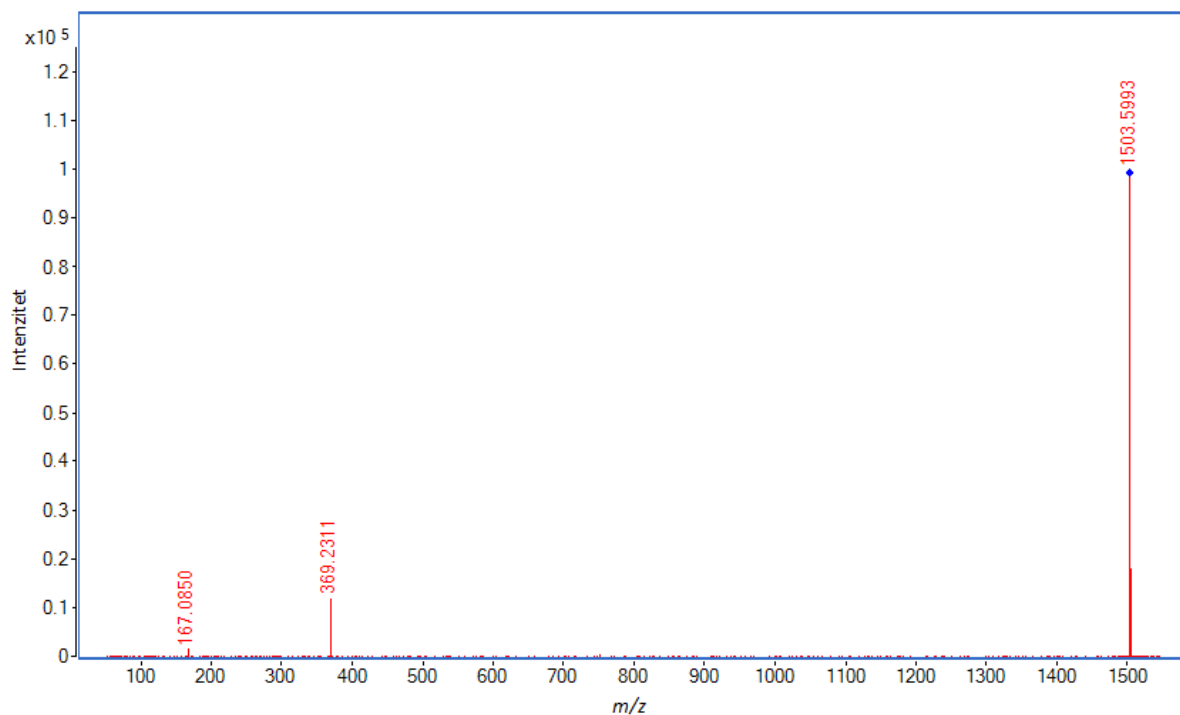
Slika D16. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1483,6248); M=HP β CD DS6. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



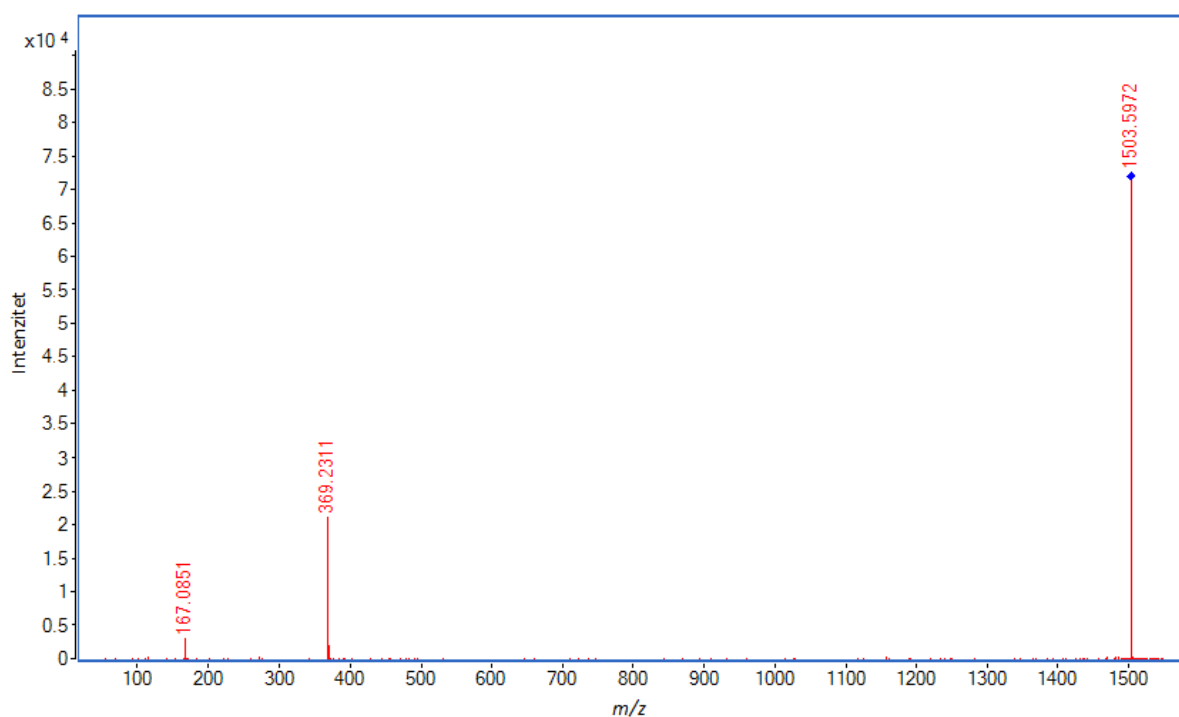
Slika D17. MS/MS spektar iona $[M+HCOO]^-$ (m/z 1527,6171); M=HP β CD DS6. Ionizacija ESI-, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



