

Određivanje razgradnih produkata lidokaina spektrometrijom masa visoke razlučivosti

Gluhak, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:654353>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mihaela Gluhak

ODREĐIVANJE RAZGRADNIH PRODUKATA LIDOKAINA
SPEKTOMETRIJOM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi povjerenstva: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

prof. dr. sc. Marijana Hranjec

Zagreb, rujan 2018.

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na pomoći, strpljenju, sugestijama i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svom neposrednom voditelju Mislavu Runji, dipl. ing. iz Plive Hrvatska d.o.o. (R&D TAPI Istraživanje i Razvoj/ TAPI analitika) na pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška kroz cijeli moj studij.

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu razvijena je učinkovita metoda tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) za analizu onečišćenja i razgradnih produkata lidokaina. Razvoj metode uključivao je testiranje različitih nepokretnih faza, modifikatora pokretnih faza i različite omjere otapala u pokretnoj fazi. Razvijenom metodom uspješno su odijeljeni pikovi lidokaina, onečišćenja i razgradnih produkata. Na temelju nastalih fragmenata pretpostavljene su strukture razgradnih produkata. Određeni su i mogući načini fragmentacije razgradnih produkata lidokaina na temelju MS/MS spektara.

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

ABSTRACT

Determination of lidocaine degradation products by high resolution mass spectrometry

A quick and efficient method of high efficiency liquid chromatography (UHPLC) for analysis of contaminants and degradation products of the drug lidocaine was developed through this diploma thesis. The development of the method involved the testing of various fixed phases, mobile phase modifiers and different proportions of the solvent in the mobile phase. The developed methods had successfully separated peaks of lidocaine from contaminants and degradation products. Structure of the degradation products were assumed based on the resulting fragments. There were also assessed possible modes of lidocaine degradation products fragmentation by analyzing MS/MS spectra.

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....	6
2. OPĆI DIO.....	8
2.1. FARMACEUTICI.....	9
2.1.1. Anestetici.....	10
2.1.2. Lidokain.....	11
2.2.FORSIRANA RAZGRADNJA.....	12
2.3.KROMATOGRAFIJA.....	13
2.3.1. Tekućinska kromatografija.....	14
2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti.....	14
2.3.3. Kromatografski parametri.....	15
2.4.SPEKTOMETRIJA MASA.....	17
2.4.1. Dijelovi spektrometra masa.....	17
2.5.PRIMJENA UHPLC- TOF- MS- A U ANALIZI FARMACEUTIKA.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1.MATERIJALI.....	22
3.1.1. Kemikalije.....	22
3.1.2. Nepokretne faze korištene u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti.....	22
3.2.PRIPREMA POKRETNIH FAZA I DILUENATA.....	23
3.3.PRIPREMA OTOPINA UZORKA	23
3.4.TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI VEZANA SA SPEKTOMETROM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1.RAZVOJ METODE UHPLC-QTOF ZA KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA LIDOKAINA.....	27
4.2.SPECIFIČNOST.....	30
4.3.PRISILNA RAZGRADNJA LIDOKAINA.....	31
5. ZAKLJUČAK.....	44
6. LITERATURA.....	46
7. ŽIVOTOPIS.....	49

1. UVOD

U lijeku se osim djelatne tvari mogu nalaziti razna onečišćenja i razgradni produkti koji nastaju ili u procesu proizvodnje lijeka ili njegovom razgradnjom. Osim što njihova prisutnost smanjuje primjenu i učinkovitost lijeka, ona mogu biti kancerogena, mutagena i genotoksična. Iz tog razloga važno je odrediti i identificirati prisutnost onečišćenja, kvantificirati ih i odrediti njihovu kemijsku strukturu. Lidokain je anestetik koji se koristi u medicini i stomatologiji. Za određivanje i kvantificiranje lidokaina i njegovih razgradnih produkata koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti uz spektrometriju masa određeni su razgradni produkti nastali forsiranom razgradnjom lidokaina u kiselini, lužini i vodikovom peroksidu, te u netretiranom uzorku.

2. OPĆI DIO

2.1. FARMACEUTICI [1]

Lijekovi ili farmaceutici su tvari ili smjese različitih tvari koje u određenim uvjetima i u određenim količinama služe za sprječavanje, ublažavanje, liječenje ili dijagnosticiranje bolesti u čovječjem ili životinjskom tijelu. Lijekovi se dijele na prirodne, polusintetske i sintetske, odnosno na droge, na anorganske i organske kemijske preparate, galenske preparate te na serume i cjepiva. S obzirom na njihovu upotrebu razlikuju se lijekovi za unutrašnju i vanjsku upotrebu, koji se primjenjuju ili lokalno (mazanjem na oboljeli dio kože, grgljanjem, ukapavanjem u oči, uho ili nos inhalacijom), ili se uvode u organizam utrljavanjem kroz kožu (perkutano), uštrcavanjem pod kožu (supkutano), u mišić (intramuskularno) ili u venu (intravenozno), davanjem kroz usta (oralno), kroz crijevo (rektalno). Prema njihovom djelovanju razlikuju se:

- lijekovi sa selektivnim djelovanjem protiv mikroorganizama (kemoterapeutici),
- sredstva za uklanjanje bolova (analgetici),
- za snižavanje temperature (antipiretici),
- za umirenje (sedativi i trankvilizanti),
- za pojačanje srčanog rada (kardiotonici),
- za snižavanje krvnog tlaka (antihipertenzivi),
- za liječenje neoplazmi (citostatici),
- za spavanje (hipnotici),
- za izazivanje neosjetljivosti (anestetici),
- za povraćanje (emetici) i čišćenje (purgativi),
- za iskašljavanje (ekspektorancije),
- za pospješivanje mokrenja (diuretici),
- za jačanje (tonici),
- za sprječavanje alergičnih simptoma (antihistaminici),
- za sprječavanje djelovanja otrova (antidoti) itd.

2.1.1. Anestetici [2]

Anestetici su sredstva koja svojim djelovanjem na živčani sustav izazivaju anesteziju, a mogu uzrokovati neosjetljivost na mjestu primjene (lokalni anestetici) ili u čitavom tijelu (opći anestetici). Imaju minimalno štetno djelovanje na ostale organe, a prestankom djelovanja funkcija živčanog sustava se vraća u normalu. Opća anestezija je postupno, povratno smanjivanje funkcija središnjeg živčanog sustava koje uzrokuje najprije gubitak svijesti, zatim neosjetljivost na bol (analgezija), gubitak sjećanja na operaciju (amnezija), i na kraju mišićnu relaksaciju, a postiže se davanjem jednog ili istovremenim davanjem različitih anestetika. Prema načinu unosa anestetika u tijelo opća anestezija dijeli se na:

- inhalacijsku (anestetik u plinovitom obliku),
- intravensku (iniciranjem anestetika u venu)
- rektalnu (primjenom anestetika u debelo crijevo).

Lokalna anestezija je postupak kojim se izaziva neosjetljivost na bol određenog dijela tijela, pri čemu je pacijent budan ili lagano uspavan. Mehanizam djelovanja lokalnih anestetika jest blokiranje putova impulsa tako što sprječavaju prolazak natrijevih iona kroz membranu živaca i time onemogućuju nastanak akcijskog potencijala. Lokalni anestetici su dušične baze i kao takve podložne su vezivanju slobodnih vodikovih iona i prelasku u naelektrizirani amonijev ion. Ukoliko je pH tkiva u koje se primijeni lokalni anestetik niži (kod upale na mjestu primjene), primijenjeni lokalni anestetik će se disocirati te neće preostati nedisocirane slobodne baze i željeni učinak će izostati. Osjetljivost pojedinih živčanih vlakana ovisi o njihovoj građi i promjeru što znači da lokalni anestetik djeluje prije svega na senzorna živčana vlakna jer su ona najtanja. Svi osjeti se ne paraliziraju istom brzinom. Prvo nestaje osjet na bol, zatim osjet za toplo i hladno te, na kraju, dubinski osjet. Prema mjestu i načinu primjene anestetika, lokalna anestezija može se podijeliti na:

- površinsku (na površinu tijela koja će biti operirana)
- infiltracijsku (iniciranje na mjestu i oko mjesta operacijskog zahvata)
- regionalnu (iniciranjem anestetika u blizinu živca ili leđne moždine što izaziva neosjetljivost na bol ili blokadu jedne veće regije na tijelu).

Lokalni anestetici se prema kemijskom sastavu dijele na esterske i amidne koji su prikazani u Tablici 2.1. Svojstva nekih amidnih anestetika, u koje se ubraja i lidokain, prikazana su u Tablici 2.2.

Tablica 2.1. Podjela anestetika

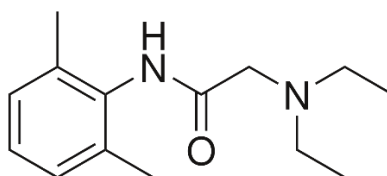
Esterski lokalni anestetici	Amidni lokalni anestetici
Kokain	Lidokain (<i>Xylocaine, Otocaine, Xylestesin</i>)
Benzokain	Mepivakain (<i>Carbocaine</i>)
Prokain	Prilokain (<i>Xylonest</i>)
Tetrakain (<i>Gingicain, Potocain</i>)	Bupivakain (<i>Marcaine, Anecaine</i>)
Propoksikain (<i>Ravocain</i>)	Artikain (<i>Ultracaine</i>)
2-Klorkain (<i>Nesacain</i>)	

Tablica 2.2. Vrste anestetika i njihova svojstva

Anestetik	Učinkovitost	Toksičnost	Brzina nastupa (min)	Trajanje (sati)	Doza (mg/kg)
prokain	1	1	5-10	1	5-7
tetrakain	10	10	3-6	8	1-1,5
lidokain	4	2	2-4	1-2	3-7
mepivakain	4	2	2-3	1-2	7
bupivakain	16	8	2-3	8	4

2.1.2. Lidokain [2]

Lidokain je lokalni anestetik aminoamidne grupe i antiaritmik. Spada u I.b skupinu antiaritmika, odnosno blokator je natrijevih kanala. Njegovo dvojako djelovanje proizlazi iz činjenice da je svestrani blokator natrijevih kanala. Blokadom natrijevih kanala na površini živaca djeluje kao lokalni anestetik, a blokadom natrijevih kanala u srcu iskazuje se kao antiaritmik, a o načinu primjene ovisi hoće li djelovati kao lokalni anestetik ili kao antiaritmik. Ukoliko se lidokain primjeni intravenski djeluje kao antiaritmik, a kada se daje lokalno, u tkivo ili pored živaca, pogotovo u kombinaciji s adrenalinom djeluje kao lokalni anestetik.



Slika 2.1. Kemijska struktura lidokaina [3]

Lidokain blokira natrijeve kanale, ali ta blokada traje kratko, tako da su mu učinci najizraženiji pri većim frekvencijama srca i u tkivu kojemu nedostaje kisika. Nije djelotvoran u liječenju aritmija atrijske jer skraćuje akcijski potencijal, ali je zato vrlo učinkovit u zaustavljanju ventrikularnih aritmija, pogotovo u stanjima kada treba hitno reagirati, kao što je infarkt srca i tijekom operacija na srcu. Također, daje se i nakon proživljenog infarkta srca radi prevencije ventrikularne fibrilacije. Najčešće se primjenjuje kao anestetik u stomatologiji. Osim što je stabilan, može se sterilizirati i ima veliku prodornu snagu. Djelovanje mu nastupa nakon 2 do 4 minute od primjene i traje 1 do 2 sata. Primjenjuje se za površinsku anesteziju u obliku spreja, gela i masti u 4%-tnoj koncentraciji, a kao antiaritmik koristi se u obliku injekcija, sam ili u kombinaciji s adrenalinom.

