

# Određivanje razgradnih produkata diazepama spektrometrijom masa visoke razlučivosti

---

Karačić, Iva

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:149:817288>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Karačić

Određivanje razgradnih produkata diazepama  
spektrometrijom masa visoke razlučivosti

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva: prof.dr.sc. Dragana Mutavdžić Pavlović  
izv. Prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević  
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, 2018.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović, koja mi je svojim stručnim savjetima, sugestijama i podrškom pomogla pri izradi ovoga rada.*

*Također se zahvaljujem neposrednom mentoru Mislavu Runje, dipl. ing. iz Plive Hrvatska d.o.o (R&D TAPI Istraživanje i Razvoj/ TAPI analitika) na pruženoj pomoći u laboratoriju tokom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada te savjetima za pisanje rada.*

*Posebno hvala mojoj obitelji, roditeljima, sestrama Evi i Lei, baki i djedu, mome Josipu, prijateljima te svima koji su mi bili podrška tijekom studija. Hvala na razumijevanju i strpljenju.*

*I na kraju, želim se zahvaliti svim kolegama i kolegicama bez kojih studentsko razdoblje nebi bilo najljepše razdoblje mog života.*

# Sadržaj

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                                                                     | 1  |
| 2. OPĆI DIO.....                                                                                                  | 2  |
| 2.1. Onečišćenja u lijekovima.....                                                                                | 3  |
| 2.2. Diazepam .....                                                                                               | 3  |
| 2.3. Forsirana razgradnja .....                                                                                   | 4  |
| 2.3.1. Uvjeti forsirane razgradnje [9].....                                                                       | 5  |
| 2.4. Tekućinska kromatografija .....                                                                              | 6  |
| 2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....                                                | 7  |
| 2.4.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UHPLC).....                                         | 10 |
| 2.5. Spektrometrija masa .....                                                                                    | 11 |
| 2.5.1. Spektrometar masa.....                                                                                     | 11 |
| 2.5.2. Načini ionizacije .....                                                                                    | 12 |
| 2.5.4. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS) .....                                                             | 16 |
| 2.5.5. Q-TOF analizator .....                                                                                     | 17 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....                                                                                       | 18 |
| 3.1. Materijali .....                                                                                             | 19 |
| 3.1.1. Oprema i instrumenti .....                                                                                 | 19 |
| 3.1.2. Kemikalije.....                                                                                            | 20 |
| 3.1.3. Nepokretne faze korištene u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti .....     | 21 |
| 3.2. Priprema pokretnih faza i diluenta.....                                                                      | 21 |
| 3.3. Priprema otopina uzorka za različite uvjete razgradnje.....                                                  | 22 |
| 3.3.1. Oksidacija .....                                                                                           | 22 |
| 3.3.2. Hidroliza .....                                                                                            | 22 |
| 3.3.4. Toplinska razgradnja u čvrstom stanju .....                                                                | 23 |
| 3.3.5. Toplinska razgradnja u otopini .....                                                                       | 23 |
| 3.3.6. Fotolitička razgradnja .....                                                                               | 23 |
| 3.4. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa visoke razlučivosti ..... | 24 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....                                                                                     | 25 |
| 4.1. Razvoj UHPLC metode određivanja razgradnih produkata diazepama .....                                         | 26 |
| 4.1.1. Izbor nepokretne faze.....                                                                                 | 26 |
| 4.1.2. Utjecaj temperature .....                                                                                  | 28 |
| 4.1.3. Utjecaj aditiva u pokretnu fazu .....                                                                      | 28 |

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| 4.1.4. Specifičnost.....                   | 29 |
| 4.1.5. Prisilna razgradnja diazepama ..... | 30 |
| 5. ZAKLJUČAK .....                         | 50 |
| 6. LITERATURA.....                         | 52 |
| 8. ŽIVOTOPIS .....                         | 56 |

## SAŽETAK

Svaki lijek ili farmaceutik sadrži razna organska ili anorganska onečišćenja te razgradne produkte koji u lijeku obično zaostaju iz proizvodnog postupka, nastaju tijekom izrade ljekovitog oblika ili skladištenjem lijeka. Razgradni produkti mogu nastati djelovanjem svjetla, temperature, u prisutnosti vode ili promjenom pH, a mogu nastati i tijekom izrade ili čuvanja farmaceutskog dozirnog oblika. Njihova prisutnost, čak i u vrlo malim količinama, može utjecati na stabilnost, djelotvornost i sigurnost primjene lijeka. U ovom radu razvijena je brza i učinkovita metoda za analizu onečišćenja i razgradnih produkata farmaceutika diazepama u farmaceutskoj otopini. Za određivanje i kvantifikaciju diazepama i njegovih razgradnih produkata koristi se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS). Pomoću razvijene metode određeni su razgradni produkti nastali forsiranom razgradnjom diazepama u kiselini, lužini, vodikovom peroksidu i netretiranom uzorku, ispitan je utjecaj temperature i svjetlosti na razgradnju te su pretpostavljene strukture i način fragmentacije dobivenih razgradnih produkata.

Za određivanje optimalnih uvjeta kromatografskog odjeljivanja metodom UHPLC (temperatura kolone, sastav pokretne faze, vremenski gradijent, pH) korišten je računalni program Drylab.

**Ključne riječi:** *Diazepam, onečišćenja, razgradni produkti, UHPLC metoda, MS/MS*

# ABSTRACT

## DETERMINATION OF DIAZEPAM DEGRADATION PRODUCTS BY HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Each drug or pharmaceutical contains various organic or inorganic contaminants and degradable products that typically lag behind in drug during the manufacturing process, preparation of a medicated form or by storage of the drug. The degradable products can be generated under the influence of light, temperature, water or pH change, and may also occur during the preparation or storage of the pharmaceutical dosage form. Even in very small quantities, the presence of contamination can affect the efficacy and safety of drug use. In this study, a quick and efficient method for analysis of contaminants and degradation products of diazepam was developed. High efficiency liquid chromatography (UHPLC) coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) was used for determination and quantification of diazepam and his degradation products. Degradation products generated by forced degradation of diazepam in acid, alkaline solution, hydrogen peroxide, untreated sample, and under the influence of temperature and light, were determined by the developed UHPLC method. Also, based on the developed method , their structures and possible pathways of fragmentation were assumed.

Drylab software was used to determine the optimal conditions of chromatographic separation method (column temperature, composition of mobile phase, time gradient, pH).

**Key words:** *Diazepam, contaminants, degradation products, UHPLC method, MS/MS*

# 1. UVOD



U svakom lijeku ili farmaceutiku prisutna su onečišćenja u većim ili manjim količinama koja u lijeku obično zaostaju iz proizvodnog postupka, nastaju tijekom izrade ljekovitog oblika ili skladištenjem lijeka. Prisutnost onečišćenja, čak i u vrlo malim količinama, može utjecati na djelotvornost i sigurnost primjene lijeka. Iz tog razloga zakonska regulativa donosi sve složenije zahtjeve u kontroli onečišćenja u lijekovima.

Ispitivanje čistoće lijeka obuhvaća analitičke postupke kojima je cilj detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje onečišćenja u ljekovitoj tvari i farmaceutskom pripravku. U skladu sa sve većim zahtjevima u kontroli kakvoće lijekova i određivanja njihovih onečišćenja, razvijaju se nove pouzdane i sofisticirane analitičke metode da bi zadovoljile potrebe regulatornih tijela i industrije, a pacijenti opskrbili kvalitetnim, sigurnim i djelotvornim lijekovima. Od analitičkih metoda koriste se separacijske tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), plinske kromatografije (GC), tankoslojne kromatografije (TLC), tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC) i kapilarne elektroforeze. Osim za separaciju, navedene tehnike se mogu koristiti i za izolaciju. Za strukturnu karakterizaciju onečišćenja koriste se spektroskopske tehnike poput spektrometrije masa (MS), nuklearne magnetske rezonantne spektrometrije (NMR), infracrvene (IR) spektrofotometrije, spektrofotometrije u bliskom infracrvenom području (NIR), Raman spektroskopije te ultraljubičaste i vidljive spektrofotometrije (UV-VIS). Za postizanje što boljih rezultata spektroskopske tehnike se vrlo često kombiniraju sa separacijskim pa govorimo o spregnutim tehnikama poput tekućinske kromatografije vezane na spektrometriju masa (LC-MS i LC-MS/MS) i druge.

U ovom radu razvijena je brza i učinkovita metoda za analizu onečišćenja i razgradnih produkata lijeka diazepama u farmaceutskoj otopini. U svrhu optimizacije kromatografskih uvjeta (vremenskog gradijenta, temperature kolone i pH vrijednosti) koristio se računalni program DryLab. Za određivanje i kvantifikaciju diazepama i njegovih razgradnih produkata koristi se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa. Navedenom metodom određeni su razgradni produkti nastali forsiranom razgradnjom diazepama u kiselini, lužini, vodikovom peroksidu i netretiranom uzorku te su pretpostavljene njihove strukture i način njihove fragmentacije.

## 2. OPĆI DIO

## 2.1. Onečišćenja u lijekovima

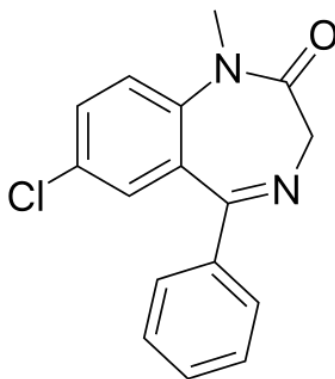
Onečišćenja u lijekovima mogu se podijeliti na organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Organska onečišćenja uglavnom nastaju tijekom proizvodnog procesa ili pri skladištenju, a uključuju početne sirovine, nusprodukte, međuprodukte i razgradne produkte. Razgradni produkti mogu nastati djelovanjem svjetla, temperature, u prisutnosti vode ili promjenom pH, a mogu nastati i tijekom izrade ili čuvanja farmaceutskog dozirnog oblika. Anorganska onečišćenja uglavnom zaostaju iz proizvodnog procesa, a obuhvaćaju anorganske katalizatore, reagense i ligande, anorganske soli, drveni ugljen, silika gel, celulozu, teške metale te druge zaostale metale. Ostatna otapala su zaostale, hlapljive organske tvari koje se upotrebljavaju ili nastaju u postupku proizvodnje lijeka. S obzirom da su lijekovi namijenjeni uglavnom za oralnu, dermalnu ili intravenoznu primjenu kod ljudi ili životinja, od iznimne je važnosti poznavati prisutna onečišćenja u lijeku, definirati njihova toksična svojstva i štetnost, istražiti da li uzrokuju nuspojave te da li utječu na aktivnost i stabilnost ljekovite tvari. [1]

## 2.2. Diazepam

Diazepam (7-kloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) je antiepileptički lijek koji pripada skupini benzodiazepinskih lijekova. Kao i drugi lijekovi iz benzodiazepinske skupine, diazepam se koristi u liječenju anksioznosti, mišićnog spazma, uključujući tetanus i cerebralnu spastičnost, zatim u terapiji simptoma sindroma sustezanja od alkohola, kao dodatak liječenju kod nekih vrsta epilepsija te u premedikaciji kod manjih kirurških zahvata kao intravenski anestetik. Generalno, koristi se kao hipnotički, anksiolitički te mišićni relaksant. Uz diazepam, u skupinu benzodiazepinskih lijekova spadaju i lorazepam, bromazepam, alprazolam, flurazepam i drugi. Terapijska aktivnost diazepama je iznimno brza s visokom stopom djelotvornosti koja je važna kod akutnih i anksioznih napadaja te napadaja panike. Poput ostalih benzodiazepina, diazepam također ima relativno nisku toksičnost kod predoziranja. [2, 3]

Do sada je poznato mnoštvo analitičkih metoda za određivanje i analizu diazepama i ostalih 1,4-benzodiazepina poput kapilarne elektroforeze, tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kromatografije (GC) te plinske kromatografije vezane na spektrometriju masa (GC-MS). Osim navedenih metoda za određivanje i analizu diazepama i drugih benzodiazepina, poznato je i nekoliko metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) koja je ujedno

postala i najčešće rabljena tehnika u određivanju diazepama. Međutim, sve ove metode ograničene su dugotrajnošću izvedbe ili visokom cijenom. Stoga se ovaj rad fokusira na razvijanje jednostavne, učinkovite i precizne metode određivanja i analize diazepama. Jedna od efikasnih validiranih metoda za određivanje diazepama je RP-HPLC (engl. *Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) metoda. [4, 5]



**Slika 1.** Struktura diazepama

### 2.3. Forsirana razgradnja

Kemijska stabilnost farmaceutskih molekula predstavlja veliku zabrinutost jer utječe na sigurnost i učinkovitost lijeka. Regulatorne agencije zahtijevaju od farmaceutskih kompanija ispitivanje stabilnosti lijekova da bi dobili uvid kako se kvaliteta lijeka mijenja pod utjecajem različitih faktora okoline. Poznavanje stabilnosti molekule pomaže u odabiru pravilne formulacije i pakiranja, kao i pružanje odgovarajućih uvjeta skladištenja i roka trajanja, što je neophodno za regulatornu dokumentaciju. Forsirana razgradnja je metoda koja omogućuje sakupljanje osnovnih informacija o stabilnosti lijeka u vrlo kratkom vremenu te je važan dio razvoja i validacije analitičke metode. To je proces koji uključuje razgradnju farmaceutske supstance ili dozirnog oblika u ekstremnim uvjetima i time generira produkte razgradnje koji se mogu proučavati kako bi se odredila stabilnost molekule. U razvoju metode za određivanje onečišćenja važno je rezultatima forsirane razgradnje pokazati da se potencijalna onečišćenja odjeljuju međusobno i od analita, dok je u razvoju metode za određivanje sadržaja važno pokazati odjeljivanje potencijalnih onečišćenja od analita kako ona ne bi utjecala na površinu njihovih kromatografskih krivulja. Forsirane razgradnje provode se pri različitim pH

vrijednostima otopine, pri visokoj temperaturi, u prisutnosti kisika i svjetlosti te na različitim razinama vlažnosti. Vrijednosti između 5% i 20% razgradnje ljekovite supstance smatraju se prihvatljivim za validaciju kromatografskih ispitivanja. Kod većeg udjela razgradnje mogu nastati sekundarni razgradni produkti što nije poželjno. [6, 7, 8]

Za identifikaciju i karakterizaciju razgradnih produkata forsirane razgradnje koriste se različite analitičke metode. Najčešće korištena metoda za analizu stabilnosti je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC). Ona je najprikladnija zbog kompatibilnosti s organskim i s vodenim otopinama, visoke preciznosti, osjetljivosti i mogućnosti detekcije polarnih komponenti. HPLC metoda za određivanje razgradnih produkata najčešće se koristi spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS, LC-MS/MS). Takva metoda igra značajnu ulogu u razvoju cjelokupnog razgradnog puta farmaceutske molekule te pomaže u ilustriranju strukture glavnih razgradnih produkata. [6]

### **2.3.1. Uvjeti forsirane razgradnje [9]**

#### **2.3.1.1. Hidroliza**

U širokom rasponu pH, najčešća kemijska reakcija koja se odvija prilikom forsirane razgradnje je hidroliza. Hidroliza je razlaganje kemijskog spoja u reakciji s vodom. U kiseloj i lužnatoj hidrolizi dolazi do katalize ionizirajućih funkcionalnih skupina prisutnih u molekuli. Za kiselinsku hidrolizu najprikladnije su klorovodična ili sumporna kiselina (0,1-1M), dok su za bazičnu hidrolizu najprikladniji natrijev ili kalijev hidroksid (0,1-1M). Ako su spojevi slabo topljivi u vodi mogu se koristiti i kootapala. Forsirana razgradnja započinje na sobnoj temperaturi te se povećava ukoliko ne dolazi do razgradnje.

#### **2.3.1.2. Oksidacijska razgradnja**

Za forsiranu oksidacijsku razgradnju najčešće se koristi vodikov peroksid. Osim vodikovog peroksida, mogu se koristiti i metalni ioni, kisik te radikalni inicijatori poput azobi-izobutironitrila (AIBN). Odabir koncentracije i stanja oksidacijskih sredstava ovisi o samoj strukturi lijeka. Kod oksidacijske razgradnje farmaceutske supstance javlja se mehanizam prijenosa elektrona.

### **2.3.1.3. Fotolitička razgradnja**

Izloženost dnevnoj svjetlosti ne utječe na ljekovitu tvar, već se za tu svrhu provodi ispitivanje fotostabilnosti izlaganjem UV ili fluorescentnim uvjetima pri čemu nastaju primarni razgradni produkti lijeka. 300-800 nm je najčešće prihvaćena valna duljina svjetlosti koja uzrokuje fotolitičku razgradnju. Fotosenzitivne skupine su karbonilni, nitroaromati, N-oksidi, alkeni, arilni kloridi, slabe C-H i O-H veze, sulfidi te polieni.