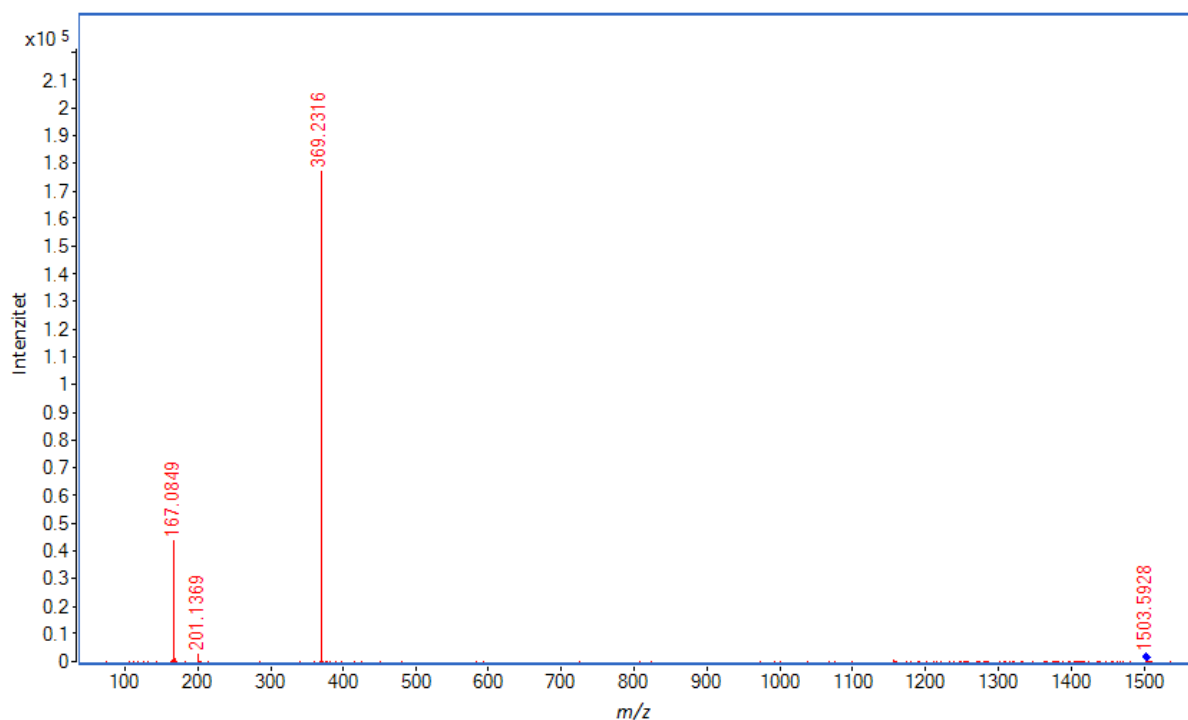
Slika D18. MS/MS spektar iona $[M+HCOO]^-$ (m/z 1527,6171); M=HP β CD DS6. Ionizacija ESI-, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



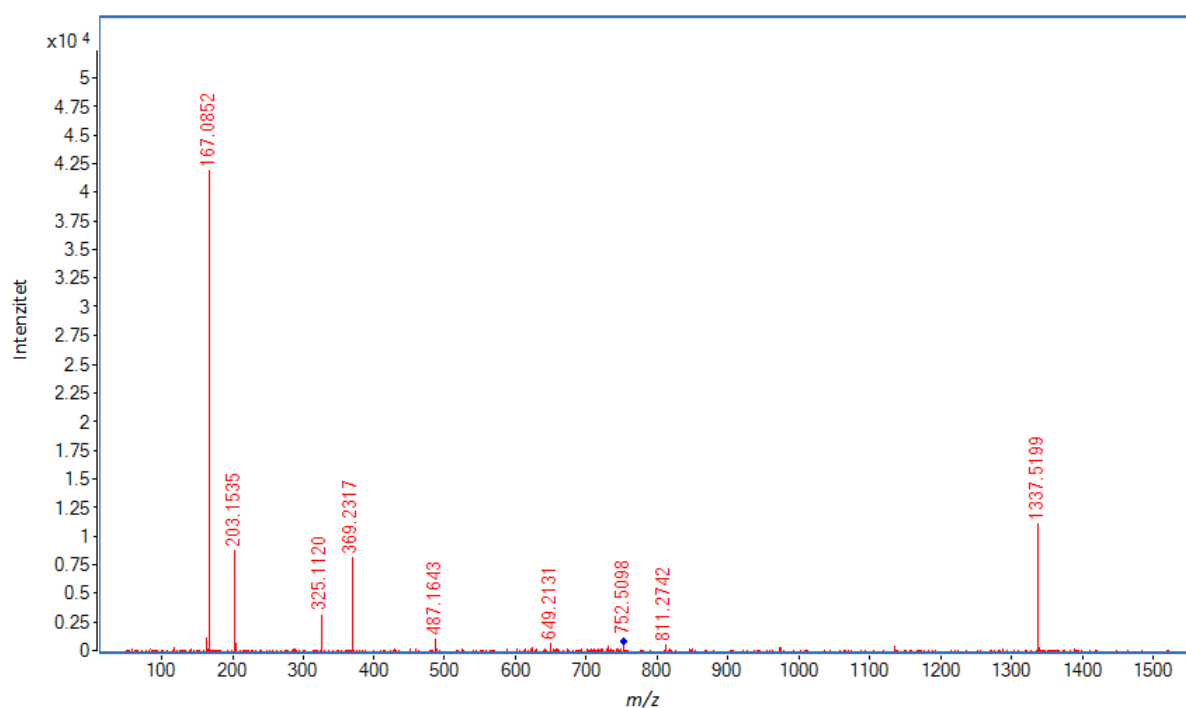
Slika D19. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1503,6045); M=CIN+ β -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V