2.2. FORSIRANA RAZGRADNJA [4]

Forsirana razgradnja je postupak kojim se ubrzano razgrađuje ljekovita supstanca na ekstremnim uvjetima kako bi se dobila potencijalna onečišćenja i razgradni produkti. Uzorci se izlažu visokoj temperaturi i svjetlosti, a ispituje se i njihova osjetljivost na oksidacije, kiselinu i lužinu. Točni uvjeti ispitivanja ovise o prirodnoj ljekovitoj supstanci i tipu dozirnog oblika, ali i o učinku kojeg je potrebno ispitati. Na temelju dobivenih rezultata moguće je identificirati faktore koji utječu na stabilnost ljekovite supstance, te utvrditi razgradne produkte. Forsirana razgradnja omogućuje sakupljanje osnovnih informacija o stabilnosti lijeka u vrlo kratkom vremenu te je važan dio razvoja i validacije analitičke metode. Rezultati ispitivanja također mogu pomoći pri odabiru formulacije ili pri razvoju proizvodnog procesa.

2.3. KROMATOLOGRAFIJA [5]

Kromatografija je tehnika kojom se odjeljuju sastojci iz smjese ovisno o raspodjeli između dviju faza od kojih je jedna pokretna, a druga nepokretna. Pokretna (mobilna) faza, prelazeći preko nepokretne (stacionarne) faze, prenosi otopljene tvari, koje se po nepokretnoj fazi kreću različitim brzinama. Nepokretna faza odabire se tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, odnosno da različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese. Kao nepokretna faza koristi se porozni zrnati prašak velike specifične površine, koja se modificiranjem može dodatno aktivirati, a kao pokretna faza većinom se primjenjuju organska otapala. Kromatografske se tehnike s obzirom na ravnotežu između pokretne i nepokretne faze mogu podijeliti na:

- razdjelnu kromatografiju, pri kojoj se ravnoteža upostavlja između dviju kapljevina pri čemu je nepokretna faza kapljevina vezana na inertni čvrsti nosač,
- adsorpcijsku kromatografiju gdje se ravnoteža uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze,
- afinitetnu kromatografiju, kod koje se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, a do vezanja dolazi zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze,
- ionizmjenjivačku kromatografiju koja se temelji na ravnotežnom procesu između nabijenih funkcionalnih grupa na nepokretnoj fazi i iona prisutnih u uzorku i pokretnoj fazi,
- kromatografiju isključivanjem, kod koje je nepokretna faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom, a do razdvajanja molekula dolazi zbog razlike u molekularnoj masi i obujmu.

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti i na temelju sastava pokretne faze na:

- plinsku kromatografiju, kod koje je pokretna faza inertni plin
- tekućinsku kromatografiju, kod koje je pokretna faza kapljevina male viskoznosti
- fluidnu kromatografiju u superkritičnim uvjetima, kod koje je pokretna faza tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka.

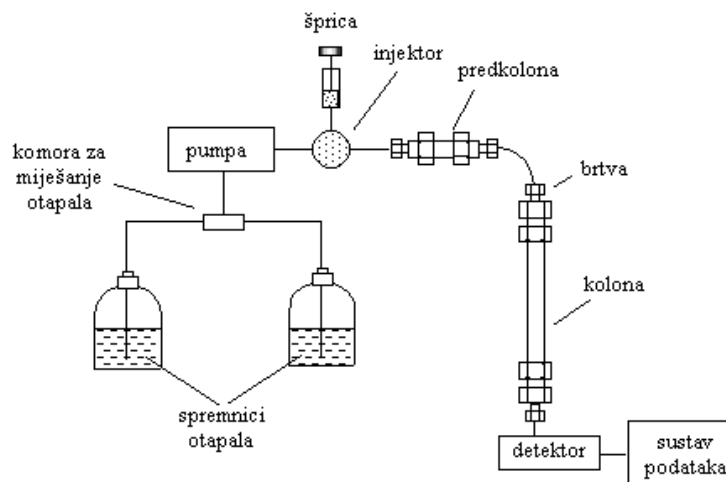
2.3.1. Tekućinska kromatografija [5]

U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevinna, a nepokretna faza su različiti sorbensi. Dijeli se na adsorpcijsku i razdjelnu kromatografiju. Kod adsorpcijske kromatografije nepokretna faza je adsorbens, a kod razdjelne kromatografije nepokretna faza je kapljevinna nanosena na čvrsti inertni nosač. Pogodna je za odjeljivanje smjesa koje se zbog toplinske nestabilnosti ili visoke hlapljivosti ne mogu analizirati plinskom kromatografijom. Učinkovitost kromatografskog stupca pri tekućinskoj kromatografiji, uz pretpostavku da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, ovisi o duljini stupca, promjeru čestica punjenja i radnom tlaku. Na odjeljivanje u tekućinskoj kromatografiji uvelike utječe i temperatura, posebice kad je riječ o otopinama male molekularne mase. Povišena temperatura poboljšava difuzivnost uzorka te reducira viskoznost pokretne faze čime se poboljšavaju kinetički parametri. S obzirom na polarnost nepokretne faze može se podijeliti na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obratnih faza. Kod kromatografije normalnih faza nepokretna faza je polarna, a pokretna faza je nepolarna, dok je kod kromatografije obrnutih faza nepokretna faza nepolarna, a pokretna faza je polarna.

2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je vrsta kolonske tekućinske kromatografije koja se zbog primjene viših tlakova razlikuje od obične tekućinske kromatografije. Zbog primjene viših tlakova pokretna faza brže prolazi kroz kolonu što zahtjeva i složeniju opremu [6,7]. Sustav se sastoji od jednog ili više spremnika pokretne faze koji služe za skladištenje otapala iz kojega crpka kontinuirano vuče određeni volumen određenog otapala. Spremnici i crpke međusobno su povezani cjevčicama. Crpka sadrži filter koji sprječava unos čestica i onečišćenja unutar crpke te radi pri jako visokim tlakovima i omogućava konstantan protok pokretne faze. Razlikuju se crpke s konstantnim tlakom i crpke s konstantnim protokom. Automatski uzorkivač služi za automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu, a točno određeni volumen uzorka zadan je programom. Kolona je uska metalna cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza čije su dimenzije, duljina i unutarnji promjeri različiti. Promjer kolone može biti od 2 mm do 4,6 mm, a duljina od 100 mm do 250 mm [8]. Analizirana tvar ili smjesa tvari prolazi kroz

kolonu pod visokim tlakom. U pokretnu fazu unosi se jako mali volumen uzorka, te se zbog specifičnih kemijskih interakcija, sastava pokretne i nepokretne faze i prirode analizirane tvari komponente smjese različito zadržavaju na koloni. Na detektoru se mjere promjene svojstava analita ili pokretne faze. Najčešće se kao detektori koriste UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski detektor ili spektrometar masa. Svaki detektor je specifičan i razlikuju se u radu jedan od drugog, ali svi daju signal koji je proporcionalan nekom određenom svojstvu analita. HPLC sustavom se upravlja računalom kojim se mogu mijenjati i kontrolirati određeni parametri, a prikupljeni podaci se mogu dodatno obrađivati [8, 9].



Slika 2.2. Shematski prikaz HPLC sustava [10]

2.3.3. Kromatografski parametri [11]

Kromatogram je grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o vremenu ili volumenu. Visina odnosno površina pika koristi se za kvantitativnu analizu dok se položaj kromatografske krivulje ili pika koristi za kvalitativnu analizu. Optimiranjem kromatografskih parametara postiže se uspješnost kromatografskog razdvajanja. Svaka kromatografska krivulja karakterizira se *vremenom zadržavanja* (t_R) i *širinom kromatografske krivulje na polovici visine* ($W_{1/2}$). U praksi se često koristi *relativno vrijeme zadržavanja* (r_R) koje se računa prema jednadžbi (1) gdje je t_{R2} vrijeme zadržavanja kromatografske krivulje od interesa, a t_{R1} vrijeme zadržavanja glavne kromatografske krivulje.

$$r_R = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (1)$$

Faktor kapaciteta (k') opisuje brzinu gibanja tvari u koloni. Može se mijenjati promjenom sastava pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji ili promjenom temperature u plinskoj kromatografiji. Računa se prema jednadžbi (2) gdje je K_C ravnotežni omjer raspodjele, V_S volumen nepokretne faze, a V_M volumen pokretne faze.

$$k' = \frac{\text{količina tvari u nepokretnoj fazi}}{\text{količina tvari u pokretnoj fazi}} = K_C \frac{V_S}{V_M} \quad (2)$$

Djelotvornost kolone može se kvantitativno izraziti brojem i visinom teorijskih tavana, a raste povećanjem broja tavana (N) i smanjenjem visine tavana (h). Parametri procjene djelotvornosti kolone su razlučivanje (R_S), koeficijent selektivnosti (α), simetrijski faktor (A_S) i omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje (p/v). Parametri preciznosti određivanja su omjer signala i šuma (s/n) te ponovljivost (RSD%). Jednadžbe parametara djelotvornosti i preciznosti prikazane su u Tablici 2.3.

Tablica 2.3. Prikaz kromatografskih parametara i njihovih jednadžbi

Broj teorijskih tavana (N)	$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$
Visina teorijskih tavana (h)	$h = \frac{L}{N}$
Razlučivanje (R_S)	$R_S = \frac{1.18(t_{rB} - t_{rA})}{W_{B\ 0.5} + W_{A\ 0.5}}$
Koeficijent selektivnosti (α)	$\alpha = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0} = \frac{k'_B}{k'_A}$
Simetrijski faktor (A_S)	$A_S = \frac{W_{0.05}}{2d}$
Omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje (p/v)	$p/v = \frac{H_p}{H_v}$
Omjer signala i šuma (s/n)	$s/n = \frac{2H}{n}$
Ponovljivost (RSD%)	$RSD\% = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$

2.4. SPEKTOMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (MS) je analitička instrumentalna tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju omjera njihove mase i naboja. Prvi korak pri analizi je ionizacija molekula u ionizatoru. Nastali ioni se zatim provode kroz analizator, koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu. Iz analizatora, ioni odlaze na detektor gdje proizvode signal koji se može registrirati na osciloskopu, pisaču, računalu ili na nekom drugom uređaju. Spektrometrija masa se koristi za:

- određivanje sastava nepoznatog uzorka,
- određivanje izotopskog sastava uzorka,
- određivanje strukture molekula promatrajući fragmentaciju molekula,
- određivanje molarne mase molekule,
- određivanje količine određene tvari u uzorku,
- određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava tvari,
- proučavanje ponašanja iona u vakuumu [12].

Može se povezati s tekućinskom kromatografijom, kapilarnom zonskom elektroforezom i mikročipovima. Na taj način dobivaju su kontinuirane vezane tehnike u kojima se prilikom analize gubi malo uzorka, te su vremenski manje zahtjevne. Zbog metodoloških ograničenja mogu se koristiti i diskontinuirane metode kao što su nanosprej-MS i MALDI-MS. LC-MS/MS je spregnuti vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa koji omogućava analizu iona uz bolju fragmentaciju ili odvajanje. Iz dobivenih spektara masa može se odrediti struktura analiziranog iona [13].

