Prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata 2D-LC-MS tehnikom

Mikulčić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:616907

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Valentina Mikulčić

Prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata 2D-LC-MS tehnikom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Plivi, Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović i suvoditeljstvom Kornelije Lasić, mag. pharm.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Biljani Nigović na ukazanom povjerenju. Zahvaljujem se svojoj komentorici Korneliji Lasić mag. pharm. na trudu i pomoći koje mi je pružila tijekom izrade ovoga rada. Posebno se zahvaljujem gospodinu prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću na danoj prilici izrade diplomskog rada u Plivi. Veliko hvala mojoj obitelji što su mi bili podrška i ohrabrenje tijekom cijelog studiranja. Hvala dragim prijateljima što su bili uz mene.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Torasemid 1
1.2. Onečišćenja u lijekovima 2
1.2.1. Klasifikacija onečišćenja 3
1.3. Prisilna razgradnja lijeka 6
1.3.1. Ispitivanja stabilnosti 7
1.3.2. Prisilna razgradnja 7
1.4. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda 8
1.4.1. Razvoj stabilitetno-indikativne HPLC metode 9
1.4.2. Validacija metode 10
1.5. Masena spektrometrija 10
1.5.1. Ionizacija 11
1.5.2. Ionska separacija 12
1.6. 2D-LC 14
1.6.1. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija 14
1.6.1.1. Skupine dvodimenzionalne tekućinske kromatografije 15
1.6.1.2. Primjena dvodimenzionalne tekućinske kromatografije 16
1.6.1.3. Detekcija u dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji 16
1.7. LC-MS tehnike 16
1.7.1. LC-MS/MS 17
2. OBRAZLOŽENJE TEME 18
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. Materijali 19
3.2. Radni instrumenti 19
3.2.1. HPLC 19
3.2.2. 2D-LC-MS 20
3.2.3. Q-TOF 20
3.3. Metode 20
3.3.1. Priprema otopina uzorka 20
3.3.2. Priprema uzoraka torasemida nakon toplinske razgradnje 21
3.3.3. Priprema otopine pufera za HPLC analizu 21
3.3.4. HPLC analiza 21
3.3.5. 2D-LC analiza 21
3.3.6. MS analiza 22

4. REZULTATI I RASPRAVA 24
4.1. Provjera uvjeta razgradnje pomoću HPLC tehnike 24
4.2. 2D-LC analiza 26
4.2.1. 2D-LC analiza uzorka sušenog 24 sata na 105^0C 26
4.2.2. 2D-LC analiza uzorka grijanog 3 sata na 60^0C 30
4.2.3. 2D-LC analiza uzorka u oksidirajućim uvjetima 32
4.2.4. 2D-LC analiza uzorka nakon kisele hidrolize 37
4.2.5. 2D-LC analiza uzorka nakon bazične hidrolize 41
4.3. MS spektri torasemida i njegovih razgradnih produkata 43
4.3.1. Uzorak sušen 24 sata na 105^0C 43
4.3.2. Uzorak grijan 3 sata na 60^0C 45
4.3.3. Uzorak razgrađivan oksidacijom pomoću H_2O_2 45
4.3.4. Uzorak razgrađivan u kiselim uvjetima pomoću HCl 49
4.3.5. Uzorak razgrađivan u bazičnim uvjetima pomoću NaOH 50
4.4. MS/MS spektri torasemida i njegovih razgradnih produkata 51
4.4.1. Uzorak sušen 24 sata na 105^0C 51
4.4.2. Uzorak razgrađivan oksidacijom pomoću H_2O_2 54
4.4.3. Uzorak razgrađivan u kiselim uvjetima pomoću HCl 62
4.4.4. Uzorak razgrađivan u bazičnim uvjetima pomoću NaOH 64
4.5. Određivanje struktura razgradnih produkata torasemida 65
4.5.1. Toplinska razgradnja torasemida 65
4.5.2. Razgradnja torasemida oksidacijom 67
4.5.3. Razgradnja torasemida u kiselim uvjetima 71
4.5.4. Razgradnja torasemida u bazičnim uvjetima 72
5. ZAKLJUČCI 73
6. LITERATURA 74
7. SAŽETAK/SUMMARY 76
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Torasemid

Hipertenzija je jedan od najznačajnijih čimbenika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Ona je čimbenik rizika koji je moguće modificirati te je potreban odgovarajući pristup liječenju. Osnovni cilj antihipertenzivnog liječenja je smanjenje ukupnog kardiovaskularnog rizika te posljedično morbiditeta i mortaliteta. Oštećenja ciljnih organa koja mogu nastati kao posljedica obuhvaćaju oštećenje srca, mozga, kroničnu bolest bubrega i retinopatiju. Autori nekih studija smatraju da su niskodozirni diuretici lijekovi prvog izbora u bolesnika s nekompliciranom hipertenzijom, a također su važna komponenta kombinirane antihipertenzivne terapije (Vitezić i Francetić, 2007).

Torasemid je lijek koji spada u skupinu diuretika. Zajedno s furosemidom, bumetanidom i etakrinskom kiselinom čini diuretike Henleove petlje. Oni su jedni od najdjelotvornijih diuretika, u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje inhibiraju reapsorpciju NaCl te njihov diuretski učinak nije ograničen razvojem acidoze. Inhibicija reapsorpcije NaCl postignuta je inhibicijom luminalnog Na^+ /K^+ /$2Cl^-$ suprijenosnika. Njegovom inhibicijom smanjena je reapsorpcija NaCl, kao i pozitivni potencijal u lumenu tubula pa je povećano i izlučivanje Mg^{2+} i Ca^{2+}. Diuretski učinak diuretika Henleove petlje povećan je i povišenom ekspresijom ciklooksigenaze COX-2, čiji produkti prostaglandini (PGE_2) inhibiraju transport soli u petlji (Katzung i sur., 2011).

Apsorpcija torasemida nakon peroralne primjene vrlo je brza, bioraspoloživost iznosi oko 90%, a vršna koncentracija lijeka u plazmi postiže se već unutar prvog sata. Metabolizam torasemida uključuje hepatičku biotransformaciju, dok se 25% intravenski primijenjene doze izlučuje nepromijenjeno urinom (Ballester i sur., 2015).

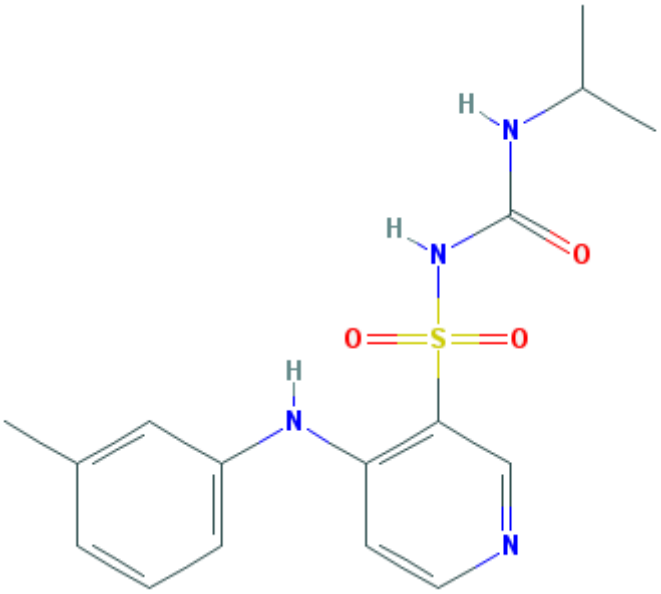
Na tržištu torasemid se nalazi u obliku tableta od 5 i 10 mg, a koristi se kod:
- esencijalne hipertenzije,
- edema zbog kongestivnog srčanog zatajenja,
- edema zbog bolesti jetre ili bubrega, te plućnih edema (www.halmed.hr)

Iako torasemid pokazuje slabiji diuretski učinak nego neki drugi lijekovi iz iste skupine, primjerice furosemid, svejedno može uzrokovati hipokalijemiju. Zato se u terapiju ponekad uvodi i spironolakton, koji je kalij štedeći diuretik. Kombinacija torasemida i spironolaktona

korisna je zbog sinergističkog djelovanja na hipertenziju, a također se smanjuje pretjerani gubitak kalija diurezom (Subramanian i sur., 2014).

Kemijsko ime torasemida je 1-(1-metil)-3-[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il]sulfonil]urea. Molekulska formula je $C_{16}H_{20}N_4O_3S$, a molekularna masa (Mr) iznosi 348,4. Prema izgledu bijeli je do skoro bijeli prah. Praktički je netopljiv u vodi, malo topljiv u 96%-tnom etanolu, umjereno je topljiv u razrijeđenoj otopini hidroksida alkalijskih metala i umjereno topljiv u razrijeđenim kiselinama (Council of Europe, 2013).

Struktura torasemida prikazana je na slici 1.



Slika 1: Struktura torasemida
(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/torsemide#section=Top)

1.2. Onečišćenja u lijekovima

Onečišćenje je bilo koji sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar. Ni jedna tvar nije u potpunosti čista i zato zahtjevi kakvoće definiraju prihvatljive granice za onečišćenja koja se dozvoljavaju u roku trajanja farmaceutskog proizvoda (Nigović, 2015).

Onečišćenja u lijekovima je važno kontrolirati jer utječu na kvalitetu proizvoda, a kontroliraju se u novim ljekovitim tvarima i novim dozirnim oblicima. Mogu imati farmakološka djelovanja, biti toksična i genotoksična, uzrokovati alergije ili na neki drugi način interferirati s djelovanjem aktivne tvari u organizmu (Nigović, 2015).

1.2.1. Klasifikacija onečišćenja

Onečišćenja dijelimo na (ICH, Q3A):

- Organska onečišćenja
- Anorganska onečišćenja
- Ostatna otapala

Organska onečišćenja mogu nastati u proizvodnji i/ili pri skladištenju. Mogu biti identificirana i neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva, a uključuju polazne sirovine, nusprodukte, međuprodukte, razgradne produkte, reagense, ligande i katalizatore. Identificirana onečišćenja, ona koja imaju identificiranu kemijsku strukturu, i neidentificirana onečišćenja, ona koja su definirana isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvom, spadaju u specificirana onečišćenja. To su stvarna onečišćenja koja se nalaze u ispitivanom uzorku. Ovisno o njihovoj količini proizvođač ih treba navesti u izjavi o onečišćenjima, identificirati ili kvalificirati (Nigović, 2015). Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja nalaze se u tablici 1 (ICH Q3A). Osim specificiranih onečišćenja postoje i ostala onečišćenja koja se mogu dokazati. Ona u trenutku izrade monografije nisu detektirana ni u jednom uzorku, ali mogu nastati te su također ograničena ispitivanjima (Nigović, 2015). Organska onečišćenja se mogu mjeriti raznim tehnikama, uključujući one koje uspoređuju analitički odgovor onečišćenja u odnosu na referentni standard ili u odnosu na odgovor same ispitivane tvari. Osim u ljekovitim supstancijama, postoje granice za onečišćenja u dozirnim oblicima. One su prikazane u tablici 2 (ICH Q3B).

Tablica 1: Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja u ljekovitim supstancijama prema ICH smjernicama

Maksimalna dnevna doza	Granica za izvještavanje	Granica za identifikaciju	Granica za kvalifikaciju
≤ 2 g/dan	0,05%	0,10% ili 1,0 mg/dan (ovisno koja granica je niža)	0,15% ili 1,0 mg/dan (ovisno koja granica je niža)
> 2 g/dan	0,03%	0,05%	0,05%

Tablica 2: propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja u dozirnim oblicima prema ICH smjernicama

Granica za izvještavanje	
Maksimalna dnevna doza	Granica
≤ 1 g	0,1%
> 1 g	0,05%
Granica za identifikaciju	
< 1 mg	1,0% ili 5µg ukupnog dnevnog unosa (koje je niže)
1 mg-10 mg	0,5% ili 20 µg ukupnog dnevnog unosa (koje je niže)
> 10 mg- 2 g	0,2% ili 2 µg ukupnog dnevnog unosa (koje je niže)
> 2 g	0,10%
Granica za kvalifikaciju	
< 10 mg	1,0% ili 50 µg ukupnog dnevnog unosa (koje je niže)
10 mg- 100 mg	0,5% ili 200 µg ukupnog dnevnog unosa (koje je niže)
> 100 mg- 2 g	0,2% ili 3 mg ukupnog dnevnog unosa (koje je niže)
> 2 g	0,15%

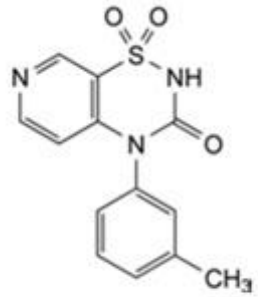
Anorganska onečišćenja potječu iz postupka proizvodnje, većinom su poznata i identificirana, te obuhvaćaju reagense, ligande i katalizatore, teške metale, anorganske soli i druge materijale, npr. drveni ugljen. Ona se detektiraju i identificiraju koristeći farmakopejske ili druge prikladne postupke (ICH, Q3A).

Ostatna otapala su zaostale, hlapljive, organske kemikalije koje se rabe ili nastaju u postupku proizvodnje. Ostatna otapala dijele se u tri skupine. Prva skupina otapala su ona koja treba izbjegavati jer uzrokuju neprihvatljivu toksičnost, kancerogena su i opasna za okoliš. Skupinu dva čine otapala koja treba ograničiti (0,1 mg/dan, koncentracije 10 ppm), ona su također toksična. Treća skupina su otapala male toksičnosti, ograničena na 50 mg/dan, konc. 5000

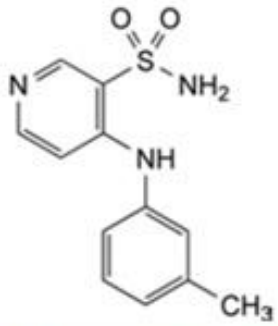
ppm. Propisane granice za ostatna otapala ovise o toksičnosti otapala, načinu primjene i dozama farmaceutske tvari, a nalaze se propisane u ICH smjernicama, poglavlje Q3C. (Nigović, 2015).

Farmakopeja u monografijama propisuje smjernice za kontrolu onečišćenja, koje se nalaze u poglavlju ispitivanja čistoće (engl. *Tests*). Tamo su, ovisno o aktivnoj supstanciji koja se ispituje, navedene metode za analizu srodnih tvari, teških metala, gubitka sušenjem, itd., a na kraju monografije nalaze se strukture specificiranih onečišćenja.

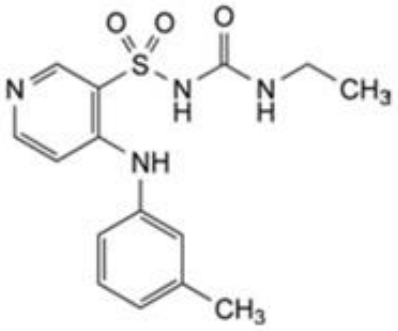
Strukture specificiranih onečišćenja torasemida nalaze se na slici 2.



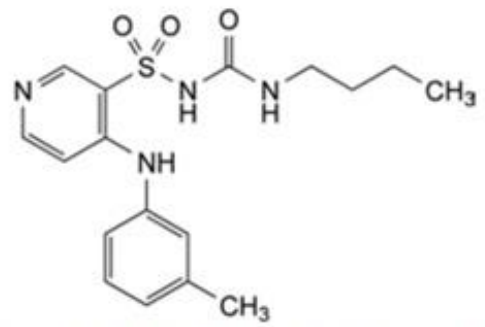
A. 4-(3-metilfenil)-2H-pirido-[4,3-e]-1,2,4-tiadizin-3(4H)-on 1,1-dioksid



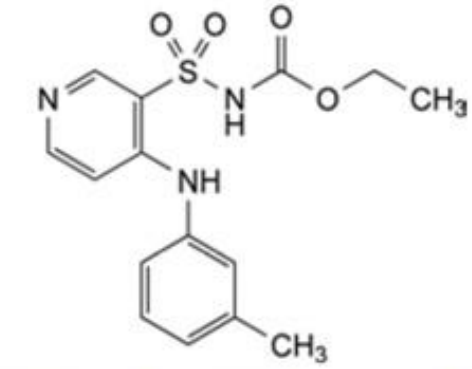
B. 4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-sulfonamid



C. 1-etil-3-[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il] sulfonil]urea



D. 1-butil-3-[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il] sulfonil]urea



E. etil[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il] sulfonil]karbamat

Slika 2: Specificirana onečišćenja torasemida (Council of Europe, 2013)

1.3. Prisilna razgradnja lijeka

Prisilna razgradnja lijeka opisana je u različitim međunarodnim smjernicama. Međunarodni odbor za usklađivanje tehničkim zahtjevima za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu (eng. *International Committee for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) objavio je skup smjernica koje su prihvaćene od strane Američkih, Europskih i Japanskih regulatornih tijela (Hicks, 2012).

ICH smjernice koje su primjenjive na studije ispitivanja stabilnosti su:

- ICH Q1A - Ispitivanje stabilnosti nove ljekovite tvari i novog ljekovitog oblika
- ICH Q1B - Ispitivanje fotostabilnosti nove ljekovite tvari i novog ljekovitog oblika
- ICH Q1C - Ispitivanje stabilnosti novog dozirnog oblika
- ICH Q1D - *Bracketing and Matrixing Designs* za ispitivanje stabilnosti nove ljekovite tvari i novog ljekovitog oblika
- ICH Q1E - Procjena podataka o stabilnosti

- ICH Q1F - Paket podataka o stabilnosti za prijavu registracije u klimatskim zonama III i IV

Prisilnu razgradnju lijeka vršimo u sklopu ispitivanja stabilnosti (Hicks, 2012).

1.3.1. Ispitivanja stabilnosti

Svrha ispitivanja stabilnosti je sakupiti dokaze o tome kako kvaliteta ljekovite tvari i ljekovitog oblika variraju s vremenom pod utjecajem raznih okolišnih faktora kao što su toplina, vlažnost i svjetlost, te da bi se ustvrdio period retestiranja ljekovite tvari ili odredio rok valjanosti ljekovitog oblika i uvjeti skladištenja (ICH Q1A).

Period retestiranja je period nakon kojega bi trebalo provjeriti da li farmaceutska aktivna tvar odgovara zahtjevima specifikacije te da li je prikladna za korištenje pri oblikovanju gotovog ljekovitog oblika. Rok valjanosti je vrijeme unutar kojega farmaceutska aktivna tvar i gotovi ljekoviti oblik odgovaraju zahtjevima specifikacije ukoliko su pohranjeni pod zadanim uvjetima (ICH Q1A).

Izbor uvjeta ispitivanja ovisi o klimatskim uvjetima i zato je svijet podijeljen u 4 klimatske zone. Ispitivanja stabilnosti vrše se na ljekovitoj tvari i na ljekovitom obliku. Informacije o stabilnosti ljekovite tvari sastavni su dio sustavnog pristupa procjeni stabilnosti. Studija stabilnosti ljekovitog oblika bazira se na znanjima o ponašanju i svojstvima ljekovite tvari te iskustvima iz kliničkih formulacijskih studija (ICH Q1A).

1.3.2. Prisilna razgradnja

Ispitivanja prisilne razgradnje ljekovite tvari pomažu prepoznati moguće razgradne produkte, što može zauzvrat pomoći identificirati puteve razgradnje, unutarnju stabilnost molekule i provjeriti korištene stabilitetno-indikativne analitičke metode. Prisilna razgradnja provodi se na čvrstoj tvari i otopini, a obuhvaća utjecaj temperature, vlage, oksidirajućih tvari, svjetla i hidrolizu u širokom rasponu pH vrijednosti, kiselom odnosno bazičnom mediju otopine ili suspenzije. U takvim ispitivanjima potrebno je koristiti stabilitetno-indikativne metode, a pažnju treba posebno usmjeriti na one parametre koji bi mogli dovesti do promjene kvalitete, sigurnosti ili djelotvornosti lijeka (ICH Q1A).

Neke tvari se teško otapaju u vodi pa je potrebno u tim slučajevima koristiti organska otapala. Kako u ICH smjernicama nije striktno navedeno da se prisilna razgradnja treba odvijati na otopinama, to dozvoljava upotrebu suspenzija. Međutim, kod suspenzija postoji tendencija

sporije razgradnje nego kod otopina i često je potrebna analiza sadržaja cijelog vijala kako bi se smanjila pogreška povezana s poduzorkovanjem suspenzija. Upotreba organskih otapala smanjuje ove probleme, ali treba biti na oprezu jer može doći do povećane ili smanjene razgradnje, reakcije otapala s analitom ili pojave pikova organskog otapala u kromatogramu. Najupotrebljivanija otapala u tu svrhu su acetonitril i dimetilsulfoksid (Hicks,2012).

Priroda uvjeta prisilne razgradnje ovisi o samoj ljekovitoj tvari i o tipu ljekovitog pripravka. U ranoj fazi razvoja molekule, dok se o molekuli ne zna mnogo, koristi se set standardnih uvjeta. Ukoliko postoje rane studije stabilnosti, uvjeti se prilagođavaju poznatim činjenicama: ako se zna da je molekula nestabilna pri višem pH, može se skratiti vrijeme studije ili raspad provesti pri nižoj temperaturi (Hicks, 2012).

Uvjeti prisilne razgradnje kojima je uzorak izložen trebaju biti pažljivo odabrani kako ne bi došlo do nedovoljne ili pretjerane razgradnje. Ako se primjene preblagi uvjeti, neki razgradni produkti neće nastati i neki razgradni putevi neće biti otkriveni pa se izabranom metodom neće moći pratiti svi razgradni produkti. Prevelikim stresom pak nastaju nerealni razgradni produkti pa metoda može biti neprikladna za praćenje realnih produkata. Zato uvjete treba odabrati tako da razgradnja bude umjerena (Hicks, 2012).

Željeni razgradni produkti primarni su razgradni produkti, jer je najvjerojatnije da će oni nastati pod stvarnim uvjetima prisilne razgradnje. Ako se uzorak analizira u više vremenskih točaka, može se uočiti ukoliko dođe do nastanka sekundarnih razgradnih produkata. U tom slučaju pikovi primarnih produkata se smanjuju, a novi pikovi sekundarnih produkata nastaju (Hicks, 2012).

HPLC u kombinaciji s masenom spektrometrijom može pružiti vrijedne informacije o strukturnim promjenama koje nastaju kao rezultat razgradnje, što može pomoći u tumačenju puteva razgradnje (Hicks, 2012).

1.4. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda

Prema pravilima dobre proizvođačke prakse, svaki lijek prije puštanja u promet mora biti ispitan stabilitetno-indikativnom metodom (Sarkate i sur., 2015).

Stabilitetno-indikativna HPLC metoda validirana je i selektivna analitička metoda koja može točno kvantitativno odrediti ispitivanu aktivnu farmaceutsku supstanciju i njezina onečišćenja, odnosno razgradne produkte. Koristi se pri ispitivanjima prisilne razgradnje, gdje je aktivna

farmaceutska tvar podvrgnuta različitim uvjetima pri kojima dolazi do razgradnje. Prati se postotak razgradnje supstancije i nastalih razgradnih produkata. Radi sigurnosti da je došlo do odvajanja svih sastojaka radi se provjera čistoće kromatografskog pika tako da se tijekom njegove eluacije snimaju UV-spektri koji se trebaju poklapati duž cijelog pika. Ukoliko se poklapaju, tada je osigurano da nema interferencija. Takva metoda može se koristiti i za analizu multikomponentnih ljekovitih oblika, no tada treba podesiti mnogo parametara kako bi se točno razdvojile sve djelatne supstancije iz oblika i svi njihovi razgradni produkti (Nigović, 2015).

Pri prisilnoj razgradnji može doći do nastanka više razgradnih produkata nego što će ih realno nastati, ali tako se smanjuje rizik nedetektiranja nekog analita. Ako je prisilna razgradnja pravilno izvedena, metoda se može smatrati stabilitetno-indikativnom. U takvim slučajevima, odsutnost nekog produkta označava stabilnost tvari pri tim korištenim uvjetima (Hicks, 2012).

1.4.1. Razvoj stabilitetno-indikativne HPLC metode

U razvitku stabilitetno-indikativne metode važan je izbor reagenasa, kromatografskih uvjeta, mobilne faze te pravilna izrada standardnih otopina i otopina analita. Uzorak se podvrgava razgradnji pod različitim uvjetima: temperatura, svjetlo, kisela i bazična hidroliza i oksidacija, s ciljem da se razvije stabilitetno-indikativna HPLC metoda za određivanje sadržaja lijeka. Za kiselu hidrolizu koristi se HCl, za bazičnu NaOH, dok se za oksidativne uvjete koristi H_2O_2. Termalna degradacija provodi se pri povišenoj temperaturi, a fotodegradacija pod UV svjetlom (Sarkate i sur, 2015).

Da bi metoda bila stabilitetno-indikativna, mora biti selektivna za ispitivani analit, odnosno mora biti sposobna odijeliti ga od ostalih prisutnih tvari u uzorku: degradacijskih produkata, matriksa, itd. To se provjerava analiziranjem analita u uzorku nakon prisilne razgradnje. Mora biti potvrđena čistoća svih pikova, jer je primarni cilj postići zadovoljavajuće razlučivanje analita i njegovih razgradnih produkata. Da bi se postiglo odvajanje analita, koriste se razne kombinacije stacionarnih faza, npr. C-18, i mobilnih faza, npr. acetonitril i voda u volumnom omjeru 60:40. Provjeravaju se simetrija pika i vremena zadržavanja analita. Ako su svi pikovi dovoljno odijeljeni, metoda se smatra specifičnom i validira se prema ICH smjernicama. (Nigović, 2015).

1.4.2. Validacija metode

Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu. Svaki prijedlog za usvajanje nove ili prerađene analitičke metode zahtijeva dovoljno laboratorijskih podataka kojima se dokumentira valjanost metode. Analitički parametri koji se određuju pri validaciji su specifičnost odnosno selektivnost, linearnost i koncentracijsko područje, točnost, preciznost, granica dokazivanja, granica određivanja i izdržljivost. Specifičnost kao parametar objašnjena je u prethodnom odjeljku. Linearnost je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Određuje se mjerenjem 3 do 6 određivanja na najmanje 5 koncentracija te koeficijent korelacije za regresijski pravac mora biti veći od 0,999. Točnost pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Određuje se mjerenjem 3 uzorka poznate koncentracije za najmanje 3 koncentracije u radnom području metode. Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Provjerava se određivanjem 5 do 6 mjerenja na 2 ili 3 različite koncentracije, a izražava se kao standarnda devijacija (SD), relativna standardna devijacija (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Preciznost se iskazuje kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Granica dokazivanja je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati, a granica određivanja najniža koncentracija analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode (Nigović, 2015).

1.5. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je spektrometrija čije se načelo rada zasniva na stvaranju ioniziranih molekula i molekulskih fragmenata koji nastaju u vakuumu ili neposredno prije ulaska molekule u visoki vakuum. Ionizirane molekule moraju biti u plinovitoj fazi, a upotrebom električnog ili magnetskog polja razdvajaju se prema njihovoj masi. Tako se masena spektrometrija može podijeliti na ionizaciju i ionsku separaciju (Watson 2012).

U farmaceutskoj industriji masena spektrometrija ima značajnu primjenu. Koristi se za određivanje strukture i potvrdu identiteta ljekovitih tvari, određivanje relativnih molekulskih masa. Može se kombinirati s kromatografskim metodama kao što su plinska i tekućinska kromatografija za karakterizaciju onečišćenja u ljekovitim i pomoćnim tvarima, za određivanje lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i tkivima te u proteomici kao dio peptidnog mapiranja. To je najbolja metoda za identifikaciju i strukturnu

karakterizaciju tragova onečišćenja u kombinaciji s kromatografskim odjeljivanjem. Jedino ograničenje metode je skup instrument koji zahtijeva posebno obrazovanog stručnjaka (Nigović, 2015).

1.5.1. Ionizacija

Postoji više načina ionizacije molekula od kojih su značajne: ionizacija djelovanjem snopa elektrona (EI), kemijska ionizacija (CI), kemijska ionizacija kod atmosferskog tlaka (APCI), elektrosprej ionizacija (ESI) i matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desoprcijom (MALDI) (Nigović, 2015).

Elekstrosprej ionizacija (ESI)

Elektrosprej ionizacija danas je najčešće korištena metoda ionizacije zbog kompatibilnosti s tekućinskom kromatografijom. Do ionizacije dolazi prolaskom uzorka kroz kapilaru čiji kraj je na visokom potencijalu. Ovisno da li je korišten pozitivan ili negativan potencijal nastaju pozitivni ili negativni ioni. Uzorak se raspršuje pri atmosferskom tlaku, a otapalo se otklanja strujom dušika čime nastaju ioni analita. Mogu nastati i ioni aduktora, zbog prisutnosti kontaminanata iz mobilne faze. Nastali ioni odlaze u vakuum masenog spektrometra (Nigović, 2015).

Kemijska ionizacija kod atmosferskog tlaka (APCI)

Ionizacija se odvija pri atmosferskom tlaku. Analit prolazi kroz grijanu HPLC kapilaru te se djelovanjem temperature i struje dušika raspršuje. Kroz aerosol se provodi električni napon koji stvara ione mobilne faze koji ioniziraju analit (Nigović, 2015).

Ionizacija djelovanjem snopa elektrona (EI)

Uzorak se grije i prelazi u plinovitu fazu te se bombardira elektronima zbog čega nastaju visoko aktivirani molekulski ioni koji su uvijek pozitivni. Korišteni elektroni su visokoenergetski pa dolazi do pucanja veza u analitu i snažne fragmentacije molekula. Ioni mogu izgubiti samo jedan radikal i više neutralnih fragmenata (Watson, 2012).

Matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI)

Da bi se ionizacija mogla vršiti laserskom desorpcijom, analit mora biti otopljen u otopini matriksa s kojom nakon otparavanja otapala kristalizira. Na tako pripremljeni uzorak direktno se dovodi pulsna laserska zraka i dolazi do ionizacije, nastaju ioni matriksa i ioni analita.

Prednost ove tehnike je analiza spojeva visoke molekulske mase, a nedostatak to što je ograničena na korištenje TOF analizatora (Nigović, 2015).

Kemijska ionizacija (CI)

U kemijskoj ionizaciji snopom elektrona ionizira se inertni plin čiji ioni potiču kemijsku ionizaciju uzorka. Mogu nastati pozitivni ili negativni ioni, a pošto molekula prima manje energije, fragmentiranje je znatno manje nego kod ionizacije snopom elektrona (Nigović, 2015).

1.5.2. Ionska separacija

Separacija iona provodi se u vakuumu djelovanjem električnog ili magnetnog polja prema njihovoj masi. Postoji nekoliko analizatora za izdvajanje iona.

Magnetski analizator

U magnetski analizator ioni dolaze ubrzani u električnom polju te s određenom električnom energijom dolaze u magnetsko polje. Pri prolazu kroz magnetsko polje ioni dobivaju otklon koji ovisi o njihovoj masi. Ioni veće mase imaju manji otklon, a ioni manje mase veći. Varirajući magnetsko i električno polje, uvjete u analizatoru možemo prilagoditi tako da samo određeni ioni mogu biti detektirani (Watson, 2012).

Kvadropolni analizator masa

Korištenjem dva ortogonalna elektrostatska polja pod pravim kutevima, stvara se rezonantna frekvencija s kojom rezoniraju ioni određenog omjera mase i naboja. Ti ioni imaju stabilnu putanju i dođu do detektora, dok ostali ne rezoniraju i nemaju stabilnu putanju te ne mogu doći do detektora (Watson, 2012).

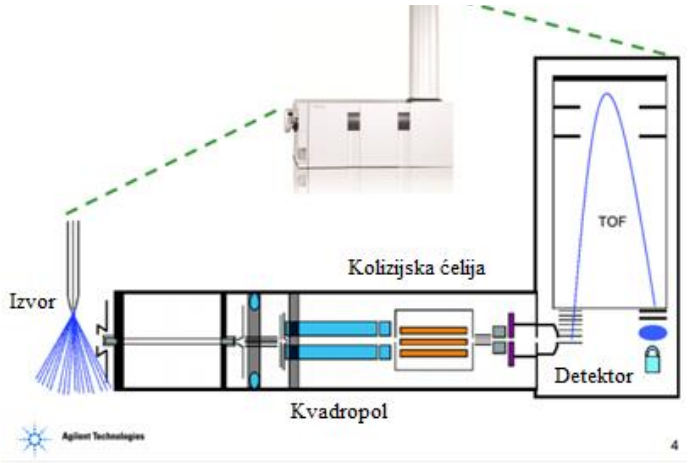
Analizator vremena leta (TOF)

Načelo rada analizatora vremena leta je razlika u putovanju malih i velikih molekula. Velike molekule putuju sporije, dok male putuju brže i prije dođu do detektora. Ioni su ubrzani u električnom polju do velikih brzina te se puste da slobodno putuju u praznoj cijevi. U cijevi se također nalazi i reflektron, ionsko ogledalo, koji odbija ione i šalje ih u suprotnom smjeru čime im se produžuje put koji prolaze do detektora. Time je dodatno povećana rezolucija instrumenta (Watson, 2012).

QTOF

QTOF je uređaj koji ima dva masena analizatora, kvadropol i analizatora vremena leta. Može se snimati maseni spektar, MS, ili MS/MS. U sprej komori dolazi do nastanka aerosola, ionizacije te odvajanja otapala. Ioni ulaze u kapilaru koja ih vodi u regiju visokog vakuuma. Kako izlaze iz kapilare ubrzavaju i putuju prema kvadropolu kroz oktopol, gdje se odvajaju neutralne specije. U MS/MS načinu, u kvadropolu se izdvoji molekularni ion, u kolizijskoj ćeliji nastaju fragmenti te u TOF-u se mjeri točna masa fragmentiranih iona (Agilent Tehnologies, 2015).

Slika 3 prikazuje Q-TOF.



Slika 3: Q-TOF (Agilent Tehnologies, 2015)

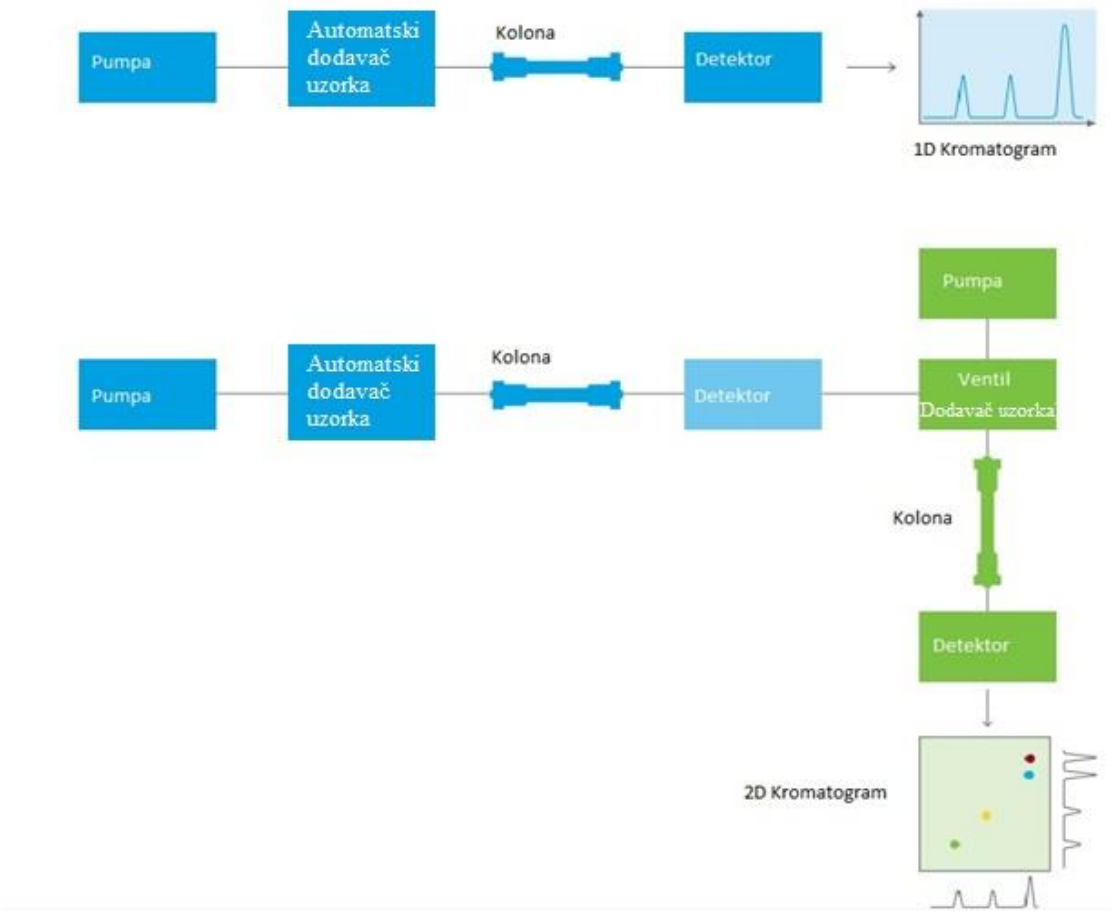
Ionska stupica analizator

Kružna elektroda stvara elektromagnetsko polje u kojem ostaju zarobljeni ioni. Oni osciliraju u centru stupice, gdje se nalazi helij koji utišava njihovu energiju. Korištenjem jednosmjerne struje stvara se puls električnog polja koji će izbiti ione iz stupice. Stupica se može namjestiti tako da u njoj ostanu samo ioni od interesa (Watson, 2012).

1.6. 2D-LC

1.6.1. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija značajan je napredak u tekućinskim kromatografijama, onima koje uključuju jednodimenzionalnu izokratnu i gradijentnu eluaciju (Carr i Stoll, 2015).



Slika 4: Usporedba jednodimenzionalne i dvodimenzionalne kromatografije (Carr i Stoll, 2015)

Usporedba jednodimenzionalne i dvodimenzionalne tekućinske kromatografije prikazana je na slici 4. Na prvoj koloni provodi se uobičajena separacija. Ona može biti izokratna ili gradijentna. Alikvoti koji eluiraju s prve kolone zatim odlaze u drugu dimenziju na drugu kolonu koja mora imati drugačiju separacijsku selektivnost u usporedbi s prvom kolonom, ako se želi dobiti stvarni utjecaj na ukupnu kromatografsku razlučivost. Odnosno, kolona druge dimenzije i njezin pripadajući detektor ponašaju se kao osjetljivi sustav za analizu eluenta s prve dimenzije. S obzirom na to da kolona druge dimenzije ima drugačiju selektivnost, velika

je mogućnost da se pikovi, koji se nakon prolaza kroz prvu kolonu djelomično ili u potpunosti preklapaju, razdvoje prolazom kroz drugu dimenziju. Isto tako omogućeno je vidjeti male pikove koji se nalaze u repu glavnog pika (Carr i Stoll, 2015).

Mogu biti povezane dvije kolone s različitim mehanizmima odjeljivanja, npr. obrnuto fazna kromatografija i ionska kromatografija. Većinom je obrnuto fazna kromatografija korištena u drugoj dimenziji zbog dostupnosti visoko kvalitetnih kolona i kompatibilnosti s masenom spektrometrijom. Kombinacija obrnuto fazne kromatografije u obje dimenzije je vrlo moćna tehnika koja je robusna zbog kompatibilnosti otapala (Carr i Stoll, 2015).

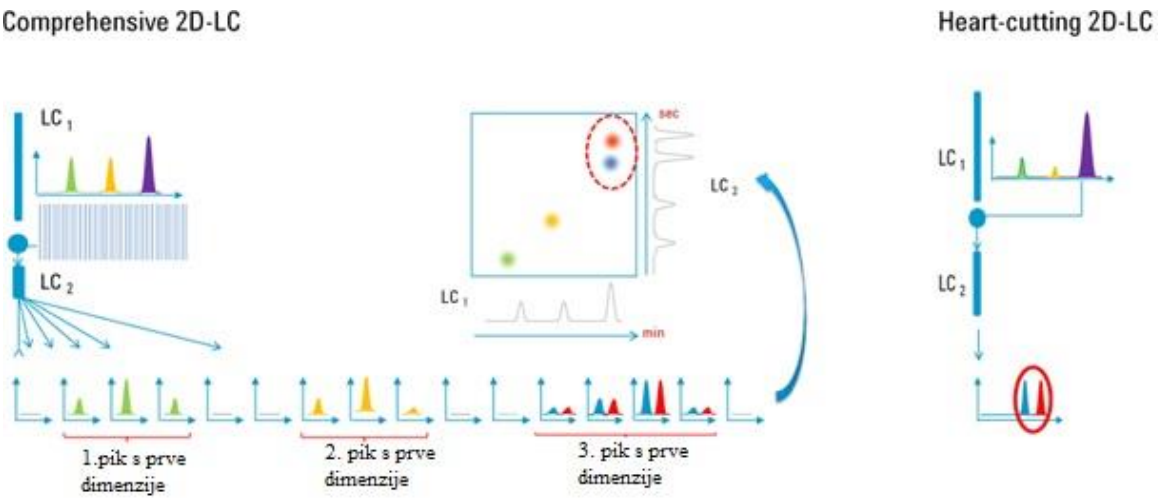
Najveća prednost dvodimenzionalne kromatografije iznimno je povećanje rezolucijske moći bez velikog produljivanja vremena analize. Ni jedna konvencionalna 1D-LC metoda nema toliku moć razlučivanja u tako kratkom vremenu, bez obzira na to koliko male bile čestice kolone ili koliko velik tlak je korišten (Carr i Stoll, 2015).

1.6.1.1. Skupine dvodimenzionalne tekućinske kromatografije

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija može se podijeliti u dvije glavne skupine: *comprehensive* dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju, koja se označava LCxLC, i *heart-cutting* kromatografiju, označena s LC-LC. U LCxLC, eluiranjem s prve kolone struja eluenta prelazi na kolonu druge dimenzije, dok u LC-LC kromatografiji samo odabrani pikovi prelaze u drugu dimenziju. Može se uhvatiti cijeli pik, ili samo alikvot na početku, sredini ili kraju pika, ovisno o potrebi. *Heart-cutting* 2D-LC korisna je u analizi uzoraka koji nisu previše složeni, a sadržavaju sastavnice vrlo sličnih retencijskih osobina. Kao podskupina postoji i *multiple heart-cutting* (mLC-LC) u kojoj postoji više petlja koje skupljaju alikvote pikova, čime je spriječeno moguće preklapanje u drugoj dimenziji, u slučaju kada dolazi do eluiranja pika s prve kolone, a prethodni pik još uvijek prolazi drugu kolonu (Carr i Stoll, 2015).

Sustav iz *comprehensive* 2D-LC skuplja alikvote pikova iz prve dimenzije tri do četiri puta. Vrijeme početka analize alikvota na drugoj dimenziji poklapa se s vremenom eluacije s prve dimenzije te na kraju softver rekonstruira pikove, a za kvantitativno određivanje računa volumene pikova iz 3D-kromatograma (http://www.agilent.com).

Usporedba *comprehensive* dvodimenzionalne tekućinske kromatografije i *heart-cutting* tekućinske kromatografije prikazana je na slici 5.



Slika 5: Usporedba *comprehensive* dvodimenzionalne tekućinske kromatografije i *heart-cutting* tekućinske kromatografije (http://www.agilent.com)

1.6.1.2. Primjena dvodimenzionalne tekućinske kromatografije

2D-LC našla je svoju primjenu u analizi vrlo složenih prirodnih uzoraka: biološke stanice, krv, urin, okolišni uzorci, hrana, zatim sintetskih polimera, posebno kopolimera. Također se koristi u analizi biomarkera, proteomici i metabolomici, gdje se promjene u koncentraciji proteina i malih molekula koriste kao indikatori rane faze bolesti (Carr i Stoll, 2015).

Kada se koristi u kombinaciji s masenom spektrometrijom, 2D-LC može pružiti širok raspon kvalitativnih i kvantitativnih informacija (Carr i Stoll, 2015).

1.6.1.3. Detekcija u dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji

Nakon prve dimenzije preporučljivo je koristiti neku vrstu detekcije, primjerice UV detektor, barem kod postavljanja sustava ili razvoja metode. Potrebno je paziti kako protok kroz prvi detektor ne bi previše pridonosio širini pika. Nadalje, pikovi u drugoj dimenziji su vrlo uski u vremenskim jedinicama i vrlo su malog volumena, što znači da detektor mora biti sposoban prepoznati najmanje 40 podatkovnih jedinica u sekundi. Osim UV detektora može se koristiti i MS detektor (Carr i Stoll, 2015).

1.7. LC-MS tehnike

Zadnjih nekoliko desetljeća razvijane su LC-MS tehnike kako bi se zadovoljili zahtjevi on-line detekcije analita nakon razdvajanja tekućinskom kromatografijom. Najširi broj analita prema polarnosti i molekularnoj masi obuhvaćaju kemijska ionizacija kod atmosferskog tlaka

(APCI) i elekstrosprej ionizacija (ESI). Te tehnike su mnogo osjetljivije i robusnije u odnosu na neke starije tehnike (Agilent technologies, 2015).

LC-MS se sastoji od masenog spektrometra i HPLC uređaja. HPLC donosi uzorak u tekućem obliku do ulaznog uređaja za uzorkovanje na MS-u. U drugom slučaju MS-u može prethoditi plinska kromatografija. U odnosu na GC-MS i LC-MS, LC-MS/MS postaje sve više zastupljena tehnika (Agilent technologies, 2015).

1.7.1. LC-MS/MS

LC-MS/MS uređaj sastoji se od ionizacijskog izvora (najčešće ESI ili APCI) zajedno s komponentom za ulaz iona i njihovo fokusiranje, koji omogućuju i prijelaz iz atmosferskog tlaka do vakuuma i ionsko fokusiranje, u prvi analizator. Potom se sastoji od kolizijske ćelije, koja se može napuniti niskotlačnim plinom za disocijaciju uzrokovanu sudarima (CID), nakon čega slijedi drugi analizator, i konačno detektor. Takav instrument omogućava provođenje nekoliko vrsti eksperimenata (Grebe i Singh, 2011):

- kompletno skeniranje (eng. *Product Ion Scan*)- snima se cijeli raspon masa, a kolizijska ćelija nije napunjena plinom. Korisnik vidi sve ione sadržane u uzorku.
- skeniranje prekursorskog iona (eng. *Precursor Ion Scan*) - skeniranje cijelog masenog raspona, kolizijska ćelija ispunjena je plinom, dolazi do fragmentacije svih iona, a zatim se odabere specifičan omjer mase i naboja. Koristi se kako bi se utvrdilo koji bi *m/z* prekursorski ion mogao dovesti do odabranog iona produkta.
- skeniranje neutralnog gubitka (eng. *Neutral Loss Scan*)- snima se cijeli raspon masa, svi ioni budu fragmentirani te se onda traže oni produkti koji odgovaraju gubitku jedne specifične mase izazvane fragmentacijom.
- selektivno (ili višestruko) praćenje reakcije (eng. *Selective (or Multiple) Reaction Monitoring*)- izabere se jedan specifični *m/z* i fragmentira, a zatim odabere jedan specifični *m/z* od tih fragmenata. Ovaj eksperiment omogućava vrlo specifično otkrivanje analita (Grebe i Singh, 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tema ovog diplomskog rada je prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata dvodimenzionalnom tekućinskom kromatografijom povezanom s masenom spektrometrijom.

Prisilna razgradnja torasemida, kao i njegovi razgradni produkti te putevi razgradnje, već su poznati u literaturi, no u ovom radu cilj je bio razviti metodu dvodimenzionalne tekućinske kromatografije povezane izravno s masenim spektrometrom.

Takva metoda vrlo je korisna jer omogućuje korištenje izvorne metode koja je razvijena za jednodimenzionalnu kromatografiju, bez ponovnog razvijanja nove metode. Puferi koji se koriste u prvoj dimenziji inkompatibilni su s masenim spektrometrom. Kako se željeni uzorci izvlače u drugu dimenziju, tamo je korišten sustav kompatibilan s masenim spektrometrom, formijatni pufer koji je hlapljiv. Time se štedi vrijeme, utrošak kemikalija, financijska sredstva, ne treba razvijati novu metodu, a rezultati su odmah dostupni s prve, druge dimenzije i masene spektrometrije korištenjem samo jedne metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U izradi ovog diplomskog rada korištena je ljekovita supstancija torasemida (eng. *Active pharmaceutical ingredient*, API): Torasemid, Pliva, 17.11.2016.

Ostale korištene kemikalije su:

- acetonitril- J.T.Baker, kromatografski stupanj čistoće
- 30% H_2O_2 – Merck, Darmstadt, Germany
- NaOH- Kemika, Zagreb
- HCl – Kemika, Zagreb
- KH_2PO_4- J.T.Baker
- H_3PO_4 – J.T.Baker

Korištena voda je ultra visoke čistoće (Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System, Merck).

3.2. Radni instrumenti

Kromatogrami jednodimenzionalne tekućinske kromatografije obrađeni su u programskom paketu Empower (Waters, Velika Britanija), kromatogrami dvodimenzionalne tekućinske kromatografije u programskom paketu Chemstation (Agilent Technologies, SAD), a maseni spektri u programskom paketu Masshunter (Agilent Technologies, SAD). Strukture su nacrtane u programu Chemdraw.

3.2.1. HPLC

Ispitivanja jednodimenzionalne kromatografije provedena su na tekućinskom kromatografu Agilent 1200 Systems (Agilent Technologies) koji se sastoji od binarne pumpe Agilent 1200 Binary Pump SL, automatskog dodavača uzorka Agilent 1200 High Preformance Autosampler SL, grijača automatskog dodavača uzorka Agilent 1200 Autosampler Thermostat, grijača odjeljka za kolonu Agilent 1200 Therm. Column Compartment SL, detektora Agilent 1200 Diode Array Detector SL i programskog paketa ChemStation for LC.

3.2.2. 2D-LC-MS

Ispitivanja dvodimenzionalne tekućinske kromatografije povezane s masenim spektrometrom provedena su na dvodimenzionalnom tekućinskom kromatogramu Agilent 1290 Infinity LC System koji se sastoji od binarne pumpe Agilent 1290 Infinity Binary Pump, kvarterne pumpe Agilent 1290 Infinity Quaternary Pump, dodavača uzorka Agilent 1290 Infinity Autosampler, grijača dodavača uzorka Agilent 1290 Infinity Autosampler Thermostat, odjeljka za kolonu Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment, ventila Agilent 1290 Infinity multiple *heart-cutting* valve i dva detektora Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector. Taj sustav povezan je s masenim spektrometrom Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS System pri čemu je izvor iona Dual Ion Source AIS ESI.

3.2.3. Q-TOF

Masena spektrometrija provedena je na instrumentu Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS. Izvor elektrona (eng. *Ion Source*) instrumenta je Dual Ion Source AIS ESI.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema otopina uzorka

Sve otopine uzorka torasemida 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 torasemida koncentracije 1 mg/ml tako što je vagano 20 mg torasemida u odmjerne tikvice od 20,0 ml. Kao otapalo korištena je smjesa acetonitrila i vode u volumnom omjeru 50:50. Otapanje torasemida provodilo se u 10 ml otapala uz pomoć ultrazvučne kupelji 3 minute. Nakon otapanja uzorci su podvrgnuti uvjetima prisilne razgradnje. U jednu tikvicu dodano je 5 ml 1M NaOH, u drugu 5 ml 1 M HCl te u treću 5 ml 30% H_2O_2. Napravljena je i slijepa proba, gdje je dodano još 5 ml smjese acetonitrila i vode. Uzorci su tako stajali 1 sat, nakon čega su tikvice dopunjene diluentom do oznake. Nakon 24 sata otopine iz tikvica prenesene su u vijale i stavljene na HPLC ili 2D-LC-MS uređaj na analizu. Uvijek je u prvoj vijali bio čisti diluent, nakon čega su slijedile analize slijepog uzorka te nakon toga analize uzoraka koji su bili podvrgnuti stresnim uvjetima. UV spektri tih uzoraka snimani su na 290 nm. Svjetlosna razdragnja nije provođena jer je u literaturi dokazano kako je torasemid pri tim uvjetima stabilan.

3.3.2. Priprema uzoraka torasemida nakon toplinske razgradnje

Uzorak je podvrgnut toplinskoj razgradnji na dva načina. Jedan način je da je uzorak torasemida zagrijavan 24 sata na temperaturi od 105^{o}C, a drugi da je pripremljena otopina torasemida, koncentracije 1 mg/mL, u diluentu acetonitrila i vode u volumnom omjeru 50:50, što je onda grijano 1 sat na 60^{o}C. Od uzorka grijanog na 105^{o}C odvagano je 20 mg te otopljeno u 20 mL diluenta, koji čine acetonitril i voda u omjeru 50:50.

3.3.3. Priprema otopine pufera za HPLC analizu

U HPLC analizi kao mobilna faza korišteni su pufer i acetonitril. Otopina pufera bila je otopina kalijeva dihidrogenfosfata pH 3.5. Odvagano je 2.7 g KH_2PO_4 u 1000 mL vode i pH je pomoću fosforne kiseline prilagođen na 3.5.

3.3.4. HPLC analiza

Metoda korištena u HPLC analizi: protok 1 ml/min, temperatura kolone namještena na 40^{o}C, temperatura čuvanja uzorka je 5^{o}C. Kao mobilna faza korišteni su fosfatni pufer pH 3,5 i acetonitril. Vrijeme analize jednog uzorka bilo je 30 minuta, a sastav mobilne faze mijenjao se s vremenom analize, što je prikazano u tablici 3.

Kolona korištena za jednodimenzionalnu kromatografiju bila je Symmetry C-18, Waters, dimenzija 150 x 4,6 mm, i veličine čestica 5μm.

Tablica 3: Prikaz sastava mobilne faze

t/min	Fosfatni pufer/%	Acetonitril/%
0	80	20
10	80	20
25	60	40
30	80	20

3.3.5. 2D-LC analiza

Kolona korištena u prvoj dimenziji bila je Symmetry C-18, Waters, dimenzija 150 x 4,6 mm, i veličine čestica 5 μm. Kolona korištena u drugoj dimenziji bila je Eclipse Plus C-18, Agilent

Tehcnologies, RRHD (eng. *Rapid Resolution High Definition*) dimenzije 2,1 x 50 mm i veličine čestica 1,8 µm.

Metoda korištena u UHPLC analizi: protok 0,4 ml/min, temperatura kolone namještena na 40^0C. Kao mobilna faza korišteni su 0.1% mravlja kiselina i acetonitril. Vrijeme analize jednog uzorka bilo je 3 minute, a sastav mobilne faze mijenjao se s vremenom analize, što je prikazano u tablici 4. Način rada dvodimenzionalne kromatografije bio je *heart-cutting*.

Tablica 4: Prikaz sastava mobilne faze u drugoj dimenziji

t/min	Formijatni pufer/%	Acetonitril/%
0,00	85	15
2,50	50	50
3,00	50	50

3.3.6. MS analiza

Parametri metode masenog spektrometra prikazani su u tablici 5, a parametri *Scan Source parameters* u tablici 6. Izvor iona je Dual Ion Source AIS ESI te su svi ioni snimljeni u pozitivnom načinu.

Tablica 5: Parametri metode korištene u masenoj spektrometriji

Parametar	**Vrijednost**
Temperatura plina (^{0}C)	200
Protok plina (l/min)	12
Atomizer (psig)	50
SheathGasTemp	350
DheathGasFlow	11

Tablica 6: Parametri Scan Source parameters

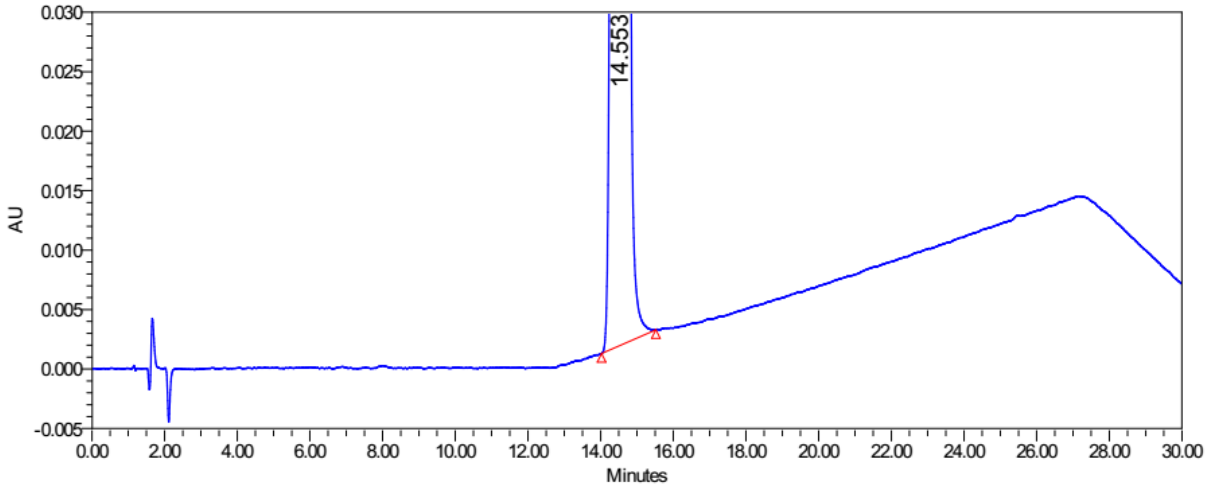
Parametar	Vrijednost
Vcap	4000
Nozzle Voltage (V)	1000
Fragmentor	175
Skimmer1	65
OctopoleRFPeak	750

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Provjera uvjeta razgradnje pomoću HPLC tehnike

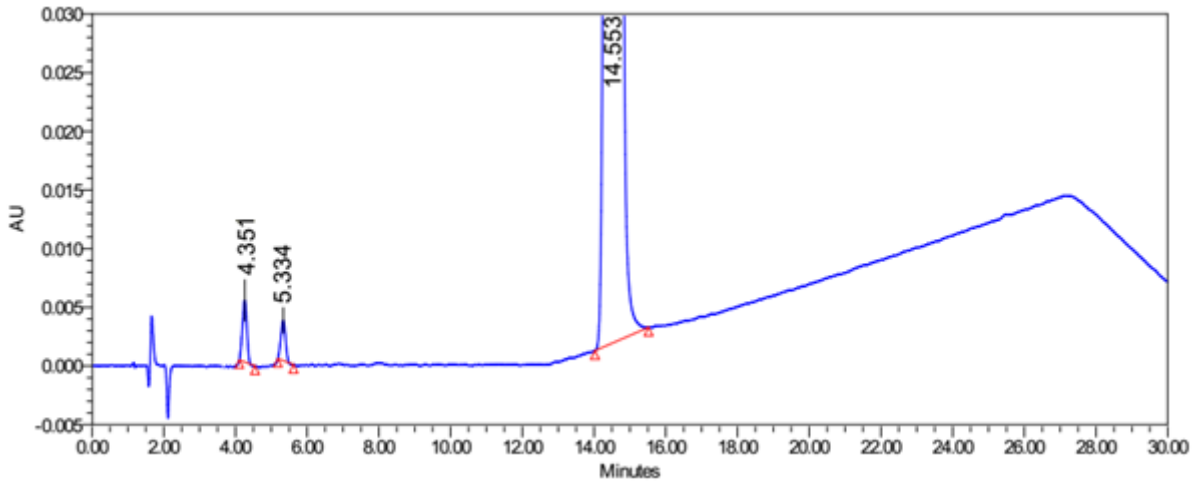
Prije nego što su uzorci analizirani na dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji i masenoj spektrometriji, uvjeti razgradnje provjeravani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, kako bi se osiguralo da je postignuta zadovoljavajuća razgradnja. Ako bi se bilo pokazalo da do razgradnje nije došlo ili da je razgradnja bila pretjerana, bili bi se mijenjali uvjeti kojima su bili podvrgnuti uzorci torasemida.

Najprije je snimljen kromatogram nerazgrađenog torasemida, prikazan na slici 6. Slika prikazuje glavni pik koji odgovara torasemidu, s vremenom zadržavanja od 14.553 minute.

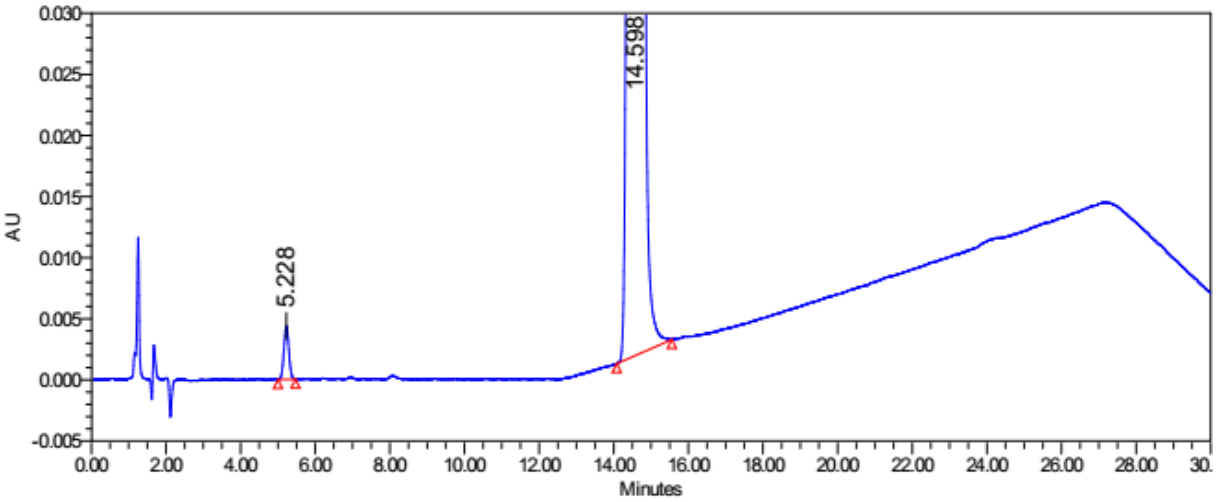


Slika 6: HPLC kromatogram nerazgrađenog uzorka torasemida.

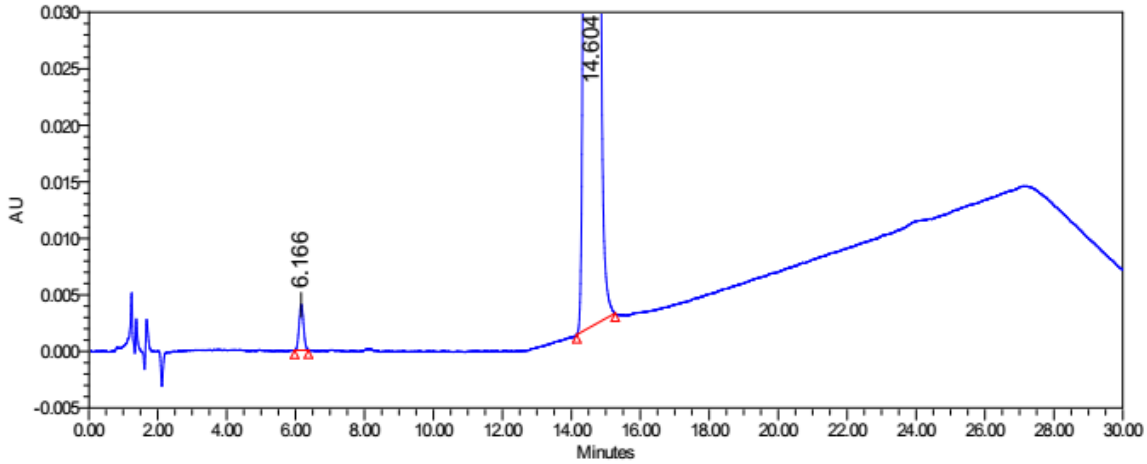
Zatim su snimljeni kromatogrami uzoraka torasemida koji su bili podvrgnuti razgradnji pomoću topline, pomoću HCl, NaOH i H_2O_2, slike 7, 8, 9 i 10.



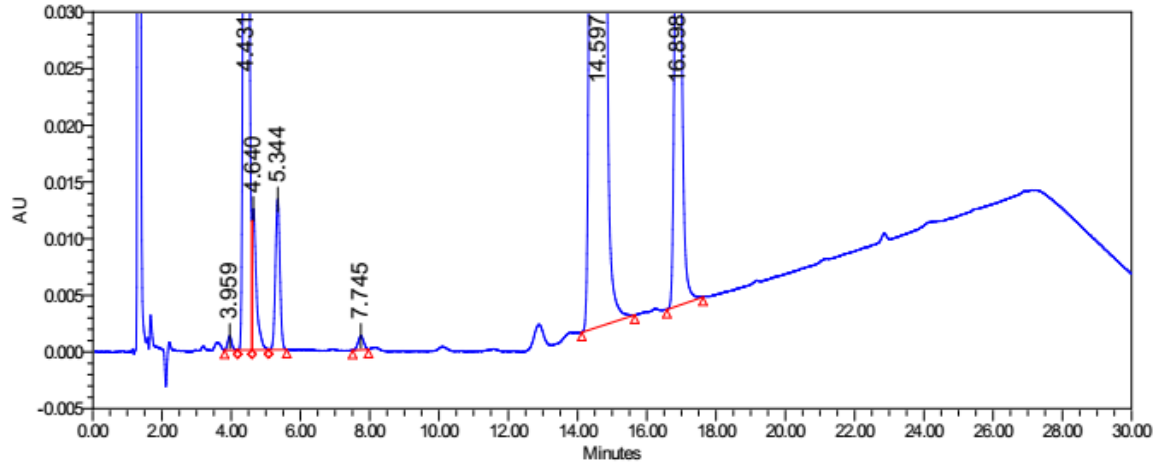
Slika 7: Kromatogram torasemida razgrađenog termalnom razgradnjom



Slika 8: HPLC kromatogram torasemida razgrađenog u 1M HCL.



Slika 9: HPLC kromatogram torasemida razgrađenog u 1M NaOH.



Slika 10: HPLC kromatogram torasemida razgrađenog u 30% H_2O_2.

Kisela i bazična razgradnja pokazale su nastanak samo jednog razgradnog produkta, dok se uzorak puno više razgradio oksidacijom. Najveći pik s vremenom zadržavanja oko 14 minuta (14,598 min za HCL, 14,604 min za NaOH i 14,597 min za H_2O_2) odgovara torasemidu. Ostali pikovi odgovaraju onečišćenjima nastalima u razgradnji. Cilj ove analize bio je potvrditi razgradnju torasemida u tim uvjetima, što je i dokazano.

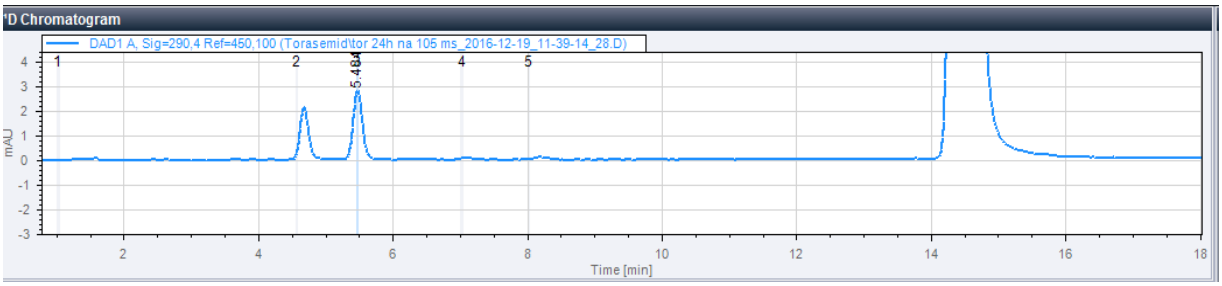
4.2. 2D-LC analiza

Nakon što je jednodimenzionalnom kromatografijom prikazana razgradnja torasemida u zadanim uvjetima, uzorci su analizirani na dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji povezanoj s masenim spektrometrom. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija omogućuje snimanje spektara i nakon prve i nakon druge dimenzije. Korišteni način skupljanja alikvota koji se koristio za analizu na drugoj dimenziji bio je *heart-cutting*. Nakon što je dobivena informacija na kojim vremenima zadržavanja eluiraju pikovi od interesa, ta vremena korištena su kao zadani kriterij za *heart-cutting* pa su u tim vremenima skupljani alikvoti s prve dimenzije i slani u drugu dimenziju. Druga dimenzija korištena je kako bi se izdvojili pikovi od interesa i pripremili se za analizu na masenom spektrometru korištenjem kompatibilne mobilne faze na drugoj dimenziji te kao potvrdu da se u jednom piku skupljenom iz prve dimenzije ne nalazi još pikova. Dakle, da takav alikvot možemo dalje analizirati na masenoj spektrometriji čime ćemo dobiti masu samo jednog analita. Korišten je DAD detektor, te su snimani spektri na valnoj duljini 290 nm.

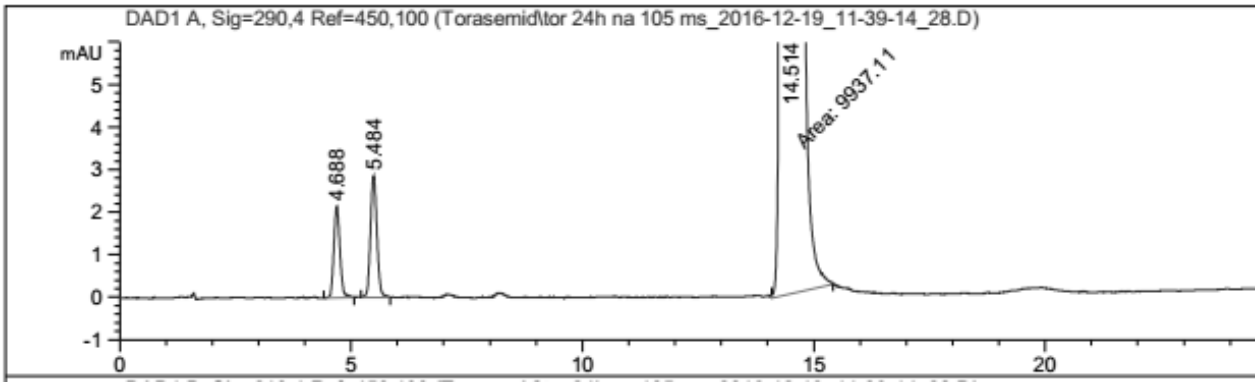
4.2.1. 2D-LC analiza uzorka sušenog 24 sata na 105^0C

Na slici 11 prikazan je kromatogram uzorka torasemida koji je 24 sata grijan na temperaturi 105^0C nakon prve dimenzije. Točna vremena zadržavanja svih pikova prikazana su na slici 12. Brojevima 1, 2, 3, 4 i 5, na slici 11, prikazani su alikvoti koji su skupljani za drugu dimenziju, a vremena početka skupljanja alikvota, kao i vremena kada je započeta analiza u drugoj dimenziji, prikazani su u tablici 7. Izgled rasporeda alikvota prikazan je na slici 13. Instrument može sakupiti 12 alikvota koji se šalju iz prve u drugu dimenziju. Koristi ih se onoliko koliko je potrebno kako bi se sakupili alikvoti svih pikova od interesa, kao i jedan alikvot koji ne sadrži niti jedan pik, nego služi kao slijepi alikvot. Ukoliko se svi pikovi ne uspiju uhvatiti u jednoj analizi sa 12 *heart-cutt-ova*, radi se još onoliko analiza koliko je potrebno da se uhvate svi željeni pikovi. Pikovi od interesa u uzorku koji je 24 sata bio grijan na temperaturi od 105^0C bili su s vremenima zadržavanja 4,688 i 5,484 min, te su ta vremena

služila kao okidač za *heart-cutting*, odnosno tada su se počeli skupljati alikvoti tih pikova za analizu u drugoj dimenziji. To su *cuttovi* prikazani na slici 11 i tablici 7 brojevima 2 i 3. Ostali alikvoti nisu sadržavali pikove. Najveći pik s vremenom zadržavanja 14.514 minuta je poznat i odgovara torasemidu, stoga on nije dalje hvatan kao alikvot za drugu dimenziju. Na slici 13 također se može primijetiti kako alikvoti nisu slani s prve dimenzije na drugu onim redoslijedom kojim su izlazili s prve dimenzije, već malo promijenjenim redoslijedom, koji ovisi o dostupnosti kapilara koje uzimaju te alikvote, jesu li prazne, pune uzorkom koji čeka odlazak na drugu dimenziju ili se u njima odvija pranje. Na slici 13, žutom bojom i slovom F, prikazano je i ispiranje kapilara između alikvota 2 i 4 kao i između 3 i 5.



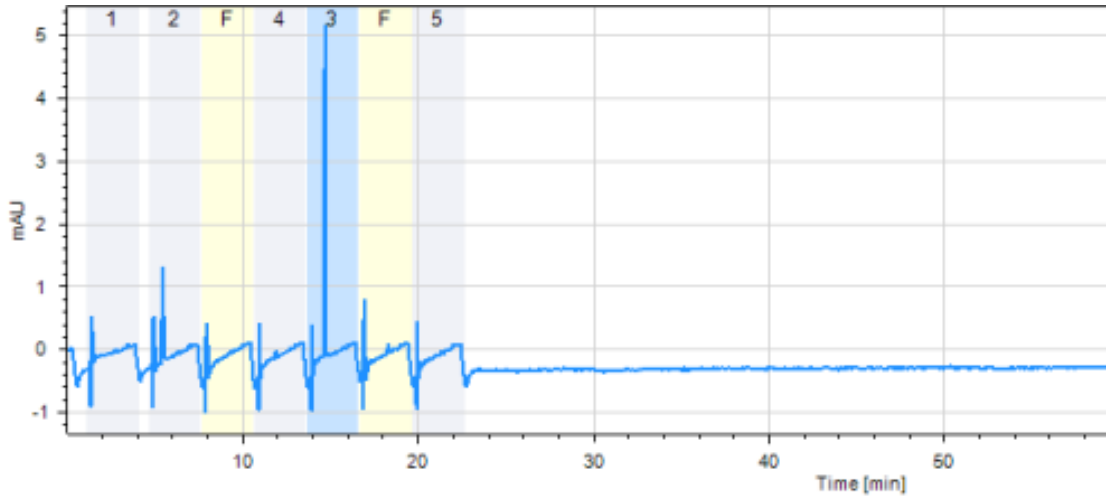
Slika 11: Kromatogram uzorka torasemida koji je 24 sata grijan na temperaturi 105^0C nakon prve dimenzije



Slika 12: Vremena zadržavanja i izgled kromatograma torasemida grijanog na temperaturi 105^0C nakon izlaska iz prve dimenzije

Tablica 7: Prikaz vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početak analize u drugoj dimenziji uzorka torasemida koji je 24 sata grijan na temperaturi 105^0C

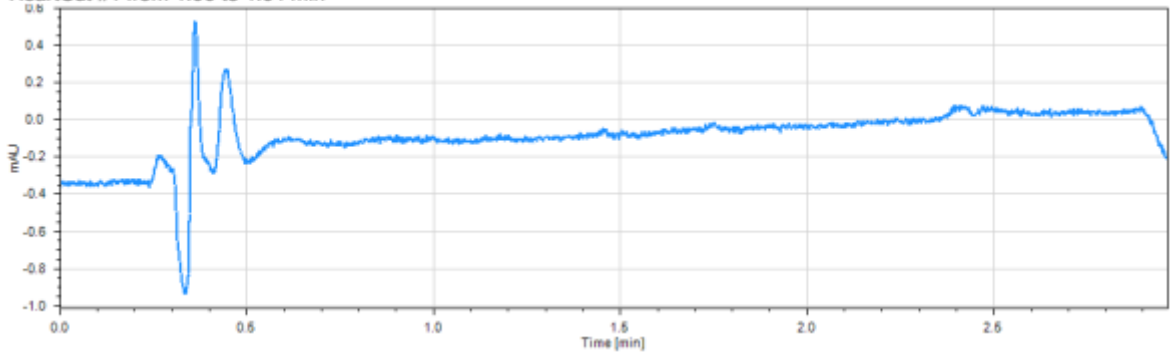
Cut #	1D Cut početak [min]	1D vrijeme zadržavanja [min]	1D trajanje [min]	Okidač	2D vrijeme početka [min]
1	1,00	***	0,04	vrijeme	1,09
2	4,55	***	0,04	vrijeme	4,64
4	7,00	***	0,04	vrijeme	10,64
3	5,45	5,48	0,04	vrijeme	13,64
5	8,00	***	0,04	vrijeme	19,64



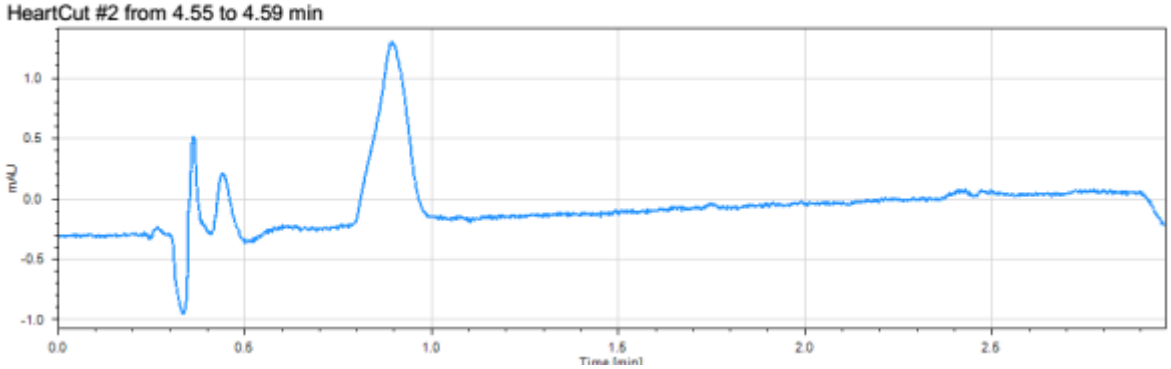
Slika 13: Prikaz rasporeda alikvota koji su prelazili s prve u drugu dimenziju

Nakon što su alikvoti skupljeni u kapilare, i poslani na drugu dimenziju, dobiveni su kromatogrami druge dimenzije prikazani na slici 14. *Heart-cuttovi* 2 i 3 prikazuju uhvaćeni alikvot željenog pika, dok ostali alikvoti prikazuju šum, odnosno slijepi signal. Druga dimenzija pokazala je čistoću svakog od analiziranih pikova. To znači da su pikovi dovoljno dobro odijeljeni već u prvoj dimenziji te da se pod jednim pikom nalazi samo jedan analit, što je poželjno u kasnijoj analizi masenom spektrometrijom pri čemu će se određivati strukture onečišćenja.

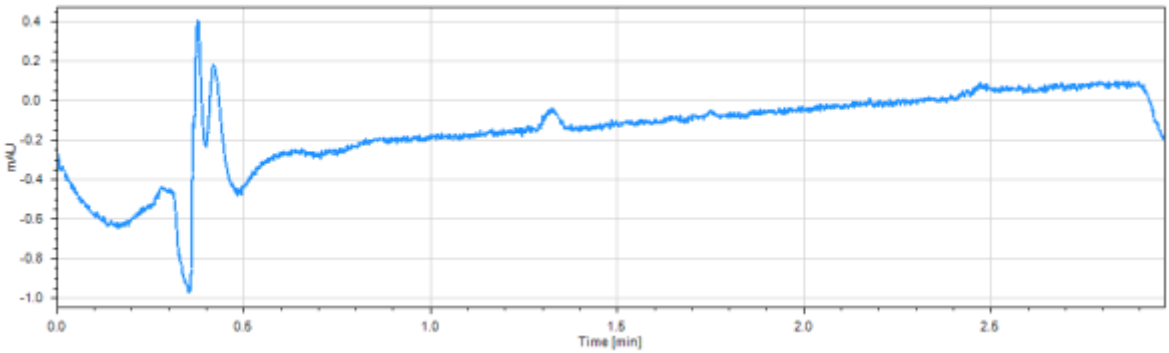
HeartCut #1 from 1.00 to 1.04 min



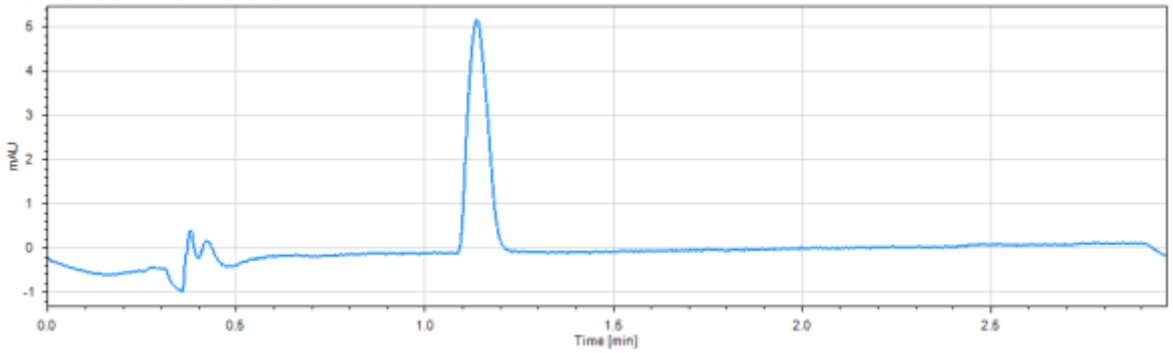
HeartCut #2 from 4.55 to 4.59 min

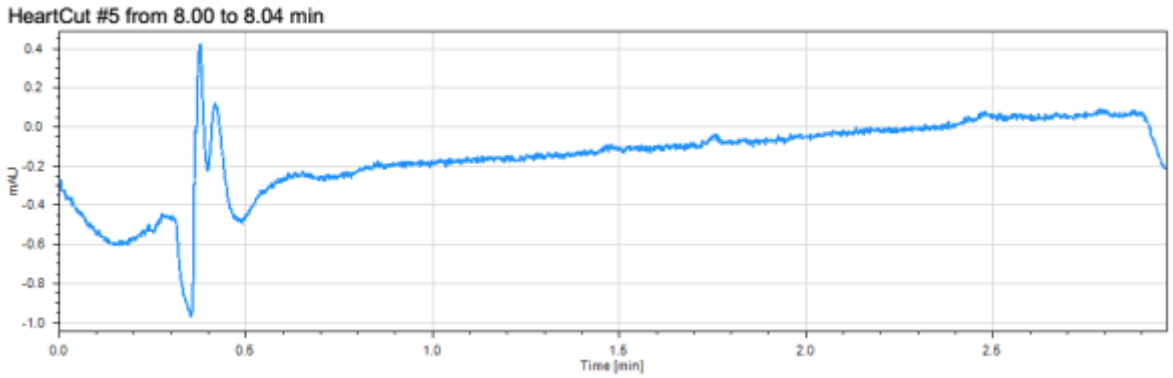


HeartCut #4 from 7.00 to 7.04 min



HeartCut #3 from 5.45 to 5.49 min

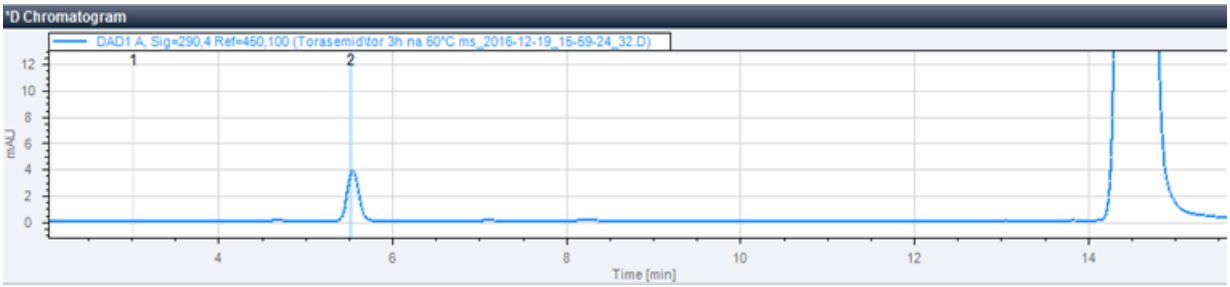




Slika 14: Kromatogrami dobiveni nakon analize alikvota na drugoj dimenziji

4.2.2. 2D-LC analiza uzorka grijanog 3 sata na 60^{0}C

Uzorak sušen 3 sata na 60^{0}C pušten je na prvoj dimenziji i njegov kromatogram prikazan je na slici 15. Brojevima 1 i 2 prikazani su alikvoti koji su skupljani za analizu na drugoj dimenziji. Broj 1 označava slijepi alikvot, u kojemu se ne nalazi analit, dok broj 2 prikazuje pik koji vremenom zadržavanja odgovara piku s 5,484 min iz uzorka koji je 24 sata sušen na 105^{0}C. Pretpostavka je da se radi o istom razgradnom produktu. Najveći pik na kromatogramu odgovara torasemidu te on nije skupljan za analizu na drugoj dimenziji.



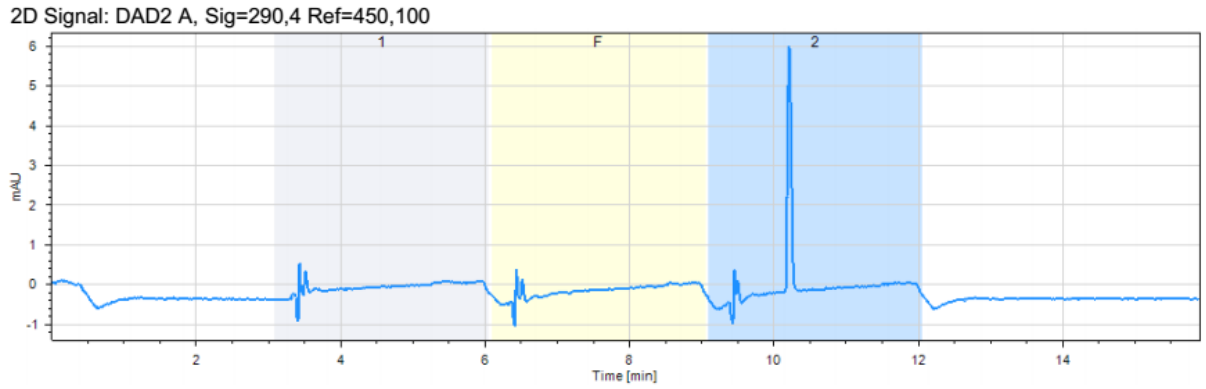
Slika 15: Kromatogram uzorka torasemida grijanog 3 sata na 60^{0}C

Tablica 8 prikazuje vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početak analize u drugoj dimenziji.

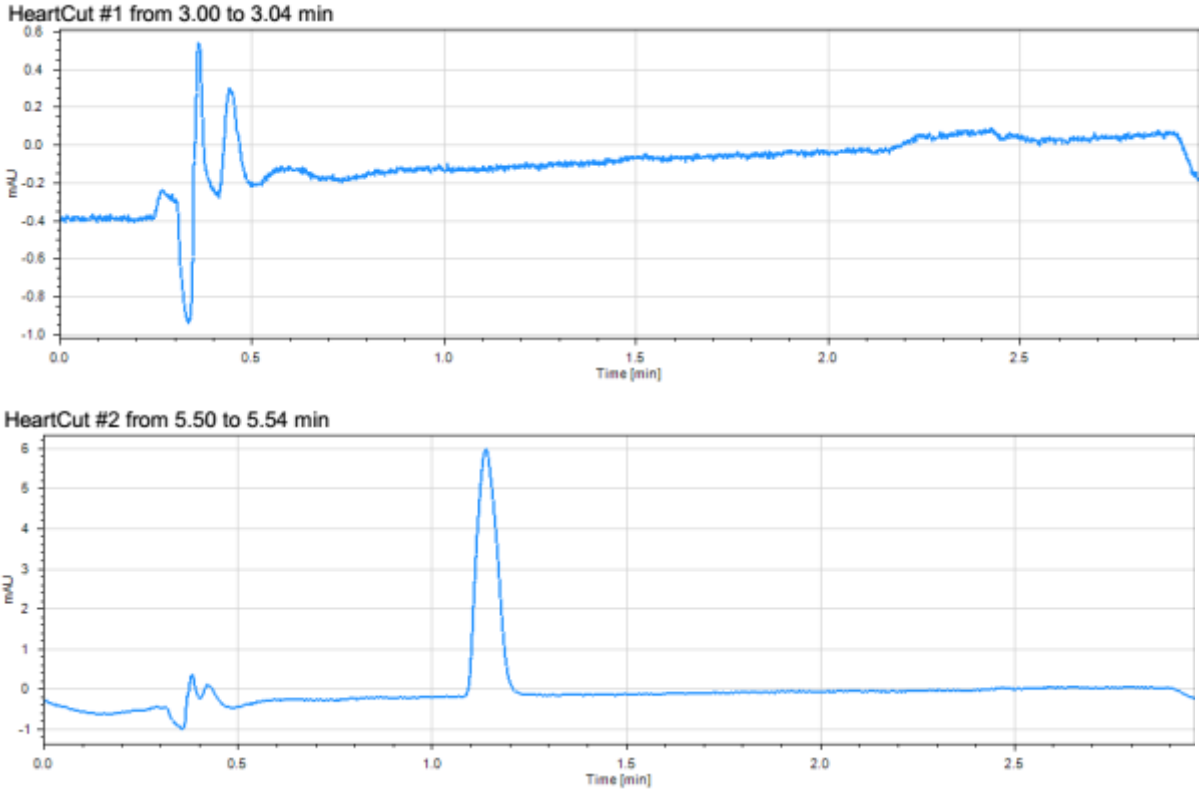
Tablica 8: Vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početak analize u drugoj dimenziji

Cut #	1D Cut početak [min]	1D vrijeme zadržavanja [min]	1D trajanje [min]	Okidač	2D vrijeme početka [min]
1	3,00	***	0,04	vrijeme	3,09
2	5,50	***	0,04	vrijeme	9,09

Pregled skupljanja alikvota s prve na drugu dimenziju prikazan je na slici 16 brojevima 1 i 2. Između njih napravljeno je jedno ispiranje petlje u instrumentu, prikazano žutom bojom i slovom F. Na slici 17 prikazani su kromatogrami dobiveni nakon prolaska odabranih alikvota kroz drugu dimenziju. Kromatogram koji prikazuje alikvot 1 nema pikova zato što se u njemu nije nalazio nikakav analit, već je prikazan šum. Alikvot 2 prikazuje analit koji je s prve dimenzije izašao s vremenom zadržavanja 5,500 min.



Slika 16: Prikaz alikvota koji su prelazili s prve u drugu dimenziju.

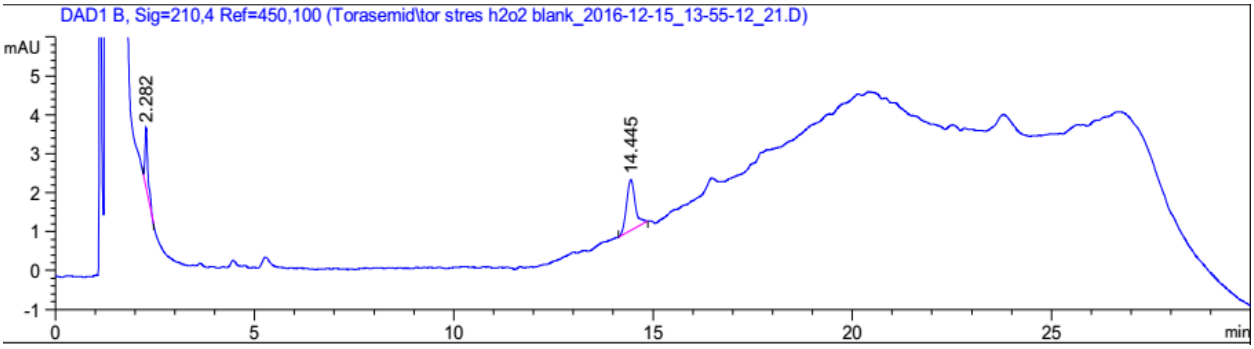


Slika 17: Prikaz kromatograma uzorka grijanog 3 sata na 60^0C nakon prolaska kroz drugu dimenziju.

Kromatogrami druge dimenzije pokazuju samo jedan pik odnosno šum, što znači da su analiti već na prvoj koloni dobro odijeljeni, te da se na istom vremenu zadržavanja eluira samo jedan analit.

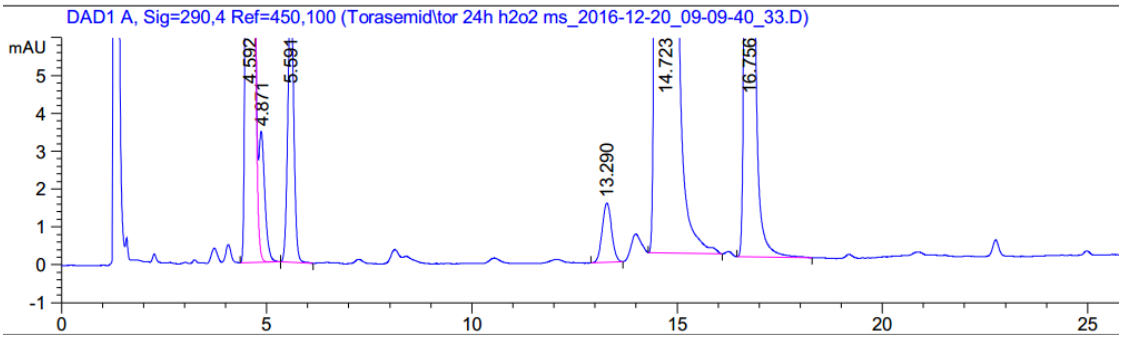
4.2.3. 2D-LC analiza uzorka u oksidirajućim uvjetima

Torasemid je oksidacijom razgrađivan 24 sata s 30%-tnim vodikovim peroksidom. Kao i kod prijašnjih uzoraka, onih koji su prošli razgradnju na povišenoj temperaturi, uzorak je analiziran dvodimenzionalnom tekućinskom kromatografijom te dalje masenom spektrometrijom. Izuzev uzorka, snimljen je i kromatogram vodikova peroksida na 210,4 nm, kako bi se isključile moguće interferencije pikova iz vodikova peroksida. Na 290 nm, pri čemu su snimani kromatogrami uzoraka, vodikov peroksid nema značajnih pikova. Kromatogram slijepog uzorka bez torasemida prikazan je na slici 18. Pikovi na kromatogramu pripadaju vodikovom peroksidu.



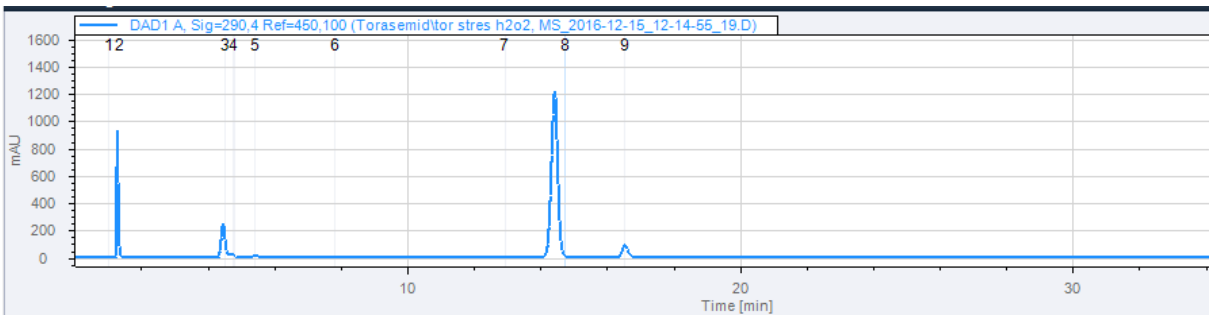
Slika 18: Kromatogram slijepog uzorka bez torasemida s H_2O_2

Kromatogram uzorka razgrađenog torasemida oksidacijom pomoću 30%-tnog H_2O_2, zajedno s vremenima zadržavanja pikova, prikazan je na slici 19. Najveći pik s vremenom zadržavanja 14,723 minute pripada torasemidu. Ostali pikovi pripadaju razgradnim produktima koji su dalje analizirani na drugoj dimenziji te masenoj spektrometriji.



Slika 19: Kromatogram torasemida razgrađen oksidacijom s 30%-tnim H_2O_2 dobiven jednodimenzionalnom tekućinskom kromatografijom

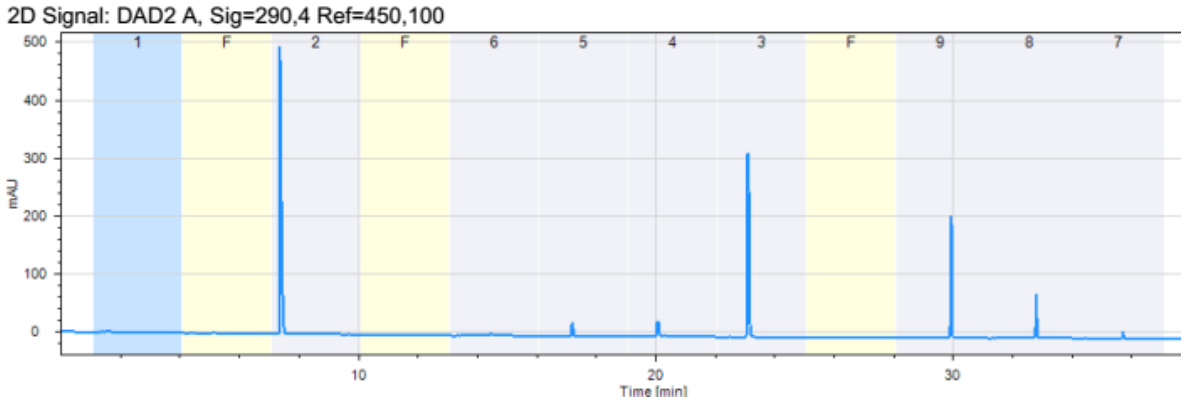
Slika 20 prikazuje kromatograme nakon izlaska iz prve dimenzije, te brojevima 1 do 8 alikvote koji su skupljani za analizu na drugoj dimenziji. Najveći pik pripada torasemidu te on nije skupljan za analizu na drugoj dimenziji. Tablica 9 prikazuje vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početka analize u drugoj dimenziji. Alikvot pod brojem 1 nije sadržavao analit, već je to bio slijepi alikvot. Skupljani alikvoti nisu slani na drugu dimenziju prema vremenima kojima su izlazili iz prve dimenzije, već je njihov redoslijed također vidljiv u tablici 9, kao i na slici 21. Žutom bojom i slovom F, na slici 21, između alikvota uzoraka prikazano je ispiranje kapilara koje skupljaju alikvote. Slika 22 prikazuje kromatograme nakon izlaska iz druge dimenzije. Nakon izlaska s druge dimenzije, pikovi su analizirani masenom spektrometrijom kako bi se odredile strukture analtima u zadanim pikovima.



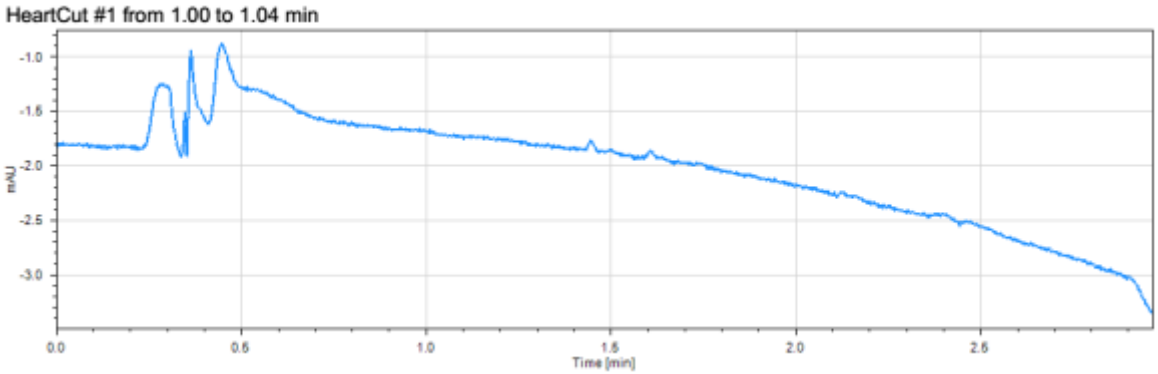
Slika 20: Kromatogram torasemida razgrađen oksidacijom s 30%-tnim H_2O_2 nakon prve dimenzije

Tablica 9: Prikaz vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početak analize u drugoj dimenziji za oksidacijom razgrađeni torasemid

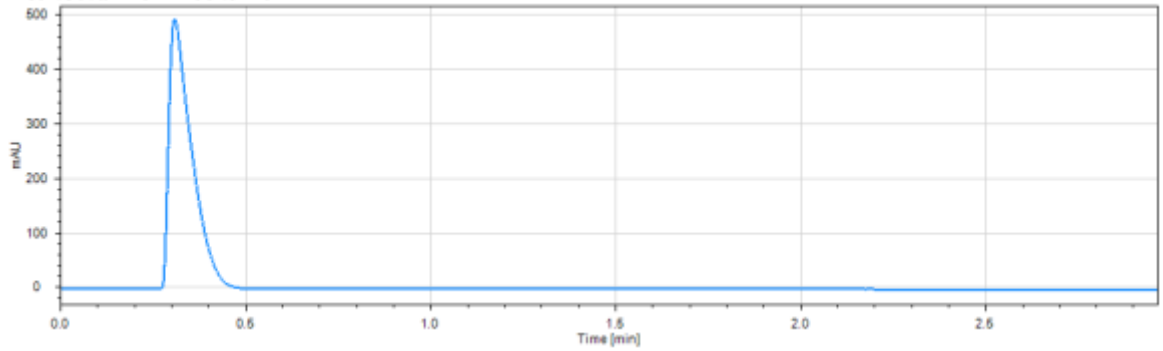
Cut #	1D Cut početak [min]	1D vrijeme zadržavanja [min]	1D trajanje [min]	Okidač	2D vrijeme početka [min]
1	1,00	***	0,04	vrijeme	1,08
2	1,35	***	0,02	vrijeme	7,09
6	7,80	***	0,04	vrijeme	13,09
5	5,40	***	0,04	vrijeme	16,09
4	4,75	***	0,05	vrijeme	19,09
3	4,50	***	0,04	vrijeme	22,09
9	16,50	***	0,04	vrijeme	28,09
8	14,70	***	0,04	vrijeme	31,09
7	12,90	***	0,04	vrijeme	34,09



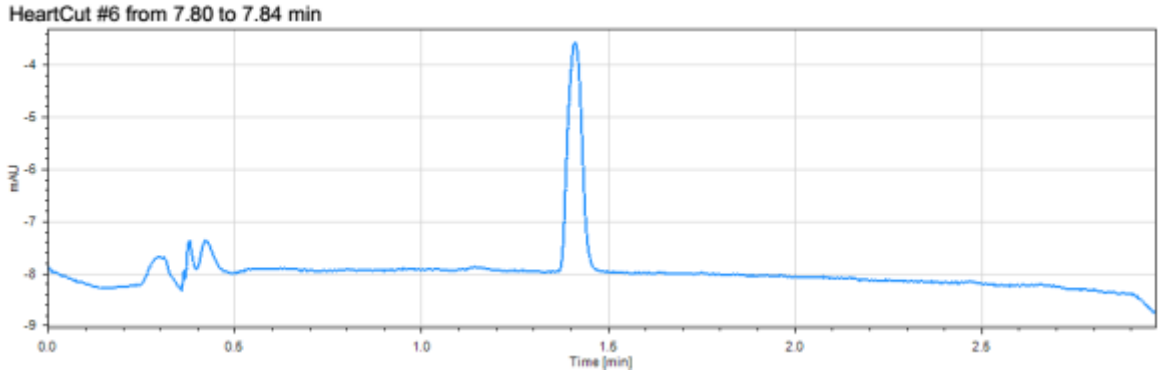
Slika 21: Prikaz alikvota koji su prelazili s prve u drugu dimenziju



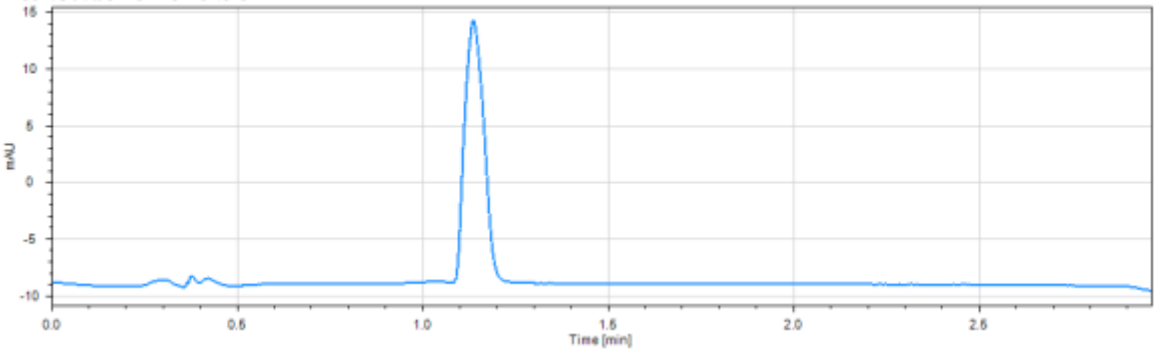
HeartCut #2 from 1.35 to 1.37 min



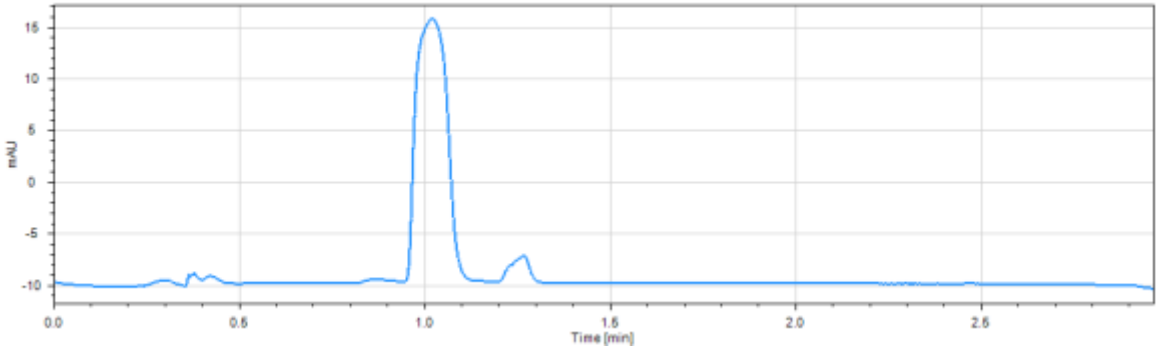
HeartCut #6 from 7.80 to 7.84 min

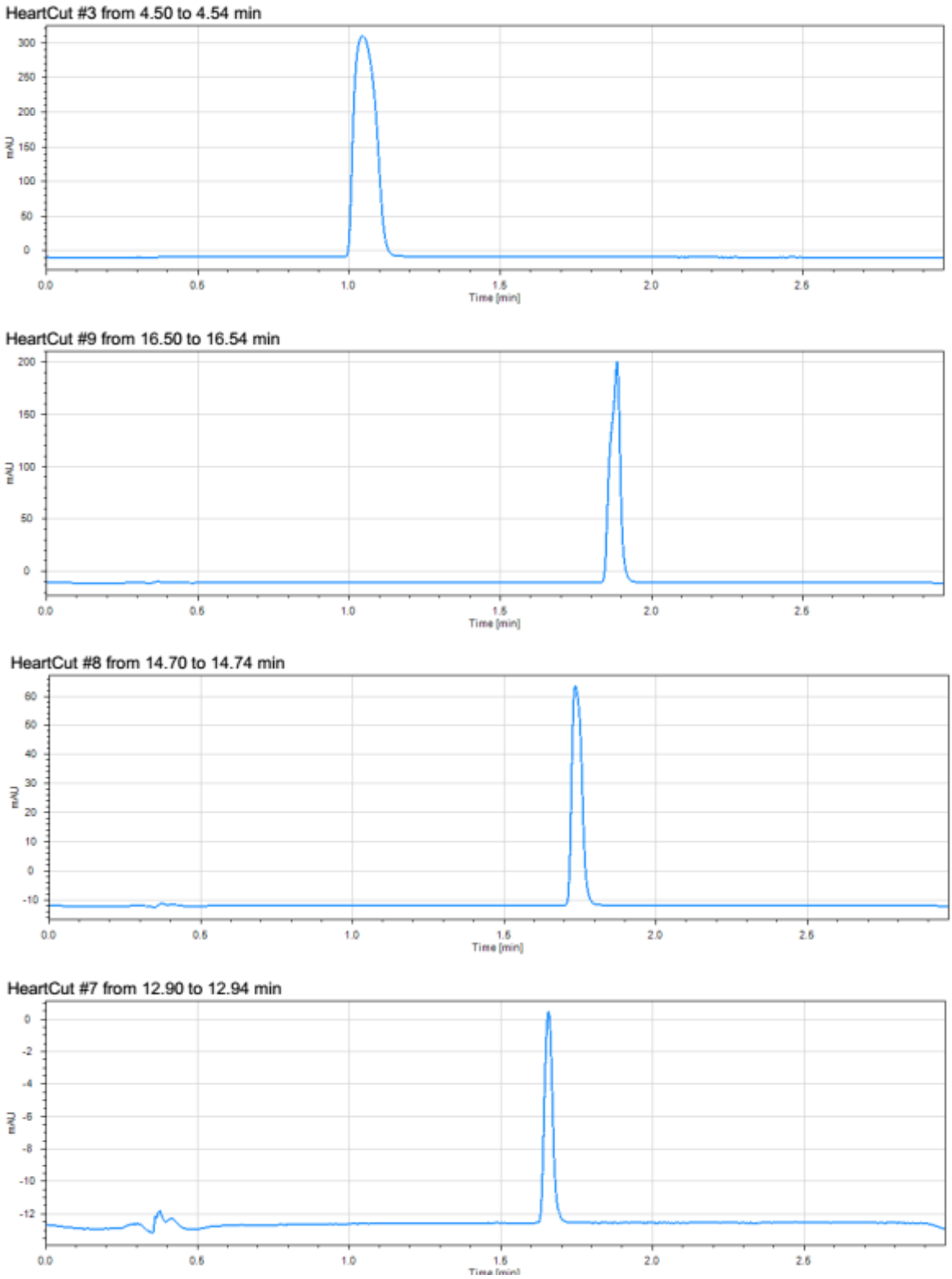


HeartCut #5 from 5.40 to 5.44 min



HeartCut #4 from 4.75 to 4.80 min





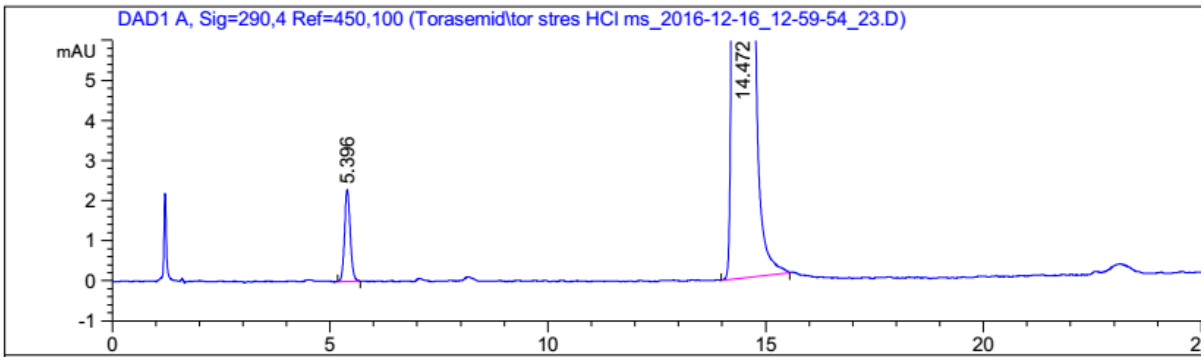
Slika 22: Kromatogrami oksidacijom razgrađenog torasemida nakon izlaska iz druge dimenzije

Svaki kromatogram nakon analize drugom dimenzijom pokazuje samo jedan pik osim kromatograma alikvota 4 čime je pokazano da su svi pikovi izuzev spomenutog dobro odijeljeni na prvoj koloni te da nema koeluacije u prvoj dimenziji. Ti pikovi su čisti i kao

takvi ekstrahirani su i slani su na analizu masenim spektrometrom kako bi se odredile strukture onečišćenja. Pik alikvota 4 sadrži po dva analita koji su se prolaskom kroz drugu dimenziju u potpunosti odvojili.

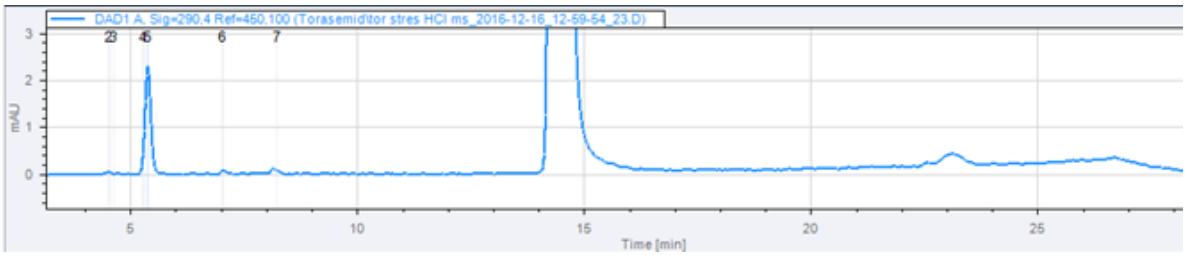
4.2.4. 2D-LC analiza uzorka nakon kisele hidrolize

Torasemid je kiselom hidrolizom razgrađivan 24 sata pomoću 1M HCl. Najprije je napravljena HPLC analiza uzorka jednom dimenzijom kako bi se odredila vremena pri kojima će se sakupljati alikvoti za analizu na drugoj dimenziji. Slika 23 prikazuje kromatogram razgrađivanog torasemida i razgradnih produkata, zajedno sa pripadajućim vremenima zadržavanja, nakon kisele hidrolize nakon izlaska iz prve dimenzije. Pik s vremenom 14,472 min pripada torasemidu. Drugi pik, s vremenom zadržavanja 5,396 min smatra se pikom nekog razgradnog produkta, čija struktura će biti predložena nakon masene spektrometrije.



Slika 23: Vremena zadržavanja i izgled kromatograma nakon izlaska iz prve dimenzije

Slika 24 prikazuje alikvote, označene brojevima 1 do 6, koji su skupljani za analizu u drugoj dimenziji, a tablica 10 prikazuje vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početka analize u drugoj dimenziji. Alikvoti nisu slani na analizu drugom dimenzijom prema redoslijedu kojim su eluirani s prve kolone, već je njihov redoslijed prelaska na drugu kolonu vidljiv također u tablici 10. Alikvot pod brojem 1 nije sadržavao analit, već je predstavljao slijepi alikvot.

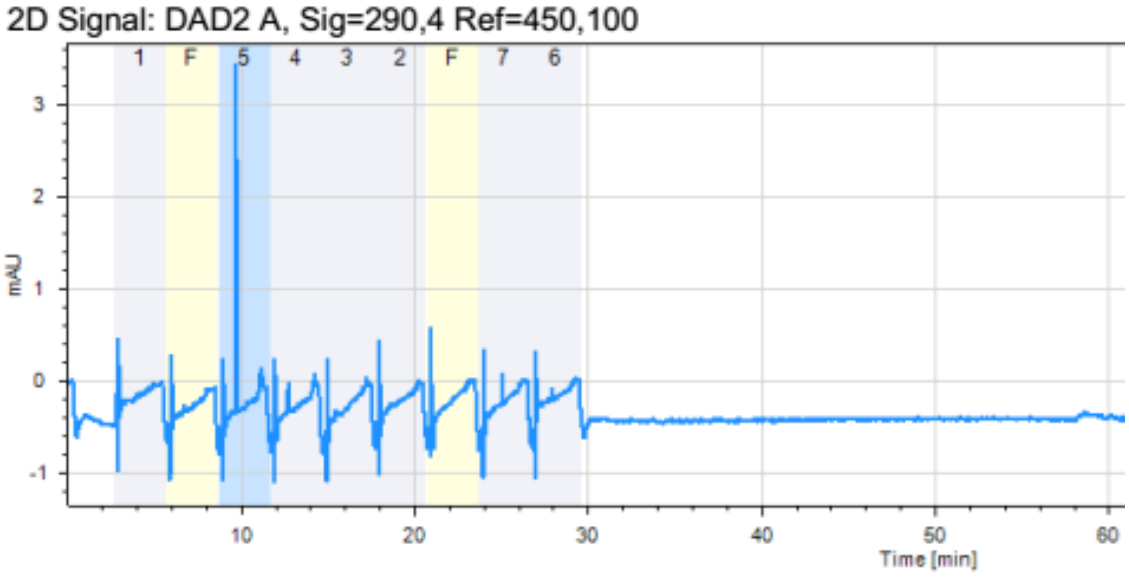


Slika 24: Kromatogram nakon izlaska iz prve dimenzije uzorka torasemida razgrađivanog u kiselim uvjetima, s označenim alikvotima skupljanima za drugu dimenziju

Tablica 10: Prikaz vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početak analize u drugoj dimenziji uzorka torasemida razgrađivanog u kiselim uvjetima

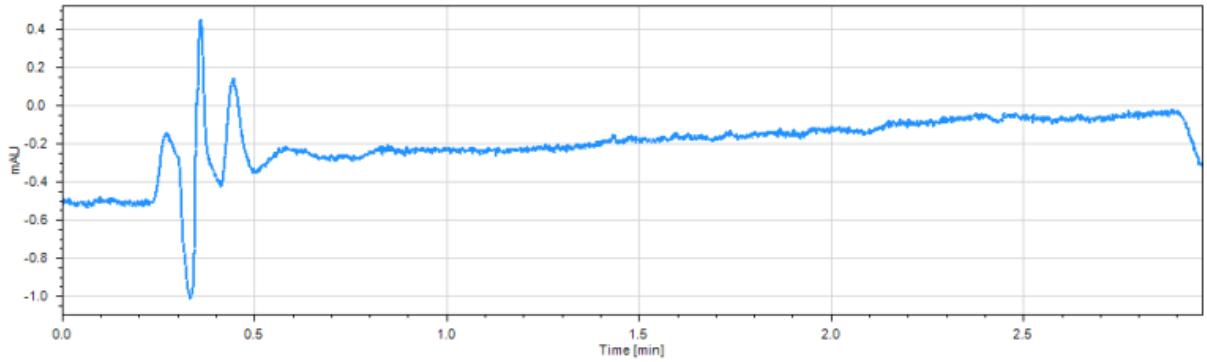
Cut #	1D Cut početak [min]	1D vrijeme zadržavanja [min]	1D trajanje [min]	Okidač	2D vrijeme početka [min]
1	2,60	***	0,02	vrijeme	2,66
5	5,35	***	0,04	vrijeme	8,67
4	5,25	***	0,04	vrijeme	11,67
3	4,60	***	0,04	vrijeme	14,67
2	4,50	***	0,05	vrijeme	17,67
7	8,20	***	0,04	vrijeme	23,67
6	7,00	***	0,04	vrijeme	26,67

Nakon eluiranja s prve kolone, analiti su prelazili u drugu kolonu, što je prikazano na slici 25, a njihovi kromatogrami na slici 26. Žutom bojom i slovom F, na slici 25, prikazano je ispiranje jedne od kapilara koja skupljaju alikvote za drugu dimenziju. Nakon izlaska iz druge dimenzije, analiti su analizirani masenom spektrometrijom.

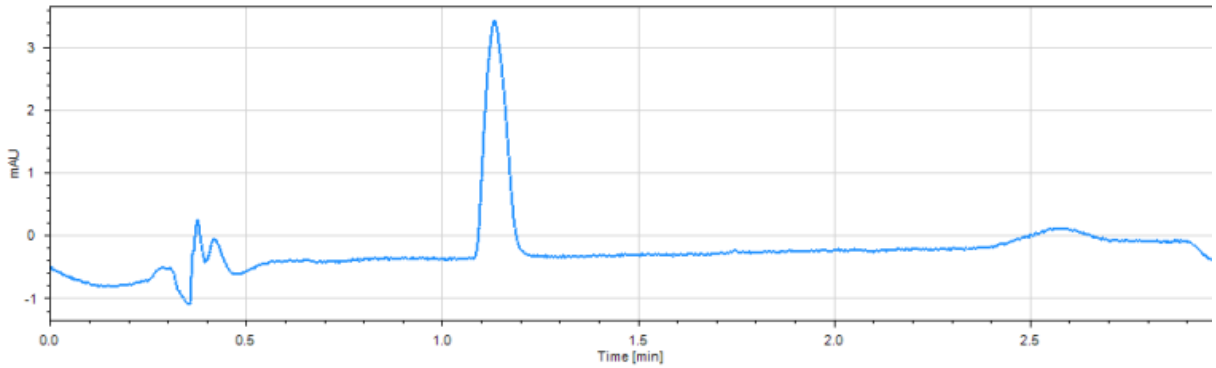


Slika 25: Prikaz rasporeda alikvota koji su prelazili s prve u drugu dimenziju

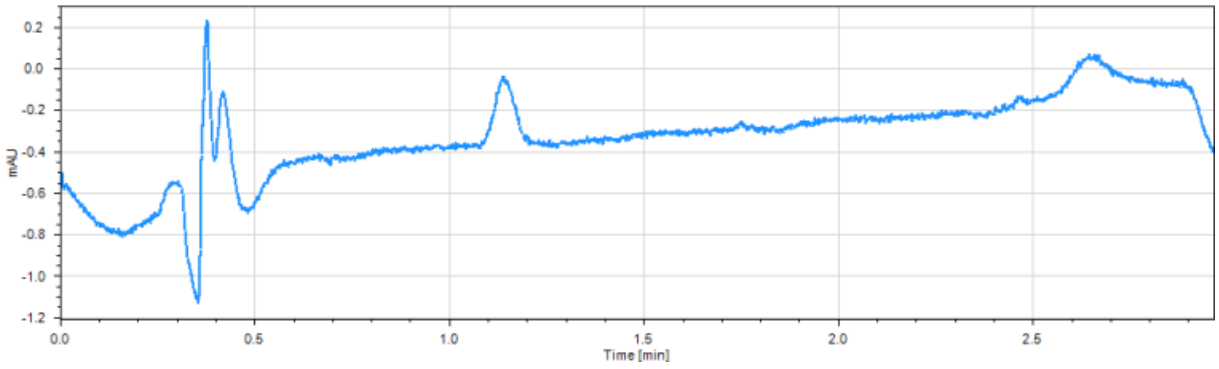
HeartCut #1 from 2.60 to 2.62 min



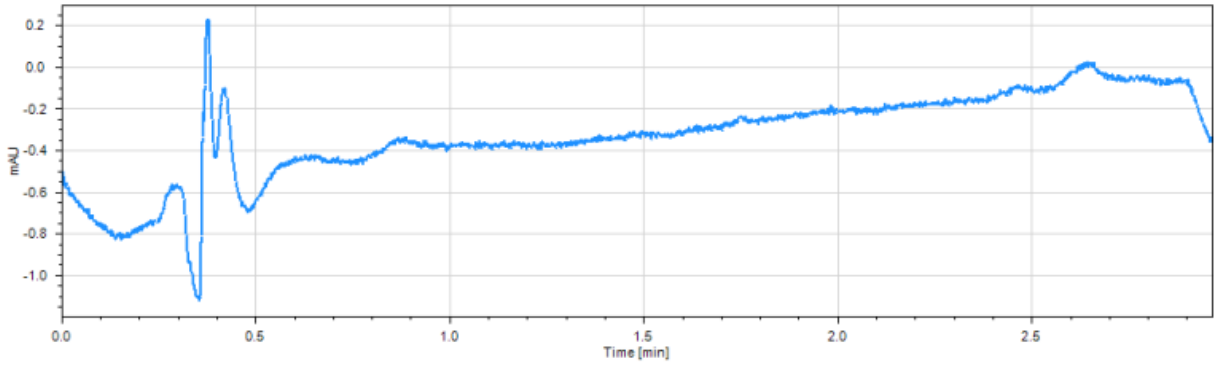
HeartCut #5 from 5.35 to 5.39 min

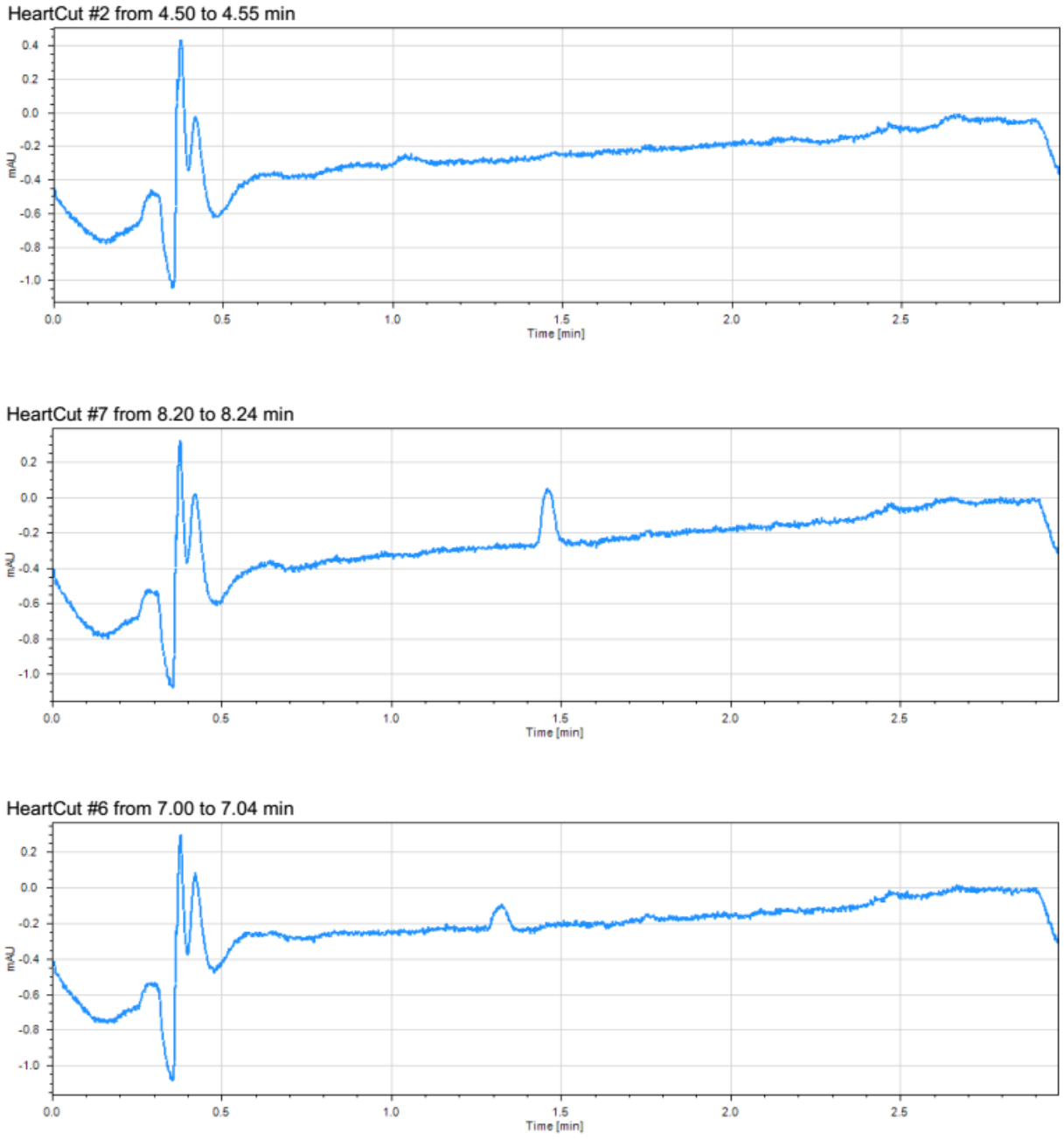


HeartCut #4 from 5.25 to 5.29 min



HeartCut #3 from 4.60 to 4.64 min



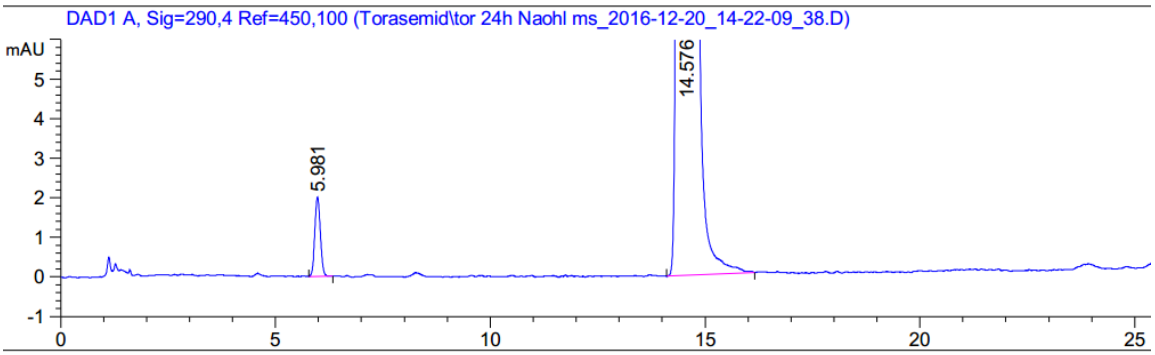


Slika 26: Kromatogrami torasemida razgrađenog kiselom hidrolizom nakon izlaska iz druge dimenzije

Druga dimenzija pokazala je čistoću svakog od analiziranih pikova. To znači da su pikovi dovoljno dobro odijeljeni već u prvoj dimenziji te da nema koeluiranja pikova. Odijeljenim analitima određivane su strukture pomoću masene spektrometrije.

4.2.5. 2D-LC analiza uzorka nakon bazične hidrolize

Torasemid je osim kisele hidrolize, razgrađivan i u bazičnoj hidrolizi, 24 sata pomoću 1M NaOH. Kromatogram torasemida i njegovih razgradnih produkata nakon bazične hidrolize, kao i pripadajuća vremena zadržavanja, prikazani su na slici 27. Vrijeme zadržavanja 14,576 min odnosi se na torasemid, dok drugi pik najvjerojatnije prikazuje neki razgradni produkt, čija će struktura biti pokazana kasnije.



Slika 27: Kromatogram torasemida razgrađivanog 24 h u 1M NaOH

Nakon eluacije s prve kolone, prema vremenima zadržavanja određeno je skupljanje alikvota za analizu u drugoj dimenziji, slika 28. Alikvot glavnog pika nije skupljan, poznato je da glavni pik odgovara torasemidu. Alikvot označen brojem 1 ne sadrži analit. Drugi pik prikazan na kromatogramu, pretpostavlja se, pripada jednom od razgradnih produkata torasemida, čija će struktura biti potvrđena masenom spektrometrijom. Tablica 11 prikazuje vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početka analize u drugoj dimenziji.

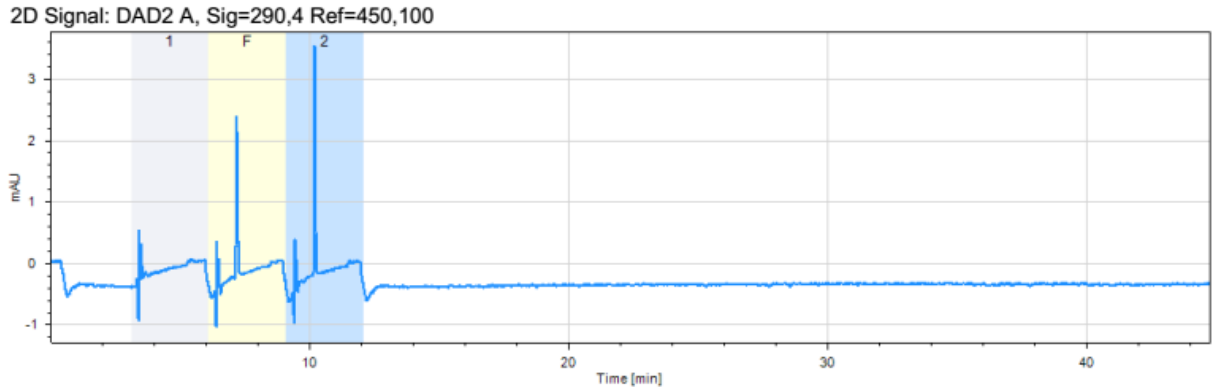


Slika 28: Kromatogram torasemida razgrađivanog 24 h u 1M NaOH nakon izlaska iz prve dimenzije, s označenim alikvotima skupljanima za drugu dimenziju

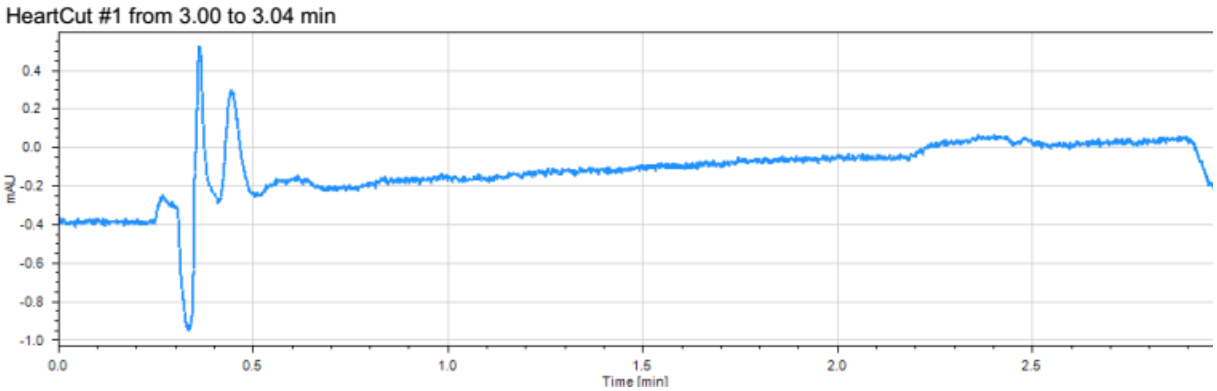
Tablica 11: Prikaz vremena početka skupljanja alikvota u prvoj i početak analize u drugoj dimenziji

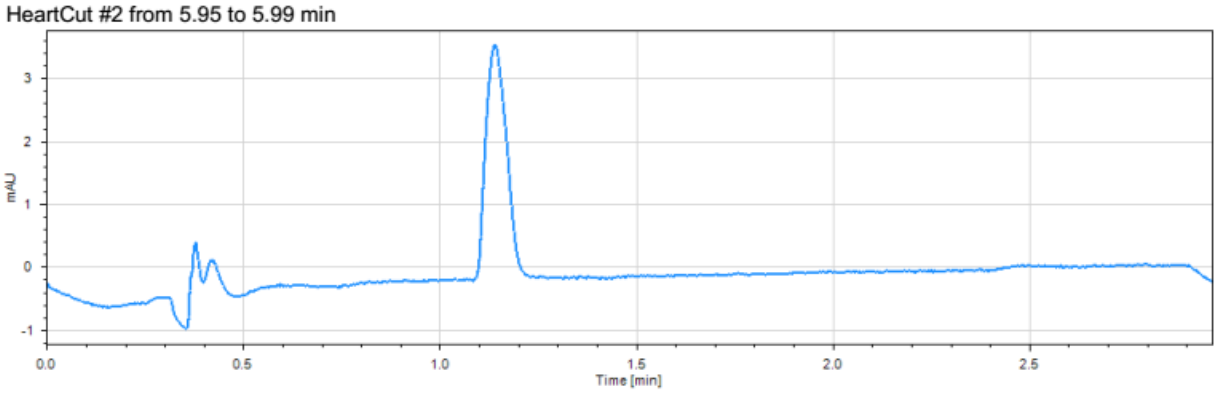
Cut #	1D Cut početak [min]	1D vrijeme zadržavanja [min]	1D trajanje [min]	Okidač	2D vrijeme početka [min]
1	3,00	***	0,04	vrijeme	3,09
2	5,95	5,98	0,04	vrijeme	9,09

Na slici 29 prikazan je raspored prelaska alikvota s prve na drugu dimenziju. Alikvoti su prelazili prema vremenima eluacije s prve kolone, a slovo F označava ispiranje kapilare. Slika 30 prikazuje kromatograme dobivene nakon analize alikvota prve dimenzije na drugoj dimenziji.



Slika 29: Prikaz rasporeda alikvota koji su prelazili s prve u drugu dimenziju





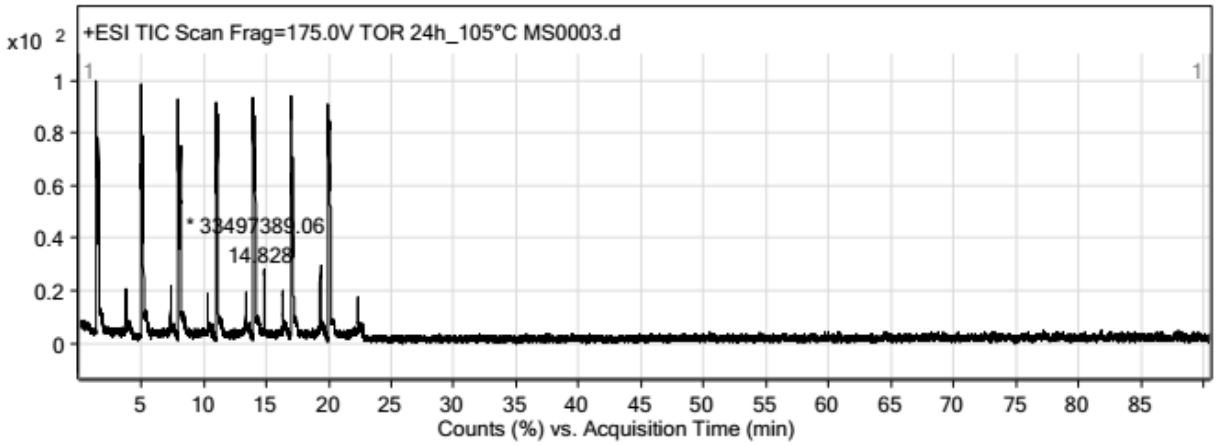
Slika 30: Kromatogrami torasemida razgrađenog bazičnom hidrolizom nakon izlaska iz druge dimenzije

Na kromatogramu alikvota 2 prikazan je samo jedan pik, što znači da niti nakon prvog razdvajanja nije bilo koeluacije, nego je onečišćenje eluiralo samo na ovom vremenu zadržavanja. Njegova struktura određena je kasnije masenom spektrometrijom.

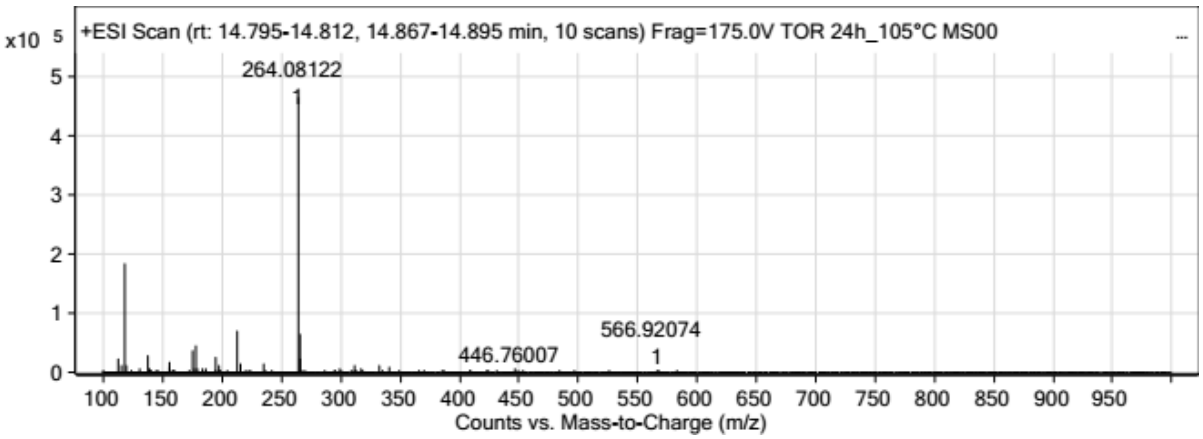
4.3. MS spektri torasemida i njegovih razgradnih produkata

4.3.1. Uzorak sušen 24 sata na 105^{0}C

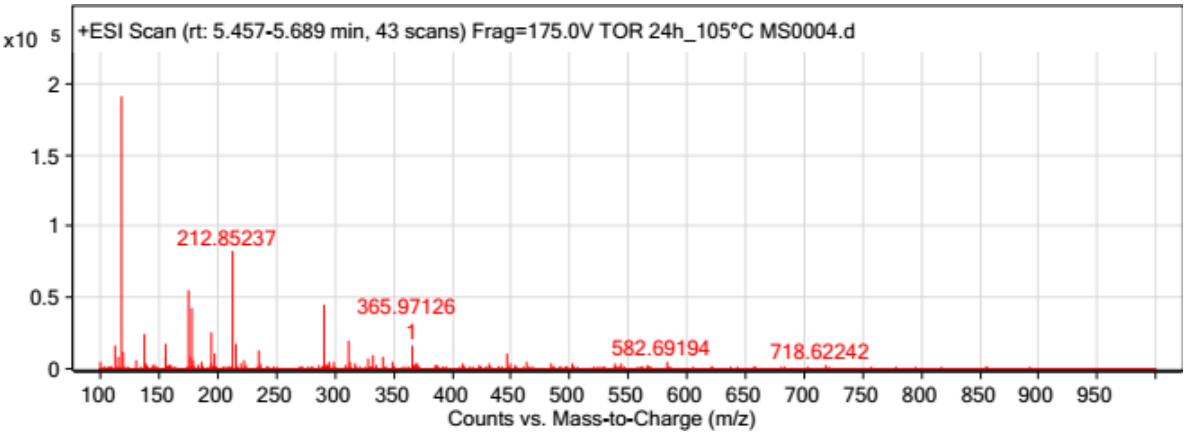
Za uzorak koji je 24 sata sušen na 105^{0}C masenom spektrometrijom analizirana su dva pika koja su prethodno razdvajana na dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji. Slika 31 prikazuje kromatogram ukupne ionske struje, TIC (eng. *Total Ion Current*), odnosno sve ione koji su detektirani analizom. Analiza analita broj 2 (slika 11) na drugoj dimenziji započela je nakon 4,54 minute, a završila nakon 0,9 min. Dakle, željeni spektar masa se na kromatogramu može očekivati na otprilike 5,44 minute. Za analit 3 (slika 11) razdvajanje na drugoj koloni započelo je u 13,64. minuti, te je završeno nakon 1,15 minuta. Zato se očekuje spektar masa za pik od interesa u kromatogramu na otprilike 14,79 minuta. Dobiveni maseni spektri za analite 2 i 3 prikazani su na slikama 32 i 33.



Slika 31: Kromatogram ukupne ionske struje uzorka koji je 24 sata sušen na 105^{0}C



Slika 32: Spektar masa analita 3

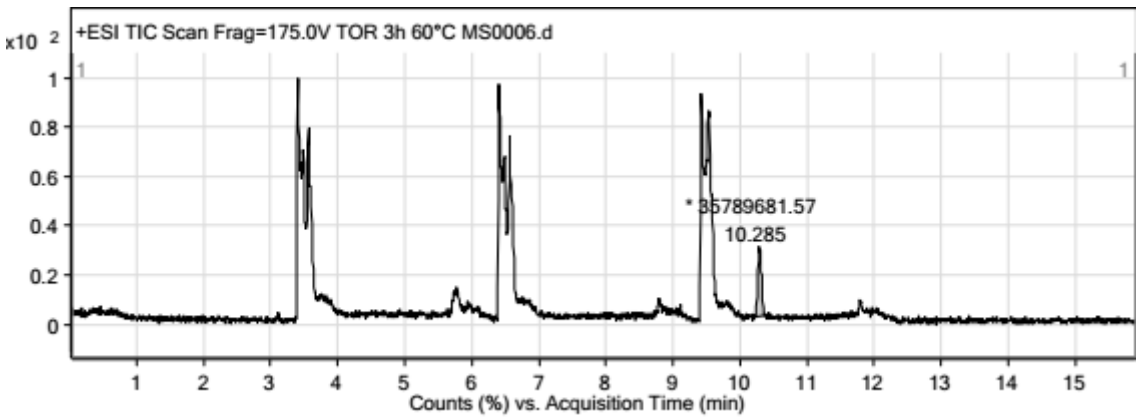


Slika 33: Spektar masa analita 2

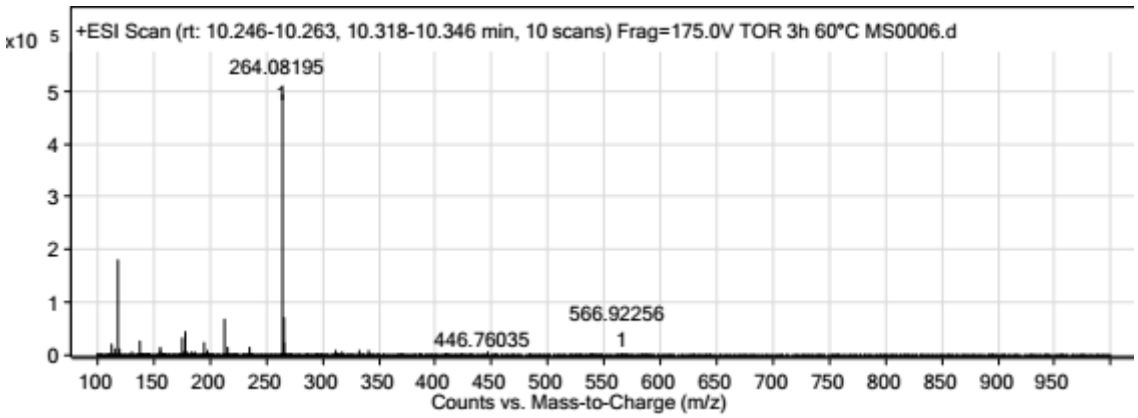
Najveći odziv omjera mase i naboja ukazuje na to da analit u alikvotu 2 ima masu 118,09.

4.3.2. Uzorak grijan 3 sata na 60^{0}C

Za uzorak grijan 3 sata na 60^{0}C analiziran je jedan analit na masenoj spektrometriji. Taj uzorak prikazan je na slici 15 i označen skupljanim alikvotom broj 2. Slika 34 prikazuje TIC kromatogram, a slika 35 spektar masa. Razdvajanje alikvota na drugoj koloni započelo je nakon 9,09 minuta, a završeno nakon 1,15 min, što ukazuje na to da se željeni spektar masa na kromatogramu nalazi na otprilike 10,24 minute.



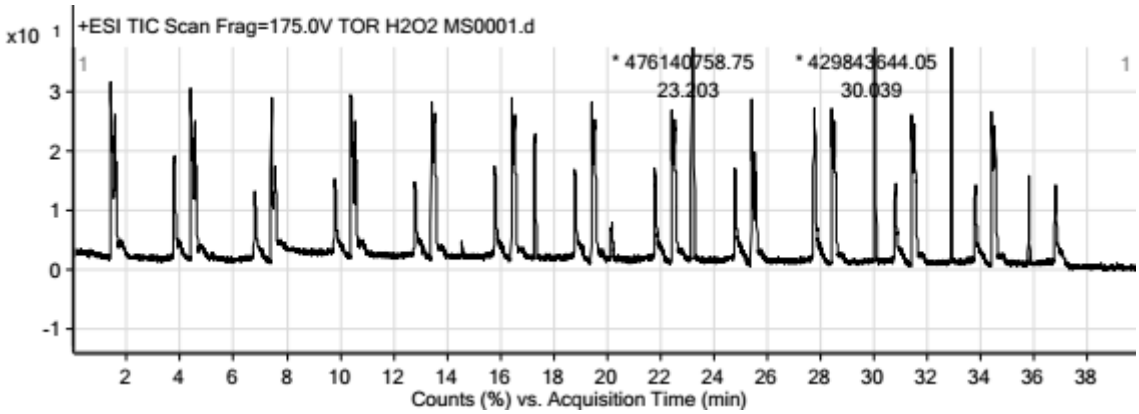
Slika 34: Kromatogram ukupne ionske struje uzorka grijanog 3 sata na 60^{0}C



Slika 35: Spektar masa za analit uzorka grijanog 3 sata na 60^{0}C

4.3.3. Uzorak razgrađivan oksidacijom pomoću H_2O_2

Razgradnja torasemida oksidacijom pomoću 30% vodikova peroksida daje najveći broj razgradnih produkata, što je bilo vidljivo iz tekućinske kromatografije. Slika 36 prikazuje TIC kromatogram razgradnih produkata. Svi razgradni produkti oksidacije nisu mogli biti analizirani u jednoj sekvenci, pa su napravljene dvije, od čega slika 36 prikazuje prvi dio.

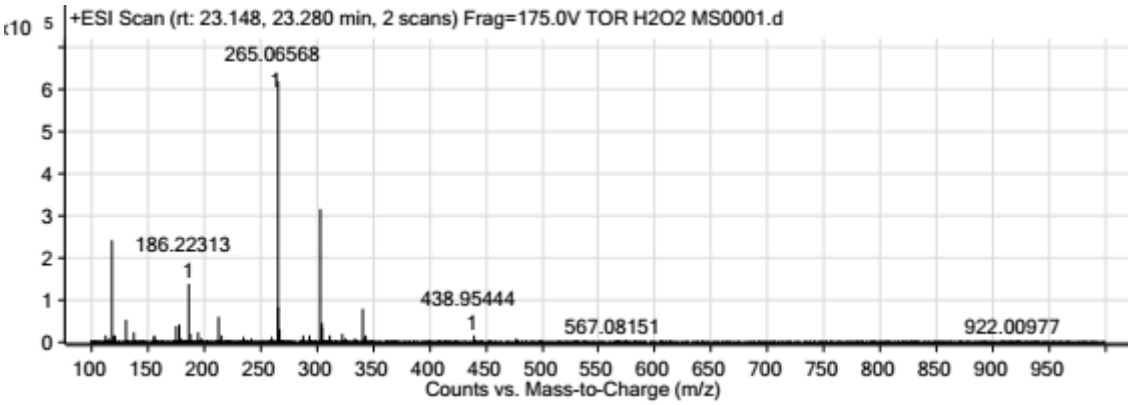


Slika 36: Kromatogram ukupne ionske struje razgradnih produkata torasemida oksidacijom (1 dio)

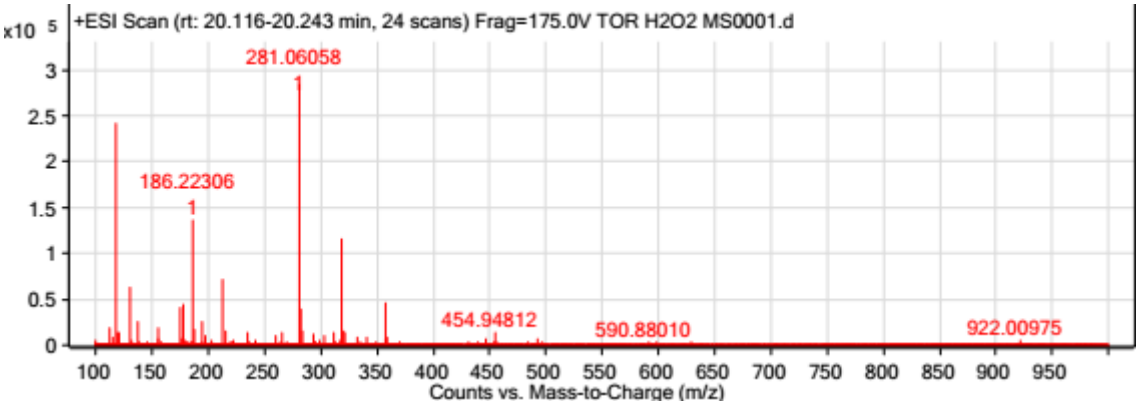
Alikvote koji su u dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji skupljani s prve za razdvajanje na drugoj dimenziji u masenim kromatogramima traženi su prema vremenima kojima su završavale analize: slika 20, tablica 9.

Slike 37, 38, 39, 40, 41, 42 i 43 prikazuju spektre masa iz prvog dijela analiziranih alikvota, pomoću kojih je određivana njihova struktura. Na slici 20 i tablici 9 alikvot označen brojem 3 započeo je analizu nakon 22,09 minuta na drugoj dimenziji, koja je završila nakon 1,1 minutu, te se njegov spektar masa u TIC-u 1 očekivao nakon 23,19 minuta. Alikvot označen brojem 4 započeo je analizu na drugoj dimenziji u 19,09. minuti, a završio nakon 1,0 minute te je njegov spektar masa tražen nakon otprilike 20,09 minuta. Alikvot pod brojem 5 krenuo je na drugu dimenziju nakon 16,09 minuta i završio ju nakon 1,15 minuta. Njegov spektar masa nalazio se pri 17,24 minuta u TIC-u 1. Alikvotu označenom brojem 6, analiza na drugoj dimenziji započela je nakon 13,09 minuta i završila nakon 1,4 minute pa je njegov spektar tražen nakon 14,49 minuta. Alikvot koji je na drugu dimenziju eluirao izdvojen zadnji, alikvot broj 7, započeo ju je nakon 34,09 minuta te završio nakon 1,67 minuta pa je spektar masa dobiven nakon 35,76 minuta. Uzorak pod rednim brojem 8 započeo je analizu na drugoj dimenziji nakon 31,09 minuta, a završio nakon 1,75. Njegov spektar masa dobiven je nakon otprilike 32,84 minute. Za alikvot pod brojem 9 analiza na drugoj dimenziji započeta je nakon 28,09 minuta i završena nakon 1,9 minute. Njegov spektar masa dobiven je nakon 29,99 minuta.

Drugom analizom oksidacijom razgrađenog uzorka ustanovljeno je da su najzastupljenije mase u uzorcima: 118,90, 365,13, 406,16 i 444,11.

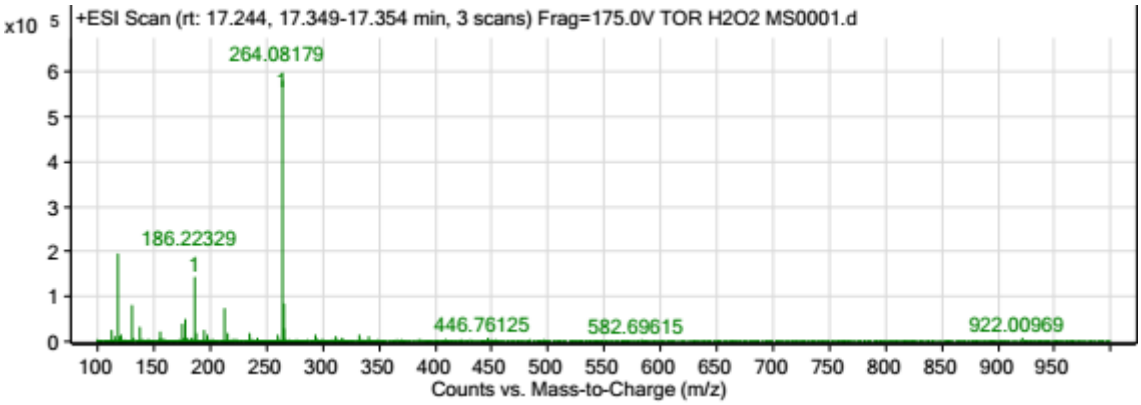


Slika 37: Spektar masa analita iz alikvota 3

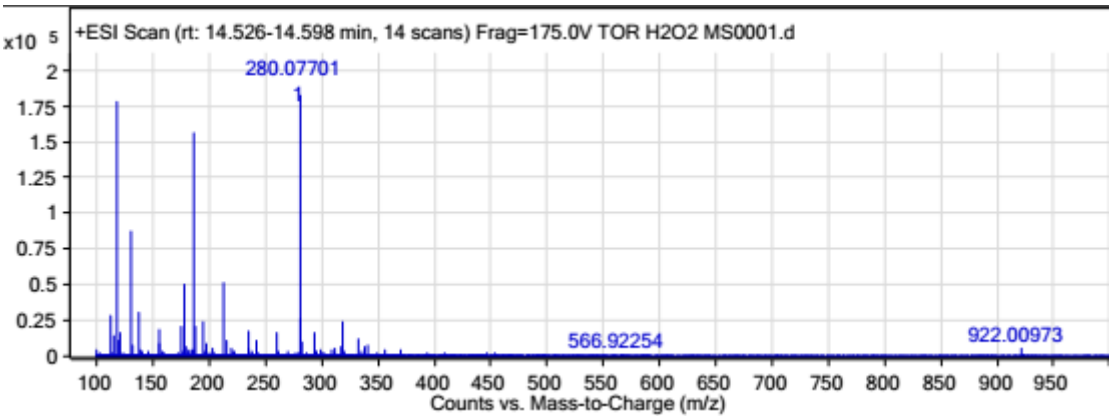


Slika 38: Spektar masa analita iz alikvota 4

Slika 38 prikazuje najveću zastupljenost masa 118,09 i 281,06.

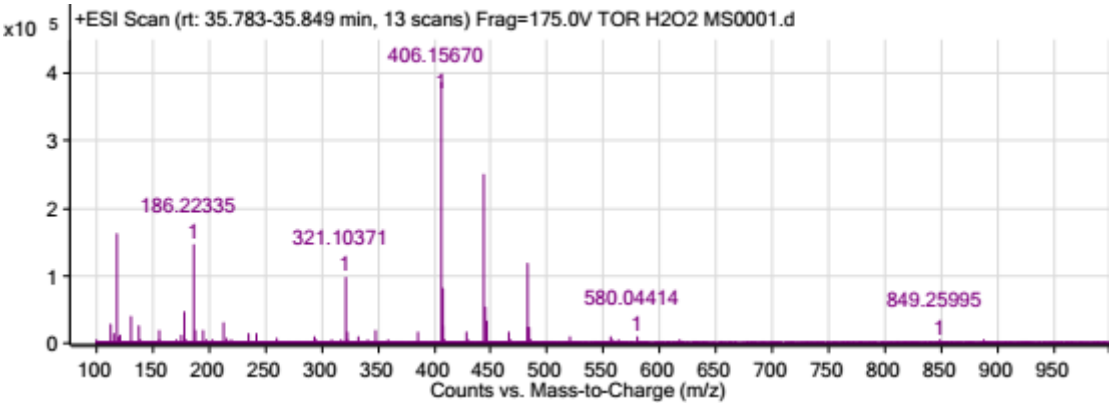


Slika 39: Spektar masa analita iz alikvota 5



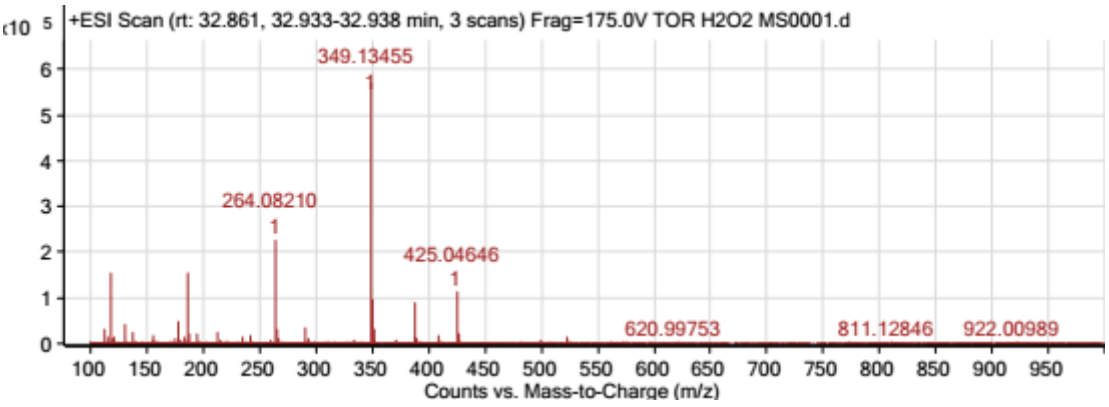
Slika 40: Spektar masa analita iz alikvota 6

Slika 40 pokazuje najveću zastupljenost masa 118,09, 186,2 i 280,08.

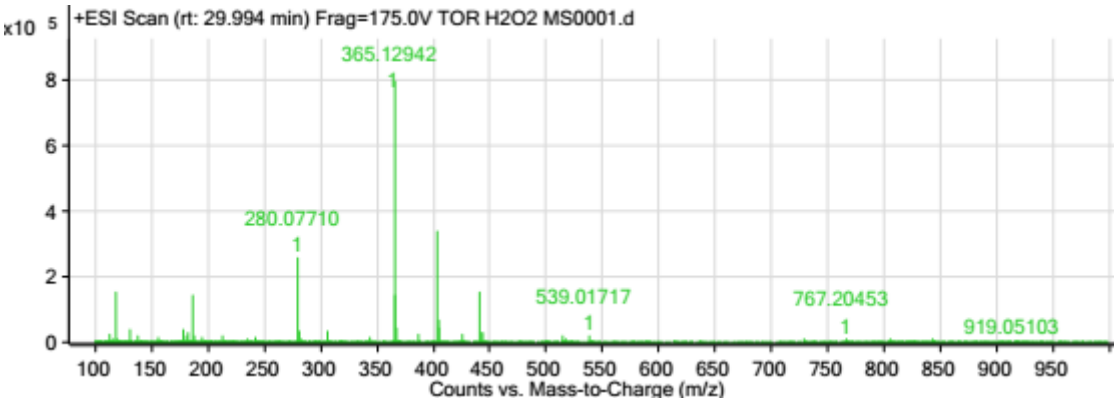


Slika 41: Spektar masa analita iz alikvota 7

Slika 41 pokazuje da prevladava masa 406,16, te masa 444,11.



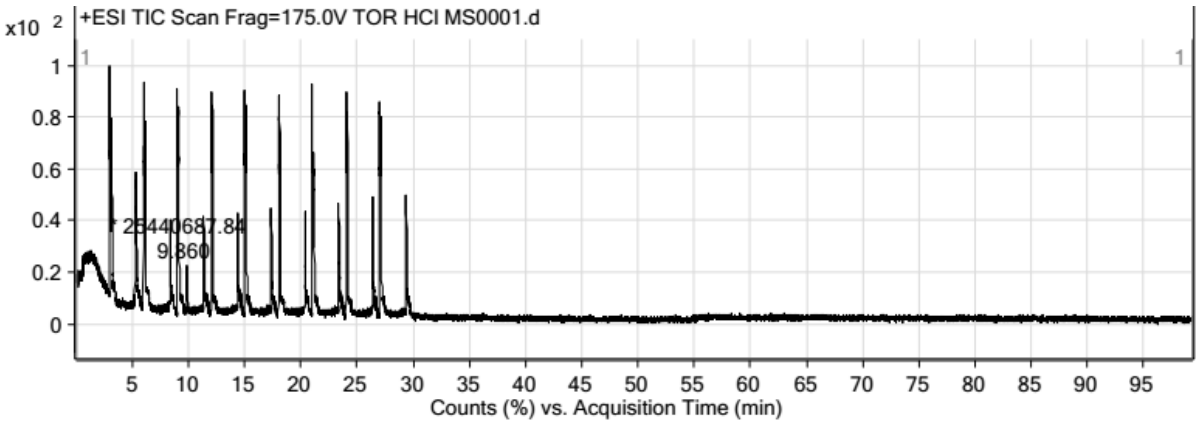
Slika 42: Spektar masa analita iz alikvota 8



Slika 43: Spektar masa analita iz alikvota 9

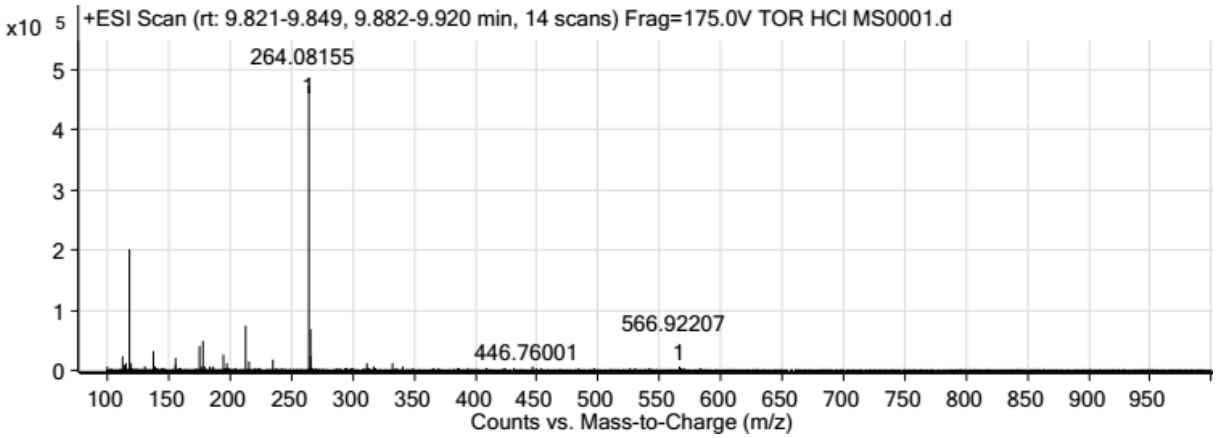
4.3.4. Uzorak razgrađivan u kiselim uvjetima pomoću HCl

Za uzorak koji je bio razgrađivan pomoću 1M HCl, utvrđeno je pomoću tekućinske kromatografije da postoji jedan značajan razgradni produkt, čija masa je utvrđena nakon analize masenom spektrometrijom. Slika 44 prikazuje TIC kromatogram snimljen masenim spektrometrom.



Slika 44: Kromatogram ukupne ionske struje uzorka torasemida nakon kisele hidrolize

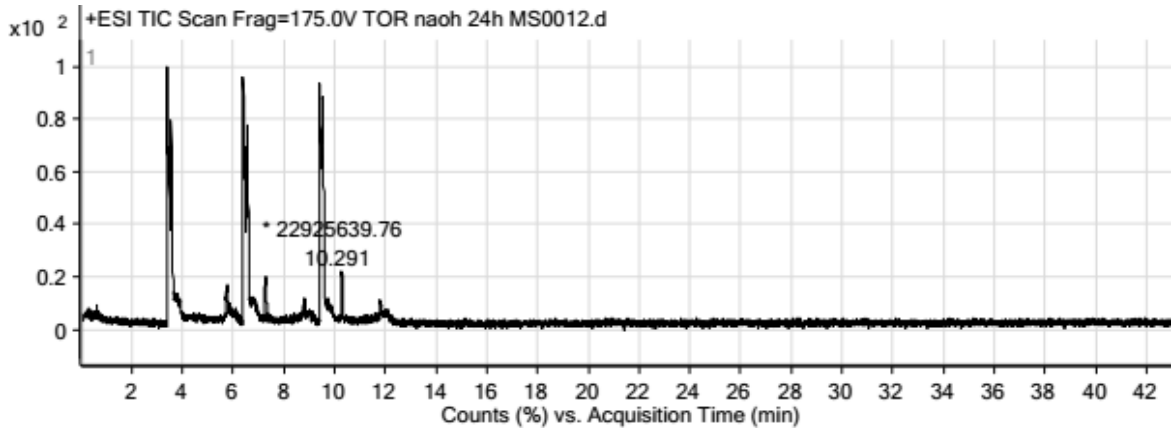
Frakcija u koju je skupljan razgradni produkt, na slici 24 i tablici 10, označen je brojem 5. Njegovo razdvajanje na drugoj koloni započelo je nakon 8,76 minuta i završeno nakon 1,15 minute, što ukazuje na to da se maseni spektar očekuje na vremenu od oko 9,91 min. Maseni spektar tog analita prikazan je na slici 45.



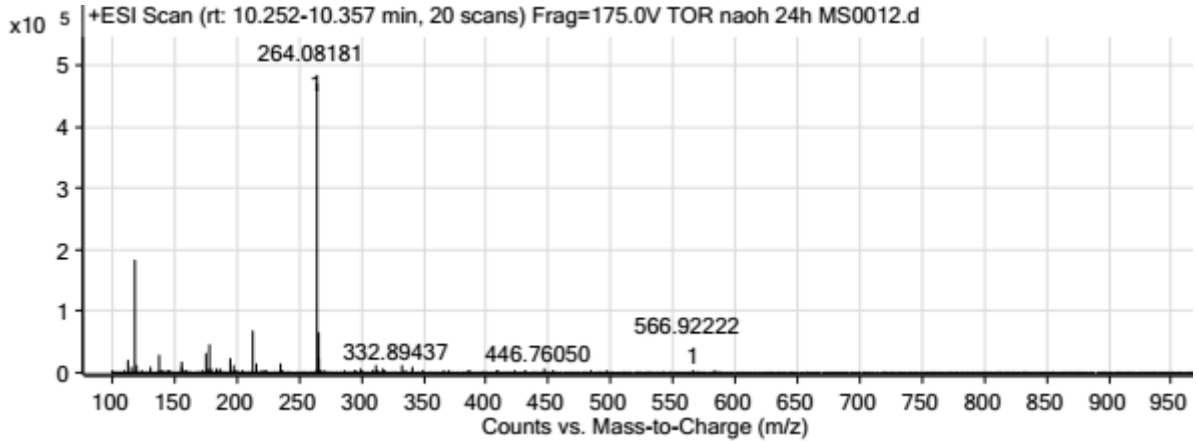
Slika 45: Spektar masa torasemida razgrađenog s 1M HCl

4.3.5. Uzorak razgrađivan u bazičnim uvjetima pomoću NaOH

Torasemid razgrađivan u bazičnim uvjetima pomoću 1M NaOH pokazuje jedan značajan razgradni produkt, prikazan na slici 28 i označen skupljanom frakcijom broj 2. Njegova analiza na drugoj koloni započela je nakon 9,09 minuta, a završila nakon 1,15 minuta, što ukazuje na pojavu masenog spektra u kromatogramu pri otprilike 10,24 minute. Kromatogram je prikazan na slici 46, a spektar masa na slici 47.



Slika 46: Kromatogram ukupne ionske struje uzorka torasemida nakon bazične hidrolize



Slika 47: Spektar masa degradacijskog produkta torasemida razgrađivanog s 1M NaOH

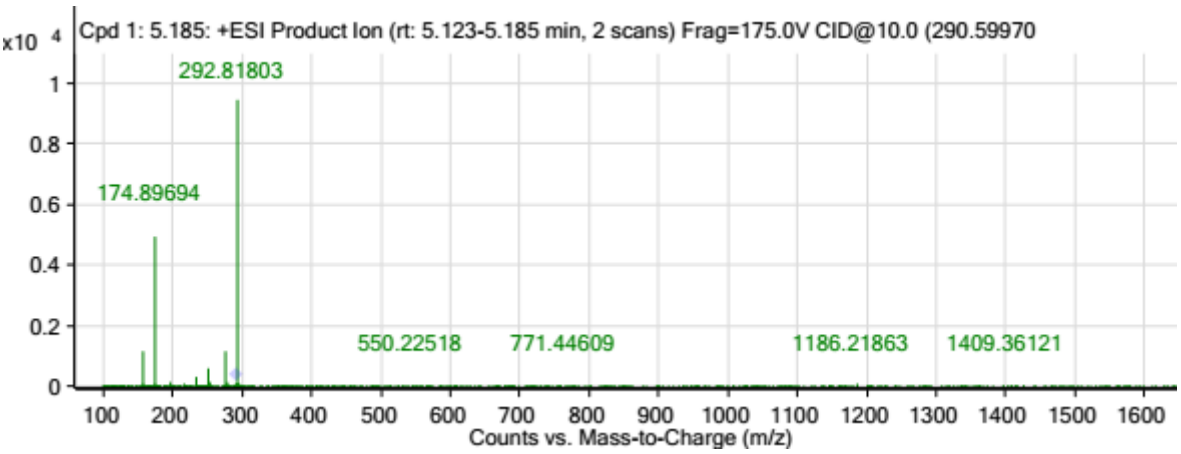
4.4. MS/MS spektri torasemida i njegovih razgradnih produkata

Za neke analite rađeni su MS/MS spektri. Dobiveni su fragmentacijom primarnih fragmentiranih iona te su korišteni u određivanju struktura razgradnih produkata torasemida. Korištene su tri kolizijske energije: 10, 20 i 30 V.

4.4.1. Uzorak sušen 24 sata na 105^0C

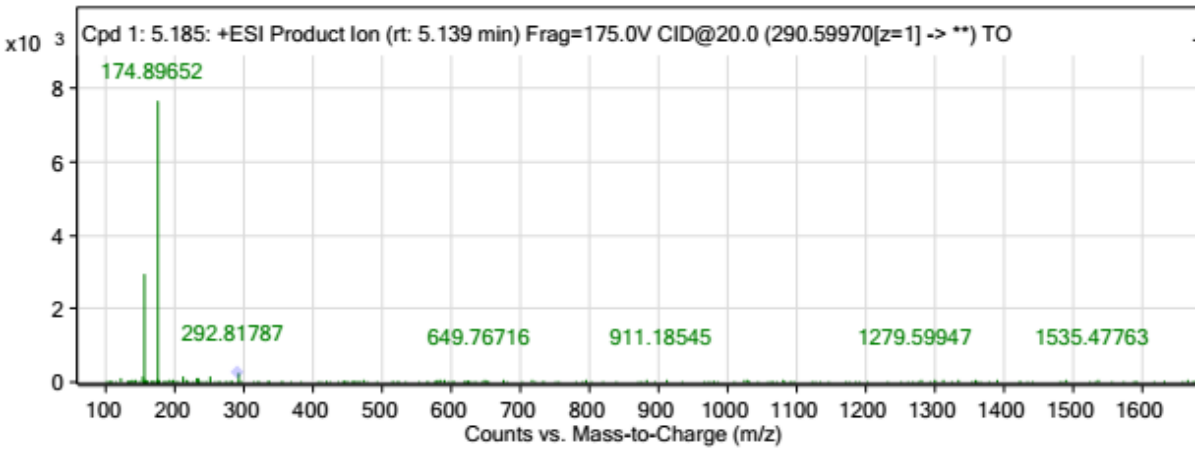
Za uzorak sušen 24 sata na 105^0C, rađen je MS/MS spektar za razgradne produkte masa 290,60 i 264,08.

Pri kolizijskoj energiji 10,0 V produkti nastali od mase 290,60 prikazani su u spektru masa na slici 48. Količinom se ističu fragmenti masa 174,90 i 292,82. Oni su kasnije uzeti u razmatranje pri određivanju masa razgradnih produkata torasemida.



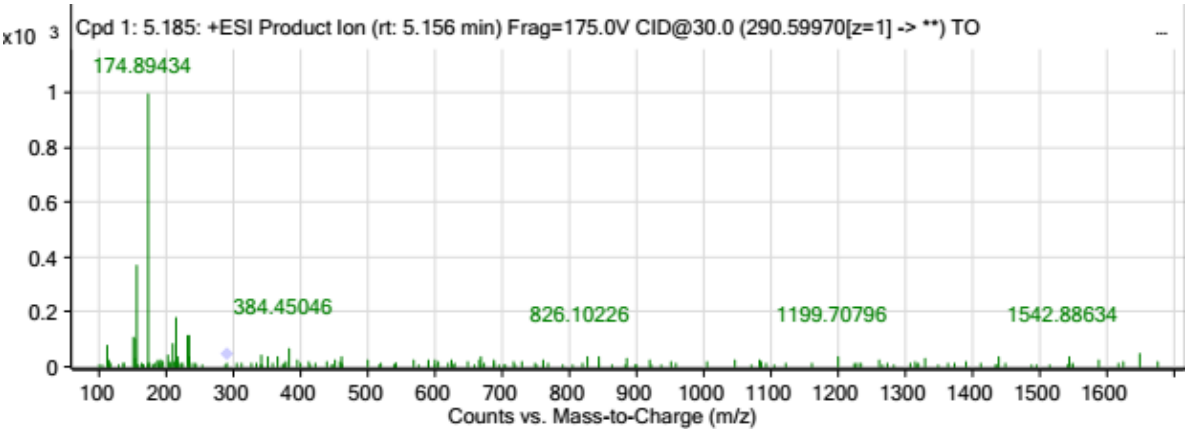
Slika 48: Spektar masa nastao od produkta mase 290,60 kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 49 prikazuje fragmente nastale kolizijskom energijom 20,0 V. Ističu se mase 174,90 i nešto manje masa 156,89. One su kasnije uzete u razmatranje pri određivanju masa razgradnih produkata torasemida.



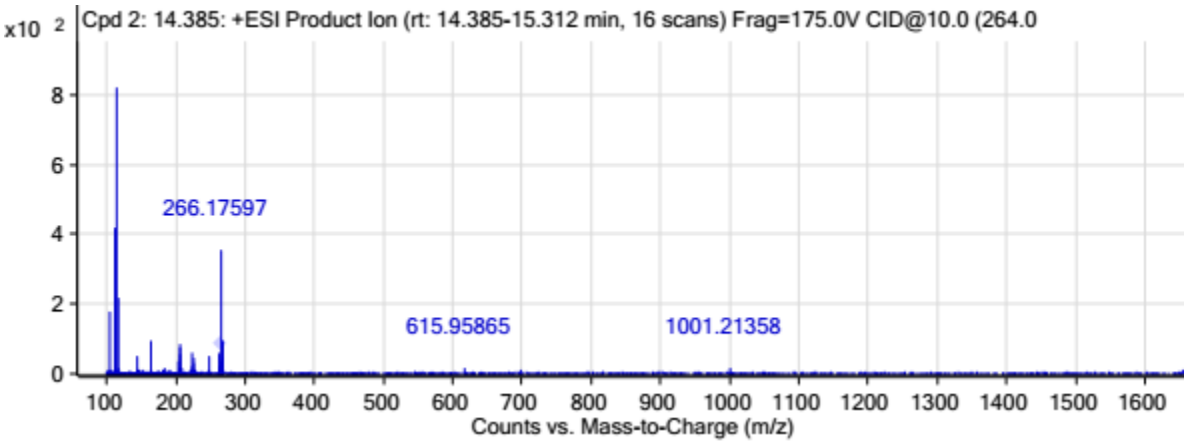
Slika 49: Spektar masa nastao od produkta mase 290,60 kolizijskom energijom 20,0 V

Slika 50 prikazuje fragmente nastale kolizijskom energijom 30,0 V. Ističu se mase 174,90 i 156,89. One su kasnije uzete u razmatranje pri određivanju masa razgradnih produkata torasemida.



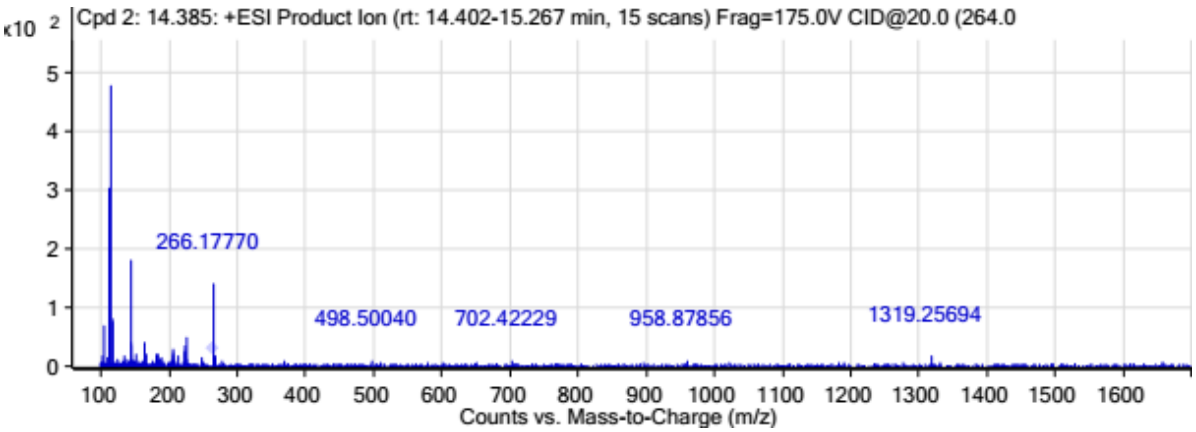
Slika 50: Spektar masa nastao od produkta mase 290,60 kolizijskom energijom 30,0 V

Fragmenti nastali od mase 264,08 također su izloženi kolizijskim energijama 10,0, 20,0 i 30,0 V. Slika 51 prikazuje fragmente nastale kolizijskom energijom 10,0 V. Mase koje se ističu su 114,90 i 112,90. One su kasnije uzete u razmatranje pri određivanju masa razgradnih produkata torasemida.



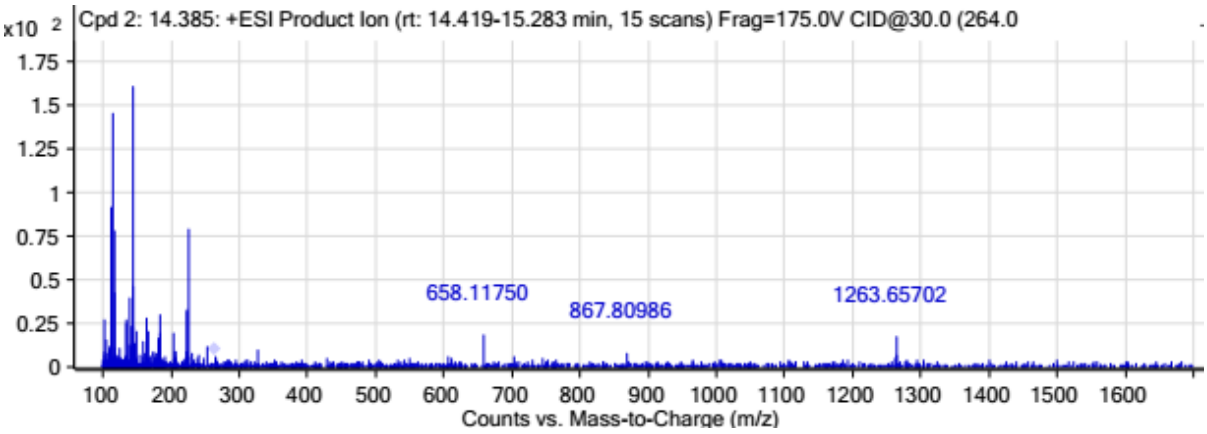
Slika 51: Spektar masa nastao od produkta mase 264,08 kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 52 prikazuje fragmente nastale kolizijskom energijom 20,0 V. Mase koje se ističu su 114,90 i 112,90. One su kasnije uzete u razmatranje pri određivanju masa razgradnih produkata torasemida.



Slika 52: Spektar masa nastao od produkta mase 264,08 kolizijskom energijom 20,0 V

Slika 53 prikazuje fragmente nastale kolizijskom energijom 30,0 V. Mase koje se ističu su 114,90 i 112,90. Treća masa koja se ističe je 145,00. One su kasnije uzete u razmatranje pri određivanju masa razgradnih produkata torasemida.

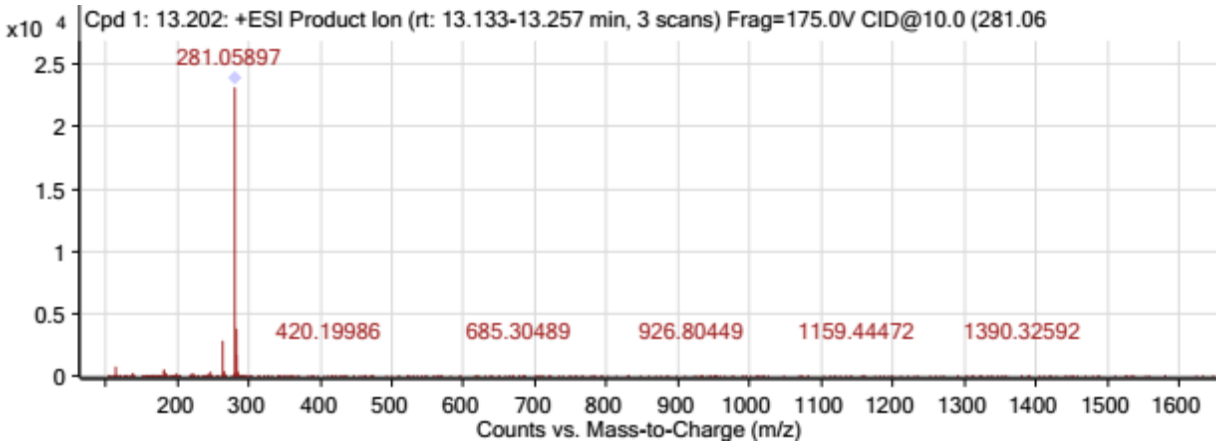


Slika 53: Spektar masa nastao od produkta mase 264,08 kolizijskom energijom 30,0 V

4.4.2. Uzorak razgrađivan oksidacijom pomoću H_2O_2

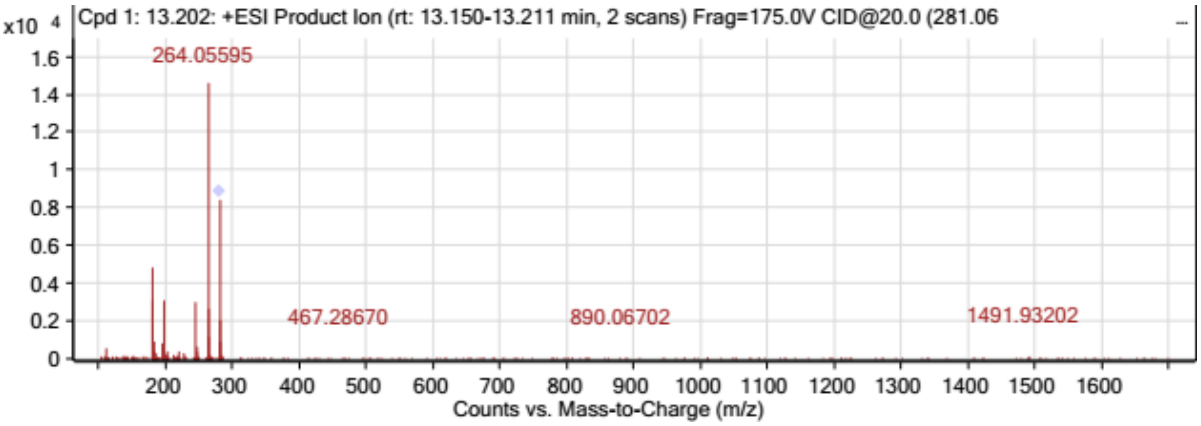
Za uzorak koji je bio razgrađivan oksidacijom pomoću 30%-tnog H_2O_2 snimljeno je 5 MS/MS spektara masa. Fragmentirani ioni bili su ioni masa 281.06, 265.06, 264.0, 365.12, 406.15 i 280.07. Za svaki ion bile su korištene kolizijske energije 10,0, 20,0 i 30,0 V.

Slika 54 prikazuje fragmente mase 281,06, nastale kolizijskom energijom 10,0 V. Masa polaznog iona prikazana je najvišim odzivom signala, te označena sivim rombom. Nije nastalo mnogo fragmenata, što ukazuje na to da je energija kolizije bila premala.



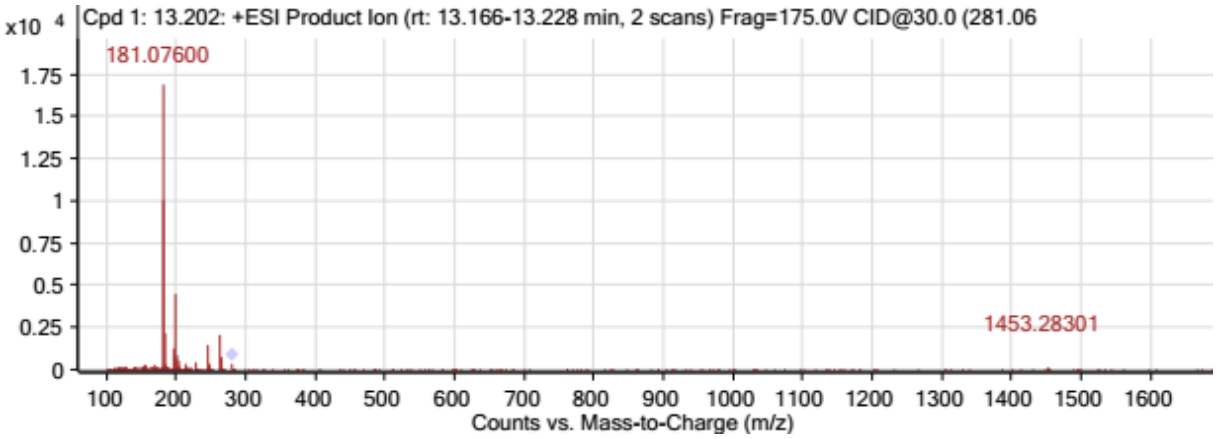
Slika 54: Spektar masa nastao od produkta mase 281,06 kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 55 prikazuje fragmente mase 281,06, nastale kolizijskom energijom 20,0 V. Masa polaznog iona označena je sivim rombom. Nastalo je više fragmenata nego kolizijskom energijom 10,0. Prevladava ion mase 264,06.



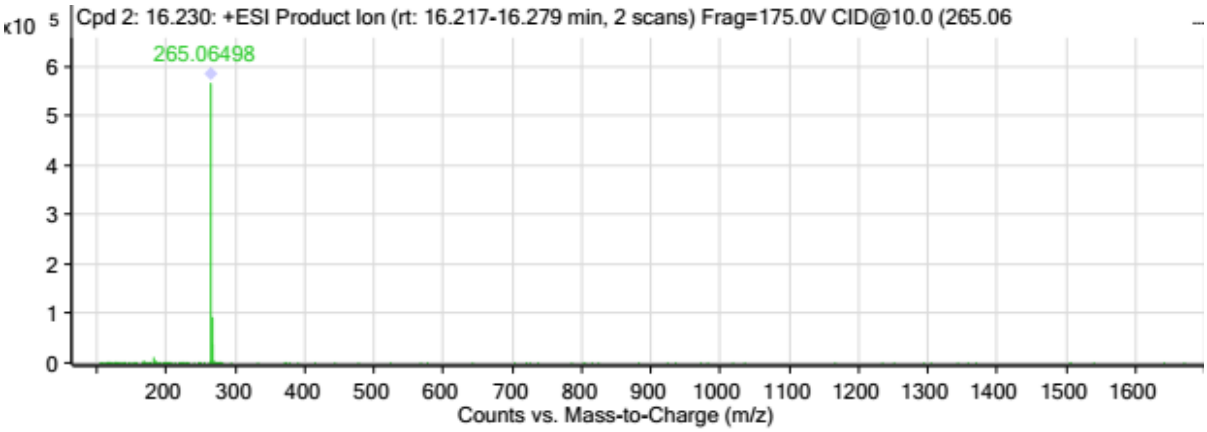
Slika 55: Spektar masa nastao od produkta mase 281,06 kolizijskom energijom 20,0

Slika 56 prikazuje fragmente mase 281,06, nastale kolizijskom energijom 30,0 V. Polazni ion jako je fragmentiran, te njegov je signal dosta slab. Označen je na slici 64 pomoću romba. Fragment koji se ističe ima masu 181,08.



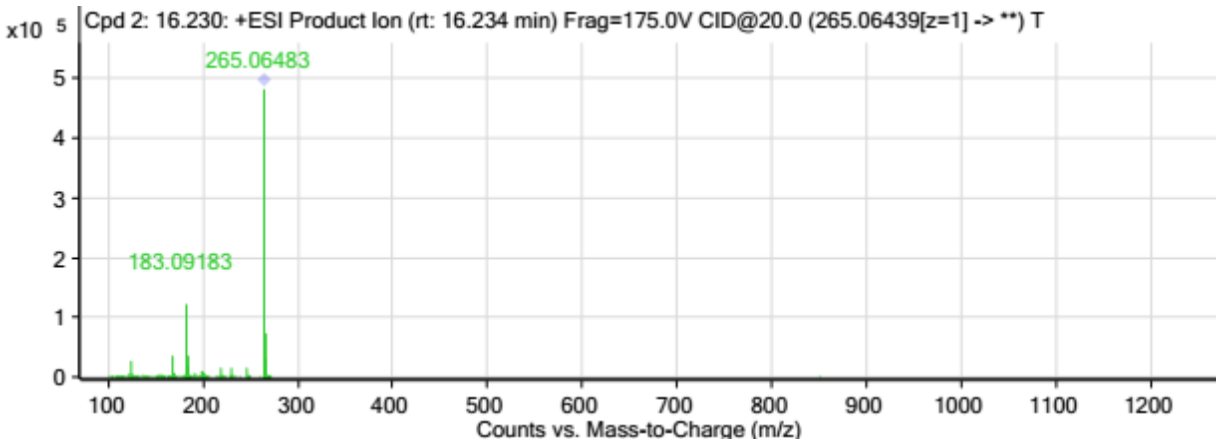
Slika 56: Spektar masa nastao od produkta mase 281,06 kolizijskom energijom 30,0 V

Iduća fragmentirana masa iznosila je 265.06. Fragmentiranje je provedeno kolizijskim energijama 10,0, 20,0 i 30,0 V. Slika 57 prikazuje spektar masa nastao fragmentiranjem spomenutoga iona kolizijskom energijom 10,0 V. Zastupljenošću ističe se polazni ion, označen je sivim rombom, dok su ostali fragmenti puno manje zastupljeni. Ova energija kolizije nije bila dovoljna da se dobiju fragmenti od interesa pomoću kojih bi se mogla potvrditi struktura polaznog iona.



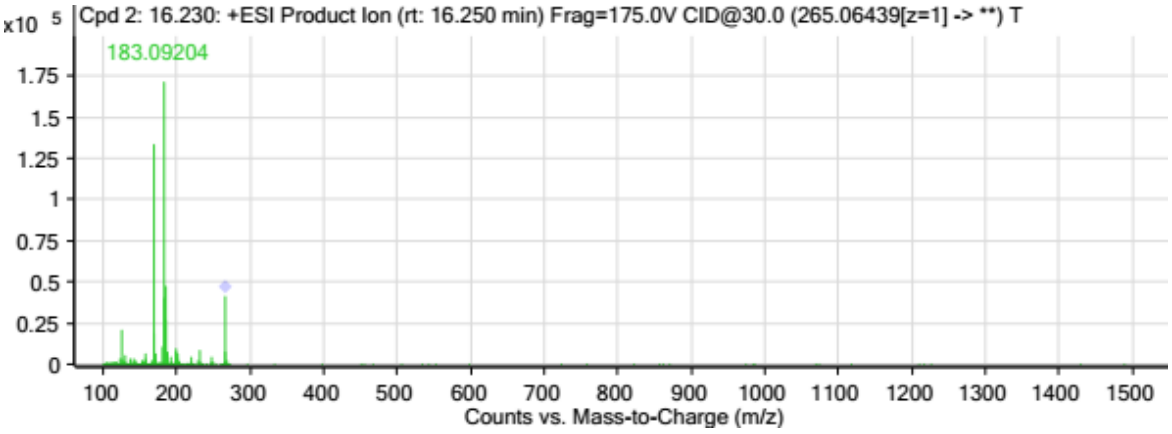
Slika 57: Spektar masa nastao fragmentiranjem iona mase 265,06 kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 58 prikazuje fragmente iona mase 265,06 nastale kolizijskom energijom 20,0 V. Kolizijska energija bila je dovoljna da nastanu značajniji fragmenti. Glavni ion pripada polazišnom spoju te je označen rombom. Od nastalih fragmenata, ističe se fragment mase 183,09.



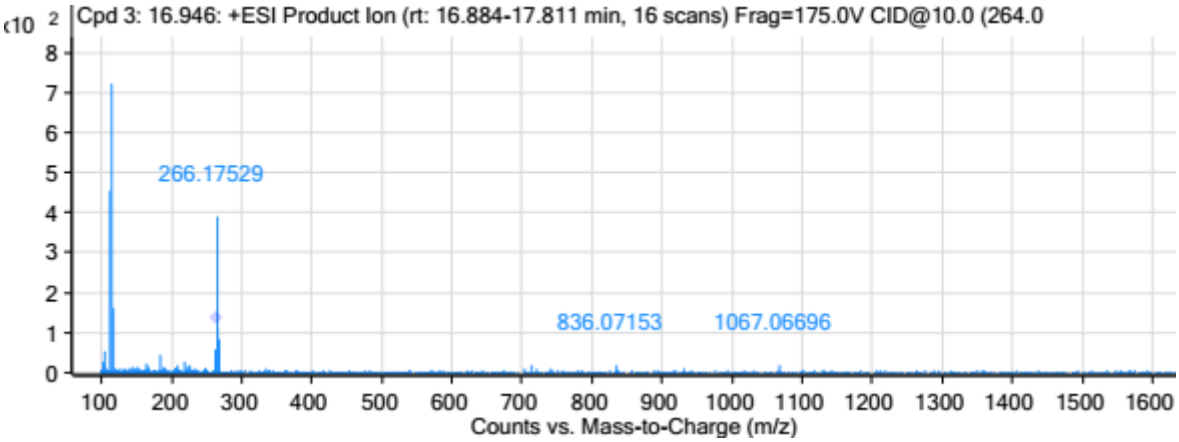
Slika 58: Fragmenti iona mase 265,06 nastale kolizijskom energijom 20,0 V

Slika 59 prikazuje fragmente iona mase 265,06 nastale kolizijskom energijom 30,0 V. Glavni je fragment mase 183,09 te uz njega ističe se fragment mase 168,07.



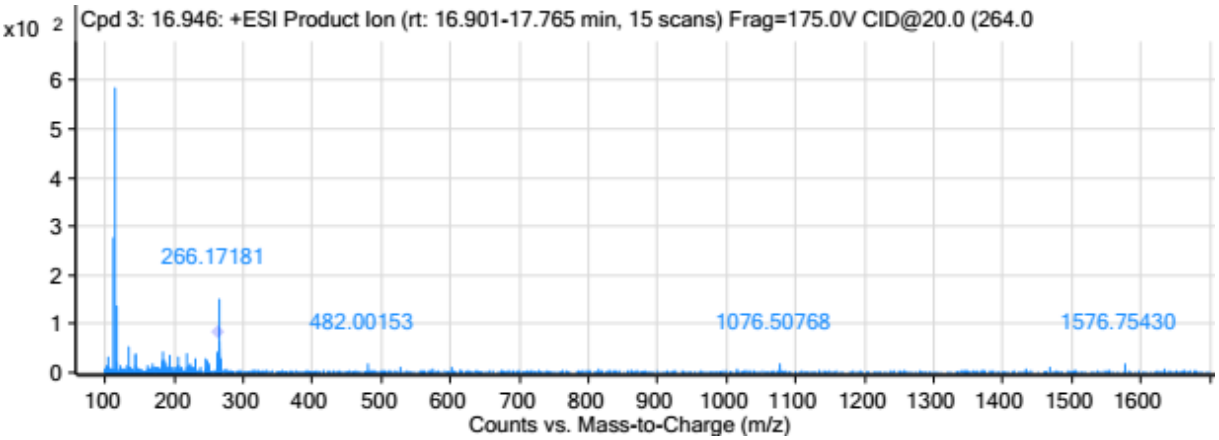
Slika 59: Fragmenti iona mase 265,06 nastale kolizijskom energijom 30,0 V

Fragmentacijom iona mase 264.08197 kolizijskom energijom 10,0 V dobiven je spektar fragmenata prikazan na slici 60. Polazni ion označen je rombom, njegova zastupljenost nije velika, ova kolizijska energija bila je dovoljna da prouzroči daljnje fragmentiranje. Ističu se fragmenti triju masa: 112,90, 114,90 i 266,18.



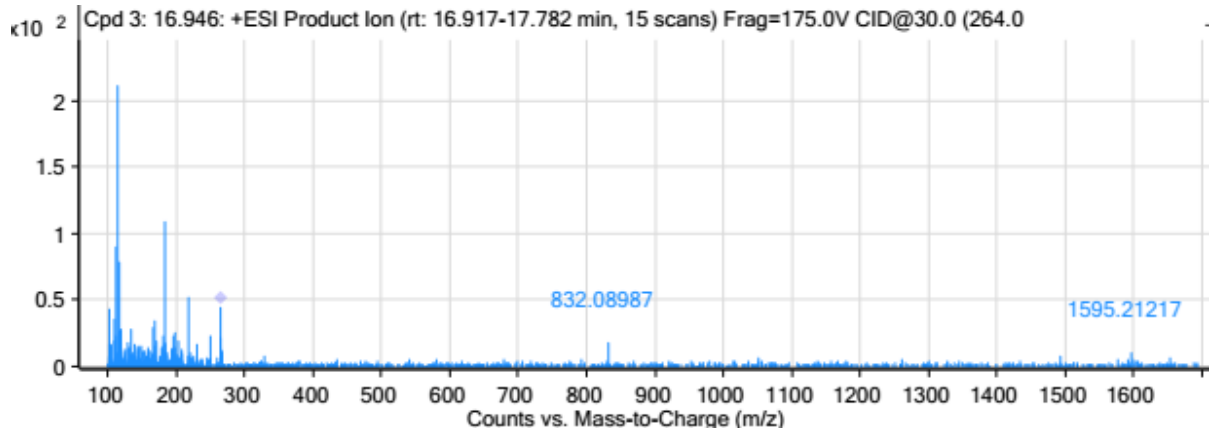
Slika 60: Fragmenti iona mase 264,08 nastali kolizijskom energijom 10,0 V

Fragmentacijom iona mase 264.08197 kolizijskom energijom 20,0 V dobiven je spektar fragmenata prikazan na slici 61. Polazni ion razgrađen je još više, njegova zastupljenost u spektru masa još je manja. Ističe se fragment mase 114,90.



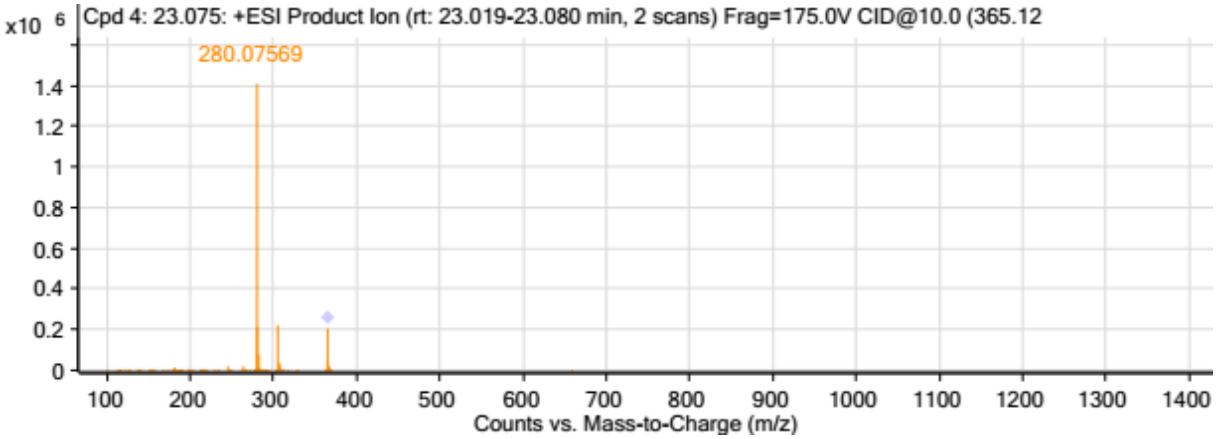
Slika 61: Fragmenti iona mase 264,08 nastali kolizijskom energijom 20,0 V

Fragmentacijom iona mase 264.08197 kolizijskom energijom 20,0 V dobiven je spektar fragmenata prikazan na slici 62. Ističe se fragment mase 114,90.



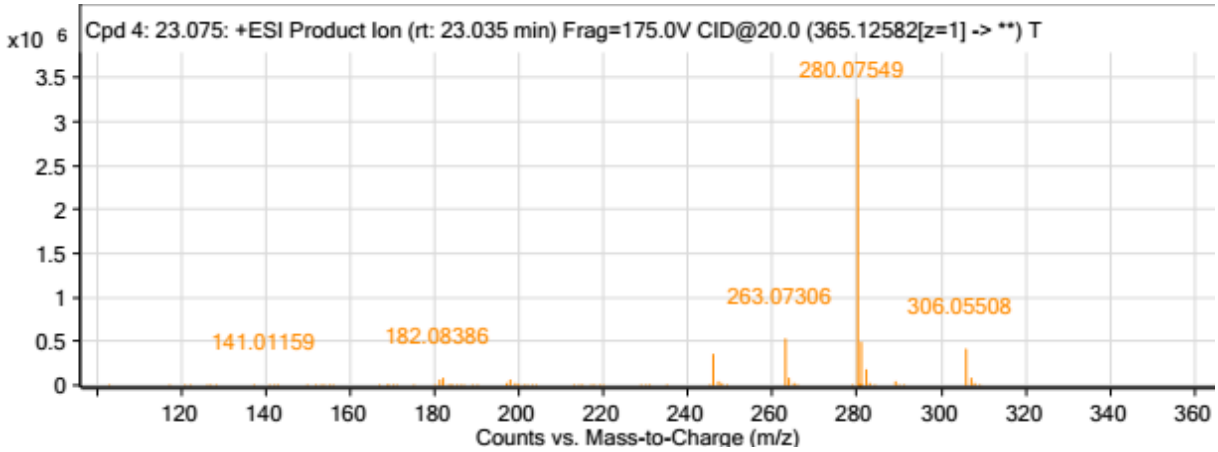
Slika 62: Fragmenti iona mase 264,08 nastali kolizijskom energijom 30,0 V

Slika 63 prikazuje fragmente nastale djelovanjem kolizijske energije 10,0 V na ion mase 365.12582. Polazni ion jako je fragmentiran.



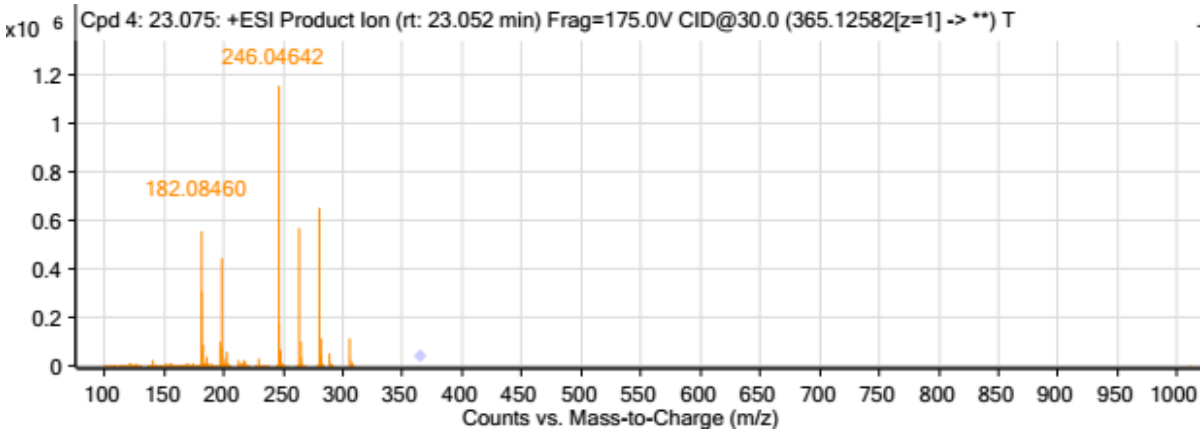
Slika 63: Fragmenti iona mase 365,13 nastali kolizijskom energijom 10,0 V

Fragmentacijom iona mase 365,13 kolizijskom energijom 20,0 V dobiven je spektar fragmenata prikazan na slici 64. Polazišni ion značajno je razgrađen korištenom kolizijskom energijom te su nastali brojni fragmenti.



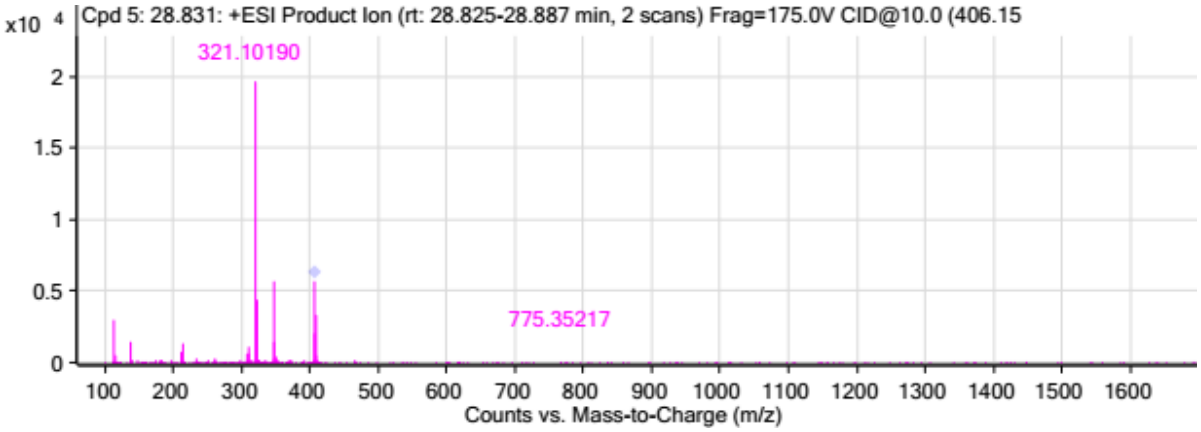
Slika 64: Fragmenti iona mase 365,13 nastali kolizijskom energijom 20,0 V

Fragmentacijom iona mase 365,13 kolizijskom energijom 30,0 V dobiven je spektar fragmenata prikazan na slici 65. Ion mase 365,13 gotovo je u potpunosti fragmentiran. Nastalo je mnogo fragmenata. Mase koje su značajno nastale fragmentiranjem su: 182,08, 198,08, 246,05 te 280,08.



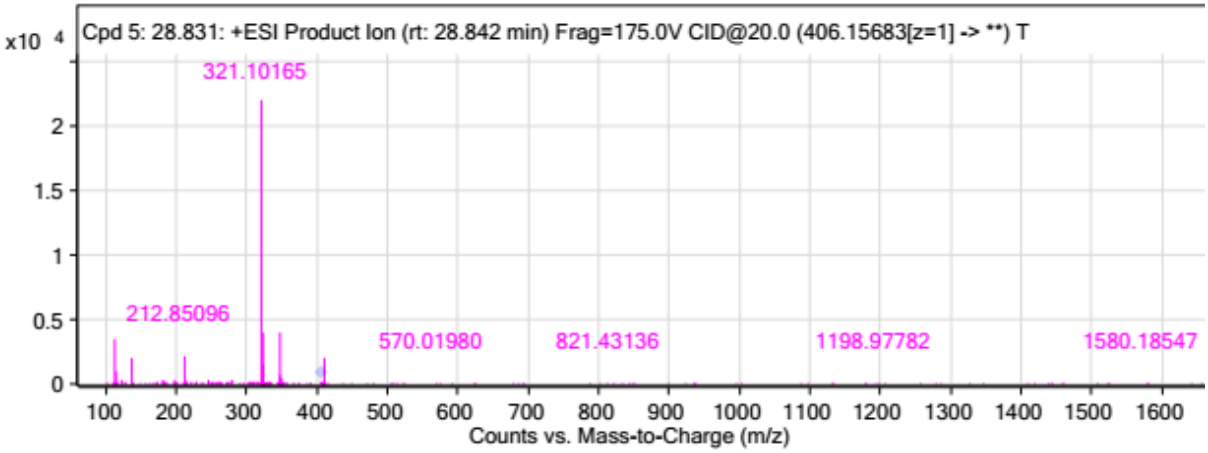
Slika 65: Fragmenti iona mase 365,13 nastali kolizijskom energijom 30,0 V

Dalje fragmentirani ion bio je mase 406.15683. Kolizijskom energijom 10,0 V dobiven je spektar masa prikazan na slici 66. Polazni ion označen je rombom.



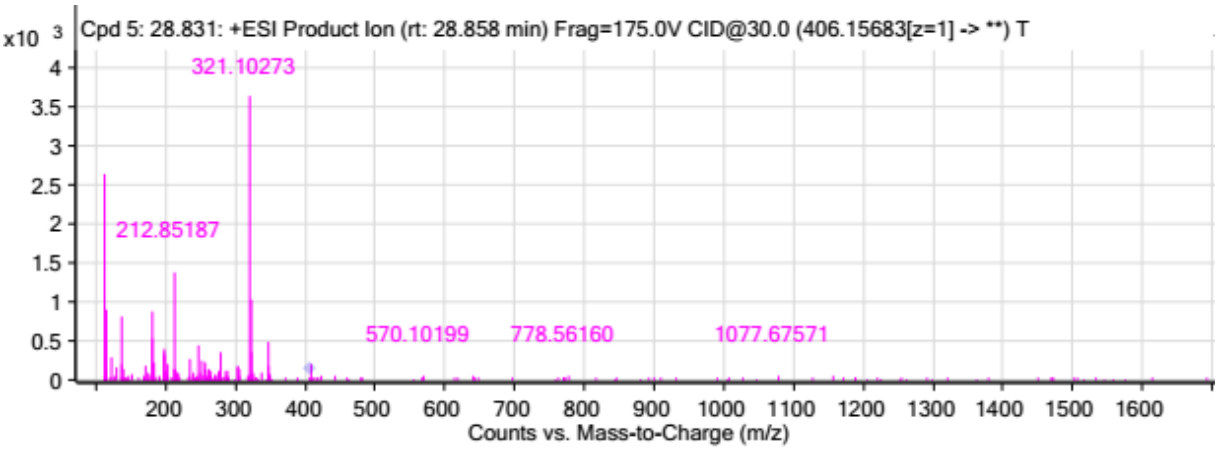
Slika 66: Fragmenti iona mase 406.16 nastali kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 67 prikazuje fragmente iona mase 406.16 nastale kolizijskom energijom 20,0 V. Kolizijska energija bila je dovoljna da nastanu značajniji fragmenti. Glavni ion pripada polazišnom spoju te je označen rombom, gotovo je u potpunosti fragmentiran. Masa koja se ističe, masa je 321,10.



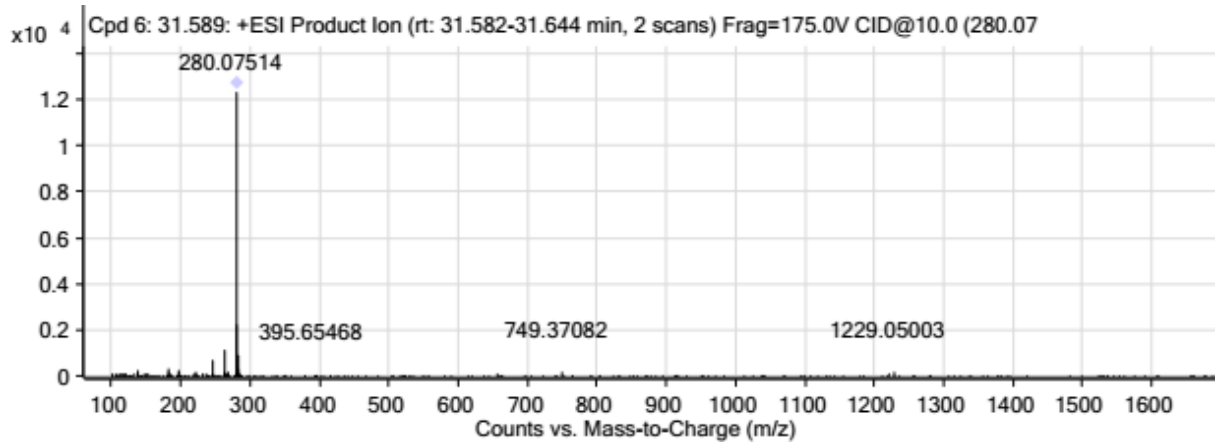
Slika 67: Fragmenti iona mase 406.16 nastali kolizijskom energijom 20,0 V

Slika 68 prikazuje fragmente iona mase 406.16 nastale kolizijskom energijom 20,0 V. Polazni ion gotovo je u potpunosti fragmentiran. Najznačajniji fragmenti mase su 112,90 i 321,10.



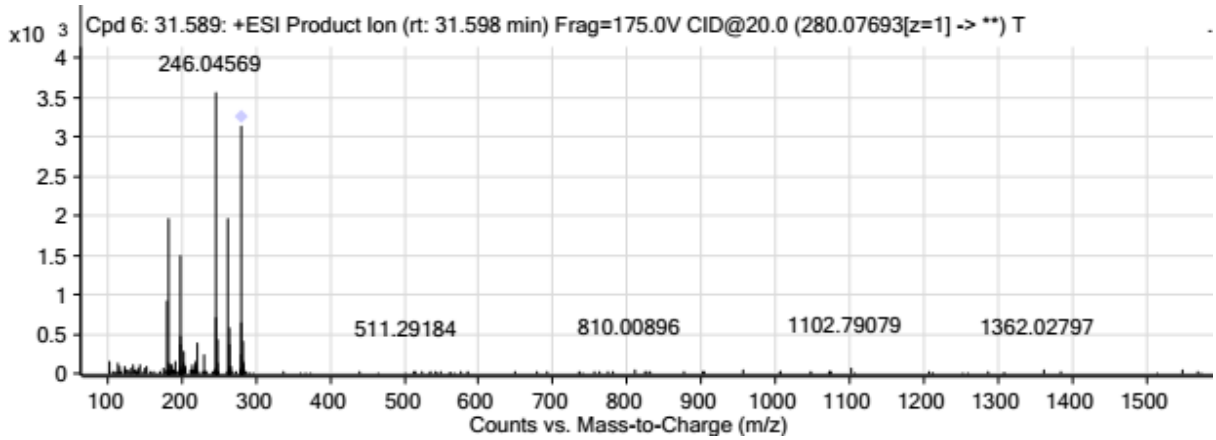
Slika 68: Fragmenti iona mase 406.16 nastali kolizijskom energijom 30,0 V

Fragmentacijom iona mase 280.07693 kolizijskom energijom 10,0 V dobiven je spektar prikazan na slici 69. Najviši pik pripada polaznom ionu, označen je rombom. Ostalih fragmenata ima malo.



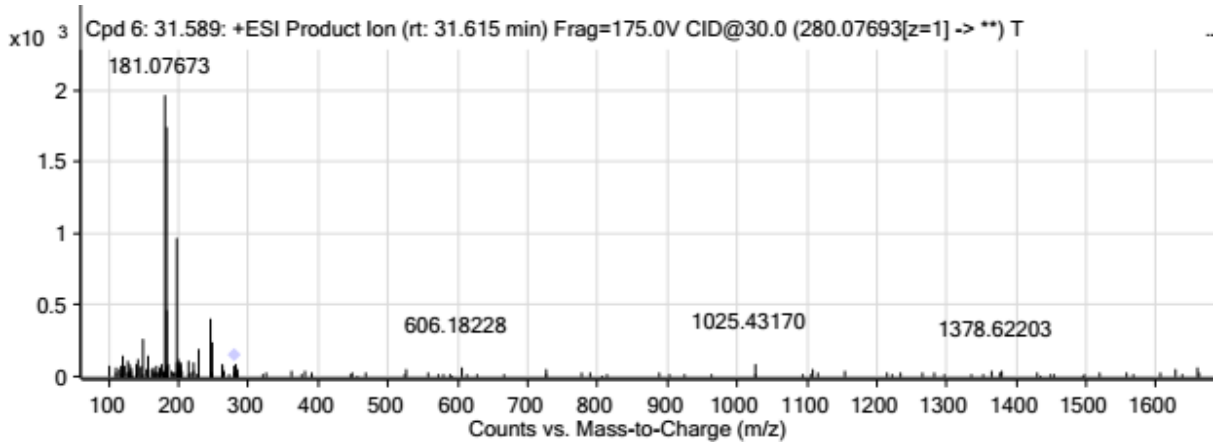
Slika 69: Fragmenti iona mase 280.08 nastali kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 70 prikazuje fragmente iona mase 280.08 nastale kolizijskom energijom 20,0 V. Polazni ion je još uvijek dovoljno zastupljen, no prisutan je dovoljan broj i drugih fragmenata: 182,08, 246,04, 263,07 i 280,08.



Slika 70: Fragmenti iona mase 280.08 nastali kolizijskom energijom 20,0 V

Slika 71 prikazuje fragmente iona mase 280.08 nastale kolizijskom energijom 30,0 V. Polazni ion jako je razgrađen. Najznačajniji fragment su masa 181,08 i 182,08.

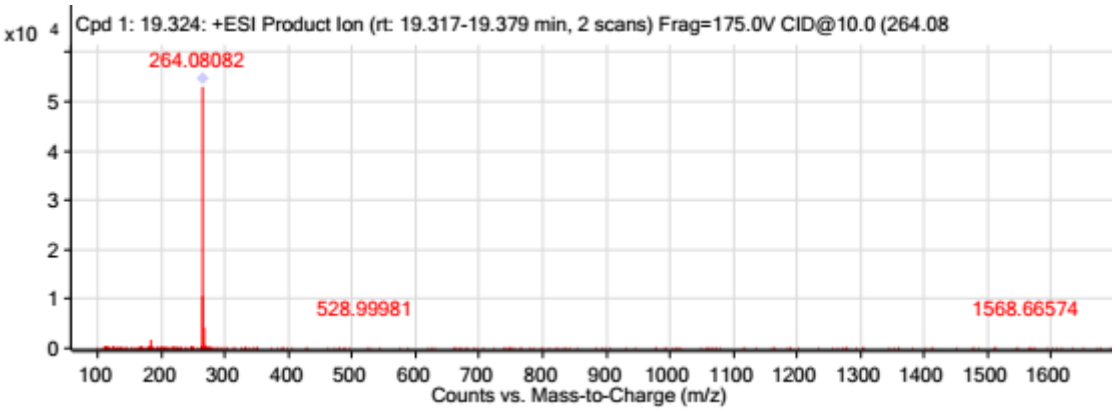


Slika 71: Fragmenti iona mase 280.08 nastali kolizijskom energijom 30,0 V

4.4.3. Uzorak razgrađivan u kiselim uvjetima pomoću HCl

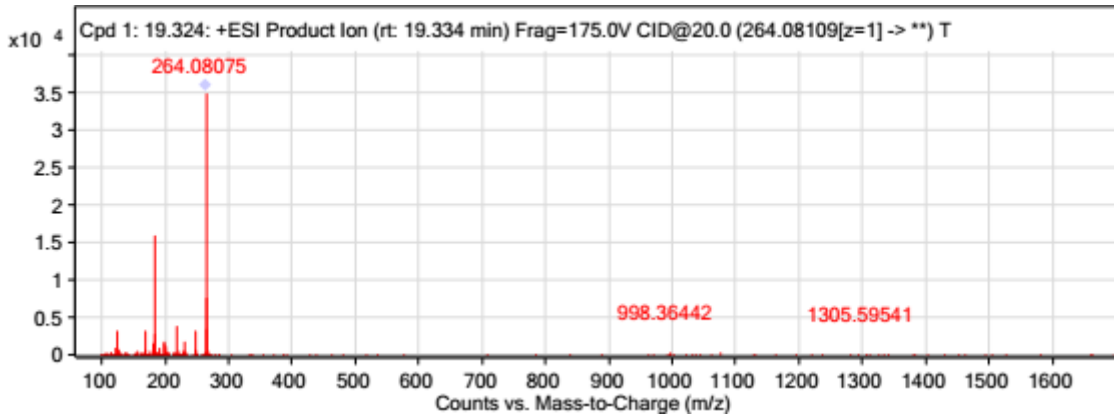
Za uzorak razgrađivan pomoću 1M HCl, razgradni produkti analizirani su dvodimenzionalnom tekućinskom kromatografijom povezanom s masenim spektrometrom. Iz spektra masa utvrđeno je da prevladava produkt mase 264.08 te je za tu masu napravljen MS/MS spektar.

Polazna masa fragmentirana je pomoću 3 kolizijske energije: 10,0, 20,0 i 30,0 V. Slika 72 prikazuje spektar masa nastao fragmentacijom iona 264,08 kolizijskom energijom 10,0 V. Polazna masa označena je sivim rombom, to je glavni pik u spektru. Nastalo je malo fragmenata, kolizijska energija 10,0 V nije dovoljna da stvori reprezentativne fragmente.



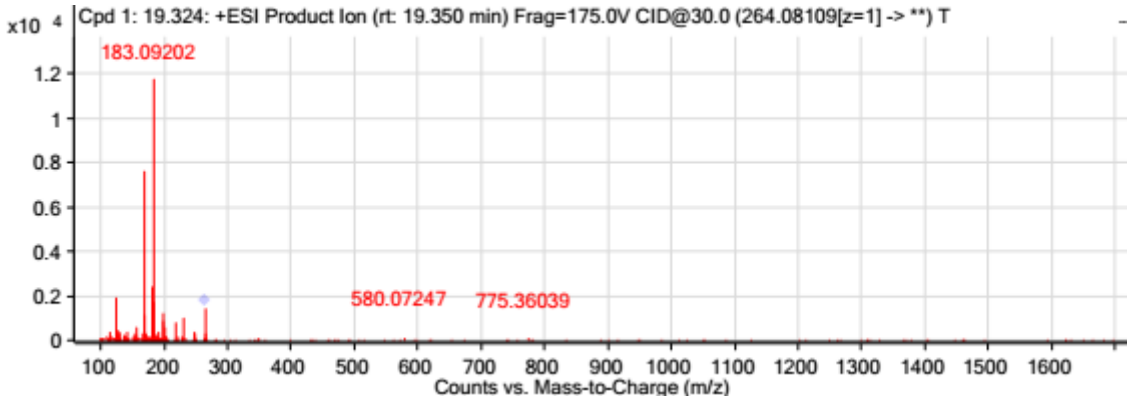
Slika 72: Fragmenti iona mase 268,08 nastali kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 73 prikazuje fragmente iona 264,08 nastale korištenjem kolizijske energije 20,0 V. Glavni pik i dalje pripada polaznom ionu, no nastalo je više fragmenata. Iduća masa koja se ističe, masa je 183,09.



Slika 73: Fragmenti iona mase 268,08 nastali kolizijskom energijom 20,0 V

Fragmenti iona 264,08 nastali korištenjem kolizijske energije 30,0 V prikazani su na slici 74. Polazni ion značajno je smanjen, nastalo je više fragmenata, od kojih se ističe fragment mase 183,09. Također se ističe i masa 168,07.

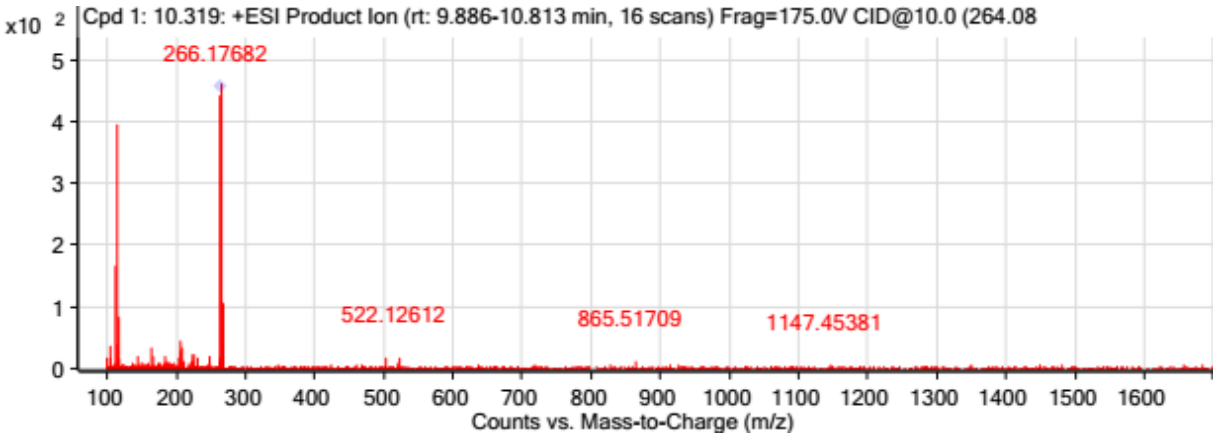


Slika 74: Fragmenti iona mase 268,08 nastali kolizijskom energijom 30,0 V

4.4.4. Uzorak razgrađivan u bazičnim uvjetima pomoću NaOH

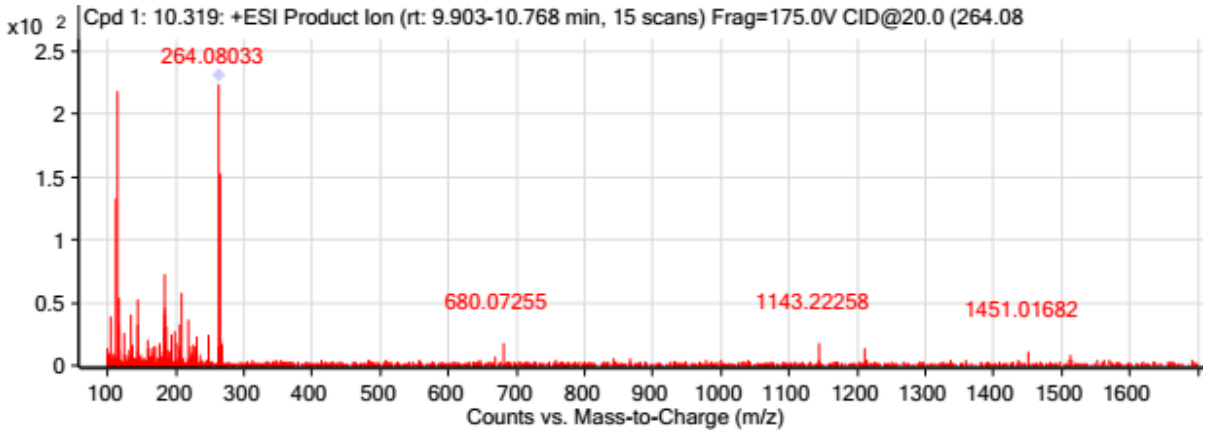
Uzorak torasemida razgrađivan s NaOH u MS spektru pokazao je najznačajniji razgradni produkt mase 264.08. Ta masa fragmentirana je kolizijskim energijama 10,0, 20,0 i 30,0 V.

Na slici 75 prikazani su fragmenti mase 264,08 dobiveni kolizijskom energijom 10,0 V. Glavni pik pripada polaznoj masi i označen je rombom. Ističu se fragmenti mase 114,90 i 266,18.



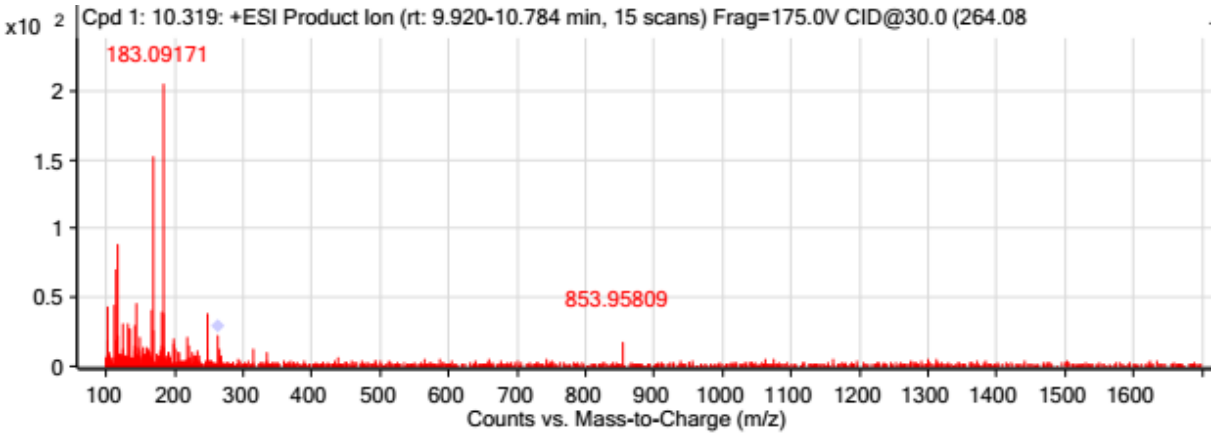
Slika 75: Fragmenti iona mase 264,08 nastali kolizijskom energijom 10,0 V

Slika 76 prikazuje fragmente mase 264,08 dobivene kolizijskom energijom 20,0 V. Mase koje se ističu mase su 112,90, zatim 114,90 i 266,18.



Slika 76: Fragmenti iona mase 264,08 nastali kolizijskom energijom 20,0 V

Slika 77 prikazuje fragmente mase 264,08 dobivene kolizijskom energijom 30,0 V. Polazni ion vrlo je razgrađen, na slici 80 označen je sivim rombom. Najznačajniji fragmenti mase su 168,07 i 183,09.

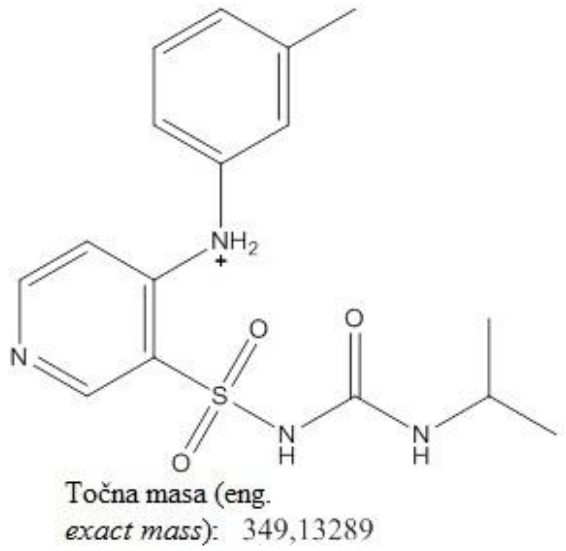


Slika 77: Fragmenti iona mase 264,08 nastali kolizijskom energijom 30,0 V

4.5. Određivanje struktura razgradnih produkata torasemida

Strukture torasemida i razgradnih produkata crtane su u programu Chemdraw. Pri određivanju pretpostavljenih struktura korištene su informacije dobivene iz masenih spektara, prikazanih u prethodnim poglavljima te pomoć samog programa koji računa masu nacrtanih struktura.

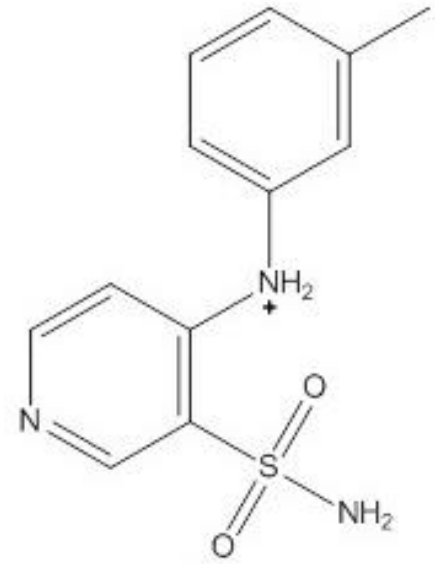
Slika 78 prikazuje strukturu torasemida kao pozitivno ioniziranu molekulu koja nastaje ionizacijom korištenjem pozitivne elektrosprej ionizacije.



Slika 78: Struktura ioniziranog torasemida

4.5.1. Toplinska razgradnja torasemida

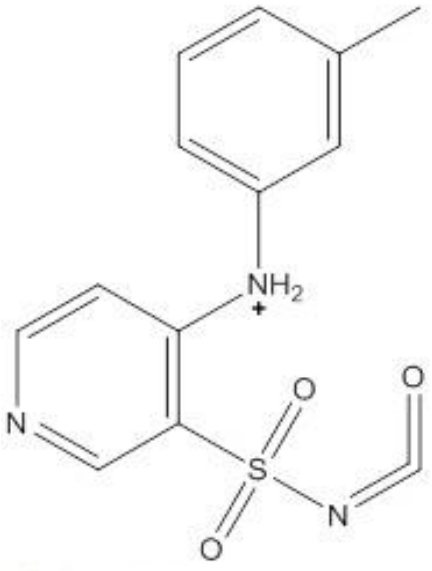
U toplinski razgrađivanim uzorcima, masa koja prevladava kao razgradni produkt torasemida, je masa 264,08. Vrlo je zastupljena u uzorku grijanom 3 sata na 60^0C, isto kao i u uzorku grijanom 24 sata na 105^0C. Njegova struktura prikazana je na slici 79.



Točna masa (eng. *exact mass*): 264,08012

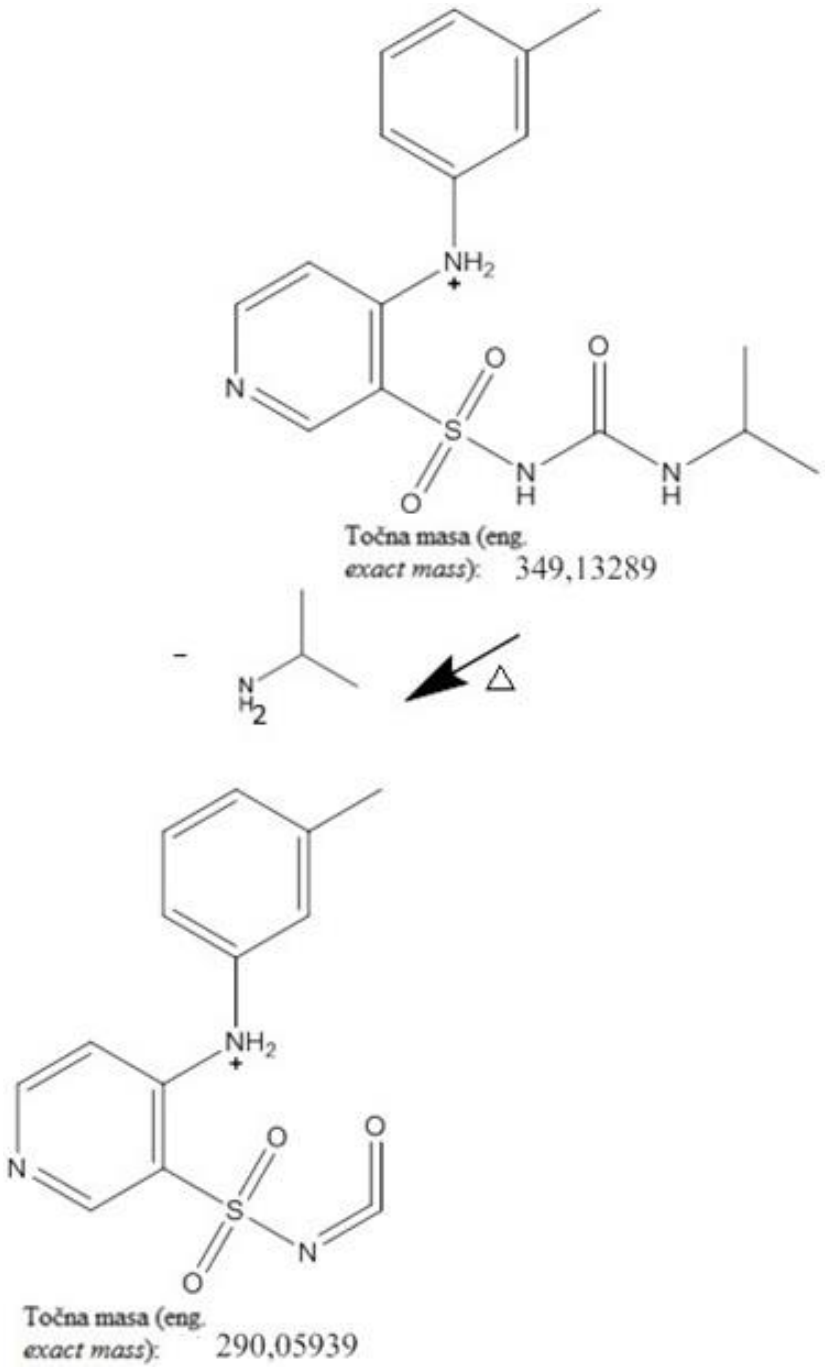
Slika 79: Najzastupljeniji produkt torasemida nastao toplinskom razgradnjom

Osim te mase, zastupljena je masa 118,09, dok je i među razgradnim produktima fragment mase 290,06, koji je već od prije poznati razgradni produkt, slika 80. Pretpostavlja se da je to prvi korak u razgradnji torasemida pri toplinskom stresu, slika 81. Nakon nastanka tog produkta, izdvaja se -CO, nastaje amino skupina na dušiku te sve prelazi u najzastupljeniji produkt mase 264,08.



Točna masa (eng. *exact mass*): 290,05939

Slika 80: Razgradni produkt torasemida

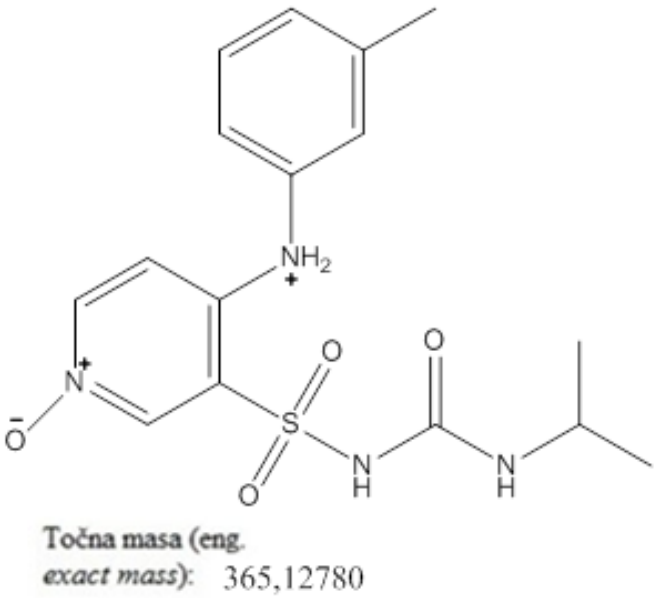


Slika 81: Mehanizam razgradnje torasemida djelovanjem topline

4.5.2. Razgradnja torasemida oksidacijom

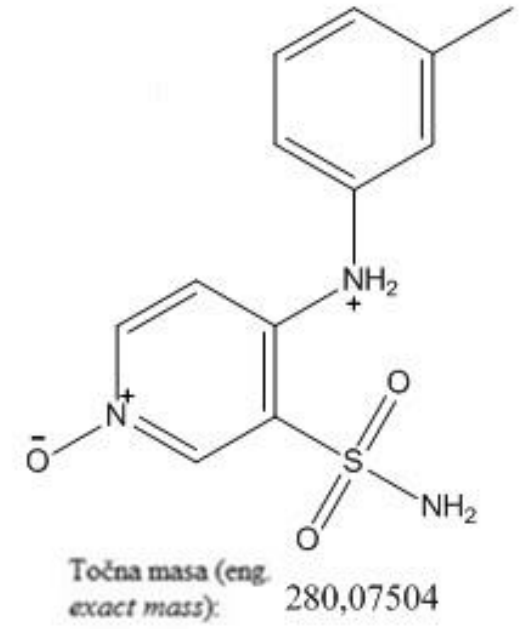
Pregledom masenih spektara razgradnih produkata torasemida nastalih razgradnjom 30%-tnim H_2O_2, utvrđeno je da su najzastupljenije mase detektiranih razgradnih produkata: 264,08, 280,08, 406,16, 349,13, 365,13 i 118,09. Masa 349,13 pripada nerazgrađenom torasemidu te je prikazana na slici 78. Struktura iona mase 264,08 utvrđena je u prošlom poglavlju i prikazana na slici 79. Ona jednako kao i pri toplinskim uvjetima, tako i u oksidaciji, nastaje cijepanjem N-C veze i odvajanjem 2-aminopropana. Osim cijepanja te veze, dolazi do

oksidacije torasemida, pri čemu nastaje masa 365,13, prikazana na slici 82. Razlika masa između mase 365,13 i 349,13 iznosi 16, što odgovara masi atoma kisika koji se veže na dušik iz piridina u strukturi nerazgrađenog torasemida.

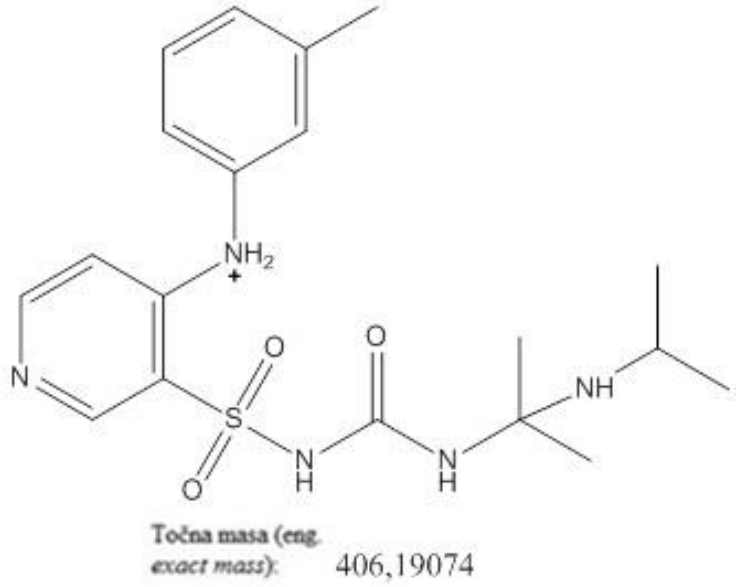


Slika 82: Oksidirani torasemid

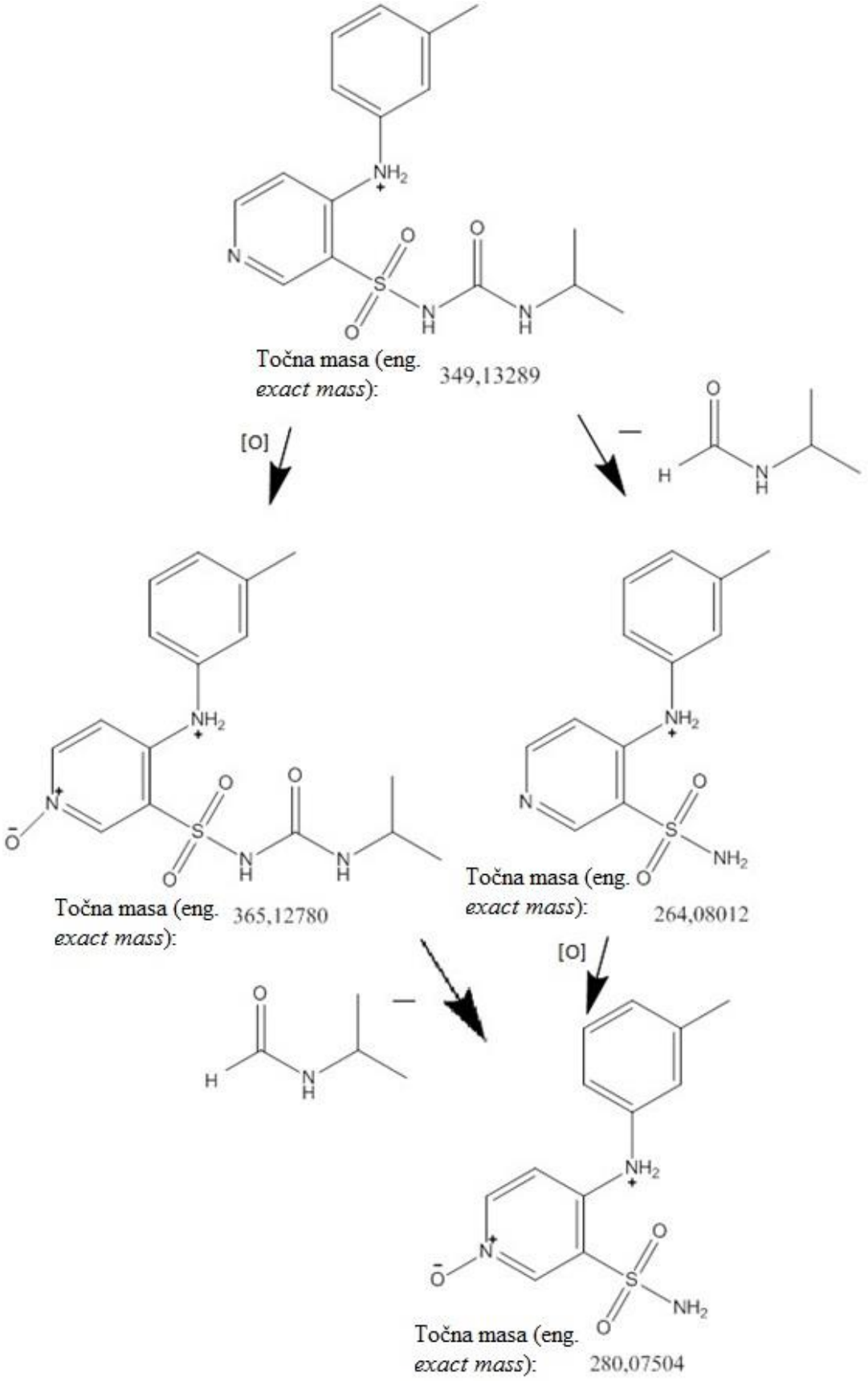
Nakon vezanja kisika na strukturu torasemida, također dolazi do cijepanja C-N veze u postraničnom lancu, kao i pri toplinskoj razgradnji, te nastaje produkt mase 280,08. Njegova struktura ista je onome mase 264,08, jedina razlika je masa atoma kisika, što odgovara razlici njihovih masa. Struktura produkta mase 280,08 prikazana je na slici 83. Izuzev samo cijepanja veza, zbog prisutnih 2-aminopropana, pretpostavlja se da može doći do njihove adicije na strukturu torasemida, čime nastaje masa 406,16, prikazana na slici 84. Najvjerojatniji put razgradnje torasemida oksidacijom prikazan je na slici 85.



Slika 83: Oksidirani razgradni produkt torasemida



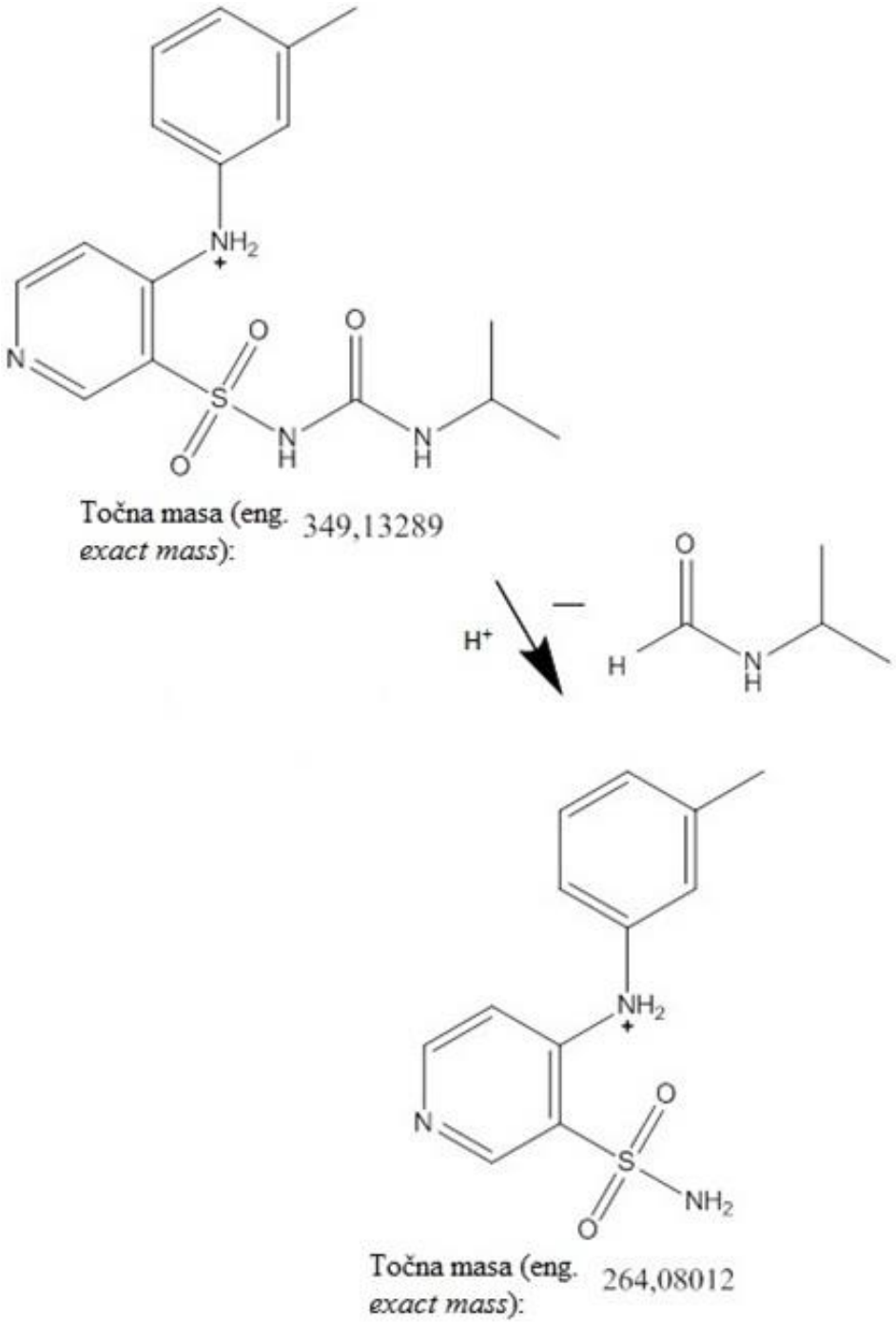
Slika 84: Produkt torasemida nastao adicijom 2-aminopropana



Slika 85: Mehanizam razgradnje torasemida oksidacijom

4.5.3. Razgradnja torasemida u kiselim uvjetima

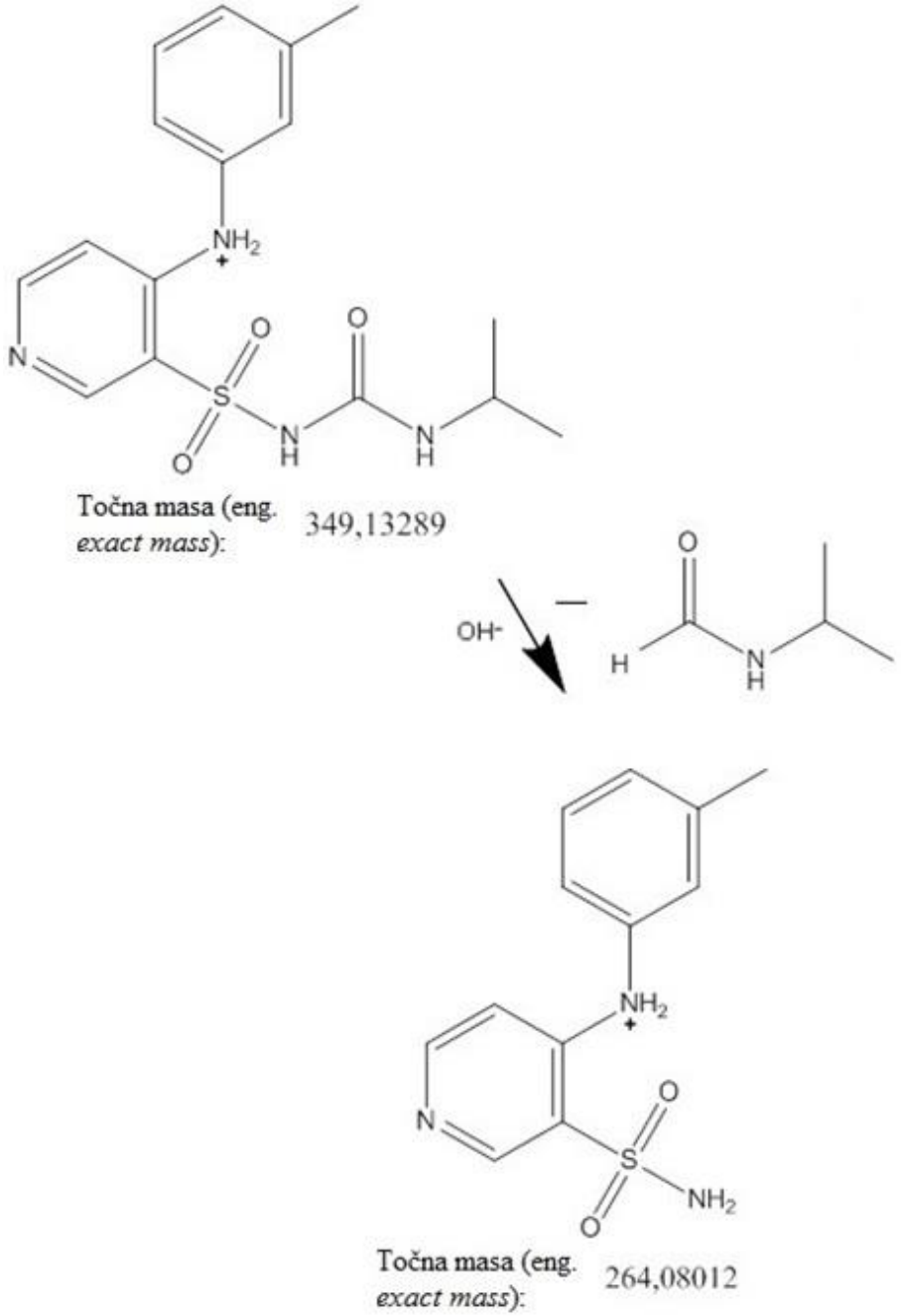
U kiselim uvjetima prevladavaju mase 264,08, slika 79, i masa 118,09. Kisela razgradnja torasemida prikazana je na slici 86.



Slika 86: Kisela hidroliza torasemida

4.5.4. Razgradnja torasemida u bazičnim uvjetima

U uvjetima gdje je torasemid razgrađivan pomoću 1M NaOH, masenom spektrometrijom utvrđeno je da su najzastupljeniji razgradni produkti masa: 264,08 i 118,09. Struktura mase 264,08 određena je u prethodnim poglavljima i prikazana na slici 79. Razgradnja torasemida bazičnom hidrolizom prikazana je na slici 87.



Slika 87: Razgradnja torasemida u bazičnim uvjetima

Masa 118,09 koja se nalazi vrlo zastupljena u svim uzorcima, polazi od diluenta, nađena je i u slijepim alikvotima gdje nije bilo uzorka te je pri crtanju struktura ta masa zanemarena.

5. ZAKLJUČCI

1) Torasemid se raspada pri toplinskoj obradi, kiselom i bazičnom hidrolizom te u oksidirajućim uvjetima.

2) Korištena 2D-LC metoda stabilitetno-indikativna je metoda, pomoću koje su detektirana i odijeljena sva onečišćenja torasemida kao produkti nastali prisilnom razgradnjom. Time je omogućeno određivanje njihove pretpostavljane strukture masenom spektrometrijom.

3) Korištena 2D-LC-MS metoda omogućila je izravnu analizu uzoraka pomoću masene spektrometrije, odmah nakon analize tekućinskom kromatografijom, štedeći vrijeme, kemikalije i novac.

4) Toplinskom razgradnjom dolazi do pucanja C-N veze u postraničnom lancu torasemida te odvajanja 2-aminopropana, nastanka produkta mase 290,06, koja prelazi otpuštanjem –CO u masu 264,08.

5) Kiselom i bazičnom razgradnjom nastaju jednaki produkti, od najznačajnijih produkata je produkt mase 264,08.

6) Razgradnjom u oksidirajućim uvjetima nastaje najviše razgradnih produkata, što upućuje da je torasemid najviše osjetljiv na oksidaciju. Jedan od produkata nastalih oksidacijom mase je 264,08.

7) Razgradni produkt mase 264,08 nastaje svim načinima razgradnje torasemida i jedan je od glavnih razgradnih produkata. Uvidom u monografiju torasemida u Europskoj farmakopeji potvrđeno je da se nalazi među specificiranim onečišćenjima torasemida.

6. LITERATURA

Agilent Technologies. Agilent 6500 Series Q-TOF LC/MS Techniques and Operation for Small Molecules. United States of America, Agilent technologies, 2015, str. 3, 15-19, 25-28.

Ballester MB, Roig E, Gich I, Puntes M, Delgadillo J, Santos B, Antonijoan RM. Randomized, open-label, blinded-endpoint, crossover, single-dose study to compare the pharmacodynamics of torasemide-PR 10 mg, torasemide-IR 10 mg, and furosemide-IR 40 mg, in patients with chronic heart failure. *Drug Des Devel Ther.* 2015, 9, 4291-4302.

Carr PW, Stoll DR. Two-dimensional liquid cromatography: principles, practical implementation and applications. Germany, Agilent technologies, 2015, str. 1-4, 6-9, 83-87.

Council of Europe. Torasemide. U: European pharmacopoeia, eight edition. Strasbourg, Council of Europe, 2013, str. 3449-3450.

Francetić I, Vitezić D. 16. Osnove kliničke farmakologije. Zagreb, Medicinska naklada, 2007, str. 234-238.

Grebe SKG, Singh RJ. 20. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here?. *Clin Biochem Rev*, 2011, 32(1), 5-31.

Hicks SRJ. Forced Degradation to Develop Stability-indicating Methods. http://www.pharmoutsourcing.com/Featured-Articles/37640-Forced-Degradation-to-Develop-Stability-indicating-Methods/, pristupljeno 23.11.2016.

Impurities in New Drug Products, 2006b, International Conference on Harmonisation, Q3B(R2)

Impurities in New Drug Substances, 2006a, International Conference on Harmonisation, Q3A(R2)

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija, 11. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 251, 258-259.

Nigović B. Masena spektrometrija. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015

Nigović B. Plinska kromatografija. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015

Nigović B. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015

Nigović B. Validacija analitičkih postupaka. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015

Sarkate AP, Shinde SD, Sarkate AP, Sangshetti JN. Stability Indicating HPLC Method for Determination of Torsemide in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Form. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 2015, 6(4), 749-755.

Sažetak opisa svojstava lijeka, Diuver 10 mg tablete, 2015., http://www.halmed.hr, pristupljeno 1.3.2017.

Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2006c, International Conference on Harmonisation, Q1A(R2)

Struktura torasemida Pubchem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/torsemide#section=Top, pristupljeno 11.3.2017.

Subramanian V, Nagappan K, Mannemala SS. Optimization and Validation of a Sensitive Method for HPLC-PDA Simultaneous Determination of Torasemide and Spironolactone in Human Plasma using Central Composite Design. *Acta Chim Slov*, 2015, 62, 633-641

Usporedba *comprehensive* dvodimenzionalne tekućinske kromatografije i *heart-cutting* tekućinske kromatografije, http://www.agilent.com/en-us/newsletters/accessagilent/2013/jun/1290infinity, pristupljeno 7.5.2017.

Watson DG. Pharmaceutical analysis, a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists, third edition. Churchill Livingstone, 2012, str. 204-219.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata 2D-LC-MS tehnikom

Cilj ovog diplomskog rada bio je primjeniti dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju izravno povezanu s masenom spektrometrijom u analizi razgradnih produkata torasemida nastalih prisilnom razgradnjom.

Uzorci torasemida bili su razgrađivani pri različitim uvjetima: 3 sata na 60^0C, 24 sata na 105^0C, u 1M HCl, u 1M NaOH i u 30% H_2O_2. Uzorci su analizirani jednodimenzionalnom tekućinskom kromatografijom, kako bi se provjerilo da je došlo do razgradnje i da ona nije pretjerana. Zatim su analizirani na dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji izravno povezanoj na masenu spektrometriju. Dobiveni su kromatogrami nakon svake dimenzije, kao i maseni spektri razgradnih produkata. Nakon izlaska uzorka iz prve dimenzije, pomoću dobivenih kromatograma određena su vremena kada će se skupljati alikvoti za analizu u drugoj dimenziji. Analiza druge dimenzije pokazala je čistoću pikova nakon izlaska iz prve dimenzije, i njihovu dovoljnu odijeljenost. Slijedila je analiza na masenom spektrometru. Razgradni produkti ionizirani su pozitivnim ionizacijskim načinom i ioni razdvajani prema omjeru mase i naboja. Najzastupljeniji ioni ponovno su fragmentirani i dobiveni su njihovi MS/MS spektri kako bi pomogli u određivanju struktura razgradnih produkata torasemida. Uspoređivani su maseni spektri razgradnih produkata s pripadajućim MS/MS spektrima, a strukture razgradnih produkata crtane su u programu Chemdraw.

Razgradnja torasemida najjača je u oksidirajućim uvjetima, u prisustvu 30%-tnog H_2O_2. Kiselom i bazičnom hidrolizom nastaje isti razgradni produkt mase 264,08. Njegova prisutnost utvrđena je i u uzorcima razgrađenim u oksidirajućim uvjetima i toplinskim stresom. Isti produkt je najznačajniji razgradni produkt, a nalazi se među specificiranim onečišćenjima torasemida u Europskoj farmakopeji.

Pomoću nacrtanih struktura pretpostavljeni su putevi razgradnje torasemida u različitim stresnim uvjetima.

Forced degradation study of torasemide and the analysis of its degradation products using 2D-LC-MS technique

The aim of this study was to apply two-dimensional liquid chromatography directly connected with mass spectrometry in the analysis of the degradation products of torasemide produced by forced degradation.

Torasemide samples were degraded under different conditions: 3 hours at 60^0C, 24 hours at 105^0C, with 1M HCl, 1M NaOH and 30% H2O2. Samples were analyzed by one-dimensional liquid chromatography, to verify that the decomposition occurred and that it was not exaggerated. They were then analysed by two-dimensional liquid chromatography directly connected with mass spectrometry. The chromatograms obtained after each dimension, as well as the mass spectra of the degradation products, were obtained. After samples were eluated from the first dimension, it was determined, by using obtained chromatograms, when the aliquots for analysis in the second dimension will be collected. The second dimension analysis showed the purity of the peaks after the first dimensional eluation and their sufficient separation. Then the mass spectrometry analysis followed. The degradation products were ionized by positive ionization mode and the ions were separated by the mass and charge ratio. The most common ions were again fragmented and their MS/MS spectra were obtained to help determine the structure of the degradation products of torasemide. Mass spectra of degradation products were compared with corresponding MS/MS spectra, and the structures of degradation products were drawn in the Chemdraw program.

Torasemide degradation was the thorough in oxidizing conditions, in the presence of 30% H_2O_2. By acid and basic hydrolysis, the same degradation product of mass 264.08 is formed. Its presence was confirmed also in the samples that were degraded by oxidizing conditions and by thermal stress. The same product is the most significant degradation product, and is among the specified impurities of torasemide in the European Pharmacopoeia.

By means of the drawn structures, pathways of degradation of torasemide were assumed under different stress conditions.

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata 2D-LC-MS tehnikom

Valentina Mikulčić

SAŽETAK

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija izravno povezanu s masenom spektrometrijom korištena je u analizi razgradnih produkata torasemida nastalih prisilnom razgradnjom. Uzorci torasemida bili su razgrađivani pri različitim uvjetima: 3 sata na 60^0C, 24 sata na 105^0C, u 1M HCl, u 1M NaOH i u 30% H_2O_2. Uzorci su analizirani jednodimenzionalnom tekućinskom kromatografijom, kako bi se provjerilo da je došlo do razgradnje i da ona nije pretjerana. Zatim su analizirani na dvodimenzionalnoj tekućinskoj kromatografiji izravno povezanoj na masenu spektrometriju. Dobiveni su kromatogrami nakon svake dimenzije, kao i maseni spektri razgradnih produkata. Nakon izlaska uzorka iz prve dimenzije, pomoću dobivenih kromatograma određena su vremena kada će se skupljati alikvoti za analizu u drugoj dimenziji. Analiza druge dimenzije pokazala je čistoću pikova nakon izlaska iz prve dimeznije, i njihovu dovoljnu odijeljenost. Slijedila je analiza na masenom spektrometru. Razgradni produkti ionizirani su pozitivnim ionizacijskim načinom i ioni razdvajani prema omjeru mase i naboja. Najzastupljeniji ioni ponovno su fragmentirani i dobiveni su njihovi MS/MS spektri. Uspoređivani su maseni spektri razgradnih produkata s pripadajućim MS/MS spektrima, a strukture razgradnih produkata crtane su u programu Chemdraw. Razgradnja torasemida najjača je u oksidirajućim uvjetima. Kiselom i bazičnom hidrolizom nastaje razgradni produkt mase 264,08. Njegova prisutnost utvrđena je u svim. To je najznačajniji razgradni produkt, a nalazi se među specificiranim onečišćenjima torasemida u Europskoj farmakopeji. Pomoću nacrtanih struktura pretpostavljeni su putevi razgradnje torasemida u različitim stesnim uvjetima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži:	77 stranica, 87 grafičkih prikaza, 77 tablica i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	Torasemid, dvodimenzionalna tekućinska kromatografija, masena spektrometrija, prisilna razgradnja
Mentor:	**Dr. sc. Biljana Nigović**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Ocjenjivači:	**Dr. sc. Biljana Nigović**, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Zrinka Raijć Džolić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytics and drugs control
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Forced degradation study of torasemide and the analysis of its degradation products using 2D-LC-MS technique

Valentina Mikulčić

SUMMARY

Two-dimensional liquid chromatography directly connected with mass spectrometry was used in the analysis of the degradation products of torasemide produced by forced degradation. Torasemide samples were degraded under different conditions: 3 hours at 60^0C, 24 hours at 105^0C, with 1M HCl, 1M NaOH and 30% H2O2. Samples were analyzed by one-dimensional liquid chromatography, to verify that the decomposition occurred and that it was not exaggerated. They were then analysed by two-dimensional liquid chromatography directly connected with mass spectrometry. The chromatograms obtained after each dimension, as well as the mass spectra of the degradation products, were obtained. After samples were eluated from the first dimension, it was determined, by using obtained chromatograms, when the aliquots for analysis in the second dimension will be collected. The second dimension analysis showed the purity of the peaks after the first dimensional eluation and their sufficient separation. Then the mass spectrometry analysis followed. The degradation products were ionized by positive ionization mode and the ions were separated by the mass and charge ratio. The most common ions were again fragmented and their MS/MS spectra were obtained. Mass spectra of degradation products were compared with corresponding MS/MS spectra, and the structures of degradation products were drawn in the Chemdraw program. Torasemide degradation was the thorough in oxidizing conditions. By acid and basic hydrolysis, the degradation product of mass 264.08 is formed. Its presence was confirmed in all samples. That is the most significant degradation product, and is among the specified impurities of torasemide in the European Pharmacopoeia. By means of the drawn structures, pathways of degradation of torasemide were assumed under different stress conditions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 77 pages, 87 figures, 77 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Torasemide, two-dimensional liquid chromatography, mass spectrometry, forced degradation

Mentor: **Biljana Nigović**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Nigović**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Zrinka Rajić Džolić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.