

# Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa

---

**Marković, Tomislav**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:234260>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Tomislav Marković**

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ZOLMITRIPTANA U  
TABLETAMA UPORABOM KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE  
DJELOTVORNOSTI VEZANE SA SPEKTROMETROM MASA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul**

**Split, listopad 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Tomislav Marković**

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ZOLMITRIPTANA U  
TABLETAMA UPORABOM KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE  
DJELOTVORNOSTI VEZANE SA SPEKTROMETROM MASA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul**

**Split, listopad 2019.**

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij**  
**FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Instrumente metode analize u farmaciji  
**Tema rada** je prihvaćena na 60. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 14. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc. dr. sc. Franko Burčul  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Mislav Runje

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ZOLMITRIPTANA U TABLETAMA  
UPORABOM KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI VEZANE SA  
SPEKTROMETROM MASA**

Tomislav Marković, broj indeksa: 141

**Sažetak:**

**Cilj istraživanja:** Razvoj i optimizacija te vrednovanje metode kvantitativnog i kvalitativnog određivanja zolmitriptana u tabletama pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane s masenim spektrometrom s trostrukim kvadripolom.

**Materijali i metode:** U istraživanju je korišten radni standard zolmitriptana od kojeg su pripravljene otopine u rasponu od 1 ng mL<sup>-1</sup> do 1 µg mL<sup>-1</sup>, korištene za optimizaciju parametara masenog spektrometra, tekućinske kromatografije te vrednovanje metode. Radni standard je korišten i u određivanju prikladnog otapala za uzorke. Otopine tableta zolmitriptana korištene su prilikom vrednovanja metode te optimizacije ultrazvučne ekstrakcije.

**Rezultati:** Kao otapalo izbora za zolmitriptan izabrana je smjesa acetonitrila, ultračiste vode i amonijaka u omjeru 49.5:49.5:1. Maseni spektrometar je optimiziran na energiju sruza od 20 eV, temperaturu plina od 250 °C i napon na kapilari od 3000 V. Stacionarna faza s C18 punilom kolone, 0,1 % w/w mravljom kiselinom kao modifikatorom otapala te smjesa vode, acetonitrila i mravlje kiseline u omjeru 800 : 200 : 1 kao mobilna faza predstavljaju optimalne ispitane kromatografske parametre. Na temelju analize MS i MS/MS spektara pretpostavljene su strukture razgradnih produkata i način njihove fragmentacije. Ultrazvučna ekstrakcija je optimizirana na trajanje od 60 minuta. Ispitani parametri validacije koji uključuju specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu određivanja i dokazivanja, stabilnost i robusnost dali su zadovoljavajuće vrijednosti.

**Zaključci:** Tekućinska kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa je prikladna metoda za kvantitativno i kvalitativno određivanje zolmitriptana u tabletama. Razvijena metoda je vrednovana čime je osigurana njena prikladnost za određivanje zolmitriptana.

**Ključne riječi:** zolmitriptan, tekućinska kromatografija, ultrazvučna ekstrakcija, vrednovanje

**Rad sadrži:** 48 stranice, 13 slika, 19 tablica, 20 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član-mentor

**Datum obrane:** 3. listopada 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Instrumental methods of Analysis in Pharmacy  
**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 60. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19. and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14  
**Mentor:** Franko Burčul, PhD, assistant prof.  
**Technical assistance:** Mislav Runje, PhD

### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ZOLMITRIPTAN IN TABLETS USING ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY

Tomislav Marković, index number: 141

#### Summary:

**Objectives:** Development, optimization and validation of the method for quantitative and qualitative determination of zolmitriptan in tablets by ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry.

**Material and methods:** The study used a standard of zolmitriptan from which solutions ranging from 1 ng mL<sup>-1</sup> to 1 µg mL<sup>-1</sup> were prepared and used to optimize mass spectrometry parameters, liquid chromatography parameters and to validate the method. A standard was also used to determine the appropriate solvent for the samples. Zolmitriptan tablet solutions were used to validate the method and optimize ultrasonic extraction.

**Results:** The solvent of choice for zolmitriptan was a mixture of acetonitrile, ultra-pure water and ammonia in a ratio of 49.5:49.5:1. The mass spectrometer was optimized for a collision energy of 20 eV, a gas temperature of 250 °C and a capillary voltage of 3000 V. Stationary phase with C18 column filler, 0,1 % w/w formic acid as solvent modifier and a mixture of water, acetonitrile and formic acid in the ratio of 800 : 200 : 1 as the mobile phase represent optimized tested chromatographic parameters. Based on the analysis of MS and MS/MS spectra, the structures of the degradation products and the way of their fragmentation were proposed. Ultrasonic extraction is optimized to the duration of 60 minutes. Tested validation parameters including specificity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification and detection, stability and robustness resulted with adequate values.

**Conclusions:** Ultra-high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer is a suitable method for the quantitative and qualitative determination of zolmitriptan in tablets. The method has been validated to ensure its suitability for the determination of zolmitriptan.

**Key words:** zolmitriptan, liquid chromatography, ultrasound extraction, validation

**Thesis contains:** 48 pages, 13 figures, 19 tables, 20 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

1. Olivera Politeo, PhD, associate prof. - chair person
2. Lea Kukoč Modun, PhD, assistant prof. - member
3. Franko Burčul, PhD, assistant prof. - supervisor

**Defence date:** October 3, 2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## Sadržaj

<b>1</b>	<b>Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1	Migrena.....	2
1.2	Zolmitriptan .....	2
1.3	Kromatografija.....	3
1.3.1	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	4
1.3.2	Kromatografski parametri .....	6
1.3.3	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....	8
1.4	Spektrometrija masa .....	9
1.4.1	Princip rada masenog spektrometra .....	9
1.4.2	Maseni analizatori .....	11
1.5	Ultrazvučna ekstrakcija .....	12
1.6	Vrednovanje analitičke metode .....	13
<b>2</b>	<b>Cilj istraživanja .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Materijali i metode.....</b>	<b>17</b>
3.1	Korištene kemikalije i oprema.....	18
3.2	Odabir otapala.....	19
3.3	Priprema otopina za UHPLC analizu .....	19
3.3.1	Priprema standardnih otopina.....	19
3.3.2	Priprema otopina tableta.....	19
3.4	Priprema otopina za optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije .....	19
<b>4</b>	<b>Rezultati .....</b>	<b>20</b>
4.1	Izbor otapala .....	21
4.2	Identifikacija zolmitriptana uporabom UHPLC-MS/MS – rješavanje masenog spektra/fragmentacija.....	21
4.3	Optimizacija parametara masenog spektrometra.....	23
4.3.1	Energija sraza .....	23
4.3.2	Temperatura plina .....	24
4.3.3	Napon na kapilari .....	24
4.3.4	Parametri spektrometra masa .....	25
4.4	Optimizacija UHPLC metode.....	25
4.4.1	Odabir stacionarne faze .....	25
4.4.2	Odabir modifikatora .....	26
4.4.3	Odabir otapala u mobilnoj fazi.....	27

4.4.4	Parametri UHPLC metode .....	27
4.5	Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije.....	28
4.6	Vrednovanje metode.....	28
4.6.1	Specifičnost .....	28
4.6.2	Linearnost.....	28
4.6.3	Granice određivanja i dokazivanja .....	30
4.6.4	Točnost i iskorištenje .....	30
4.6.5	Preciznost .....	31
4.6.6	Stabilnost.....	33
4.6.7	Robusnost.....	33
<b>5</b>	<b>Rasprava .....</b>	<b>34</b>
5.1	Optimizacija parametara metode .....	35
5.2	Vrednovanje metode.....	37
<b>6</b>	<b>Zaključci .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Literaturni izvori .....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Sažetak .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Summary.....</b>	<b>46</b>
<b>10</b>	<b>Životopis.....</b>	<b>47</b>

*Ovaj rad izrađen je u Plivi Hrvatska d.o.o. pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Mislava Runje. Veliko hvala za svu pomoć, trud i uloženo vrijeme. Hvala mentoru doc.dr. sc. Franku Burčulu na pomoći pri odabiru teme i strpljenju za sva moja pitanja.*

*Svim mojim prijateljima i kolegama, hvala na pet dosad najboljih godina života. Hvala što ste moje studiranje učinili nezaboravnim životnim iskustvom kojeg ću se uvijek rado prisjećati. Posebno hvala Deniju.*

*Najveće hvala mojoj obitelji na svojoj podršci i ljubavi, bez koje ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Mojoj majci, hvala što si me uvijek imala strpljena saslušati, hvala za svaku riječ utjehe i motivacije koju sam trebao čuti.*





## 1.1 Migrena

Migrena je kompleksna indikacija sa širokim spektrom simptoma. Od migrene pati otprilike svaka osma osoba i to najčešće žene u dobi od 30 do 50 godina. Glavno obilježje ovog stanja je jaka i prodorna glavobolja koja uglavnom ometa dnevne aktivnosti osobe te tako narušava kvalitetu života. Najčešći podtip migrene jest migrena bez aure koju karakteriziraju napadi umjerene do jake glavobolje u trajanju od 4 do 72 sata, gdje je bol jednostrana, pulsirajuća i pogoršava se tjelesnom aktivnošću.<sup>1</sup> Drugi tip je migrena s aurom kojoj prethodi skupina osjetilnih simptoma koji se očituju kao vizualne smetnje, trnci, govorne poteškoće i slično. Ostali simptomi koji ukazuju na migrenoznu glavobolju su mučnina i povraćanje, fotoosjetljivost te osjetljivost na slušne i mirisne podražaje. Za migrenu postoji genetska predispozicija, a okidači napadaja su uglavnom stres, pojedini mirisi ili vizualni i slušni podražaji, meteorološke promjene te uzimanje lijekova.<sup>2</sup>

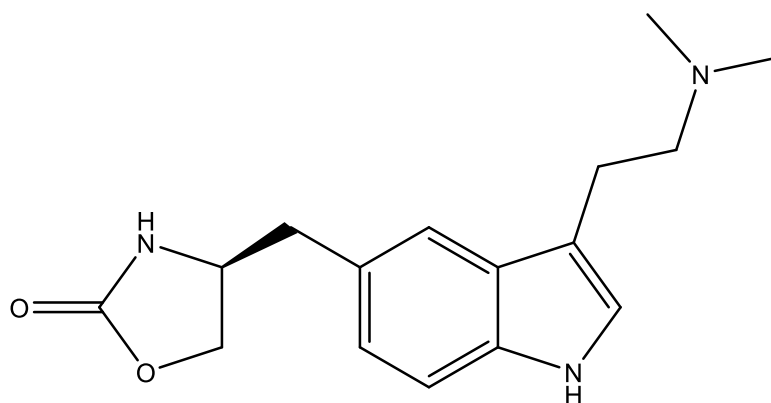
## 1.2 Zolmitriptan

Početna terapija migrene sastoji se od bezreceptnih analgetika paracetamola, acetilsalicilne kiseline, ibuprofena, naproksena, ketoprofena ili kombiniranih analgetika s dodatkom kofeina, propifenazona te kodeina.<sup>2</sup> Osim navedenih bezreceptnih lijekova, jedna od skupina lijekova koji se koriste u terapiji migrene su triptani. Zolmitriptan je lijek koji spada u skupinu triptana, spojeva koji djeluju agonistički na serotoninске receptore. Pretežno se veže za 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptore te ima tri predložena mehanizma ostvarivanja antimigrenoznog učinka:

- Vazokonstrikcija dilatiranih moždanih krvnih žila
- Inhibicija otpuštanja vazoaktivnih neuropeptida iz perivaskularnih trigeminalnih senzornih neurona
- Smanjenje prijenosa bolnih signala u trigeminalnom dorzalnog rogu.