2.4.1. Dijelovi spektrometra masa

Osnovni dijelovi spektrometra masa su ionizator, analizator masa i ionski detektor. U ionskom izvoru dolazi do ionizacije molekula. Molekule se mogu različito ionizirati ovisno o količini energije koja se primjenjuje u procesu ionizacije i o svojstvima analita [14]. Za ionizaciju molekula u plinovitom stanju koristi se ionizacija elektronima, kemijska ionizacija i ionizacija u polju. Pri ionizaciji elektronima dolazi do sudara između molekula uzorka i elektrona pri čemu nastaje veliki broj fragmenata, te u spektru masa signal molekulskog iona može izostati. Za razliku od ionizacije elektronima, kemijska ionizacija koristi plin reagens za ionizaciju

molekula uzorka. Prvo se ionizira plin reagens ionizacijom elektronima, koji zatim ionizira uzorak reakcijama kojim mogu nastati pozitivno i negativno nabijeni ioni. Pri kemijskoj ionizaciji u spektru masa jasno se vidi signal molekulskog iona. Ionizacija poljem koristi snagu električnog polja čime dolazi do izbijanja elektrona iz molekule uzorka. Tom metodom nastaju kationski radikali. Tehnike koje se koriste za ionizaciju uzoraka u čvrstom stanju su MALDI ili maticom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, te ionizacija bombardiranjem sekundarnim ionima (engl. *Secondary ion mass spectrometry*, SIMS). U prvoj navedenoj metodi, MALDI, koristi se otopina malih organskih molekula (matrica). Laserom se osvijetli matrica s uzorkom, ali tek nakon što otapalo ispari. Energija lasera se apsorbira matricom, te time dolazi do desorpcije i ionizacije analita. Kod SIMS ionizacije, ioni analita nastaju nakon bombardiranja površine uzorka snopom iona. Slična joj je metoda bombardiranjem brzim atomima (engl. *Fast atom bombardment*, FAB) u kojoj se uzorci otape u nehlapljivoj matrici, najčešće glicerolu [14, 15]. Za vezani sustav tekućinska kromatografija i spektrometrija masa (LC-MS) bitna je ionizacija uzoraka direktno iz otopine. Koriste se tehnike pri atmosferskom tlaku poput termoraspršenja (engl. *Thermospray*, TSP), elektroraspršenja (engl. *Electrospray ionization*, ESI), kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) i ionizacije fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure photoionization*, APPI). Ioni se uvode u analizator masa smješten u vakuumu kako bi nesmetano prošli od izvora do detektora. Bitno je da su otvori za prolaz iona dovoljno veliki zbog prolaska što većeg broja iona, ali ne previše zbog održavanja vakuuma u analizatoru masa. Jedna od najvažnijih tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS je ionizacija elektroraspršenjem jer se može primijeniti na polarne, nepolarne i toplinski nestabilne spojeve. Na metalnu kapilaru kroz koju prolazi otopina s analitom primjenjuje se električno polje. Djelovanjem električnog polja dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Kapilara se može priključiti na pozitivan kraj izvora napona, pri čemu pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi gdje se akumuliraju. Nedostatak ove tehnike je utjecaj matrice na ionizaciju analita. Sastojci matrice ili eluensa mogu utjecati na isparavanje otapala, što može izravno utjecati na prelazak analita u plinovito stanje [16]. Da ne bi došlo do prelaska analita u plinovito stanje, uzorak se najprije pročisti ili razrijedi čime se poboljšava kromatografsko razlučivanje. Može se koristiti metoda umjeravanja gdje standardna otopina ne sadrži analit [17, 18, 19]. Analizatori masa imaju svrhu razdvajanja nastalih iona u vakuumu na temelju njihovih omjera mase i naboja. Najvažniji analizatori masa su analizator koji mjeri vrijeme preleta (engl. *Time offlight*, TOF) i kvadripolni analizator masa (engl. *Quadrupole*, Q), a u posljednje vrijeme razvio se linearni analizator masa s ionskom klopkom

(engl. *Linear ion trap*, LIT). Analizator masa koji mjeri vrijeme preleta razdvaja ione iste energije, ali različitih vrijednosti odnosa mase i naboja (m/z) budući da putuju različitim brzinama. Početno ubrzanje za sve ione je isto, ali se počinju razdvajati kad u cijevi ne djeluje nikakvo električno polje. Ioni s većim omjerom mase i naboja (m/z) putuju sporije od onih s manjim omjerom m/z . Masa se računa iz mjerenja vremena u kojem ioni dođu od izvora do detektora. Kvadripolni analizator masa sastoji se od četiri elektrode, gdje su dvije suprotne pozitivno nabijene, a preostale dvije negativno nabijene. Na elektrode se primjenjuje kombinacija izmjeničnog i radiofrekventnog potencijala. Ioni s određenom vrijednošću m/z koji se gibaju stabilnom putanjom u oscilirajućem električnom polju, odvajaju se od ostalih i dolaze na detektor. Linearni analizator masa s ionskom klopkom je jedan od novijih analizatora masa. Koristi elektrostatsku klopku s Fourierovom transformacijom za odijeljivanje i detekciju iona. Kvadripolni analizatori mogu se spojiti u seriju. Detektor je zadnji dio spektrometra masa. U njega ulaze ioni nakon što prođu kroz analizator i detektiraju se na osnovi mase, naboja ili brzine. Kako jako mali broj prođe kroz analizator, potrebno je pojačati signale koje daje detektor. Najpoznatiji detektori su Faradayev cilindar, fotografska ploča, te multiplikatori elektrona [13, 20].

2.5. PRIMJENA UHPLC-TOF-MS-A U ANALIZI FARMACEUTIKA

Pri analizi farmaceutika njihove koncentracije u uzorcima mogu biti niske što predstavlja najveći problem u identifikaciji i kvantifikaciji. Osim toga u uzorcima se nalaze i moguće nečistoće i produkti razgradnje iz biotičkih procesa koji mogu utjecati na aktivnost tvari. Razgradnjom početne molekule farmaceutika smanjuje se njena koncentracija, odnosno dolazi do cijepanja početne molekule što rezultira promjenom u molekulskoj masi. Iz tog razloga potrebno je odrediti i okarakterizirati nečistoće i razgradne produkte [20]. UHPLC-MS metoda se koristi zbog svoje brzine i efikasnosti odvajanja za određivanje farmaceutika, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata. UHPLC, za razliku od standardnog HPLC-a, posjeduje bolju optimizaciju pokretnih faza i selektivnost kolone. Promjer čestica se ovom tehnikom smanjuje s 5 μm na 2 μm , a osjetljivost i rezolucija povećavaju se za 10 do 1000 puta. TOF maseni spektrometar može odrediti točnu masu molekule uz pogrešku manju od 2 mDa [21, 22, 23]. Utvrđivanje struktura farmaceutika i njihovih razgradnih produkata može se dobro postići navedenom UHPLC-TOF-MS metodom. Dobro razvijenom UHPLC metodom, jasno se mogu

odjeliti komponente koje se zatim mogu detektirati na spektrometru masa. Detekcija se može postići fragmentacijom početnog iona i usporedbom s dobivenim fragmentnim ionima, te određivanjem točne mase. Za analizu farmaceutika koristi se i dvodimenzijaska tekućinska kromatografija uz spektrometriju masa (2D-LC-MS) koja je važna prilikom odvajanja kompleksnih uzoraka. Njezine prednosti su kratka i brza separacija, te niže granice detekcije [24].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada, njihova kemijska čistoća kao i proizvođač prikazani su u Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač	CAS broj	Čistoća
Acetonitril	CH ₃ CN	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	75-05-8	<i>p.a.</i>
Klorovodična kiselina	HCl	Kemika, Zagreb, Hrvatska	7647-01-0	<i>p.a.</i>
Natrijev hidroksid	NaOH	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1310-73-2	<i>p.a.</i>
Vodikov peroksid, 30 %	H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, Njemačka	46424798 512	<i>p.a.</i>
Amonijev formijat	NH ₄ HCO ₂	Merck, Darmstadt, Njemačka	540-69-2	<i>p.a.</i>
Mravlja kiselina	HCOOH	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	64-18-6	<i>p.a.</i>
Kalijev hidroksid	KOH	Kemika, Zagreb, Hrvatska	67-56-1	<i>p.a.</i>
Lidokain	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	Genera d.d.	137-58-6	>99%

3.1.2. Nepokretne faze korištene u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti

Za razvoj metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti ispitane su tri kromatografske kolone (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD) istih dimenzija 100 mm x 2,1 mm i promjera čestica punila 1,7 μm.

Tablica 3.2. Dimenzije kolona i vrsta punila kromatografskih kolona korištenih u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti

Naziv	Nepokretna faza	Dimenzije
Waters Acquity BEH C18	C18	100 x 2,1 mm, 1,7 μm
Waters Acquity BEH Phenyl	Phenyl	100 x 2,1 mm, 1,7 μm
Waters Acquity CSH	C18	100 x 2,1 mm, 1,7 μm

3.2. PRIPREMA POKRETNIH FAZA I DILUENTA

Kao pokretna faza A pripremljena je 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi i acetonitrilu. Dodano je 1 mL mravlje kiseline u vodu i 1 mL mravlje kiseline u acetonitril. Prilikom razvoja metode dodatno je pripremljena i 0,1 % otopina amonijevog hidroksida u vodi i acetonitrilu. Dodano je 1 mL amonijevog hidroksida u vodu i 1 mL amonijevog hidroksida u acetonitril. Kao diluent korištena je smjesa MiliQ vode i acetonitrila u omjeru 1:1. Pomiješano je 500 mL MiliQ vode, 500 mL acetonitrila.

3.3. PRIPREMA OTOPINA UZORKA

Sve otopine uzorka lidokaina korištene u izradi ovog diplomskog rada, izrađene su na isti način, bilo da se radi o analizi u kojoj su provjeravani uvjeti razgradnje ili o analizi razgradnih produkata. Pripremljene su otopine lidokaina koncentracije 1 mg/mL tako što je vagano 20 mg lidokaina u odmjerne tikvice od 20,0 mL. Kao otapalo korištena je smjesa acetonitrila i vode u volumnom omjeru 50:50. Otapanje lidokaina provodilo se u 10 mL otapala uz pomoć ultrazvučne kupelji 3 minute. Nakon otapanja uzorci su podvrgnuti uvjetima prisilne razgradnje.

- U prvu tikvicu od 20 mL odvagano je 20 mg lidokaina i otopljeno u smjesi acetonitrila i ultračiste vode u omjeru (1:1, v/v), onečišćenja koja su bila prisutna nisu razmatrana u putevima razgradnje.

Oksidacija

Oksidacija lidokaina ispitana je dodatkom H_2O_2 (30 %):

- U drugu tikvicu od 20 mL odvagano je 20 mg lidokaina, dodano 10 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 1 mL 30 % H₂O₂. Ostavljeno je na sobnoj temperaturi 1 sat zbog odvijanja reakcije i nakon toga je dodana smjesa acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) do oznake na tikvici.

Hidroliza

Hidrolitička razgradnja lidokaina ispitana je u kiselim i lužnatim uvjetima. U tu svrhu pripremljene su sljedeće otopine:

- U treću tikvicu od 20 mL odvagano je 20 mg lidokaina, dodano je 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 0,5 mL prethodno pripremljene otopine HCl koncentracije 0,5 mol/L. Tikvica je ostavljena 2 sata na sobnoj temperaturi za odvijanje reakcije. Nakon 21 sata dodano je 0,5 mL NaOH koncentracije 0,5 mol/L i do oznake nadopunjeno s otopinom smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v).
- U četvrtu tikvici od 20 mL odvagano je 20 mg lidokaina, dodano 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 0,5 mL NaOH koncentracije 0,5 mol/L. Tikvica je ostavljena na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon toga, dodano je 0,5 mL HCl koncentracije 0,51 mol/L i tikvica je nadopunjena do oznake smjesom acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v).

Toplinska razgradnja u čvrstom stanju

Uzorak lidokaina je podvrgnut toplinskoj razgradnji na način je da je uzorak lidokaina zagrijavan 24 sata na temperaturi od 105°C.

- Nakon toga u tikvicu od 20 mL odvagano je 20 mg lidokaina i otopljeno u smjesi acetonitrila i ultračiste vode u omjeru (1:1, v/v).

Toplinska razgradnja u otopine

Pripremljena je otopina lidokaina, koncentracije 1 mg/mL, u diluentu acetonitrila i vode u volumnom omjeru 50:50, što je zatim grijano 1 sat na 60°C.