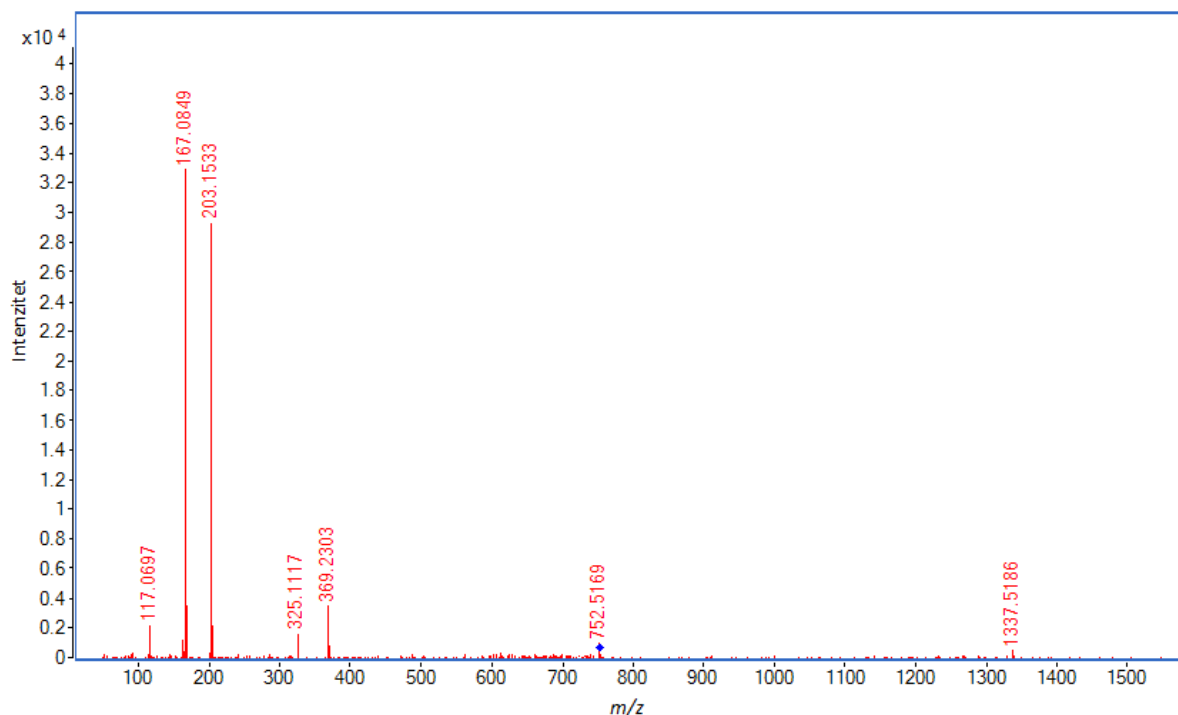
Slika D20. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1503,6045); M=CIN+ β -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V



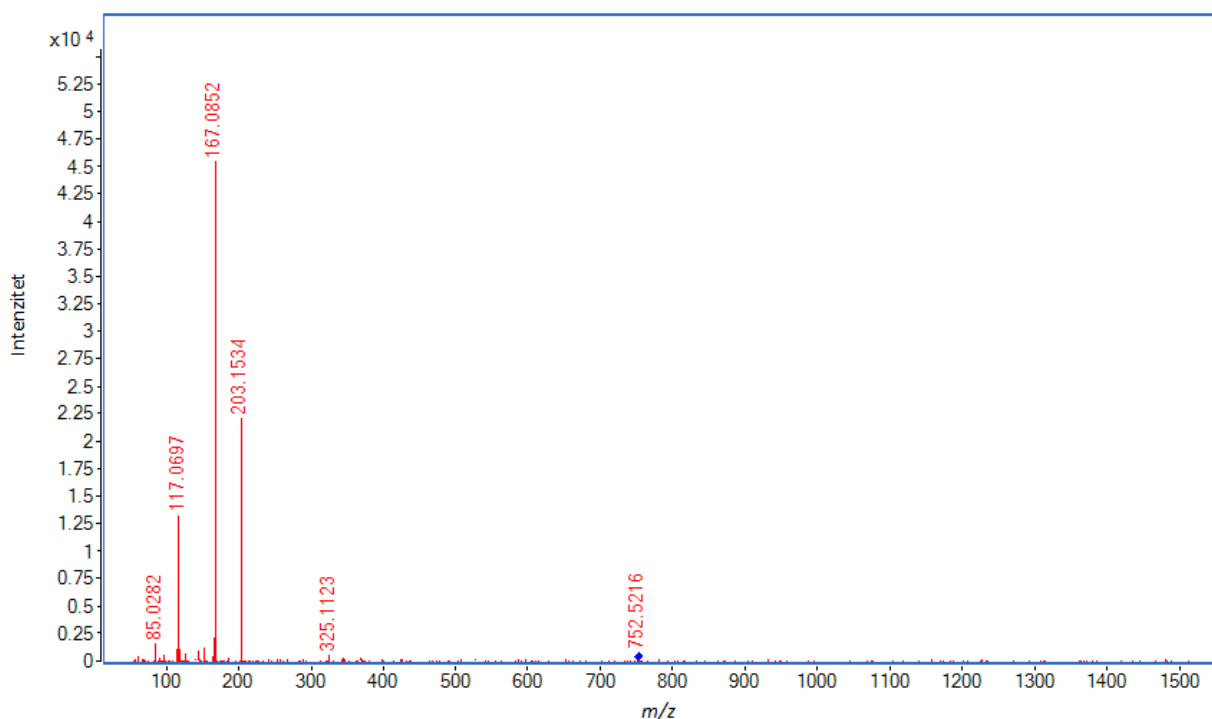
Slika D21. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1503,6045); M=CIN+ β -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