### **2.3.1.4. Toplinska razgradnja**

Toplinska razgradnja se provodi tako da se lijek izlaže suhoj ili vlažnoj toplini. Uzorci krutih lijekova izlažu se ili suhoj ili vlažnoj toplini dok se tekući lijekovi izlažu isključivo suhoj toplini. Kroz Arrheniusovu jednadžbu može se proučiti utjecaj temperature na toplinsku razgradnju tvari. Ispitivanje termalne razgradnje obično se provode u intervalu 40-80°C.

### **2.3.1.5. Razgradnja u uvjetima vlage**

Vlažnost je jedan od učinkovitijih faktora u utvrđivanju potencijalnih razgradnih produkata u gotovom proizvodu i aktivnom farmaceutskom sastojku. Normalno se preporučuje izlaganje do 90 % vlažnosti tijekom tjedan dana za utvrđivanje produkata forsirane razgradnje.

## **2.4. Tekućinska kromatografija**

Tekućinska kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja uzoraka na temelju različitih interakcija uzorka s pokretnom i nepokretnom fazom. Molekule koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi čvršće će se vezati za nju i tako će sporije eluirati s kromatografske kolone. Budući da postoje mnoge kombinacije nepokretnih/pokretnih faza koje se mogu koristiti pri odvajanju smjese, postoji nekoliko različitih vrsta kromatografija koje se klasificiraju prema fizičkom stanju tih faza. To su adsorpcijska, razdjelna, afinitetna, izmjenjivačka kromatografija te kromatografija isključenjem. Prema obliku kromatografske podloge, tekućinska kromatografija se može podijeliti na kromatografiju na stupcu i plošnu kromatografiju. U kromatografiji na stupcu, nepokretna faza ispunjava usku cijev kroz koju se pokretna faza kreće pod utjecajem gravitacije ili tlaka. Kod plošne kromatografije, nepokretna faza nanosi se na ravnu plohu ili u pore papira, a pokretna faza prolazi kroz nepokretnu pod utjecajem kapilarnih

sila ili gravitacije. S obzirom na polarnost nepokretne faze, tekućinska kromatografija može se podijeliti na kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza sadrži polarnu nepokretnu fazu i nepolarnu pokretnu fazu, dok je kod kromatografije obrnutih faza obrnuto. [10]

**Tablica 1.** Podjela tekućinske kromatografije s obzirom na vrstu ravnoteže [10]

| Vrsta tekućinske kromatografije                      | Specifična metoda                        | Stacionarna faza                           | Vrsta ravnoteže                              |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Razdjelna                                            | Tekuće-tekuće, ili raspodjela            | Tekućina adsorbirana na čvrstoj tvari      | Razdioba između tekućina koje se ne miješaju |
| Adsorpcijska                                         | Tekućina-krutina, ili adsorpcija         | Čvrsta tvar                                | Adsorpcija                                   |
| Afinitetna                                           | Tekuća-vezana faza                       | Organski spojevi vezani na čvrstu površinu | Razdioba između tekuće i vezane površine     |
| Izmjenjivačka                                        | Ionska izmjena                           | Ionski izmjenjivač                         | Ionska izmjena                               |
| Kromatografija isključenjem (kromatografija na gelu) | Odjeljivanje na temelju veličine čestica | Tekućina u prostorima (porama) polimera    | Raspodjela/prosijavanje                      |

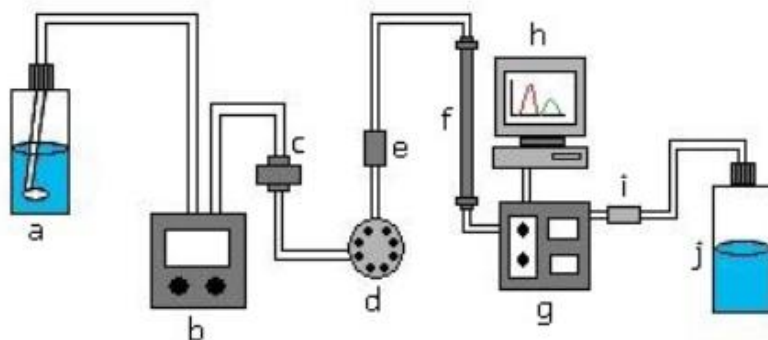
### 2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti postala je vrlo svestrana i moćna separacijska analitička metoda tijekom godina. Danas se u 75 % primjena koristi kao kromatografija obrnutih faza. HPLC obrnutih faza je u pravilu metoda koja se prva ispituje kada se rješava neki novi analitički problem. Uobičajena nepokretna faza je C<sub>18</sub> (ODS), a zadržavanje tvari i selektivnost podešavaju se variranjem sastava pokretne faze. [11] HPLC je napredni oblik tekućinske kromatografije. Za razliku od klasične tekućinske kromatografije, kod HPLC-a uzorak je podvrgnut tlaku te tekuća faza brže prolazi kroz kolonu što rezultira bržim i učinkovitim razdvajanjem. HPLC slijedi isti osnovni princip kao i klasična kromatografija. Različite komponente u uzorku imaju različite afinitete prema adsorbensu. To uzrokuje razliku

u brzini protoka svake komponente što dovodi do njihova odvajanja po izlasku iz kolone. Jedina je razlika u tome što su brzina i osjetljivost HPLC-a znatno veće nego kod klasične tekućinske kromatografije upravo radi primjene tlaka. Jačina primjenjenog pritiska ovisi o nekoliko čimbenika kao što su duljina i promjer kolone, brzina protoka, veličina čestice u nepokretnoj fazi i sastav pokretne faze. [11]

#### 2.4.1.1. Dijelovi HPLC uređaja

Za postizanje dovoljnih brzina protoka u kolonama punjenim suvremenim punilima za tekućinsku kromatografiju s promjerom zrna 10  $\mu\text{m}$  ili manje, nužni su tlakovi od nekoliko milijuna Pa. Upotreba tako visokih tlakova zahtijeva mnogo složeniju i skuplju opremu od one koju susrećemo kod drugih vrsta kromatografije. Slika 2 prikazuje važne dijelove tipičnog tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti.



**Slika 2.** Dijelovi HPLC-a. (a) otapalo s filterom za uklanjanje plinova i čvrstih čestica, (b) crpka, (c) filter za uklanjanje čestica, (d) injekcijski vetil, (e) filter prije kolone, (f) kolona, (g) detektor, (h) računalo za obradu podataka, (i) regulator povratnog tlaka, (j) otpad [13]

Suvremeni uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, prema Slici 2, sastoji se od jednog staklenog ili čeličnog spremnika, ili više njih, u kojima se nalazi otapalo. Otapala koja se koriste kao pokretna faza moraju biti visoke čistoće, stoga se u sklopu sustava otapala nalazi i oprema za uklanjanje plinova i čvrstih čestica iz otapala. Plinovi zbog stvaranja mjehurića, mogu uzrokovati širenje zona eluiranih sastojaka, a mjehurići i čestice mogu ometati rad detektora. Korištenje jednog otapala kao pokretna faza najčešće je najjednostavniji način



odjeljivanja tekućinskom kromatografijom (izokratička elucija), no, često se bolji kromatogram dobije gradijentnom elucijom odnosno korištenjem dvaju ili više sustava otapala različitih polarnosti. [10] Dobar izbor otapala izuzetno je važan za dobro odjeljivanje. Povećanjem polarnosti povećava se jakost otapala pri kromatografiji normalnih faza, dok se kod kromatografije obrnutih faza smanjuje. Kao pokretna faza najčešće se koristi voda u kombinaciji s još nekim organskim otapalom poput metanola ili acetonitrila. [16, 17] Osim toga, bitan parametar je i pH vrijednost koja se može podesiti dodatkom kiseline u pokretnu fazu. Za dobro razlučivanje kromatografskih vrpci, pH vrijednost pokretne faze treba biti dvije pH jedinice oko  $pK_a$  vrijednosti analita. [18]

Crpka (pumpa) služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom (0,1-10 mL/min) u kolonu. Za primjenu u tekućinskoj kromatografiji pogodne su dvije vrste mehaničkih crpki: crpka s vijčanim pogonom i recipročna crpka. Crpka s vijčanim pogonom stvara ravnomjeren protok i može se jednostavno nadzirati, ali imaju mali kapacitet (do 250 mL) i nepogodne su za promjenu otapala. Recipročne crpke stoga se upotrebljavaju češće, a njihove prednosti su mali unutarnji volumen, visok vanjski tlak, mogućnost primjene za gradijentnu eluciju te stalni protoci koji ne ovise ni o povratnom tlaku u koloni ni o viskoznosti otapala. [10, 14]

Nakon prolaska pokretne faze kroz crpku, slijedi injektiranje uzorka. Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje tzv. petlju zapremnine 5 do 500  $\mu$ L u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. [10, 14]

Kolona je najčešće cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, ali može biti izrađena i od stakla ukoliko se upotrebljavaju niski tlakovi. Kolone su najčešće duge 10-13 cm, unutrašnjeg promjera 4-10 mm. Promjer zrna punila najčešće iznosi od 5 do 10  $\mu$ m. Takve kolone najčešće imaju 40 000 do 60 000 tavana/m. Odnedavno su na tržištu dostupne visoko djelotvorne mikrokolone, unutrašnjeg promjera 1-4,6 mm i duljine 3-7,5 cm. Te kolone, punjene zrcima promjera 3-5  $\mu$ m sadrže i do 100 000 tavana/m i imaju prednost glede brzine i potrošnje otapala. U tekućinskoj kromatografiji kao punilo najčešće se upotrebljava silikagel, a mogu se upotrebljavati i punila koja sadrže glinicu, porozne polimere i ionske izmjenjivače. [10] Kolone nose oznake po vrsti nepokretne faze (C18, C8, C4, NH<sub>2</sub>, Ph-NH<sub>2</sub>, CN, grafitna, SiO<sub>2</sub>, gel-propusna itd.). [19]

U tekućinskoj kromatografiji ne postoji univerzalan sustav detektora. On ovisi o samoj prirodi uzorka. Najčešće se kao detektor koristi UV/VIS spektrofotometar, zatim fluorimetar, elektrokemijski detektor ili spektrometar masa. Detektor služi za praćenje značajki pokretne faze ili analita. Svaki detektor mjeri određeno svojstvo analita te na temelju toga daje signal koji je upravo proporcionalan tom svojstvu. Signal se šalje na računalo za obradu podataka. [10, 12]

#### **2.4.1.2. Primjena HPLC**

HPLC se koristi za odjeljivanje i određivanje polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, kliničkoj, forenzičkoj te industrijskoj praksi. Izuzetno važna primjena HPLC-a je u ispitivanjima hrane, zraka, industrijskih procesnih i drugih otpadnih tekućina na štetne tvari poput pesticida, polikloriranih bifenila, policikličkih aromatskih ugljikovodika te ostalih karcinogena i mutagena. Osim navedenog, HPLC se može primjenjivati za odjeljivanje alkana, lipida, steroida, šećera, lipofilnih vitamina i dr. [14, 15]

U farmaceutskoj industriji tekućinska kromatografija i spektrometrija masa primjenjuju se kao odvojene ili pak kao vezane tehnike za kvantitativne analize, karakterizaciju onečišćenja, u strukturnim analizama peptida, analizama modifikacije proteina i slično. [15]

#### **2.4.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)**

UHPLC je moderna tehnika koja daje novi značaj tekućinskoj kromatografiji. U odnosu na HPLC, kod UHPLC dolazi do poboljšanja performansi u tri područja: brzina, rezolucija i osjetljivost. Efikasnost kromatografske kolone povećava se korištenjem nepokretne faze manjih veličina čestica, ali to dovodi do velikog povećanja povratnog tlaka, što nije povoljno za HPLC sustave jer oni uglavnom mogu raditi samo do 400 bara. Zbog toga se kod UHPLC sustava koriste kratke kolone punjene česticama promjera oko 2  $\mu\text{m}$  čime se ubrzava analiza bez gubitka efikasnosti. Korištenje manjih čestica (promjer manji od 2,5  $\mu\text{m}$ ) kod UHPLC povećava efikasnost, brzinu, osjetljivost i razlučivost. Odvajanje i kvantifikacija u UHPLC uređaju vrši se pod vrlo visokom tlakom (do 100 MPa). [20, 21]

## 2.5. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička instrumentalna tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju omjera mase i naboja. Nakon ionizacije molekule u ionizatoru, nastali ioni se analiziraju u analizatoru te potom putuju do detektora koji daje signal na računalu. MS je vjerojatno najснаžnija tehnika dostupna za strukturnu karakterizaciju i najčešće se odabire za brzu identifikaciju komponenti odvojenih tekućinskom kromatografijom. MS je najprije korištena kao zasebna tehnika, zatim je povezana s plinskom kromatografijom, a krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća počela se povezivati s tekućinskom kromatografijom. Danas se spektrometrija masa može povezati i s drugim separacijskim tehnikama poput kapilarne elektroforeze. Prednosti MS analiza su: sposobnost dobivanja elementarne analize i molekulske mase spoja, sposobnost identificiranja različitih fragmenata molekule te zahtjev za vrlo malim količinama uzorka. [12]

Spektrometrija masa kontinuirano je povezana s tekućinskom kromatografijom, kapilarnom zonskom elektroforezom ili mikročipovima. Takve kontinuirane vezane tehnike razvile su se sa svrhom analize uz izrazito male gubitke uzorka. Vezani sustav tehnika tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS) predstavlja dodatnu mogućnost analize iona, s ciljem da se poboljša separacija ili dodatna fragmentacija iona, kako bi se na temelju dobivenih spektara masa odredila struktura analiziranog iona. [15]

Spektrometrija masa svoju primjenu pronalazi ponajviše u farmaceutskoj industriji za određivanje strukture i potvrdu identiteta ljekovitih supstanci, određivanje relativnih molekulskih masa ili za karakterizaciju onečišćenja u ljekovitim supstancama u kombinaciji s kromatografskim metodama. Također se koristi za određivanje lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i tkivima te u proteomici kao dio peptidnog mapiranja. [22]

### 2.5.1. Spektrometar masa

Spektrometar masa je instrument koji omogućava određivanje ispitivane komponente na osnovu spektra masa. Sastoji se od tri osnovna dijela: ionizator, analizator i detektor. Ionizator je uređaj koji prevodi molekule u ione. U procesu ionizacije, analiziranoj molekuli dovodi se energija, pri čemu molekula otpušta elektrone. Ionizacijom molekule dolazi do njene fragmentacije pri čemu dobivamo molekulski ion. Molekulski ion pokazuje molarnu masu

molekule i daje signal s najvećom vrijednosti mase. Analizator savija putanje različitih iona djelovanjem magnetskog ili električnog polja i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja ( $m/z$ ), a potom ioni odlaze u detektor koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti  $m/z$  što rezultira stvaranjem spektra masa. Neki od analizatora koji se najčešće koriste su: ionska klopka (engl. *Ion trap*, IT), kvadripolni analizator (engl. *Quadropole*, Q) i analizator vremena preleta (engl. *Time Of Flight*, TOF). [23]

## 2.5.2. Načini ionizacije

Postoji nekoliko načina ionizacije, a razlikuju se po vrsti i količini energije kojom se molekula ionizira. To su ionizacija elektronima (EI), ionizacija brzim atomima i ionima (FAB), kemijska ionizacija (CI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI), ionizacija fotonima pri atmosferskom tlaku (APPI), ionizacija elektroraspršenjem (ESI), matricom potpomognuta laserska desorpcija/ ionizacija (MALDI) te ionizacija termoraspršenjem. Ovisno o količini energije koju predaju molekuli analita navedeni tipovi ionizacije dijele se u dvije osnovne skupine: blage ionizacijske tehnike (engl. *soft ionization*) i čvrste ionizacijske tehnike (engl. *hard ionization*). U blage ionizacijske tehnike spadaju FAB, ESI i MALDI. [24]

### 2.5.2.1. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI)

Ionizacija elektroraspršenjem danas je najčešće korištena metoda ionizacije u kvantitativnim analizama zbog kompatibilnosti s tekućinskom kromatografijom. Elektroraspršenje je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS i kompatibilno je sa svim analizatorima masa. Osim s tehnikom LC, kompatibilna je i s kapilarnom zonskom elektroforezom. Kod ESI tehnike, dozvoljena je upotreba vodenih i organskih otapala, te hlapljivih pufera. Do ionizacije dolazi prolaskom otopine uzorka kroz kapilaru čiji je kraj na visokom potencijalu. Ovisno o potencijalu, nastaju pozitivni ili negativni ioni. Uzorak se raspršuje pri atmosferskom tlaku, a otapalo se otklanja strujom dušika čime nastaju ioni analita. Ovom tehnikom nastaju višestruko nabijeni ioni, što omogućuje njihovo detektiranje i spektrometrima masa malog mjernog područja. Kao analizatori masa najprimjenjiviji je kvadripolni analizator (jednostruki ili trostruki) i ionska klopka. [19]

