

# Razvoj HPLC metode za analizu antibiotika doksiciklin hicklata i razgradnih produkata

---

Štanfel, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:332334>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Lana Štanfel

**RAZVOJ HPLC METODE ZA ANALIZU  
ANTIBIOTIKA DOKSICIKLIN HIKLATA I  
RAZGRADNIH PRODUKATA**

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Antonije Trontel (Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta), u BICRO BIOCentar d.o.o. pod voditeljstvom dr. sc. Anite Šporec te uz pomoć dr. sc. Mateje Lozančić.

*Ovim putem se zahvaljujem BICRO BIOcentru na prilici za izradu diplomskog rada, ali posebno dr. sc. Aniti Šporec na uloženom trudu, strpljenju i prenesenom znanju kroz izradu eksperimentalnog dijela rada. Nadalje, želim se zahvaliti izv. prof. dr. sc. Antoniji Trontel na pomoći i savjetima tijekom pisanja rada.*

*Također hvala prijateljima koji su učinili ovih 5 godina zaista posebnim i bili tu za mene.*

*No, punog srca želim zahvaliti obitelji i dečku na neprestanoj potpori, razumijevanju i ljubavi koju su mi pružali kada je bilo najpotrebnije. Bez vas ne bi bila tu gdje jesam.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Bioproceno inženjerstvo

Razvoj HPLC metode za analizu antibiotika doksiciklin hiklata i razgradnih produkata

Lana Štanfel, univ. bacc. ing. biotechn. 0058217531

### Sažetak:

Doksiciklin hiklat je jedan od često upotrebljivanih antibiotika za liječenje različitih bolesti kod ljudi i životinja. Stoga je neophodno ispuniti zahtjeve o kvaliteti lijeka kao što je mikrobiološka čistoća u cilju postizanja sigurnosti primjene lijeka. Uobičajeni pristupi inaktivacije antibiotika uključuju razrjeđivanje do niskih koncentracija ili kemijsku razgradnju, dok se u ovom radu istražuje enzimska razgradnja kao ekološki prihvatljivija alternativa. Odabran je enzim lakaza koji oksidacijom fenolnih skupina razgrađuje doksiciklin hiklat prisutan u farmaceutskom proizvodu odnosno tableti. Razvijena je gradijentna HPLC metoda za praćenje promjene koncentracije doksiciklin hiklata i srodnih spojeva. Primjenom Luna Omega Polar C18 kolone (150 x 3 mm, 3  $\mu$ m) s mobilnom fazom koja se sastoji od acetatnog pufera pH=8,8 i acetonitrila, uz protok 0,8 mL/min i pri 274 nm, eluira se doksiciklin hiklat i njegovi razgradni spojevi unutar 25 minuta. Metodom se može učinkovito pratiti enzimska razgradnja, što je ključno za procjenu djelotvornosti lakaze u razgradnji antibiotika.

**Ključne riječi:** doksiciklin hiklat, lakaza, HPLC, razgradnja

**Rad sadrži:** 57 stranica, 9 slika, 20 tablica, 36 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Anita Šporec

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mario Novak (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

**Datum obrane:** 27. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

Development of HPLC method for analysis of antibiotic doxycycline hyclate and its degradation products

Lana Štanfel, univ. bacc. ing. biotechn. 0058217531

### **Abstract:**

Doxycycline hyclate is one of the most commonly used antibiotics for treating various diseases in humans and animals. Therefore, it is essential to meet the quality requirements of the drug, such as microbiological purity, to ensure the safety of its application. Traditional approaches to antibiotic inactivation include dilution to low concentrations or chemical degradation, while this study investigates enzymatic degradation as a more environmentally friendly alternative. The enzyme laccase, which oxidizes phenolic groups, was selected to degrade doxycycline hyclate present in a pharmaceutical product (tablet). A gradient HPLC method was developed to monitor changes in the concentration of doxycycline hyclate and related compounds. Using a Luna Omega Polar C18 column (150 x 3 mm, 3  $\mu$ m) with a mobile phase consisting of acetate buffer pH=8.8 and acetonitrile, at a flow rate of 0.8 mL/min and detection at 274 nm, doxycycline hyclate and its degradation products elute within 25 minutes. This method can effectively monitor the enzymatic degradation, which is crucial for assessing the effectiveness of laccase in the degradation of the antibiotic.

**Keywords:** doxycycline hyclate, laccase, HPLC, degradation

**Thesis contains:** 57 pages, 9 figures, 20 tables, 36 references

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Antonija Trontel, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Anita Šporec, PhD

### **Reviewers:**

1. Mario, Novak, PhD, Associate professor (president)
2. Antonija, Trontel, PhD, Associate professor (mentor)
3. Andreja, Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Blaženka, Kos, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 27<sup>th</sup> September 2024.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1. ANTIBIOTICI	2
2.1.1. Tetraciklini	2
2.1.2. Doksiciklin hikat	3
2.2. MIKROBIOLOŠKA ČISTOĆA LIJEKOVA	4
2.2.1. Metode ispitivanja mikrobiološke čistoće	5
2.3. LAKAZA	7
2.3.1. Aktivnost lakaze	8
2.3.2. Utjecaj na tetraciklinske antibiotike	8
2.4. METODE ZA ISPITIVANJE ANTIBIOTIKA I NJEGOVE RAZGRADNJE	9
2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti	9
2.4.2. UV/Vis spektrofotometrija	11
2.5. RAZGRADNJA DOKSICIKLIN HIKLATA	12
2.6. RAZVOJ HPLC METODE	13
2.7. RAZVOJ UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Kemikalije	15
3.1.2. Enzim lakaza	15
3.1.3. Otopina za otapanje enzima	16
3.2. UREĐAJI I OPREMA	16
3.2.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)	16
3.2.2. UV/Vis spektrofotometar	16
3.2.3. Ostali uređaji	17
3.2.4. Potrošni materijal	17
3.3. METODE	18
3.3.1. Priprema puferirane peptonske otopine s natrij kloridom	18



3.3.2. Priprema otopine uzoraka tableta doksiciklin hiklata.....	18
3.3.3. Priprema otopine enzima lakaze .....	18
3.3.4. Provođenje enzimске reakcije.....	18
3.3.5. Priprema otopina potrebnih za HPLC analizu .....	19
3.3.6. Priprema otopina potrebnih za provođenje studije forsirane razgradnje.....	20
3.3.7. Analitičke metode .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
4.1. HPLC METODA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA U TABLETAMA DOKSICIKLIN HIKLATA NAKON TRETIRANJA S ENZIMOM LAKAZA .....	26
4.2. STUDIJA FORSIRANE RAZGRADNJE DOKSICIKLIN HIKLATA PRAĆENA NA UV/VIS SPEKTROFOTOMETRU .....	30
4.2.1. Kiselinska hidroliza.....	31
4.2.2. Bazna hidroliza.....	33
4.2.3. Oksidativna razgradnja i fotoliza.....	34
4.2.4. Temperaturna razgradnja .....	36
4.3. RAZVOJ HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE SRODNIH SPOJEVA U TABLETAMA DOKSICIKLIN HIKLATA NAKON TRETIRANJA S ENZIMOM LAKAZA.....	37
4.3.1. Tijek razvoja metode .....	37
4.3.2. Određivanje srodnih spojeva doksiciklin hiklata .....	39
4.4. UPOTREBA RAZVIJENE HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE SRODNIH SPOJEVA NA UZORCIMA TABLETA DOKSICIKLIN HIKLATA NAKON PROVOĐENJA STRES TESTA .....	46
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>53</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>54</b>

## 1. UVOD

Doksiciklin hikat je često upotrebljavan antibiotik zbog njegovog širokog spektra djelovanja te utjecaja na rijetke i opasne bolesti kod ljudi, ali i životinja. Iz tog razloga je vrlo bitna djelatna tvar u farmaceutskoj industriji. Farmaceutske industrije podliježu strogim zahtjevima i čestim regulatornim inspekcijama kako bi se očuvala sigurnost pacijenata. Jedan od bitnih zahtjeva kvalitete lijeka je i onaj o mikrobiološkoj čistoći lijekova. Mikrobiološka čistoća lijekova obuhvaća izostanak mikroorganizama u farmaceutskim pripravcima. Ispitivanje mikrobiološke čistoće propisano je farmakopejom te čini važan dio analize farmaceutskih pripravaka iz razloga što prisutnost mikroorganizama u pripravku može naškoditi krajnjem korisniku pogotovo ako se radi o imunokompromitiranim pacijentima. Prilikom ispitivanja mikrobiološke čistoće antibiotika problem nastaje zbog toga što sam uzorak inhibira rast mikroorganizama te ga je zato potrebno neutralizirati. Dosadašnja neutralizacija antibiotika obuhvaćala je uglavnom kemijske metode, ali primjenjuje se i enzimatska metoda razvijena za neutralizaciju penicilinske skupine antibiotika. Za neutralizaciju antibiotika doksiciklin hikalata dosada nije implementirana neutralizacija putem enzima (Yang i sur., 2017).

Cilj ovog rada je ispitati razgradnju antibiotika doksiciklin hikalata pomoću enzima lakaze te razviti prikladnu i jednostavnu HPLC metodu za određivanje sadržaja doksiciklin hikalata i njegovih pripadajućih onečišćenja. Također je ispitivan utjecaj kemijskih metoda na razgradnju antibiotika što je provedeno kroz studiju forsirane razgradnje.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ANTIBIOTICI

Antibiotici su spojevi s antimikrobnim djelovanjem koji se koriste kao lijekovi zbog mogućnosti sprečavanja rasta ili uništavanja određenih grupa mikroorganizama. Postoje prirodni, polusintetski i sintetski antibiotici. Prirodni antibiotici su proizvodi sekundarnog metabolizma mikroorganizama i samim time nastali isključivo mikrobnom biosintezom, dok polusintetski nastaju kemijskom modifikacijom prirodnih antibiotika. Budući da se radi o produktima kompleksnih struktura i brojnih svojstava, antibiotici se dijele u različite grupe prema: mikroorganizmu producentu, načinu djelovanja, kemijskoj strukturi te metaboličkom putu biosinteze. Podjela prema kemijskoj strukturi jedna je od najznačajnijih iz razloga što antibiotici koji dijele sličnu strukturu, također dijele i sličnu učinkovitost te alergijski, odnosno toksični potencijal. Kod klasificiranja antibiotika prema kemijskoj strukturi dijele se na derivate organskih spojeva kao što su: oligosaharidi, aminokiseline i peptidi, glikozidi, glikopeptidi, nukleozidi, makrociklički laktoni, heterociklički, aliciklički, aromatski, alifatski i kinonski antibiotici (Reeves, 2012).

#### 2.1.1. Tetraciklini

U kinonsku skupinu antibiotika spadaju tetraciklini. Producenti tetraciklina su bakterije iz roda *Streptomyces*. Radi se o antibiotiku širokog spektra djelovanja koji djeluje na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, ali i viruse. Mehanizam djelovanja je inhibicija sinteze proteina uslijed sprečavanja povezivanja aminoacil-tRNA s 30 S podjedinicom bakterijskog ribosoma. Kako bi antibiotik djelovao na ciljani bakterijski organizam potrebno je da prijeđe kroz jedan ili više membrana, ovisno o tome radi li se o gram-pozitivnoj ili gram-negativnoj bakteriji. Struktura antibiotika je sačinjena od linearno spojenih tetraciklinskih jezgri na koje su vezane razne funkcionalne grupe. Najvažnije značajke za antibakterijsku aktivnost su održavanje linearno fuziranih karbocikličkih prstena od šest atoma, zatim određene stereokemijske konfiguracije u strukturi, pozicije dimetilamino skupina i održavanje ketoenolnog sustava u blizini fenolnog prstena. Također, za ostvarivanje farmakokinetičkih svojstva bitno je da se tetraciklini u organizmu spoje s metalnim ionima, budući da su kelirajući agensi (Chopra i Roberts, 2001).

Tetraciklinski antibiotici imaju široku primjenu u liječenju ljudi, ali imaju upotrebu i u veterinarskoj medicini. Ova grupa antibiotika vrlo lako penetrira u tjelesne tekućine i tkiva te se izlučuje kroz urin. Dolaze u obliku dražeja, kapsula i oblika za injekcijsku primjenu, no njihova primjena sve više pada zbog porasta bakterijske rezistencije. Naime, njihova je upotreba još uvijek bitna zbog učinka na rijetke, ali opasne bolesti kao što su tifus, Q-groznica, borelijoza, gonoreja i kuga, te u nekim slučajevima pneumonije. Budući da mogu penetrirati u

sebum i lako se izlučuju kroz znoj koriste se i za terapiju akni. Nadalje, koriste se i pri terapiji peptičnog ulkusa uzrokovanim *Helicobacter pylori* (Baird, 2011).

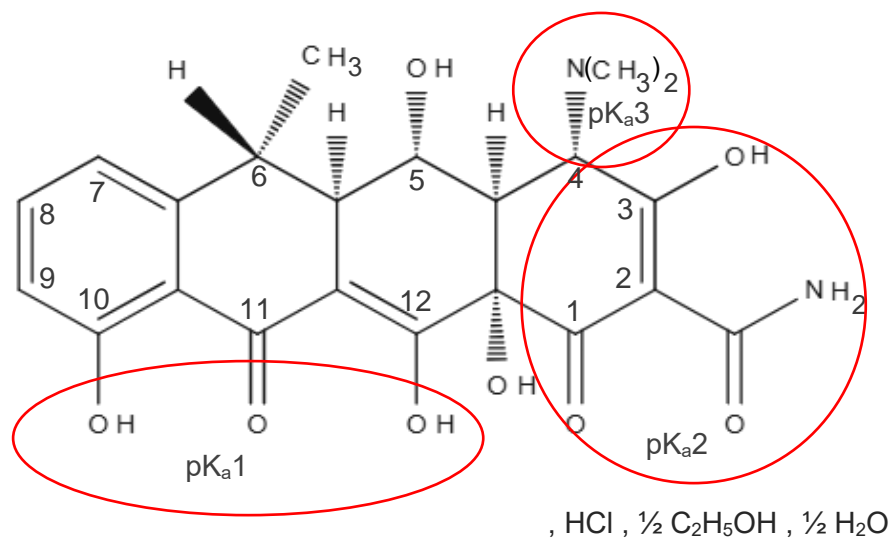
Povijesno, uporaba tetraciklina u veterinarskoj medicini temeljena je na tretmanima za perad, stoku, svinje i ovce. Tetraciklini su se često upotrebljavali zbog toga što dodavanje antibiotika u hranu i piće životinja na farmi povećava njihovu stopu rasta, ali i učinkovitost unosa hranjivih tvari. No, zbog rasta broja sojeva bakterija koji su imali razvijenu rezistenciju došlo je do zabrane korištenja tetraciklina u Europi kao promotora rasta. Današnja uporaba obuhvaća liječenje infekcija kod kućnih ljubimaca pri čemu se najčešće koriste kod urinarnih i respiratornih infekcija te infekcija intestinalnog trakta (Granados-Chinchilla i Rodríguez, 2017).

### 2.1.2. Doksiciklin hiklat

Prvi otkriveni antibiotik iz skupine tetraciklina je bio klortetraciklin, prirodni antibiotik, proizvod bakterije *Streptomyces aureofaciens* (Grossman, 2016). Ubrzo nakon toga je otkriven oksitetraciklin, proizvod sekundarnog metabolizma bakterije *Streptomyces rimosus*. Nadalje, kemijskom modifikacijom klortetraciklina dolazi do otkrivanja tetraciklina – najjednostavnijeg oblika ove grupe antibiotika za koji je kasnije otkriveno da se radi o prekursoru klortetraciklina. Daljnji razvitak polusintetskih antibiotika dovodi do sinteze metaciklina odnosno prekursora za sintezu doksiciklina, najčešće korištenog tetraciklinskog antibiotika (Nguyen i sur., 2014).

Doksiciklin je antibiotik širokog spektra djelovanja koji se može naći u tri oblika, odnosno kao monohidrat, hiklat i hidroklorid. Početna struktura je doksiciklin hiklat koji kroz otapanje u vodi i neutralizaciju s natrijevim hidroksidom prelazi u doksiciklin monohidrat. Nadalje, ukoliko se u otopinu doksiciklin monohidrata doda klorovodična kiselina nastaje doksiciklin hidroklorid (Kogawa i sur., 2012). Prema monografiji europske farmakopeje (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph.Eur.), doksiciklin monohidrat polusintetski je proizvod sačinjen od 95 – 102 % doksiciklina molekularne mase od 462,46 g/mol. Radi se o žutom, kristaliničnom prahu koji je vrlo slabo topiv u vodi i koncentriranom etanolu, dok je topiv u razrijeđenim otopinama mineralnih kiselina i otopinama alkalnih hidroksida i karbonata. Doksiciklin hidroklorid je žuti do smeđi kristalični prah koji je vrlo topiv u vodi, a molekularna masa mu je 480,90 g/mol. Doksiciklin hiklat, žuti je kristalični prah, molekulske mase od 512,9 g/mol. Za razliku od ostalih vrsta doksiciklina, vrlo je topiv u vodi i metanolu, a topiv u koncentriranom etanolu. Otapa se i u otopinama nekih alkalijskih hidroksida i karbonata.

Kemijski naziv doksiciklin hiklata je: (4S, 4aR, 5S, 5aR, 6R, 12aS)-4-(dimetilamino)-3,5,10,12,12a-pentahidroksi-6-metil-1,11-dioksio-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidrotetracen-2-karbomid hidroklorid hemietanol hemihidrat (Kogawa i sur., 2012).



**Slika 1.** Struktura doksiciklin hiklata (vlastita slika)

Promjene u strukturi doksiciklin hiklata direktno utječu na promjenu u antimikrobnoj aktivnosti. Naime, promjene u kisiku na C1 ugljikovom atomu ili hidroksidnoj skupini na C3 atomu dovode do inaktivne strukture. Na C4 atomu se nalazi N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> skupina koja je zapravo ključna za antimikrobnu aktivnost. Uklanjanje CH<sub>3</sub>- skupine s C6 ugljikovog atoma zapravo čini strukturu još stabilnijom, a prisutnost Cl- ili metilne skupine na C9 smanjuje aktivnost molekule (Kogawa i sur., 2012). Budući da je doksiciklin hikat, kao i ostali oblici antibiotika doksiciklina, higroskopan i osjetljiv na svjetlost, treba se čuvati u dobro zatvorenim, tamnim pakiranjima.

Doksiciklin hikat je hidrokloridna sol doksiciklina te ga ova kemijska promjena čini značajno topljivijom u vodi u odnosu na molekulu doksiciklina pri čemu doksiciklin hikat postaje pogodniji oblik za primjenu u raznim farmaceutskim pripravcima. Molekula doksiciklin hiklata ima tri konstante disocijacije kiseline čije su vrijednosti: pKa<sub>1</sub> = 3,02 ± 0,3, pKa<sub>2</sub> = 7,97 ± 0,15 i pKa<sub>3</sub> = 9,15 ± 0,3 (Aniagor i sur., 2021). Funkcionalne skupine zaslužne za vrijednosti konstanti disocijacije kiselina su prikazane na slici 1.

## 2.2. MIKROBIOLOŠKA ČISTOĆA LIJEKOVA

Antibiotici su farmaceutski proizvodi kompleksnog sastava, a kao takvi moraju biti proizvedeni i kontrolirani u skladu sa zahtjevima dobre proizvođačke prakse, ali također moraju biti stabilni i sigurni za pacijenta. Jedan od zahtjeva za proizvode u farmaceutskoj

industriji je da ispunjavaju visoke mikrobiološke standarde odnosno da su sterilni ili sadrže minimalnu mikrobnu populaciju u trenutku izdavanja proizvoda (Europska farmakopeja, 2019).

Proizvodnja čvrstih oralnih oblika lijekova odnosno tableta se sastoji od nekoliko koraka, a oni kritični za potencijalnu mikrobnu kontaminaciju su dobavljanje farmaceutskih sastojaka, proizvodnja vode za formulaciju, vlažna granulacija i mljevenje, sušenje te oblaganje tableta. Mikrobna kontaminacija može se dogoditi dodavanjem farmaceutskih sastojaka, u različitim fazama procesa formulacije konačnog proizvoda, koji su inicijalno sadržavali mikroorganizme. Neutralne pomoćne tvari koje se dodaju u svrhu formulacije tableta su često sam izvor kontaminacije. Rizik kontaminacije proizvoda se povećava ovisno o podrijetlu neutralnih pomoćnih tvari (korištenjem tvari biljnog i životinjskog podrijetla kao što su kukuruzni škrob, laktoza i želatina). Način na koji se to se može izbjeći jest provođenje uhodanih praksi analize ulaznih sirovina. Ulazne sirovine biljnog i životinjskog podrijetla obavezno se testiraju na prisutnost vrsta iz roda *Salmonella* i izostanak *E. coli* (Klink i sur., 2021; Cundell, 2020).

Kod vlažne granulacije kritični je korak dodavanje vode koja također može biti izvor kontaminacije, kao i oprema s kojom se dolazi u kontakt tijekom mljevenja. Dobro praćenje čistoće vode kao i validacija čišćenja opreme može smanjiti rizik. Prilikom oblaganja tableta treba se paziti na vrijeme zadržavanja vodene otopine za oblaganje jer se često radi o otopinama sa želatinom ili drugim bakterijskim nutrijentima koje stvaraju pogodne uvjete za rast mikroorganizama. Sušenje je kritičan korak zbog trajanja klasičnog sušenja na pladnjevima, no implementacijom sušenja u fluidiziranom sloju, puno kraćem procesu, znatno se smanjuje rizik od mikrobnog onečišćenja (Cundell, 2020).