Fotolitička razgradnja

Fotolitička razgradnja lidokaina ispitana je izlaganjem temeljne standardne otopine lidokaina (1 mg/mL) UV-A (200 Wh/m) i vidljivom ($1,2 \cdot 10^6$ luks sati) zračenju. Za provođenje eksperimenata korišten je uređaj Suntest XLS+ opremljen ksenonskom svjetiljkom kao izvorom umjetnog Sunčeva zračenja. Intenzitet svjetiljke održavan je na 500 W/m, a temperatura na (25 ± 2) °C.

3.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI VEZANA SA SPEKTROMETROM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI

Za analizu razgradnih produkata lidokaina korišten je tekućinski kromatograf (Agilent UHPLC 1290 Infinity) s kvarternom pumpom i kromatografskom kolonom (Waters, BEH C18 2,1 x 100 mm, 1,7 μ m) uz detektor s nizom dioda i spektrometrom masa visoke razlučivosti (Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOFLC- MS). Za pokretnu fazu A korištena je 0,1 % mravlja kiselina (v/v) koja je pogodna za ionizaciju u MS-u, a za pokretnu fazu B korištena je 0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu.

Uvjeti na spektrometru masa visoke razlučivosti bili su sljedeći:

- napon fragmentatora: 380 V
- kapilarni napon: 4000 V
- temperatura plina: 300 °C
- protok plina: 15 L min⁻¹
- tlak raspršivača: 30 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica (eng. *sheat gas*): 400 °C

Na glavnim razgradnim onečišćenjima provedene su MS/MS analize. Mijenjane su energije sudara s ciljem dobivanja što više različitih fragmenata iz čega su doneseni zaključci o strukturi molekule. Korištene su sljedeće energije sudara: 0 eV, 10 eV, 20 eV, 30 eV.

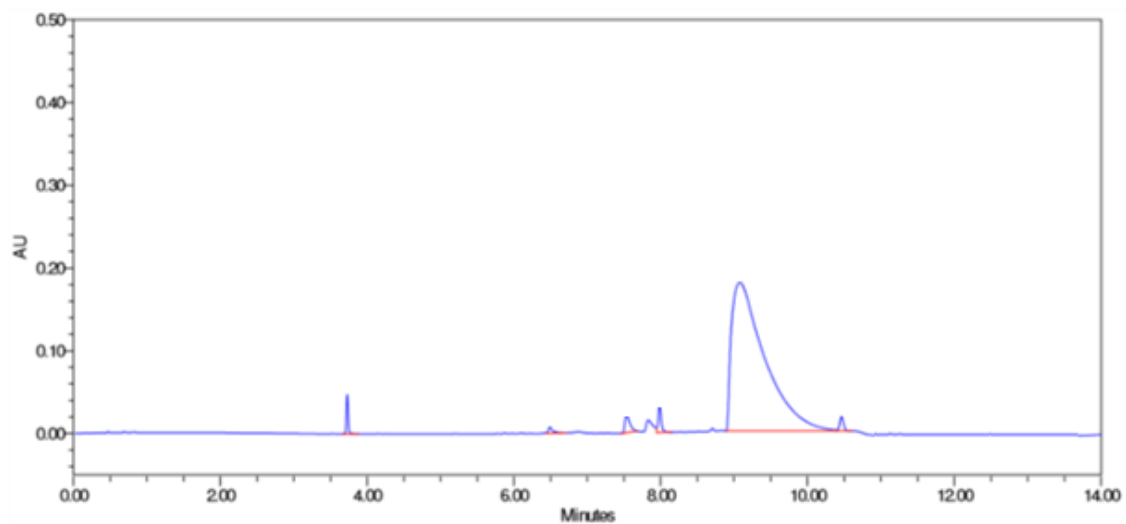
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. RAZVOJ METODE UHPLC-QTOF ZA KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA LIDOKAINA

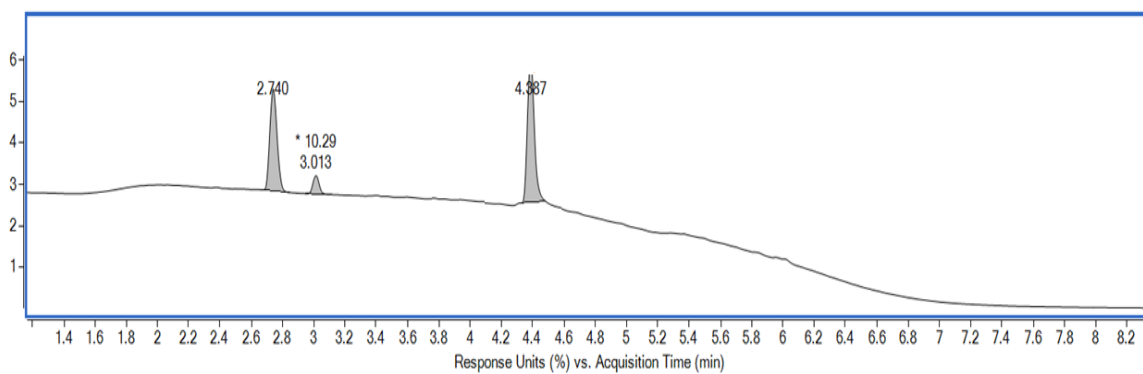
Obzirom da je potrebno koristiti lako hlapive soli prilikom analize na QTOF detektoru, cilj je bio razviti brzu metodu visoke osjetljivosti, sposobnu razdvojiti lidokain od njegovih razgradnih produkata. U tu svrhu korištena je otopina razgrađena u vodikovim peroksidu, obzirom da je sadržavala najveći broj razgradnih produkata. Uspješnost razvijene metode se mjerila na način da su se uspoređivali spektri masa otopine lidokaina i razgradnih otopina. Dodatno provjerena je i čistoća glavnog kromatografskog pika uporabom detektora s nizom elektroda (engl. DAD). Razvoj metode uključivao je testiranje različitih nepokretnih faza, modifikatora pokretnih faza i različite omjere otapala u pokretnoj fazi. Kao kriteriji prihvatljivosti prilikom razvoja metode uzeti su čistoća kromatografskog pika i asimetrija kromatografskog pika $0,7 < 1,5$.

Izbor nepokretne faze

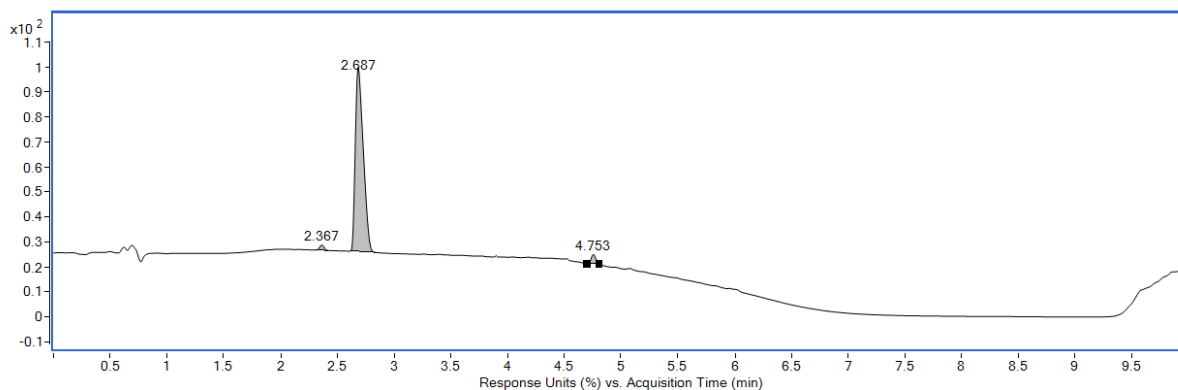
Testirano je nekoliko kromatografskih kolona s različitim punjenjem: reverzne faze C8 i C18. Prilikom testiranja C8 i C18 nepokretne faze kao pokretna faza korištena je 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi i acetonitrilu. Na koloni Waters Phenyl (Slika 4.1.) izgled kromatografskog pika nije bio zadovoljavajući (faktor asimetrije > 2), te nizak broj teoretskih odsječaka. Optimalno razdvajanje dobiveno je uporabom C18 kolone (Slika 4.2.), također pregledom spektra masa nije uočeno nikakva razlika u odnosu na standardnu otopinu lidokaina (Slika 4.3.). Testirana je Waters CSH kolona, te nije uočena nikakva razlika u odnosu na BEH C18 kolonu, s obzirom na veću cijenu navedene kolone, odlučeno je da će se daljnja mjerenja raditi na Acquity BEH C18 (Waters) dimenzija 100 x 2,1 mm i veličinom zrna punila 1,7 μm .



Slika 4.1. Kromatogram lidokaina na Phenyl kromatografskoj koloni



Slika 4.2. Kromatogram lidokaina tretiran vodikovim peroksidom na BEH C18 koloni



Slika 4.3. Kromatogram lidokaina otopljenog u diluentu na BEH C18 koloni

Utjecaj temperature

Nakon odabira nepokretne faze, ispitan je utjecaj temperature na kromatografsko razlučivanje lidokaina i razgradnih onečišćenja. Ispitana je temperatura od 50 °C i 70 °C. Nije uočena razlika u separaciji, stoga je zbog dugovječnosti kolone izabrana niža temperatura od 50 °C.

Utjecaj aditiva u pokretnu fazu

Ispitan je utjecaj koncentracije 0,1 % otopine amonijaka na kromatografsko razlučivanje. Sva glavna potencijalna onečišćenja su razdvojena, ali je primijećena slabija ionizacija, te je stoga odlučeno nastaviti daljnja ispitivanja s 0,1 % mravljom kiselinom obzirom na veću osjetljivost detektora. Na temelju dobivenih rezultata, odabrani su optimalni eksperimentalni uvjeti za kromatografsko određivanje lidokaina i onečišćenja primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti vezane na detektor s nizom dioda koji su prikazani u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje onečišćenja u lidokainu

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity BEH C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Eluens A	0,1 % mravlja kiselina		
Eluens B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	8,00	30	70
	8,01	20	80
	8,01-10,0	80	20
Vrijeme stabilizacije	2,00 min		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	DAD, 250 nm		
Temperatura kolone	50 °C		

4.2. SPECIFIČNOST

Studijama prisilne razgradnje može se i potvrditi selektivnost metode. Selektivnost je sposobnost metode da razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka ili matriksa uzorka bez interferencija ostalih komponenti sličnog ponašanja i indikativno je svojstvo za više tvari. Provjerena je spektralna čistoća pika prilikom studije prisilne razgradnje koristeći DAD detektor. Očitane su vrijednosti čistoće kuta (eng. *purity angle*) i poklapanja kuta (eng. *match angle*) i uspoređene su s odgovarajućim kriterijima (eng. *purity treshold*, *match treshold*). Vrijednost *purity angle* i *purity treshold* uzoraka prisilne razgradnje direktno govore o homogenosti samog kromatografskog pika, dok *match angle* i *match treshold* služe za potvrdu identifikacije (Tablica 4.2.). Ukoliko je vrijednost *purity angle* manja od vrijednosti *purity tresholda*, kromatografski pik se smatra spektralno čist. Ukoliko je vrijednost *match angle* veća od vrijednosti *match tresholda*, identifikacija je potvrđena. Dodatno specifičnost metode je potvrđena uporabom spektrometrije masa visoke razlučivosti.