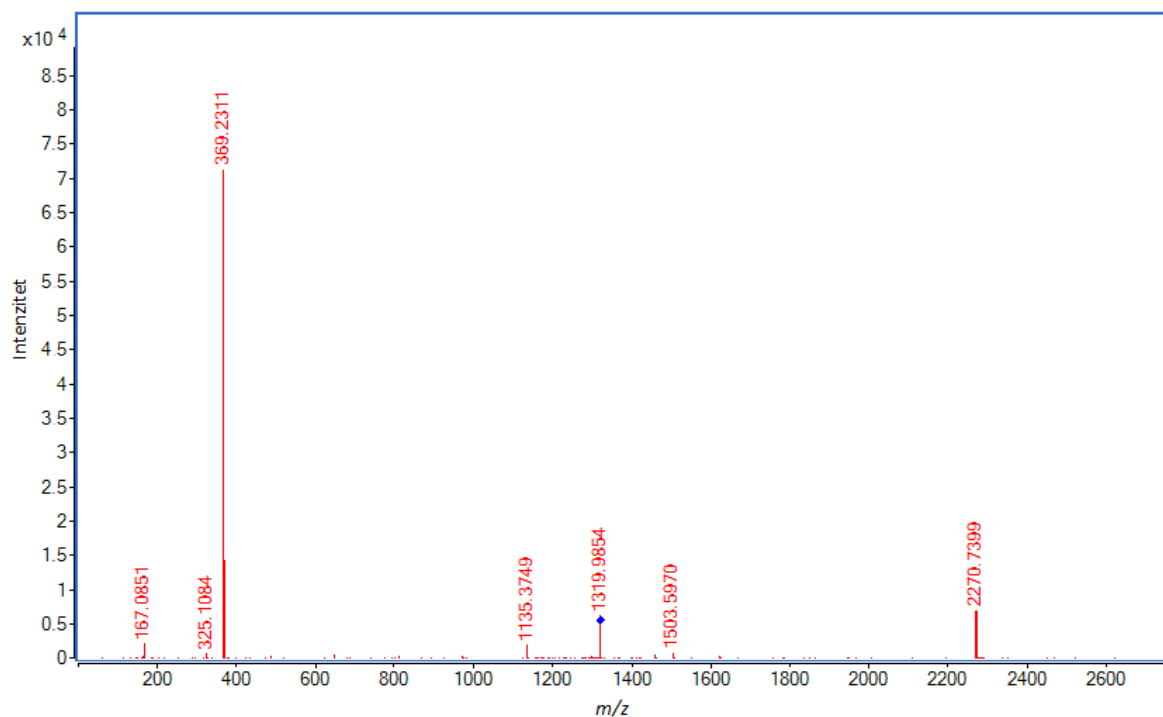
Slika D22. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 752,3075); M=CIN+ β -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V



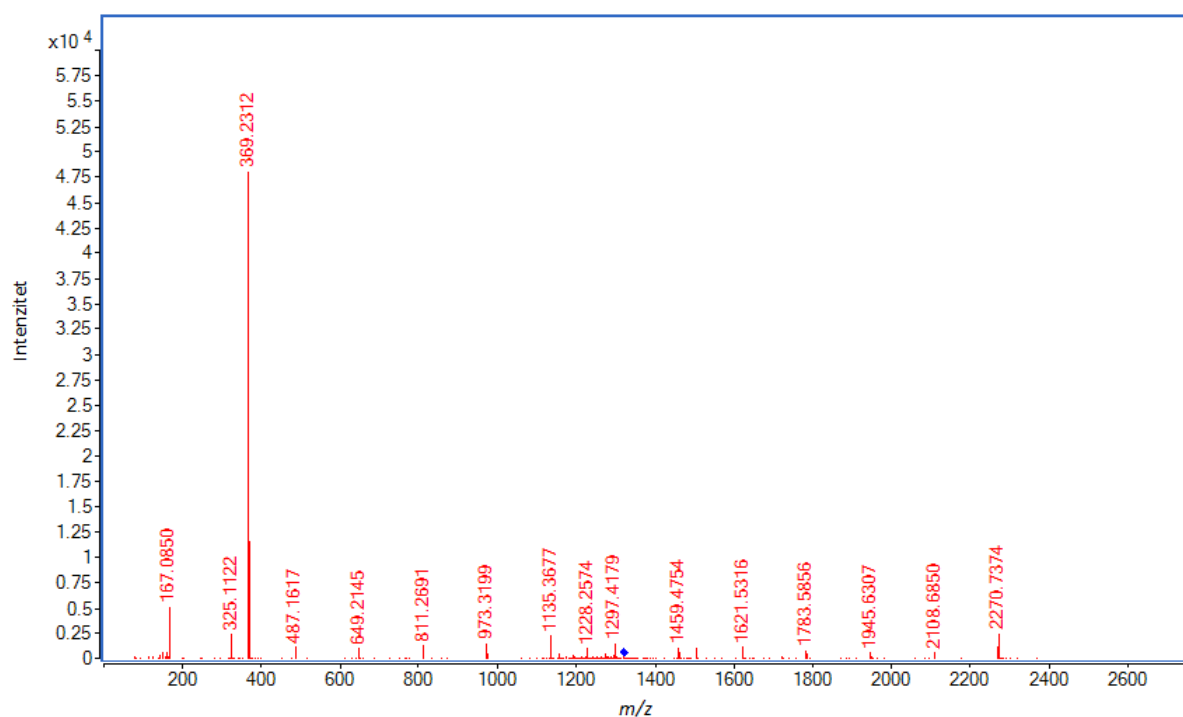
Slika D23. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 752,3075); $M=CIN+\beta$ -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