### **2.5.2.2. Spektrometrija masa MALDI**

MALDI je pulsna ionizacijska tehnika u kojoj kratki intenzivni pulsevi laserske zrake pomoću matrice induciraju desorpciju i nastanak iona u plinovitom stanju u vakuumu spektrometra masa. Kao matrica koriste se otopine određenih tvari u smjesi vode i organskog otapala. Analit je otopljen u matrici koja ga štiti od lasera. Isparavanjem i ionizacijom matrice uslijed djelovanja lasera, dio naboja se prenosi na analit koji se ionizira. Smatra se blagom ionizacijskom tehnikom koja omogućuje nastanak gotovo intaktnih, jednostruko nabijenih ionskih vrsta. Ovom tehnikom najčešće se analiziraju molekule velike molekulske mase ( $m/z > 1000$ ) poput peptida i proteina zbog jednostavnosti pripreme uzoraka, osjetljivosti i visokoprotočnosti analiza. [24]

### **2.5.2.3. Ionizacija elektronima (EI)**

Ionizacija elektronima koristi snop brzih elektrona kojima se bombardiraju molekule u plinskoj fazi. Elektronski snop nastaje provođenjem struje kroz zagrijanu katodu. Prolaskom struje kroz katodu elektroni izlaze iz nje te se ubrzavaju prema pozitivno nabijenoj anodi. Ionizacija elektronima obično jako fragmentira molekule analita stoga se smatra tehnikom tvrde ionizacije. Ova metoda se najčešće koristi za vezanu tehniku GC-MS (plinska kromatografija-spektrometrija masa). [24]

### **2.5.2.4. Ionizacija brzim atomima (FAB)**

Ova metoda ionizacije koristi brze atome kojima se bombardiraju molekule analita u matrici. Za bombardiranje se obično koriste atomi inertnih plinova poput argona ili ksenona. Najčešće matrice koje se upotrebljavaju su glicerol, nitrobenzilni alkohol ili tioglicerol. Pokretna faza, analit i matrica, na ulazu u ionizator razmazuju se u tanki sloj pri čemu pokretna faza otparava, a matrica i analit su izloženi udaru akceleriranih atoma. Mehanizam ionizacije je desorpcija, a ionizacija može biti pozitivna i negativna. Varijacija FAB ionizacije bila je zamjena atomske zrake sa zrakom iona, najčešće cezijevim ionima, koja se naziva sekundarna ionska spektrometrija masa (SIMS). [19, 24]

### 2.5.2.5. *Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI)*

APCI je vrlo zastupljena tehnika ionizacije i kompatibilna sa svim analizatorima. Može ionizirati i polarne i nepolarne molekule. Ionizacija može biti i pozitivna i negativna, a odvija se pri atmosferskom tlaku u struji dušika na oko 400 °C. APCI ionizacija se događa u plinskoj fazi, a uzrokuje ju prijenos naboja među ionima, gdje je inicijator ionizacije izbijajuća igla na samom ulazu pokretne faze i analita u ionizator. [19, 24]

### 2.5.3. Analizatori masa

Analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja. Različiti analizatori zahtijevaju različite ionizacijske izvore i različite detektore iona. [19]

**Tablica 2.** Podjela analizatora masa po vrstama, ionskom izvoru i načinu razdvajanja iona [19]

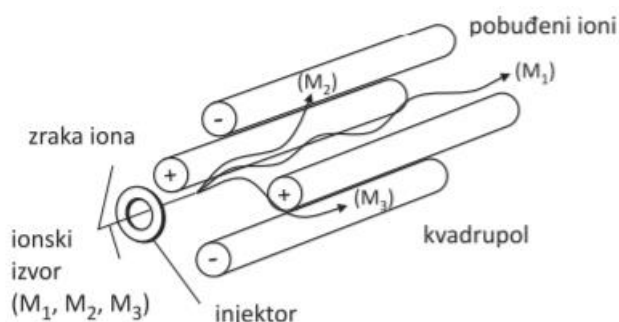
| <b>Analizator masa</b>   | <b>Ionski izvor</b> | <b>Način razdvajanja iona</b>      |
|--------------------------|---------------------|------------------------------------|
| <b>Kvadripol</b>         | Kontinuirani        | Električno polje i propusni filter |
| <b>Ionska klopka</b>     | Pulsni              | Napon i rf polje                   |
| <b>Vremena preleta</b>   | Pulsni              | Vrijeme leta                       |
| <b>Sektor</b>            | Kontinuirani        | Magnetsko polje                    |
| <b>Fourier Transform</b> | Pulsni              | Frekvencija                        |

Od navedenih analizatora masa u Tablici 2 u ovom radu spominjati će se kvadripol i analizator vremena preleta (TOF).

#### 2.5.3.1. *Kvadripol*

Kvadripol je jedan od najčešće korištenih analizatora u spektrometriji masa, a sastoji se od četiri dijagonalno električki povezane elektrode. Elektrode su podijeljene na dva para, pri čemu jedan ima pozitivni, a drugi negativni polaritet. Osim međusobnog povezivanja, elektrode su dodatno spojene s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje. Primjenom električnog polja moguće je filtrirati ione ovisno o vrijednosti omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Kvadripol je „filter“ mase, jer za određenu vrijednost električnog polja propušta ione samo jedne vrijednosti  $m/z$ .

Kontinuiranom promjenom RF električnog polja moguće je motriti željeni raspon masa. Kvadrupol je izuzetno pogodan za spregnute tehnike zbog brzine skeniranja koju postiže. Jedini nedostatak koji bi se mogao navesti kod ovog analizatora jest manja rezolucija u usporedbi s ostalim analizatorima. [19, 25]

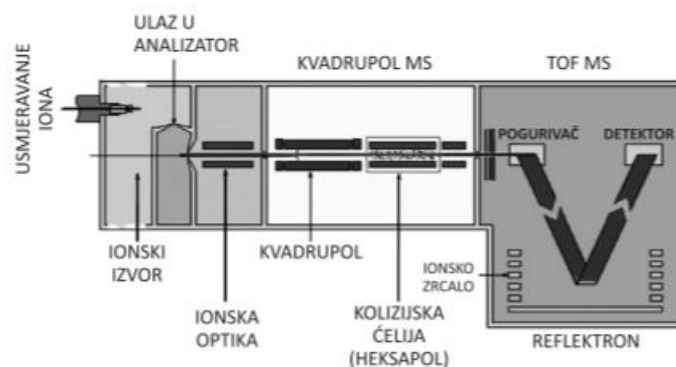


**Slika 3.** Presjek kvadrupola [19]

### **2.5.3.2. Analizator vremena preleta**

Princip rada TOF analizatora bazira se na pravilu da brzina iona ovisi o masi iona. Ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi. Iz toga se može zaključiti da će manji ioni imati veću brzinu, dok će veći ioni imati manju brzinu. Upravo zbog svoje veće ili manje brzine, ioni dolaze na detektor u različitim vremenima te se na taj način vrši njihova separacija. Ioni u analizator ulaze aksijalno ili ortogonalno. Po ulasku iona u analizator, on ih sakuplja u određenom vremenu, te ih potom istovremeno otpušta. U trenutku otpuštanja iona započinje mjerenje vremena preleta do detektora koje je najčešće između 5 i 100  $\mu$ s. TOF analizatori mogu imati i ugrađeno ionsko ogledalo (engl. reflectron, ion mirror), koje omogućava da ioni iste mase, a različitih kinetičkih energija, dođu istovremeno do detektora.

Kod TOF analizatora često je slučaj hibridizacija s kvadrupolnim analizatorima (Q-TOF), što im daje mogućnost analiza MS/MS. [19]



**Slika 4.** Presjek hibridnog analizatora MS/MS [19]

### 2.5.4. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)

Tandemska spektrometrija masa je visoko osjetljiva i specifična tehnologija koja se u zadnjih nekoliko godina sve više upotrebljava. LC-MS/MS predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu i prostoru, s ciljem da se unaprijedi separacija ili izazove dodatna fragmentacija s pomoću koje možemo kvalitetnije odrediti strukturu analiziranog iona. Temelji se na udruženim analizatorima masa (MS/MS). Ova metoda koristi dva analizatora mase, kombinirana u jednom instrumentu, da bi se izdvojio jedan ion iz smjese. Potom se stvaraju fragmenti na temelju kojih se dobijaju informacije o strukturi. [19]

U tandemskom spektrometru masa ioni se prvo formiraju u ionskom izvoru i potom se odvajaju na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Zatim se odabiru ioni određenog omjera  $m/z$  (prekursorski ioni) te njihovim sudarima, fotodisocijacijom ili drugim procesom stvaraju se fragmenti iona. Konačni ioni su zatim odvojeni i detektirani u drugoj fazi spektrometrije masa. [26]

Spektrometre masa s analizatorom MS/MS možemo podijeliti na spektrometre masa s jednim analizatorom, spektrometre masa s više analizatora (trostruki kvadrupol, QQQ) te spektrometre masa s dva analizatora. Kod spektrometra masa s dva analizatora, između analizatora nalazi se kolizijska ćelija. Oni se nazivaju još i hibridni spektrometri masa kao što je npr. analizator Q-TOF o kojem je bilo riječi u prethodnom odlomku. [19]



### 2.5.5. Q-TOF analizator

Q-TOF maseni spektrometri kombiniraju analizatore TOF i kvadrupol, čime se postiže iznimna preciznost određivanja mase iona prekursora i molekuskog iona, snažna kvantitativna sposobnost te primjenjivost eksperimenata koji uključuju fragmentaciju. Glavne prednosti Q-TOF spektrometra masa su zasigurno brzina i osjetljivost. Q-TOF MS koristi kvadripol (četiri paralelna štapića raspoređena tako da čine kvadrat), kolizijsku ćeliju te TOF jedinicu za dobivanje spektra. Manji ioni brže putuju kroz letačku cijev do detektora, gdje se potom određuje njihov omjer mase i naboja ( $m/z$ ). Kod Q-TOF analizatora izvori iona mogu biti: MALDI, ESI, APCI i APPI. [27]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Oprema i instrumenti

- **Kromatograf:** UHPLC Infinity II (Agilent, SAD)
  - Kvaterna pumpa
  - Detektor: DAD
  - Automatski uzorkivač s kontrolom temperature
  - Injektorski sustav
- **Računalni programi**
  - DryLab Software (Molnar Institut, Berlin)
  - Mass Hunter ( Agilent, SAD)
  - Open Lab ( Agilent, SAD)
- **Ostala oprema**
  - Mikrovaga, model XP56 (Mettler-Toledo AG Švicarska)
  - pH metar, model PHM220 (Radiometer Analytical SAS, Francuska)
  - Ultrazvučna kupelj, Sonrex digital 10P (Bandelin, Njemačka)
  - Membranski filtri za pokretnu fazu, RC58, veličina pora 0,2 μm (Whatman, Njemačka)

### 3.1.2. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada, njihova kemijska čistoća kao i proizvođač prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Popis korištenih kemikalija

| Naziv                  | Molekulska formula                                 | Proizvođač                               | CAS broj     | Čistoća     |
|------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------|-------------|
| Acetonitril            | CH <sub>3</sub> CN                                 | J. T. Baker,<br>Phillipsburg,<br>NJ, SAD | 75-05-8      | <i>p.a.</i> |
| Klorovodična kiselina  | HCl                                                | Kemika,<br>Zagreb,<br>Hrvatska           | 7647-01-0    | <i>p.a.</i> |
| Natrijev hidroksid     | NaOH                                               | Kemika,<br>Zagreb,<br>Hrvatska           | 1310-73-2    | <i>p.a.</i> |
| Vodikov peroksid, 30 % | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                      | Merck,<br>Darmstadt,<br>Njemačka         | 46424798 512 | <i>p.a.</i> |
| Amonijev formijat      | NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub>                   | Merck,<br>Darmstadt,<br>Njemačka         | 540-69-2     | <i>p.a.</i> |
| Mravlja kiselina       | HCOOH                                              | J. T. Baker,<br>Phillipsburg,<br>NJ, SAD | 64-18-6      | <i>p.a.</i> |
| Kalijev hidroksid      | KOH                                                | Kemika,<br>Zagreb,<br>Hrvatska           | 67-56-1      | <i>p.a.</i> |
| Diazepam               | C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O | JGL d.d.,<br>Rijeka,<br>Hrvatska         | 439-14-5     | 99,9%       |

### 3.1.3. 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).

**Tablica 4.** Dimenzije kolona i vrsta punila kromatografskih kolona korištenih u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti

| Naziv                         | Nepokretna faza | Dimenzije                 |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------|
| <b>Waters Acquity BEH C18</b> | C18             | 100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu$ m |
| <b>Waters Acquity BEH C8</b>  | C8              | 100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu$ m |
| <b>Waters Acquity CSH</b>     | C18             | 1002,1 mm, 1,7 $\mu$ m    |

### 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 acetontrila u omjeru 1:1. Pomješano je 500 mL MiliQ vode i 500 mL acetontrila.

### 3.3. Priprema otopina uzorka za različite uvjete razgradnje

Sve otopine uzorka diazepama 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 diazepama koncentracije 1 mg/mL tako što je vagano 20 mg diazepama u odmjerne tikvice od 20,0 mL. Kao otapalo korištena je smjesa acetonitrila i vode u volumnom omjeru 50:50. Otapanje diazepama 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 diazepama i otopljeno u smjesi acetonitrila i ultračiste vode u omjeru (1:1, v/v). Onečišćenja koja su bila prisutna nisu razmatrana u putevima razgradnje.

#### 3.3.1. Oksidacija

Oksidacija diazepama ispitana je dodatkom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %):

- U drugu tikvicu od 20 mL odvagano je 20 mg diazepama, dodano 10 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 1 mL 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ostavljeno je na sobnoj temperaturi 1 sat zbog odvijanja reakcije. Nakon toga je dodana smjesa acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) do oznake na tikvici.

#### 3.3.2. Hidroliza

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

- U treću tikvicu od 20 mL odvagano je 20 mg diazepama, 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 sat 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 tikvicu od 20 mL odvagano je 20 mg diazepama, 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 0,5 mol/L i tikvica je nadopunjena smjesom acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) do oznake.

### **3.3.4. Toplinska razgradnja u čvrstom stanju**

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

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

### **3.3.5. Toplinska razgradnja u otopini**

Pripremljena je otopina diazepama, koncentracije 1 mg/mL, u diluentu acetonitrila i vode (u volumnom omjeru 50:50), te je otopina zatim grijana 1 sat na 60 °C.

### **3.3.6. Fotolitička razgradnja**

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

### 3.4. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa visoke razlučivosti

Za analizu razgradnih produkata diazepama korišten je tekućinski kromatograf (Agilent UHPLC 1290 Infinity) s kvarternom pumpom i kromatografskom kolonom (Waters, BEH C18 2,1 x 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) uz detektor s nizom dioda i spektrometrom masa visoke razlučivosti (Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF). 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 % mravlja kiselina u acetonitrilu.

Uvjeti na spektrometru masa visoke razlučivosti bili su sljedeći:

- napon fragmentatora: 380 V
- kapilarni napon: 4500 V
- temperatura plina: 250 °C
- protok plina: 20 L min<sup>-1</sup>
- tlak raspršivača: 30 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica (eng. *sheat gas*): 450 °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, 20 eV, 30 eV, 40 eV.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

## **4.1. Razvoj UHPLC metode određivanja razgradnih produkata diazepama**

Glavni cilj ovog rada bio je razviti selektivnu metodu za određivanje razgradnih onečišćenja diazepama. Razvoj metode je napravljen na način da su se koristile otopine diazepama razgrađene u kiselini, lužini i vodikovom peroksidu te otopina diazepama u diluentu. Uspješnost razvijene metode se mjerila na način da su se uspoređivali spektri masa otopine diazepama i razgradnih otopina. Dodatno je provjerna i čistoća glavnog kromatografskog pika uporabom detektora s nizom elektroda (eng. DAD). Razvoj metode uključivao je i testiranje različitih nepokretnih faza, modifikatora pokretnih faza i različite omjere otapala u pokretnoj fazi. Također, ispitan je učinak temperature, kao i različitih gradijentnih programa na kromatografsko razlučivanje.