Koristi se u liječenju napadaja migrene kao akutna terapija i nije predviđen za prevenciju i kontinuirano uzimanje. Dostupan je u tri farmaceutska oblika: oralna tableta, raspadljiva tableta za usta te nazalni sprej.<sup>1</sup>

Zolmitriptan je strukturno mala molekula, kemijske formule C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. Ime molekule po IUPAC-u jest 4*S*-4-({3-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-indol-5-il}metil)-1,3-oksazolidin-2-on. Molekulska masa zolmitriptana iznosi 287,363 g mol<sup>-1</sup>. Bijeli je prašak, dobro topljiv u vodi.<sup>3</sup>



Slika 1.1. Struktura zolmitriptana

### 1.3 Kromatografija

Kromatografija je jedna od najraširenijih analitičkih tehnika u modernoj farmaceutskoj industriji, a zasniva se na odjeljivanju sastojaka iz uzorka na temelju njihove različite raspodjele između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze. Mobilna faza služi kao nosač komponenti uzorka, a tijekom analize sve komponente imaju drugačiju brzinu prolaska kroz sustav zbog različitog zadržavanja na stacionarnoj fazi. Kromatografiju kao tehniku možemo podijeliti prema tri kriterija.

Kada govorimo o načinu na koji faze dolaze u međusobni doticaj, razlikujemo plošnu i kolonsku kromatografiju.

Prema agregatnom stanju mobilne faze, kromatografiju dijelimo na plinsku, tekućinsku te fluidnu kromatografiju pri superkričnim uvjetima. Plinska kromatografija koristi inertne plinove, tekućinska koristi slabo viskozne tekućine, dok se kod fluidne koristi mobilna faza koja se nalazi iznad svojih kritičnih uvjeta (tj. posjeduje određena svojstva i tekućine i plina).

Prema načinu na koji se sastojci uzorka odjeljuju, metodu dijelimo na razdjelnu kromatografiju, adsorpcijsku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju, kromatografiju isključenjem te ionsko-izmjenjivačku kromatografiju.<sup>4</sup>

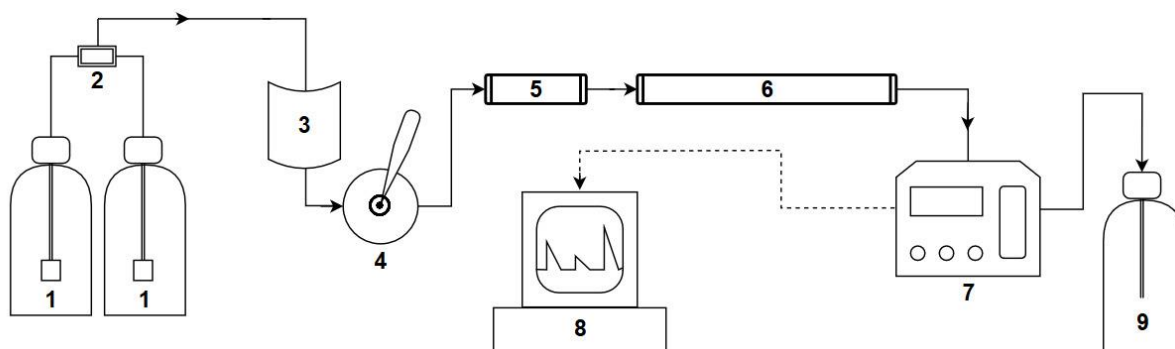
- **Razdjelna kromatografija** je najčešće korištena metoda tekućinske kromatografije gdje se mobilna tekuća faza ne miješa s tekućom stacionarnom fazom zbog razlike u polarnosti. Stacionarna faza može biti slobodna (sustav tekućina-tekućina) ili vezana na čestice punila (sustav tekućina-vezana faza). Kada je mobilna faza nepolarna

(kromatografija normalnih faza), prvo se eluira najmanje polarni sastojak uzorka. Kod kromatografije obrnutih faza (mobilna faza je polarna), prvo se eluira najpolarniji sastojak.

- **Adsorpcijska kromatografija** je metoda u kojoj se sastojci uzorka raspodjeljuju između tekuće mobilne i čvrste stacionarne faze na način da se određeni sastojci više vežu za čvrstu podlogu od ostalih i tako se odjeljuju.
- **Afinitetna kromatografija** funkcionira na principu kemijske interakcije sastojaka uzorka s ligandom koji se nalazi na stacionarnoj fazi.
- **Kromatografija isključenjem** se zasniva na fizikalnom odjeljivanju čestica različite mase i volumena. Stacionarnu fazu čini molekulsko sito točno propisanih dimenzija pora kroz koje mogu proći samo sastojci specifičnih svojstava.
- **Kromatografija ionske izmjene** je metoda utemeljena na odjeljivanju nabijenih čestica sastojaka između tekuće mobilne faze i stacionarne faze načinjene od čvrstog polimernog ionskog izmjenjivača.<sup>4,5</sup>

### *1.3.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti*

U vrijeme razvoja tekućinske kromatografije, uočeno je kako učinkovitost odjeljivanja raste smanjenjem veličine čestica punila u kolonama. Međutim, kada su čestice punila fino usitnjene, protok kroz kolonu je veoma spor, a da bi se ostvarila zadovoljavajuća brzina mjerenja bilo je potrebno primijeniti visoki tlak koji će protok ubrzati. Tako je nastala tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*) kao napredna izvedba kolonske tekućinske kromatografije.<sup>5</sup> Shema HPLC uređaja je prikazana na slici 1.2.



**Slika 1.2.** Shematski prikaz komponenti HPLC uređaja: spremnici mobilne faze (otapala) s filterom (1); otplinjač (2); crpka (3); injektor uzorka (4); pretkolona (5); kolona (6); detektor (7); računalo za obradu podataka (8); otpadni spremnik (9).

Početna otapala za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti predstavljaju mobilnu fazu. Ona moraju biti u potpunosti čista, bez mehaničkih nečistoća ili otopljenih plinova. Kako bi se ispunili ti uvjeti, otapalo prije ulaska u sustav prolazi kroz početni mikroporozni filter, a nakon toga i kroz otplinjač koji pomoću mjehurića inertnih netopljivih plinova uklanja potencijalno prisutne otopljene plinove. Tako tretirano otapalo crpka prenosi dalje kroz sustav. Crpkom možemo utjecati na brzinu protoka mobilne faze pa tako i na rezultate kromatografske analize. Protok mobilne faze kroz sustav može biti izokratan, gdje je sastav mobilne faze tijekom cijelog trajanja mjerenja isti ili gradijentan, gdje se sastav mobilne faze mijenja za vrijeme mjerenja. Pomoću injektora u tok mobilne faze se unosi uzorak. Postoje različite izvedbe ove komponente HPLC uređaja od kojih se prednost daje automatskim injektorima koji smanjuju mogućnost pogreške prilikom ručnog apliciranja uzorka. Mobilna faza odnosi injektirani uzorak do kolone u kojoj dolazi do odjeljivanja komponenti zbog njihovog različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Kolona je ključna komponenta sustava. Kako bi se produžio njen životni vijek, ispred kolone je moguće postaviti pretkolonu kao dodatnu zaštitu u slučaju prolaska čestica nečistoće koje mogu začepiti kolonu. Uglavnom se koriste kolone s vrlo sitnim punjenjem čime se smanjuje potrošnja mobilne faze. Odvojeni uzorci se potom eluiraju s kolone i odlaze do detektora koji dobivene rezultate prevodi u računalo prepoznatljiv signal. Posredstvom određenog računalnog programa, generira se jasan računalni grafički zapis, kromatogram, koji prikazuje ovisnost koncentracije o volumenu ili vremenu elucije. Otopina se nakon prolaska kroz detektor odvođuje u otpadni spremnik (slika 1.2).

Za HPLC metodu ne postoji univerzalni detektor već je potrebno izabrati uređaj koji će biti najbolji ovisno o uzorku koji se analizira. Idealan detektor bi trebalo imati prikladnu razinu osjetljivosti, dobru stabilnost i reproducibilnost, linearan odgovor kroz nekoliko redova veličine i kratak odziv koji ne ovisi o brzini protoka mobilne faze. Takav detektor mora biti jednostavan za korištenje, ne smije uništiti uzorak i treba biti prikladan za više vrsta otapala.<sup>5,6</sup> U analizama se najčešće primjenjuju apsorpcijski detektori poput spektrofotometra, zatim detektori s nizom foto-osjetljivih dioda (engl. *diode-array detector*, DAD), fluorescencijski detektori (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektori (engl. *electrochemical detector*, ED), detektori indeksa loma (engl. *refractive index detector*, RID) te detektori raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *evaporative light-scattering detector*, ELSD).<sup>7</sup>

### 1.3.2 Kromatografski parametri

Mnogi dijelovi kromatografske metode su mogu mijenjati i pomoću njih možemo utjecati na uspješnost i optimizaciju cijele metode. Tako promjene temperature u koloni, pH-vrijednosti otopine, čestica punila kolone, volumena injektiranja ili tlaka mogu dovesti do značajnih razlika u dobivenim rezultatima.<sup>8</sup>

Kromatogram je grafički zapis kromatografskog mjerenja koji se sastoji od pikova, tj. krivulja porasta koncentracije određenog sastojka uzorka u vremenu ili volumenu mobilne faze. Položaj pika na kromatogramu se može koristiti za identifikaciju određene tvari, dok visina pika (odnosno površina ispod pika) daje kvantitativni podatak o udjelu (količini) tvari u uzorku. Poželjno je da pik bude što uži jer se time povećava učinkovitost i osjetljivost metode.<sup>9</sup>

Slika 1.3. prikazuje uobičajeni kromatogram. Vrijeme između točke injektiranja uzorka i dolaska komponente uzorka do detektora naziva se vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*,  $t_r$ ). Vrijeme koje potrebno mobilnoj fazi da dođe do detektora naziva se nezadržano ili mrtvo vrijeme (engl. *void time*,  $t_m$ ). Razlika vremena zadržavanja i nezadržanog vremena rezultira prilagođenim vremenom zadržavanja (engl. *adjusted retention time*,  $t_r'$ ):

$$t_r' = t_r - t_m \quad (1)$$

Dok vrijeme zadržavanja ovisi o brzini protoka mobilne faze, dimenzijama kolone i dr., izraz koji pobliže mjeri stupanj zadržavanja komponente uzorka jest faktor zadržavanja (engl. *capacity factor* ili *retention factor*,  $k'$ ). Faktor zadržavanja daje podatak koliko je puta komponenta zadržana u odnos na nezadržanu komponentu. Ukoliko faktor zadržavanja iznosi jedan, komponenta uzorka eluira zajedno s mobilnom fazom i ne zadržava se na koloni. Što je faktor zadržavanja veći, komponenta više vremena provodi vezana uz stacionarnu fazu i duže se eluira:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r'}{t_m} \quad (2)$$

Odjeljivanje dvaju komponenti uzorka je moguće samo ako one imaju različitu brzinu prolaska kroz kolonu. Faktor odjeljivanja ili faktor selektivnosti (engl. *separation* ili *selectivity factor*,  $\alpha$ ) predstavlja omjer faktora zadržavanja dvije komponente uzorka. Omjer mora iznositi više od 1 kako bismo mogli reći da su komponente u analizi razdvojene:

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (3)$$

Kromatografski pikovi uglavnom imaju oblik Gaussove krivulje koja s vremenom postaje šira. Tako je širina pika na baznoj liniji (engl. *peak width*,  $w$ ) veća što je duže vrijeme zadržavanja komponente. Broj teorijskih tavana (engl. *plate number*,  $N$ ) je kvantitativna mjera učinkovitosti kolone koja predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža između mobilne i stacionarne faze:

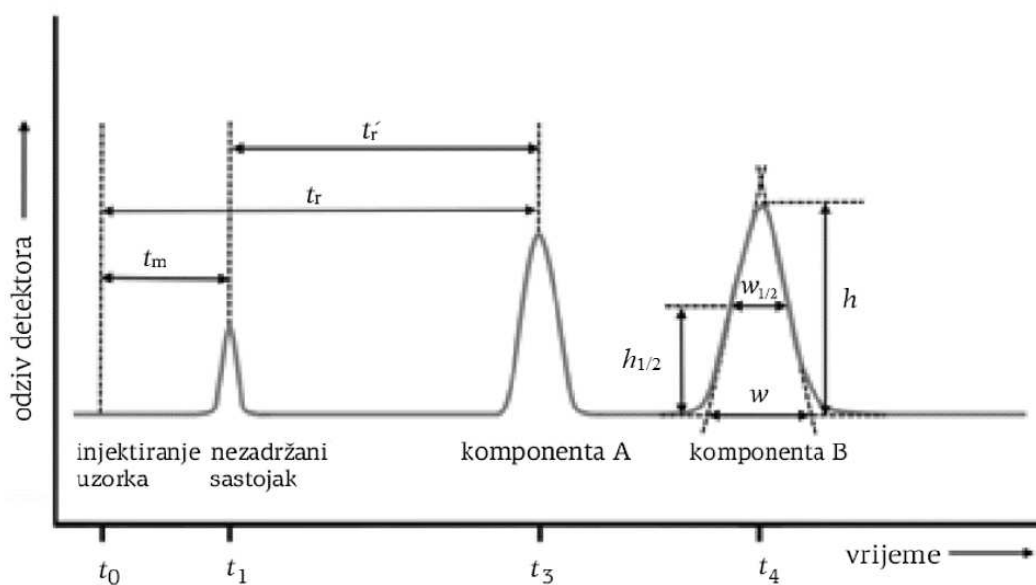
$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (4)$$

Visina teoretskog tavana (engl. *height equivalent of a theoretical plate*,  $H$ ) kao druga mjera učinkovitosti kolone odgovara omjeru duljine kolone (engl. *length of the column*,  $L$ ) i broju teoretskih tavana:

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

Razlučivanje (engl. *resolution*,  $R_s$ ) je stupanj odjeljivanja dvaju susjednih pikova kromatograma, a definirano je kao omjer razlike vremena zadržavanja komponenti i prosječne širine pika na baznoj liniji. Ukoliko razlučivanje iznosi 0, komponente eluiraju s kolone zajedno. Vrijednost razlučivanja veća od 1,5 upućuje na uspješno razdvajanje pikova, no u analizama se teži da vrijednost bude veća od 2 jer to dovodi do „robusnije kvantifikacije“ i razdvajanja.<sup>10</sup>

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2} \quad (6)$$



**Slika 1.3.** Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima<sup>4</sup>

### 1.3.3 Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Već po nazivu kromatografske tehnike možemo zaključiti da se radi o naprednoj verziji HPLC-a. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, *UHPLC*) koristi kolone sa promjerom čestica punjenja manjim od 2  $\mu\text{m}$  kako bi se postiglo bolje razdvajanje, kraće vrijeme analize i veća osjetljivost u odnosu na HPLC. Nadalje, dimenzije kolone i potreban volumen uzorka su manji, dok su temperatura i tlak veći (do 65  $^{\circ}\text{C}$  i 10<sup>8</sup> Pa). Povećanjem temperature, smanjuje se viskoznost mobilne faze i brzina protoka pa se trajanje analize smanjuje.<sup>11</sup> UHPLC također daje uže pikove na kromatogramu što znači da su granice dokazivanja određene komponente u uzorku niže nego kod HPLC metode.<sup>12</sup>



## 1.4 Spektrometrija masa

U modernoj farmaceutskoj industriji, spektrometrija masa je široko prihvaćena i nužna tehnika kod analize organskih molekula. Masena spektrometrija (MS) je destruktivna (ireverzibilna) tehnika koja se zasniva na produkciji karakterističnih iona u plinovitoj fazi, nakon čega se ioni odjeljuju i prikupljaju. Spektrometrija masa je vrlo osjetljiva tehnika zbog čega ima nisku granicu dokazivanja, određivanja molekulske mase i objašnjavanja strukture čak i manjih komponenti koje eluiraju s kolone. Postoje mnoge izvedbe uređaja za masenu spektrometriju, a svaki od njih ima posebna svojstva koja ga čine pogodnim za određenu analizu. U masenoj spektrometriji se uzorak uništava te pritom neutralne molekule postaju pozitivno ili negativno nabijeni ioni. Ioni se potom odjeljuju u plinovitoj fazi prema omjeru njihove mase i naboja ( $m/z$ ). Masena spektrometrija se koristi na različite načine, između ostalog može biti spregnuta sa tehnikama odjeljivanja poput HPLC sustava gdje dolazi do umrežene analize komponenti koje eluiraju s kolone (LC/MS). Radi se o kvantitativnoj tehnici koja se može koristiti za praćenje i optimizaciju određenog procesa kako bi se smanjio udio nečistoća za vrijeme proizvodnje.

### 1.4.1 Princip rada masenog spektrometra

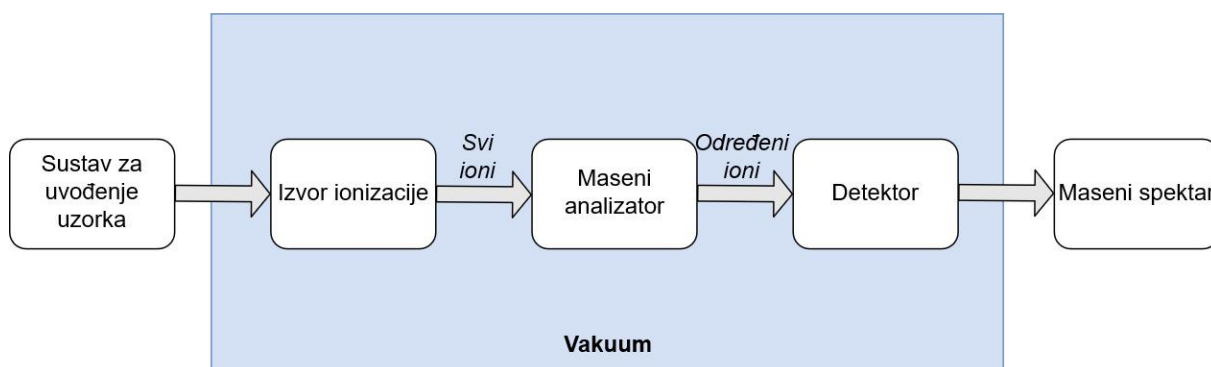
Glavni dijelovi masenog spektrometra čine sustav za uvođenje uzorka, izvor ionizacije, maseni analizator te detektor povezan sa sustavom za obradu podataka. Odvajanje iona u plinovitoj fazi zahtjeva da maseni analizator bude u vakuumu kako bi se smanjile interakcije iona s česticama zraka, a to se postiže sustavom za uvođenje uzorka. Tekući uzorak kroz tanku cijev dolazi u sustav gdje je uzorak potrebno odvojiti od otapala jer bi velika količina tekućine pretvorene u paru poremetilo vakuumsko okruženje. Uzorak je zatim potrebno ionizirati nekom od ionizacijskih tehnika:

- **Ionizacija elektronima** (engl. *electron ionisation, EI*) je tradicionalna tehnika u kojoj zraka elektrona visoke energije prolazi kroz paru uzorka čime nastaju nestabilni molekularni radikali skloni fragmentaciji na manje dijelove. Uglavnom se koristi u kombinaciji s plinskom kromatografijom.
- **Kemijska ionizacija** (engl. *chemical ionisation, CI*) je tehnika gdje se kod izvora ionizacije nalazi reakcijska komora u kojoj se plin reagens (najčešće amonijak) ionizira zrakom elektrona. Sudarima nastaju stabilne protonizirane čestice plina kojima se uvodi uzorak i tada dolazi do reakcije, najčešće

prijenosa protona. Time se dobivaju stabilni ioni molekula uzorka. Tehnika se također može spregnuti s plinskom kromatografijom.

- **Ionizacija elektroraspršenjem** (engl. *electrospray ionisation, ESI*) je tehnika u kojoj tekući eluent prolazi kroz usku cijev na čijem kraju se nalazi izvor visokog napona. Napon uzrokuje zakrivljenu putanju izlaska tekućine iz cijevi prema elektrodi uzrokujući formiranje malih kapljica. Otapalo isparava, a kapljice se smanjuju sve dok gustoća naboja ne postane previsoka kada se one pod utjecajem Coulombovih sila raspadaju na još manje kapljice i nabijene ione. Struja iona kroz otvor tada odlazi do masenog analizatora. Slična ovoj tehnici je i ionizacija nanoraspršenjem koja omogućuje dulje vrijeme korištenja ioniziranog uzorka.
- **Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku** (engl. *atmospheric pressure chemical ionisation, APCI*) je tehnika kemijske ionizacije prikladna za tekuće uzorke iz HPLC kolone. Uzorak u otapalu se nebulizira te tvori maglicu uzorka koja je u struji dušika. Maglica prolazi kroz zagrijanu cijev koja otparava otapalo te dolazi do ionizacije dušika pomoću vrška igle kao izvora visokog napona. Ioni dušika reagiraju s otapalom i nastaju ioni amonijaka koji reagiraju s molekulama uzorka.

Ionizirane molekule ubrzavaju prema masenom analizatoru u kojem se pomoću različitih izvedbi električnih i magnetskih polja postiže odjeljivanje iona i njihovo pojavljivanje na detektoru. Nakon detekcije se slab električni signal iona pojačava kako bi ga računalo prepoznalo i na osnovu podataka generiralo (prikazalo) maseni spektar.<sup>13</sup>



**Slika 1.4.** Shematski prikaz komponenti masenog spektrometra

### 1.4.2 Maseni analizatori

Glavna funkcija masenog analizatora je mjeriti omjer mase i naboja ( $m/z$ ) nabijenih čestica i omogućiti njihovo odjeljivanje. Često korišteni analizatori uključuju magnetski sektorski analizator, kvadripolni analizator, kvadripolni analizator s ionskom stupicom, analizator koji mjeri vrijeme preleta te analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama. Magnetski sektorski analizator je dobar za analizu molekula malih struktura, no nema značajnu ulogu u LC/MS sustavu zbog loše osjetljivosti i poteškoća u povezivanju s kolonom.