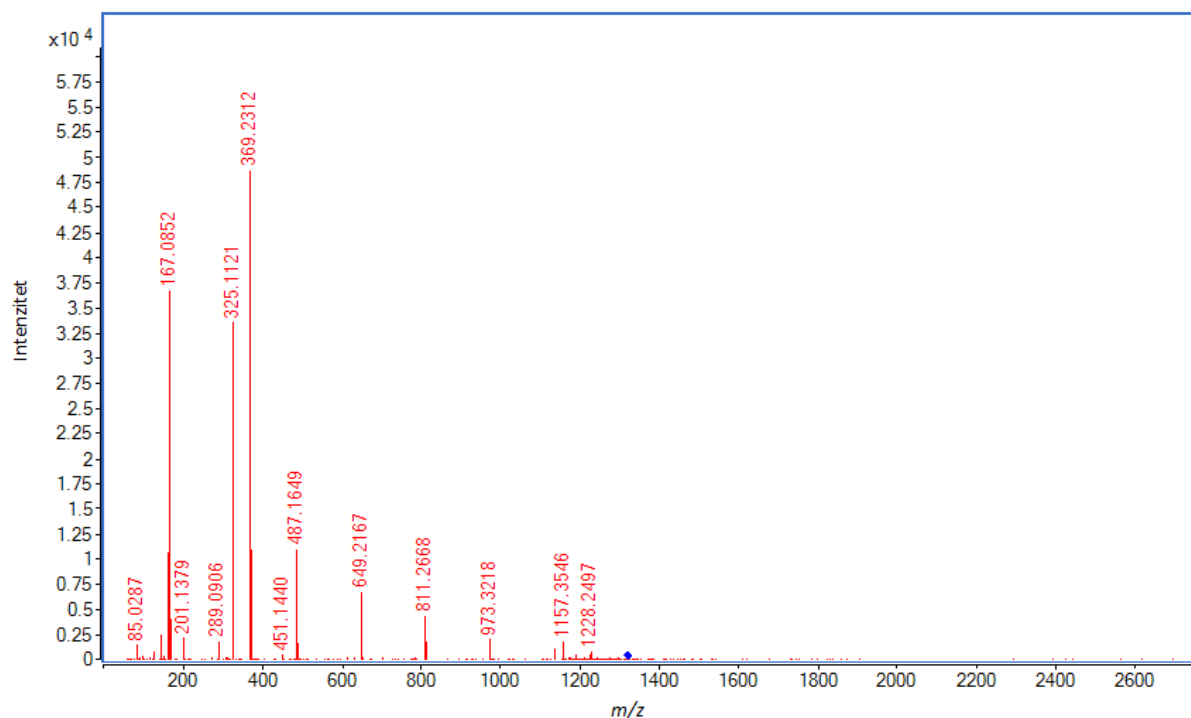
Slika D24. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 752,3075); $M=CIN+\beta$ -CD. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