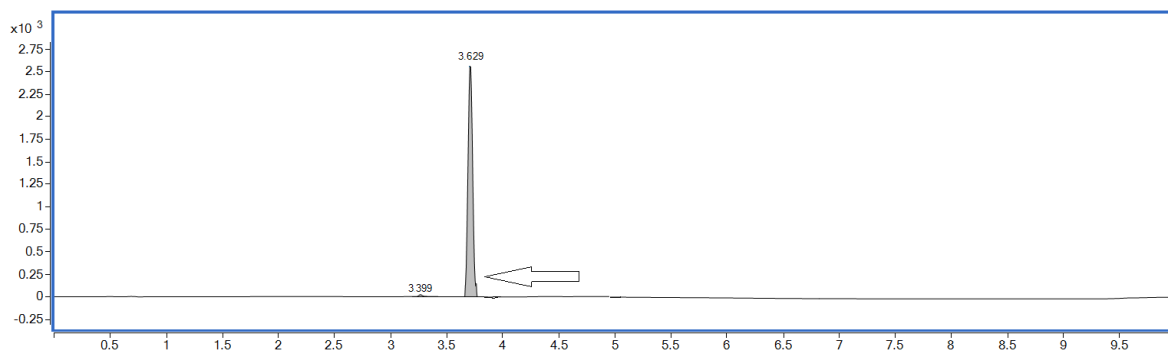
### **4.1.1. Izbor nepokretne faze**

Testirano je nekoliko kromatografskih kolona s različitim punjenjem: reverzne faze C8 i C18 faza temeljem pregleda literaturnih metoda.

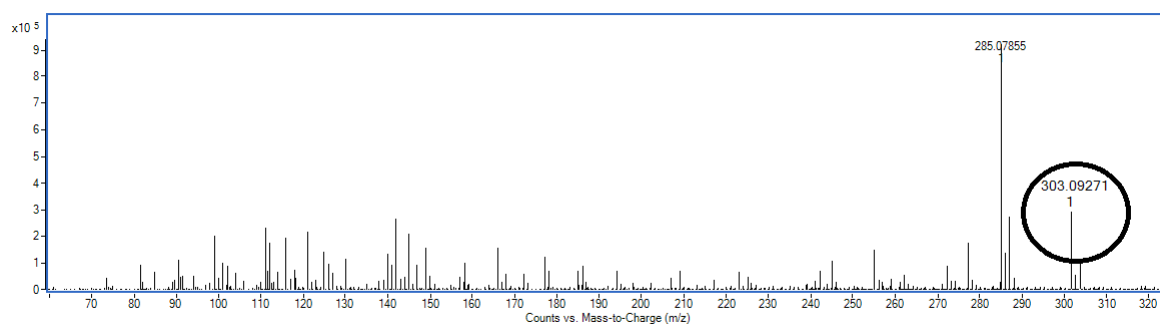
Prilikom testiranja C8 i C18 nepokretne faze kao pokretna faza korištena je 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi i acetontrilu.

Na koloni C8 (Slika 5), dolazilo je do ranije elucije pikova što je onemogućavalo jasnu identifikaciju onečišćenja MS-om. Dodatno je uočena masa u standardnoj otopini diazepama što je ukazivalo na ko-eluciju razgradnih onečišćenja s diazepama (Slika 6).

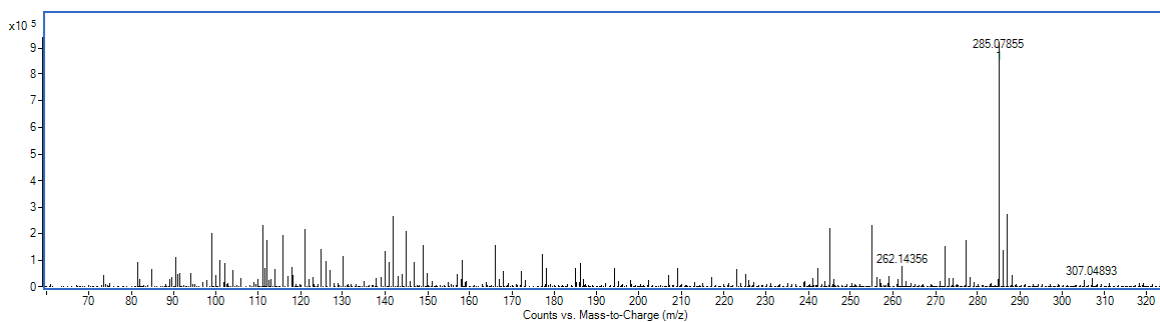
Optimalno razdvajanje dobiveno je uporabom C18 kolone (Slika 8), također pregledom spektra masa nije uočena nikakva razlika u odnosu na standardnu otopinu diazepama (Slika 7).



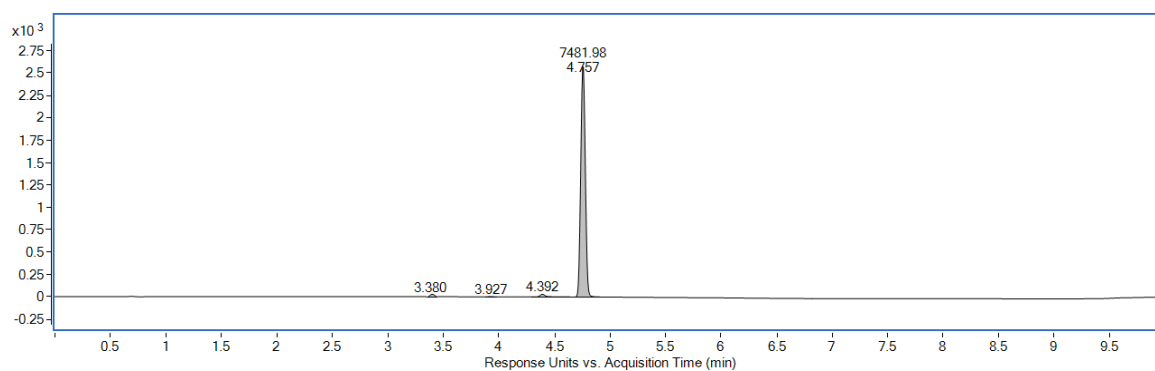
**Slika 5.** Kromatogram diazepama na C8 kromatografskoj koloni



**Slika 6.** Spektar masa diazepama na C8 koloni



**Slika 7.** Spektar masa diazepama standardne otopine



**Slika 8.** Kromatogram diazepama razgrađenog vodikovim peroksidom na C18 kromatografskoj koloni

Na temelju dobivenih rezultata sva daljnja istraživanja provedena su s kromatografskom kolonom Acquity BEH C18 (Waters) dimenzija 100 x 2,1 mm i veličinom zrna punila 1,7  $\mu\text{m}$ .

#### **4.1.2. Utjecaj temperature**

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

#### **4.1.3. Utjecaj aditiva u pokretnu fazu**

Ispitan je utjecaj koncentracije 0,1% otopine amonijaka na kromatografsko razlučivanje. Uočeno je razvlačenje pika u standardnoj otopini. S obzirom na rezultate s 0,1% mravljom kiselinom odlučeno je nastaviti s 0,1% mravljom kiselinom

Na temelju dobivenih rezultata, odabrani su optimalni eksperimentalni uvjeti za kromatografsko određivanje diazepama i onečišćenja primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti vezane s detektorom s nizom dioda koji su prikazani u Tablici 5.

**Tablica 5.** Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje onečišćenja u diazepamu

| <b>Kolona i pakiranje</b>    | <b>WATERS Acquity BEH C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 <math>\mu</math>m</b> |            |            |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| <b>Eluens A</b>              | 0,1% mravlja kiselina                                              |            |            |
| <b>Eluens B</b>              | ACN                                                                |            |            |
| <b>Gradijent</b>             | Vrijeme / min                                                      | % eluens A | % eluens B |
|                              | 0,00                                                               | 80         | 20         |
|                              | 2,00                                                               | 80         | 20         |
|                              | 8,00                                                               | 20         | 80         |
|                              | 8,01                                                               | 20         | 80         |
|                              | 8,01-10,0                                                          | 80         | 20         |
| <b>Vrijeme stabilizacije</b> | 2,00 min                                                           |            |            |
| <b>Volumen injektiranja</b>  | 1 $\mu$ L                                                          |            |            |
| <b>Protok</b>                | 0,5 mL/min                                                         |            |            |
| <b>Detektor</b>              | DAD, 250 nm                                                        |            |            |
| <b>Temperatura kolone</b>    | 50 °C                                                              |            |            |

#### 4.1.4. Specifičnost

Studijama prisilne razgradnje može se potvrditi i selektivnost metode. Selektivnost je sposobnost metode da razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka ili matice uzorka bez interferencija ostalih komponenti sličnog ponašanja [28], 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 threshold*, *match threshold*). Vrijednost *purity angle* i *purity threshold* uzoraka prisilne razgradnje direktno govore o homogenosti samog pika, dok *match angle* i *match threshold* služe za potvrdu identifikacije (Tablica 6). Ukoliko je vrijednost *purity angle* manja od vrijednosti *purity thresholda*, kromatografski pik se smatra spektralno čist [29]. Ukoliko je vrijednost *match angle* veća od vrijednosti *match thresholda*, identifikacija je potvrđena. Dodatno specifičnost metode je potvrđena uporabom spektrometrije masa visoke razlučivosti.

**Tablica 6.** Spektralna čistoća kromatografskog pika diazepama

|                               | <i>Purity Angle</i> | <i>Match Angle</i> | <i>Purity Threshold</i> | <i>Match Threshold</i> | <b>Egzaktna masa</b> |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| Standardna otopina            | 0,233               | 0,453              | 0,149                   | 0,274                  | 285.07878            |
| Razgradnja kiselinom          | 0,231               | 0,335              | 0,123                   | 0,215                  | 285.07878            |
| Razgradnja lužinom            | 0,246               | 0,321              | 0,119                   | 0,229                  | 285.07878            |
| Razgradnja peroksidom         | 0,228               | 0,319              | 0,115                   | 0,246                  | 285.07878            |
| Toplinska razgradnja -krutina | 0,228               | 0,375              | 0,125                   | 0,238                  | 285.07878            |
| Toplinska razgradnja otopina  | 0,219               | 0,342              | 0,118                   | 0,228                  | 285.07878            |
| Foto razgradnja               | 0,225               | 0,343              | 0,109                   | 0,259                  | 285.07878            |

#### **4.1.5. Prisilna razgradnja diazepama**

Prisilna razgradnja provodi se kako bi se utvrdila stabilnost lijeka te identificirali glavni produkti razgradnje. Diazepam 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 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, toplinska te fotolitička razgradnja.

Značajnija razgradnja diazepama uočena je pri svim uvjetima razgradnje. Kod toplinske razgradnje diazepama u otopini uočen je nastanak dva onečišćenja – na retencijama 4,4 min (DP-2) te 5,8 min (DP-3) (Slika 14). Napravljene su MS i MS/MS analize, te su predložene strukture i fragmentacija molekula (Slika 9, Slika 10).

Toplinskom razgradnjom u krutini, uz DP-2 (4,4 min) i DP-3 (5,8 min) nastalo je još jedno onečišćenje na vremenu zadržavanja 3,9 min – DP-1 (Slika 12). Napravljene su MS i MS/MS analize, te su predložene strukture i fragmentacija molekula.

Fotolitičkom razgradnjom, uz DP-1 (3,9 min), DP-2 (4,4 min), DP-3 (5,8 min) nastala su još dodatna dva onečišćenja na vremenima zadržavanja 3,4 min – DP-4 i 5,0 min - DP-5 (Slika 13). Napravljene su MS i MS/MS analize, te su predložene strukture i fragmentacija molekula.

Razgradnjom vodikovim peroksidom, nastala su DP-1 (3,9 min), DP-2 (4,4 min) te DP-4 (3,4 min) (Slika 15).

Razgradnjom u kiselini nastala su onečišćenja DP-1 do DP-5 te onečišćenje na 2,4 min - DP6 (2,4 min) (Slika 16). Napravljene su MS i MS/MS analize, te su predložene strukture i fragmentacija molekula.

Razgradnjom u lužini nastala su onečišćenja DP-2 i DP-3 (Slika 17).

Detektirani su sljedeći razgradni produkti:

DP-1,  $m/z$  246  $[M+H]^+$ ,

DP-2,  $m/z$  301  $[M+H]^+$ ,

DP-3  $m/z$  273  $[M+H]^+$

DP-4  $m/z$  303  $[M+H]^+$

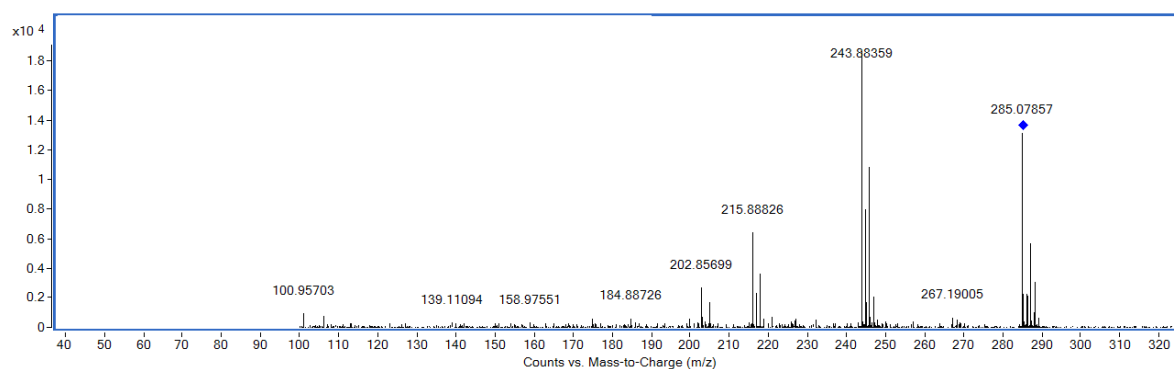
DP-5  $m/z$  289  $[M+H]^+$

DP-6  $m/z$  244  $[M+H]^+$

U Tablici 7 navedena su vremena zadržavanja, uvjeti MS/MS analize koji su dali optimalan odziv  $[M+H]^+$  iona i fragmentnih iona diazepama i razgradnih produkata te glavni fragmenti nepoznatih razgradnih produkata. MS i MS/MS spektri razgradnih produkata nalaze se na Slikama 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 33, 34, a putevi fragmentacije razgradnih produkata prikazani su na Slikama 20, 23, 26, 29, 32, 35, 36.