Tablica 4.2. Spektralna čistoća pika lidokaina

Frakcija	<i>Purity Angle</i>	<i>Match Angle</i>	<i>Purity Treshold</i>	<i>Match Treshold</i>	Egzaktna masa
Standardna otopina	0,340	0,553	0,242	0,375	235,18016
Razgradnja kiselinom	0,329	0,555	0,217	0,317	235,18016
Razgradnja lužinom	0,350	0,524	0,221	0,330	235,18016
Razgradnja s H ₂ O ₂	0,331	0,523	0,216	0,342	235,18016
Toplinska razgradnja - krutina	0,324	0,581	0,245	0,337	235,18016
Toplinska razgradnja otopina	0,312	0,548	0,242	0,329	235,18016
Fotolitička razgradnja	0,331	0,552	0,221	0,361	235,18016

4.3. PRISILNA RAZGRADNJA LIDOKAINA

Prisilna razgradnja provodi se kako bi se utvrdila stabilnost lijeka te identificirali glavni produkti razgradnje. Lidokain je podvrgnut svim testovima prisilne razgradnje opisanim u ICH-vodiču: hidrolitička razgradnja u kiselim uvjetima s 1,0 mol/L HCl, hidrolitička razgradnja u lužnatim uvjetima s 1,0 mol/L NaOH, oksidativna razgradnja s 30 % H₂O₂, fotolitička razgradnja, razgradnja Sunčevom svjetlošću i termalna razgradnja. Snimljen je spektar masa lidokaina i riješeni su glavni fragmenti strukture lidokaina.

Značajnija razgradnja lidokaina uočena je tijekom eksperimenta razgradnje vodikovim peroksidom pri čemu su nastala dva degradacijska onečišćenja. (Slika 4.11.). Prvo nastalo degradacijsko onečišćenje odgovara *N*-oksidu lidokaina, pri čemu su dominantni fragmenti 235 Da, 135 Da i 150 Da. Drugo nastalo onečišćenje odgovara nastanku hidroksi-lidokaina s dominantnim fragmentima 209, 152, 130. Hidrolitičkom razgradnjom u kiselim uvjetima uočen je nastanak jednog značajnog razgradnog produkata, dok je tijekom hidrolitičke razgradnje u lužnatim uvjetima nastalo isto degradacijsko onečišćenje. Nisu uočeni razgradni produkti lidokaina prilikom razgradnje sunčevom svjetlošću ili toplinskom razgradnjom.

Detektirani su sljedeći razgradni produkti:

DP-1, m/z 237 $[M+H]^+$,

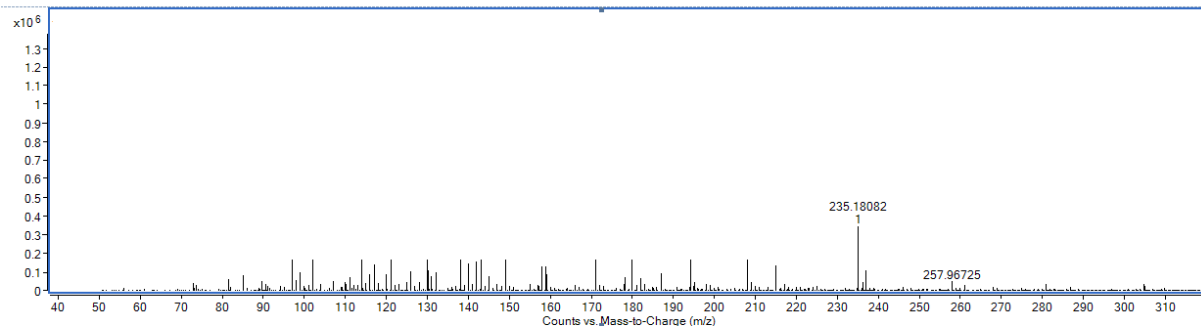
DP-2, m/z 251 $[M+H]^+$,

DP-3 m/z 122 $[M+H]^+$ i

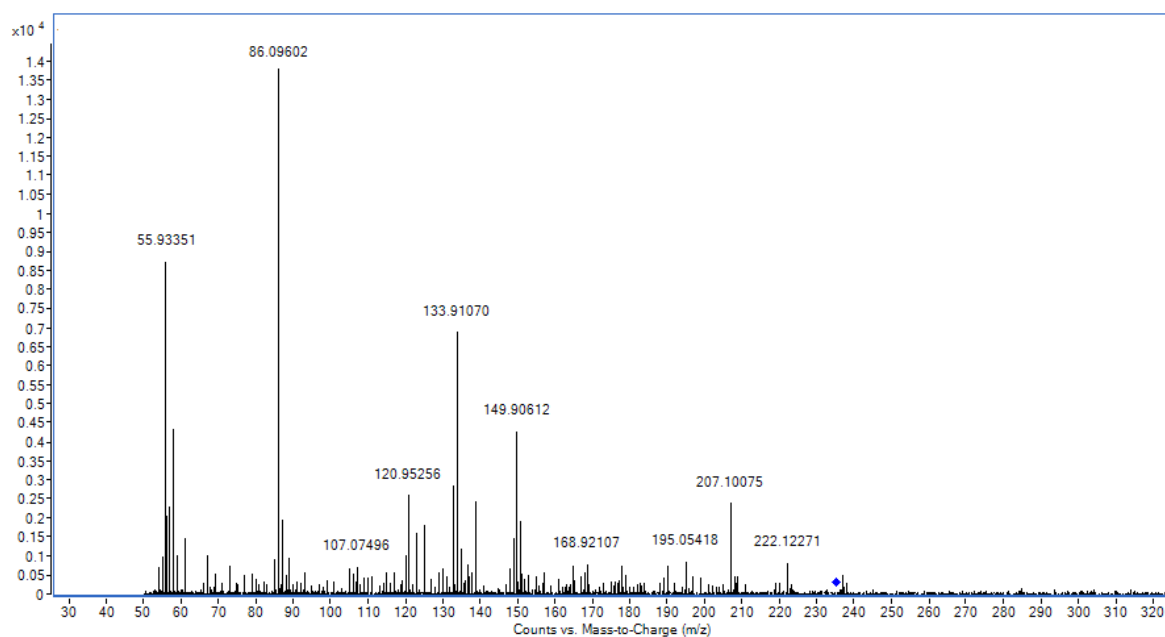
U Tablici 4.3. navedena su vremena zadržavanja, uvjeti MS/MS analize koji su dali optimalan odziv $[M+H]^+$ iona i fragmentnih iona lidokaina i razgradnih produkata te glavni fragmenti nepoznatih razgradnih produkata. MS i MS/MS spektri razgradnih produkata nalaze se u prilogu na Slikama 4.4, 4.5, 4.7- 4.15, 4.17, 4.18, 4.20 i 4.21, a putevi fragmentacije razgradnih produkata prikazani su na Slikama 4.6, 4.16, 4.19, 4.22 i 4.23.

Tablica 4.3. Vremena zadržavanja nepoznatih produkata razgradnje i optimalni uvjeti na MS/MS-u

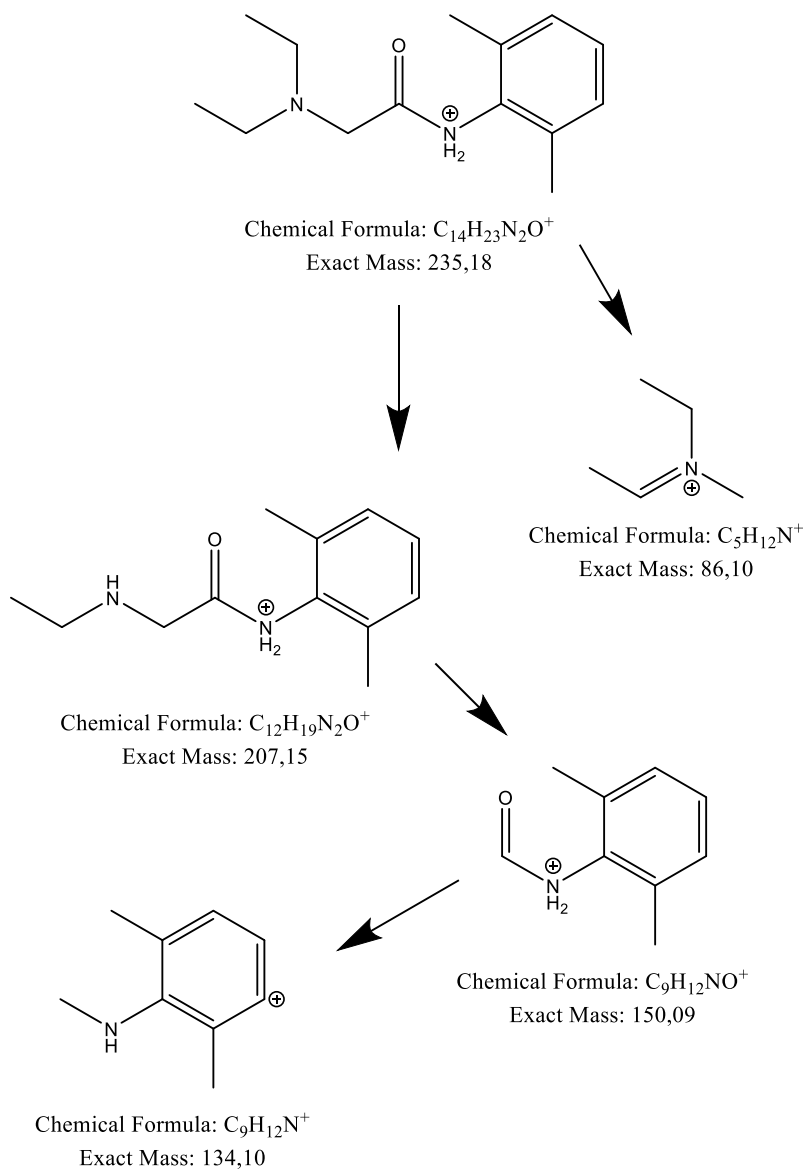
	Vrijeme zadržavanja (t_R , min)	$[M+H]^+$	Napon fragmentora (V)	Energija sraza (eV)	Fragmentni ioni (m/z)
lidokain	2,7	235	380	20	207, 150, 134
DP-1	3,01	237	380	20	209, 152, 130
DP-2	1,72	122	380	0	122,105
DP-3	2,78	251	380	30	235,150,130