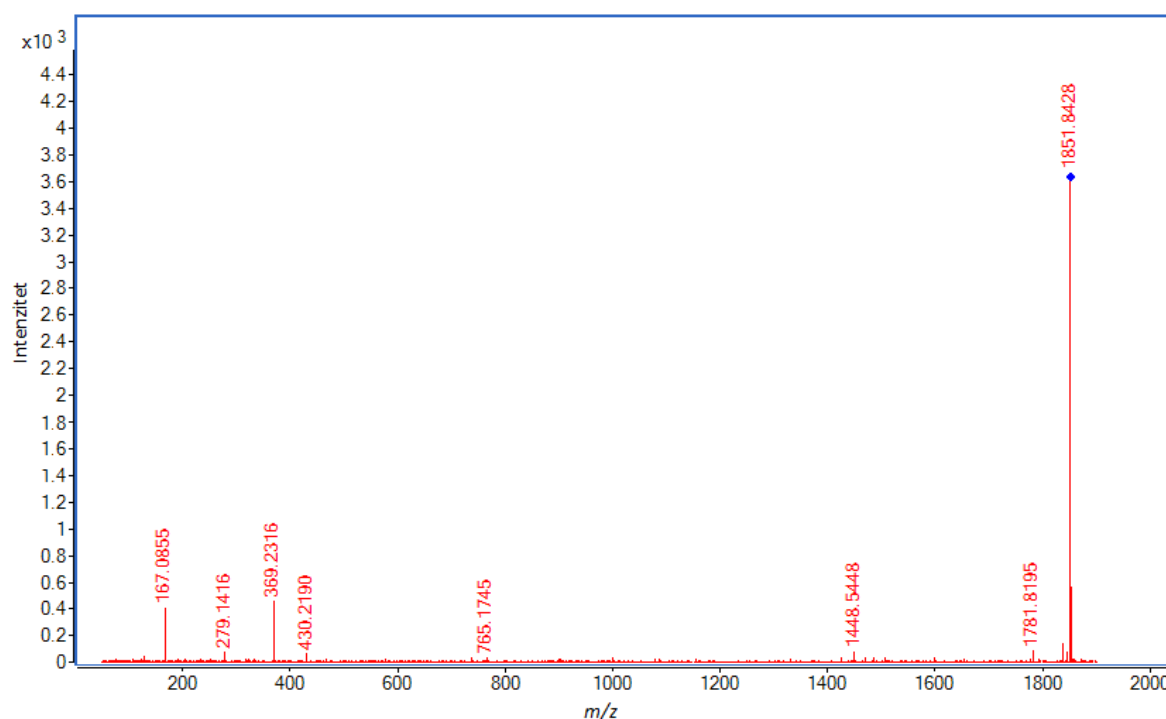
Slika D25. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1319,4900); $M=CIN+2\beta CD$. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V



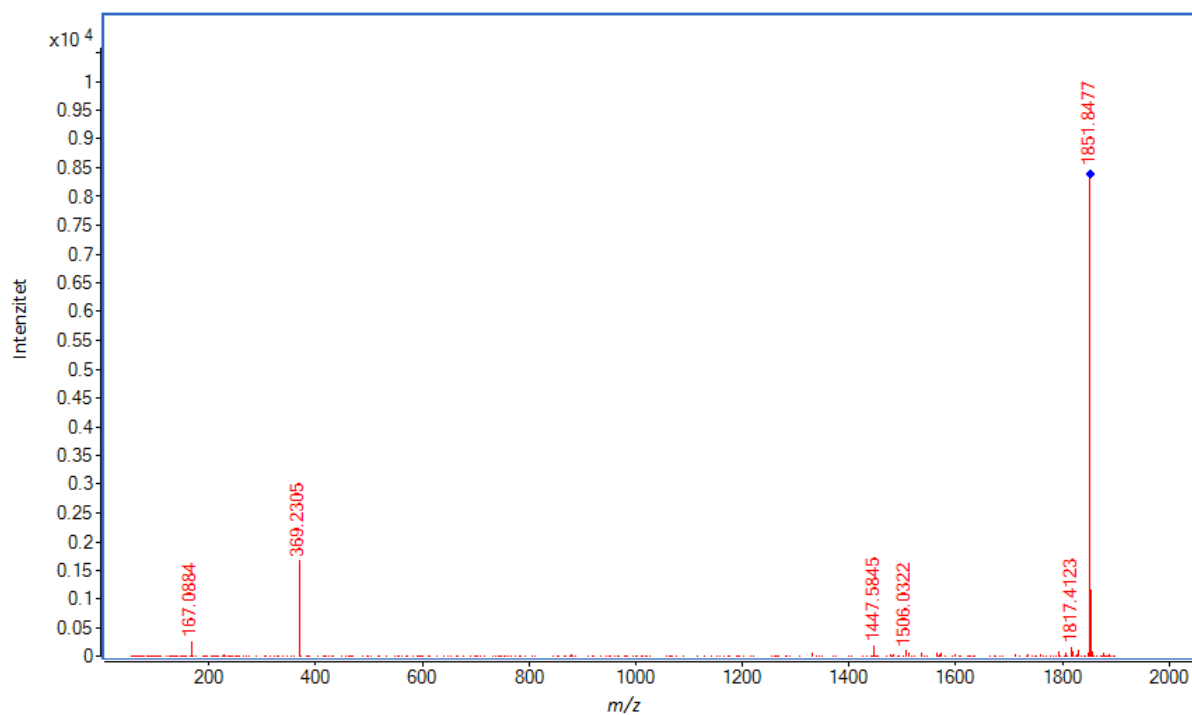
Slika D26. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1319,4900); $M=CIN+2\beta CD$. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