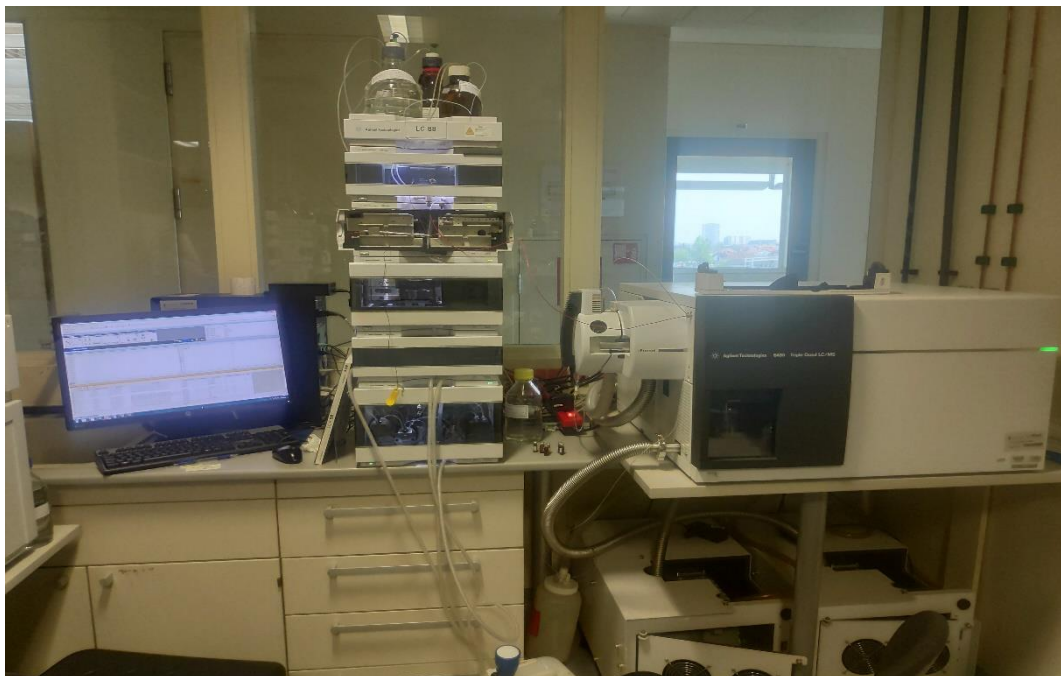
Kvadripolni analizator (engl. *quadrupole*,  $Q$ ) je uređaj u kojem su električni potencijali primijenjeni na suprotnim parovima četiri paralelno postavljena metalna štapa na način da je između prostor kroz koji mogu proći ioni. Ioni prolaze između složenih nabijenih štapova i izloženi su sili u ravnini kretanja. Samo ioni koji su prema svom omjeru  $m/z$  stabilni u toj ravnini ostaju na putanji i dolaze do detektora. Ostali ioni koji ne zadovoljavaju kriterij su odbačeni i ne prolaze putanju između štapova. Kvadripolni analizator s ionskom stupicom (engl. *ion trap*,  $IT$ ) je trodimenzijalna izvedba linearnog kvadripolnog analizatora.

Analizator koji mjeri vrijeme preleta (engl. *Time-of-Flight*,  $TOF$ ) je vrsta analizatora u kojoj se ioni nakon ionizacije ubrzavaju kroz poznati potencijal i putuju kroz cijev do ionskog detektora. Vrijeme dolaska iona na detektor se bilježi, a ovisi o njihovom  $m/z$  omjeru. Teži ioni dulje putuju do detektora, dok lakši putuju kraće.

Analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance*,  $FT-ICR$ ) sadrži centralnu ćeliju u području jakog magnetskog polja koje može zarobiti ione u vakuumskom okruženju. Tamo se ioni ciklički kreću u ravnini okomitoj od izvora magnetskog polja. Nakon pobuđivanja iona pomoću napona, oni u ćeliji vrše ciklotronsko kretanje pomoću kojeg se dolazi do detektoru prepoznatljivog signala.

Uz pojedine analizatore, moguće je koristiti i njihove kombinacije. Tada govorimo o tandemskejoj masenoj spektrometriji ( $MS/MS$ ) pomoću koje je moguće pregledavati pojedinačne ione u skupini iona. Ta vrsta analize daje informacije o ionskim fragmentima koji su potekli iz složenije molekulske strukture. U procesu prvi maseni analizator izdvaja ione od interesa koji se onda fragmentiraju i daju manje ionske produkte koje procesira drugi analizator. Istraživanja s  $MS/MS$  sustavom mogu koristiti različite kombinacije instrumenata,

poput trostrukog kvadripola (QQQ) ili kvadripol-TOF.<sup>14</sup> Trostruki kvadripol se najčešće koristi za kvantitativne analize u farmaceutskoj industriji jer je puno selektivniji od jednostrukog kvadripola. U prvom se kvadripolu spoj ionizira, u drugom se fragmentira, a u trećem se prate određeni fragmentirani ioni.<sup>7</sup>



**Slika 1.5.** Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (Agilent 1290) vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (Agilent 6490)

## 1.5 Ultrazvučna ekstrakcija

Kod ekstrakcije čvrstih uzoraka, ultrazvučna ekstrakcija ima prednost ispred Soxhlet ekstrakcije ili samog mućkanja. Raspon frekvencija ultrazvučnih valova iznosi od 20 kHz do 10 MHz, između čujnih zvučnih i mikrovalova. Svojim širenjem, valovi uzrokuju titranje molekula medija. Ukoliko se poveća intenzitet širenja valova, dolazimo do kritične točke kada se stvaraju mjehurići pare medija kroz koji se šire valovi, što nazivamo kavitacija. Ultrazvuk se temelji na napredovanju mehaničkih valova nastalih kao posljedica izmjene visokog i niskog tlaka. Tim promjenama, kavitacijski mjehurići se šire i kompresiraju dok se naposljetku ne uruše, čime se stvaraju ekstremni uvjeti u mediju odgovorni za fizikalne i kemijske promjene obližnjih čestica. Kod ekstrakcije iz čvrstih uzoraka, ovim procesom se smanjuju čestice uzorka i ubrzava se prijenos mase tvari.<sup>15,16</sup>



Slika 1.6. Kupelj za ultrazvučnu ekstrakciju (Bandelin Sonorex)

## 1.6 Vrednovanje analitičke metode

Vrednovanje ili validacija označava proces kojim se potvrđuje da je neka analitička metoda prikladna za svrhu kojoj je predodređena. Analitička metoda se mora vrednovati kako bi postojao dokumentirani dokaz da će njenim korištenjem rezultati ispitivanja biti točni. Vrednovanje treba razlikovati od razvoja analitičke metode jer vrednovana metoda ne znači da je ona dobra i učinkovita. Kriteriji koje metoda mora zadovoljiti dati su u smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization, ICH*). Važno je definirati terminologiju pojmova koji se u procesu koriste.

**Točnost** (engl. *accuracy*) analitičkog postupka izražava se kao blizina dobivenih rezultata stvarnim ili referentnim vrijednostima.

**Preciznost** (engl. *precision*) analitičkog postupka izražava se kao blizina dobivenih rezultata dobivenih serijom obavljenih mjerenja istog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost se može pobliže proučavati kao ponovljivost, srednja preciznost ili obnovljivost.

**Ponovljivost** (engl. *repeatability*) izražava preciznost pod istim uvjetima kroz kratak vremenski period. **Srednja preciznost** (engl. *intermediate precision*) se odnosi na varijacije u laboratoriju poput korištenja druge opreme, drugog analitičara ili obavljanje analize drugi dan.

**Obnovljivost** (engl. *reproducibility*) označava preciznost između rezultata drugih laboratorija.

**Specifičnost** (engl. *specificity*) je sposobnost jasne procjene željenog analita u prisutnosti drugih komponenti za koje se može očekivati da će biti prisutne.

**Granica dokazivanja** (engl. *detection limit*) analitičkog postupka je najmanja količina analita koju metoda može dokazati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti njegovu točnu vrijednost.

**Granica određivanja** (engl. *quantitation limit*) pojedinog analitičkog postupka je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću točnosti i preciznost.

**Linearnost** (engl. *linearity*) je svojstvo analitičkog postupka da ostvari rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji ili količini analita u uzorku.

**Raspon** (engl. *range*) analitičke metode je interval između najniže i najviše koncentracije analitu u uzorku za koje se pokazalo da metoda ima zadovoljavajuću preciznost, linearnost i točnost.

**Robusnost** (engl. *robustness*) metode je mjera njene izdržljivosti da na metodu ne utječu male namjerne varijacije u parametrima mjerenja te da pritom ostane pouzdana tijekom normalne uporabe.

**Osjetljivost** (engl. *sensitivity*) analitičke metode je jednaka nagibu krivulje umjeravanja u linearnom sustavu.<sup>17</sup>

## **2 Cilj istraživanja**

- Razvoj i optimizacija metode za analitičko određivanje tvari zolmitriptan korištenjem tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom
- Odabrati najprikladnije otapalo za analizu uzoraka
- Optimizacija odabranih parametara masenog spektrometra – energije sraza, temperature plina te napona na kapilari
- Optimizacija određenih parametara tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti – stacionarne faze, mobilne faze te modifikatora
- Utvrđivanje optimalnog vremena trajanja ultrazvučne ekstrakcije uzorka za najkraću analizu bez umanjivanja kvalitete
- Određivanje linearnosti, točnosti i iskorištenja, granice određivanja, granice dokazivanja, preciznosti (preciznost instrumenta, ponovljivost, srednja preciznost), stabilnosti i robusnosti kao odabranih parametara vrednovanja kromatografske metode



### **3 Materijali i metode**

### 3.1 Korištene kemikalije i oprema

U tablici 3.1. i tablici 3.2. navedeni su popisi supstanci i ostalih kemikalija koje su korištene za analizu. Korištena voda je bila ultra visoke čistoće.

**Tablica 3.1.** Popis standarada i korištenih tableta zolmitriptana

Naziv	Kratica	Proizvođač
<b>Zolmitriptan radni standard</b>	WS Zolmi	TAPI Pliva Hrvatska
<b>Zomig 2,5 mg</b>	WJ0060	Astra Zeneca
<b>AscoTop 5 mg</b>	P024110	Astra Zeneca
<b>Zomig 5 mg</b>	WL0116	Astra Zeneca

**Tablica 3.2.** Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač	CAS broj	Čistoća
<b>Acetonitril</b>	CH <sub>3</sub> CN	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	75-05-8	p.a
<b>Amonijev hidroksid</b>	NH <sub>4</sub> OH	Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka	1336-21-6	p.a
<b>Mravlja kiselina</b>	HCOOH	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	64-18-6	p.a

Popis korištene opreme:

- vage – Sartorius Cubis MSA 2.7S-000-DM, Mettler Toledo XP205DR
- ultrazvučna kupelj – Bandelin Sonorex
- pipete – Eppendorf Research plus, Eppendorf Xplorer
- uređaj za pročišćavanje vode - Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System
- vorteks – Vortex genie 2
- statički pištolj – Sigma-Aldrich Zerostat 3

## 3.2 Odabir otapala

Prije mjerenja i podešavanja kromatografskih uvjeta te uvjeta masenog spektrometra, potrebno je izabrati otapalo u kojem je aktivna farmaceutska tvar zolmitriptan topljiva. Uz to, potrebno je voditi računa o kompatibilnosti otapala s pokretnom fazom. Kada bi otapalo bilo čista organska faza, moglo bi doći do lošije simetrije pika, manjeg broja teorijskih tavana i posljedično niže osjetljivosti metode.

Prikladno otapalo je izabrano na način da se odvaže 10 mg radnog standarda zolmitriptana u tikvicu od 100 mL te se vizualno provjerava je li se standard otopio nakon 10 minuta na ultrazvučnoj kupelji.

## 3.3 Priprema otopina za UHPLC analizu

### 3.3.1 Priprema standardnih otopina

Odvagano je 10 mg radnog standarda zolmitriptana na *Sartorius Cubis MSA 2.7S-000-DM* vagi i kvantitativno preneseno u tikvicu od 100 mL te nadopunjeno pripremljenim otapalom do oznake. Za otapanje je korištena ultrazvučna kupelj *Bandelin Sonorex* te vortex miješalica *Vortex genie 2*. Razrjeđivanjem su pripravljene otopine sljedećih koncentracija: 1 ng mL<sup>-1</sup>, 2 ng mL<sup>-1</sup>, 5 ng mL<sup>-1</sup>, 10 ng mL<sup>-1</sup>, 20 ng mL<sup>-1</sup>, 50 ng mL<sup>-1</sup>, 1 µg mL<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Priprema otopina tableta

Tableta je razmrvljena u pateni, a potom prenesena i kvantitativno vagana na *Mettler Toledo XP205DR* vagi. Prah tablete je prebačen u tikvicu od 100 mL i otapalom otopljen. Otapalo je napunjeno do oznake i tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 60 minuta. 1 mL otopine analita pipetom *Eppendorf Research plus* je prenesena u novu tikvicu od 100 mL koja se onda puni otapalom do oznake. Zatim se 1 mL razrijeđene otopine prenosi u sljedeću tikvicu od 100 mL i opet puni otapalom do oznake. Tako pripravljena otopina je filtrirana i pripravljena u mjernu posudicu (vial).

## 3.4 Priprema otopina za optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije

Ukupno 10 Zomig tableta je pojedinačno smrvljeno u 10 tarionika te je sadržaj kvantitativno prebačen u tikvice. Tikvice su nadopunjene otapalom do pola te su stavljene u ultrazvučnu kupelj. Tikvice su vađene u intervalima od 10 minuta te su pritom nadopunjavane otapalom do oznake. Uzorak je razrijeđen na koncentraciju zolmitriptana od 20 ng mL<sup>-1</sup>. Uzorci su filtrirani u UHPLC mjernoj posudici te injektirani u skladu s metodom.

## **4 Rezultati**

#### 4.1 Izbor otapala

U tablici 4.1. prikazani su ishodi otapanja radnog standarda zolmitriptana u različitim omjerima otapala.

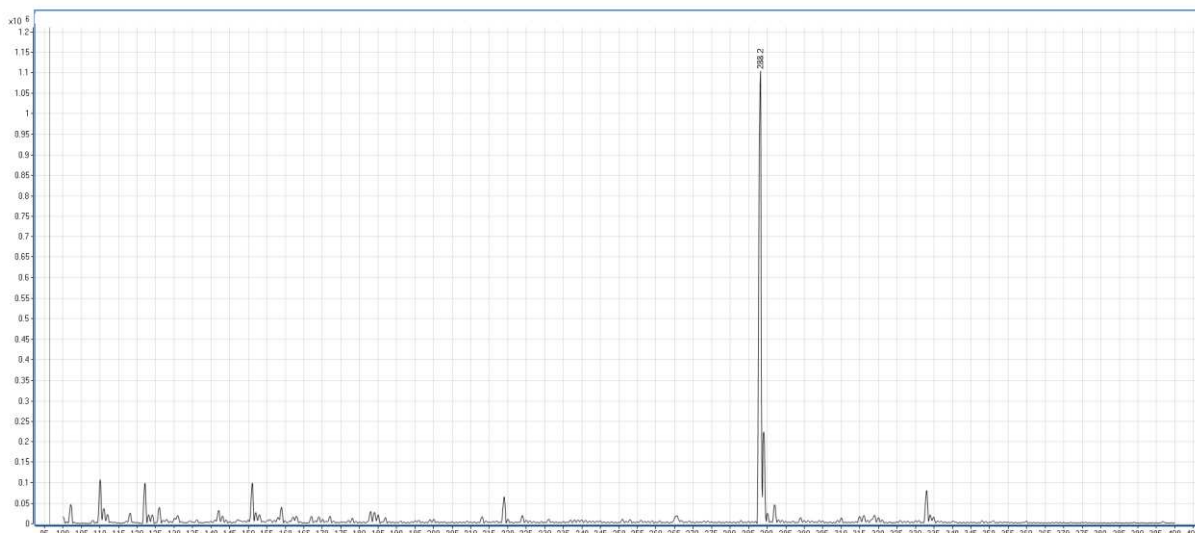
**Tablica 4.1.** Otapala korištena za otapanje zolmitriptana

Otapalo	Omjer (%)	Otopljeno
Ultračista voda	100	ne
Mravlja kiselina/ultračista voda	0,1 : 99,9	ne
Amonijak/ultračista voda	0,1 : 99,9	ne
Acetonitril	100	da
Acetonitril/ultračista voda/mravlja kiselina	49,5 : 49,5 : 1	ne
Acetonitril/ultračista voda/amonijak	49,5 : 49,5 : 1	da
Acetonitril/ultračista voda	50 : 50	ne

Obzirom na dobivene rezultate kao otapalo je izabrana smjesa smjesa vode ultra visoke čistoće, acetonitrila i amonijevog hidroksida u omjeru 49,5 : 49,5 : 1.

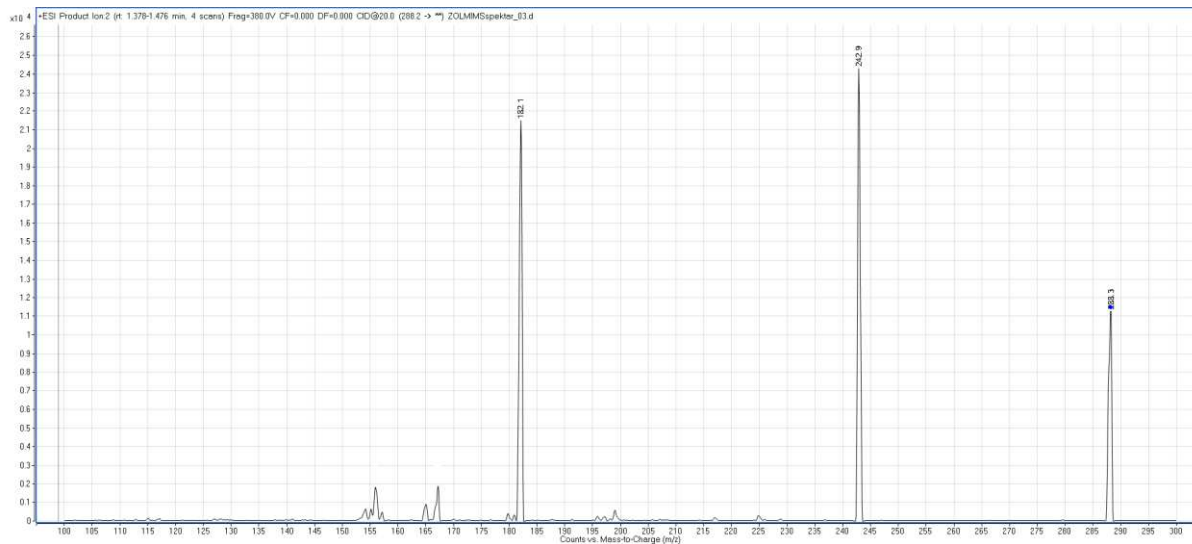
#### 4.2 Identifikacija zolmitriptana uporabom UHPLC-MS/MS – rješavanje masenog spektra/fragmentacija

Pripravljena otopina radnog standarda zolmitriptana u koncentraciji od  $1\mu\text{g mL}^{-1}$  je injektirana u maseni spektrometar. Uzorak je ioniziran elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom modu (načinu). Dobivena masa zolmitriptana uvećana za  $\text{H}^+$  iznosi 288,2 Da.



**Slika 4.1.** Maseni spektar zolmitriptana

Nakon toga injektirana je otopina zolmitriptana u koncentraciji od  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ , prilikom čega su dobiveni karakteristični fragmenti zolmitriptana.



**Slika 4.2.** MS/MS spektar zolmitriptana

Iz MS/MS spektra vidljiva su dva glavna fragmenta zolmitriptana. Prvi fragment  $[M+H]^+$  iznosi 243 Da, a drugi fragment je 182,1 Da. Ta dva fragmenta korištena su za kvantifikaciju i kvalifikaciju pri mjerenju sadržaja tableta zolmitriptana.

### 4.3 Optimizacija parametara masenog spektrometra

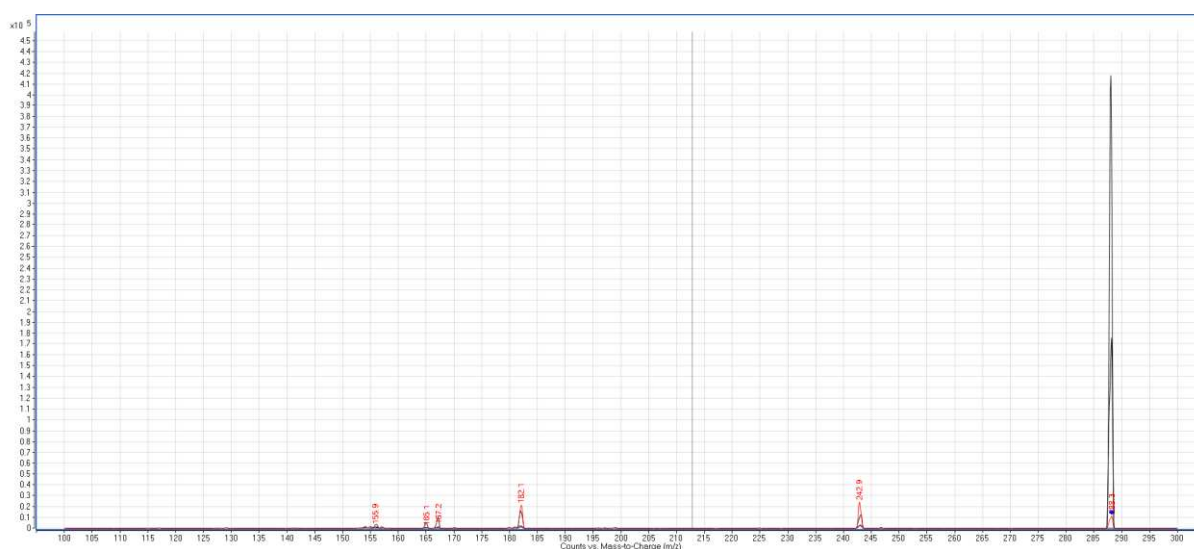
#### 4.3.1 Energija sraza

Za postizanje što bolje osjetljivosti, potrebno je optimizirati uvjete masenog detektora, pri čemu je najvažniji parametar pri optimizaciji detektora energija sraza. Otopina radnog standarda koncentracije  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  je injektirana te je pritom mijenjana energija sraza (0, 10, 20, 30 eV). U prvom kvadripolu mjereno je odzivanje iona 288 Da, a u trećem kvadripolu mjereno je odzivanje iona 243 Da i 182 Da.

Iz dobivenih odziva u tablici 4.2. vidi se kako je najbolji odziv dobiven pri 20 eV. Time je odabrana energija sraza.

**Tablica 4.2.** Odziv detektora pri različitim energijama sraza

Energija sraza (eV)	288/243	288/182
<b>0</b>	15000	12450
<b>10</b>	17300	16530
<b>20</b>	34800	29870
<b>30</b>	32200	29500



**Slika 4.3.** Maseni spektar zolmitriptana pri energiji sraza 20 eV

### 4.3.2 Temperatura plina

Nakon što je prilagođena energija sraza, podešena je temperatura plina. Ispitane su tri temperature plina uz konstantu energiju sraza od 20 eV, 200 °C, 225 °C i 250 °C. Injektiranja je otopina koncentracije 1 ng mL<sup>-1</sup>.

**Tablica 4.3.** Odziv detektora pri različitim temperaturama plina

Temperatura plina (°C)	288/243	288/182
<b>200</b>	30960	26500
<b>225</b>	33200	28700
<b>250</b>	34800	29870

### 4.3.3 Napon na kapilari

Ispitan je i utjecaj napona na kapilari. Ispitani su naponi od 1500 V, 2500 V i 3000 V, uz energiju sraza od 20 eV i temperaturu plina od 250 °C. Injektirana je otopina radnog standarda zolmitriptana koncentracije 1 ng mL<sup>-1</sup> te su mjereni odzivi.

**Tablica 4.4.** Odziv detektora pri različitim naponima na kapilari

Napon na kapilari (V)	288/243	288/182
<b>1500</b>	31800	27190
<b>2500</b>	32300	28430
<b>3000</b>	34800	29870



#### 4.3.4 Parametri spektrometra masa

Optimizacijom energije sraza, temperature plina te napona na kapilari, podešeni su krajnji uvjeti na masenom spektrometru:

- napon fragmentatora: 380 V
- napon na kapilari: 3000 V
- temperatura plina: 250 °C
- protok plina: 15 L min<sup>-1</sup>
- tlak raspršivača: 20 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica (engl. *sheat gas*): 400 °C
- energija sraza: 20 eV
- praćeni ion za kvantifikaciju: 243 Da
- praćeni ion za kvalifikaciju: 183 Da.

#### 4.4 Optimizacija UHPLC metode

Optimizacije UHPLC metode uključivala je odabir optimalne stacionarne faze, odabir modifikatora pokretnih faza i različite omjere otapala u pokretnoj fazi.

##### 4.4.1 Odabir stacionarne faze

Pri odabiru nepokretne faze ispitane su kolone punjene reverznim fazama C8, C18 i fenilna nepokretna faza.

Kao pokretna faza korištena je 0,1 % w/w mravlja kiselina u vodi i 0,1 % w/w mravlja kiselina u acetonitrilu, a kao faktor odabira korišten je faktor simetrije pika (engl. *tailing*, *T*) i broj teorijskih tavana (*N*). Korištena je otopina radnog standarda zolmitriptana koncentracije 20 ng mL<sup>-1</sup>. Rezultati se nalaze u tablici 4.5.

**Tablica 4.5.** Rezultati analize korištenjem različitih punjenja kolone

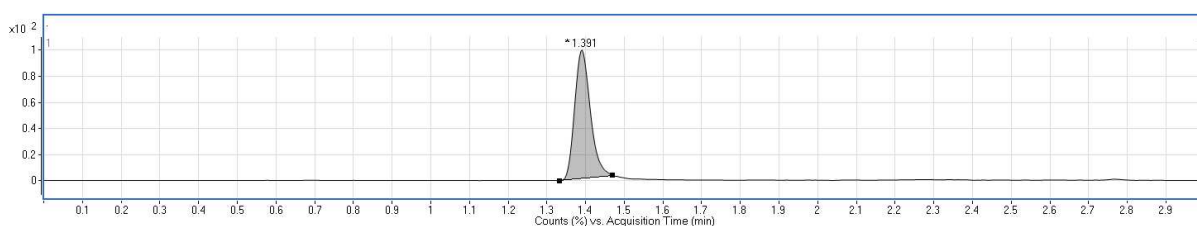
Nepokretna faza	<i>N</i>	<i>T</i>
<b>C18</b>	52350	1,008
<b>C8</b>	47520	0,953
<b>Fenilna</b>	39405	0,890

#### 4.4.2 Odabir modifikatora

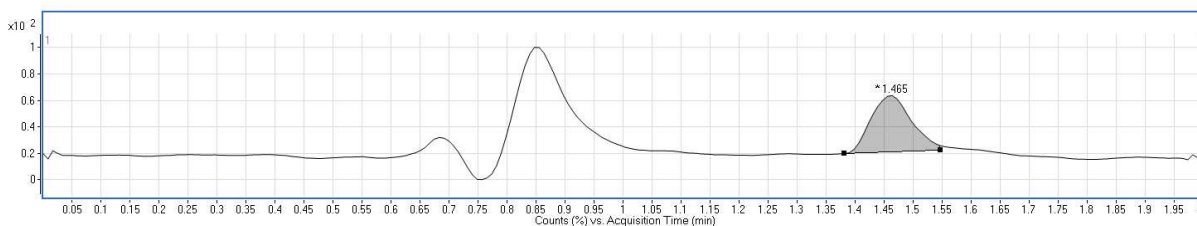
Kako se kao detektor za određivanje zolmitriptana koristio maseni spektrometar, ispitani su lako hlapivi modifikatori - mravlja kiselina (HCOOH) i amonijev hidroksid (NH<sub>4</sub>OH), koju su dodavani u pokretnu fazu u omjeru 0,1 % w/w. U eksperimentima je korištena Waters BEH C18 kolona dimenzija 100 x 2,1 mm, 1,7 μm.

**Tablica 4.6.** Rezultati analize korištenjem dvaju modifikatora

Modifikator	<i>N</i>	<i>T</i>
<b>0,1 % w/w HCOOH</b>	52350	1,008
<b>0,1 % w/w NH<sub>4</sub>OH</b>	22581	0,652



**Slika 4.4.** Kromatogram. HCOOH 0,1 %, BEH C18, 1 ng mL<sup>-1</sup>



**Slika 4.5.** Kromatogram. NH<sub>4</sub>OH 0,1 %, BEH C18, 1 ng mL<sup>-1</sup>

#### 4.4.3 Odabir otapala u mobilnoj fazi

Odabir otapala u pokretnoj fazi je izrazito važan prilikom optimizacije metode. Ispitani su različiti omjeri početnih otapala, a kao optimalan je izabran udio vode/acetonitrila/mravlje kiseline u omjeru 800 : 200 : 1.

#### 4.4.4 Parametri UHPLC metode

Nakon odabira stacionarne faze, modifikatora te otapala u mobilnoj fazi, određeni su optimalni uvjeti analize, navedeni u tablici 4.7.

**Tablica 4.7.** Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje sadržaja tableta zolmitriptana

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity BEH C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Eluens A	0,1 % mravlja kiselina u vodi		
Eluens B	0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	80	20
	2,00	20	80
	2,01	80	20
Vrijeme stabilizacije	1 min		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Temperatura kolone	50 °C		
Detektor	trostruki kvadripol (MRM način)		

MRM - engl. *Multiple Reaction Monitoring*

## 4.5 Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije

Nakon odabira prikladnog otapala i prilagođavanja kromatografskih uvjeta te uvjeta masenog detektora, potrebno je optimizirati metodu ultrazvučne ekstrakcije. Mjereni su odzivi, a rezultati se nalaze u tablici 4.8.

**Tablica 4.8.** Odziv detektora nakon različitih vremena provedenih u ultrazvučnoj kupelji

Vrijeme na UZV	Odziv	Vrijeme na UZV	Odziv
<b>0 minuta</b>	29520	<b>60 minuta</b>	89220
<b>10 minuta</b>	36520	<b>70 minuta</b>	90150
<b>20 minuta</b>	62490	<b>80 minuta</b>	88550
<b>30 minuta</b>	79650	<b>90 minuta</b>	89145
<b>40 minuta</b>	83190	<b>100 minuta</b>	89150
<b>50 minuta</b>	89620		

## 4.6 Vrednovanje metode

Metoda za određivanje sadržaja zolmitriptan tableta UHPLC-MS/MS-om vrednovana je u skladu s ICH smjernicama.<sup>18</sup> Određene su sljedeće izvedbene značajke metode: specifičnost, prikladnost sustava, točnost, preciznost, iskorištenje, granice određivanja i dokazivanja, robusnost i stabilnost otopine.

### 4.6.1 Specifičnost

Specifičnost je sposobnost metode da razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka ili matrice uzorka bez interferirajućeg učinka ostalih komponenti sličnog ponašanja i indikativno je svojstvo za više tvari.<sup>19</sup> Obzirom da se kao detektor u metodi koristio trostruki kvadrupol, čistoća svakog uzorka i standarda je potvrđena na način da je propušтана molarna masa zolmitriptana kroz prvi kvadrupol te njegova dva najznačajnija fragmenta kroz treći kvadrupol. Na taj način je potvrđena specifičnost metode.

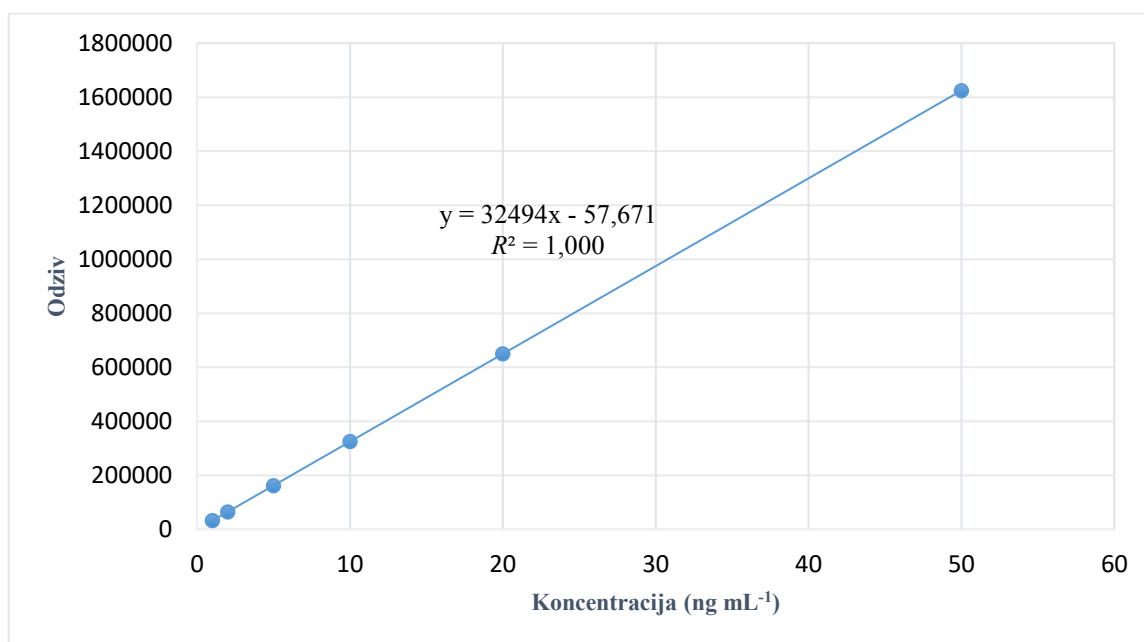
### 4.6.2 Linearnost

Linearnost je potvrđena korelacijskim koeficijentom ( $R^2$ ) koji iznosi  $\geq 0,999$ . Ovisnost signala o koncentraciji prikazana je grafički te je određena jednadžba pravca (nagib i

odsječak) i korelacijski koeficijent ( $R^2$ ). RSD (%) nagiba pravca i odsjeka na ordinati manja je od 2,0 % za zolmitriptan.

**Tablica 4.9.** Koncentracije zolmitriptana s pridruženim odzivima detektora

Koncentracija (ng mL <sup>-1</sup> )	Odziv
1	32500
2	64850
5	162250
10	325145
20	649750
50	1624650



**Slika 4.6.** Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji zolmitriptana

**Tablica 4.10.** Tablični prikaz vrijednosti linearnosti za analizu zolmitriptana

Analit	$n$	Nagib (a)	Odsječak (b)	$R^2$	RSD (%)
Zolmitriptan	6	32494	-57,671	1,000	0,02

#### 4.6.3 Granice određivanja i dokazivanja

Prema smjernicama kriterij odnosa signala i šuma za granicu određivanja je 10, a za granicu dokazivanja 3. Budući da se u radu koristio maseni spektrometar izmjerena je otopina radnog standarda zolmitriptana koncentracije  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ . Ista je otopina injektirana 6 puta, mjerene su površine i omjer signala i šuma. Iz površina je izračunata relativna standardna devijacija. Iz odnosa signala i šuma, računski je određena granica dokazivanja i ona iznosi otprilike  $30 \text{ pg mL}^{-1}$ .

**Tablica 4.11.** Odzivi dobiveni uzastopnim injektiranjem otopine iste koncentracije

Injektiranje	Koncentracija ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Odziv	S/N
1	1	31500	112
2	1	31750	115
3	1	31950	105
4	1	32525	108
5	1	31890	116
6	1	32320	114
<b>RSD (%)</b>		1,173352	

#### 4.6.4 Točnost i iskorištenje

Potvrđena je točnost određivanja zolmitriptana na način da je iz nagiba pravca izračunata teorijska površina te je uspoređena s mjernim površinama, a dobiveni rezultati nalaze se u tablici 4.12. Iz tablice je vidljivo da je iskorištenje metode 99,9 – 100,2 %.

**Tablica 4.12.** Računski dobiven i mjereni odziv prilikom mjerenja različitih koncentracija otopina zolmitriptana

Koncentracija (ng mL <sup>-1</sup> )	Odziv - mjereni	Odziv - računski	Iskorištenje
<b>1</b>	32500	32436,33	100,2
<b>2</b>	64850	64930,33	99,9
<b>5</b>	162250	162412,3	99,9
<b>10</b>	325145	324882,3	100,1
<b>20</b>	649750	649822,3	100,0
<b>50</b>	1624650	1624642	100,0

#### 4.6.5 Preciznost

Prilikom ispitivanja preciznosti metode, ispitana je preciznost instrumenta na način da se tableta Zomig pripremila po opisanom postupku te se injektirala 6 puta zaredom, prilikom čega je izračunat sadržaj te relativna standardna devijacija sadržaja (RSD %). Rezultati se nalaze u tablici 4.13.

**Tablica 4.13.** Preciznost injektiranja

Injektiranje	Sadržaj (%)
<b>1</b>	99,2
<b>2</b>	99,5
<b>3</b>	99,7
<b>4</b>	100,1
<b>5</b>	99,5
<b>6</b>	99,6
<b>RSD (%)</b>	0,298

Ispitana je i ponovljivost metode na način da se isti kontrolni broj tablete pripremio šest puta na isti način te je načinjena analiza. Iz dobivenog odziva izračunat je sadržaj tablete. Izračunata je i relativna standardna devijacija. Rezultati se nalaze u tablici 4.14.

**Tablica 4.14.** Ponovljivost metode

Priprema	Sadržaj (%)
<b>1</b>	99,6
<b>2</b>	98,8
<b>3</b>	99,1
<b>4</b>	100,6
<b>5</b>	100,6
<b>6</b>	98,5
<b>RSD (%)</b>	0,9

Srednja preciznost načinjena je na način da je drugi analitičar napravio analizu istih kontrolnih brojeva Zomig tableta kao i analitičar prethodnog dana. Dobiveni rezultati su potom uspoređeni.

**Tablica 4.15.** Srednja preciznost analize

Priprema	Analitičar I	Analitičar II
	Sadržaj (%)	Sadržaj (%)
<b>1</b>	99,6	100,6
<b>2</b>	98,8	99,5
<b>3</b>	99,1	98,3
<b>4</b>	100,6	99,5
<b>5</b>	100,6	100,3
<b>6</b>	98,5	100,4
<b>Srednja vrijednost</b>	99,5	99,8
<b>RSD (%)</b>	0,9	0,9



#### 4.6.6 Stabilnost

Stabilnost je ispitana na način da su se otopina standarda i uzorak ostavili u tikvici tijekom perioda od 7 dana te su mjereni odzivi standarda prema svježe pripremljenom standardu. Uzorak je kvantificiran prema svježoj pripremi standarda. Rezultati se nalaze u tablici 4.16.

**Tablica 4.16.** Stabilnost otopine standarda i otopine tablete Zomig

Dan	Standard – iskorištenje (%)	Tableta – sadržaj (%)
0	/	99,6
1	99,9	99,5
2	100,1	99,7
3	99,5	99,4
4	99,6	99,6
5	99,2	99,3
6	99,8	99,5
7	99,2	99,5

#### 4.6.7 Robusnost

Robusnost je ispitana na način da su mijenjani parametri metode poput protoka, temperature kolone i udjela mravlje kiseline u pokretnoj fazi. Mjerena je ista serija Zomig tableta te su dobiveni rezultati uspoređeni. Rezultati se nalaze u tablici 4.17.

**Tablica 4.17.** Promjene parametara metode

Parametar	Tableta (sadržaj, %)
Prema metodi	99,6
Protok + 0,05 mL min <sup>-1</sup>	99,8
Protok – 0,05 mL min <sup>-1</sup>	99,7
Temperatura kolone + 5 °C	99,4
Temperatura kolone – 5 °C	99,3
Mravlja kiselina + 0,1 mL	100,1
Mravlja kiselina – 0,1 mL	99,9

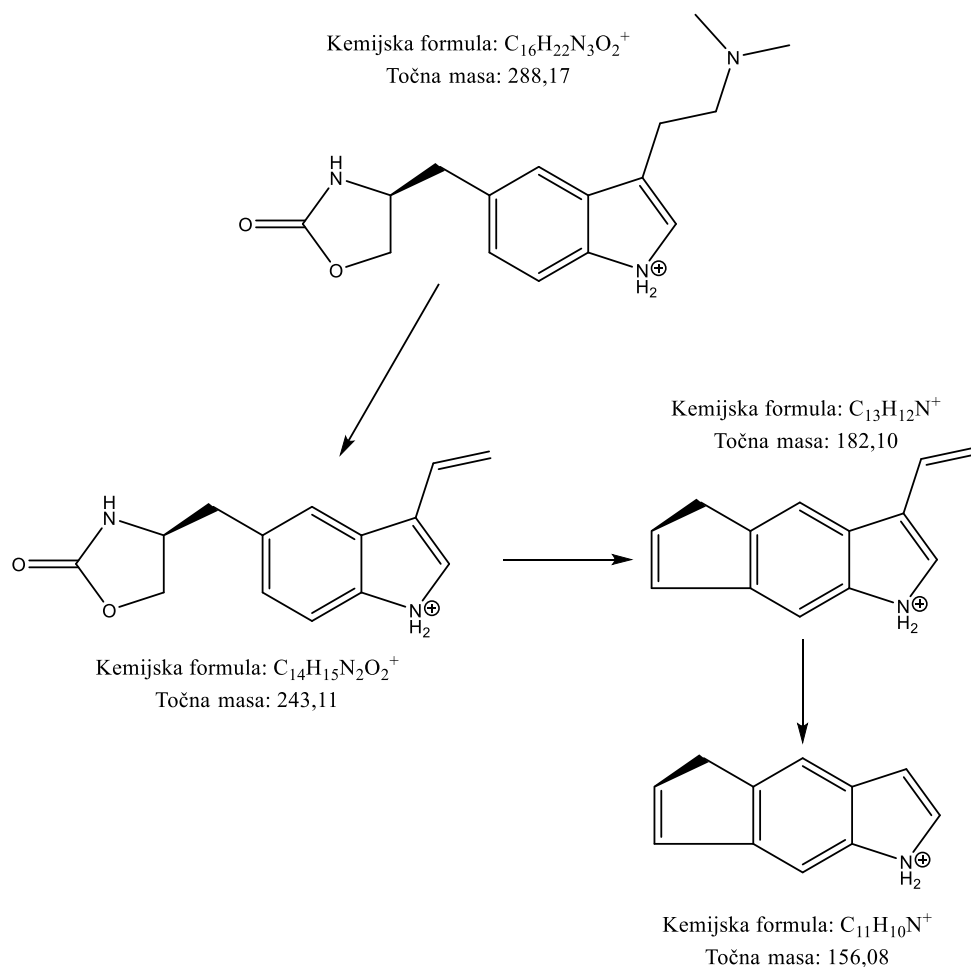


## 5.1 Optimizacija parametara metode

Cilj diplomskog rada bio je razviti i optimizirati metodu određivanja zolmitriptana u tabletama uz pomoć tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom te istu metodu vrednovati, tj. utvrditi njenu prikladnost kroz parametre vrednovanja.

Prije svega bilo je potrebno odrediti najprikladnije otapalo za zolmitriptan. Iz tablice 4.1. vidljivo je da se tvar otopila u acetonitrilu te smjesi acetonitrila, ultračiste vode i amonijaka u omjeru 49,5 : 49,5 : 1. Smjesa acetonitrila, ultračiste vode i amonijaka odabrana je kao otapalo u analizama zbog bržeg otapanja zolmitriptana u usporedbi sa samim acetonitrilom.

Provedena je identifikacija zolmitriptana UHPLC-MS/MS tehnikom čime je dobiven maseni spektar zolmitriptana (slika 4.1.). Mjerenjem otopine zolmitriptana niže koncentracije dobiven je maseni spektar s vidljivim fragmentima prema kojima je predložen mehanizam fragmentacije zolmitriptana prikazan na slici 5.1.



Slika 5.1. Predloženi put fragmentacije zolmitriptana

Kako bi se ostvarila što bolja osjetljivost metode, optimizirani su parametri masenog spektrometra: energija sraza, temperatura plina te napon na kapilari.

Utjecaj energije sraza ispitan je u području od 0 do 30 eV pri čemu je najveći odziv zabilježen na vrijednost od 20 eV što je i uzeto kao optimalna vrijednost. Potom je ispitan utjecaj temperature kolizijskog plina gdje se vrijednost od 250 °C pokazala optimalnom. Između vrijednosti napona na kapilari od 1500 V, 2500 V i 3000 V, odziv detektora je bio najveći pri 3000 V.

Optimizirani su i kromatografski parametri analize: stacionarna faza, modifikator otapala i otapalo u mobilnoj fazi.

Ispitane su tri kolone punjene redom: C8, C18 i fenilnom reverznom fazom, a kao relevantne vrijednosti pri odabiru uzet je broj teorijskih tavana ( $N$ ) i faktor simetrije pika ( $T$ ). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da nepokrenta faza punjena C18 reverznom fazom najpogodnija za određivanje zolmitriptana.

Pri određivanju modifikatora ispitan su mravlja kiselina i amonijev hidroksid. Kao faktor odabira korišten je faktor simetrije pika (engl. *tailing*,  $T$ ) i broj teorijskih tavana ( $N$ ). Budući da je konstanta disocijacije,  $pK_a$  za zolmitriptan jednaka 9,6,<sup>20</sup> rezultati s amonijevim hidroksidom ukazuju na lošiju simetriju i broj teoretskih tavana jer je pH-vrijednost pokretne faze blizu konstanti disocijacije. Zbog toga amonijev hidroksid nije pogodan za određivanje sadržaja zolmitriptana.

Pri odabiru otapala mobilne faze cilj je bio izabrati optimalan omjer početnih otapala koji će omogućiti brzu i preciznu analizu. Smjesa otapala vode/acetonitrila/mravlje kiseline u omjeru 800 : 200 : 1 pokazala se zadovoljavajućom.

Uz kromatografske parametre i parametre masenog spektrometra, optimizirana je i metoda ultrazvučne ekstrakcije, tj. vrijeme uzorka provedeno u ultrazvučnoj kupelji. Ispitan je interval od 0 do 100 minuta s koracima od 10 minuta. Pokazalo se da nakon 60 minuta nije zabilježen značajno veći odziv detektora te je ta vrijednost uzeta kao optimalna radi uštede vremena.

## 5.2 Vrednovanje metode

Linearnost metode određena je za područje koncentracije od 1 do 50 ng mL<sup>-1</sup> kroz šest točaka. Uz koeficijent raspodjele ( $R^2$ ) u iznosu 1,000 rezultati ukazuju na zadovoljavajuću linearnost kroz ispitivani raspon koncentracija.

Prilikom određivanja granice određivanja (LOQ) bilo je potrebno zadovoljiti kriterij odnosa signala i šuma 10:1. Za koncentraciju otopine 1 ng mL<sup>-1</sup> u svih 6 injektiranja odnos je bio barem 10 puta veći od traženog kriterija. Pri određivanju granice dokazivanja (LOD), trebalo je zadovoljiti kriterij omjera signala i šuma 3:1.

Usporedbom računski dobivenih i izmjerenih površina ispod kromatografske krivulje dobivena su iskorištenja za šest koncentracija zolmitriptana u rasponu od 1 do 50 ng mL<sup>-1</sup>. Iskorištenja u rasponu 99,9 – 100,2 % ukazuju na potvrdu točnosti ove metode.

Preciznost metode ispitana je na tri razine kroz preciznost instrumenta, ponovljivost i srednju preciznost. Preciznost instrumenta je iskazana preciznošću injektiranja na način da su određeni sadržaji za svako od 6 uzastopnih injektiranja. Dobivenim rezultatima potvrđena je preciznost instrumenta. Ponovljivost metode potvrđena je pripremom 6 otopina iste koncentracije dobivenih iz 6 tableta zolmitriptana iste serije. Dodatno je ispitana srednja preciznost ponavljanjem istog postupka s drugim analitičarom. Dobiveni rezultati ukazuju da je metoda precizna, ponovljiva i obnovljiva.

Stabilnost je ispitana usporedbom otopine standarda i otopine uzorka sa svježe pripremljenom otopinom standarda kroz 7 dana. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi. Ispitivanjem je potvrđena stabilnost otopina svih 7 dana.

Robusnost metode ispitana je malim promjenama kromatografskih parametara. Usporedbom dobivenih iskorištenja prilikom analize prema parametrima razvijene metode i iskorištenja dobivenih analizom s promijenjenim parametrima, utvrđena je zadovoljavajuća robusnost metode. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da varijacije metode ne utječu značajno na dobivene rezultate.

Provedeni postupci u svrhu vrednovanja prethodno optimizirane kvalitativne i kvantitativne metode analize zolmitriptana pokazali su da je ista prihvatljiva za tu svrhu.



1. Tekućinska kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa sa trostrukim kvadripolom je prikladna metoda za kvantitativno i kvalitativno određivanje zolmitriptana u tabletama.
2. Kao otapalo od izbora za zolmitriptan odabrana je smjesa acetonitrila, ultračiste vode i amonijaka u omjeru 49,5 : 49,5 : 1.
3. Maseni spektrometar je optimiziran na energiju sraza 20 eV, temperaturu plina 250 °C te napon na kapilari 3000 V.
4. Tekućinska kromatografija je optimizirana na način da je odabrano C18 punilo kolone, 0,1 % w/w mravlju kiselinu kao modifikator otapala te smjesu vode/acetonitrila/mravlje kiseline u omjeru 800 : 200 : 1 kao mobilnu fazu.
5. Optimalno vrijeme uzorka provedeno na ultrazvučnoj kupelji je 60 minuta.
6. Razvijena metoda ima zadovoljavajuće vrijednost parametara vrednovanja čime je osigurana njena prikladnost za određivanje zolmitriptana.





1. Bird S, Derry S, Moore R. Zolmitriptan for acute migraine attacks in adults. Cochrane Database of Systematic Reviews 2014, Issue 5. Art. No.: CD008616. DOI: 10.1002/14651858.CD008616.pub2
2. Priručnik za samoliječenje; Menkadžiev B. Glavobolja, Croatian Association of self-medication industry, Zagreb 2017 str. 48
3. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60857> [citirano 24.4.2019.]
4. Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 630-659
5. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentals of Analytical Chemistry. 9. izd. Mary Finch. Belmont 2014 str. 847-934
6. Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Medicinska naklada, Zagreb, 1997, str. 246-257
7. Runje, Mislav. Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku [doktorski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2018.
8. Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2007. str. 347-454
9. URL: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?locale=en\\_US&cid=134803614](https://www.waters.com/waters/en_US/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?locale=en_US&cid=134803614) [citirano 11.8.2019.]
10. Ahuja S, Dong MW. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC: Volume 6 of separation science and technology. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005. str. 19-45
11. Taleuzzaman M, Ali S, Gilani SJ, Imam SS and Hafeez A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. Austin J Anal Pharm Chem. 2015; 2(6): 1056.
12. Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. 3. izd. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2012. str. 353
13. Lee DC, Webb ML. Pharmaceutical analysis. Oxford: Blackwell Publishing/CRC Press; 2004. str. 165-202
14. Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2007. str. 281-299
15. Drljača D, Mrđa M. Ultrazvučna ekstrakcija epikatehina i procijanidina B2 iz čokolade. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2009.

16. Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*. 2017;7(3):47.
17. Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis by HPLC: Volume 3 of separation science and technology. San Diego: Academic Press; 2001. str. 415-443
18. ICH Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures Q2 (R1), 2005.
19. Vessman J, Stefan RI, Van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Thorburn Burns D, Fajgelj A, Müller H. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001). *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1381 –1386.
20. URL: <https://www.drugfuture.com/chemdata/zolmitriptan.html> [citirano 13.9.2019.]



*Cilj istraživanja:* Razvoj i optimizacija te vrednovanje metode kvantitativnog i kvalitativnog određivanja zolmitriptana u tabletama pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane s masenim spektrometrom s trosrukim kvadripolom.

*Materijali i metode:* U istraživanju je korišten radni standard zolmitriptana od kojeg su pripravljene otopine u rasponu od  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  do  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , korištene za optimizaciju parametara masenog spektrometra, tekućinske kromatografije te vrednovanje metode. Radni standard je korišten i u određivanju prikladnog otapala za uzorke. Otopine tableta zolmitriptana korištene su prilikom vrednovanja metode te optimizacije ultrazvučne ekstrakcije.

*Rezultati:* Kao otapalo izbora za zolmitriptan izabrana je smjesa acetonitrila, ultračiste vode i amonijaka u omjeru 49,5 : 49,5 : 1. Maseni spektrometar je optimiziran na energiju sraza od 20 eV, temperaturu plina od 250 °C i napon na kapilari od 3000 V. Stacionarna faza s C18 punilom kolone, 0,1 % w/w mravljom kiselinom kao modifikatorom otapala te smjesa vode, acetonitrila i mravlje kiseline u omjeru 800 : 200 : 1 kao mobilna faza predstavljaju optimalne kromatografske parametre. Na temelju analize MS i MS/MS spektara pretpostavljene su strukture razgradnih produkata i način njihove fragmentacije. Ultrazvučna ekstrakcija je optimizirana na trajanje od 60 minuta. Ispitani parametri vrednovanja koji uključuju specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu određivanja i dokazivanja, stabilnost i robusnost, dali su zadovoljavajuće vrijednosti.

*Zaključci:* Tekućinska kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa je prikladna metoda za kvantitativno i kvalitativno određivanje zolmitriptana u tabletama. Razvijena metoda je vrednovana čime je osigurana njena prikladnost za određivanje zolmitriptana.

Ključne riječi: zolmitriptan, tekućinska kromatografija, ultrazvučna ekstrakcija, vrednovanje



## 9 Summary

*Diploma Thesis Title:* Qualitative and quantitative determination of zolmitriptan in tablets using ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

*Objectives:* Development, optimization and validation of the method for quantitative and qualitative determination of zolmitriptan in tablets by ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry.

*Material and methods:* The study used a standard of zolmitriptan from which solutions ranging from  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  to  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  were prepared and used to optimize mass spectrometry parameters, liquid chromatography parameters and to validate the method. A standard was also used to determine the appropriate solvent for the samples. Zolmitriptan tablet solutions were used to validate the method and optimize ultrasonic extraction.

*Results:* The solvent of choice for zolmitriptan was a mixture of acetonitrile, ultra-pure water and ammonia in a ratio of 49,5 : 49,5 : 1. The mass spectrometer was optimized for a collision energy of 20 eV, a gas temperature of 250 °C and a capillary voltage of 3000 V. Stationary phase with C18 column filler, 0,1 % w/w formic acid as solvent modifier and a mixture of water, acetonitrile and formic acid in the ratio of 800 : 200 : 1 as the mobile phase represent optimized tested chromatographic parameters. Based on the analysis of MS and MS/MS spectra, the structures of the degradation products and the way of their fragmentation were proposed. Ultrasonic extraction is optimized for a duration of 60 minutes. Tested validation parameters including specificity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification and detection, stability and robustness resulted with adequate values.

*Conclusions:* Ultra-high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer is a suitable method for the quantitative and qualitative determination of zolmitriptan in tablets. The method has been validated to ensure its suitability for the determination of zolmitriptan.

Keywords: zolmitriptan, liquid chromatography, ultrasound extraction, validation

## **10 Životopis**

**Osobni podaci:**

- Ime i prezime: Tomislav Marković
- Datum rođenja: 29.8.1995.
- Državljanstvo: hrvatsko
- Adresa: Sisak, Lonjska 92
- E-mail: tomislav\_markovic@outlook.com

**Obrazovanje:**

- 2010. – 2014. Gimnazija Sisak, opći smjer, Sisak
- 2014. – 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: Farmacija

**Radno iskustvo:**

- 2016./2017. Koordinator za javnozdravstvene kampanje Udruge CPSA
- 2018./2019. Koordinator za studentske razmjene Udruge CPSA
- 2019. Promotor Milsing dodatka prehrani
- 2019. Stručno osposobljavanje: 25. veljače – 30. kolovoz; Ljekarne Splitsko – dalmatinske županije, ljekarna Spinut

**Posebne vještine:**

- Strani jezici: engleski – izvrsno, njemački – osnovno
- Vozačka dozvola: B kategorija
- Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000

**Priznanja:**

- 2018. Rektorova nagrada za projekt Praktična znanja za studente
- 2017. – 2019. stipendist Plive

**Ostalo:**

- 2017. Student Exchange Program (SEP), University of Minnesota College of Pharmacy, Minneapolis, Minnesota
- 2018. EPSA Summer University, Izmir, Turska