Kako bi se procijenila kvaliteta proizvoda prije izlaska na tržište i je li u skladu s dobrom proizvođačkom praksom, provode se ispitivanja regulirana farmakopejom. Britanska farmakopeja govori kako za lijekove koji se oralno administriraju, ukupan broj živih organizama ne bi trebao biti veći od  $10^3$  za aerobne bakterije i  $10^2$  za plijesni po gramu ili mililitru proizvoda, dok je propisan potpuni izostanak određenih mikroorganizama kao što su *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pulmonella aeruginosa* te *Salmonella* spp. Jedan od načina procjene kvalitete proizvedene šarže je mikrobiološko testiranje finalnog proizvoda. Testiranje krajnjih proizvoda ne može otkriti koja izolirana neispravna praksa u proizvodnji je zaslužna za pad na testiranju mikrobiološke čistoće. Stoga je pravilo u praksi da se prate svi koraci tijekom proizvodnje farmaceutskih proizvoda (Roesti, 2020).

#### 2.2.1. Metode ispitivanja mikrobiološke čistoće

Prema Cundell (2020) trenutačno korištene metode za ispitivanje mikrobiološke čistoće lijekova su metode kvantitativnog brojanja. One obuhvaćaju metodu najvjerojatnijeg

broja (engl. *Most Probable Number*, MPN), metodu brojanja na ploči te membransku filtraciju. Pri tomu je membranska filtracija preferirana pred druge dvije metode jer ima veću osjetljivost.

Metoda najvjerojatnijeg broja je statistička metoda koja koristi serijska razrjeđenja i naciepljivanje u nekoliko epruveta kako bi se procijenio broj živih mikroorganizama. Dok metoda brojanja na ploči uključuje miješanje razrijeđenog uzorka s rastopljenim agarom te izlijevanje u petrijevu zdjelicu. Nakon što se agar stvrdne, inkubira se do 48 sati na prikladnoj temperaturi. Nakon inkubacije formirane zasebne kolonije se broje te se broj poraslih jedinica izražava kroz CFU (engl. *Colony Forming Units*) (Roesti, 2020).

Membranska filtracija obuhvaća propuštanje poznatog volumena uzorka pomoću vakuum pumpe kroz membranu koja zadržava mikroorganizme. Zatim se membrana postavlja na odabrane hranjive podloge i inkubira kroz definirano vrijeme pri odabranoj temperaturi. Radi se o vrlo pouzdanoj metodi određivanja broja prisutnih mikroorganizama budući da se na ovaj način može odrediti prisutnost vrlo malog broja mikroorganizama u uzorku. Kada se koriste metode propisane po Ph.Eur. monografiji nije potrebno izvoditi test prikladnosti ili validaciju metode, već je ključno potvrditi da se mikroorganizmi prisutni u proizvodu mogu detektirati ovom metodom te da sam proizvod ne inhibira rast mikroorganizama. Metoda se ispituje u trenutku izlaska novih proizvoda, zatim uslijed promjena u formulaciji ili doziranju koje mogu utjecati na mikrobni rast ili kada se promijeni procedura metode. Validacija se propisuje farmakopejom i opisuje potrebni medij, razrjeđenje, volumene i inkubacijska vremena potrebna za pravilno ispitivanje mikrobiološke čistoće lijekova. Ponekad i sam uzorak može inhibirati mikrobni rast zbog njegovog antimikrobnog djelovanja (npr. antibiotici) ili zbog smanjenja topljivosti uzorka u uvjetima testiranja. Iz tog je razloga otežano provođenje mikrobiološkog ispitivanja pomoću standardnih propisanih metoda. Razrjeđivanjem uzorka može se smanjiti koncentracija supstancije koja interferira s mikrobnim rastom. No, ukoliko uslijed razrjeđivanja još uvijek nisu postignuti zadovoljavajući rezultati potrebno je supstanciju „neutralizirati“. Neutralizacija obuhvaća promjenu pH vrijednosti otopine ili promjenu kemijskog sastava uzorka kako bi se smanjio inhibični efekt na rast mikroorganizma. Neki od neutralizacijskih agensa koji se koriste su polisorbati (Tween 20 ili 80), natrijev tiosulfat i lecitin. Ukoliko se koriste navedene tvari, potrebno je demonstrirati da one same nisu toksične za mikroorganizme (Klink i sur., 2021; Europska farmakopeja, 2019).

U svrhu neutralizacije antibiotika zbog mikrobiološkog ispitivanja može se koristiti i enzimski neutralizacija. Najčešće je u upotrebi enzimski neutralizacija antibiotika pomoću penicilinaze. Penicilinaze su specifične beta-laktamaze koje djeluju na penicilinske antibiotike. Kada se enzim doda u medij, penicilinaza cijepa  $\beta$ -laktamski prsten i posljedično neutralizira antibiotsku aktivnost. Dosada je proučavano mnogo tehnika za uklanjanje tetraciklina iz

okoliša kao što su adsorpcija, fotokataliza, napredni procesi oksidacije i membranska filtracija. Tretiranje tetraciklina enzimima lakaze čini se najučinkovitijim zbog visoke specifičnosti i selektivnosti reakcije, no do danas korištenje ove metode nije zabilježeno u praksi kao što je to slučaj za  $\beta$ -laktamske antibiotike. Razlog uklanjanja tetraciklina iz uzorka, osim kod ispitivanja mikrobiološke čistoće proizvoda, je relativno visoka koncentracija tih antibiotika u otpadnoj vodi i zemlji kao posljedica pretjeranog korištenja u uzgoju stoke. Povišene koncentracije ove skupine antibiotika su posljedično doprinijele razvoju rezistencije prirodnih bakterijskih populacija (Spina-Cruz i sur., 2018).

Prema Erceg i Knežević (2022) za izvješće Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2022. godini u Hrvatskoj je 251 osoba umrla od infekcijskih bolesti što čini 0,44 % od ukupnog broja umrlih. Postoje više uzroka infekcijskih bolesti, no jedan od mogućih je i infekcija uzrokovana kontaminiranim farmaceutskim proizvodom. Iako ovakve infekcije ne pridonose znatno ukupnom broju smrti od infekcijskih bolesti bitno je za spomenuti, budući da određeni pacijenti koji primaju lijekove imaju veći rizik zaraze od ostatka populacije, prvenstveno imunokompromitirani pacijenti. Populacije pacijenata s većim rizikom su oni s kroničnim stanjima (dijabetes, cistična fibroza i sl.), zatim s kroničnim infekcijskim bolestima (npr. hepatitis i AIDS), pacijenti koji zloupotrebljavaju droge, primaju imunosupresivne terapije (npr. kemoterapija, radijacija, imunosupresija kod transplantacija organa, kortikosteroidi) te specijalni slučajevi, odnosno novorođenčad, starija populacija i trudnice. Ove populacije pacijenata moraju se uzeti u obzir kod procjene rizika mikrobiološke kontaminacije pri čemu lijekovi namijenjeni imunokompromitiranim osobama podliježu objektivno strožim zahtjevima za isključivanje mikroorganizama (Cundell, 2020).

### 2.3. LAKAZA

Lakaza (EC 1.10.3.2) je enzim koji se tipično pronalazi u biljkama i gljivama, no također je pronađen u bakterijama kao što je *Bacillus subtilis*. Radi se o enzimu koji pripada skupini oksidaza, a oksidiraju veliki broj organskih i anorganskih supstrata, uključujući mono-, di- i polifenole, aminofenole, metoksifenole, aromatske amine i askorbat (Ali i sur., 2019).

Lakaza je multibakrena oksidaza s molekularnim kisikom kao krajnjim elektron akceptorom, odnosno enzim koji sadrži po 3 bakrena atoma koji se klasificiraju kao tip I, II i III. Klasifikacija se određuje pomoću UV/Vis spektrometrije i spektrometrije elektro paramagnetske rezonance (engl. *Electron paramagnetic resonance*, EPR). Na taj način se razlikuje tip I atom bakra zaslužnog za plavo obojenje enzima i snažnu elektronsku apsorpciju pri 600 nm koji se može detektirati pomoću EPR. Tip II atoma bakra je bezbojan, ali još uvijek se može detektirati pomoću EPR, no tip III sačinjava par atoma bakra koji slabo apsorbira u UV spektru te EPR signal izostaje (Madhavi i Lele, 2009).



### 2.3.1. Aktivnost lakaze

Lakaze su vrlo nespecifične prema supstratu i oksidiraju širok raspon spojeva. Katalitička reakcija lakaze uključuje redukciju bakra tipa I prilikom oksidacije supstrata, zatim unutrašnji prijenos elektrona s tipa I na tip II i tip III. Transfer elektrona sa supstrata na bakar tipa I kontroliran je putem razlike u redoks potencijalu. Također, vezno mjesto supstrata, često nazivano mjesto bakra tipa I, je „plitko“ odnosno ne seže duboko u enzim, što znači da kod vezanja supstrata ne postoje značajne steričke prepreke. Dok je dostupnost aktivnih mjesta bakra tipa II i III ograničavajuća te se onemogućava vezanje bilo kakvih oksidacijskih spojeva osim kisika (Madhavi i Lele, 2009).

Budući da su lakaze uglavnom izvanstanični proteini, jako su osjetljivi na promjene u temperaturi, pH uvjetima i prisutnosti inhibitora. Lakaze fungalnog podrijetla imaju niži pH optimum jer su prilagođene rastu pri kiselim uvjetima, dok su biljne lakaze unutarstanični proteini koji djeluju u gotovo fiziološkim uvjetima. No, veliki utjecaj na pH optimum imaju i sami supstrati. Na primjer, razlika u redoks potencijalu između fenolnog spoja i bakra tipa I pojačava oksidaciju supstrata pri visokim vrijednostima pH, ali hidroksilni anion koji se veže na tip II i tip III mjesto rezultira u inhibiciji lakazne aktivnosti zbog ometanja unutrašnjeg prijenosa elektrona između tipa I i tipa II i III. Nadalje, fungalne lakaze su sastavni dio mehanizma za uklanjanje toksičnih fenola iz medija, dok su biljni enzimi uključeni u proces formacije lignina. Inhibitori lakaza uglavnom su zajednički svim vrstama i oni su tioglikolna i dietilditiokarbaminska kiselina, cijanidi, metalni ioni, masne kiseline, sulfadrilni reagensi, hidroksilglicin i drugi (Ali i sur., 2019).

### 2.3.2. Utjecaj na tetraciklinske antibiotike

Kod pročišćavanja vode za uklanjanje različitih zagađivača najčešće se koriste enzimi oksidoreduktaze od kojih lakaze imaju najveći doprinos zbog niske cijene i dostupnosti. Ovaj enzim može razgraditi brojne aromatske spojeve (Madhavi i Lele, 2009). Zbog toga je razmatran i utjecaj na antibiotike iz skupine tetraciklina. Prema Zdarta i sur. (2020) slobodna i kovalentno imobilizirana lakaza uspješno je uklonila 100 % tetraciklina iz otopine. U navedenom primjeru, slobodan je enzim imao manju efikasnost uklanjanja budući da imobiliziran enzim ima veću rezistenciju na nepovoljni pH i općenito je bolje zaštićen od ekstremnih uvjeta. Tijekom konverzije tetraciklina pomoću lakaze uočena su tri procesa zaslužna za konverziju molekule antibiotika, a to su oksidacija, dehidrogenizacija i demetilacija. U početku reakcije prisutni su tetraciklini, zatim su promatrana dva nova degradacijska produkta; jedan koji je nastao oksidacijom C5 ugljikova atoma i drugi dehidrogenizacijom na istom mjestu. U sljedećem koraku produkt oksidacije prolazi kroz

proces dehidrogenizacije pri čemu se stvara keton. Naposljetku, otkriven je spoj uklonjenim metilnim skupinama s amina na C4 ugljikovom atomu.

Yang i sur. (2017) istražili su učinkovitost lakaze iz gljive *Cerrena* u detoksifikaciji tetraciklinskih antibiotika. Dok u početku tetraciklin i oksitetraciklin inhibiraju rast testiranih bakterija, nakon 24 h tretmana s lakazom ta inhibicija je ublažena. Nakon dodatnih 48 h inhibitorski učinak na rast bakterija je dodatno smanjen, to jest gotovo potpuno izostaje.

Osim lakaze, istražena je primjena i drugih enzima u svrhu razgradnje tetraciklinskih antibiotika. U radu Wu i sur. (2020) koristi se dizajnirana peroksidaza kod uklanjanja tetraciklinskih antibiotika iz okoliša. Prilikom praćenja doksiciklina nakon tretiranja peroksidazom na UV/Vis spektrofotometru, postignuta je gotovo potpuna razgradnja unutar 5 minuta uz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao oksidans. Osim peroksidaze razlikuje se i tetraciklin destruktaza koja je istraživana u cilju inaktivacije tetraciklina. Radi se o skupini flavoenzima koji mogu inaktivirati tetraciklinske antibiotike monooksidacijom i drugim mehanizmima (Forsberg i sur., 2015). Tetraciklin destruktaza, iako djeluje kao inaktivator tetraciklinskih antibiotika nema široku primjenu zbog toga što njihova aktivnost znatno varira ovisno o okolišnim uvjetima. Zatim geni koji kodiraju za te enzime imaju nisku razinu ekspresije, a enzimi za reakciju zahtijevaju posebne nestabilne kofaktore koji nisu prisutni u svim bakterijskim okolišima (Park i sur., 2017).

## **2.4. METODE ZA ISPITIVANJE ANTIBIOTIKA I NJEGOVE RAZGRADNJE**

Razvitkom antibiotika dolazi i do potrebe za razvojem analitičkih metoda za osjetljivu i selektivnu identifikaciju, odnosno kvantifikaciju antibiotika. Propisane tehnike od strane regulatornih tijela koje se koriste u farmaceutskoj industriji propisane su farmakopejama (Siddiqui i sur., 2017).

Dosada je razvijeno nekoliko različitih metoda za analizu doksiciklin hicklata koje se temelje na kromatografiji, fluorometriji, elektroforezi, potenciometriji, spektrofotometriji te bioanalitičkim testovima. Prema britanskoj farmakopeji, glavna metoda za analizu doksiciklin hicklata je tekućinska kromatografija s UV/Vis detekcijom (Ramesh i sur., 2011).

### **2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti**

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je prvi put uvedena za analizu ljekovitih materijala 1980. godine u američkoj farmakopeji. Tijekom godina se ova tehnika razvijala i od 2004. postala glavna metoda za analizu lijekova u američkoj, ali i u europskoj farmakopeji, što ukazuje na njenu važnost i široku upotrebu (Siddiqui i sur., 2017).

Radi se o vrsti kromatografije kod koje je mobilna odnosno pokretna faza tekućina, a stacionarnu to jest nepokretnu fazu čini čvrsta tvar ili tanki tekući film vezan na čvrsti inertni nosač. Razdvajanje se zasniva na različitim interakcijama spojeva s mobilnom i stacionarnom fazom odnosno afinitetu spojeva prema njima. Postoji više podjela tekućinske kromatografije, no osnovna je podjela prema vrsti primijenjene mobilne i stacionarne faze (načinu rada). Prema tome se razlikuju kromatografije obrnutih faza i normalnih faza. Kod kromatografije obrnutih faza stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza polarna pa do separacije dolazi zbog različite polarnosti analita. Dok za kromatografiju normalnih faza je ključno da koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu, a analit je polarna tvar. Danas se u većem broju koristi kromatografija obrnutih faza (Zotou, 2012).

Sustav tekućinske kromatografije funkcionira na način da mobilna faza nosi uzorak do kolone na kojoj se molekule razdvajaju ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima i različitim interakcijama sa stacionarnom fazom. Nakon razdvajanja na koloni, vrijeme zadržavanja pojedine molekule je različito zbog čega one u različitim vremenima stižu do detektora (Žuvela i sur., 2019).

Kromatografski sustav obuhvaća nekoliko komponenata. Ulazni sustav se sastoji od spremnika mobilne faze i sustava za otplinjavanje. Za tlačenje mobilne faze kroz sustav služi pumpa koja je konstruirana da podnosi visoke tlakove i brzine protoka od 0,1 – 10 mL/min. Prema tehničkim izvedbama, razlikuju se binarne i kvartarne pumpe. Mobilna faza prolazi kroz sustav za injektiranje uzoraka koji je u današnje vrijeme automatiziran u obliku petlje za injektiranje. U trenutku injektiranja uzorak se unosi u petlju gdje se miješa s mobilnom fazom koja ga dalje nosi do kolone. Kolona je napravljena od čelika i karakterizira se kroz duljinu kolone, unutrašnjeg promjera, promjera zrna punila te vrste punila. Vrsta punila kolone kao i vrsta detektora se odabiru na temelju nekog od fizikalno-kemijskih svojstava analita u uzorku. Ukoliko analit(i) u uzorku sadrže UV-kromofore (funkcionalne skupine koje apsorbiraju u UV/Vis dijelu spektra) imaju mogućnost detekcije s UV/Vis detektorom različite izvedbe. Danas se za analizu farmaceutski djelatnih tvari najčešće koristi detektor s nizom dioda (engl. *Diode array detector*, DAD). Za analizu analita koji imaju prirodno fluorescirajuće funkcionalne grupe ili se kemijskom derivatizacijom mogu prevesti u fluorescentni oblik koristi se fluorescencijski detektor (engl. *Fluorescence detector*, FLD). Analiti koji nemaju niti jednu funkcionalnu skupinu najčešće se analiziraju s detektorom indeksa loma (engl. *Refractive index detector*, RID) ili drugim prikladnim detektorom. Poseban detektor koji se koristi za analizu tragova lijekova ili njihovih onečišćenja jest maseni spektrometar (engl. *Mass spectrometer detector*, MSD) (Siddiqui i sur., 2017).

HPLC je jedna od najučestalije korištenih tehnika za praćenje razgradnje antibiotika u farmaceutskoj industriji zbog njene selektivnosti i specifičnosti, preciznosti i reproducibilnosti mjerenja. Selektivnost omogućava istovremenu identifikaciju jednog ili više analita u prisutnosti potencijalnih interferencija koje potječu iz uzorka. Za razliku od selektivnosti, HPLC metode mogu biti i specifične čime se omogućava nedvojbeno određivanje jednog analita u složenom uzorku, primjerice na temelju reakcije kiralni selektor - kiralni analit. HPLC metode se odlikuju i visokom preciznošću koja ukazuje na slaganje niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Reproducibilnost tehnike podrazumijeva da se dobivaju konzistentni i pouzdani rezultati bez obzira na različite šarže antibiotika, različite instrumente, analitičare ili otopine za analizu. Danas je HPLC tehnika rasprostranjena u gotovo svim farmaceutskim industrijama budući je odobrena od strane regulatornih agencija i čini jednu od glavnih tehnika za analizu antibiotika (Peris-Vicente i sur., 2022).

#### 2.4.2. UV/Vis spektrofotometrija

Premda je korištenje HPLC tehnike uobičajeno zbog njene selektivnosti i osjetljivosti, većina metoda je vremenski zahtjevna jer obuhvaća više koraka pripreve otopina za analizu te pripremu instrumenta za provedbu analize. Stoga se danas za jednostavnije analize farmaceutskih lijekova koristi UV/Vis spektrometrijske metode, kojima je najveća prednost brzina i troškovna učinkovitost (Ramesh i sur., 2011).

Spektrometrijske metode zasnivaju se na interakciji elektromagnetskog zračenja s uzorkom, gdje analit emitira ili apsorbira točno određenu količinu zračenja koja se mjeri. Analit je apsorbirao zračenje kada je intenzitet zrake koja je prošla kroz uzorak manji od intenziteta ulazne zrake. Ukoliko je omjer intenziteta ulazne zrake i zrake koja je prošla kroz analit jednak 1 to znači da do apsorpcije nije došlo. Apsorpcija zračenja je opisana Lambert-Beerovim zakonom i govori kako je apsorbancija proporcionalna logaritmu omjera intenziteta zračenja, ali i umnošku molarnog apsorpcijskog koeficijenta, koncentracije analita te duljine puta svjetlosti kroz analit (debljine kivete). Molekularni apsorpcijski koeficijent je zapravo mjera koliko je jako molekula apsorbirala zračenje pri nekoj valnoj duljini i ona ovisi o veličini kromofora (dijela molekule koji apsorbira zračenje). UV-dio elektromagnetskog zračenja je između 200 – 400 nm valne duljine, a spojevi koji apsorbiraju u tom djelu su bezbojni. Vis-dio spektra je u području između 400-800 nm i spojevi koji apsorbiraju u tom dijelu spektra daju obojane otopine (Skoog i sur., 2017).

UV/Vis spektrofotometar se sastoji od izvora zračenja koji je najčešće volframova nit za Vis-dio spektra, dok je deuterijeva lampa izvor UV spektra. Iz izvora svjetlo prolazi kroz monokromator koji služi za propuštanje samo jedne valne duljine svjetlosti karakteristične za analit. Uglavnom se radi o dvosnopnom sistemu u kojem jedan snop zraka ide na uzorak

slijepe probe, a drugi na analit. Nadalje, zrake koje su prošle kroz uzorak odlaze na detektor koji mjeri intenzitet zrake propuštene kroz uzorak. Instrument je spojen na računalo te se na njemu ispisuje podatak apsorbancije pri određenoj valnoj duljini (Chakravarthi i sur., 2023).