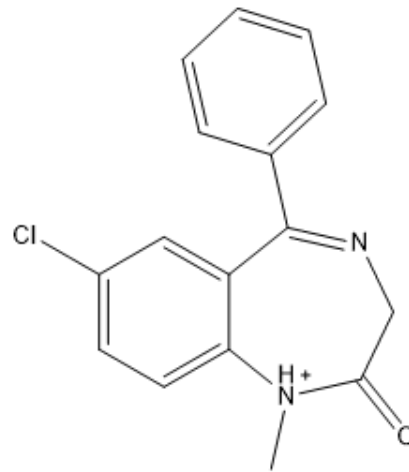
**Tablica 7.** Vremena zadržavanja nepoznatih produkata razgradnje i optimalni uvjeti na MS/MS-u

|                 | Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ , min) | $[M+H]^+$ | Napon fragmentora (V) | Energija sraza (eV) | Fragmentni ioni ( $m/z$ ) |
|-----------------|------------------------------------|-----------|-----------------------|---------------------|---------------------------|
| <b>Diazepam</b> | 4,7                                | 285       | 380                   | 10                  | 244, 216, 202             |
| <b>DP-1</b>     | 3,9                                | 246       | 380                   | 0                   | 228, 194, 158             |
| <b>DP-2</b>     | 4,4                                | 301       | 380                   | 30                  | 272, 255, 213             |
| <b>DP-3</b>     | 5,8                                | 273       | 380                   | 20                  | 253, 230, 223             |
| <b>DP-4</b>     | 3,4                                | 303       | 380                   | 30                  | 248, 194, 58              |
| <b>DP-5</b>     | 5,0                                | 289       | 380                   | 20                  | 245, 209, 185             |
| <b>DP-6</b>     | 2,4                                | 244       | 380                   | 10                  | 210, 196, 184             |

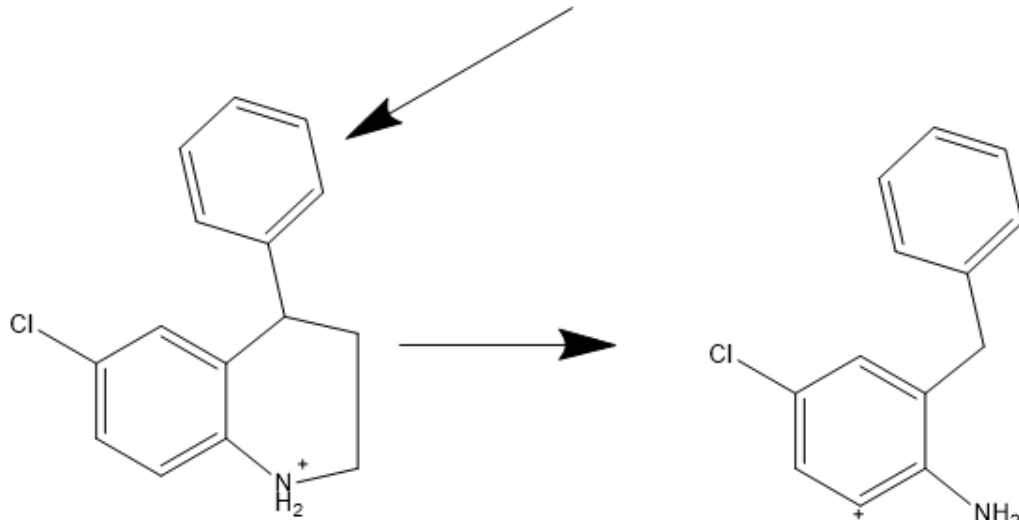


**Slika 9.** MS/MS spektar diazepama



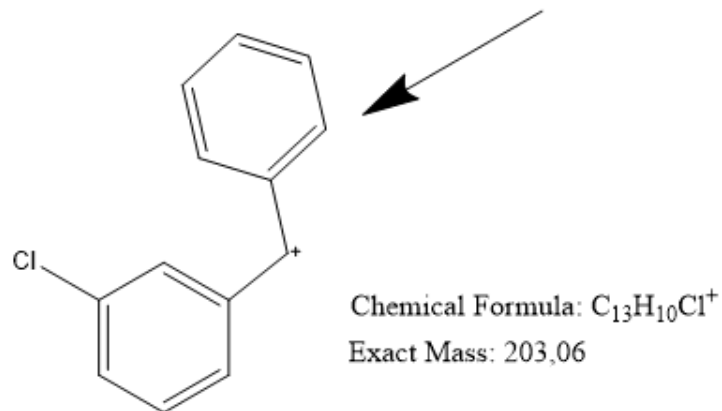


Chemical Formula:  $C_{16}H_{14}ClN_2O^+$   
 Exact Mass: 285,08



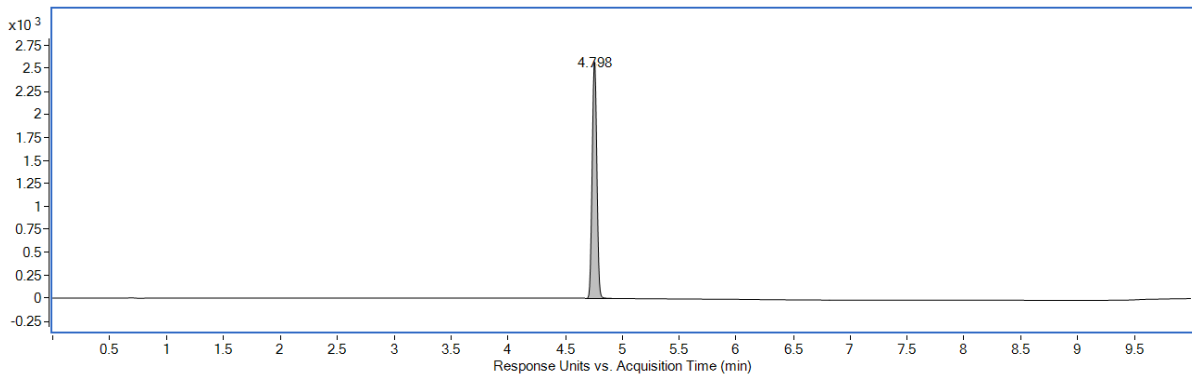
Chemical Formula:  $C_{15}H_{15}ClN^+$   
 Exact Mass: 244,09

Chemical Formula:  $C_{13}H_{11}ClN^+$   
 Exact Mass: 216,06

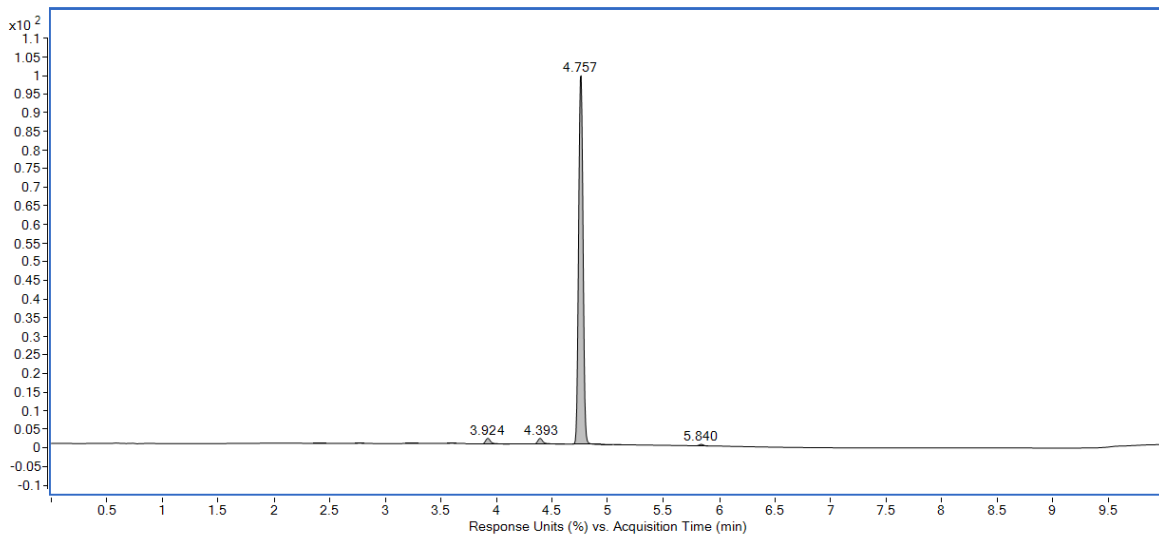


Chemical Formula:  $C_{13}H_{10}Cl^+$   
 Exact Mass: 203,06

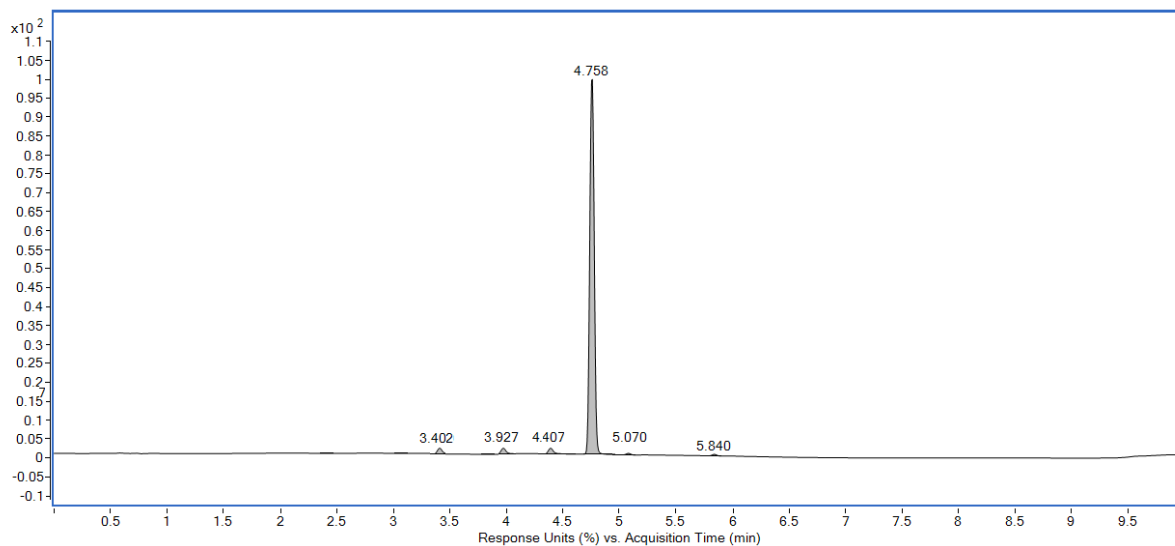
**Slika 10.** Predložena fragmentacija diazepama



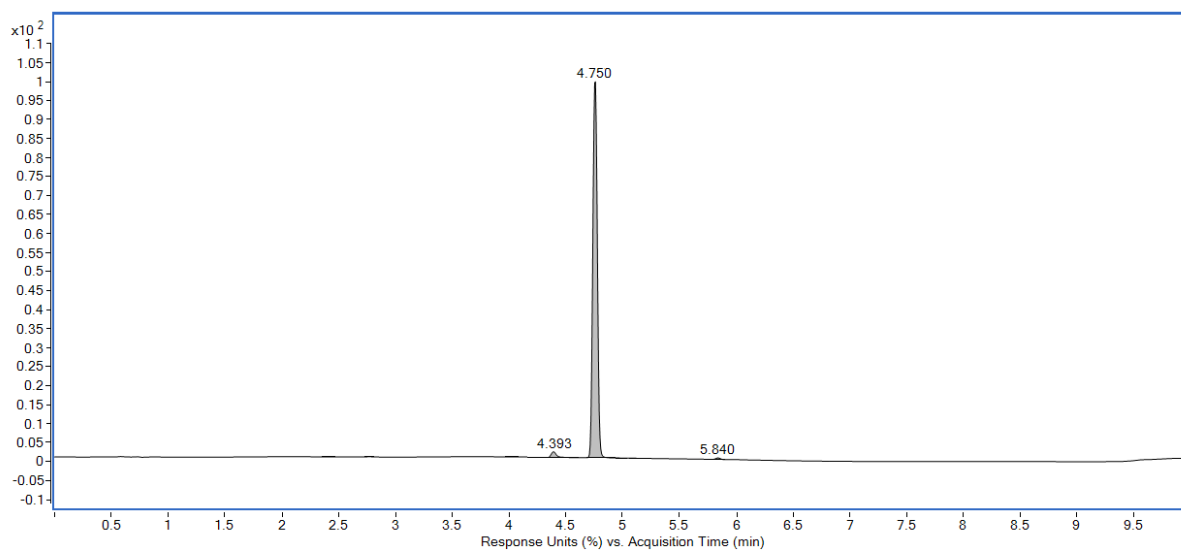
**Slika 11.** Kromatogram ne tretiranog diazepama (konc. 1 mg/mL)



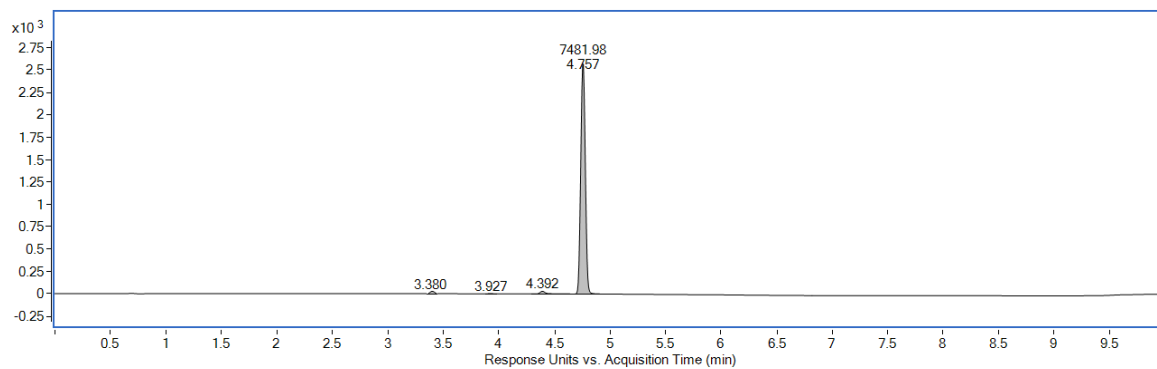
**Slika 12.** Kromatogram diazepama u uvjetima toplinske razgradnje u krutini (konc. 1 mg/mL)



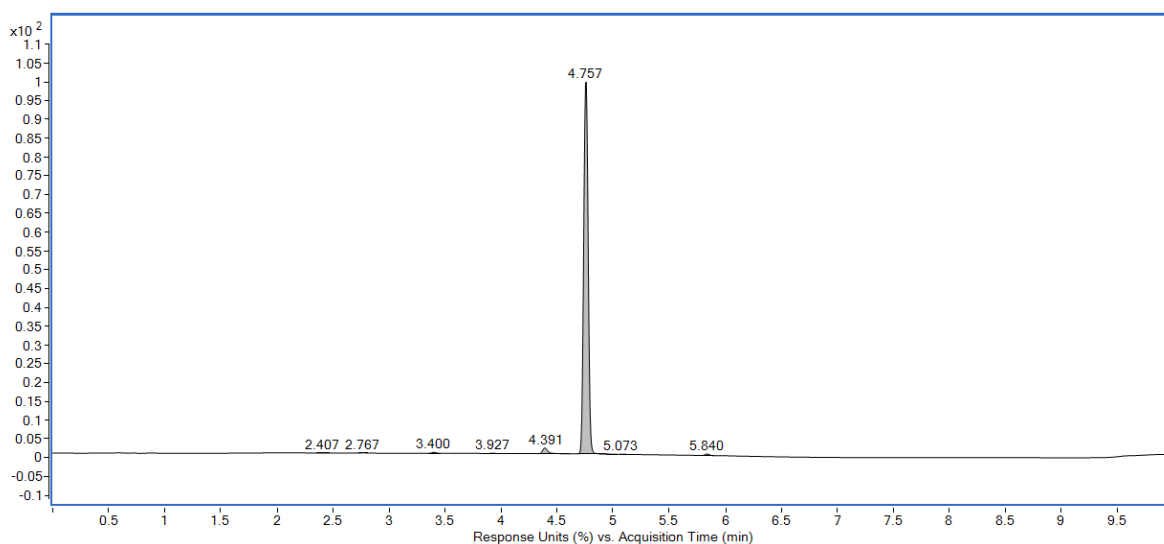
**Slika 13.** Kromatogram diazepama u uvjetima fotolitičke razgradnje u otopini (konc. 1 mg/mL)



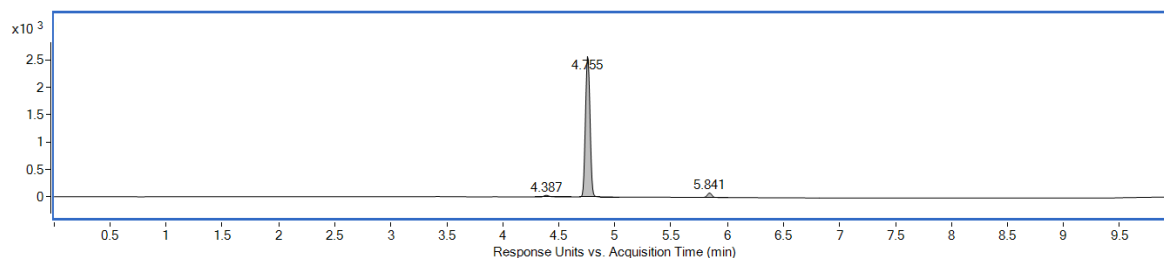
**Slika 14.** Kromatogram diazepama u uvjetima toplinske razgradnje u otopini (konc. 1 mg/mL)



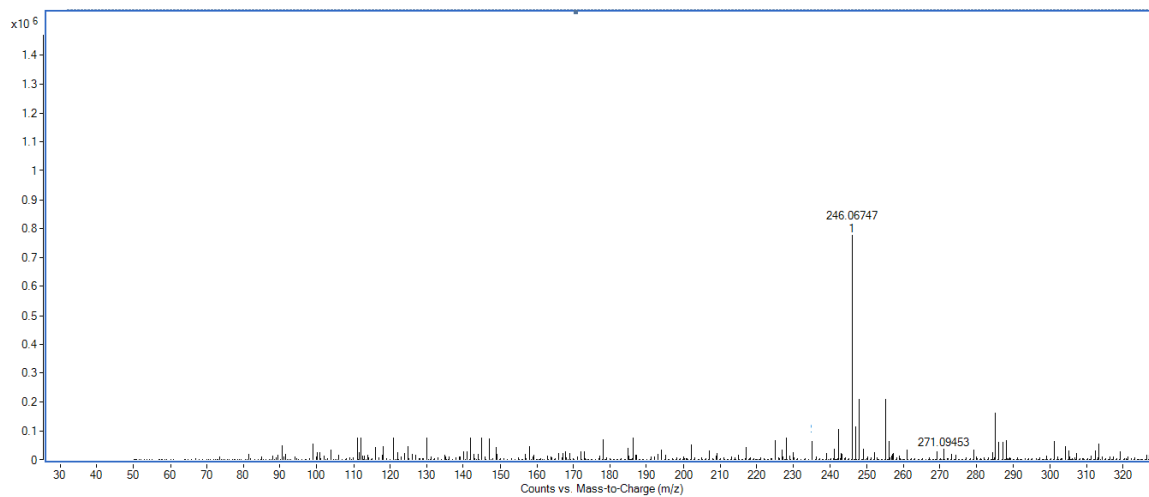
**Slika 15.** Kromatogram diazepama tretiranog s 30% peroksidom



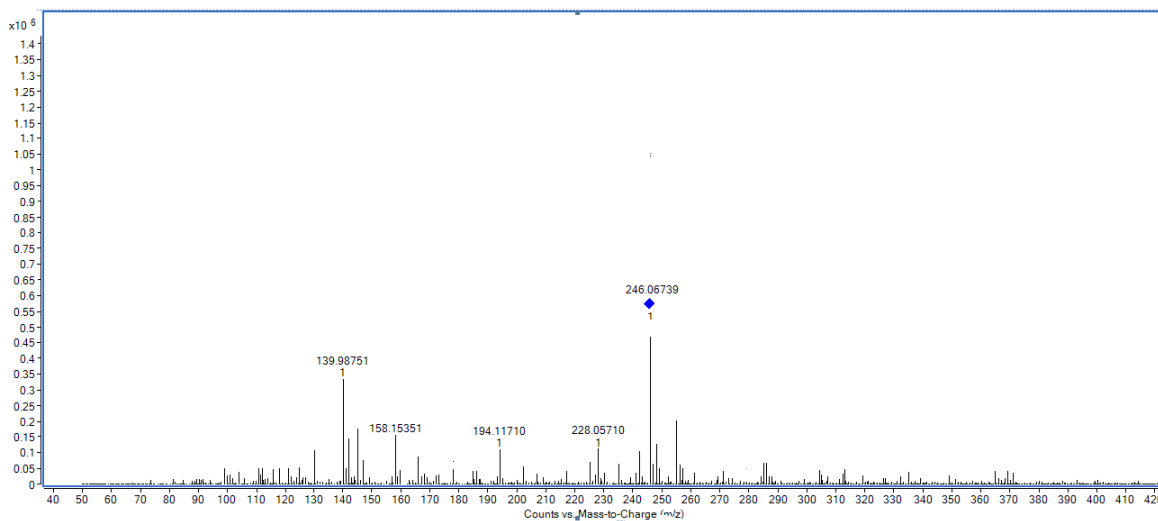
**Slika 16.** Kromatogram diazepama tretiranog s 1 M HCl



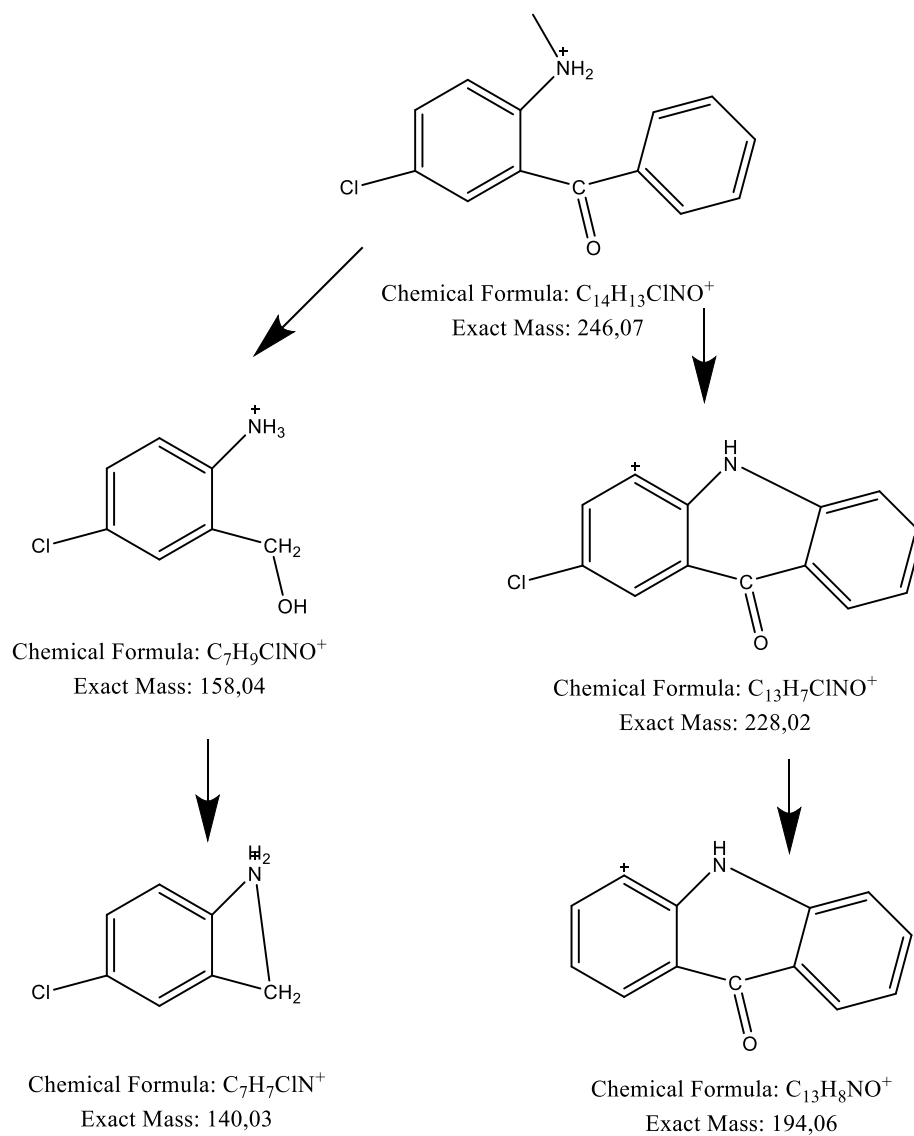
**Slika 17.** Kromatogram diazepama tretiranog s 1 M NaOH



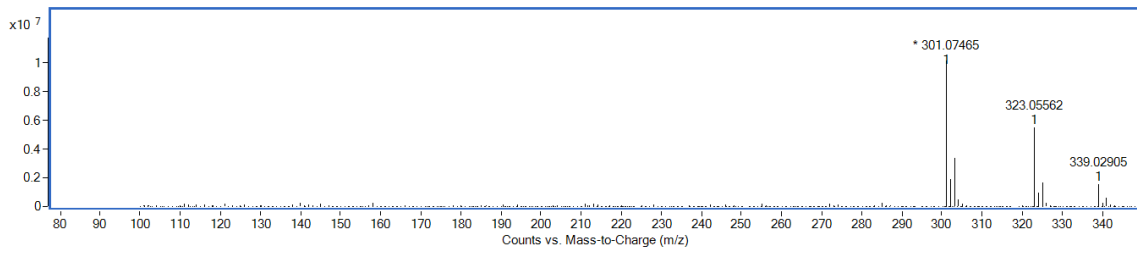
**Slika 18.** Spektar masa DP-1



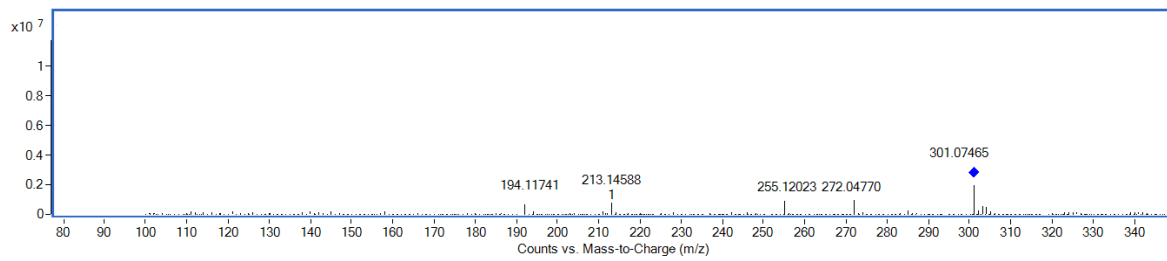
**Slika 19.** MS/MS DP-1



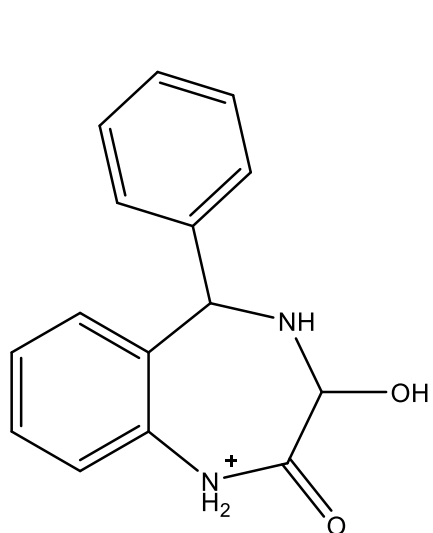
**Slika 20.** Predložena fragmentacija DP-1



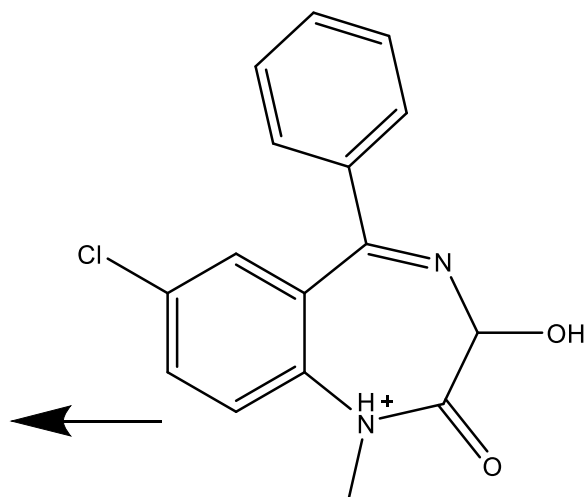
**Slika 21.** Spektar masa DP-2



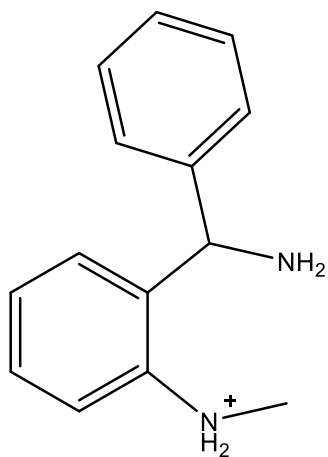
**Slika 21.** MS/MS DP-2



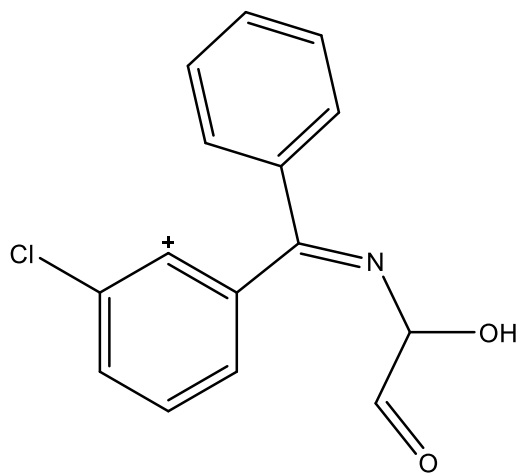
Chemical Formula:  $C_{15}H_{15}N_2O_2^+$   
Exact Mass: 255,11



Chemical Formula:  $C_{16}H_{14}ClN_2O_2^+$   
Exact Mass: 301,07



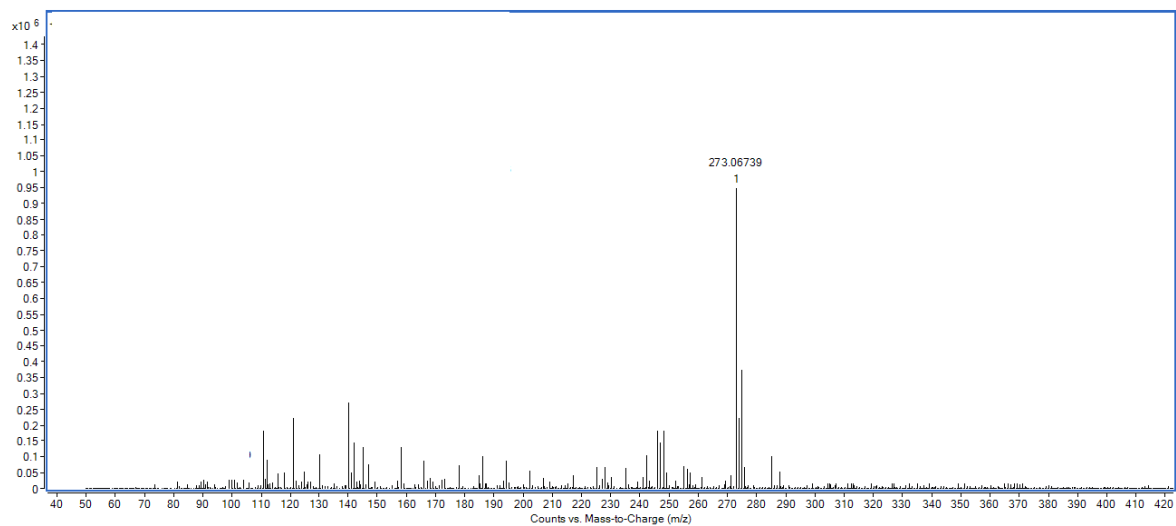
Chemical Formula:  $C_{14}H_{17}N_2^+$   
Exact Mass: 213,14



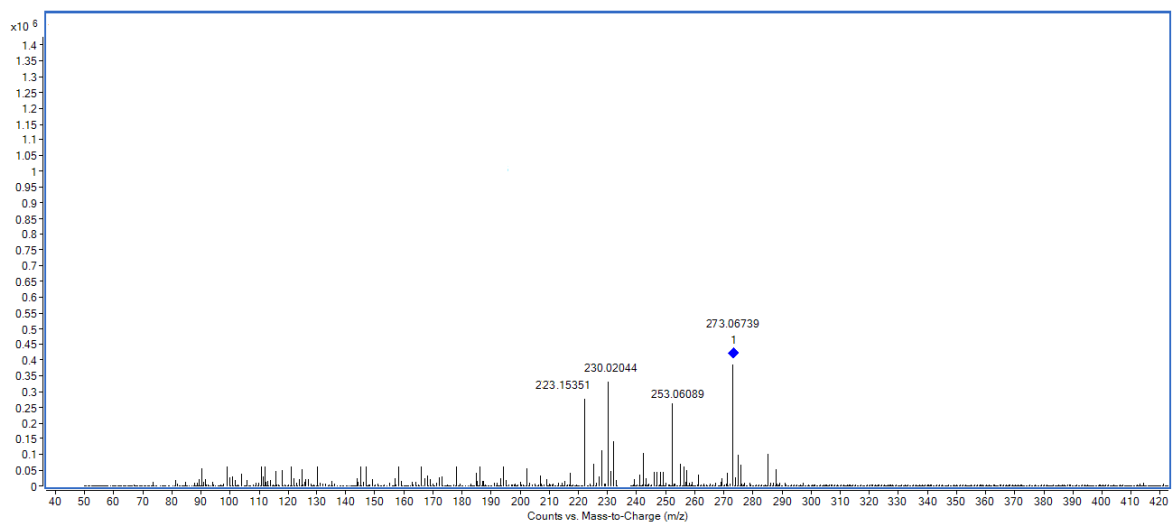
Chemical Formula:  $C_{15}H_{11}ClNO_2^+$   
Exact Mass: 272,05

**Slika 23.** Predložena fragmentacija DP-2

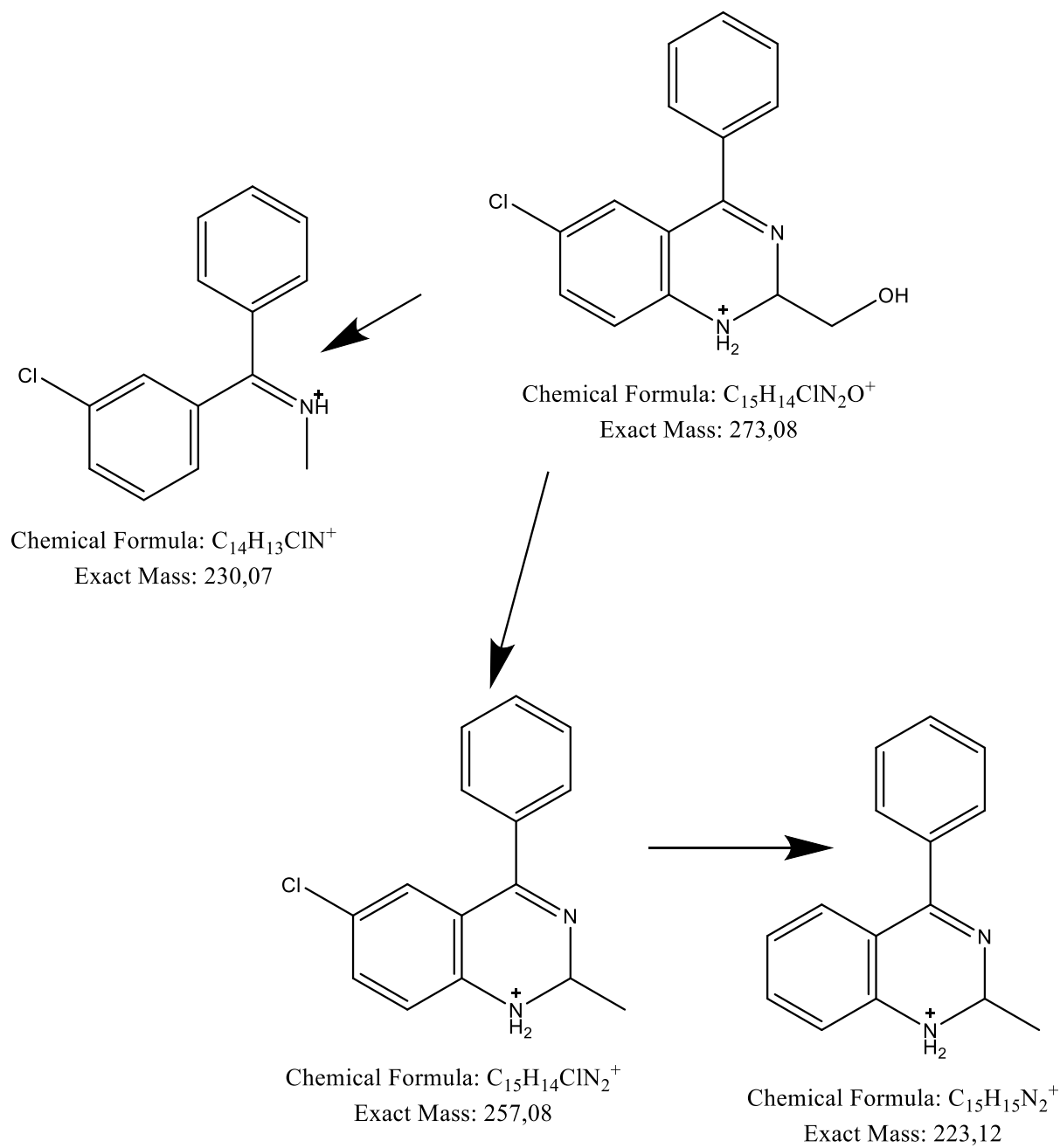




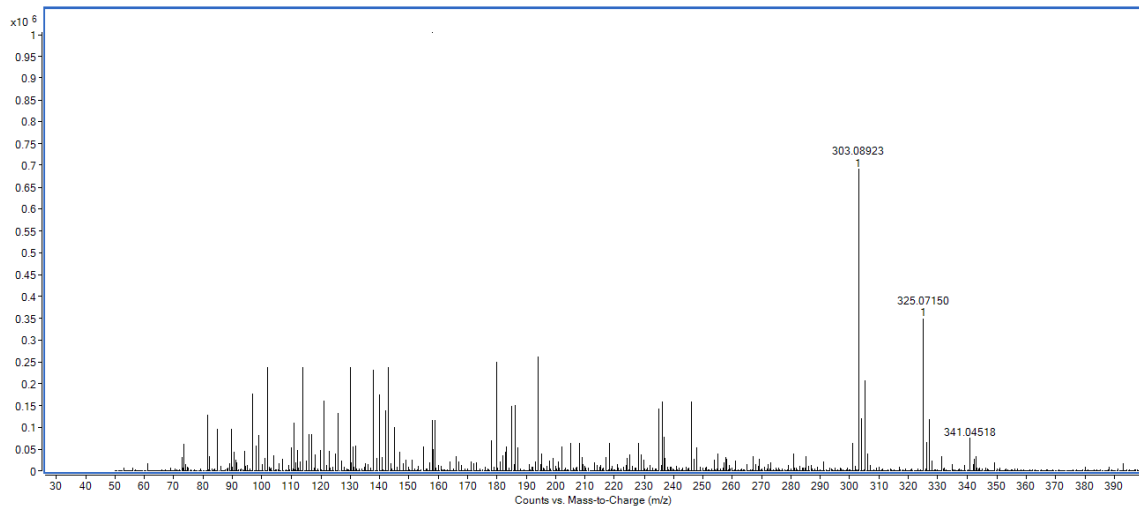
**Slika 24.** Spektar masa DP-3



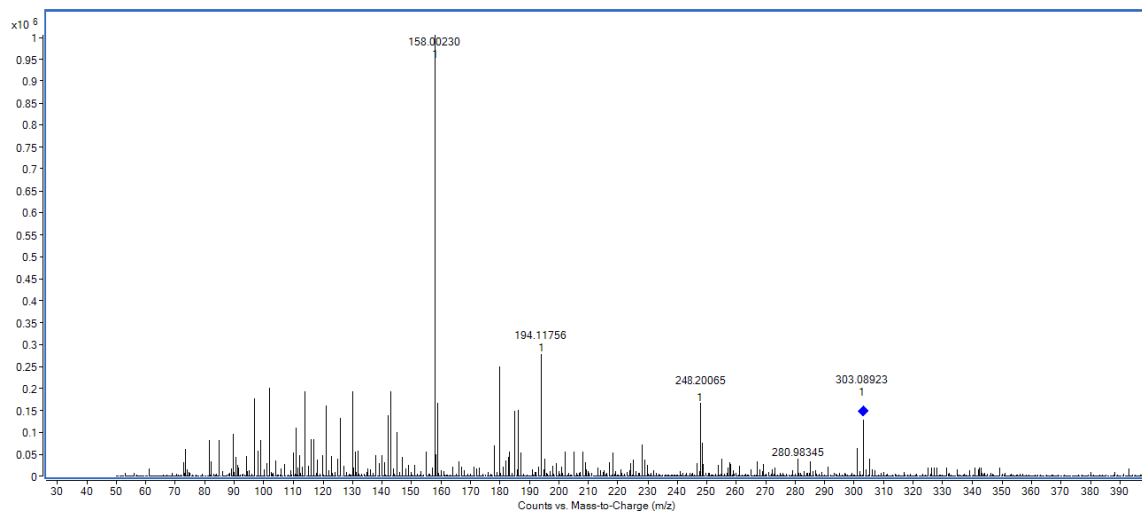
**Slika 25.** MS/MS DP-3



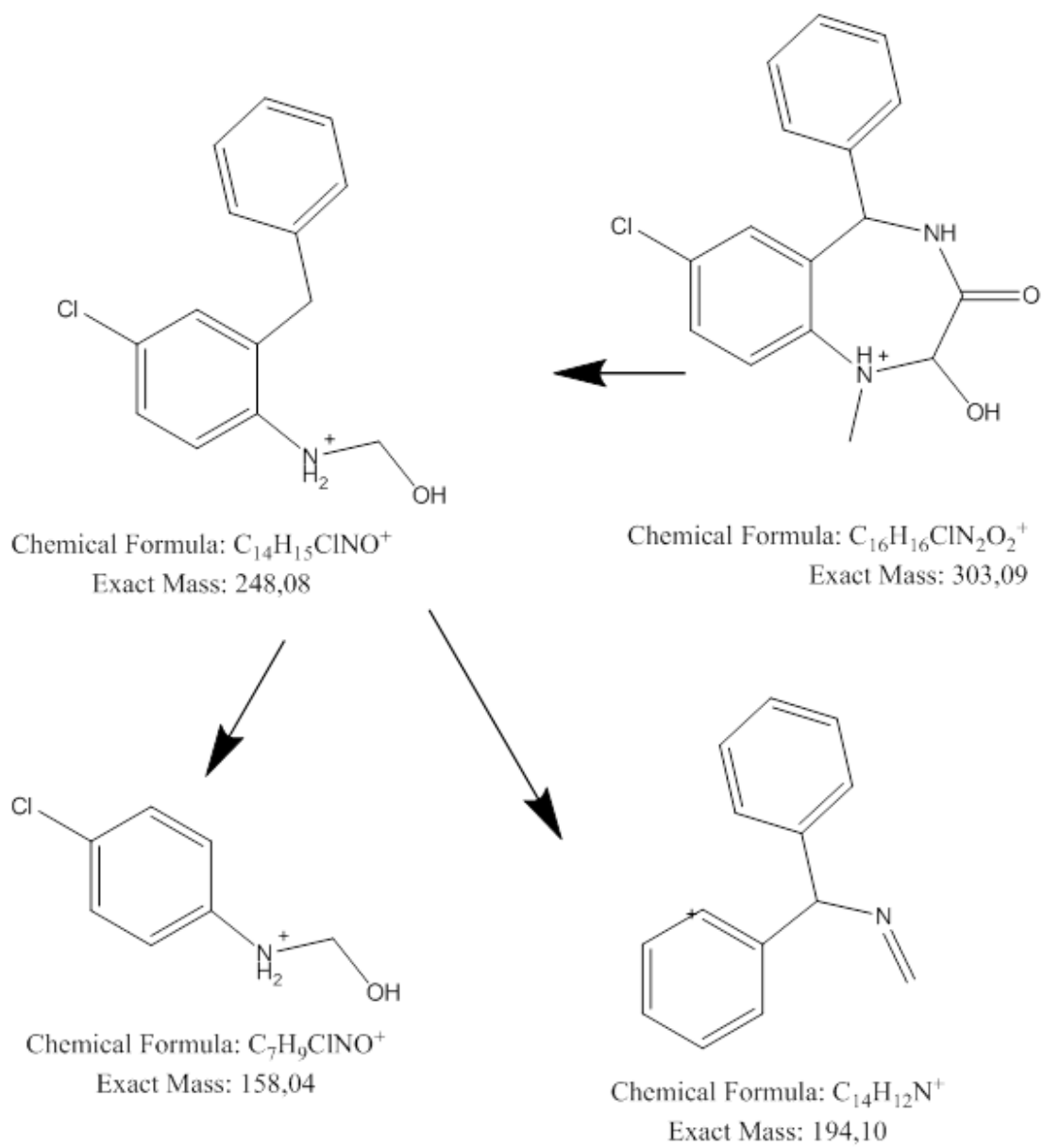
**Slika 26.** Predložena fragmentacija DP 3



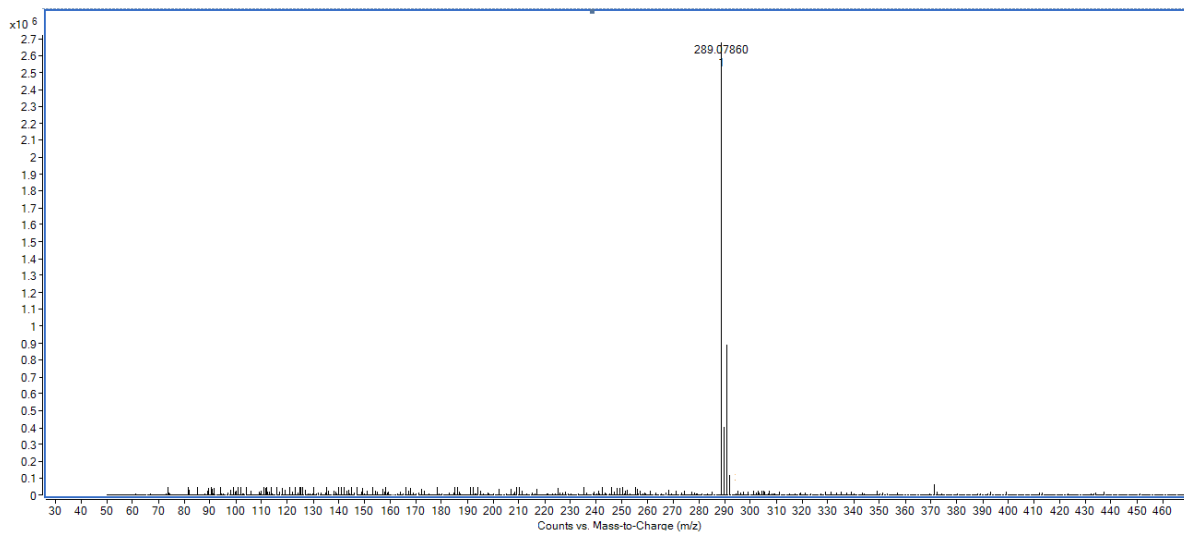
**Slika 27.** Spektar masa DP-4



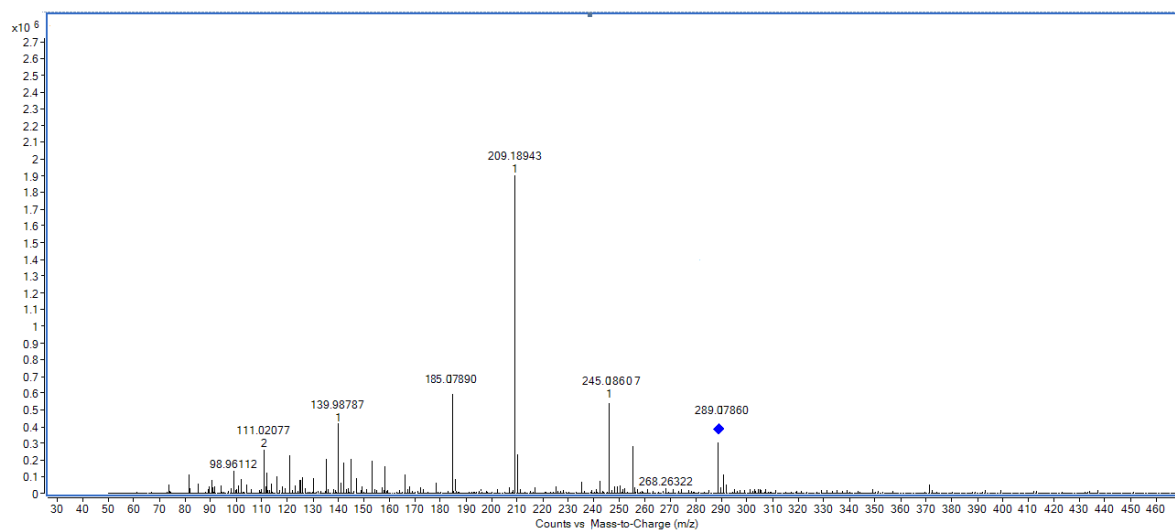
**Slika 28.** MS/MS spektar DP-4



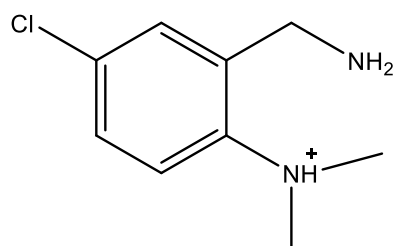
**Slika 29.** Predložena fragmentacija DP 4



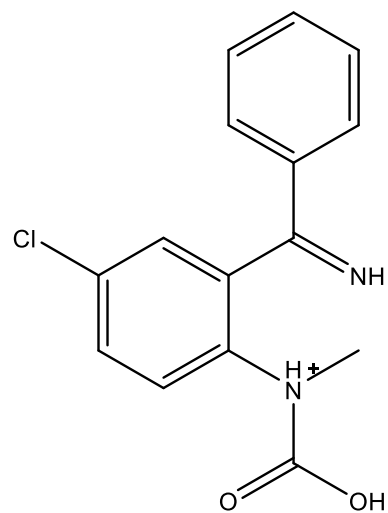
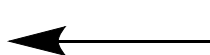
**Slika 30.** Spektar masa DP-5



**Slika 31.** MS/MS spektar DP-5

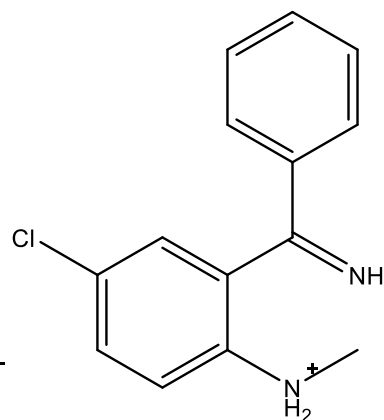
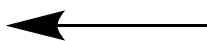
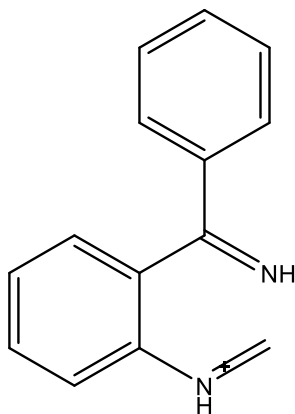


Chemical Formula:  $C_9H_{14}ClN_2^+$   
Exact Mass: 185,08



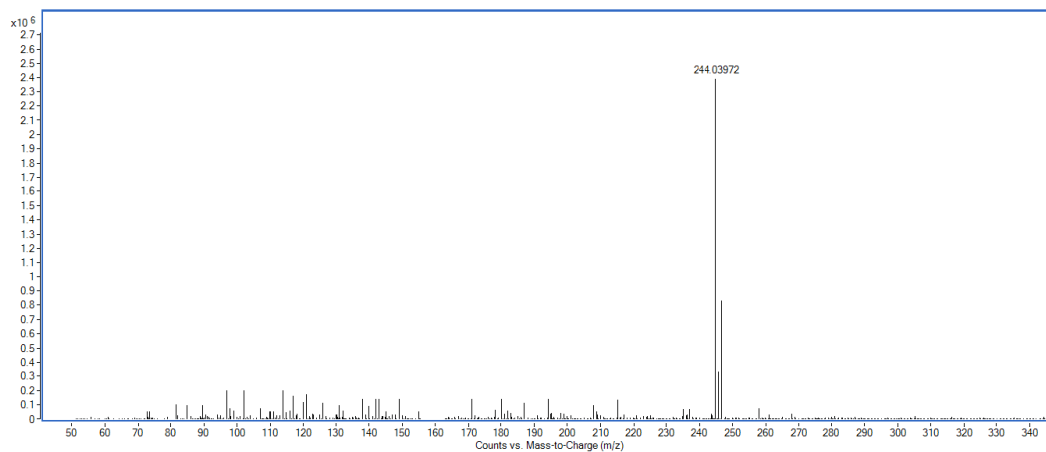
Chemical Formula:  $C_{15}H_{14}ClN_2O_2^+$   
Exact Mass: 289,07

Chemical Formula:  $C_{14}H_{13}N_2^+$   
Exact Mass: 209,11

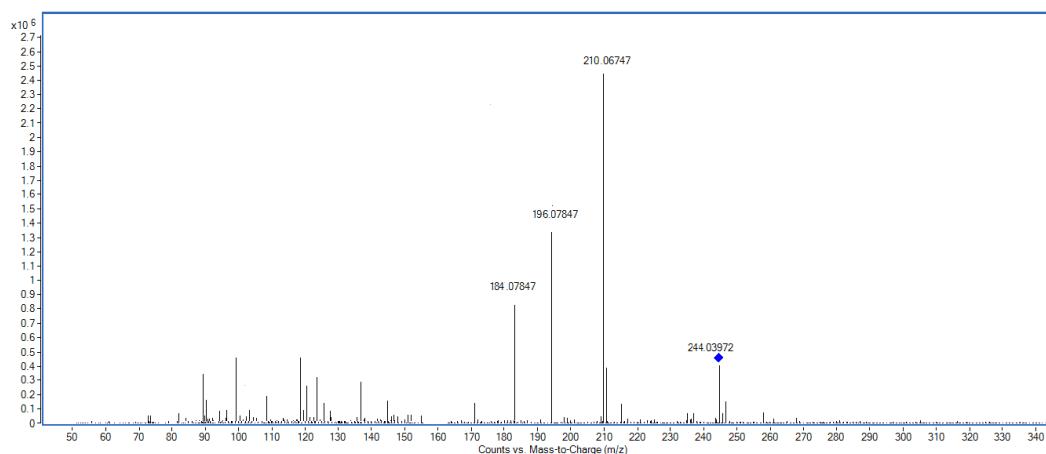


Chemical Formula:  $C_{14}H_{14}ClN_2^+$   
Exact Mass: 245,08

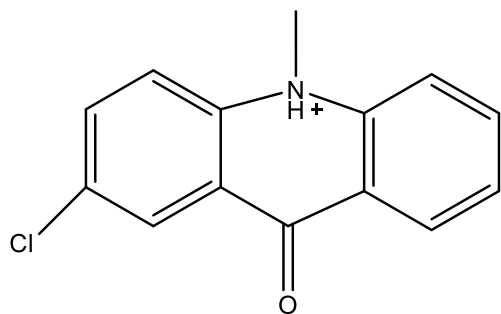
**Slika 32.** Predložena fragmentacija DP 5



**Slika 33.** Spektar masa DP-6

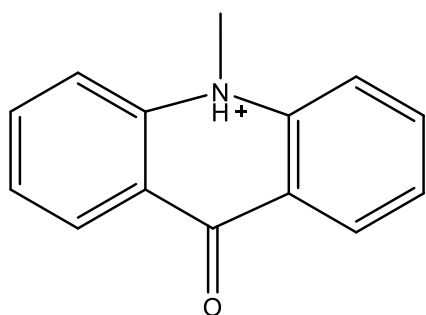


**Slika 34.** MS/MS spektar DP-6



Chemical Formula:  $C_{14}H_{11}ClNO^+$

Exact Mass: 244,05



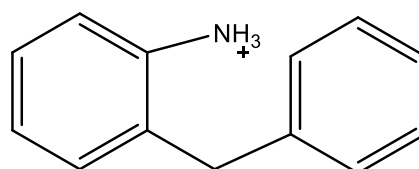
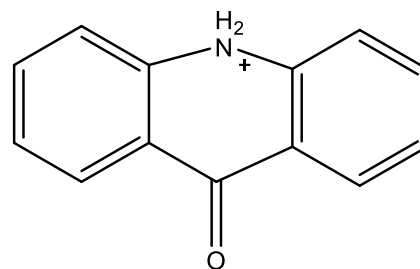
Chemical Formula:  $C_{14}H_{12}NO^+$

Exact Mass: 210,09



Chemical Formula:  $C_{13}H_{10}NO^+$

Exact Mass: 196,08

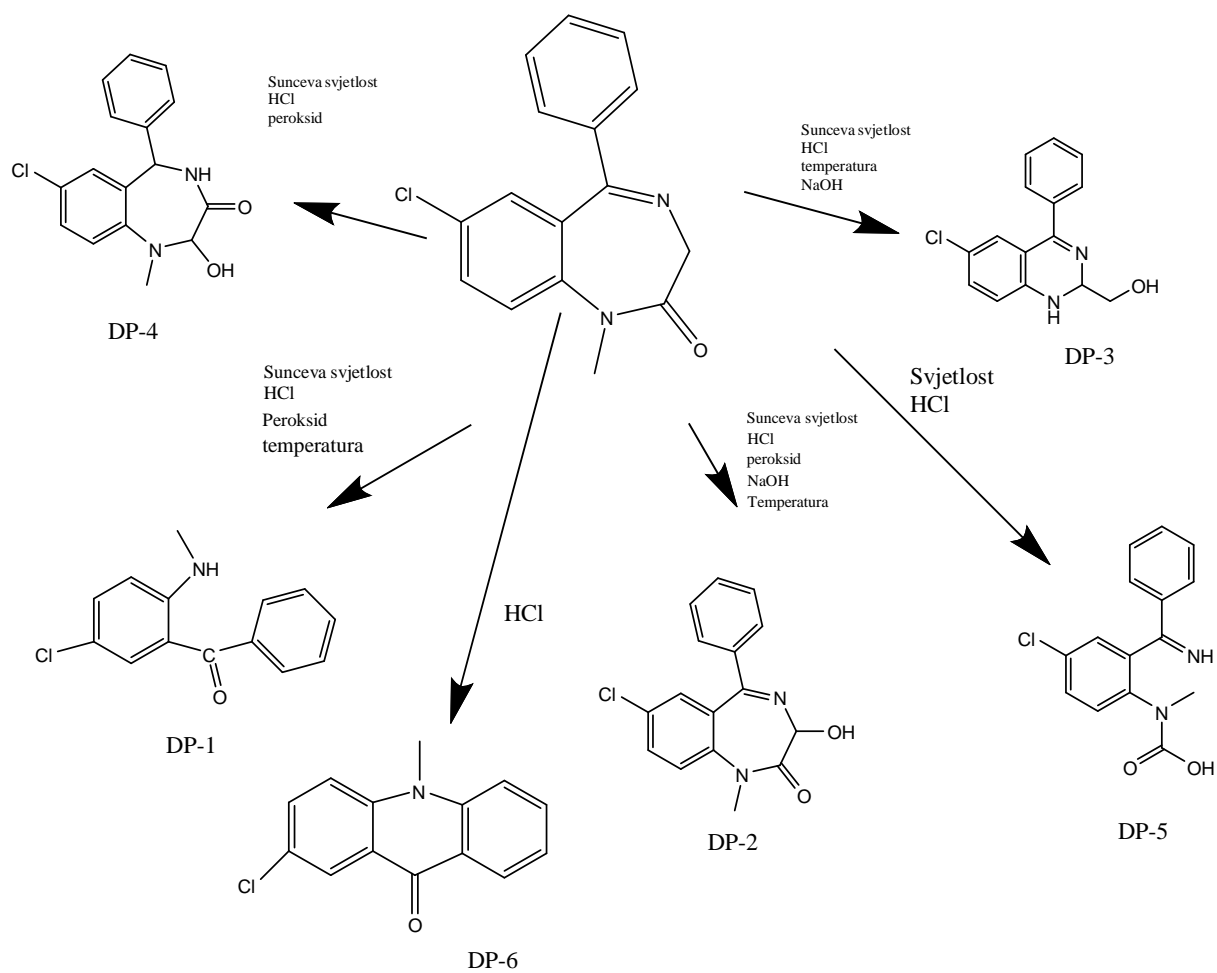


Chemical Formula:  $C_{13}H_{14}N^+$

Exact Mass: 184,11

**Slika 35.** Predložena fragmentacija DP-6





**Slika 36.** Predloženi putevi razgradnje

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je razviti učinkovitu i brzu metodu za određivanje farmaceutika diazepama te njegovih razgradnih produkata. Za analizu razgradnih produkata diazepama korištena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezane s detektorom s nizom dioda (DAD). Korištenjem DryLab računalnog programa odabrani su optimalni eksperimentalni uvjeti za kromatografsko određivanje diazepama i njegovih onečišćenja.

Kako bi se odabranom metodom mogli ispitati razgradni produkti, bilo je potrebno provesti forsiranu razgradnju diazepama. Diazepam 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 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotolitička razgradnja te toplinska razgradnja. Razvijenom UHPLC metodom uspješno su detektirani kromatografski pikovi razgradnih produkata te je dobiveno da se značajnija razgradnja odvija pri svim uvjetima razgradnje. Ipak, najznačajnija razgradnja zamijećena je u kiselim uvjetima, gdje nastaje svih 6 razgradnih produkata diazepama. Razgradni produkt koji se pojavljuje u svim uvjetima razgradnje je DP-2. DP-6 razgradni produkt pojavljuje se samo u kiselim uvjetima, dok u ostalim uvjetima nije prisutan. Također, dobiveno je da utjecajem temperature na forsiranu razgradnju diazepama nastaju tri razgradna produkta, DP-1, DP-2 i DP-3, kao i u uvjetima oksidativne razgradnje gdje nastaju DP-1, DP-2 i DP-4.

Na glavnim razgradnim produktima (DP-1, DP-2, DP-3, DP-4, DP-5, DP-6) 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 energije sudara od 0 eV, 20 eV, 30 eV te 40 eV. Na osnovu fragmentacije i mase nastalih fragmenata pretpostavljene su strukture razgradnih produkata kao i način fragmentacije istih.

Razvijena UHPLC metoda pokazala se učinkovitom i brzom za određivanje farmaceutika diazepama i njegovih razgradnih produkata.

## 6. LITERATURA

- [1] Nigović B., Sertić M., Onečišćenja u lijekovima, Stručni rad, Zavod za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <https://core.ac.uk/download/pdf/132314324.pdf> (pristup lipanj 2018.)
- [2] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diazepam#section=Identification> (pristup lipanj 2018.)
- [3] Mimica N., Folnegović-Šmalc V., Uzun S., Rušinović M., Benzodiazepini: za i protiv, *Medicus* **11** (2) (2002) 183-188.
- [4] Sruthi A., Tejaswi P., Thanuja N., Sudheer Kumar D., Vivek Sagar P., Simple RP-HPLC method for estimation of diazepam in tablet dosage form, *Journal of Pharmacy Research* **6** (2013) 140-144.
- [5] Kalíková K., Riesová M., Chudoba R., Schmid G. Martin, Tesařová E., Separation and Quantification of 1,4-benzodiazepina: HPLC *versus* CZE, *Croatica Chemica Acta* **84** (3) (2011) 367-373.
- [6] Blessy M., Ruchi D. Patel, Prajesh N. Prajapati, Y.K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **4** (3) (2014) 159-165.
- [7] [https://www.particlesciences.com/docs/Forced\\_Degradation\\_Studies-DDT\\_June2010-rd3.pdf](https://www.particlesciences.com/docs/Forced_Degradation_Studies-DDT_June2010-rd3.pdf) (pristup lipanj 2018.)
- [8] Milekić T., Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave lijekovitih supstancija anthelminitika, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
- [9] Iram F., Iram H., Iqbai A., Husain A., Forced Degradation Studies, *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* **3** (6) (2016) 1-5.
- [10] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., *Osnove analitičke kemije*, 6. izd. engl., 1. izd. hrv., Školska knjiga d.d. Zagreb, 1999., str. 645-699.
- [11] Cheriyaedath S.: High performance liquid Chromatography (HPLC), [https://www.news-medical.net/life-sciences/High-Performance-Liquid-Chromatography-\(HPLC\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/High-Performance-Liquid-Chromatography-(HPLC).aspx) (pristup lipanj 2018.)

- [12] Snyder L. R., Kirkland J. J., Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second edition, *J. Wiley & Sons, Inc.* Kanada, 1979., str. 87–166., str. 595.
- [13]  
[https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography) (pristup lipanj 2018.)
- [14] Luterotti S., Uvod u kemijsku analizu, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 3. izdanje, Zagreb, 2009. str. 222-225.
- [15] Horvatić A., Cindrić M., Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa, *Medicina* **45** (3) (2009) 258-263.
- [16] Kaštelan-Macan M., Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, Mentor d.o.o., Zagreb, 2014., str. 97-99.
- [17] Kaštelan-Macan M., Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-235.
- [18] Miao X.-S., Metcalfe C. D., Analysis of neutral and acidic pharmaceuticals by liquid chromatography mass spectrometry, u M. Petrović, D. Barcelo (urednici), *Comprehensive Analytical Chemistry - Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*, Elsevier, Amsterdam, 2007., str. 133–154.
- [19] Cindrić M., Marković A., Horvatić A., Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina* **45** (3) (2009) 218-232.
- [20] Škrinjar T., Karakterizacija nepokretnih faza u kromatografiji reverznih faza ultravisoke djelotvornosti, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, rujanj 2015.
- [21] Taleuzzaman M., Ali S., Gilani S.J., Imam S.S., Hafeez A., Ultra performance liquid chromatography (UPLC)- A review, *Austin Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* **2**(6) (2015), 2-5.
- [22] Mikulčić V., Prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata 2D-LC-MS tehnikom, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2017.
- [23] Demartini D. R., Chapter 2.: A short overview of the components in mass spectrometry instrumentation for proteomics analyses, u Varela Coelho A., de Matos Ferraz Franco C. (urednici), *Tandem Mass Spectrometry*, IntechOpen, Brazil, 2013. str. 39-51.

- [24] <http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html> (pristup lipanj 2018.)
- [25] [https://www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/12\\_AK2\\_MS\\_krom.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/12_AK2_MS_krom.pdf) (pristup lipanj 2018.)
- [26] [http://www.ffh.bg.ac.rs/Dokumenti/doktorske\\_nove\\_fizickohemijske\\_metode/2014-2015/masena\\_spektrometrija\\_-\\_savremeni\\_trendovi.pdf](http://www.ffh.bg.ac.rs/Dokumenti/doktorske_nove_fizickohemijske_metode/2014-2015/masena_spektrometrija_-_savremeni_trendovi.pdf) (pristup lipanj 2018.)
- [27] <https://www.labcompare.com/Mass-Spectrometry/130-Quadrupole-Time-of-Flight-Mass-Spectrometer-QTOF-MS/Compare/?compare=9077305,11129986&catid=130> (pristup lipanj 2018.)
- [28] Vessman J., Stefan I. R., Van Staden F. J., Danzer K., Lindner W., Thorburn B. D., Fajgelj A., Muller H., International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC recommendations 2001: Selectivity in analytical chemistry, *Pure Appl. Chem.*, **73** (8) (2001) 1382-1383.
- [29] Ursić I., Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće nepafenaka, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

## 8. ŽIVOTOPIS