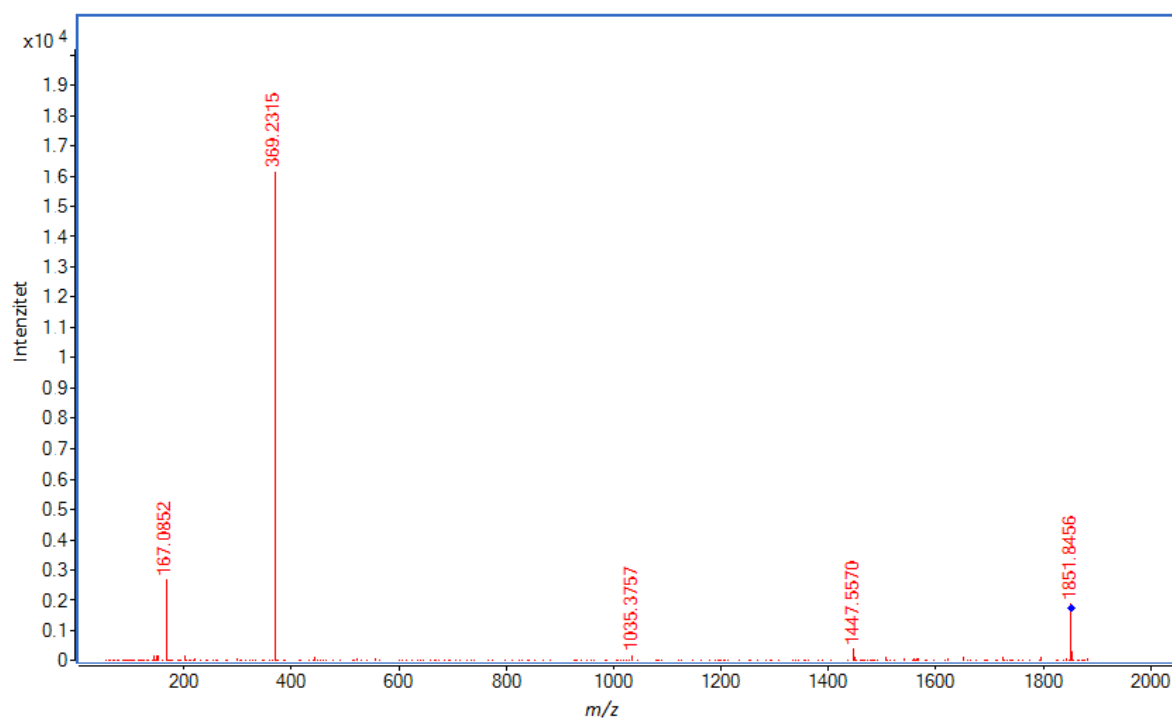
Slika D27. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1319,4900); $M=CIN+2\beta CD$. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



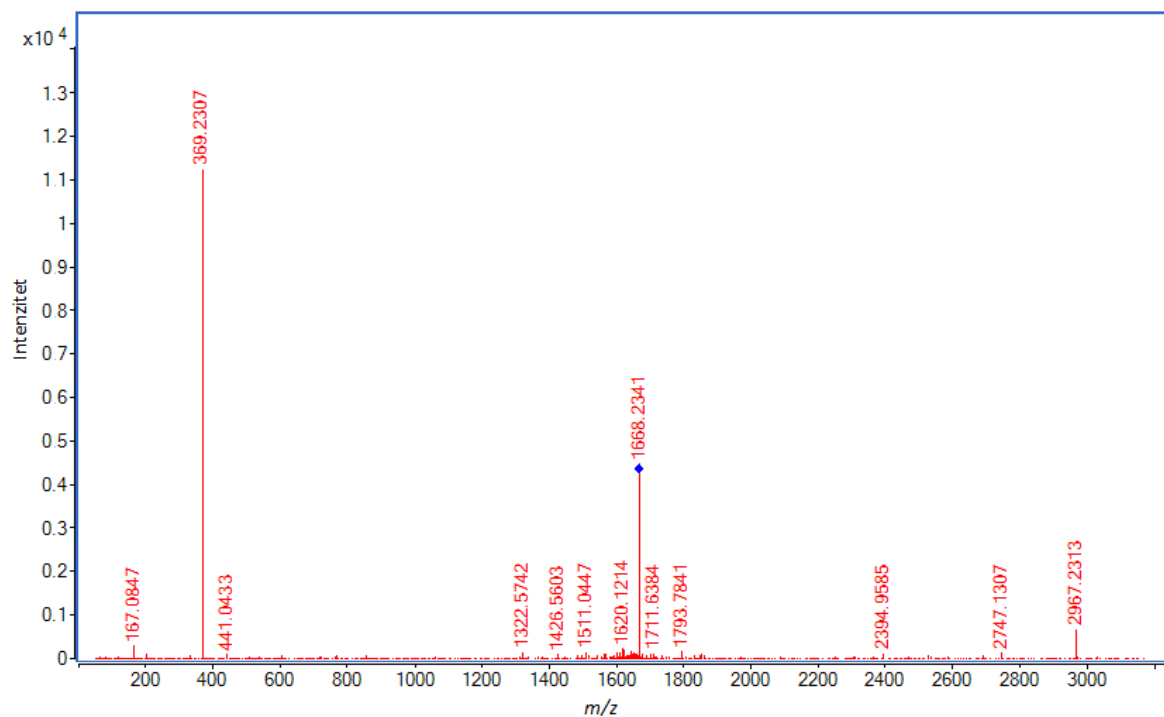
Slika D28. MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ (m/z 1851,8526); $M=CIN+HP\beta CD$ DS 6. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 5,0 V



Slika D29. MS/MS spektar iona [M+H]⁺ (m/z 1851,8526); M=CIN+HP β CD DS 6. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V