Prema europskoj farmakopeji (2019) doksiciklin hikat apsorbira u području od 200 – 400 nm zbog kemijske strukture koja sadrži konjugirani sustav dvostrukih veza i aromatskih prstena te funkcionalnih skupina koje apsorbiraju UV svjetlo u tom području. Doksiciklin hikat, ima dva apsorpcijska maksimuma, jedan pri 274 nm, a drugi pri 345 nm. Sekundarni apsorpcijski pikovi se mogu pojaviti pri snimanju u nižim valnim duljinama što je bitna informacija prilikom praćenja razgradnje antibiotika. Za pravilnu provedbu analize, prvo je potrebno snimiti spektar u rasponu valnih duljina od 200 – 400 nm kako bi se odredilo pri kojoj valnoj duljini otopina analita ima maksimalnu apsorbanciju, a što ovisi i o samom otapalu koje se koristilo za pripremu uzoraka (Sahoo i sur., 2023).

## **2.5. RAZGRADNJA DOKSICIKLIN HIKLATA**

Razgradnja antibiotika se odvija različitim kemijskim ili biokemijskim postupcima ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima antibiotika. Neki od načina su cijepanje strukture uz pomoć enzima ili kemijskom razgradnjom djelovanjem kiselina, lužina, peroksida ili drugih reagensa te djelovanjem temperature i UV zračenja (Yang i sur., 2021).

Osim razgradnje antibiotika u svrhe ispitivanja mikrobiološke čistoće lijeka, ona se provodi i zbog ispitivanja stabilnosti. Ispitivanje stabilnosti obuhvaća studije forsirane razgradnje kojim se lijekovi ciljano razgrađuju u ekstremnim uvjetima. Ovakav test je propisan od strane regulatornih tijela da se procjeni kako se kvaliteta lijeka mijenja s vremenom pod različitim okolišnim uvjetima. Na taj način se procjenjuju i razgradni putevi lijeka, te se razvijaju i validiraju stabilitetno-indikativne analitičke metode kojima će se uspješno kromatografski razlikovati sama djelatna tvar lijeka od razgradnih produkata. Također se ovime bolje razumiju kemijska svojstva proizvoda. Razvijeni model razgradnje prikazuje kako će se u normalnim uvjetima lijek mijenjati kroz vrijeme. Ispitivanja forsirane razgradnje se ujedno nazivaju i stres testom, a moraju obuhvaćati kiselu i bazičnu hidrolizu, temperaturnu i oksidacijsku razgradnju te fotolizu, sve kako bi se procijenila stabilnost lijeka. Hidrolitički test obuhvaća cijepanje nabijenih funkcionalnih grupa prisutnih u molekuli. Za kemijsku hidrolizu se uglavnom upotrebljavaju HCl ili H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a za bazičnu NaOH ili KOH. Za postizanje oksidacijskih uvjeta koristi se većinom 3 – 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U tim su uvjetima amini, sulfidi i fenoli podložni oksidaciji pri čemu nastaju N-oksidi, hidroksilamini, sulfoni i sulfoksidi. Nadalje, pri temperaturnoj razgradnji primjenjuje se temperatura od 40 – 80 °C. Fotoliza je proces razgradnje djelatne tvari pod utjecajem UV i/ili Vis svjetla. Odvijanje fotolize je bitno kako bi se prikazalo koliko je

supstancija osjetljiva na svjetlost. Funkcionalne skupine „osjetljive“ na djelovanje svjetla su karbonili, N-oksidi, alkeni, slabe C-H i O-H veze, sulfidi i polieni (Blessy i sur., 2014).

Epimerizacija doksiciklina se može dogoditi na C4 i C6 mjestima u strukturi zbog izlaganja nepovoljnim uvjetima kao što su neoptimalna temperatura, pH, vlaga i svjetlost pri čemu nastaju spojevi s niskom antimikrobnom aktivnosti koji mogu biti toksični (Barros i sur., 2018). U Europskoj farmakopeji (2019) su opisani najčešći spojevi koji nastaju razgradnjom doksiciklin hicklata, takozvani srodni spojevi ili onečišćenja. Navedeno je šest poznatih onečišćenja; onečišćenje A (6-epidoksiciklin), onečišćenje B (metaciklin), onečišćenje C (4-epidoksiciklin), onečišćenje D (4-epi-6-epidoksiciklin), onečišćenje E (oksitetraciklin), onečišćenje F (2-acetil-2-dekarboksiamidodoksiciklin). U Europskoj farmakopeji (2019) su navedene i dozvoljene granice svakog pojedinačnog razgradnog produkta koje iznose 0,5 % za onečišćenje C, 0,5 % za onečišćenje D i 0,5 % za onečišćenje E. Prema Spina-Cruz i sur. (2018) nakon promatranja utjecaja oksidativne aktivnosti na antibiotik doksiciklin hikat, zaključeno je da s porastom stope razgradnje uslijed oksidativnog stresa je proporcionalno smanjivana antimikrobna aktivnost antibiotika. Zbog toga je zaključeno da razgradnja doksiciklina ne dovodi do razgradnih produkata s visokom antimikrobnom aktivnosti.

## 2.6. RAZVOJ HPLC METODE

Razvoj HPLC metode za farmaceutske gotove proizvode započinje od informacija pronađenih u Ph.Eur. monografiji djelatne tvari ili drugim izvorima. Pri razvoju metode za sadržaj onečišćenja odnosno srodnih spojeva, stres test je vrlo bitna stavka. Ključno je poznavati strukturu spoja i njegovih funkcionalnih skupina kako bi se procijenio stupanj polarnosti molekule. U slučaju doksiciklin hicklata radi se o polarnoj molekuli zbog prisustva hidroksilnih, amino i karbonilnih grupa. Prema tome je najčešće korištena metoda za određivanje sadržaja i srodnih spojeva doksiciklin hicklata metoda obrnutih faza. Nadalje optimalni pH mobilne faze za korištenje u metodi se određuje prema pKa vrijednostima antibiotika (Siddiqui i sur., 2017). Tako prema Mohammad i sur. (2018) metoda za određivanje sadržaja doksiciklin hicklata koristi C18 kolonu, odnosno bazira se na metodi obrnutih faza, a pH mobilne faze je 8,8. Dok u radu Injac i sur. (2007) je korištena mobilna faza s pH vrijednosti od 2,5 pH jedinice. Nadalje sam sastav mobilnih faza je drugačiji, Mohammad i sur. (2018) uz amonijev acetat koriste i EDTA zbog povećavanja efikasnosti kolone odnosno sprječava se deformiranje tzv. Ispružanje ili engl. „*tailing*“ pikova zbog kompleksacije metalnih iona iz mobilne faze.

Sljedeća bitna informacija prilikom razvoja metode jest topljivost djelatne tvari. Tu je vrlo važno prilagoditi otapalo (diluent) u kojem se djelatna tvar otapa sa sastavom mobilne faze. U opisanim HPLC metodama kao diluent za otapanje doksiciklin hicklata se često koristi

otopina 0,01 M HCl budući je doksiciklin hiklat dobro topiv u navedenoj kiselini. U radu Injac i sur. (2007) kao diluent koriste mješavinu acetonitrila i metanola, dok u radu Spina-Cruz i sur. (2018) koriste samo metanol.

U spomenutim metodama prema Injac i sur. (2007) te Spina-Cruz (2018) analize se provode pri različitim temperaturama kolone koja iznosi od 25 °C do 55 °C. Promjenom temperature kolone mijenja se i vrijeme izlaska pika od interesa, pri čemu pik brže eluira s porastom temperature. Odabir temperature kolone ovisi i o ostalim pikovima prisutnim na kromatogramu te u kolikoj mjeri povećanje temperature utječe na separaciju svih pikova na kromatogramu. Budući da doksiciklin hiklat apsorbira u UV/Vis području, za detekciju je korišten DAD detektor pri različitim valnim duljinama koje su varirale od 270 nm do 355 nm. Ono što je zaključeno praćenjem doksiciklin hiklata pomoću spomenutih metoda jest da bazična hidroliza, fotoliza i oksidativna razgradnja najviše utječu na razgradnju doksiciklin hiklata (Mohammad i sur., 2018).

## **2.7. RAZVOJ UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE**

Kada se govori o razvoju spektrofotometrijskih metoda, budući se radi o nešto jednostavnijim postupcima, manje je mogućih parametara koji se mogu mijenjati. Pri razvoju spektrofotometrijskih metoda prvotno je bitno određivanje apsorpcijskog maksimuma za doksiciklin hiklat kako bi se odredilo pri kojoj valnoj duljini je optimalno provoditi mjerenje (Siddiqui i sur., 2017). U radu Ramesh i sur. (2011) se procijenilo da je tijekom razvoja metode, uočeno nekoliko apsorpcijskih maksimuma ovisno u kojim kemikalijama se otopio uzorak. Dok je otopina doksiciklin hiklata u otopini HCl-a pokazivala adsorpcijski maksimum pri 240 nm, otopina u koju je dodana 1 M NaOH je maksimum pokazala pri 375 nm zbog nastajanja žuto-zelenog obojenja, a kod korištenja H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> isto se vidjelo pri 420 nm. Najbolja linearnost metode se pokazala pri korištenju otopine 0,1 M HCl, dok su druge dvije metode zahtijevale dodatnu optimizaciju. U metodama u kojima je za određivanje doksiciklin hiklata korišten UV-spektrofotometar, kao kod Sahoo i sur. (2023) također je najveći stupanj razgradnje primijećen u bazičnim i oksidacijskim uvjetima te pri fotolizi.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

Za potrebe istraživanja korištene su tablete doksiciklin hiklata (400 mg/tbl). Kao analitički standard korištena je djelatna tvar doksiciklin hiklat (*Doxycycline hyclate*, Yangzhou Liberty Pharmaceutical, Yangzhou, Kina) čistoće 98,2 %. Za potrebe razvoja metode korištena je placebo smjesa koja sadrži pomoćne komponente tablete bez djelatne tvari. U tablici 1 su prikazane korištene kemikalije za provedbu HPLC analize.

**Tablica 1.** Kemikalije korištene za provedbu HPLC analize

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Tetrabutilamonijev hidrogensulfat (TBAH)	p.a.	Merck, Darmstadt, Njemačka
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	99 %	VWR Chemicals BDH, Radnor, Sjedinjene Američke Države
Kalijev dihidrogen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	≥ 99,5 %	Merck, Darmstadt, Njemačka
Natrijev hidroksid (NaOH)	≥99%	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Acetonitril (ACN)	HPLC čistoća	VWR Chemicals BDH, Radnor, Sjedinjene Američke Države
Kloridna kiselina, 37 %	p.a.	VWR Chemicals BDH, Radnor, Sjedinjene Američke Države
Metanol	HPLC čistoća	VWR Chemicals BDH, Radnor, Sjedinjene Američke Države
Amonij acetat	>98 %	Sigma-Aldrich, St.Louis, Sjedinjene Američke Države
Amonijak, 25 %	p.a.	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Vodikov peroksid, 30 %	p.a.	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska

##### 3.1.2. Enzim lakaza

Budući da fokus rada ispitivanje inaktivacije doksiciklin hiklata pomoću enzima lakaze u svrhu mikrobiološkog ispitivanja čistoće lijeka potrebno je odabrati prikladan enzim.

Za provedbu eksperimenta neutralizacije antibiotika korišten je enzim lakaza s komercijalnim nazivom *Recombinant Microbial Laccase*, proizvođača Kerfast, kategorije FSA017, kontrolnog broja F0015, čija je izmjerena specifična aktivnost 1.458.264 U/mg proteina. Radi se o rekombinantnom proteinu proizvedenom u *E. coli*, a prvotno je izoliran iz termofilne bakterije. Iz tog razloga ima temperaturni raspon 30 – 90 °C, a optimum 80 °C pri



čemu enzim može zadržati oko 60 % svoje aktivnosti nakon 2 sata izloženosti na 60 °C. Raspon pH je između 5,5 i 7,5, a optimum pH 6. Supstrati su siringaldazin i kisik. Jedna jedinica lakazne aktivnosti (U) definirana je kao promjena u apsorbanciji od 0,001 pri 530 nm u minuti, u uvjetima temperature 70 °C uz pH 6 prilikom korištenja siringaldazina kao supstrata. Specifična aktivnost pročišćenog preparata, proizvođača Swissaustral je veća ili jednaka 300 U/mg.

Vrijednosti pH i temperature pri kojima korišteni enzim ima zadovoljavajuću razinu aktivnosti u rasponu je maksimalno dopuštenih vrijednosti koje ne uzrokuju smrt mikroorganizama pri provedbi tretmana mikrobiološke čistoće.

### 3.1.3. Otopina za otapanje enzima

Za otapanje i ispiranje enzima lakaze koristila se puferirana peptonska otopina s natrij kloridom, pH=7, proizvođača Merck i dolazi u obliku praha kojeg je potrebno otopiti u vodi. Inače se koristi za otapanje, suspendiranje i razrjeđivanje uzoraka farmaceutskog podrijetla.

## 3.2. UREĐAJI I OPREMA

### 3.2.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)

Za provedbu eksperimentalnog dijela rada korišten je HPLC instrument za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti HPLC-DAD Agilent Infinity 1260 (Agilent Technologies, SAD). Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti opremljen je s kvartarnom pumpom G1311B ugrađenim otplinjivačem, automatskim sustavom za injektiranje G1329B s mogućnosti termostatanja od 4 do 40 °C, termostatiranim odjeljkom za kolonu G1316A i detektorom na osnovi niza dioda G4212B DAD (engl. *Diode Array Detector*) koji može snimati u području valnih duljina od 190 nm do 950 nm. Sustav koristi računalni program za obradu podataka OpenLab CDS. Za razvoj metode i analizu uzoraka korištene su sljedeće kolone: Agilent Technologies, PLRP-S 100A, 150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m; Phenomenex, Luna Omega Polar C18, 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m; Thermo Scientific, Hypersil GOLD C18 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XBD, 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m; Phenomenex, Luna 5, C8, 250 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m te Phenomenex, Luna, C18, 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m.

### 3.2.2. UV/Vis spektrofotometar

Za provedbu eksperimentalnog dijela rada korišten je UV/Vis spektrofotometar, Cary 100 od proizvođača Agilent Technologies. Mjerenja su provedena u kivetama UV Quarz Cells 10 mm, proizvođača Agilent Technologies s volumenom od 3,5 mL i optičkom duljinom puta 10 mm.

### 3.2.3. Ostali uređaji

Ostali uređaji koji su korišteni za provedbu eksperimentalnog dijela rada navedeni su u tablici 2.

**Tablica 2.** Ostali uređaji korišteni tijekom izrade rada

<b>Uređaj</b>	<b>Proizvođač</b>
Mikrobiološki kabinet – Safemate 1.2	EuroClone, Milan, Italija
Magnetna miješalica UC15	Stuart, Nottingham, Ujedinjeno Kraljevstvo
Tehnička vaga PS 2100/C/2	Radwag, Radom, Poljska
Inkubator-CB 210	Binder, Tuttlingen, Njemačka
Autoklav- 3870 ELV-D	Tuttnauer, Breda, Nizozemska
Vakuumpumpa	Welch Vacuum, Illinois, Sjedinjene Američke Države
Sustav za filtraciju	Duran, Wertheim, Njemačka
Stolna rotacijska miješalica	IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka
Ultrazvučna kupelj	Falc Instruments Srl, Treviglio, Italija
Sustav za proizvodnju visokopročišćene vode – Synergy UV water purification system	Merck, Darmstadt, Njemačka
Centrifuge 5425 R	Eppendorf, Hamburg, Njemačka

### 3.2.4. Potrošni materijal

Potrošni materijali koji su bili potrebni za provedbu eksperimentalnog rada navedeni su u tablici 3.

**Tablica 3.** Popis potrošnog pribora korištenog tijekom izrade ovog rada

<b>Pribor</b>	<b>Proizvođač</b>
Filteri za sterilizaciju enzima, Ultrafree-MC Centrifugal Filter 0,45 $\mu\text{m}$	Merck, Darmstadt, Njemačka
CHROMAFIL Xtra disposable filter PVDF, 13 mm, 0,45 $\mu\text{m}$	Macherey-Nagel, Düren, Njemačka

**Tablica 3.** Popis potrošnog pribora korištenog tijekom izrade ovog rada (nastavak)

Regenerated Cellulose Membrane Filters, 25 mm, 0,20 $\mu\text{m}$	Sartorius, Göttingen, Njemačka
Non-sterile PTFE Syringe HPLC Filter 13 mm, 0,20 $\mu\text{m}$	Fisherbrand, Pittsburgh, Sjedinjene Američke Države

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema puferirane peptonske otopine s natrij kloridom

U 1000 mL visokopročišćene vode dodano je 16,1 g praha puferiranog natrijev-peptonskog bujona, prethodno izvaganog na analitičkoj vagi, nakon čega je otopina stavljena na miješanje na magnetskoj miješalici dok nije homogeno distribuirana. Pripremljen medij je proziran i blago žute boje.

#### 3.3.2. Priprema otopine uzoraka tableta doksiciklin hklata

Uzorak je pripremljen odvagom jedne tablete u čaši od 50 mL na analitičkoj vagi. Masa jedne tablete iznosila je od 1,36 do 1,44 g, a sadrži 400 mg doksiciklin hklata. Tableta je otopljena u 14,4 mL puferirane peptonske otopine s natrij kloridom, čija je priprema opisana u poglavlju 3.3.1., uz pažljivo miješanje. Otopini je provjeren pH indikator trakama (Macherey-Nagel) te je podešen na pH vrijednost od 6 do 7 jedinica pomoću 32 %-tne otopine NaOH. Tako pripremljena otopina daje razrjeđenje 1:10, odnosno koncentraciju doksiciklin hklata od 27,8 mg/mL. Daljnja razrjeđenja, 1:100 i 1:1000 rađena su pomoću iste otopine. Krajnja koncentracija doksiciklin hklata iznosi približno 0,3 mg/mL. Uzorak se čuvao u laboratorijskom posuđu izrađenog od tamnog stakla budući da je doksiciklin osjetljiv na svjetlo.

#### 3.3.3. Priprema otopine enzima lakaze

Enzim je prije upotrebe potrebno sterilizirati i u tu je svrhu korišten filter Ultrafree-MC Centrifugal Filter 0,45  $\mu\text{m}$ , prethodno namočen s 200  $\mu\text{L}$  puferirane peptonske otopine s natrij kloridom, iz poglavlja 3.3.1., a zatim centrifugiran pri 12 000 g, tijekom 4 min i pri 10 °C. Ovaj korak je ključan kako filter ne bi zadržao enzim. Nakon toga je odvagano 40 mg enzima i otopljeno u 400  $\mu\text{L}$  puferirane peptonske otopine s natrij kloridom. Pripremljena otopina sterilizirana je centrifugiranjem pri 12 000 g, tijekom 4 min i pri 10 °C. Navedena količina enzima dovoljna je za 4 uzorka ako se koristi u koncentraciji 1 mg/mL ili 2 uzorka ako se koristi u koncentraciji 2 mg/mL. Enzim se otapa neposredno prije upotrebe u eksperimentu budući da je najstabilniji u liofiliziranom obliku.

#### 3.3.4. Provođenje enzimske reakcije

U 10 mL pripremljene otopine tablete razrjeđenja 1:1000 dodano je 100 ili 200  $\mu\text{L}$  otopine enzima lakaze pripremljene kako je navedeno što daje količinu enzima od 1 mg/mL

odnosno 2 mg/mL. Tako pripremljena otopina inkubirana je pri 37 °C i u vremenskim točkama 15, 30, 60 i 90 minuta izuzimani su alikvoti uzorka te je reakcija zaustavljena dodatkom otopine 0,01 M HCl.

### 3.3.5. Priprema otopina potrebnih za HPLC analizu

#### 3.3.5.1. 5 M otopina NaOH

U odmjernu tikvicu od 100 mL odvagano je 20 g NaOH, dodano oko 50 mL visoko pročišćene vode i stavljeno je u ultrazvučnu kupelj dok se granule lužine nisu otopile. Nadopunjeno je visoko pročišćenom vodom do oznake.

#### 3.3.5.2. 0,01 M otopina HCl

U odmjernu tikvicu od 100 mL dodano je približno ½ volumena visoko pročišćene vode, pipetirano je 0,83 mL 37 % HCl te dopunjeno do oznake s vodom (c= 0,1 M HCl). Dobivena otopina razrijeđena je tako da je 10 mL pipetirano u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjeno do oznake visoko pročišćenom vodom (c=0,01 M HCl).

#### 3.3.5.3. Mobilna faza 1 (analiza sadržaja) – pufer $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + TBAH + EDTA (pH 8,5)

U laboratorijsku čašu od 1000 mL odvagano je 2,72 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500 mg TBAH i 400 mg EDTA. Dodano je 800 mL vode i 4 mL 5 M NaOH, nakon čega je otopina stavljena na miješanje na magnetskoj miješalici. Otopini je podešen pH na 8,5 pomoću 5 M NaOH. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 1000 mL i nadopunjena visoko pročišćenom vodom do oznake te profiltrirana kroz membranski filter veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### 3.3.5.4. Mobilna faza 2 (analiza sadržaja i onečišćenja) – pufer $\text{NH}_4\text{Ac}$ + EDTA (pH=8,8)

U laboratorijsku čašu od 500 mL odvagano je 11,56 g  $\text{NH}_4\text{Ac}$  i 2,34 g EDTA, dodano je 150 mL visoko pročišćene vode i otopina je stavljena na magnetsku miješalicu. Izmjeren je pH, nakon čega je dodavana otopina  $\text{NH}_4\text{OH}$  pomoću kapalice do pH otopine od 8,8. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 200 mL i nadopunjena visoko pročišćenom vodom do oznake te profiltrirana kroz membranski filter veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$ . Ovako pripremljena otopina je pomiješana s 1800 mL vode kako bi ukupni volumen bio 2 L.

#### 3.3.5.5. Matična otopina doksiciklin hicklata ( $\gamma=1$ mg/mL)

U odmjernu tikvicu od 10 mL izrađene od tamnog stakla odvagano je 10 mg sirovine doksiciklin hicklata i otopljeno u diluentu (0,01 M HCl). Sirovina je otopljena u diluentu pomoću ultrazvučne kupelji.

### 3.3.5.6. Priprema kalibracijskih otopina

Kalibracijske otopine pripravljene su iz matične otopine doksiciklin hklata u koncentracijskom području od 0,005 do 0,100 mg/mL kako je prikazano u tablici 4.

**Tablica 4.** Priprema kalibracijskih otopina doksiciklin hklata

STD	$\gamma_{\text{teorijska}}$ [mg/mL]	$V_{\text{matična otop.}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{diluent}}$ [ $\mu\text{L}$ ]
1	0,005	5	995
2	0,010	10	990
3	0,025	25	975
4	0,050	50	950
5	0,100	100	900

### 3.3.5.7. Priprema uzorka za HPLC analizu

Uzorak tablete razrjeđenja 1:1000 pripremljen je kako je opisano u poglavlju 3.3.4. Tako pripremljen uzorak tablete s enzimom sadrži koncentraciju doksiciklin hklata  $\gamma=0,3$  mg/mL.

Dodatno razrjeđenje uzorka je provedeno tako da je u odmjernu tikvicu od 10 mL od tamnog stakla pipetirano 1 mL uzorka te nadopunjeno do oznake diluentom (0,01 M HCl). Konačna koncentracija doksiciklin hklata iznosi  $\gamma=0,03$  mg/mL što je unutar područja kalibracijske krivulje. Otopina uzorka filtrirana je kroz PTFE filter veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  u tamne bočice za injektiranje na HPLC.

### 3.3.6. Priprema otopina potrebnih za provođenje studije forsirane razgradnje

#### 3.3.6.1. 1 M otopina HCl

U odmjernu tikvicu od 100 mL dodano je približno  $\frac{1}{2}$  volumena visoko pročišćene vode, pipetirano je 8,3 mL 37 % HCl te dopunjeno do oznake s vodom ( $c=1$  M HCl).

#### 3.3.6.2. 1 M otopina NaOH

U odmjernu tikvicu od 100 mL dodano je 20 mL 5 M otopine NaOH iz poglavlja 3.3.5.1. i nadopunjeno do oznake s visoko pročišćenom vodom ( $c=1$  M NaOH).

#### 3.3.6.3. 3 % v/v otopina $\text{H}_2\text{O}_2$

Neposredno prije upotrebe je u odmjernu tikvicu od 100 mL dodano 10 ml 30 % v/v vodik peroksida i nadopunjeno do oznake s visoko pročišćenom vodom.

#### 3.3.6.4. Priprema otopina standarda doksiciklin hiklata

Izvagano je 10 mg sirovine doksiciklin hiklata u odmjernu tikvicu od 10 mL, sadržaj je otopljen uz pomoć ultrazvučne kupelji i nadopunjen s otopinom 0,01 M HCl.

#### 3.3.6.5. Priprema otopina standarda doksiciklin hiklata za stres test

Izvagano je 10 mg sirovine doksiciklin hiklata u tri tamne odmjerne tikvice od 10 ml. U prvoj tikvici doksiciklin je otopljen i nadopunjen s visoko pročišćenom vodom, u drugoj tikvici je otopljen u 0,01 M HCl, a u trećoj u metanolu. U cilju provedbe stres testa iz svake matične otopine je pipetirano je 250  $\mu$ L otopine standarda u tamne odmjerne tikvice od 10 mL. Za provedbu kiseline hidrolize pipetirano je 250  $\mu$ L 1 M HCl, za baznu hidrolizu 250  $\mu$ L 1 M NaOH, za oksidativnu razgradnju 250  $\mu$ L 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, za temperaturnu razgradnju i za fotolizu pipetirano je 250  $\mu$ L odgovarajućeg otapala. Nakon provedenog stres testa tikvice su nadopunjene do oznake pripadajućim otapalima.

#### 3.3.7. Analitičke metode

##### 3.3.7.1. HPLC metoda za određivanje sadržaja doksiciklin hiklata

Metoda za određivanje sadržaja se temelji na metodi za doksiciklin hikat propisanoj u Ph.Eur. monografiji i njeni parametri su prikazani u tablici 5.

Za mobilnu fazu A ove metode korišteni su pufer pH 8,5 (opisan u poglavlju 3.3.5.3.) i acetonitril u volumnom omjeru 80:20. Mobilna faza B sadržava iste komponente promiješane u volumnom omjeru 50:50. Obje mobilne faze su prije analize otplinjavane u ultrazvučnoj kupelji kroz 10 minuta s ciljem uklanjanja mjehurića zraka.

**Tablica 5.** HPLC parametri instrumentalne metode za određivanje sadržaja

<b>Kolona:</b>	<b>Agilent Technologies, PLRP-S 100A, 150 x 4.6 mm, 3 <math>\mu</math>m</b>																							
<b>Mobilna faza A:</b>	(Pufer pH = 8,5) : acetonitril = 80 : 20, v/v																							
<b>Mobilna faza B:</b>	(Pufer pH = 8,5) : acetonitril = 50 : 50, v/v																							
<b>Gradijent:</b>	<table border="1"><thead><tr><th>Vrijeme / min</th><th>Mobilna faza A %</th><th>Mobilna faza B %</th></tr></thead><tbody><tr><td>0,0</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>2,0</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>10,0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>18,0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>18,1</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>25,0</td><td>100</td><td>0</td></tr></tbody></table>	Vrijeme / min	Mobilna faza A %	Mobilna faza B %	0,0	100	0	2,0	100	0	10,0	0	100	18,0	0	100	18,1	100	0	25,0	100	0		
	Vrijeme / min	Mobilna faza A %	Mobilna faza B %																					
	0,0	100	0																					
	2,0	100	0																					
	10,0	0	100																					
	18,0	0	100																					
	18,1	100	0																					
25,0	100	0																						
<b>Protok:</b>	0,8 mL/min																							
<b>Volumen injektiranja:</b>	5 $\mu$ L																							

**Tablica 5.** HPLC parametri instrumentalne metode za određivanje sadržaja (nastavak)

<b>Temperatura injektora:</b>	10 °C
<b>Temperatura kolone:</b>	60 °C
<b>Valna duljina:</b>	355 nm
<b>Vrijeme analize:</b>	25 min

**3.3.7.2. HPLC metoda za određivanje srodnih spojeva doksiciklin hklata**

Metoda za određivanje sadržaja se zasniva na metodi za određivanje sadržaja doksiciklin hklata i onečišćenja prema radu Mohammad i sur. (2018). Korišteni parametri za provođenje ove metode nalaze se u tablici 6.

**Tablica 6.** HPLC parametri instrumentalne metode za određivanje srodnih spojeva

<b>Kolona:</b>	<b>Phenomenex, Luna Omega 3 <math>\mu</math>m Polar C<sub>18</sub>, 150 x 3 mm</b>		
<b>Mobilna faza A:</b>	(Puffer pH = 8,8) : acetonitril = 90 : 10, v/v		
<b>Mobilna faza B:</b>	(Puffer pH = 8,8) : acetonitril = 50 : 50, v/v		
<b>Gradijent:</b>	<b>Vrijeme / min</b>	<b>Mobilna faza A %</b>	<b>Mobilna faza B %</b>
	0,0	100	0
	15,0	100	0
	15,1	0	100
	18,0	0	100
	18,1	100	0
	25,0	100	0
<b>Protok:</b>	0,8 mL/min		
<b>Volumen injektiranja:</b>	10 $\mu$ L		
<b>Temperatura injektora:</b>	10 °C		
<b>Temperatura kolone:</b>	40 °C		
<b>Valna duljina:</b>	274 nm		
<b>Vrijeme analize:</b>	25 min		

**3.3.7.3. UV/Vis metoda za određivanje sadržaja doksiciklin hklata tijekom stres testa**

Apsorbancija uzoraka doksiciklin hklata nakon provođenja studije forsirane razgradnje izmjerena je pomoću spektrofotometra Cary 100, Agilent Technologies. Uzorci su mjereni u staklenim kivetama pri valnoj duljini od 274 i 355 nm.

#### 3.3.7.4. Određivanje koncentracije doksiciklin hklata preko Lambert-Beerovog zakona

Koncentracija doksiciklin hklata se izračunavala prema ovisnosti apsorbancije i koncentracije u Lambert – Beerovom zakonu prikazanog u jednadžbi 1:

$$A_{274\text{ nm}} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad [1]$$

$A_{274\text{ nm}}$  – apsorbancija uzorka pri 274 nm

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent [L/cmmol]

$b$  – duljina puta svjetlosti kroz analit - debljina kivete [cm]

$c$  – koncentracija doksiciklin hklata [mol/L]

#### 3.3.7.5. Određivanje relativne i apsolutne razlike koncentracije doksiciklin hklata

Apsolutna razlika rezultata ( $\Delta_{aps}$ ) pokazuje koliki je % raspada (razgradnje) doksiciklin hklata, a izračunava se prema jednadžbi 2:

$$\Delta_{aps} = \left| \gamma_{izračunato} - \gamma_{stavljeno} \right| \times 100\% \quad [2]$$

$\gamma_{izračunato}$  – koncentracija doksiciklin hklata nakon stres testa, izračunata prema Lambert-Beer zakonu [mg/mL]

$\gamma_{stavljeno}$  – početna koncentracija doksiciklin hklata prije stres testa [mg/mL]

Relativna razlika rezultata ( $\Delta_{rel}$ ) pokazuje koliki je % raspada (razgradnje) doksiciklin hklata, a izračunava se prema jednadžbi 3:

$$\Delta_{rel} = \frac{\left| \gamma_{izračunato} - \gamma_{stavljeno} \right|}{\bar{\gamma}} \times 100\% \quad [3]$$

$\bar{\gamma}$  – srednja vrijednost  $\gamma_{izračunato}$  i  $\gamma_{stavljeno}$

#### 3.3.7.6. Određivanje relativnog vremena zadržavanja srodnih spojeva

Relativno vrijeme zadržavanja (engl. *Relative Retention Time*, RRT) je omjer vremena zadržavanja analita u odnosu na referentnu tvar, dobiven pod istim eksperimentalnim uvjetima. Na ovaj način se u kromatografiji definira vrijeme zadržavanja nepoznatih spojeva (npr. srodnih spojeva / onečišćenja) u odnosu na glavni pik što je u ovom slučaju doksiciklin hklat. RRT prilikom identifikacije onečišćenja doksiciklin hklata se izračunava prema jednadžbi 4:

$$RRT = \frac{\text{Retencijsko vrijeme onečišćenja}}{\text{Retencijsko vrijeme doksiciklin hklata}} \quad [4]$$



### 3.3.7.7. *Određivanje udjela (%) površine srodnih spojeva*

Udio (%) površine pika (engl. *Area percentage*, % Area) je način kvantifikacije pojedinih komponenta u smjesi i naziva se metoda normalizacije. Ova metoda se koristi u kromatografiji kao gruba metoda za procjena određivanja udjela pojedinog spoja. tj. udio površine jedne komponente prema ukupnoj površini. Sadržaj onečišćenja može se izraziti na ovaj način kao % površine, a izračunava se prema jednadžbi 5:

$$\% \text{ površine} = \frac{(\text{površina 1 pika})}{\Sigma(\text{površina svih pikova})} \times 100 \quad [5]$$

### 3.3.7.8. *Određivanje koncentracije doksiciklin hklata i srodnih spojeva prema jednadžbi pravca*

Koncentracija doksiciklin hklata i srodnih spojeva izračunava se prema jednadžbi pravca dobivenom razrjeđenjem matične otopine doksiciklin hklata u radnom području metode tj. nominalnoj koncentraciji doksiciklina od 0,005 mg/mL do 0,1 mg/mL. Jednadžba pravca prikazana je jednadžbom 6:

$$y = ax + b \quad [6]$$

$y$  – površina pika doksiciklin hklata [mAU]

$a$  – nagib pravca

$x$  – koncentracija doksiciklin hklata u otopini [mg/mL]

$b$  – odsječak pravca

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je testirati primjenu enzima lakaze kako bi se razgradila molekula doksiciklin hicklata u svrhu ispitivanja mikrobiološke čistoće antibiotika. Neutralizacijom antibiotskog djelovanja doksiciklin hicklata odnosno njegovom razgradnjom se postiže da se tijekom provođenja ispitivanja prisutnosti mikroorganizama u lijeku ne dobije lažno negativan rezultat koji je posljedica lokalnog djelovanja samog antibiotika, a ne stvarnog izostanka kontaminanata u pripravku lijeka.

Za tu potrebu je prvo razvijena HPLC metoda za određivanje sadržaja doksiciklin hicklata u tableti, a koja se koristila za praćenje smanjenje koncentracije doksiciklin hicklata nakon enzimske razgradnje. Kako bi se razvila metoda prikladna za analizu razgradnih spojeva doksiciklin hicklata u tableti provedena je studija forsirane razgradnje. Prije HPLC analize, provedena su preliminarna ispitivanja razgradnje doksiciklin hicklata pri različitim uvjetima forsirane razgradnje pomoću UV/Vis spektrofotometra. Ta ispitivanja su obuhvaćala ispitivanje najpogodnijeg diluenta za provođenje studije forsirane razgradnje doksiciklin hicklata, kao i provjera apsorpcijski maksimuma doksiciklin hicklata u čistoj tvari u usporedbi s doksiciklin hicklatom u tableti. Nakon toga, razvoj metode za analizu srodnih spojeva je nastavljen primjenom HPLC uređaja gdje je ispitivana prikladnost različitih kolona, mobilnih faza, temperature kolone, protoka i volumena injektiranja na razdvajanje pikova srodnih spojeva doksiciklin hicklata.

U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati HPLC analize sadržaja tablete doksiciklin hicklata nakon tretiranja s enzimom lakaza. U ovom dijelu je praćeno vrijeme inkubacije potrebno za uspješnu razgradnju doksiciklin hicklata, koncentracija doksiciklin hicklata zaostala na filteru te potrebna koncentracija enzima za reakciju.

U poglavlju 4.2. prikazani su rezultati studije forsirane razgradnje primjenom UV/Vis spektrofotometra. Čisti doksiciklin hicklata podvrgnut je stres testu koji je obuhvaćao kiselinsku i baznu hidrolizu, oksidaciju, fotolizu te temperaturnu razgradnju u različitim otapalima, kao i određivanje apsorpcijskog maksimuma.

U poglavlju 4.3. prikazan je tijek razvoja metode za analizu sadržaja i srodnih spojeva doksiciklina u tableti primjenom HPLC uređaja. Razvijena metoda primijenjena je za analizu sadržaja i srodnih spojeva u tableti doksiciklin hicklata nakon tretiranja s enzimom lakaza.

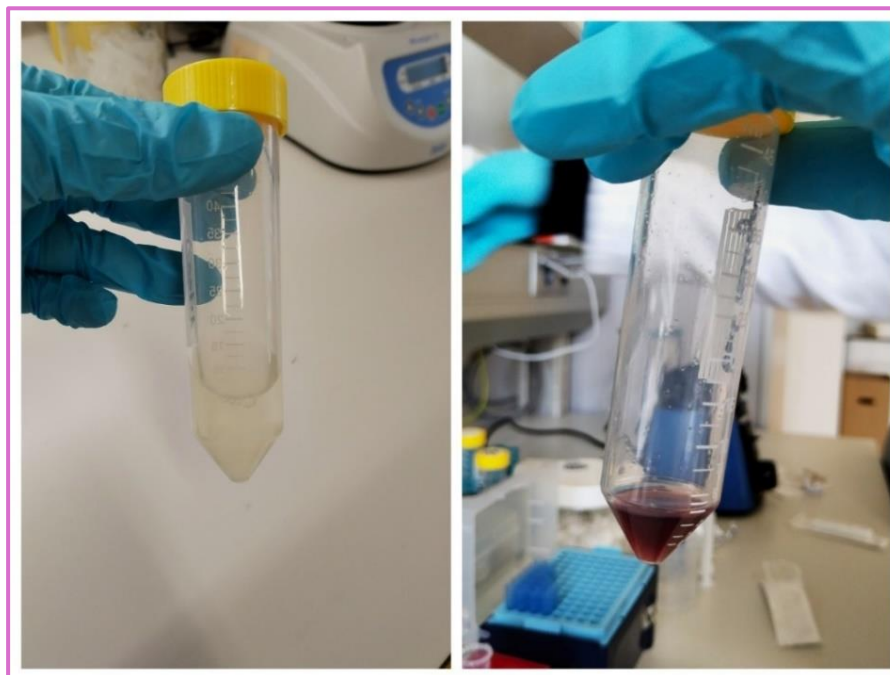
U poglavlju 4.4. je prikazana primjena razvijene HPLC metoda za analizu sadržaja i srodnih spojeva doksiciklin hicklata nakon studije forsirane razgradnje kemijskim putem. Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima enzimske razgradnje.

#### 4.1. HPLC METODA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA U TABLETAMA DOKSICIKLIN HIKLATA NAKON TRETIRANJA S ENZIMOM LAKAZA

Cilj istraživanja je bilo određivanje utjecaja enzima lakaze na uzorak tablete doksiciklin hiklata. Priprema enzima je opisana u poglavlju 3.3.3., a priprema uzorka tablete doksiciklin hiklata u poglavlju 3.3.2. Kako bi se odredila koncentracija doksiciklin hiklata u pojedinim uzorcima izrađen je kalibracijski pravac primjenom sirovine djelatne tvari pripremljenom kao što je napisano u poglavlju 3.3.5.6.

Prvi korak u istraživanju obuhvaćao je određivanje je li enzim lakaza ima učinak na doksiciklin hiklat, ispitivanje koji je najbolji postupak pripreme uzorka te koliko antibiotika zaostaje na filteru prilikom filtriranja uzorka enzima i otopine doksiciklin hiklata. Ponovljivost pripreme uzorka iz 3 tablete doksiciklin hiklata se odredilo mjerenjem koncentracije doksiciklin hiklata u otopini. Koncentracija enzima u eksperimentu je iznosila 1 mg/mL, a koncentracija supstrata doksiciklin hiklata 0,3 mg/mL. Tijekom ukupno 90 min inkubacije analizirani su alikvoti reakcijske smjese u 5 vremenskih točaka:  $t_0$ ,  $t_1$ -15 min,  $t_2$ -30 min,  $t_3$ -60 min i  $t_4$ -90 min. Za napomenuti je da tijekom inkubacije uzorci nisu bili miješani na tresilici. Isti uzorci su analizirani prije i poslije filtracije pomoću PVDF filtera pora 0,45  $\mu\text{m}$ , u cilju provjere da li se i u kojoj mjeri doksiciklin hiklat zadržava na filteru.

Prilikom izuzimanja alikvota reakcijske smjese (enzim lakaza i doksiciklin hiklat) primijećena je izrazito purpurna boja uzorka što je prikazano na slici 2. Ono što je također primijećeno jest da se intenzitet boje pojačavao kako je teklo vrijeme inkubacije.



**Slika 2.** Uzorak koji sadrži smjesu enzima lakaze i otopine doksiciklin hiklata prije dodavanja enzima (lijevo) te nakon 60 minuta inkubacije na 37 °C (desno)

Ključan korak nakon izuzimanja alikvota iz reakcijske smjese je bio zaustavljanje reakcije. Način na koji se zaustavljala reakcija je bio dodavanjem otopine 0,01 M HCl u reakcijsku smjesu što je dovelo do denaturiranja enzima, a prilikom čega je došlo do obezbojenja otopine.

Korištena metoda za određivanje sadržaja je prikazana u tablici 5, a temelji se na Ph.Eur. metodi za analizu sadržaja doksiciklin hiklata. Dobiveni kromatogrami su obrađeni pomoću računalnog programa Open LAB CDS. Rezultati HPLC analize prikazani u tablici 7, prikazuju koncentraciju doksiciklina u tableti u svakoj točki izračunatu prema kalibracijskom pravcu ( $y=3902,7x + 0,7243$ ,  $R^2 = 0,9997$ ).

**Tablica 7.** Sadržaj doksiciklin hiklata u otopini tableta nakon razgradnje s enzimom lakaza koncentracije 1 mg/mL

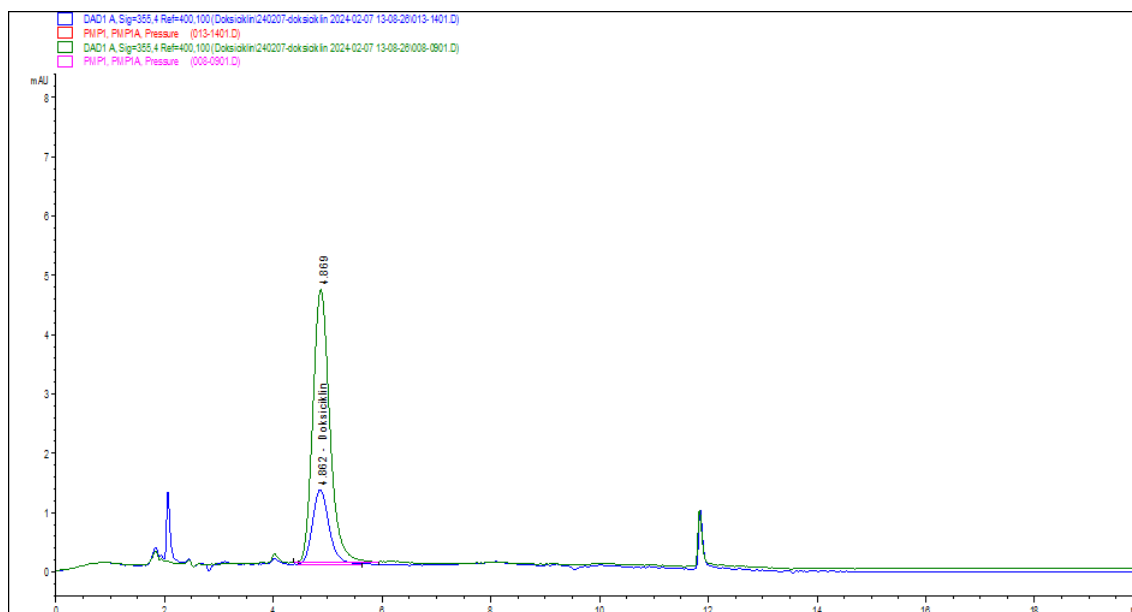
Uzorak		Retencijsko vrijeme [min]	Površina pika [mAU]	$\gamma$ (doks.hikl.) kalib.pravac [mg/mL]	$\gamma$ (doks.hikl.) konačna [mg/mL]	$\Delta_{aps}$
Uzorak 1 ( $t_0$ )	N	4,532	121,41954	0,031	0,3093	0,08
	F	4,528	89,81614	0,023	0,2283	
Uzorak 2 ( $t_1=15$ min)	N	4,540	83,66810	0,021	0,2125	0,07
	F	4,502	57,81359	0,015	0,1463	
Uzorak 3 ( $t_2=30$ min)	N	4,526	55,70598	0,014	0,1409	0,01
	F	4,493	50,50568	0,013	0,1276	
Uzorak 4 ( $t_3=60$ min)	N	4,348	26,85015	0,007	0,0669	0,00
	F	4,395	24,91591	0,006	0,0620	
Uzorak 5 ( $t_4=90$ min)	N	4,378	5,04657	0,001	0,0111	0,00
	F	4,411	5,34032	0,001	0,0118	

N=nefiltrirano, F=filtrirano,  $\Delta_{aps}$ =apsolutna razlika

Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 7, uz koncentraciju enzima 1 mg/mL, enzimaska razgradnja doksiciklin hiklata nakon 60 minuta uzrokuje smanjenje koncentracije za 78,4 % dok nakon 90 minuta dolazi do smanjenja od 96,4 %. Apsolutna razlika prikazuje razliku vrijednosti koncentracija (mg/mL) između pojedinačnih nefiltriranih i filtriranih uzoraka. Rezultati apsolutne razlike pokazuju da je vrlo mala razlika u sadržaju doksiciklin hiklata

između nefiltriranog i filtriranog uzorka što ukazuje da se doksiciklin ne zadržava na filteru tijekom postupka filtracije.

Slika 3 prikazuje kromatogram u dvije odabrane točke početnoj u 0. minuti (zeleno) te u 60. (plavo) prilikom čega se vizualno uočava smanjenje koncentracije doksiciklin hklata u uzorku budući da je intenzitet razgradnje doksiciklin hklata proporcionalan smanjenju površine pika.



**Slika 3.** Kromatogram nefiltriranog uzorka doksiciklin hklata u 0. minuti (zeleni pik) i 60. minuti (plavi pik) u eksperimentu prikazanom u tablici 7

Ispitivan je i utjecaj povećanja koncentracije enzima s 1 mg/mL na 2 mg/mL u cilju skraćivanja vremena reakcije potrebne za razgradnju doksiciklin hklata. Reakcija s povećanom koncentracijom enzima uz istu koncentraciju supstrata doksiciklin hklata (0,3 mg/mL) odvijala se ukupno 30 min. Analizirani su alikvoti reakcijske smjese u 3 točke:  $t_0$ ,  $t_1$ -15 min,  $t_2$ -30 min. Rezultati sadržaja doksiciklin hklata u otopini tableta prikazani su u tablici 8. Prema dobivenim rezultatima, izračunatim prema kalibracijskom pravcu, tijekom 30 min koncentracija doksiciklin hklata se smanjuje 54,0 % u filtriranom uzorku odnosno 53,4 % u nefiltriranom uzorku. Uspoređujući navedene podatke s rezultatima iz tablice 7 gdje je nakon 30 minuta smanjenje koncentracije doksiciklin hklata u uzorku bilo 54,45 %, vidljivo je da povećanje koncentracije enzima ne pridonosi većoj učinkovitosti razgradnje.

**Tablica 8.** Sadržaj doksiciklin hklata u otopini tableta doksiciklin hklata nakon razgradnje s enzimom lakaza koncentracije 2 mg/mL tijekom 30 minuta

Uzorak		Retencijsko vrijeme [min]	Površina pika [MAU]	$\gamma$ (doks.hikl.) kalib.pravac [mg/mL]	$\gamma$ (doks.hikl.) konačna [mg/mL]	$\Delta_{aps}$
Uzorak 1 ( $t_0$ )	N	4,755	108,62218	0,027	0,2706	0,02
	F	4,760	100,62605	0,025	0,2513	
Uzorak 2 ( $t_1=15$ min)	N	4,785	72,91576	0,018	0,1845	0,01
	F	4,776	67,82546	0,017	0,1722	
Uzorak 3 ( $t_2=30$ min)	N	4,743	48,04406	0,012	0,1244	0,01
	F	4,753	44,97875	0,012	0,1171	

N=nefiltrirano, F=filtrirano,  $\Delta_{aps}$ =apsolutna razlika

\* kalibracijski pravac;  $y = 4144,3 x - 3,5316$ ,  $R^2 = 0,9998$

Isti je eksperiment ponovljen na način da je produženo vrijeme reakcije do 60 min te su rezultati prikazani u tablici 9.

**Tablica 9.** Sadržaj doksiciklin hklata u otopini tableta nakon razgradnje s enzimom lakaza koncentracije 2 mg/mL tijekom 60 minuta

Uzorak		Retencijsko vrijeme [min]	Površina pika [MAU]	$\gamma$ (doks.hikl.) kalib.pravac [mg/mL]	$\gamma$ (doks.hikl.) konačna [mg/mL]	$\Delta_{aps}$
Uzorak 1 ( $t_0$ )	N	4,869	99,17903	0,024	0,2426	0,03
	F	4,840	88,87711	0,022	0,2171	
Uzorak 2 ( $t_1=15$ min)	N	4,898	56,67743	0,014	0,1374	0,01
	F	4,913	54,34171	0,013	0,1316	
Uzorak 3 ( $t_2=60$ min)	N	4,910	25,35959	0,006	0,0599	0,00
	F	4,862	26,74064	0,006	0,0633	

N=nefiltrirano, F=filtrirano,  $\Delta_{aps}$ =apsolutna razlika

\* kalibracijski pravac;  $y = 4040 x + 1,1623$ ,  $R^2 = 0,9997$

Nakon upotrijebljene veće koncentracije enzima, ali i produživanja vremena inkubacije, uz koncentraciju doksiciklin hklata od 0,3 mg/mL, koncentracija doksiciklin hklata se smanjila 75,3 %. Kod eksperimenta s manjom koncentracijom enzima prikazanim u tablici 7, nakon 60 minuta inkubacije koncentracija doksiciklin hklata se smanjila 78,4 % što daljnje potvrđuje da veća koncentracija enzima ne omogućava veći intenzitet razgradnje.

Praćenjem zadržavanja doksiciklin hicklata na filteru, nakon filtracije otopine doksiciklin hicklata i enzima, pomoću HPLC uređaja utvrđeno je da zaostala koncentracija doksiciklin hicklata iznosi manje od 0,07 mg/mL, što je zanemariva vrijednost.

Praćenjem enzimske razgradnje doksiciklin hicklata pomoću HPLC uređaja utvrđeno je da se među testiranim uvjetima najefikasnija razgradnja postiže u reakciji s koncentracijom enzima od 1 mg/mL u trajanju od 90 min. U tom slučaju dolazi do smanjenja količine doksiciklin hicklata za više od 95 %, odnosno detektirana koncentracija doksiciklin hicklata nakon razgradnje iznosi 0,011 mg/mL za nefiltrirani uzorak.

Iako je uspješno primijenjena HPLC metoda za praćenje sadržaja doksiciklin hicklata pri enzimatskoj razgradnji ipak su uočeni kromatografski nedostaci metode. To se prvenstveno odnosi na kompleksnost pripreve pufer otopine, skupoću reagensa te variranje vremena zadržavanja doksiciklin hicklata što ukazuje na nestabilan kromatografski sustav. Iz tog razloga razvijena je druga metoda za analizu sadržaja doksiciklin hicklata i srodnih spojeva, a u kojoj je primijenjen jednostavniji pufer i druga kolona. Dobiveni kromatografski rezultati su reproducibilniji i kromatografski sustav je stabilan što rezultira ujednačenim vremenima zadržavanja doksiciklin hicklata. U poglavlju 4.3. je opisan tijek razvoja metode za analizu sadržaja srodnih spojeva.

Dosada nije zabilježeno istraživanje ovakvog tipa na antibiotiku doksiciklin hicklata te se zato za usporedbu rezultata koristi sličan antibiotik iz iste skupine – tetraciklin. U istraživanju Zdarta i sur. (2020) ispitivao se utjecaj imobiliziranog i slobodnog enzima lakaze izoliranog iz gljive *Trametes versicolor* na tetraciklin. Razgradnja tetraciklina se pratila pomoću HPLC instrumenta s detektorom spektrometrije mase. Korišteni pufer je sadržavao amonij acetat i acetonitril (pH=5). Korištena je kolona Phenomenex, Gemini-NX 3  $\mu$ m, C18 kolona (100 mm x 2mm) pri protoku od 0,3 mL/min i 35 °C. Nakon provedbe eksperimenta u navedenim uvjetima ustanovljeno je da 40 minuta izlaganja tetraciklina slobodnom enzimu dovodi do razgradnje od 100 %. Koncentracija upotrijebljenog enzima je bila 0,5 mg/mL, no njegova specifična aktivnost nije navedena. U ovom istraživanju nakon 90 minuta inkubacije doksiciklin hicklata s enzimom lakaza koncentracije 1 mg/mL dolazi do razgradnje od 96,4 % (tablica 7) što prikazuje da je bilo potrebno više vremena za postizanje sličnog učinka.

## **4.2. STUDIJA FORSIRANE RAZGRADNJE DOKSICIKLIN HIKLATA PRAĆENA NA UV/VIS SPEKTROFOTOMETRU**

Preliminarna ispitivanja uvjeta za forsiranu razgradnju provedena su s UV/Vis spektrofotometrom kako bi se brže i jednostavnije proveo odabir koncentracija i vremena izlaganja uvjetima stres testa. Primjenom brže i jednostavnije UV/Vis spektrofotometrijske analize omogućilo se dobivanje većeg broja rezultata ispitivanja u kraćem vremenu. Glavni

ispitivani parametri su: određivanje apsorpcijskog maksimuma, odabir diluenta (otapala) doksiciklin hklata te duljine trajanja i jačine reagensa za razgradnju doksiciklin hklata.

Tijekom testiranja uočeno je da UV/Vis spektrofotometrijskom metodom nije moguće pratiti sadržaj gotovog proizvoda odnosno tableta već samo čiste djelatne tvari. Naime, prisutnost komponenti placeba interferira s ispitivanim analitom, a sam instrument nema mogućnost selektivnog odjeljivanja komponenti niti dovoljnu osjetljivost. No, ipak UV/Vis spektrofotometrijska metoda je uspješno primijenjena za odabir uvjeta razgradnje čiste djelatne tvari kao i odabir otapala.

Doksiciklin hklat je dobro topiv u vodi i metanolu, a odgovaraju mu kiseli uvjeti. Zbog toga su analizirani uzorci doksiciklin hklata otopljeni u visoko pročišćenoj vodi, otopini 0,01 M HCl i metanolu.

Apsorpcijski maksimum čistog doksiciklin hklata je potrebno odrediti kako bi se prilikom HPLC analize mjerili uzorci pri optimalnoj valnoj duljini. U Ph.Eur. monografiji je navedeno nekoliko valnih duljina pri kojima se otopine doksiciklin hklata mogu mjeriti, a one ovise o upotrijebljenom otapalu. Najčešće analize se provode pri 274 i 355 nm te su stoga obje odabrane za provođenje eksperimenta ispitivanja prikladnosti otapala i uvjeta razgradnje.

Prilikom mjerenja apsorpcije doksiciklin hklata u pojedinim otapalima uočeno je da je veća apsorpcija otopine doksiciklin hklata pri 274 nm u svim ispitivanim otapalima te je pri toj valnoj duljini je nastavljeno mjerenje.

Studija forsirane (kemijske) razgradnje provedena je primjenom čiste sirovine doksiciklin hklata. Uzorci su pripremljeni kao što je opisano u poglavlju 3.3.6.5. s teorijskom koncentracijom doksiciklin hklata od 25  $\mu\text{g/mL}$ . Razlog tome je što prema radu Sahoo i sur. (2023) doksiciklin hklat prati Lambert-Beerov zakonu u koncentraciji 5 – 50  $\mu\text{g/mL}$ , a limit detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) i limit kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) su iznosili 0,53 i 1,55  $\mu\text{g/mL}$ . Nakon pripreme, matične otopine su podvrgnute kiselinskoj i baznoj hidrolizi, oksidativnoj i temperaturnoj razgradnji te fotolizi. Eksperiment se provodio u 5 vremenskih točki;  $t_1=30$  min,  $t_2=60$  min,  $t_3=90$  min,  $t_4=120$  min i  $t_5=180$  min. Za izračun % raspada tj. razgradnje doksiciklina pri određenom uvjetu korištena je vrijednost koncentracije doksiciklina u početnoj točki  $t_0$  u odnosu na koncentraciju u ostalim točkama ( $t_{15}-t_{180}$ ).

#### 4.2.1. Kiselinska hidroliza

Za potrebe ispitivanja utjecaja jake kiseline na doksiciklin hklat upotrijebljena je 1 M otopina HCl i njena priprema je opisana u poglavlju 3.3.6.1.



Mjerenja apsorbancije su provedena pri 274 nm, a alikvot uzorka uziman je svakih 30 minuta. Obrada rezultata je obuhvaćala izračun koncentracije prema Lambert-Beerovom zakonu te izračun postotaka apsolutne i relativne razgradnje doksiciklin hiklata. Rezultati kiselinske hidrolize doksiciklin hiklata u pojedinim otapalima su prikazani u tablici 10.

**Tablica 10.** Sadržaj standarda doksiciklin hiklata otopljenog u ispitivanim otapalima nakon kiselinske hidrolize tijekom 180 minuta

KISELINSKA HIDROLIZA		$\gamma$ (stavljeno) [mg/mL]	$\gamma$ (izračunato) [mg/mL]	%raspad, $\Delta_{aps}$	%raspad, $\Delta_{rel}$
VODA	0.min	0,02540	0,0254	0,0	0
	30.min	0,02503	0,0290	0,4	15
	60.min	0,02540	0,0300	0,4	16
	90.min	0,02540	0,0290	0,3	12
	120.min	0,02540	0,0290	0,4	14
	180.min	0,02540	0,0290	0,4	14
0,01 M HCl	0.min	0,0255	0,0255	0,0	0
	30.min	0,0250	0,0260	0,1	6
	60.min	0,0252	0,0260	0,1	3
	90.min	0,0252	0,0260	0,1	2
	120.min	0,0252	0,0260	0,1	2
	180.min	0,0252	0,0260	0,0	2
METANOL	0.min	0,02550	0,0255	0,0	0
	30.min	0,02503	0,0280	0,3	11
	60.min	0,02550	0,0290	0,3	13
	90.min	0,02550	0,0290	0,4	13
	120.min	0,02550	0,0280	0,3	11
	180.min	0,02550	0,0280	0,3	11

$\Delta_{aps}$ =apsolutna razlika;  $\Delta_{rel}$ =relativna razlika

Uspoređivanjem rezultata kiselinske hidrolize otopine standarda doksiciklin hiklata u različitim otapalima uočava se da je najveći postotak razgradnje u vodi gdje je relativna razgradnja u 180 minuti bila 14 %. Navedeni rezultat je u skladu s rezultatima objavljenim u radu Sahoo i sur. (2023) gdje je razgradnja doksiciklin hiklata u neutralnim uvjetima (visoko pročišćena voda) nakon 12 sati iznosila 85 – 90 %.

#### 4.2.2. Bazna hidroliza

Za potrebe ispitivanja utjecaja jake baze na doksiciklin hikat upotrijebljena je 1 M otopina NaOH i njena priprema je opisana u poglavlju 3.3.6.2.

Ostali dio eksperimenta se provodio na isti način kao i kod kiselinske hidrolize. Primijećeno je da prilikom odvijanja eksperimenta otopina standarda doksiciklin hikalata nakon stajanja u 1 M NaOH je poprimila žuto-zelenu boju. Rezultati su prikazani u tablici 11.

**Tablica 11.** Sadržaj standarda doksiciklin hikalata otopljenog u ispitivanim otapalima nakon bazne hidrolize tijekom 180 minuta

BAZNA HIDROLIZA		$\gamma$ (stavljeno) [mg/mL]	$\gamma$ (izračunato) [mg/mL]	%raspad, $\Delta_{aps}$	%raspad, $\Delta_{rel}$
VODA	0.min	0,0254	0,0250	0,0	0
	30.min	0,0250	0,0260	0,1	5
	60.min	0,0254	0,0260	0,0	2
	90.min	0,0254	0,0270	0,2	7
	120.min	0,0254	0,0270	0,2	6
	180.min	0,0254	0,0280	0,3	11
0,01 M HCl	0.min	0,0255	0,026	0,0	0
	30.min	0,0250	0,022	0,3	11
	60.min	0,0252	0,022	0,3	12
	90.min	0,0252	0,022	0,3	13
	120.min	0,0252	0,022	0,3	13
	180.min	0,0252	0,021	0,4	18
METANOL	0.min	0,0255	0,0255	0,0	0
	30.min	0,0250	0,0250	0,0	1
	60.min	0,0255	0,0260	0,1	3
	90.min	0,0255	0,0240	0,2	7
	120.min	0,0255	0,0240	0,2	7
	180.min	0,0255	0,0250	0,1	4

$\Delta_{aps}$ =apsolutna razlika;  $\Delta_{rel}$ =relativna razlika

Razgradnja otopine standarda doksiciklin hikalata uslijed bazne hidrolize je najjača u otapalu 0,01 M HCl gdje je razgradnja doksiciklina manja za 18 % u odnosu na početnu koncentraciju. Ukoliko se rezultat bazne hidrolize usporedi s rezultatom kiselinske hidrolize, uočava se jača razgradnja u baznim uvjetima. Razlog tome je što u bazičnom mediju

hidroksilni ioni napadaju elektrofilne skupine strukture doksiciklina i on se razgrađuje. Upravo elektrofilne skupine doksiciklin hikat čine stabilnim i efikasnim antibiotikom te s njihovom razgradnjom inaktivirat će se djelovanje antibiotika.

#### 4.2.3. Oksidativna razgradnja i fotoliza

U cilju ispitivanja utjecaja oksidacijskog sredstva na razgradnju doksiciklin hikalata upotrijebljena je 3 %-tna otopina v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> čija priprema je opisana u poglavlju 3.3.6.3.

Za razliku od ostalih eksperimenata tijekom studija forsirane razgradnje, provjera utjecaja oksidativnog sredstva se provodila kroz 30 minuta. Oksidativna razgradnja s vodikovim peroksidom je intenzivna te 30 min je dovoljno vrijeme da se analit razgradi do primarnih produkata. Daljnjom razgradnjom nastali bi sekundarni razgradni produkti što nije u cilju ovog istraživanja.

Prema Europskoj farmakopeji (2019), monografija doksiciklin hikalata ističe da se radi o fotosjetljivom spoju. Iz tog razloga prilikom provođenja svih eksperimenata i tijekom analize otopine doksiciklin hikalata su čuvane u tamnim odmjernim tikvicama ili bočicama za injektiranje. Kako bi se pravilno izložila otopina doksiciklina UV-zračenju, otopine su stavljene u prozirne staklene kivete u laminaru. Laminar posjeduje UV zračenje jakosti 70 μW/cm<sup>2</sup> (snage ≥ 30 W) te valnu duljinu 254 nm. Otopine doksiciklina su izložene UV-zračenju u vremenskom periodu od 40 minuta. Rezultati oksidativne razgradnje i fotolize su prikazani u tablici 12.

**Tablica 12.** Sadržaj čistog doksiciklin hikalata otopljenog u različitim otapalima nakon oksidativne razgradnje i fotolize

OKSIDACIJA + FOTOLIZA		γ (stavljeno) [mg/mL]	γ (izračunato) [mg/mL]	%raspad, Δ <sub>aps</sub>	%raspad, Δ <sub>rel</sub>
<b>Oksidativna razgradnja</b>					
<b>VODA</b>	0.min	0,0254	0,0254	0,0	0
	30.min	0,0250	0,0318	0,7	24
<b>0,01 M HCl</b>	0.min	0,0255	0,0260	0,0	0
	30.min	0,0250	0,0338	0,9	30
<b>METANOL</b>	0.min	0,02546	0,0250	0,0	0
	30.min	0,02503	0,0346	1,0	32

Δ<sub>aps</sub>=apsolutna razlika; Δ<sub>rel</sub>=relativna razlika

**Tablica 12.** Sadržaj čistog doksiciklin hklata otopljenog u različitim otapalima nakon oksidativne razgradnje i fotolize (nastavak)

Fotoliza					
VODA	0.min	0,0254	0,0250	0,0	0
	20.min	0,0250	0,0253	0,0	1
	40.min	0,0250	0,0242	0,1	3
0,01 M HCl	0.min	0,0255	0,0260	0,0	0
	20.min	0,0250	0,0254	0,0	2
	40.min	0,0250	0,0209	0,4	18
METANOL	0.min	0,0255	0,0255	0,0	0
	20.min	0,0250	0,0272	0,2	8
	40.min	0,0250	0,0127	1,2	65

$\Delta_{aps}$ =apsolutna razlika;  $\Delta_{rel}$ =relativna razlika

Uspoređivanjem rezultata oksidativne razgradnje otopine doksiciklin hklata u različitim otapalima uočava se da neovisno o primijenjenom otapalu nakon 30 min učinkovito se razgradi doksiciklin hklat do čak 30 %. S druge strane, kod bazne hidrolize postoji razlika u primijenjenom otapalu jer rezultati pokazuju da je pri korištenju 0,01 M HCl potrebno 180 minuta da se doksiciklin hklat razgradi 18 %. No, ipak najveća razgradnja u oksidativnim uvjetima je zabilježena u uzorcima otopljenim u metanolu uz postotak razgradnje 32 % (tablica 11).

Razlog značajnoj razgradnji pri oksidativnim uvjetima je opisan u radu Spina-Cruz i sur. (2018) gdje je objašnjeno da je oksidativni stres uzrokovan djelovanjem reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu pocijepati doksiciklinsku prstenastu strukturu pri čemu antibiotik gubi svoju efikasnost.

Nadalje, pri ispitivanju fotolize na otopinu čistog doksiciklin hklata ustanovljeno je da UV-zračenje dovodi do značajne razgradnje što je i očekivano s obzirom na podatak iz Ph.Eur. monografije doksiciklin hklata. Doksiciklin hklat sadrži tetraciklinski prsten s konjugiranim dvostrukim vezama i takva struktura apsorbira UV svjetlost pri čemu dolazi do fotokemijskih reakcija koje dovode do razgradnje. Tako kod uzoraka doksiciklina otopljenih u 0,01 M HCl

nakon 40 minuta je postignuta razgradnja od 18 % što je, uz oksidativnu razgradnju i baznu hidrolizu, također vrlo značajna razgradnja.

#### 4.2.4. Temperaturna razgradnja

Ispitivanje kako povišena temperatura utječe na otopinu čistog doksiciklin hklata je provedeno u vodenoj kupelji pri 70 °C. Rezultati za otopinu standarda doksiciklin hklata u vodi i 0,01 M HCl su prikazani u tablici 13. Ispitivanje metanola kao otapala nije bilo uspješno, zbog hlapljivosti metanola čije je vrelište pri 64,7 °C te iz tog razloga nisu prikazani rezultati.

**Tablica 13.** Sadržaj doksiciklin hklata otopljenog u vodi i 0,01 M HCl nakon temperaturne razgradnje tijekom 180 minuta

Temperaturna razgradnja	$\gamma$ (stavljeno) [mg/mL]	$\gamma$ (izračunato) [mg/mL]	%raspad, $\Delta_{aps}$	%raspad, $\Delta_{rel}$	
VODA	0.min	0,02605	0,02605	0,00	0
	30.min	0,02605	0,02582	0,02	1
	60.min	0,02605	0,02615	0,01	0
	90.min	0,02605	0,02659	0,05	2
	120.min	0,02605	0,02622	0,02	1
	180.min	0,02605	0,02759	0,15	6
0,01 M HCl	0.min	0,02578	0,02578	0,00	0
	30.min	0,02578	0,02532	0,05	2
	60.min	0,02578	0,02469	0,11	4
	90.min	0,02578	0,02621	0,04	2
	120.min	0,02578	0,02619	0,04	2
	180.min	0,02578	0,02721	0,14	5

$\Delta_{aps}$ =apsolutna razlika;  $\Delta_{rel}$ =relativna razlika

Prema prikazanim rezultatima evidentno je da nije došlo do značajnih razgradnja doksiciklin hklata nakon stajanja uzoraka pri povišenoj temperaturi. U radu Injac i sur. (2007) prikazano je kako uzorci doksiciklin hklata pokazuju značajnu razgradnju pri uvjetima od 70 °C tek nakon 30 dana. Iz toga se može zaključiti da je vrijeme od 180 minuta bilo prekratko za značajan učinak na sadržaj doksiciklin hklata u uzorcima. Za postizanje veće stope razgradnje doksiciklin hklata u zadanom vremenu potencijalno je moguće tako da se uzorci izlože višoj temperaturi od 70 °C.

Nakon provedenoj studije forsirane razgradnje, praćenju na UV/Vis spektrofotometru, zaključak je da najveći učinak na razgradnju doksiciklin hklata imaju bazna hidroliza, oksidativna razgradnja i fotoliza. Rezultati su pokazali da je 0,01 M HCl otapalo koje najviše doprinosi razgradnji doksiciklin hklata. Zbog toga se u daljnjim ispitivanjima 0,01 M HCl koristila kao diluent za uzorke doksiciklin hklata.

Sahoo i sur. (2023) ispitali su utjecaj studije forsirane razgradnje na doksiciklin hklat otopljen u metanolu koji je praćen na UV/Vis spektrofotometru kroz 12 – 24 h. Najveći učinak na doksiciklin hklat je pokazalo tretiranje s NaOH, pri čemu je stopa razgradnje bila 85 – 95 % nakon 12 sati. Značajna stopa razgradnje se odvila tretiranjem antibiotika s vodikovim peroksidom, koja je iznosila 65 – 70 % nakon 24 h. U ovom istraživanju su svi eksperimenti bili puno kraći, no također je vidljivo prema dobivenim rezultatima da najveći utjecaj na razgradnju doksiciklin hklata imaju bazna hidroliza te oksidativna razgradnja, ali nisu vidljivi toliko veliki postoci razgradnje. Razgradnja doksiciklin hklata u 0,01 M HCl kod bazne hidrolize se u ovom slučaju provodila kroz 180 minuta i stopa razgradnje je iznosila 18 % (tablica 11), dok je pri oksidativnoj razgradnji doksiciklin hklata u metanolu, nakon 30 minuta izmjerena stopa razgradnje od 32 % (tablica 12).

### **4.3. RAZVOJ HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE SRODNIH SPOJEVA U TABLETAMA DOKSICIKLIN HIKLATA NAKON TRETIRANJA S ENZIMOM LAKAZA**

Kao što je spomenuto u poglavlju 4.1. razvijena je nova metoda za praćenje sadržaja doksiciklin hklata i njegovih srodnih spojeva zbog variranja u vremenu zadržavanja doksiciklin hklata i nestabilnosti i kompleksnosti sastava mobilne faze u prvotno razvijenoj metodi.

Nakon provedenih eksperimenata u poglavlju 4.2. odlučeno je da će se za diluent koristiti otopina 0,01 M HCl, a kao valna duljina snimanja uzorka 274 nm. Ostatak razvoja metode je započeo pretraživanjem literature i pregledom metoda za određivanje doksiciklin hklata.

#### **4.3.1. Tijek razvoja metode**

##### **4.3.1.1. Odabir kolone, protoka i temperature**

Prema literaturi doksiciklin hklat se analizira primjenom kromatografije obrnute faze sa stacionarnim fazama C<sub>18</sub>-, C<sub>8</sub>-, C<sub>4</sub>-, CN- ili NH<sub>2</sub>-. Stoga su odabrane kolone takvog sastava za ispitivanje, a prikazane su u tablici 14. Nakon provedenih testiranja, Phenomenex, Luna Omega 3 μm Polar C<sub>18</sub>, 150 x 3 mm je dala najbolje rezultate te je korištena u daljnjim eksperimentima. Konačan odabrani protok iznosio je 0,8 ml/min. Ispitan je utjecaj temperature kolone od 27 °C na 40 °C na vrijeme zadržavanja pikova iz razloga što povećanjem

temperature analiti brže eluiraju s kolone. Pri analizi srodnih spojeva odnosno onečišćenja primjenjuje se veći volumen injektiranja nego kod metode za određivanje sadržaja prikazanoj u poglavlju 4.1. zbog bolje detekcije razgradnih produkata koji se nalaze u niskim koncentracijama.

#### *4.3.1.2. Odabir mobilne faze*

Za ovakav tip spoja i HPLC metode kao mobilna faza se koristi pufer bazičnog pH u smjesi s organskim otapalima kao što su acetonitril i metanol.

Isprobano je nekoliko mobilnih faza s različitim pH vrijednostima, no odabran je pufer koja sadrži amonijev acetat i EDTA pri pH=8,8. Radi se o jednostavnoj mobilnoj fazi s kojom je dobiveno razdvajanje pikova onečišćenja do bazne linije uz simetričnost pikova, što nije bilo postignuto primjenom ostalih mobilnih faza. Pregled isprobanih mobilnih faza je prikazan u tablici 14. Ključan dio u razvoju metode je podešavanje gradijenta kojim se omogućuje bolja separacija uz poboljšanje rezolucije i oštrije pikove. Pri razvoju metode korištena je izokratna metoda pufera NH<sub>4</sub>Ac + EDTA (pH=8,8) i acetonitrila u omjeru 97:3 kao što je upotrijebljeno u metodi prema Mohammad i sur. (2018). Uz navedeni omjer pikovi eluiraju s velikim zadržavanjem zbog malog udjela organske faze. Promjenom sastava mobilne faze s omjerom 90:10 u korist pufera, dobiveni su zadovoljavajući rezultati. Pri navedenim kromatografskim uvjetima pik doksiciklin hklata izlazi oko 9. minute, a svi poznati srodni spojevi do 15. minute.

**Tablica 14.** Tijek razvoja HPLC metode za analizu srodnih spojeva doksiciklin hklata

Metoda	Kolona	Protok i temperatura kolone	Mobilna faza	Kromatografski problem	Literatura
1.	Phenomenex, Luna 5 $\mu\text{m}$ , C <sub>8</sub> column (250 × 4,6 mm)	1 ml/min, 30 °C	ACN–voda–mrvlja kiselina (26:74:0.25, v/v/v), pH 2,5 – s 5 M NaOH	Deformirani pik doksiciklina, te spojeni pikovi onečišćenja	Skúlason i sur. (2003)
2.	Phenomenex, Luna 3 $\mu\text{m}$ , C <sub>18</sub> column (150 × 3 mm)	0,8 mL/min, 27 °C	ACN–voda–TFA (50:50:0.25, v/v/v), pH 2,66 – s 1 M HCl	Sabijeni pikovi	Varijacija na metodu prema Injac i sur. (2007)
3.			ACN–voda–TFA (20:80:0.25, v/v/v), pH 2,66 – s 1 M HCl	Pikovi nisu razdvojeni do bazne linije	Varijacija na metodu prema Injac i sur. (2007)
4.	Thermo Scientific Hypersil GOLD 5 $\mu\text{m}$ , C <sub>18</sub> column (150 × 4,6 mm)			Nakon 45 minuta nije se ništa eluiralo s kolone	Varijacija na metodu prema Injac i sur. (2007)
5.	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XBD 3,5 $\mu\text{m}$ (150 × 4,6 mm)	0,8 mL/min, 40 °C	Fosfatni pufer (pH 8,5, 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 mM EDTA, 0,5 ml trietilamina)	Pikovi nisu razdvojeni do bazne linije	Varijacija na metodu prema Pippala i sur. (2023)
6.	Phenomenex, Luna 3 $\mu\text{m}$ , C <sub>18</sub> column (150 × 3 mm)			Pikovi nisu razdvojeni do bazne linije	Varijacija na metodu prema Pippala i sur. (2023)
7.				Pufer NH <sub>4</sub> AC + EDTA – ACN (90:10 v/v, grad.metoda) pH 8,8	Nema odstupanja, odabrana metoda

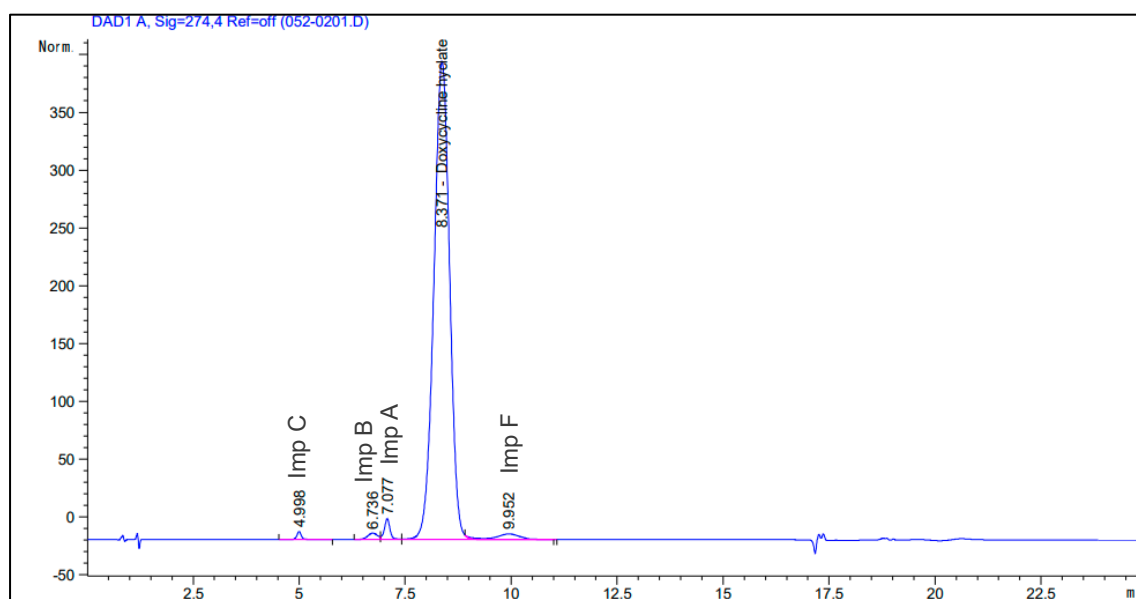
#### 4.3.2. Određivanje srodnih spojeva doksiciklin hklata

Razvijena HPLC metoda za određivanje srodnih spojeva u čistom doksiciklin hklatu, primijenjena je na gotovi oblik tableta koje su tretirane enzimom lakaza. Cilj ovog ispitivanja



bio je vidjeti hoće li novo razvijena metoda dovesti do manjeg odstupanja retencijskih vremena doksiciklin hklata budući da se koristi jednostavnija mobilna faza i druga kolona. Također, cilj je bio utvrditi daju li razgradnja uz pomoć enzima i kemijska razgradnja sličan profil onečišćenja.

Poznata onečišćenja doksiciklina identificirana su usporedbom kromatograma dobivenog pri kromatografskim uvjetima prikazanim u tablici 6 te kromatograma onečišćenja priloženog uz Ph.Eur. standard za prikladnost sustava (engl. *System Suitability Testing*, SST). Kromatogram otopine za identifikaciju pikova prema razvijenoj metodi je prikazan na slici 4.



**Slika 4.** Kromatogram doksiciklin hklata Ph.Eur standarda za onečišćenja po razvijenoj metodi

Imp A – Ph.Eur. poznato onečišćenje A; Imp B - Ph.Eur. poznato onečišćenje A; Imp C - Ph.Eur. poznato onečišćenje C; Imp F - Ph.Eur. poznato onečišćenje F

Rezultati enzimske razgradnje doksiciklin hklata – sadržaj onečišćenja u tabletama s enzimom lakaza prikazani su u tablici 15 i 16. Koncentracija enzima je iznosila 1 mg/mL, a koncentracija supstrata doksiciklin hklata 0,3585 mg/mL. Tijekom ukupno 120 min vremena analizirani su alikvoti reakcijske smjese u 6 vremenskih točaka:  $t_0$ ,  $t_1$ -15 min,  $t_2$ -30 min,  $t_3$ -60 min,  $t_4$ -90 min i  $t_5$ -120 min.

**Tablica 15.** Sadržaj onečišćenja doksiciklin hklata u otopini tableta nakon razgradnje s enzimom lakaza koncentracije 1 mg/mL tijekom 30 minuta (vremenske točke;  $t_0$ ,  $t_{15}$  i  $t_{30}$ )

Uzorak	Ime pika	Rt [min]	RRT	Površina [mAU]	$\gamma$ [mg/mL]	Površina [%]
$t_0$	nepoznato on.	1,545	0,20	7,6882	**	1,0280
	nepoznato on.	1,882	0,24	5,7814	**	0,7730
	nepoznato on.	3,412	0,43	0,8299	**	0,1110
	Ph.Eur. on. C	4,878	0,62	*	*	*
	Ph.Eur. on. B	6,431	0,82	*	*	*
	Ph.Eur. on. A	6,752	0,86	7,6101	0,0061	1,0177
	<b>Doksiciklin</b>	<b>7,890</b>	<b>1,00</b>	<b>725,3285</b>	<b>0,3373</b>	<b>97,0730</b>
	Ph.Eur. on. F	9,570	1,21	*	*	*
$t_{15}$	nepoznato on.	1,555	0,20	6,5091	**	1,0787
	nepoznato on.	1,883	0,24	5,6068	**	0,9292
	nepoznato on.	2,448	0,31	2,6125	**	0,4329
	nepoznato on.	2,826	0,36	1,5074	**	0,2498
	nepoznato on.	3,407	0,43	7,5777	**	1,2558
	nepoznato on.	4,276	0,54	6,4355	**	1,0665
	Ph.Eur. on. C	4,878	0,62	*	*	*
	Ph.Eur. on. B	6,462	0,82	*	*	*
	Ph.Eur. on. A	6,742	0,86	7,1148	0,0058	1,1791
	<b>Doksiciklin</b>	<b>7,879</b>	<b>1,00</b>	<b>539,6030</b>	<b>0,2516</b>	<b>89,4241</b>
	Ph.Eur. on. F	9,570	1,21	*	*	*
$t_{30}$	nepoznato on.	17,248	2,19	26,5156	**	4,3839
	nepoznato on.	1,555	0,20	5,9059	**	1,0827
	nepoznato on.	1,881	0,24	5,5629	**	1,0198
	nepoznato on.	2,100	0,27	1,5113	**	0,2771
	nepoznato on.	2,298	0,29	1,0169	**	0,1864
	nepoznato on.	2,443	0,31	3,2791	**	0,6011
	nepoznato on.	2,822	0,36	1,5018	**	0,2753
	nepoznato on.	3,400	0,43	8,6784	**	1,5910
	nepoznato on.	4,270	0,54	7,8247	**	1,4345
	nepoznato on.	4,752	0,60	1,3478	**	0,2471
	Ph.Eur. on. C	4,947	0,63	1,2170	0,0031	0,2231
	Ph.Eur. on. B	6,462	0,82	*	*	*
	Ph.Eur. on. A	6,733	0,86	6,5459	0,0056	1,2000
	<b>Doksiciklin</b>	<b>7,867</b>	<b>1,00</b>	<b>376,4928</b>	<b>0,1763</b>	<b>69,0200</b>
	Ph.Eur. on. F	9,570	1,22	*	*	*
nepoznato on.	17,215	2,19	124,5992	**	22,8420	

\*koncentracija onečišćenja je manja od LOQ, a iznad LOD, \*\*nije napravljena kalibracijska krivulja za izračun budući da se radi o nepoznatim onečišćenjima koji nemaju standarde

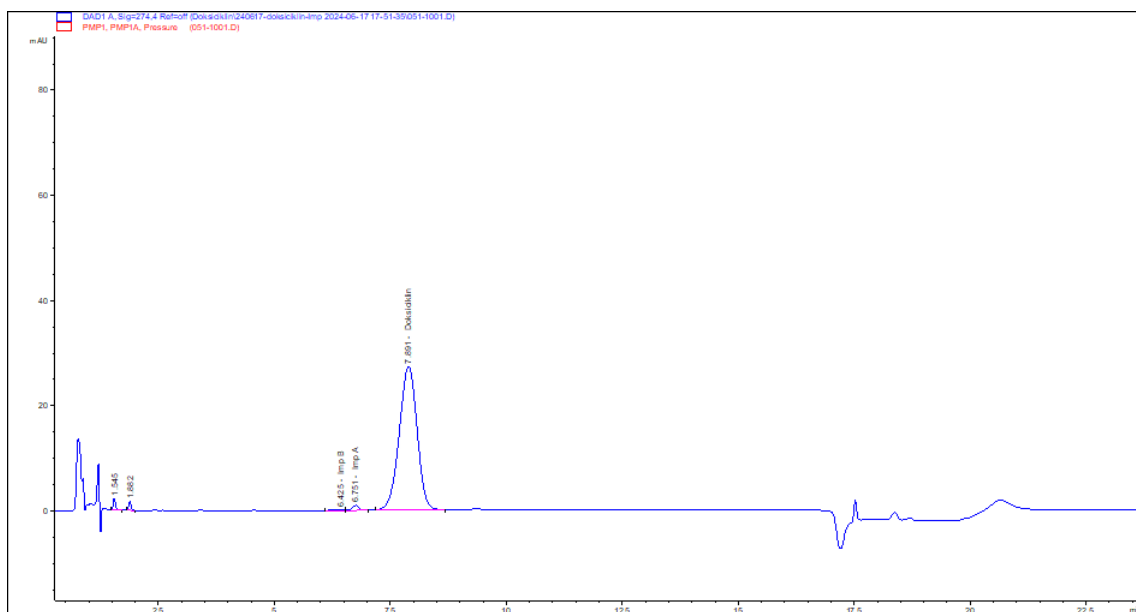
**Tablica 16.** Sadržaj onečišćenja doksiciklin hklata u otopini tableta nakon razgradnje s enzimom lakaza koncentracije 1 mg/mL u 60., 90. i 120. minuti (vremenske točke;  $t_{60}$ ,  $t_{90}$  i  $t_{120}$ )

Uzorak	Ime pika	Rt [min]	RRT	Površina [mAU]	$\gamma$ [mg/mL]	Površina [%]
$t_{60}$	nepoznato on.	1,553	0,20	6,0522	**	1,1157
	nepoznato on.	1,878	0,24	5,7378	**	1,2164
	nepoznato on.	2,104	0,27	3,4419	**	0,7309
	nepoznato on.	2,287	0,29	2,0479	**	0,4358
	nepoznato on.	2,438	0,31	5,0421	**	1,0779
	nepoznato on.	2,811	0,36	1,0630	**	0,2212
	nepoznato on.	3,391	0,43	6,6155	**	1,3938
	nepoznato on.	4,254	0,54	4,9747	**	1,9953
	Ph.Eur. on. C	4,878	0,62	1,3097	0,0031	0,2777
	Ph.Eur. on. B	6,462	0,82	*	*	*
	Ph.Eur. on. A	6,710	0,85	4,5650	0,0046	0,9677
	<b>Doksiciklin</b>	<b>7,852</b>	<b>1,00</b>	<b>133,4772</b>	<b>0,0641</b>	<b>28,2959</b>
	Ph.Eur. on. F	9,570	1,22	*	*	*
	nepoznato on.	17,209	2,192	293,7485	**	62,2719
$t_{90}$	nepoznato on.	1,230	0,16	85,7920	**	16,0397
	nepoznato on.	1,554	0,20	6,2518	**	1,2890
	nepoznato on.	1,879	0,24	6,2518	**	1,1688
	nepoznato on.	2,107	0,27	2,9919	**	0,5594
	nepoznato on.	2,440	0,31	5,2895	**	0,9889
	nepoznato on.	3,387	0,43	3,9183	**	0,7326
	nepoznato on.	4,252	0,54	3,3650	**	0,6291
	Ph.Eur. on. C	4,878	0,62	*	*	*
	Ph.Eur. on. B	6,462	0,82	*	*	*
	Ph.Eur. on. A	6,710	0,85	2,4827	0,0037	0,4642
	<b>Doksiciklin</b>	<b>7,848</b>	<b>1,00</b>	<b>27,4726</b>	<b>0,0152</b>	<b>5,1363</b>
	Ph.Eur. on. F	9,570	1,22	*	*	*
	nepoznato on.	17,208	2,19	390,4162	**	72,9921
	$t_{120}$	nepoznato on.	1,559	0,20	3,1280	**
nepoznato on.		1,882	0,24	2,9682	**	2,1486
nepoznato on.		2,114	0,27	0,9672	**	0,9672
nepoznato on.		2,296	0,29	1,1353	**	0,8218
nepoznato on.		2,454	0,31	3,9670	**	2,8716
nepoznato on.		3,390	0,43	1,3340	**	0,9656
nepoznato on.		4,263	0,54	1,3078	**	0,9467
Ph.Eur. on. C		4,878	0,62	*	*	*
Ph.Eur. on. B		6,462	0,82	*	*	*
Ph.Eur. on. A		6,729	0,86	*	*	*
<b>Doksiciklin</b>		<b>7,856</b>	<b>1,00</b>	<b>3,4411</b>	<b>0,0041</b>	<b>2,4909</b>
Ph.Eur. on. F		9,570	1,22	*	*	*
nepoznato on.		17,206	2,19	119,5282	**	86,5233

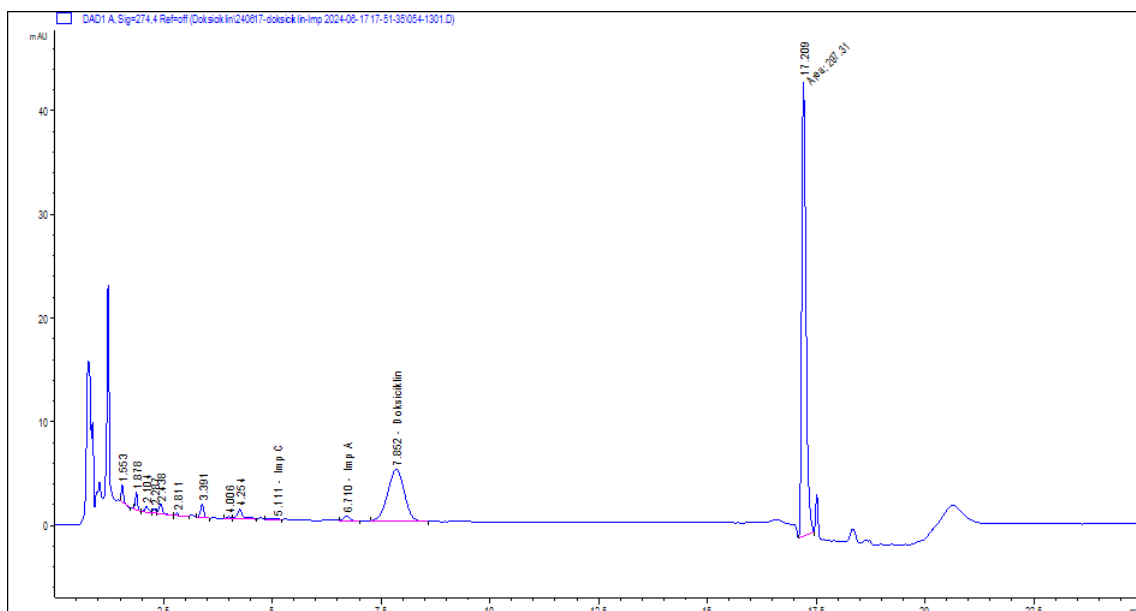
\*koncentracija onečišćenja je manja od LOQ, a iznad LOD, \*\*nije napravljena kalibracijska krivulja za izračun budući da se radi o nepoznatim onečišćenjima koji nemaju standarde

U tablici 15 prikazan je sadržaj doksiciklin hklata i njegovih srodnih spojeva kroz 30 minuta razgradnje s enzimom lakaza. U točki  $t_0$  koncentracija ukupnih onečišćenja u uzorku je 0,0203 mg/mL što se izračunalo iz razlika koncentracija doksiciklin hklata u pripremljenom uzorku te doksiciklin hklata kvantificiranog tijekom HPLC analize. Postotak površine u ukupnim pikovima za nepoznata onečišćenja iznosi 1,912 %, dok za poznata 1,0177 %. Koncentracija doksiciklin hklata u  $t_0$  iznosi 0,3373 mg/mL i čini postotak površine u ukupnim pikovima od 97,073 %. To pokazuje da već u početku reakcije dolazi do malog stupnja raspada. Već u 30. minuti reakcije koncentracija doksiciklin hklata pada na 0,1763 mg/mL.

Daljnja razgradnja doksiciklin hklata u vremenskom periodu od 60. do 120. minute prikazana je u tablici 16. S porastom vremena inkubacije nastavlja se trend smanjenja koncentracije doksiciklin hklata, dok raste koncentracija ukupnih onečišćenja. Već u 90. minuti je smanjena koncentracija doksiciklin hklata na 0,0152 mg/mL, a koncentracija ukupnih onečišćenja iznosi 0,2567 mg/mL. Značajno je da samo 0,46 % površine pikova čine poznata onečišćenja prema Ph.Eur. standardu. Dok najveći udio onečišćenja čine upravo nepoznata onečišćenja od kojih prvi izlazi na početku i ima relativno vrijeme zadržavanja 0,20 što znači da se radi o izuzetno polarnom spoju. Drugo onečišćenje koje čini veliki udio ukupnih onečišćenja u  $t_{90}$  ima relativno vrijeme zadržavanja 2,19. Isto se može vidjeti uspoređujući slike 5 i 6 koje prikazuju kromatograme doksiciklin hklata i njegovih onečišćenja. Na slici 5 se ne vide značajni pikovi onečišćenja, dok se na slici 6 se vide dva već spomenuta pika, na početku i na kraju sekvence koji čine najveći udio u ukupnom onečišćenju. Budući da su poznata onečišćenja identificirana i detektirana nakon kemijske razgradnje doksiciklin hklata može se zaključiti da nakon enzimatske razgradnje ne nastaju isti spojevi. Točan razlog ne može se sa sigurnošću reći jer mehanizam djelovanja enzima lakaza na doksiciklin hklat nije razjašnjen.

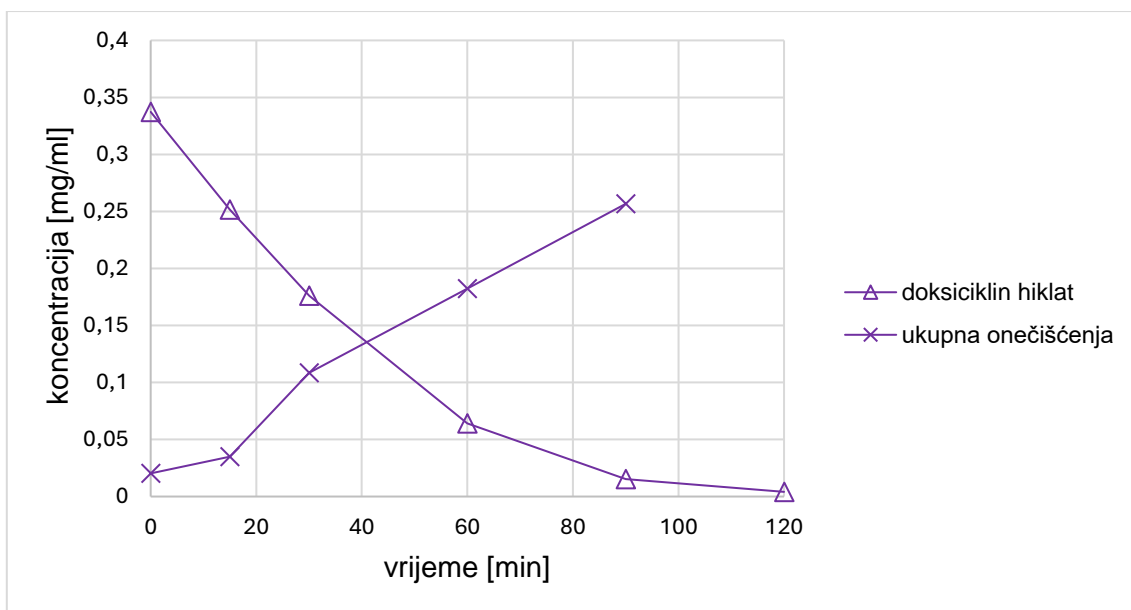


**Slika 5.** Kromatogram doksiciklin hiklata u  $t_0$  nakon tretiranja s enzimom lakaza



**Slika 6.** Kromatogram doksiciklin hiklata u  $t_{90}$  nakon tretiranja s enzimom lakaza

U 120. minuti onečišćenja više nisu prisutna u koncentracijama koje je moguće kvantificirati te je značajan samo prikaz pada koncentracije doksiciklin hiklata koja tad iznosi 0,0041 mg/mL.



**Slika 7.** Promjena koncentracije doksiciklin hiklata i ukupnog onečišćenja kroz vrijeme

Na temelju rezultata prikazanim u tablici 15 i 16 izrađen je grafički prikaz ovisnosti koncentracije doksiciklin hiklata i srodnih spojeva u vremenu, prikazanim na slici 7. Na slici 7 uočava se da je najveći skok u razgradnji doksiciklin hiklata u vremenu između 30. i 60. minute. Također, intenzitet razgradnje se znatno smanjuje između 90. i 120. minute.

Može se zaključiti da je nova metoda za praćenje sadržaja doksiciklin hiklata i njegovih srodnih spojeva prikladna za praćenje sadržaja srodnih spojeva doksiciklin hiklata u smislu ponovljivosti vremena zadržavanja pika doksiciklin hiklata (približno oko 7,8. minute). Kromatografski sustav je stabilan zbog toga što nema variranja u retencijskom vremenu analita, a mobilna faza je jednostavnijeg sastava, u usporedbi sa korištenom metodom iz poglavlja 4.1.

Na slici 6 su uočena dva veća pika nepoznatih onečišćenja nastali enzimatskom razgradnjom doksiciklina što ukazuje na drugačiji profil nastalih onečišćenja doksiciklina u odnosu na onu provedenu kemijskim putem. Takav rezultat upućuje na to da enzimi specifično djeluju na određene dijelove molekule doksiciklina, prilikom čega su uključeni različiti mehanizmi reakcije, stvarajući različite produkte razgradnje u usporedbi s kemijskom razgradnjom. Pikovi se pojavljuju na mjestima gdje kromatografska razdvojenost nije u potpunosti postignuta do bazne linije. Kako bi se ti pikovi preciznije identificirali i kvantificirali potrebno je dodatno optimizirati metodu odnosno kromatografske uvjete.

Iako ovakvo istraživanje nije provedeno na antibiotiku doksiciklin hikat, radi potrebe usporedbe rezultata u svrhu rasprave uzet je u obzir antibiotik slične strukture – oksitetraciklin. U radu prema Yang i sur. (2017) ispitivan je utjecaj imobiliziranog enzima lakaza izoliranog iz gljive *Cerrena unicolor* na razgradnju oksitetraciklina te se provela identifikacija razgradnih

produkata. Razgradnja se pratila tekućinskom kromatografijom s detektorom spektrometrije masa. Korišteni pufer je sadržavao 0,2 % mravlje kiseline i acetonitril (pH=6), dok je protok bio 0,4 mL/min. Ovom metodom se razgradilo 80 % oksitetraciklina nakon 12 h. Ovim ispitivanjem se utvrdilo da identificirani razgradni produkti nakon inkubacije s enzimom lakaza nisu jednaki onim već poznatim prema farmakopeji te se predložio mogući mehanizam razgradnje. Spomenute navode je potvrdilo i ovo istraživanje budući da je veliki udio onečišćenja tijekom analize upravo nepoznatog profila. Što se tiče stope razgradnje, u slučaju ovog istraživanja već u 90. minuti nakon tretiranja doksiciklin hicklata enzimom lakaza dolazi do gotovo kompletne razgradnje odnosno 95,5 % (tablica 16) što je što je značajno brže nego u radu prema Yang i sur. (2017).

#### 4.4. UPOTREBA RAZVIJENE HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE SRODNIH SPOJEVA NA UZORCIMA TABLETA DOKSICIKLIN HIKLATA NAKON PROVOĐENJA STRES TESTA

Nakon razvijene metode u poglavlju 4.3. provedena je studija forsirane kemijske razgradnje, uz praćenje razgradnje doksiciklin hicklata na HPLC uređaju. Primijenjeni su uvjeti razgradnje preliminarno provedeni UV/Vis spektrofotometrijskom metodom kako je opisano u poglavlju 4.2. Ovaj puta je studija forsirane razgradnje provedena i na tabletama i na sirovini čistog doksiciklin hicklata te placebo tableta koji čini smjesu komponenta tablete. Uzorci su podvrgnuti kiselinskoj i baznoj hidrolizi, oksidativnoj i temperaturnoj razgradnji te fotolizi. Kiselinska i bazna hidroliza te temperaturna razgradnja je provedena kroz 125 minuta. Dok se oksidativna razgradnja i fotoliza provodila kroz 30 minuta.

Rezultati sadržaja doksiciklin hicklata nakon bazne i kiselinske hidrolize prikazani su u tablici 17, dok su rezultati nakon temperaturne i oksidativne razgradnje te fotolize prikazani u tablici 18. Eksperiment je proveden kroz 125 minuta za kiselinsku i bazičnu hidrolizu te temperaturnu razgradnju. Oksidativna razgradnja i fotoliza su se odvijale kroz 30 minuta.

**Tablica 17.** Sadržaj doksiciklin hicklata u otopini čiste djelatne tvari i tablete nakon kemijske razgradnje - kiselinska i bazna hidroliza

Ime uzorka	Retencijsko vrijeme [min]	Površina pika [mAU]	$\gamma$ (doksiciklin) [mg/mL]	Razgradnja [%]
Netretirana djelatna tvar (kontrola)	8,377	532,46356	0,0259	0
Netretirana tableta (kontrola)	8,375	598,25952	0,0324	0
Djelatna tvar +1M HCl 30 min	8,357	521,23773	0,0253	2
Djelatna tvar +1M HCl 60 min	8,335	537,25446	0,0261	0

**Tablica 17.** Sadržaj doksiciklin hiklata u otopini čiste djelatne tvari i tablete nakon kemijske razgradnje - kiselinaska i bazna hidroliza (nastavak)

Djelatna tvar +1M HCl 90 min	8,335	545,69574	0,0265	0
Djelatna tvar +1M HCl 125 min	8,324	542,51917	0,0264	0
Tableta+1M HCl 30 min	8,311	606,06281	0,0329	0
Tableta +1M HCl 60 min	8,320	606,28082	0,0329	0
Tableta +1M HCl 90 min	8,321	615,46625	0,0334	0
Tableta +1M HCl 125 min	8,308	622,31219	0,0337	0
Djelatna tvar +1M NaOH 30 min	8,296	423,77014	0,0206	20
Djelatna tvar +1M NaOH 60 min	8,337	359,38602	0,0175	33
Djelatna tvar +1M NaOH 90 min	8,333	308,34387	0,0150	42
Djelatna tvar +1M NaOH 125 min	8,294	261,87839	0,0127	51
Tableta + 1M NaOH 30 min	8,272	525,65948	0,0285	12
Tableta + 1M NaOH 60 min	8,234	397,91632	0,0216	33
Tableta + 1M NaOH 90 min	8,228	328,95328	0,0178	45
Tableta + 1M NaOH 125 min	8,200	322,81183	0,0175	46

**Tablica 18.** Sadržaj doksiciklin hiklata u otopini čiste djelatne tvari i tablete nakon kemijske razgradnje - termička razgradnja, oksidativna razgradnja, fotoliza

Ime uzorka	Retencijsko vrijeme[min]	Površina pika [mAU]	$\gamma$ (doksiciklin) [mg/mL]	Razgradnja [%]
Netretirana djelatna tvar (kontrola)	8,377	532,46356	0,0259	0
Netretirana tableta (kontrola)	8,375	598,25952	0,0324	0
Djelatna tvar + 70°C 30 min	8,095	517,64404	0,0252	3
Djelatna tvar +70°C 60 min	8,093	521,54114	0,0253	2
Djelatna tvar +70°C 90 min	8,077	530,57465	0,0258	0
Djelatna tvar +70°C 125 min	8,062	518,60187	0,0252	3
Tableta +70°C 30 min	8,052	590,83777	0,0320	1
Tableta +70°C 60 min	8,040	592,38989	0,0321	1

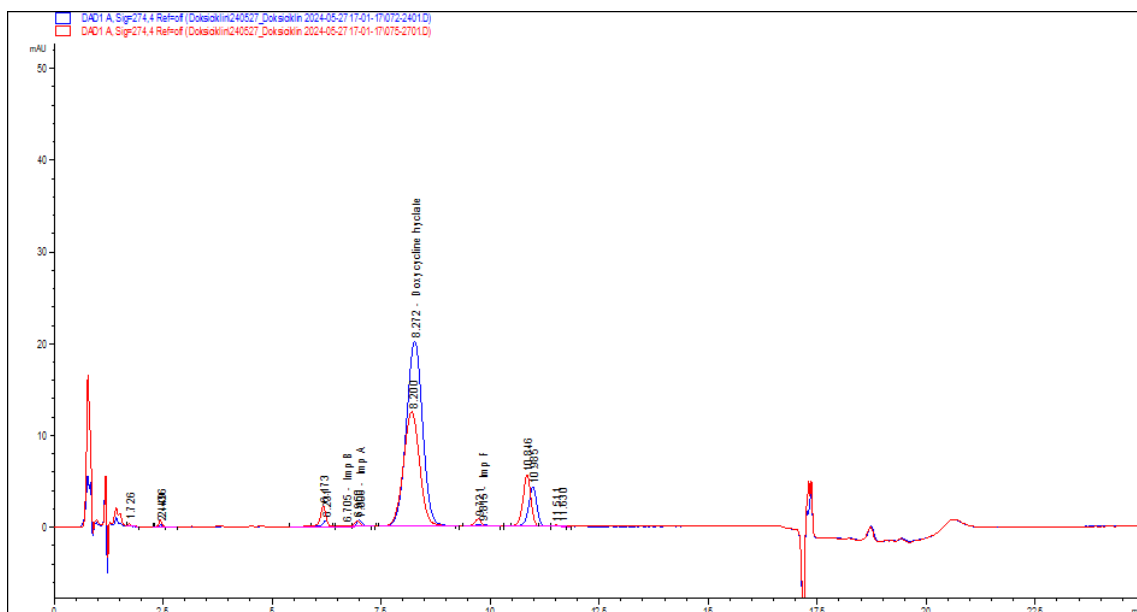


**Tablica 18.** Sadržaj doksiciklin hicklata u otopini čiste djelatne tvari i tablete nakon kemijske razgradnje - termička razgradnja, oksidativna razgradnja, fotoliza (nastavak)

Tableta +70°C 90 min	8,032	594,10052	0,0322	1
Tableta +70°C 125 min	8,011	439,86813	0,0238	26
Djelatna tvar + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 min	7,966	478,24173	0,0232	10
Tableta + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 min	7,958	577,33966	0,0313	3
Djelatna tvar + UV svjetlo 30 min	7,945	526,62842	0,0256	1
Tableta + UV svjetlo 30 min	7,933	610,26910	0,0331	0

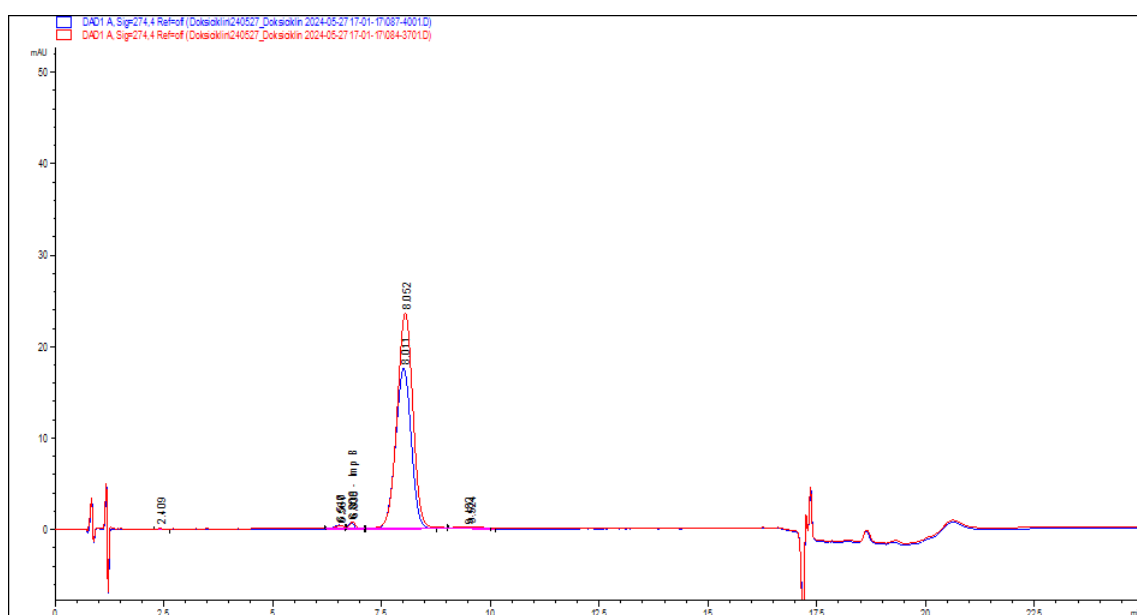
Prema prikazanim rezultatima ispitivanja uočava se da najveći učinak na doksiciklin hikat imaju bazna hidroliza, termička i oksidativna razgradnja. Fotoliza je pokazala izuzetno visoku učinkovitost razgradnje doksiciklina u eksperimentu opisanom u poglavlju 4.2., no pri provedbi eksperimenta na HPLC uređaju nije vidljiv visok postotak razgradnje (tablica 18). Razlog tome može biti nedovoljna izloženost samom UV svjetlu budući da je u eksperimentu praćenom na spektrofotometru znatna razgradnja zapažena tek u 40. minuti. Također pri kiselinskoj hidrolizi, uz korištenje 0,01 M otopine HCl kao diluenta, nisu vidljivi rezultati efikasne razgradnje kao što je prikazano u tablici 10 u eksperimentu provedenom spektrofotometrijski. Naime, doksiciklin hikat je stabilniji u kiselim uvjetima nego što je u bazičnim zato što protoniranje funkcionalnih skupina u molekuli omogućava održavanje strukture i smanjuje vjerojatnost razgradnje. No, kada molekula doksiciklin hicklata dođe u kontakt s bazičnim uvjetima dolazi do deprotoniranja funkcionalnih skupina pri čemu je molekula znatno reaktivnija što dovodi do razgradnje – posljedično epimerizacije i hidroksilacije (Mohammad i sur., 2018).

Nadalje, provedeni su isti uvjeti stres testa te HPLC analiza s metodom za srodne spojeve, kako na čistoj djelatnoj tvari i gotovom proizvodu tabletama, tako i na placebo tablete. Prema dobivenim rezultatima, u bilo kojim ispitivanim uvjetima, placebo komponente ne daju pikove koji bi interferirali s analizom sadržaja doksiciklina ili njegovih razgradnih spojeva. Prema tome, može se zaključiti da je metoda selektivna te primjenjiva za analizu srodnih spojeva u gotovom proizvodu odnosno tableti.



**Slika 8.** Kromatogram studije forsirane razgradnje za tabletu doksiciklin hiklata – bazna hidroliza (crveni pik u  $t_{30}$  i plavi u  $t_{125}$ )

Na slici 8 se vidi smanjenje površine pika doksiciklin hiklata pri bazičnim uvjetima u periodu od 30. do 125. minute, dok u istom vremenskom rasponu raste površina pikova onečišćenja.



**Slika 9.** Kromatogram studije forsirane razgradnje za tabletu doksiciklin hiklata - temperaturna razgradnja (crveni pik u  $t_{30}$  i plavi u  $t_{125}$ )

Uspoređujući sliku 9 sa slikom 8 jasno je da temperaturna razgradnja dovodi do manjeg stupnja razgradnje nego bazična budući da je razlika u površini pikova manja u vremenskom periodu od 30. do 125. minute.

Vidljivo je iz tablice 17 i 18 kako je viša razgradnja doksiciklin hiklata, pri svim ispitivanim uvjetima, kada se primjeni čista djelatna tvar u usporedbi s tabletom doksiciklin hiklata. Razlog tome može biti što je čista tvar podložnija uvjetima koji mogu potaknuti razgradnju iz razloga što nema pomoćne tvari koje bi ju zaštitile. Naime, pomoćne tvari u tableti služe stabilizaciji djelatne tvari, omogućavaju takvu formulaciju tablete koja štiti tabletu od nepovoljnih uvjeta i razgradnje.

**Tablica 19.** Profil onečišćenja sirovine doksiciklin hiklata pri bazičnim uvjetima tijekom 125 minuta

Bazična hidroliza	Ime pika	Rt [min]	Površina [mAU]	$\gamma$ [mg/mL]	% Razgradnje
API + 1 M NaOH, 30. min	nepoznato on.	6,253	6,05835	**	-
	Ph.Eur. on. A	7,022	7,25813	0,0004	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,296</b>	<b>423,77014</b>	<b>0,0206</b>	<b>20</b>
	nepoznato on.	11,031	5,02399	**	-
API + 1 M NaOH, 60. min	nepoznato on.	6,280	10,95676	**	-
	Ph.Eur. on. A	7,057	7,28722	0,0004	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,337</b>	<b>359,38602</b>	<b>0,0175</b>	<b>33</b>
	Ph.Eur. on. F	9,902	7,03940	0,0003	-
	nepoznato on.	11,098	58,67548	**	-
API + 1 M NaOH, 90. min	nepoznato on.	2,462	2,84901	**	-
	nepoznato on.	6,277	15,56644	**	-
	Ph.Eur. on. A	7,054	6,96268	0,0003	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,333</b>	<b>308,34387</b>	<b>0,0150</b>	<b>42</b>
	Ph.Eur. on. F	9,891	8,59423	0,0004	-
	nepoznato on.	11,087	66,24508	**	-
API + 1 M NaOH, 125. min	nepoznato on.	2,457	3,49503	**	-
	nepoznato on.	6,248	20,93153	**	-
	Ph.Eur. on. A	7,023	7,24130	0,0004	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,294</b>	<b>261,87839</b>	<b>0,0127</b>	<b>51</b>
	Ph.Eur. on. F	9,837	1,11204	0,0001	-
	nepoznato on.	11,009	73,03706	**	-

\*\*nije napravljena kalibracijska krivulja za izračun budući da se radi o nepoznatim onečišćenjima koji nemaju standarde

Pri uvjetima bazne hidrolize razgradnja doksiciklin hiklata je rezultirala najvišim stupnjem razgradnje. Na kromatogramu prikazanom na slici 8 se uočava nastanak velikog broja pikova onečišćenja. Rezultati kompletnog profila onečišćenja pri uvjetima bazne hidrolize prikazani su u tablici 19 za čistu djelatnu tvar, odnosno tablici 20 za uzorke tablete.

**Tablica 20.** Profil onečišćenja tablete doksiciklin hklata pri bazičnim uvjetima tijekom 125 min

Bazična hidroliza	Ime pika	Rt [min]	Površina [mAU]	$\gamma$ [mg/mL]	% Razgradnje
<b>Tbl + 1 M NaOH 30. min</b>	nepoznato on.	6,231	5,63450	**	-
	Ph.Eur. on. A	7,006	7,36046	0,0004	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,272</b>	<b>525,65948</b>	<b>0,0285</b>	<b>12</b>
	nepoznato on.	10,985	57,58231	**	-
<b>Tbl + 1 M NaOH 60. min</b>	nepoznato on.	6,200	10,43620	**	-
	Ph.Eur. on. A	6,975	6,91757	0,0003	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,234</b>	<b>397,91632</b>	<b>0,0216</b>	<b>33</b>
	nepoznato on.	10,902	58,58231	**	-
<b>Tbl + 1 M NaOH, 90. min</b>	nepoznato on.	2,442	2,87316	**	-
	nepoznato on.	6,196	13,95283	**	-
	Ph.Eur. on. A	6,973	5,73192	0,0003	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,228</b>	<b>328,95328</b>	<b>0,0178</b>	<b>45</b>
	Ph.Eur. on. F	9,754	7,29465	0,0004	-
	nepoznato on.	10,892	62,83970	**	-
<b>Tbl + 1 M NaOH, 125. min</b>	nepoznato on.	2,436	3,54225	**	-
	nepoznato on.	6,173	21,02459	**	-
	Ph.Eur. on. A	6,950	5,67849	0,0003	-
	<b>Doksiciklin</b>	<b>8,200</b>	<b>322,81183</b>	<b>0,0175</b>	<b>46</b>
	Ph.Eur. on. F	9,721	9,02634	0,0005	-
	nepoznato on.	10,846	73,59452	**	-

\*\*nije napravljena kalibracijska krivulja za izračun budući da se radi o nepoznatim onečišćenjima koji nemaju standarde

U tablicama 19 i 20 prikazana su sva onečišćenja uočena tijekom provedbe bazne hidrolize na uzorcima pojedinih oblika doksiciklin hklata. Iz priloženog je ponovno uočeno da se prilikom kemijske razgradnje ne javljaju ista onečišćenja kao kod enzimatske, to jest profil onečišćenja je drugačiji. Tijekom reakcije se s vremenom povećavala stopa razgradnje doksiciklin hklata te u uzorcima tableta je postotak razgradnje u 90. minuti činio 45 %. Daljnjim stajanjem doksiciklin hklata u otopini 1 M NaOH nije došlo do znatnog povećanja stope razgradnje.

Mohammed i sur. (2018) proveli su razgradnju tablete doksiciklin hklata studijom forsirane degradacije i pratili na UPLC uređaju pomoću razvijene metode za određivanje sadržaja doksiciklin hklata. Pufer je sadržavao amonij acetat + EDTA i acetonitril (pH=8,8).

Korištena je kolona Aquity BEH 1,7  $\mu\text{m}$ , C18 kolona (50 mm x 2,1 mm) pri protoku od 1,2 mL/min i 55 °C. Provođenjem stres testa utvrđeno je da kiselinska i temperaturna razgradnja nisu značajno utjecale na razgradnju doksiciklin hklata, dok su najveću efikasnost razgradnje postigli uvjeti bazne hidrolize pri čemu nakon 1 h izlaganja 1 M NaOH dolazi do kompletne razgradnje doksiciklin hklata. Također oksidativna razgradnja dovodi do kompletne razgradnje tablete doksiciklin hklata nakon 1 h izlaganja 3 % v/v otopini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U istom vremenskom periodu od 60. minuta, u ovom istraživanju je postignuta manja stopa razgradnje i to od 33 % pri izlaganju doksiciklin hklata 1 M otopini NaOH (tablica 20).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Nakon kromatografskog praćenja razgradnje doksiciklin hklata lakazom utvrđeno je da se najefikasnija razgradnja doksiciklin hklata postiže s koncentracijom enzima od 1 mg/mL u trajanju od 90 min, pri čemu se sadržaj doksiciklin hklata smanjuje za više od 95 %. Povećanje koncentracije enzima lakaze s 1 mg/mL na 2 mg/mL ne pridonosi većoj učinkovitosti razgradnje doksiciklin hklata.
2. Ispitano je zadržavanje doksiciklin hklata na filteru, nakon filtracije otopine doksiciklin hklata i enzima, te je utvrđeno je da zaostala koncentracija doksiciklin hklata iznosi manje od 0,07 mg/mL što je zanemariva količina u odnosu na početnu koncentraciju od 0,3 mg/mL.
3. Razvijena je HPLC metoda za određivanje doksiciklin hklata i srodnih spojeva s kojom se postigao stabilan i selektivan kromatografski sustav koji je rezultirao ujednačenim vremenima zadržavanja doksiciklin hklata i srodnih spojeva. U ovoj metodi pufer amonij acetata + EDTA (pH=8,8) i acetonitril korišteni su kao mobilna faza, razdvajanje komponenti u uzorku je provedeno na koloni Luna Omega 3  $\mu$ m Polar C18, (dimenzije 150 x 3 mm, Phenomenex), a trajanje analize bilo je 25 minuta uz protok od 0,8 mL/min pri 40 °C.
4. Ispitani su uvjeti forsirane kemijske razgradnje doksiciklin hklata, prvo spektrofotometrijski (UV/Vis), a zatim i kromatografski (HPLC) s razvijenim metodama za sadržaj djelatne tvari i srodnih spojeva. Forsirana razgradnja provedena je kiselim hidrolizom, baznom hidrolizom, oksidacijom, temperaturnom i fotolitičkom razgradnjom čistog doksiciklin hklata, placebo komponenti, te gotovog proizvoda (tablete). Utvrđeno je da najveći učinak kemijske razgradnje na sadržaj doksiciklin hklata ima bazna hidroliza, primjenom 1 M NaOH u trajanju od 125 minuta pri čemu se razgradi 51 % doksiciklin hklata.
5. Kromatografski profil srodnih spojeva (onečišćenja) se razlikuje razgradnjom doksiciklin hklata enzimskim i kemijskim putem. Enzimskom razgradnjom nastaju spojevi koji se eluiraju na različitim vremenima u odnosu na spojeve nastale kemijskom razgradnjom.

## 6. LITERATURA

Ali J, Sharma DC, Bano A, Gupta A, Sharma S, Bajpai P i sur. (2019) Exploiting Microbial Enzymes for Augmenting Crop Production. U: Kuddus M (ured.) Enzymes in Food Biotechnology, Academic Press, Cambridge, 503-519.

Aniagor CO, Igwegbe CA, Ighalo JO, Oba SN (2021) Adsorption of doxycycline from aqueous media: A review. *J Mol Liq* **334**, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116124>.

Baird RM (2011) Microbial spoilage, infection risk and contamination control, U: Denyer SP, Hodges N, Gorman SP, Gilmore B (ured.) Hugo&Russell's Pharmaceutical Microbiology, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 273-293.

Barros J, Kogawa A Salgado HR (2018) Short-Term Stability Study of Doxycycline Tablets by High Performance Liquid Chromatography, Spectrophotometry in the Ultraviolet Region and Turbidimetry. *J Pharmacol Clin Trials* **1(1)**, 43–49. <https://doi.org/10.29199/jpct.101018>

Blessy M, Patel R, Prajapati P, Agrawal Y (2014) Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *J Pharm Anal* **4(3)**, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>

Chakravarthi KSS, Ilango KB, Thomas AMS, Kowsalya DM, Sudharshan N, Swetha V (2023) UV-Visible Spectroscopy: A Comprehensive Review on Instrumentation. *World J Pharm Res* **12**, 1342-1363. DOI: 10.20959/wjpr202319-30171

Chopra I i Roberts M (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol R* **65(2)**, 232–260. <https://doi.org/10.1128/membr.65.2.232-260.2001>.

Cundell T (2020) Microbial Contamination Risk Assessment in Non-sterile Drug Product Manufacturing and Risk Mitigation. U: Roesti D, Goverde M (ured.) Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control: a Practical Guide for Non-Sterile Manufacturing, John Wiley & Sons Ltd, New York, 23-55.

Erceg M, Knežević AM (2022) Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2022. godini – Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo, <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/izvjesce-o-umrlim-osobama-u-hrvatskoj-u-2022-godini/>. Pristupljeno 29.lipnja 2024.

Europska farmakopeja (2019) European Pharmacopoeia. 10.izd., Council of Europe, Strasbourg, 201-209 i 2472-2474.

Forsberg KJ, Patel S, Wencewicz TA, Dantas G (2015) The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Chem Biol.* **22(7)**, 888-897. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.05.017.

Granados-Chinchilla F, Rodríguez C (2017) Tetracyclines in Food and Feedingstuffs: From Regulation to Analytical Methods, Bacterial Resistance, and Environmental and Health Implications. *J Anal Methods Chem* **2017**, 561-585. doi: 10.1155/2017/1315497

Grossman TH (2016) Tetracycline Antibiotics and Resistance. *CSH Perspect Med* **6(4)**, 347-372. doi: 10.1101/cshperspect.a025387

Injac R, Djordjevic-Milic V, Srdjenovic B (2007) Thermostability Testing and Degradation Profiles of Doxycycline in Bulk, Tablets, and Capsules by HPLC. *J Chromatogr Sci* **45**, 623-628. doi: 10.1093/chromsci/45.9.623

Klink PR, Ferguson TH, Magruder JA (2021) Formulation of veterinary dosage forms. U: Hardee GE, Baggot JD (ured.) Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms, CRC Press, Boca Raton, 145-229.

Kogawa AC, Regina H, Salgado N (2012) Doxycycline Hyclate: A Review Of Properties, Applications And Analytical Methods. *Int J Pharm Sci Res* **2(4)**, 11–25. <http://hdl.handle.net/11449/133794> Pristupljeno 29.lipnja 2024.

Madhavi V i Lele SS (2009) Laccase: Properties And Applications. *BioResources*, **4(4)**, 1694-1717. <https://doi.org/10.15376/biores.4.4.1694-1717>

Mohammad A, Yen CH, Schneider M, Lowry B, Yerlikaya F, Whitesell G i sur. (2018) Development and validation of a stability-indicating ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for doxycycline hyclate: an optimization of the analytical methodology for a medical countermeasure (MCM) drug. *Anal.Methods* **10**, 1842-1851. <https://doi.org/10.1039/C8AY00078>

Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson D (2014) Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem* **395(5)**, 559–575. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0292>



Pippalla S, Nekkalapudi AR, Jillellamudi SB, Reddy MP, Kumar CV (2023) A stability-indicating, reversed-phase HPLC method for quantification of assay and organic impurities in doxycycline hyclate bulk and parenteral dosage forms. *Biomed Chromatogr* **37(6)**, 427-433. <https://doi.org/10.1002/bmc.5626>

Park J, Gasparrini A, Reck M, Symister CT, Elliot JL, Vogel JP i sur. (2017) Plasticity, dynamics, and inhibition of emerging tetracycline resistance enzymes. *Nat Chem Biol* **13**, 730–736. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2376>

Peris-Vicente J, Peris-García E, Albiol-Chiva J, Durgbanshi A, Ochoa-Aranda E, Carda-Broch S i sur. (2022) Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples. *Microchem J* **177**, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107309>

Ramesh PJ, Basavaiah K, Divya M, Rajendraprasad N, Vinay K, Revanasiddappa H (2011) Simple UV and visible spectrophotometric methods for the determination of doxycycline hyclate in pharmaceuticals. *J Anal Chem+* **66(5)**, 482–489. <https://doi.org/10.1134/S1061934811050157>

Reeves PT (2012) Antibiotics: groups and properties. U: Wang J, MacNeil JD, Kay JF (ured.) *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, John Wiley & Sons Ltd, New York, 1-60.

Roesti (2020) *Microbiological Examination of Non-sterile Final Dosage Forms and Raw Material Including Acceptance Criteria and Testing Frequency*. U: Roesti D, Goverde M (ured.) *Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control: a Practical Guide for Non-Sterile Manufacturing*, John Wiley & Sons Ltd, New York, 105-151.

Sahoo PK, Sahoo P, Mohapatra J, Panigrahi D, Patra A, Mishra A (2023) Development and Validation of Stability Indicating Assay Method of Doxycycline Hyclate by using UV-Spectrophotometer. *J Drug Deliv Ther* **13(6)**, 89–94. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i6.6087>

Siddiqui MR, AlOthman ZA, Rahman N (2017) Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arab J Chem* **10(1)**, 1409–1421. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2017) *Principles of Instrumental Analysis*, 7.izd., Cengage Learning, Boston.

Skúlason S, Ingólfsson E, Kristmundsdóttir T (2003) Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products. *J Pharmaceut Biomed* **33(4)**, 667-672. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00316-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00316-9)

Spina-Cruz M, Maniero MG, Guimarães JR (2018) Advanced oxidation processes on doxycycline degradation: monitoring of antimicrobial activity and toxicity. *Environ Sci Pollut R* **26(27)**, 27604–27619. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2149-1>

Wu GR, Sun LJ, Xu JK, Gao SQ, Tan XS, Lin YW (2022) Efficient Degradation of Tetracycline Antibiotics by Engineered Myoglobin with High Peroxidase Activity. *Molecules* **27(24)**, 1-11. <https://doi.org/10.3390/molecules27248660>

Yang J, Lin Y, Yang X, Ng T, Ye X, Lin J (2017) Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. *J Hazard Mater* **322**, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.019>

Yang Q, Gao Y, Ke J, Show PL, Ge Y, Liu, Y i sur. (2021) Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. *Bioengineered* **12(1)**, 7376–7416. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974657>

Zdarta J, Jankowska K, Bachosz K, Kijeńska-Gawrońska E, Zgoła-Grześkowiak A, Kaczorek E i sur. (2020) A promising laccase immobilization using electrospun materials for biocatalytic degradation of tetracycline: Effect of process conditions and catalytic pathways. *Catal Today* **348**, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.08.042>

Zotou, A (2012) An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Cent Eur J Chem* **10**, 554–569. <https://doi.org/10.2478/s11532-011-0161-0>

Žuvela P, Skoczylas M, Liu JJ, Bączek T, Kaliszan R, Wong MW i sur. (2019) Column characterization and selection systems in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chem Rev* **119(6)**, 3674-3729. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Lana Štanfel izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---

Vlastoručni potpis