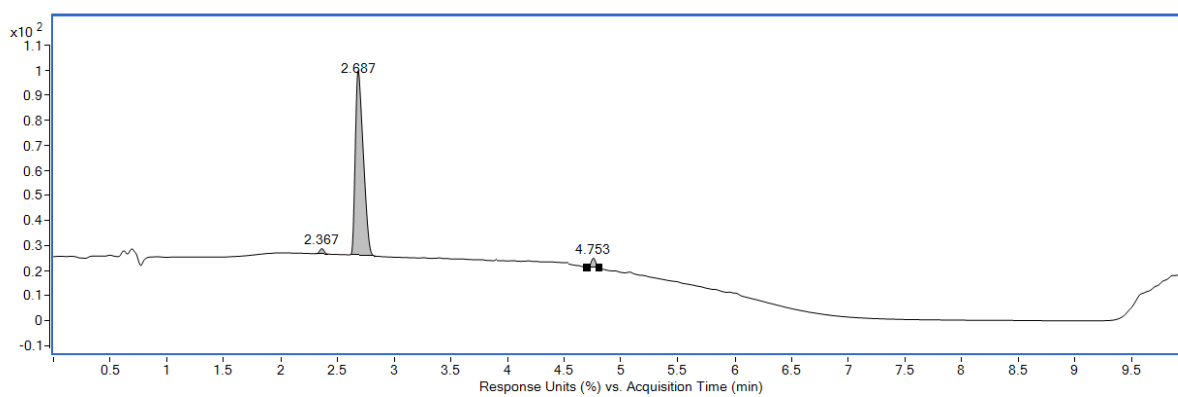
Slika 4.4. MS spektar lidokaina



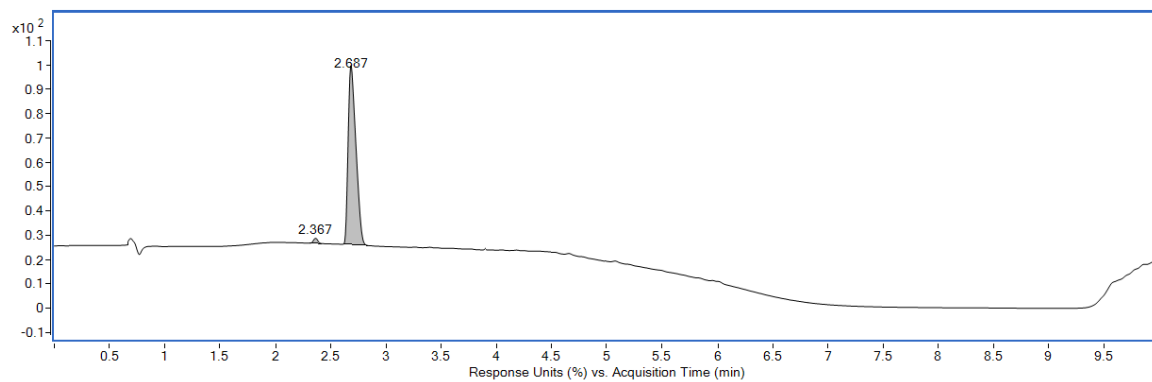
Slika 4.5. MS/MS spektar lidokaina



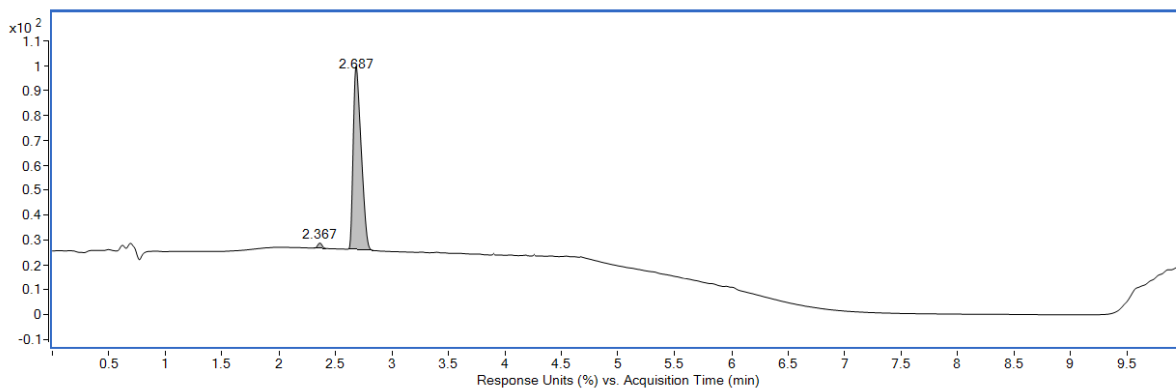
Slika 4.6. Predložena frgmentacija lidokaina



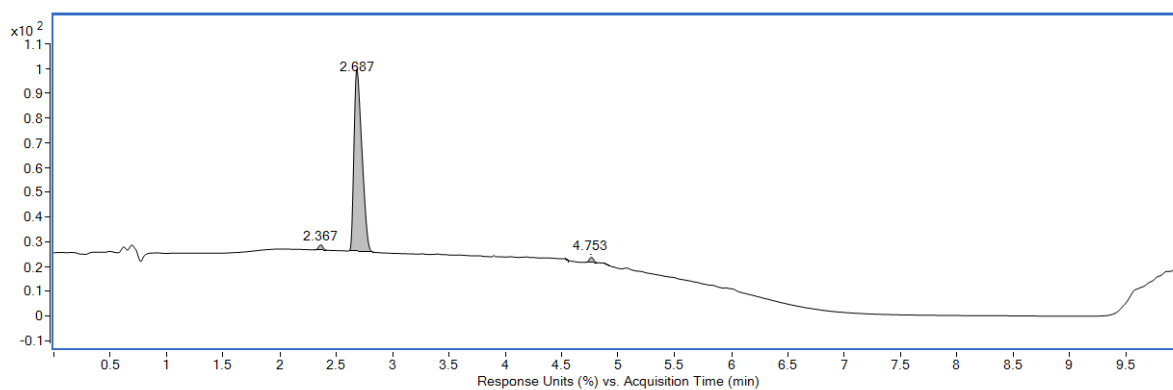
Slika 4.7. Kromatogram netretiranog lidokaina (konc. 1 mg/mL)



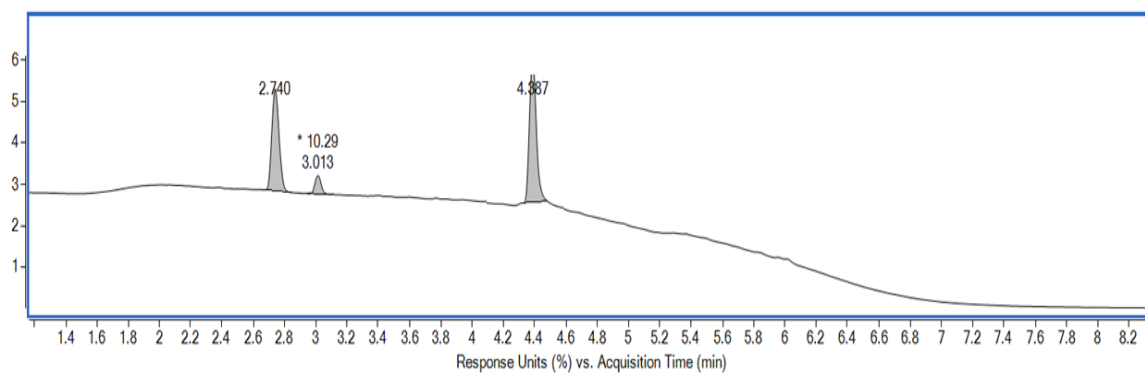
Slika 4.8. Kromatogram lidokaina LC/ICH krutina (konc. 1 mg/mL)



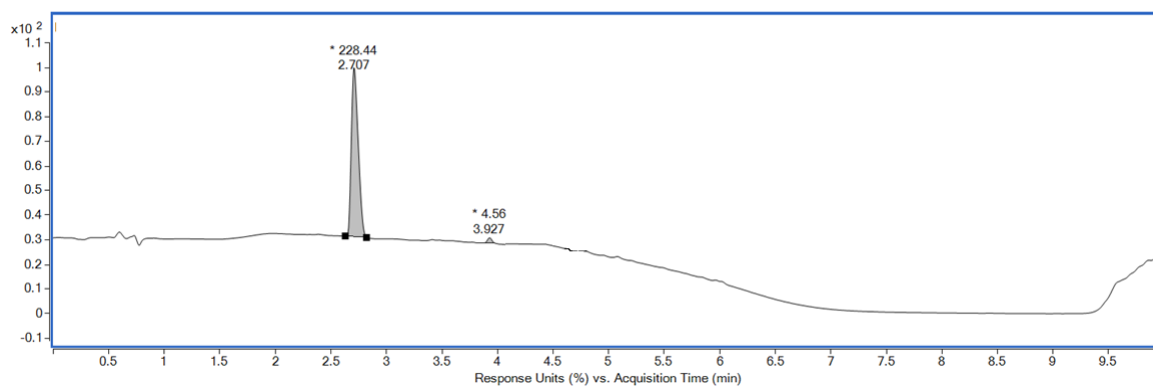
Slika 4.9. Kromatogram lidokaina LC/ICH otopina (konc. 1 mg/mL)



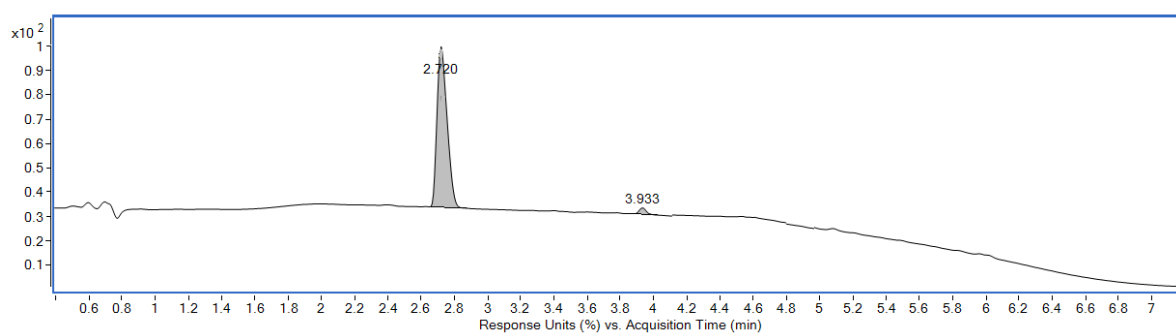
Slika 4.10. Kromatogram lidokaina temperatura (konc. 1 mg/mL)



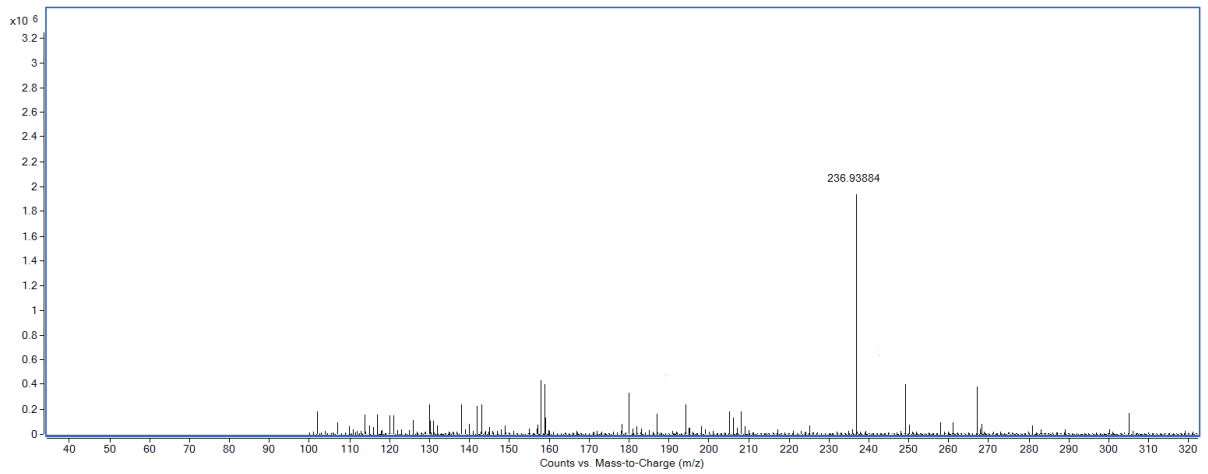
Slika 4.11. Kromatogram lidokaina tretiranog s 30% H₂O₂



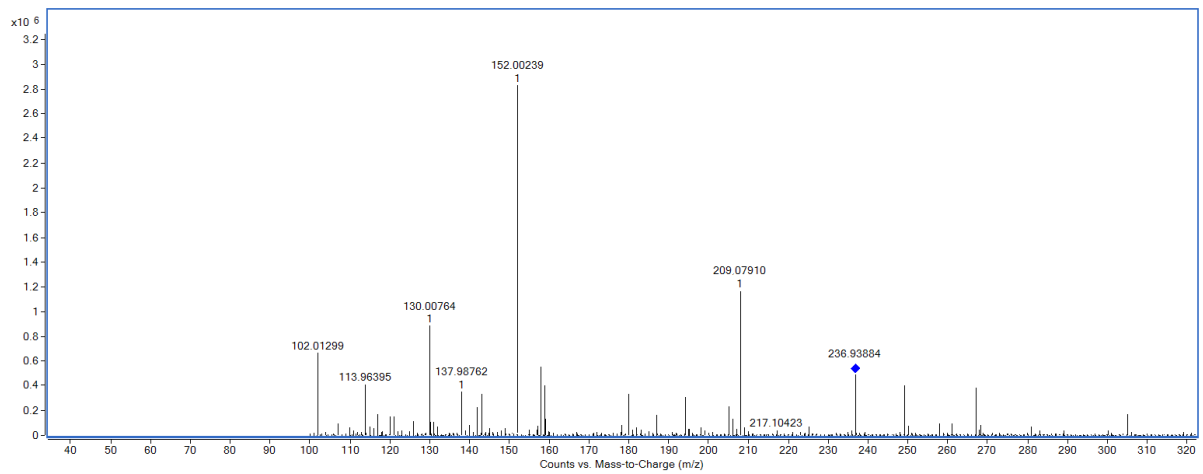
Slika 4.12. Kromatogram lidokaina tretiranog s 1 M HCl



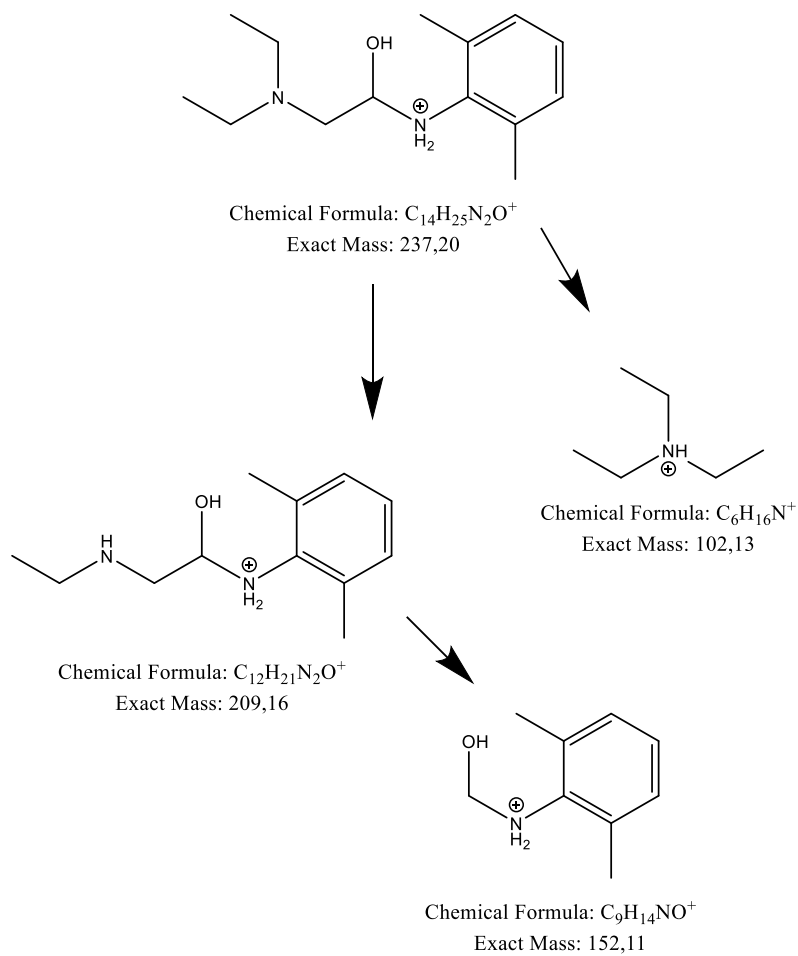
Slika 4.13. Kromatogram lidokaina tretiranog s 1 M NaOH



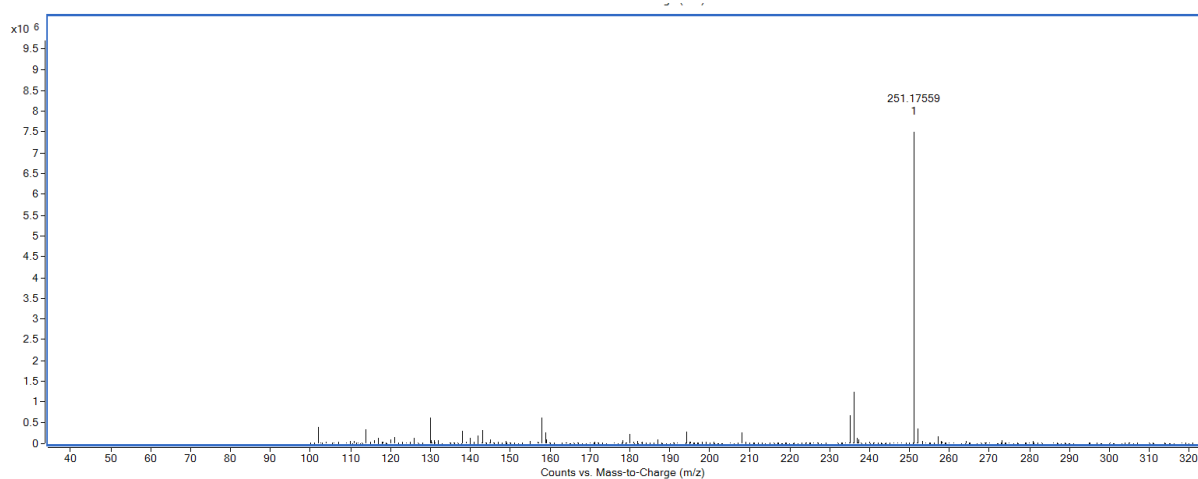
Slika 4.14. MS spektar DP-1



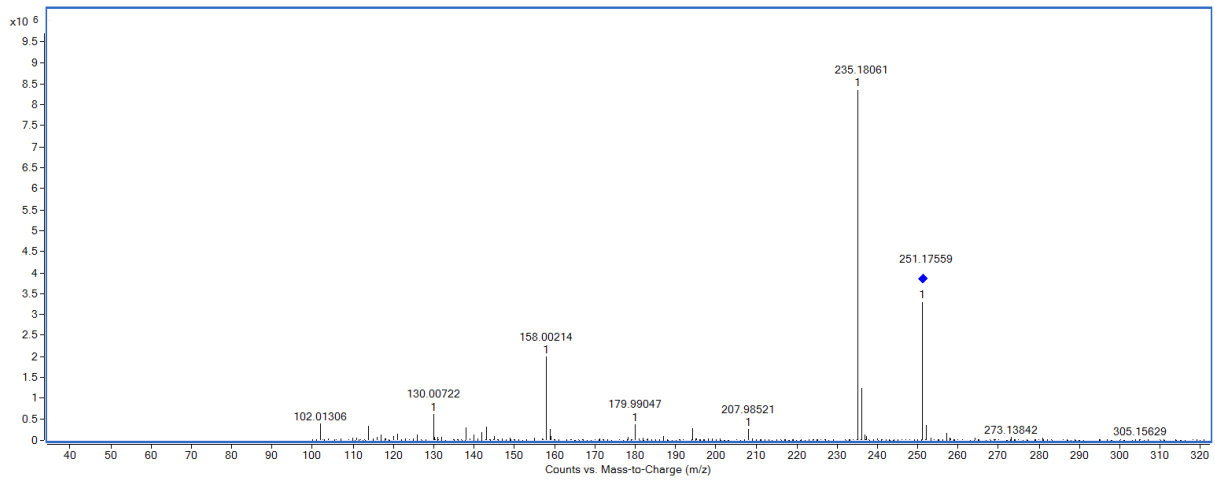
Slika 4.15. MS/MS DP-1



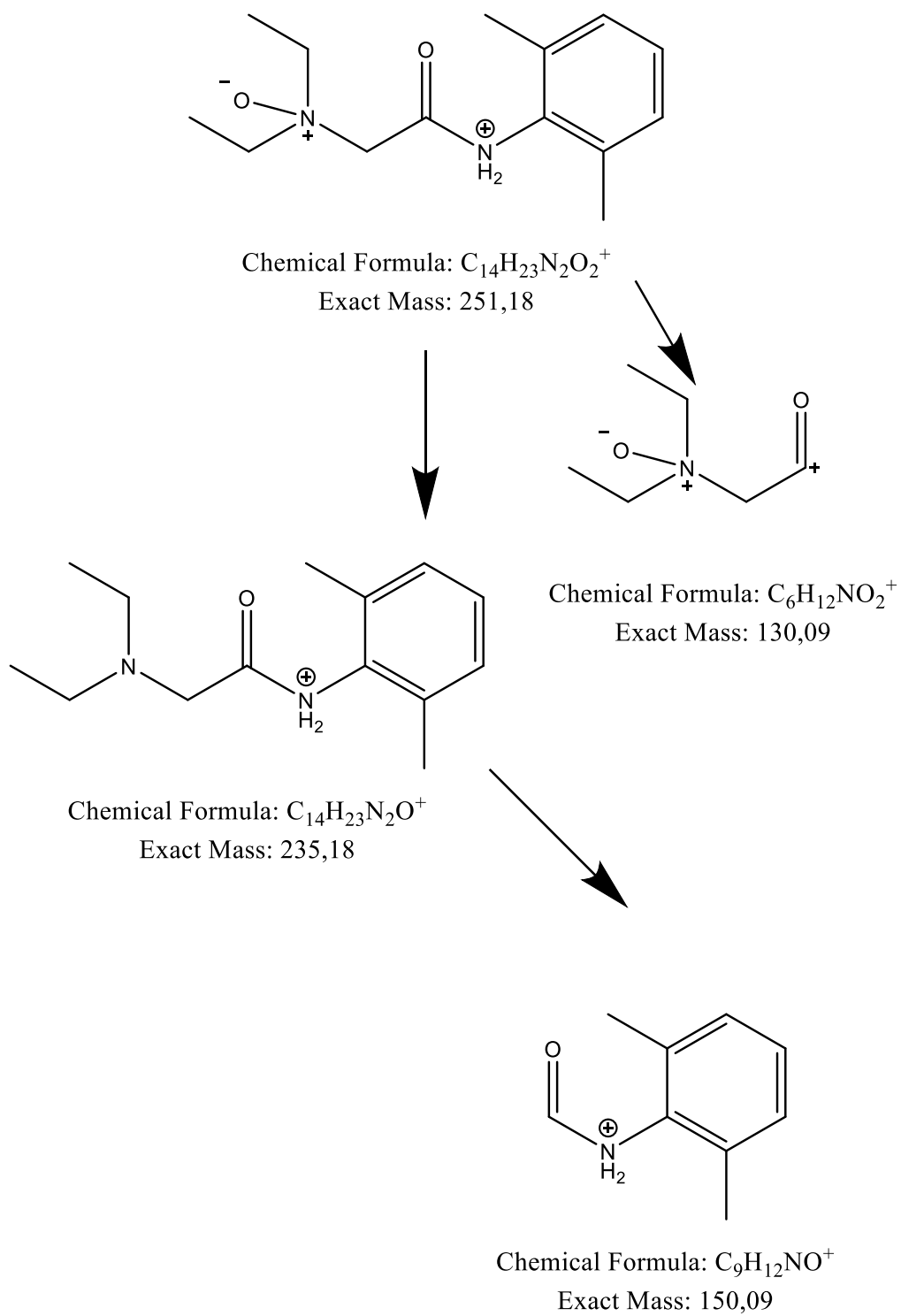
Slika 4.16. Predložena fragmentacija DP-1



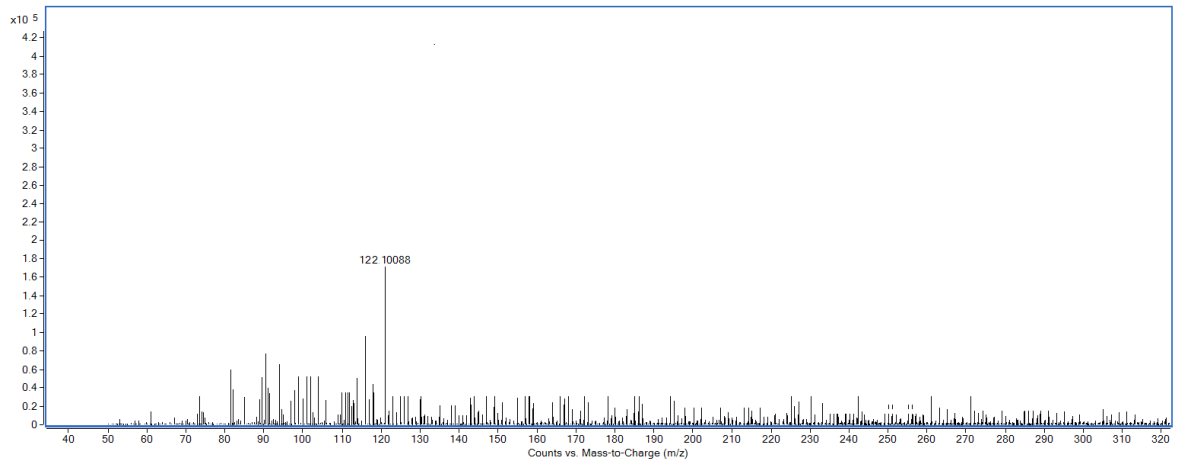
Slika 4.17. MS spektar DP-3



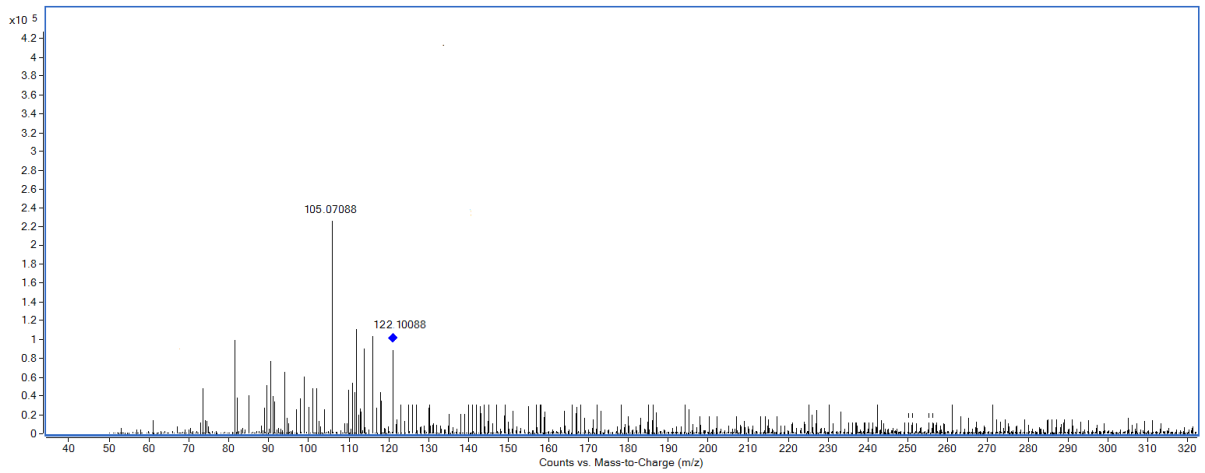
Slika 4.18. MS/MS spektar DP-3



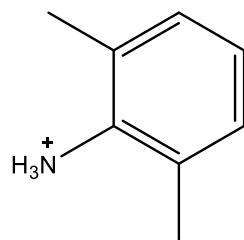
Slika 4.19. Predložena fragmentacija DP-3



Slika 4.20. MS spektar DP-2

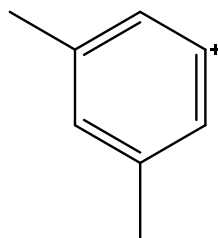
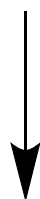


Slika 4.21. MS/MS spektar DP-2



Chemical Formula: $C_8H_{12}N^+$

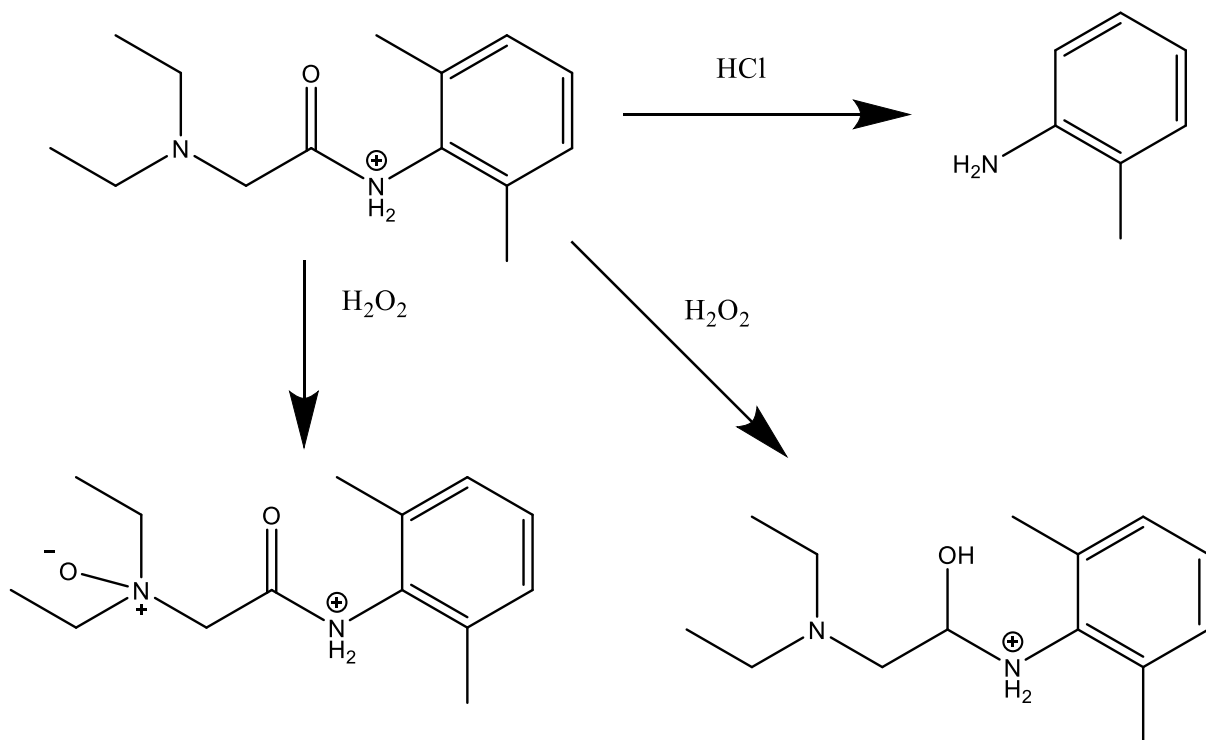
Exact Mass: 122,10



Chemical Formula: $C_8H_9^+$

Exact Mass: 105,07

Slika 4.22. Predložena fragmentacija DP-2



Slika 4.23. Putevi razgradnje lidokaina

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata kao nepokretna faza odabrana je kolona Acquity BEH C18 (Waters) dimenzija 100 x 2,1 mm i veličinom zrna punila 1,7 μm , temperatura od 50 $^{\circ}\text{C}$ uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline u pokretnu fazu zbog veće osjetljivosti detektora. Kako bi se potvrdila stabilnost lijeka provedena je prisilna razgradnja u kiselim uvjetima s 1,0 mol/L HCl, lužnatim uvjetima s 1,0 mol/L NaOH, oksidativna razgradnja s 30 % H_2O_2 , fotolitička razgradnja, razgradnja Sunčevom svjetlošću i termalna razgradnja. Do značajnije razgradnje lidokaina došlo je tijekom eksperimenta razgradnje vodikovim peroksidom pri čemu su nastala dva degradacijska onečišćenja. Hidrolitičkom razgradnjom u kiselim i lužnatim uvjetima uočen je nastanak jednog značajnog razgradnog produkata, dok prilikom razgradnje sunčevom svjetlošću ili toplinskom razgradnjom nisu uočeni razgradni produkti. Također je dodatno provjerena čistoća glavnog kromatografskog pika uporabom detektora s nizom elektroda. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da kromatografski pik nije spektralno čist jer je vrijednost *purity angle* veća od vrijednosti *purity thresholda*.

6. LITERATURA

1. Opća enciklopedija jugoslavenskog leksikografskog zavoda, Zagreb 1977., broj 5, str. 121-122
2. file:///C:/Users/anton/AppData/Local/Temp/621021.Diplomski-Ivanis_Boris-2012.pdf (pristup svibanj, 2018.)
3. https://www.google.com/search?q=lidokain&hl=hr&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjJq7CK4J7dAhXC3KQKHc7jA_IQ_AUICigB&biw=1366&bih=654#imgrc=YffA3Xn6ba_1M: (pristup svibanj, 2018.)
4. M. Lusina, Ispitivanje stabilnosti lijekova - teorija, regulativa i praksa. Farm glas, 2006, 395-404
5. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
6. L. Novakova, L. Havlikova, H. Vlčkova, Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC, *TrAC Trends in Anal. Chem.* **63** (2014) 55–64.
7. K. Toppner, HPLC Analysis, The role of ultrapure water, *Sartorius*, (2014) 16–18.
8. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, *J. Wiley & Sons, Inc.*, Kanada, 1979., str. 87–166.
9. M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, *Talanta* **70** (2006) 678–690.
10. https://www.google.hr/search?biw=1366&bih=654&tbn=isch&sa=1&ei=n46OW7jWCYrewAK73pcg&q=shematski+prikaz+hplc+sustava&oq=shematski+prikaz+hplc+sustava&gs_l=img.3...40869.51597.0.51897.32.25.0.7.7.0.242.2816.2j19j1.22.0...0..1c.1.64.img..3.18.1708...0j0i67k1j0i30k1j0i10i30k1j0i5i10i30k1j0i24k1j0i10i24k1.0.1wJ14lgBIGo#imgrc=krfUPwR_aaMqVM: (pristup svibanj, 2018.)
11. <https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma%3A33/datastream/PDF/view> (pristup svibanj, 2018.)
12. https://hr.wikipedia.org/wiki/Masena_spektrometrija (pristup svibanj, 2018.)
13. A. Horvatić, M. Cindrić, Analysis of therapeutic peptides by mass spectrometry, Institut “Ruđer Bošković”, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za sistemsku biomedicinu, Zagreb, 2008., str. 258–263.

14. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Wiley, Third Edition, 2007., str. 33–36.
15. N. Galić, Elektroraspršenje - blagi način ionizacije u spektrometriji masa, *Kem. Ind.* **53** (2004) 117–123.
16. P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Pico, Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2471–2483.
17. E. Garcia-Lor, M. Martinez, J. V. Sancho, G. Penuela, F. Hernandez, Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* **99** (2012) 1011–1023.
18. R. Varga, I. Somogyvari, Z. Eke, K. Torkos, Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction.liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Talanta* **83** (2011) 1447–1454.
19. M. Periša, S. Babić, Simultaneous determination of pharmaceuticals and some of their metabolites in wastewater by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* **37** (2014) 1289–1296.
20. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* **65** (2016) 471–482.
21. M. Petrović, D. Barcelo, LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment, *TrAC Trends in Anal. Chem.* **26** (2007) 486–493.
22. W. W. Buchberger, Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge, *Anal. Chim. Acta* **593** (2007) 129–139.
23. M. W. Dong, K. Zhang, Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *Trends in Anal. Chem.* **63** (2014) 1–15.
24. P. W. Carr, D. R. Stoll, *Two-dimensional liquid chromatography, principles, practical implementation and applications*, *Agilent Technologies, Inc.*, 2015., 1–14.

7. ŽIVOTOPIS