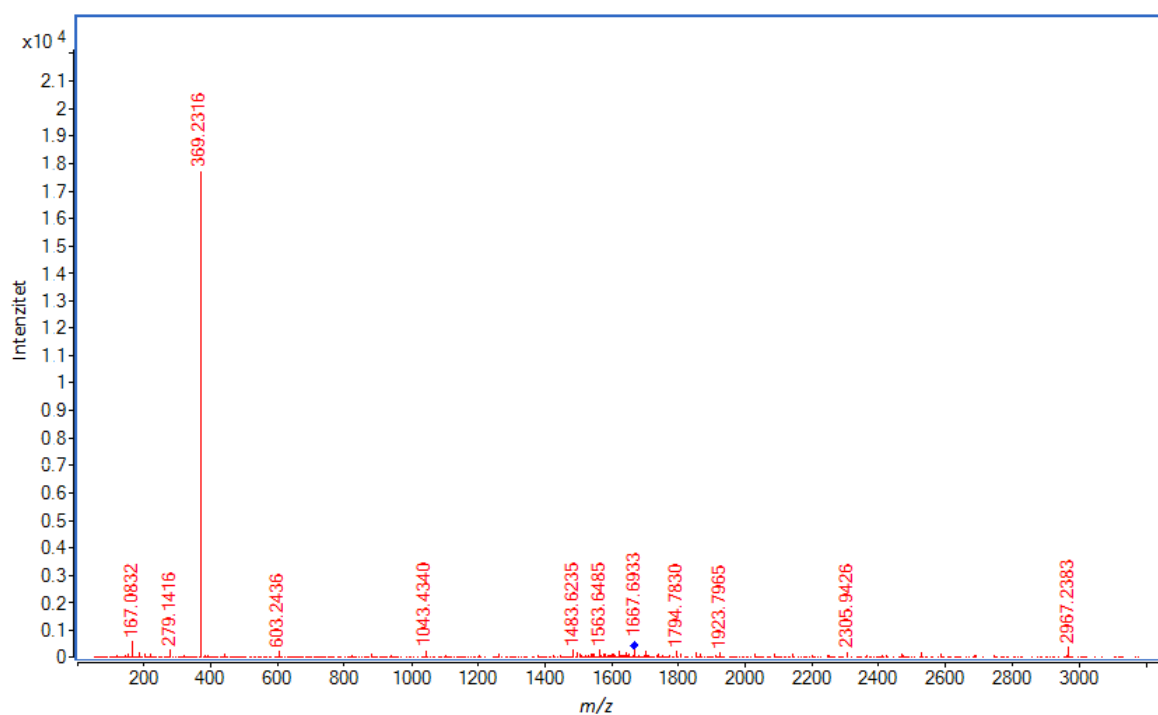


Slika D30. MS/MS spektar iona [M+H]⁺ (m/z 1851,8526); M=CIN+HP β CD DS 6. Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V



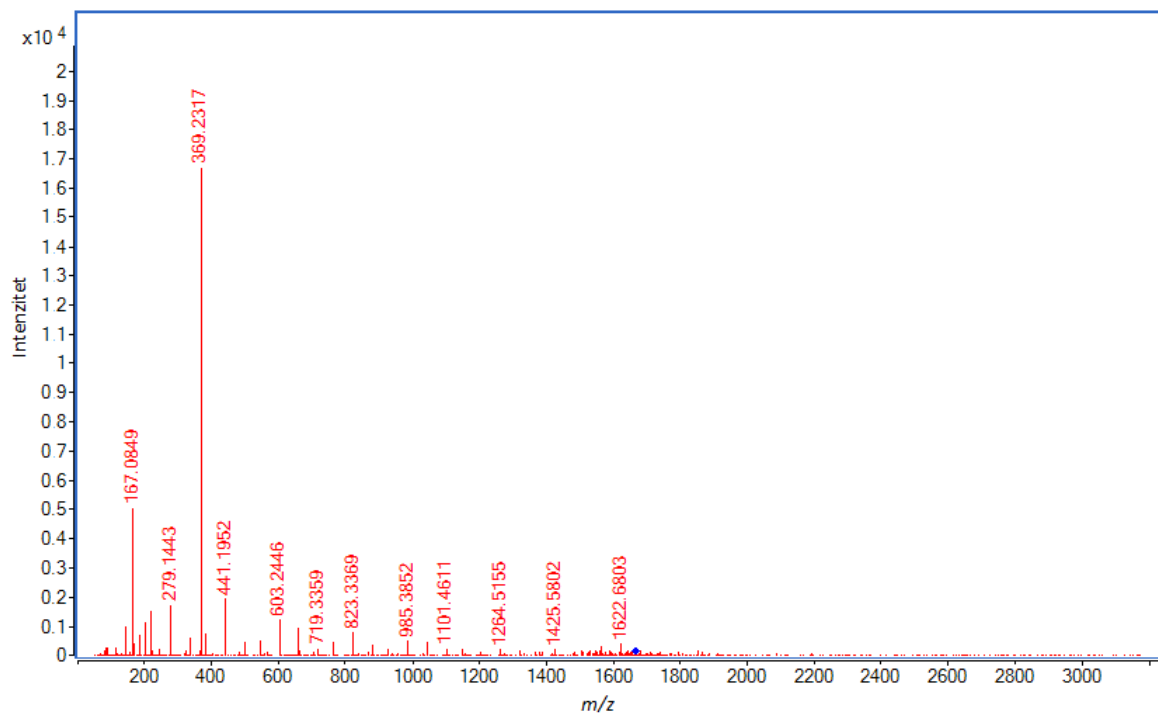
Slika D31. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1667,7377); M=CIN+2HP β CD DS 6.

Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10,0 V



Slika D32. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1667,7377); M=CIN+2HP β CD DS 6.

Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20,0 V



Slika D33. MS/MS spektar iona $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1667,7377); $M=CIN+2HP\beta CD$ DS 6.

Ionizacija ESI+, napon fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40,0 V

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Suzana Inkret

Datum rođenja: 14. ožujka 1998.

Mjesto rođenja: Zabok, Republika Hrvatska

Obrazovanje

2004–2012 Osnovna škola Side Košutić Radoboj

2012–2016 Srednja škola Krapina

2016–2019 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska

2019- Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska