

Poboljšanje topljivosti loratadina uslijed kompleksiranja s odabranim ciklodekstrinima

Mamić, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:015578>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Nina Mamić

**POBOLJŠANJE TOPLJIVOSTI
LORATADINA USLIJED
KOMPLEKSIRANJA S ODABRANIM
CIKLODEKSTRINIMA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2021. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc.
Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Marijane Pocrnić, mag. chem.

Zahvale

Veliko hvala prof. dr. sc. Nives Galić na njenom mentorstvu i prilici za izradu diplomskog rada na Zavodu za analitičku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, zahvaljujem se na uloženom vremenu i trudu.

Također, zahvaljujem se neposrednoj voditeljici, Marijani Pocrnić, na uloženom trudu i vremenu, kao i na strpljenju i stručnoj pomoći te mnogobrojnim savjetima koji su izradu i pisanje ovog diplomskog rada učinili puno lakšim.

Stoga, mentorici i neposrednoj voditeljici veliko hvala na trudu, svim idejama i motivaciji koji su ovih nekoliko mjeseci izrade i pisanja rada učinili jako zanimljivim, poučnim i ugodnim.

Hvala mojim prijateljima s faksa, koji su bili uz mene i gurali me naprijed kada za to stvarno nije bilo volje. Hvala za sva skupna učenja, za sva slavlja zbog položenih ispita, za sve popijene kave i sva zajednička druženja, hvala vam za iskreno prijateljstvo koje ste mi pružili.

Isto tako, veliko hvala mojim cjeloživotnim prijateljima što ste, iako niste točno razumjeli o čemu vam pričam kad se jadam oko faksa, bili uz mene i bodrili me, vjerovali u uspjeh i znali bolje nego ja da će jednom sve ovo biti prekrasno sjećanje. Od ovog momenta možete odahnuti jer nema više mojih paničnih ispada vezanih za ispite i od sada ćete me više vidati na svim našim druženjima.

I za kraj, jedno ogromno hvala mojim roditeljima, sestri i Donni na podršci, savjetima, zagrljajima i pusama, hvala vam što ste vjerovali u mene i što ste bili moj kamen temeljac i moji najglasniji navijači kroz sve ove godine, vjerujte mi, bez vas ne bi danas bila tu gdje jesam. Vi ste razlog mog uspjeha.

Zahvaljujem se svima koji su obilježili studentski dio mog života, učinili ste ga predivnim, zabavnim i poučnim, hvala vam od srca!

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije	3
2.1.1. <i>Djelatne tvari skupine II.....</i>	<i>4</i>
2.2. Loratadin	5
2.3. Ciklodekstrini	6
2.3.1. <i>Otkriće ciklodekstrina</i>	<i>6</i>
2.3.2. <i>Struktura i svojstva ciklodekstrina.....</i>	<i>6</i>
2.4. Inkluzijski kompleksi.....	9
2.4.1. <i>Mehanizam nastanka inkluzijskih kompleksa.....</i>	<i>9</i>
2.5. Određivanje topljivosti prema Higuchiju i Connorsu	11
2.5.1. <i>Dijagrami topljivosti</i>	<i>11</i>
2.5.2. <i>Dijagrami tipa A</i>	<i>12</i>
2.5.3. <i>Dijagrami tipa B</i>	<i>13</i>
2.5.4. <i>Konstante stabilnosti inkluzijskih kompleksa.....</i>	<i>14</i>
2.5.5. <i>Učinkovitost kompleksiranja.....</i>	<i>15</i>
2.6. Priprema i karakterizacija inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju.....	16
2.6.1. <i>Mljevenje kao metoda sinteze inkluzijskih kompleksa.....</i>	<i>16</i>
2.6.2. <i>Načini karakterizacije krutih kompleksa pripremljenih mehanokemijskom aktivacijom.....</i>	<i>18</i>
2.7. Inkluzijski kompleksi loratadina i ciklodekstrina.....	19
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Materijali	25
3.2. Instrumentacija	25
3.3. Ispitivanje poboljšanja topljivosti	26
3.4. Priprema kompleksa u čvrstom stanju	29
3.5. Ispitivanje topljivosti kompleksa u čvrstom stanju	30
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Ispitivanje poboljšanja topljivosti	31
4.1.1. <i>Ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u vodi.....</i>	<i>31</i>
4.1.2. <i>Ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u simuliranom duodenalnom mediju (pH 4,5).....</i>	<i>33</i>

4.1.3. Ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8).....	34
4.2. Karakterizacija kompleksa u čvrstom stanju.....	39
4.2.1. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina snimljeni FTIR tehnikom	40
4.2.2. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina snimljeni FTIR tehnikom.....	42
4.2.3. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina snimljeni ATR tehnikom.....	44
4.2.4. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina snimljeni ATR tehnikom	46
4.3. Ispitivanje topljivosti kompleksa u čvrstom stanju	49
§ 5. ZAKLJUČAK	53
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	56
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	57
§ 8. DODATAK.....	XIII
8.1. Spektri snimljeni FTIR tehnikom.....	xiii
8.1.1. Loratadin.....	xiii
8.1.2. β -ciklodekstrin i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin	xv
8.1.3. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina.....	xvii
8.1.4. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina	xviii
8.2. Spektri snimljeni ATR tehnikom.....	xix
8.2.1. Loratadin.....	xix
8.2.2. β -ciklodekstrin i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin	xxi
8.2.3. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina.....	xxiii
8.2.4. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina	xxiv
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

POBOLJŠANJE TOPLJIVOSTI LORATADINA USLIJED KOMPLEKSIRANJA S ODABRANIM CIKLODEKSTRINIMA

Nina Mamić

Loratadin (LOR) je antihistaminik druge generacije koji prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije spada u skupinu slabo topljivih djelatnih tvari (skupina II). Međutim, utvrđeno je da mu se topljivost povećava ukoliko je u kompleksu s ciklodekstrinom. U ovom radu istražen je utjecaj β -ciklodekstrina i njegovog derivata hidroksipropil- β -ciklodekstrina na topljivost loratadina u vodi i biorelevantnim medijima (pH 4,5 i 6,8). Loratadin je kvantitativno određen tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i UV/Vis spektrofotometrijom. Kompleksi u čvrstom stanju pripremljeni su mljevenjem u visokoenergetskim mlinovima uz dodatak male količine otapala, kao i bez otapala. Za potvrdu nastanka kompleksa korištena je infracrvena spektroskopija tehnikom prigušene totalne refleksije i u transmisijskom načinu snimanja.

(58 + xxv stranica, 29 slika, 21 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

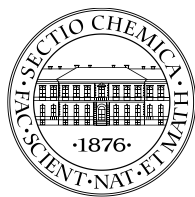
Ključne riječi: ciklodekstrini, inkluzijski kompleksi, loratadin, mehanokemijska aktivacija, topljivost

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić
Neposredni voditelj: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
 2. prof. dr. sc. Ines Primožič
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 29. siječnja 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

IMPROVEMENT OF LORATADINE SOLUBILITY BY COMPLEXATION WITH CYCLODEXTRINS

Nina Mamić

Loratadine is a second-generation antihistamine that is categorized in the Biopharmaceutics Classification System as a poorly water-soluble drug (BSC II class). However, studies have shown that its solubility increases with the addition of cyclodextrin. In this thesis, the effect of β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility of loratadine in water and biorelevant media (pH 4.5 and 6.8), was studied. High-performance liquid chromatography and UV/Vis spectrophotometry were used for the quantitative determination of loratadine. Solid loratadine-cyclodextrin inclusion complexes were prepared by grinding in high energy vibrational mills with the addition of small catalytic amounts of solvent and also without solvent. Infrared spectroscopy was used to confirm the formation of the complexes, using the technique of attenuated total reflection and the transmission mode.

(58 + xxv pages, 29 figures, 21 tables, 33 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: cyclodextrins, inclusion complex, loratadine, mechanochemical activation, solubility

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor
Assistant mentor: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Ines Primožič, Professor
 3. Dr. Željka Soldin, Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 29th January 2021.

§ 1. UVOD

Poznato je da je oko 40 % aktivnih farmaceutskih tvari klasificirano kao slabo topljivo u vodi. Za djelatnu tvar vrlo je bitna bioraspoloživost koja ovisi o njenoj topljivosti i permeabilnosti. Kako bismo neki lijek proglasili aktivnom farmaceutskom tvari, on mora zadovoljiti neki stupanj topljivosti u vodenom mediju te mora biti lipofilan kako bi mogao prolaziti kroz biološke membrane.¹ U skupinu II prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije pripadaju djelatne tvari koje karakterizira dobra permeabilnost i loša topljivost.²

Loratadin je antihistaminik druge generacije koji se koristi u humanoj medicini za ublažavanje alergijskih simptoma. Poznato je da loratadin pripada skupini II prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari, odnosno da je lijek dobre permeabilnosti, ali vrlo slabe topljivosti.³ Topljivost loratadina ovisi o pH, tj. povećanjem pH topljivost loratadina eksponencijalno opada. Upravo zbog loše topljivosti u vodi i vrlo niske brzine otapanja loratadina, njegova bioraspoloživost pokazuje visoku varijabilnost. Stoga, poboljšanje topljivosti loratadina ima važnu ulogu u dizajnu formulacija lijekova.²

Kompleksiranje s ciklodekstrinima je jedna od metoda kojom se može poboljšati topljivost djelatne tvari. Stvaranjem inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima mijenjaju se fizikalna i kemijska svojstva djelatne tvari što je preduvjet za poboljšanje topljivosti. Ciklodekstrini imaju široku upotrebu u farmaceutskoj industriji te na tržištu već postoje mnoge formulacije s ciklodekstrinima.⁴

Mehanokemijska aktivacija mljevenjem je brza, vrlo učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda koja se koristi za pripremu inkluzijskih spojeva u čvrstom stanju. Karakteristika mehanokemijske aktivacije je da se mljevenjem čvrstih sastojaka smjese povećava dodirna površina reaktanata nakon čega dolazi do amorfizacije lijeka. Daljnje izlaganje mehaničkoj energiji uzrokuje kemijsku reakciju u čvrstom stanju i omogućuje nastanak kompleksa.⁵

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj β -ciklodekstrina i njegovog hidroksipropil derivata na topljivost loratadina u vodi i biorelevantnim medijima. Provest će se ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u navedenim medijima, na temelju kojih će se odrediti konstante stabilnosti kompleksa i učinkovitost kompleksiranja. Za kvantitativno određivanje loratadina koristit će se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i UV/Vis spektrofotometrija. Inkluzijski kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina te hidroksipropil- β -ciklodekstrina će se

pripremiti mljevenjem u visokoenergetskom mlinu, a za potvrdu nastanka kompleksa koristit će se infracrvena spektroskopija tehnikom prigušene totalne refleksije i u transmisijskom načinu snimanja. Poboljšanje topljivosti pripremljenih kompleksa u čvrstom stanju ispitat će se u vodi i biorelevantnim medijima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije

Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS) služi za klasificiranje djelatnih tvari na osnovu njihove topljivosti i permeabilnosti kroz membrane probavnog sustava. Tri osnovne značajke djelatne tvari koje BCS uzima u obzir su topljivost, intestinalna permeabilnost i brzina otapanja. U BCS sustavu djelatne tvari su klasificirane u četiri skupine pri čemu u prvu skupinu pripadaju tvari visoke topljivosti i permeabilnosti, u drugu skupinu pripadaju tvari visoke permeabilnosti i niske topljivosti, u treću tvari niske permeabilnosti i visoke topljivosti, a u četvrtu pripadaju tvari niske topljivosti i permeabilnosti (slika 1).⁶



Slika 1. Klasifikacija lijekova prema BCS-u⁷

Prema smjernicama Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *the United States food and drug administration*, USFDA), djelatna tvar smatra se dobro topljivom kada je najveća doza djelatne tvari topljiva u 250 mL, ili manje, vodenog medija u rasponu pH 1,0–7,5 pri 37 °C. Topljivost je jedan od najznačajnijih parametara koji utječe na postizanje željene koncentracije djelatne tvari u sistemske cirkulaciji, koja je u organizam unesena oralnim putem. Topljivost se definira kao koncentracija otopljene tvari u zasićenoj otopini pri određenoj temperaturi.⁸ Djelatna tvar se smatra dobro permeabilnom ako se pokaže da je stupanj apsorpcije kod ljudi 90 % ili više od ukupne primijenjene doze.⁴

2.1.1. Djelatne tvari skupine II

Djelatne tvari skupine II karakterizirane su visokom permeabilnosti i niskom topljivosti te pokazuju varijabilnu bioraspoloživost. Bioraspoloživost se definira kao omjer koncentracije djelatne tvari koja nepromijenjena dospijeva u krvotok nakon primjene bilo kojim putem i koncentracije djelatne tvari u krvi nakon intravenske primjene. Primjeri djelatnih tvari skupine II su fenitoin, danazol, nifedipin, felodipin i drugi.⁸

Postoje različite metode poboljšanja topljivosti djelatnih tvari, a time i bioraspoloživosti, kao što su kristalne modifikacije djelatne tvari (priprava metastabilnih polimorfa, kristalnih soli, kokristala), smanjenje veličine čestica (mikronizacija, stvaranje nanokristala), uklapanje djelatne tvari u ciklodekstrine, pH modifikacije te prevođenje djelatnih tvari u amorfno stanje.⁴

Poboljšanje topljivosti djelatnih tvari ovisi o nekoliko čimbenika. Veličina čestica je jedan od faktora koji bitno utječe na topljivost te tvari. Smanjenjem veličine čestice, povećava se dodirna površina između tvari koja se otapa i otapala te se pospješuje topljivost. Veličina molekule također bitno utječe na promjenu topljivosti djelatne tvari. Veća molekulska masa djelatne tvari uzrokuje manju topljivost budući da će je molekule otapala teže okružiti.⁹

Na otapanje djelatne tvari također utječe i temperatura. Ovisno dolazi li prilikom procesa otapanja do apsorpcije ili otpuštanja energije topljivost će se poboljšati, odnosno smanjiti porastom temperature.⁹

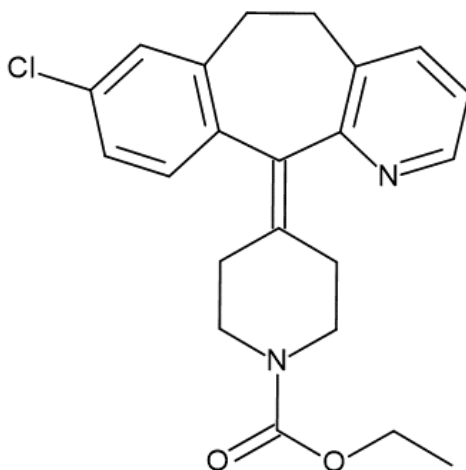
Poznato je i kako različiti polimorfni oblici imaju različitu topljivost. Neki su manje topljivi od njihovih amorfnih oblika, što za posljedicu ima njihovu nepotpunu apsorpciju. Nekristalični oblik djelatne tvari naziva se amorfni te se općenito brže otapa u usporedbi s istom djelatnom tvari uređenom u bolje strukturirani, rigidni kristalni oblik.¹⁰

2.2. Loratadin

Loratadin je triciklički H₁ antihistaminik druge generacije koji se koristi u liječenju alergija, budući da ublažava simptome alergijskog rinitisa kao što su svrbež, kihanje, suženje očiju te začepljenje dišnih puteva. Loratadin pripada djelatnim tvarima skupine II prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari u koju pripadaju djelatne tvari slabe topljivosti i dobre permeabilnosti.³ Otkriven je 1980. godine, a na tržištu se prvi put pojavio 1988. godine. Danas se nalazi na popisu bitnih lijekova svjetske zdravstvene organizacije.¹¹

Loratadin je slaba baza s vrijednosti pK_a 4,85–6,00 pri temperaturi od 25 °C.¹ Molekulska formula loratadina je C₂₂H₂₃ClN₂O₂, a molarna masa iznosi 382,88 g mol⁻¹.¹² Njegova struktura prikazana je na slici 2.

Topljivost loratadina raste sa smanjenjem pH, budući da je pri nižim vrijednostima pH protoniran te bolje topljiv u vodi.¹



Slika 2. Struktura loratadina

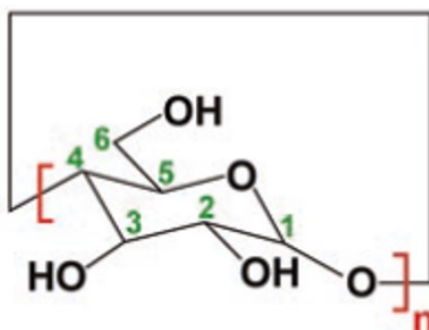
2.3. Ciklodekstrini

2.3.1. Otkriće ciklodekstrina

Francuski znanstvenik A. Villers 1891. godine izolirao je spoj za kojeg se pokazalo da je otporan na kiselu hidrolizu te nije pokazivao nikakva redukcijska svojstva. Tek početkom 20. stoljeća austrijski mikrobiolog F. Schardinger je opisao dva spoja koja je dobio bakterijskom razgradnjom škroba te ih nazvao α - i β -ciklodekstrin. Ipak, svojstva ovih spojeva nisu bila poznata do sredine 20. stoljeća kada se točna struktura ciklodekstrina odredila rendgenskom kristalografijom. Daljnjim se proučavanjem ciklodekstrina i njihovih svojstava uočilo kako mogu tvoriti inkluzijske komplekse zbog svog oblika koji sadrži šupljinu.^{13,14}

2.3.2. Struktura i svojstva ciklodekstrina

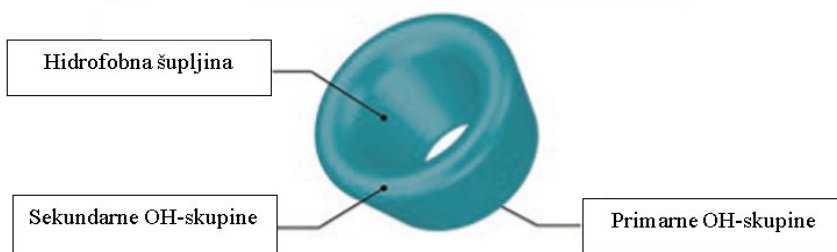
Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligomeri dobiveni enzimskom razgradnjom škroba. Sastoje se od šest ili više D-glukopiranoznih jedinica povezanih α -(1,4) glikozidnim vezama (slika 3). Tipični prirodni ciklodekstrini sastoje se od 6, 7 ili 8 glukoznih jedinica te ih redom nazivamo α -, β - i γ -ciklodekstrin.¹⁵



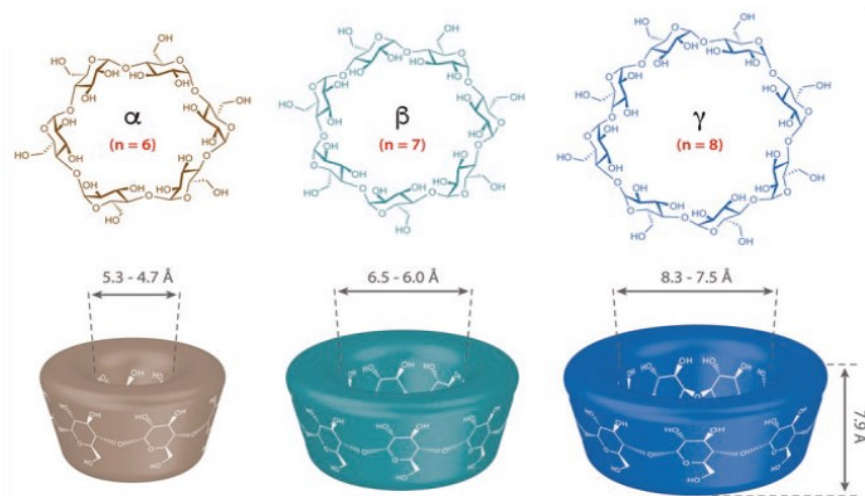
Slika 3. Shematski prikaz kemijske strukture ciklodekstrina¹⁵

Ciklodekstrini su molekule oblika krnjeg stošca koje u sredini imaju šupljinu te se sastoje od glukoznih jedinica povezanih kovalentnim vezama preko kisikovih atoma i vodikovim vezama između sekundarnih hidroksilnih skupina sa susjednom glukoznom jedinicom na širem rubu šupljine. Kako slobodna rotacija oko α -(1,4) veze nije moguća zbog steričkih razloga, ciklodekstrini nisu cilindrične molekule već konusni prstenovi. Zbog konformacije stolca glukopiranoznih jedinica, sekundarne hidroksilne skupine u molekuli CD protežu se oko šireg otvora, a primarne oko uskog otvora molekule (slika 4). Smanjenje promjera

centralne šupljine na strani primarnih hidroksilnih skupina, posljedica je njihove slobodne rotacije. Strukture triju prirodnih ciklodekstrina prikazane su na slici 5 te su njihove glavne karakteristike prikazane u tablici 1.¹⁵



Slika 4. Shematski prikaz trodimenzijske strukture ciklodekstrina, preuzeto i prilagođeno iz Fourmentin i sur.¹⁵



Slika 5. Shematski prikaz kemijskih struktura i dimenzija α-, β- i γ- ciklodekstrina¹⁵

Tablica 1. Svojstva α -, β -, γ - ciklodekstrina^{15,16}

Ciklodekstrin	α -CD	β -CD	γ -CD
Broj glukoernih jedinica po molekuli	6	7	8
Kemijska formula	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Molarna masa (g mol ⁻¹)	972	1135	1297
Vanjski promjer centralne šupljine (Å)	14,6	15,4	17,5
Unutarnji promjer centralne šupljine (Å)	4,7–5,3	6,0–6,5	7,5–8,3
Visina (Å)	7,9	7,9	7,9
Topljivost u vodi pri 25 °C (g L ⁻¹)	145	18,5	232
Broj molekula vode unutar šupljine	6–8	11–12	13–17
pK _a	12,3	12,2	12,1

Vanjski dio molekule ciklodekstrina je hidrofilan zbog primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina, dok je unutrašnjost molekule lipofilna što omogućava uklapanje lipofilnih molekula u šupljinu čime se može poboljšati njihova topljivost. Na taj način molekule ciklodekstrina mijenjaju nepovoljna fizikalno-kemijska i biološka svojstva molekula koje se nalaze u centralnoj šupljini.¹⁴

Iako su prirodni ciklodekstrini hidrofilne molekule, njihova topljivost varira ovisno o stabilnosti njihove strukture (tablica 1). Unutar molekule β -ciklodekstrina nastaje 7 vodikovih veza što tu molekulu čini vrlo rigidnom i posljedično najmanje topljivom od svih prirodnih ciklodekstrina. U molekuli α -ciklodekstrina nastaje 4–6 vodikovih veza pa je ona topljivija od β -ciklodekstrina (7,8 puta topljiviji u odnosu na β -ciklodekstrin). Za molekulu γ -ciklodekstrina znamo da je fleksibilne strukture te da su joj veze najslabije što ju čini i najbolje topljivim prirodnim ciklodekstrinom.¹⁶

Zbog svoje niske cijene, β -ciklodekstrin je najviše proučavan i najčešće korišten prirodni ciklodekstrin. Iako je slabe topljivosti zbog velikog broja intramolekulskih vodikovih veza, supstitucijom jedne od hidroksilnih skupina u molekuli β -ciklodekstrina prekida se prsten intramolekulskih vodikovih veza te se povećava topljivost nastalih derivata β -ciklodekstrina. Derivati se najčešće priređuju aminacijom, esterifikacijom i eterifikacijom primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina molekule β -CD.¹⁴

Osim onemogućavanja nastanka intramolekulskih vodikovih veza unutar molekule β -ciklodekstrina, još jedan razlog bolje topljivosti njegovih derivata je u tome što kemijskom

modifikacijom molekule β -ciklodekstrina nastaje veliki broj izomera čime se kristalinični ciklodekstrin pretvara u amorfnu smjesu izomernih derivata. Najčešće se koriste nasumično metilirani β -ciklodekstrin (RAMEB), dimetil- β -ciklodekstrin (DM β CD), hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP β CD) te maltozil- i glukozil- β -ciklodekstrin.⁷ Tablica 2 prikazuje svojstva nekih derivata prirodnih ciklodekstrina.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva najznačajnijih derivata ciklodekstrina⁷

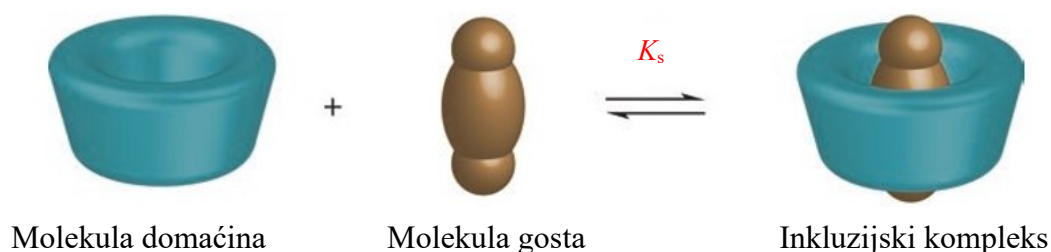
Ciklodekstrin	Prosječan broj supstituenata na molekuli CD	Molekulska masa (g mol ⁻¹)	Topljivost u vodi (mg mL ⁻¹)
Hidroksipropil- α -CD (HP α CD)	3,6	1180	500
Dimetil- β -CD (DM β CD)	12,0–16,0	1225	570
Trimetil- β -CD (TM β CD)	21,0	1430	310
Hidroksietil- β -CD (HE β CD)	3,6	1135	>20000
Hidroksipropil- β -CD (HP β CD)	2,8–10,5	1460	>1200
Sulfobutileter- β -CD (SBE β CD)	12,6	1425	>1200
Hidroksipropil- γ -CD (HP γ CD)	3,0–5,4	1762	800
Sulfobutileter- γ -CD (SBE γ CD)	4,0–8,0	1578	>1200

2.4. Inkluzijski kompleksi

Inkluzijski kompleks je kompleks u kojem jedna komponenta (molekula domaćina) tvori šupljinu, ili u slučaju kristala kristalnu rešetku, u kojoj se nalazi druga komponenta (molekula gosta) inkluzijskog kompleksa ili samo neki njezin dio. Ne postoje kovalentne veze između molekule domaćina i molekule gosta već su samo prisutne van der Waalsove sile.¹⁷

2.4.1. Mehanizam nastanka inkluzijskih kompleksa

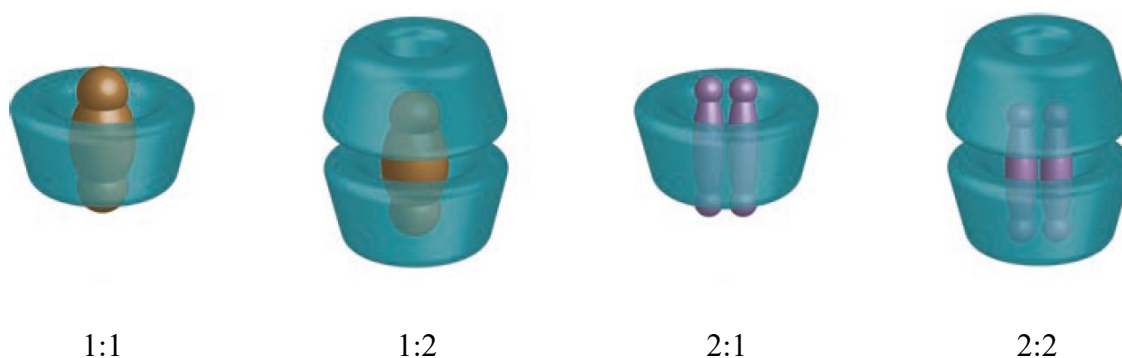
Ciklodekstrini u vodenim otopinama mogu tvoriti inkluzijske komplekse s velikim brojem kemijskih tvari pa tako i s raznim djelatnim tvarima (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz nastanka inkluzijskog kompleksa između ciklodekstrina (molekula domaćina) i djelatne tvari (molekula gosta). Preuzeto i prilagođeno iz S. Fourmentin i sur.¹⁵

Nastajanje kompleksa rezultat je ravnoteže između slobodnih molekula domaćina i gosta te inkluzijskog kompleksa i određeno je konstantom stabilnosti, odnosno konstantom nastajanja kompleksa, K_s , te se izražava u M^{-1} , odnosno $\text{mol}^{-1} \text{L}$. Dakle, što je veća K_s vrijednost to je kompleks stabilniji. Prihvatljive vrijednosti konstante stabilnosti za primjenu kompleksa u farmaceutske svrhe su u rasponu 50–5000 $\text{mol}^{-1} \text{L}$. Niže vrijednosti pokazuju da je afinitet lijeka za stvaranje inkluzijskog kompleksa vrlo mali, dok one veće vrijednosti konstante stabilnosti, koje za posljedicu imaju stabilniji kompleks, mogu znatno smanjiti bioraspodivnost djelatne tvari.¹⁸

Kao što je u 50-im godinama prošlog stoljeća Cramer ustanovio, kompleks je stabilan kada je veličina šupljine komplementarna veličini gostujuće molekule, zbog tada postignutih povoljnih interakcija između te dvije molekule. Ovisno o veličini molekule domaćina i molekule gosta, jedna molekula gosta može tvoriti komplekse molarnog omjera 1:1 s jednom molekulom domaćina ili komplekse molarnog omjera 1:2, s dvije molekule domaćina. Također je moguće da više molekula gosta tvore komplekse s jednom ili dvije (ili više) molekula domaćina, odnosno 2:1 ili 2:2 komplekse, kao što je prikazano na slici 7.¹⁵



Slika 7. Shematski prikaz glavnih stehiometrijskih odnosa CD kompleksa¹⁵

Nastajanje inkluzijskih kompleksa djelatnih tvari s ciklodekstrinima pokazalo se kao odlična metoda poboljšanja topljivosti slabo topljivih djelatnih tvari. Upravo zato, ciklodekstrini imaju široku primjenu u farmaceutskoj industriji jer se osim topljivosti djelatne tvari mijenjaju i njena druga fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Tvoreći inkluzijski kompleks, ciklodekstrini mogu utjecati na svojstva djelatne tvari kao što su agregatno stanje, topljivost, bioraspoloživost te brzina oslobađanja djelatne tvari iz primijenjenog lijeka, a da ne mijenjaju terapijski učinak djelatne tvari. Također, stvaranje inkluzijskih kompleksa može kemijski zaštititi nestabilne molekule lijeka od okoline tako da umanje mogućnost hidrolize, oksidacije, racemizacije i enzimske razgradnje određenog lijeka.⁷

2.5. Određivanje topljivosti prema Higuchiju i Connorsu

Metodu za ispitivanje topljivosti predstavili su Higuchi i Connors. Oslanjajući se na njihovu teoriju, analitičke tehnike koje se koriste za proučavanje topljivosti zahtijevaju da topljivost bude aditivna, odnosno da na topljivost svake komponente u smjesi ne utječe prisutnost ostalih komponenata u toj smjesi. Ipak, pokazalo se da većina sustava ne prati model takvog idealnog ponašanja što dovodi do veće pogreške u rezultatima. Higuchi i Connors tvrde da se i takvi sustavi, koji ne prate model idealnog ponašanja, mogu sistematizirati i na takav način primijeniti za jednostavno određivanje topljivosti. Mnoga su takva istraživanja provedena kako bi se omogućilo barem djelomično razumijevanje prirode interakcija u sustavima za određivanje topljivosti (engl. *phase-solubility systems*). Kako bi se omogućilo razumijevanje sustava za određivanje topljivosti u kojem se mogu detektirati molekulske interakcije, Higuchi i Connors su opisali prirodu takvih sustava i metode za njihovo proučavanje.¹⁹

2.5.1. Dijagrami topljivosti

Postupak za određivanje topljivosti uključuje ispitivanje utjecaja liganda L na supstrat S (djelatnu tvar) čija se promjena topljivosti prati.

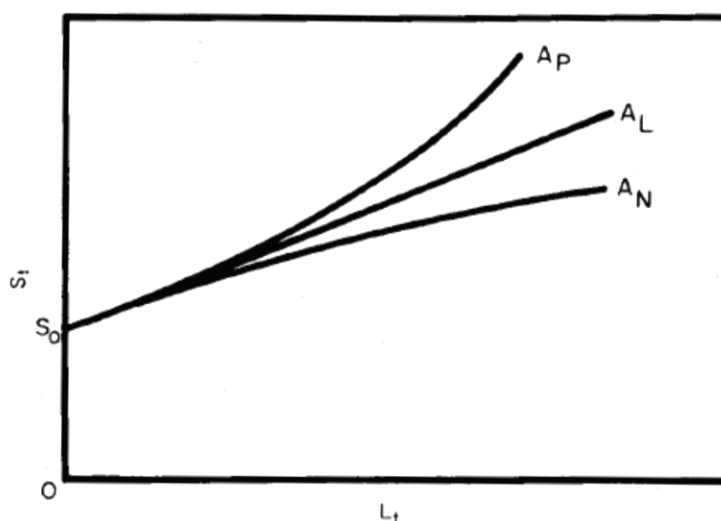
Eksperimentalno govoreći, slabo topljivi supstrat dodaje se u znatnom suvišku u određen broj tikvica u kojima se provodi eksperiment. Supstratu se tada dodaje konstantan volumen otopine koja sadrži sukcesivno veće koncentracije liganda. Tikvice se zatim podvrgnu miješanju pri konstantnoj temperaturi do postizanja ravnoteže. Takve se otopine filtriraju kako bi se uklonio višak neotopljenih tvari te analiziraju na bilo koji prikladan način

pomoću kojeg se može odrediti koncentracija supstrata u pojedinim otopinama, odnosno topljivost analita. U tu svrhu mogu se koristiti UV/Vis spektrofotometrija, spektrofluorimetrija ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Dijagram topljivosti konstruira se tako da se na y-osi nalazi ukupna molarna koncentracija slabo topljivog supstrata (djelatne tvari), a na x-osi se nalazi ukupna molarna koncentracija liganda (ciklodekstrina).^{13,19}

Tako konstruirani dijagrami topljivosti spadaju u dvije glavne kategorije, dijagram tipa A i dijagram tipa B.¹⁹

2.5.2. Dijagrami tipa A

Dijagrami tipa A ukazuju na nastajanje topljivih kompleksa između supstrata S i liganda L, čime se povećava ukupna količina supstrata S u otopini. Na slici 8 prikazani su dijagrami topljivosti tipa A. Simbol S_t predstavlja ukupnu molarnu koncentraciju slabo topljivog supstrata, L_t predstavlja ukupnu molarnu koncentraciju liganda, a S_0 ravnotežnu topljivost supstrata u odsutnosti liganda. Kao što se vidi iz dijagrama, topljivost slabo topljivog supstrata povećava se povećanjem koncentracije liganda. Postoje tri tipa krivulje A, ovisno o vrsti kompleksa koji nastaje. Krivulja tipa A_L prikazuje linearno povećanje topljivosti, A_P prikazuje pozitivno odstupajuću izotermu, a A_N negativno odstupajuću izotermu. Krivulje tipa A_L uočavaju se ako nastaju kompleksi tipa SL, S_2L , S_3L , odnosno kompleksi opće formule S_nL . Ako pak nastaju kompleksi tipa SL_2 , SL_3 , odnosno kompleksi opće formule SL_n , može se opaziti krivulja tipa A_P . Za sada nije utvrđeno što uvjetuje nastanak krivulje tipa A_N , no postoji nekoliko mogućih objašnjenja. Jedno objašnjenje je da takav izgled krivulje može biti posljedica promjene u prirodi otapala u prisutnosti velikih koncentracija liganda, što dovodi do promjene u konstanti nastajanja kompleksa. Postoji i drugo objašnjenje za nastanak ovakvog tipa krivulje, a ono se odnosi na mogućnost samoudruživanja liganda pri njegovim visokim koncentracijama u otopini što onda može utjecati na stupanj kompleksiranja.¹⁹

Slika 8. Dijagrami tipa A¹⁹

2.5.3. Dijagrami tipa B

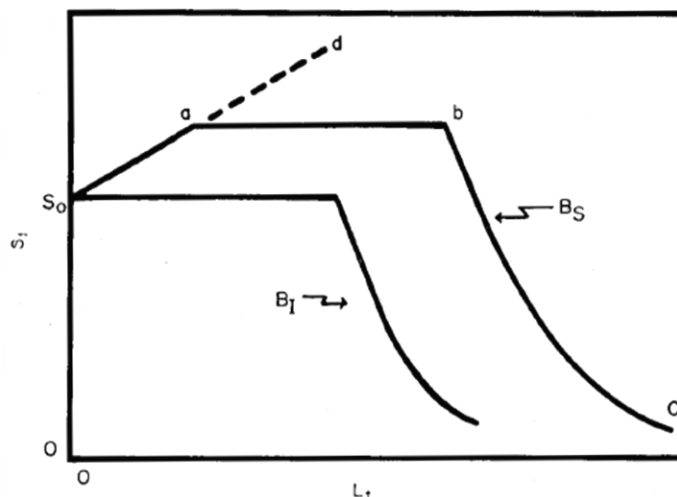
Na slici 9 prikazan je dijagram topljivosti tipa B. Krivulje ovoga tipa opisuju nastanak netopljivih kompleksa.

Krivulja B_S prikazuje nastanak topljivog kompleksa u području od S_0 do a . No, kada se dosegne gornja granica topljivosti kompleksa, prikazano točkom a , daljnje dodavanje liganda uzrokuje taloženje nastalog kompleksa, a koncentracija nekompleksiranog supstrata ostaje konstantna zbog otapanja čvrstog supstrata. U točki b je sav čvrsti supstrat otopljen te daljnje dodavanje L rezultira smanjenjem koncentracije S u otopini, zbog nastajanja i taloženja netopljivog kompleksa. Crtkani dio krivulje od a do d prikazuje prezasićenje otopine s obzirom na početno nastali kompleks.¹⁹

Na identičan način može se interpretirati i krivulja B_L . Razlika se očituje u nemogućnosti detekcije početnog porasta koncentracije supstrata zbog nastanka vrlo netopljivog kompleksa između supstrata i liganda.

Ako je nastali kompleks, koji je odgovoran za početni porast krivulje tipa B_S , isti kao kompleks koji taloži u području krivulje od b do c , povećanje koncentracije od S_0 do a mora biti jednako konačnoj koncentraciji supstrata S u točki c . Utvrđeno je kako se opisano stanje rijetko primjećuje te se iz toga da zaključiti kako sustav mora uključivati nastajanje barem dva različita kompleksa, od kojih je jedan odgovoran za početni porast topljivosti, dok se drugi taloži (kasnija faza krivulje). U nekim se ispitivanjima dalo uočiti povećanje topljivosti nakon

točke *c*, a razlog tome bio je nastanak nove vrste kompleksa koji je topljiviji od onog koji je odgovoran za silazni dio krivulje od točke *b* do točke *c*.¹⁹



Slika 9. Dijagram topljivosti tipa B¹⁹

2.5.4. Konstante stabilnosti inkluzijskih kompleksa

Kao što je već spomenuto, kompleksna priroda ovakvih sustava razlog je otežanog određivanja točnog stehiometrijskog omjera, a samim time i jednoznačnog tumačenja konstante stabilnosti nastalog inkluzijskog kompleksa. Iz tog se razloga često koristi konstanta dobivena na temelju pretpostavljenog stehiometrijskog omjera koju onda nazivamo prividnom konstantom stabilnosti i smatramo ju adekvatnom za određivanje opsega interakcije.

U slučaju nastanka samo jednog kompleksa opće formule S_mL_n konstanta stabilnosti prikazana je jednačinom:

$$K = \frac{[S_mL_n]}{[S]^m[L]^n}, \quad (1)$$

gdje $[S_mL_n]$ označava molarnu koncentraciju kompleksa, $[S]$ molarnu koncentraciju supstrata, a $[L]$ molarnu koncentraciju liganda.

Izvođenjem nekoliko formula, dobiva se izraz za konstantu stabilnosti kompleksa stehiometrijskog omjera 1:1 koja se može izračunati iz nagiba dijagrama topljivosti i intrinzične topljivosti lijeka (S_0):

$$K_{1:1} = \frac{\text{nagib}}{S_0(1 - \text{nagib})} \quad (2)$$

Iako postoji mogućnost nastanka serije kompleksa tipa SL, S₂L i ostalih kompleksa opće formule S_mL i dalje se opaža ovisnost prikazana tipom A_L te se često kao aproksimacija uzima da nastaju samo kompleksi omjera 1:1.¹⁹

2.5.5. Učinkovitost kompleksiranja

Prethodna istraživanja su pokazala da ciklodekstrini osim inkluzijskih, tvore i neinkluzijske komplekse. Također je poznato kako ciklodekstrini, ali i ciklodekstrinski kompleksi, mogu tvoriti agregate te se smatra da na taj način mogu poboljšati topljivost djelatnih tvari i ostalih hidrofobnih molekula mehanizmom micelarne solubilizacije.²⁰ Prema tome, može se zaključiti kako prividne konstante dobivene iz dijagrama topljivosti opisuju zajednički učinak različitih kompleksnih struktura na topljivost određene supstance.

Kako je prikazano u prethodnom poglavlju, konstanta stabilnosti $K_{1:1}$ određena je nagibom krivulje (kod A_L tipa je to ravna linija) te intrinzičnom topljivosti djelatne tvari (S_0). Teorijski gledano, sjecište krivulje s y-osi dijagrama topljivosti (S_{int}) trebalo bi odgovarati vrijednosti intrinzične topljivosti djelatne tvari koju ispitujemo. Međutim, za djelatne tvari čija je topljivost manja od $0,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, intrinzična topljivost je mnogo veća od vrijednosti očitane iz dijagrama, odnosno od vrijednosti sjecišta krivulje s y-osi, što može dovesti do pogrešnih vrijednosti $K_{1:1}$. Stoga su prividne konstante stabilnosti često vrlo neprecizne i vrlo osjetljive na sastav vodenog medija za kompleksiranje.²⁰

Puno točnija metoda za utvrđivanje utjecaja liganda na topljivost djelatne tvari odnosi se na određivanje vrijednosti učinkovitosti kompleksiranja (engl. *complexation efficiency*, CE), odnosno omjera koncentracije liganda koji se nalazi u kompleksu i koncentracije slobodnog liganda. Vrijednost CE se izračunava pomoću nagiba krivulje dijagrama topljivosti te je neovisna o vrijednostima S_0 i S_{int} i samim time točnija i pogodnija za ispitivanje utjecaja različitih farmaceutskih pomoćnih tvari na topljivost neke djelatne tvari.²⁰ Za komplekse djelatne tvari i ciklodekstrina stehiometrijskog omjera 1:1, CE se izračunava na sljedeći način:

$$CE = \frac{[D/CD_n]}{[CD]} = S_0 \times K_{1:1} = \frac{\text{nagib}}{(1 - \text{nagib})} \quad (3)$$

2.6. Priprema i karakterizacija inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju

Ne postoji jedinstvena metoda za pripravu i karakterizaciju inkluzijskog kompleksa u čvrstom stanju te se metoda odabire na temelju svojstava, kako djelatne tvari tako i ciklodekstrina, kao i željenih karakteristika dobivenog kompleksa.²¹

Postoje tri glavne skupine u koje možemo podijeliti tehnike za pripremu inkluzijskih spojeva u čvrstom stanju, a to su metode u čvrstom stanju, metode u polučvrstom stanju te metode u otopini. Metode u čvrstom stanju temelje se na mljevenju krutih sastojaka u različitim tipovima mlinova, primjenom mikrovalnog zračenja kao i upotrebom superkritičnih fluida (engl. *supercritical fluid*, SCF).^{5,7} Metode u polučvrstom stanju temelje se na metodi gnječenja (engl. *kneading*) gdje se fizičkoj smjesi djelatne tvari i ciklodekstrina dodaje mala količina otapala (voda ili smjesa etanol/voda) kako bi se dobila smjesa gustoće paste te se daljnjom obradom uklanja otapalo i ponovno dobiva praškasti uzorak, dok se metode u otopini provode otapanjem sastojaka u odgovarajućem otapalu pri određenom pH i temperaturi. Nakon što su se sastojci otopili, otapalo se uklanja metodama poput uparavanja, izolacijom kompleksa taloženjem iz otopine i drugim.⁵

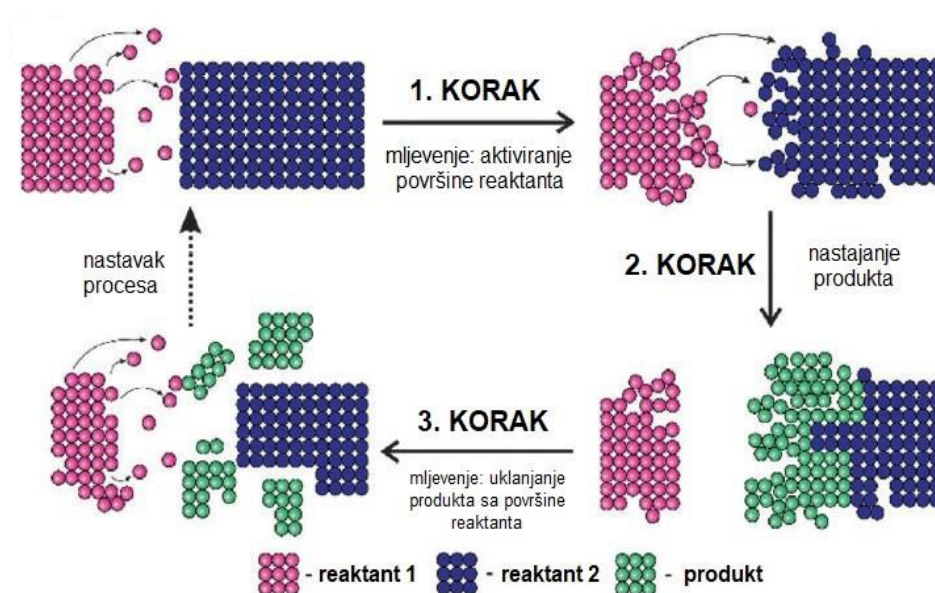
Vrlo je važno pomno odabrati metodu pripreme inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju kako bi se osigurala željena svojstva produkta i kako prilikom pripreme uzorka ne bi došlo do neželjenih reakcija poput raspada produkta korištenjem metoda koje zahtijevaju primjenu visokih temperatura te kako bi interakcija reaktanata u smjesi bila što uspješnija.²¹

Od svih navedenih metoda, najzanimljivija je metoda mljevenja krutih sastojaka u mlinovima, prije svega zbog ekološke prihvatljivosti ove metode koja ne zahtijeva upotrebu velikih količina organskih otapala, ali i zbog jednostavnosti primjene kao i prihvatljive cijene.⁵

2.6.1. Mljevenje kao metoda sinteze inkluzijskih kompleksa

Općenito, mehanokemijske reakcije su reakcije koje se temelje na dovođenju mehaničke energije u sustav koji se najčešće nalazi u čvrstom stanju. Takve se reakcije mogu izvesti upotrebom tarionika i tučka, no učinkovitije su one koje se odvijaju u visokoenergetskim mlinovima i dovode do mehanokemijskih transformacija bitnih za nastanak željenog produkta. Razlog korištenja ovakvih metoda leži u njihovoj ekološkoj prihvatljivosti, budući da ne zahtijevaju uporabu velikih količina organskih otapala te zbog brzine, visoke učinkovitosti i održivosti ovakvih metoda.⁵

Iako nije u potpunosti razjašnjen mehanizam nastajanja inkluzijskog kompleksa mehanokemijskom aktivacijom, dan je prijedlog nastanka kompleksa u tri koraka (slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa metodom mljevenja u čvrstom stanju.⁷

Iz shematskog prikaza vidi se kako u prvom koraku dolazi do smanjenja veličine čestica, nastajanja deformacija u njihovim kristalnim rešetkama i mehanokemijske aktivacije. Zatim slijedi drugi korak u kojem dolazi do reakcije na površini reaktanata i nastanka inkluzijskog kompleksa koji se u trećem koraku odvaja od površine reaktanata. Taj se proces zatim ponavlja. Važno je napomenuti kako proces mljevenja dovodi do amorfizacije kristalnog materijala koji započinje na tankom površinskom sloju, a zatim se širi po kristalu i dovodi do nastanka aktiviranog oblika djelatne tvari. Mljevenje, također, homogenizira smjesu što doprinosi boljoj interakciji djelatne tvari i ciklodekstrina.⁵

Sam proces mljevenja smjese može se izvesti na dva načina: suho mljevenje (engl. *neat grinding*, NG) i mljevenje uz dodatak otapala (engl. *liquid assisted grinding*, LAG). Gore opisana tehnika je tehnika suhog mljevenja. Mljevenje uz dodatak otapala razlikuje se upravo u dodatku male količine otapala u smjesu reaktanata u čvrstom stanju što u nekim slučajevima dovodi do bolje interakcije između reaktanata, odnosno rezultira većim prinosom produkta željenih svojstava.⁵

Vibracijski mikromlinovi koji se koriste za usitnjavanje krutina sastoje se od metalnih diskova na koje se pričvrste posudice za mljevenje valjkastog oblika. Kad se uređaj pokrene, posudice osciliraju radijalno u horizontalnom položaju, a kuglice koje se nalaze unutar posudice s uzorkom, uslijed brzog gibanja, usitnjuju uzorak čime se postiže mehanokemijska aktivacija. Zbog specifičnih pokreta posudica, koje su učvršćene na metalne diskove instrumenta, zajedno s pokretima kuglica unutar posuda, dolazi do snažnog miješanja uzorka.^{5,7} Na stupanj miješanja utječu dimenzije i količina kuglica, no uz to veliki utjecaj ima i frekvencija mljevenja, koja je najčešće između 15 i 25 Hz.

Posude za mljevenje kao i kuglice, obično su izrađene od nehrđajućeg čelika, volframovog karbida, Al₂O₃ keramike, ZrO₂ keramike, silicijeva nitrida (Si₃N₄), polistirena, polikarbonata, teflona i drugih materijala. Na slici 11 prikazan je laboratorijski vibracijski mikromlin proizvođača Retsch, koji je također korišten i u izradi ovog diplomskog rada.⁵



Slika 11. Laboratorijski vibracijski mikromlin.²²

Raznim eksperimentima je utvrđeno da je vrijeme mljevenja potrebno za potpunu amorfizaciju i nastanak inkluzijskog kompleksa između 30 i 60 minuta, ovisno o svojstvima ciklodekstrina i djelatne tvari, kao i o omjeru količine djelatne tvari i ciklodekstrina.⁵

2.6.2. Načini karakterizacije krutih kompleksa pripremljenih mehanokemijskom aktivacijom

Ne postoji jedinstvena tehnika za karakterizaciju i potvrdu stvarnog nastanka inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina i djelatne tvari, već je potrebna kombinirana upotreba različitih tehnika kako bi se točno ustanovile informacije o kompleksu i njegovu nastanku. Za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa koriste se tehnike toplinske analize poput diferencijalne pretražne kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) i termogravimetrijske analize (engl. *thermogravimetric analysis*, TGA), tehnike difrakcije

rendgenskih zraka te spektroskopske tehnike poput infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) i prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) i druge.²¹

Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama jedna je od tehnika koja se koristi za proučavanje inkluzijskog kompleksa djelatne tvari i ciklodekstrina u čvrstom stanju. Ovom se tehnikom može pratiti i identificirati kod kojih vibracija dolazi do promjena prilikom nastanka kompleksa te dobiti informacije o vrsti interakcija koje nastaju tijekom tog procesa. Neke od promjena u spektru koje nam ukazuju na nastanak kompleksa su nestanak ili proširenje određenih vrpca kao i promjene u intenzitetu vrpce, ali i u njezinom položaju. Prednosti ove tehnike su visoka osjetljivost i selektivnost kao i brzina i jednostavnost.²¹

Metoda ima i nedostatke koje ju čine neadekvatnom za kvantitativna ispitivanja, kao što su moguće promjene uzoraka prilikom pripreme KBr pastila. KBr pastile pripremaju se miješanjem uzorka s KBr u tarioniku u omjeru 1:100. Prilikom ovog postupka može doći do fizikalno-kemijskih promjena uzorka zbog primijenjene sile koja može uzrokovati nastajanje nekovalentnih interakcija između uzorka i KBr. Također, kao još jedan nedostatak tehnike navodi se i nerijetko preklapanje vrpca djelatne tvari s ostalim vrpcama što onda otežava nedvosmislenu karakterizaciju kompleksa.²¹

Kao još jedna spektroskopska metoda pogodna za karakterizaciju inkluzijskog kompleksa koristi se tehnika prigušene totalne refleksije koja se temelji na totalnoj unutarnjoj refleksiji zračenja na granici faza uzorka i refleksijskog kristala. Prednost ove tehnike u usporedbi s tehnikom FTIR je što ne zahtijeva posebnu pripravu uzorka za mjerenje, već se mjerenje provodi tako da se uzorak nanosi direktno na nosač s odgovarajućim reflektirajućim materijalom koji ne apsorbira zračenje i ima visok indeks loma (ZnSe, Si, Ge, dijamant). Ova je tehnika pogodna i za snimanje spektara uzoraka koji izrazito apsorbiraju IR zračenje.²³

2.7. Inkluzijski kompleksi loratadina i ciklodekstrina

Utjecaj pojedinih ciklodekstrina na svojstva loratadina već je istražen te je objavljeno nekoliko radova na tu temu. Čvrsti kompleksi ciklodekstrina i loratadina mogu se pripremiti, ali i analizirati korištenjem različitih analitičkih tehnika.

Omar i suradnici su u svom radu istražili utjecaj različitih ciklodekstrina (α -CD, β -CD, γ -CD i HP β CD) na povećanje topljivosti loratadina pri pH 7. Pokazalo se da svi ciklodekstrini

uzrokuju povećanje topljivosti i nastanak kompleksa LOR/CD u omjerima 1:1 i 1:2. Budući da se pokazalo da je kompleks LOR/ β -CD najstabilniji, istražen je utjecaj pH medija i koncentracije pufera na poboljšanje topljivosti LOR u prisutnosti ovog ciklodekstrina. Pripravljen je kompleks LOR/ β -CD u čvrstom stanju metodom liofilizacije (engl. *freeze drying*) te je nastanak inkluzijskog kompleksa potvrđen metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije. Molekularnim modeliranjem predložena je geometrija nastalog LOR/ β -CD kompleksa.²⁴

Nacsa i suradnici pripremali su inkluzijske komplekse loratadina i dimetil- β -ciklodekstrina (DIMEB) konvencionalnom metodom gnječenja (engl. *kneading*) i metodom mikrovalnog zračenja u omjerima 1:1, 1:2 i 1:3. Pripremljeni kompleksi u čvrstom stanju su ispitani metodama termogravimetrije i FTIR metodom. Rezultati istraživanja ukazuju kako na topljivost loratadina, kao i na brzinu otapanja, utječe molarni omjer pripremljenog kompleksa. Nastanak inkluzijskog kompleksa potvrđen je termogravimetrijskom i IR metodom. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je metoda mikrovalnog zračenja pogodna metoda za pripravu inkluzijskih kompleksa te je usporediva s konvencionalnim metodama, poput metode gnječenja.²

Nacsa i suradnici također su istražili poboljšanje topljivosti loratadina u prisutnosti prirodnih ciklodekstrina (α -CD, β -CD i γ -CD) i raznih derivata β -ciklodekstrina (nasumično metilirani β -ciklodekstrin (RAMEB), hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP β CD), dimetil- β -ciklodekstrin (DIMEB), metil- β -ciklodekstrin (Me β CD), hidroksibutil- β -ciklodekstrin (HBu β CD) i sulfobutileter- β -ciklodekstrin (SBE β CD)) u vodi. U preliminarnim ispitivanjima pokazalo se da je najveće poboljšanje topljivosti loratadina u vodi uočeno korištenjem DIMEB-a (povećanje topljivosti oko 300 puta) pa se ostatak eksperimenta provodio samo s tim ciklodekstrinom. Inkluzijski kompleksi loratadina i DIMEB-a pripremljeni su u dva različita molarna omjera (1:1 i 1:2) koristeći tri različite tehnike, miješanje u tarioniku, gnječenje i sušenje raspršivanjem (engl. *spray-drying*). Nastanak i fizikalno kemijska svojstva inkluzijskog kompleksa istraženi su ispitivanjem topljivosti, brzine oslobađanja, termalnom analizom i FTIR metodom. Konstanta stabilnosti kompleksa loratadina i DIMEB-a u fosfatnom puferu pri pH 7,5 iznosila je $1,48 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Ovisno o metodi pripreme i molarnom omjeru, brzina oslobađanja loratadina povećana je i do 200 puta, a pokazalo se i da je u slučaju kompleksa LOR/DIMEB u omjeru 1:2 pripremljenog metodom gnječenja brzina oslobađanja neovisna o pH unutar raspona gastrointestinalnog pH. Rezultati DSC i FTIR

analize pokazali su kako DIMEB tvori inkluzijski kompleks s loratadinom stvarajući vodikove veze s karboksilnom skupinom.¹

Szabados-Nacsá i suradnici u svom radu iz 2011. godine nastavili su istraživanje kompleksa LOR/DIMEB. Inkluzijski kompleks pripremljen je metodom gnječenja u dva različita molarna omjera (1:1 i 1:2). Ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja loratadina provodila su se u sedam različitih puferiranih otopina s vrijednostima pH u rasponu 1,2–7,5. Stehiometrija kompleksa određena je spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization mass spectroscopy*, ESI-MS) i ¹H NMR tehnikom DOSY (engl. *diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy*). Ustanovljeno je da loratadin stvara komplekse sa DIMEB-om stehiometrije 1:1 bez obzira na molarni omjer prilikom pripreme inkluzijskih kompleksa. Međutim, ispitivanje *in vitro* brzine oslobađanja pokazuje bolje rezultate u slučaju kompleksa pripremljenog u omjeru 1:2, pri čemu je uočena i pH neovisna brzina oslobađanja. Na temelju ovih rezultata, i *in vivo* ispitivanja, može se zaključiti da je prisutnost ciklodekstrina u suvišku potrebna za bolju farmakološku učinkovitost loratadina.²⁵

Lin i suradnici su u radu iz 2010. godine ispitivali povećanje topljivosti loratadina kada se nalazi u kompleksu s hidroksipropil-β-ciklodekstrinom (HPβCD). Inkluzijski kompleksi pripremljeni su metodom mljevenja (engl. *co-grinding process*) i metodom isparavanja otapala (engl. *solvent evaporation method*) u omjerima 1:1 i 1:2. Nastajanje kompleksa potvrđeno je DSC i FTIR metodama. Ispitivanjima topljivosti pokazali su kako topljivost loratadina linearno raste s porastom koncentracije HPβCD. Dijagram topljivosti klasificiran je kao dijagram tipa A_L što je ukazivalo na nastajanje produkta LOR/CD u omjeru 1:1. Dobivena konstanta stabilnosti iznosila je $2,22 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ što ukazuje na nastajanje stabilnog inkluzijskog kompleksa.³

U nastavku istraživanja, Lin i suradnici su u radu iz 2012. g. ispitivali poboljšanje topljivosti loratadina u prisutnosti HPβCD, ali i β-CD. Oba kompleksa su u ovom radu pripremljena metodom mljevenja u visokoenergetskom mlinu te se potvrda njihovog nastanka provodila DSC i FTIR metodama. Rezultati topljivosti kompleksa LOR/HPβCD kao i potvrda njegovog nastanka bili su identični onima iz prethodnog rada. Ispitivanje topljivosti kompleksa LOR/β-CD pokazalo je kako nastaje kompleks omjera 1:1 što je potvrđeno dobivenim dijagramom topljivosti tipa A_L. Konstanta stabilnosti ovog kompleksa iznosila je $2,17 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Također, predložen je način nastajanja inkluzijskih kompleksa LOR/β-CD i

LOR/HP β CD pri čemu tijekom mljevenja prvo dolazi do amorfizacije LOR te potom do nastanka inkluzijskog kompleksa.²⁶

Pooja i suradnici su u svom radu ispitivali poboljšanje topljivosti loratadina u prisutnosti HP β CD. Kompleksi su pripremljeni koristeći četiri različite metode: metodom pripreme fizičke smjese (engl. *physical mixture*), metodom mljevenja (engl. *co-grinding*), metodom isparavanja otapala (engl. *solvent evaporation method*) i metodom gnječenja (engl. *kneading*). Ove su metode korištene kako bi se pripravili kompleksi loratadina i HP β CD u omjerima 1:1 i 1:2 te kako bi se utvrdilo s kojom od navedenih metoda se osigurava najveće poboljšanje topljivosti loratadina. Pripremljeni inkluzijski kompleksi okarakterizirani su DSC i FTIR metodama te pretražnom elektronskom mikroskopijom (engl. *scanning electron microscopy*, SEM). Najbolje rezultate dao je kompleks LOR/HP β CD pripremljen metodom gnječenja, iako se i kod svih drugih kompleksa opazilo poboljšanje topljivosti loratadina s obzirom na topljivost čistog loratadina.²⁷

Pandya i suradnici pripremili su čvrste disperzije loratadina, koristeći se metodom isparavanja otapala i metodom fuzije, kako bi poboljšali topljivost loratadina. Pripremljene su čvrste disperzije loratadina sa β -ciklodekstrinom u omjerima 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4 metodom isparavanja otapala, dok su metodom fuzije pripremljene čvrste disperzije u omjerima od 1:1 do 1:5. Rađene su raspadljive tablete za usta koje pokazuju bolju bioraspoloživost od komercijalnih tableta. Pripremljene tablete podvrgnute su različitim parametrima procjene kao što su tvrdoća, debljina, lomljivost, varijacija težine, ujednačenost sadržaja lijeka, *in vitro* vrijeme raspadanja, vrijeme vlaženja, *in vitro* studije otapanja i studije stabilnosti. UV/Vis spektrofotometrija je korištena pri kvantitativnom određivanju djelatne tvari čvrstih disperzija. Također, IR spektroskopija je korištena za potvrdu nastanka kompleksa. Rezultati istraživanja pokazali su da je formulacija loratadina pripremljena metodom fuzije uz krospondon pokazala najbolja svojstva te je cjenovno isplativa.²⁸

Singh i suradnici su u svome radu iz 2013. godine istraživali poboljšanje topljivosti loratadina stvaranjem inkluzijskog kompleksa loratadina i β -ciklodekstrina te mogućnost pripreme termički aktiviranog mukoadhezivnog *in situ* gela za nosnu šupljinu, kako bi loratadinu povećali bioraspoloživost. Ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u prisutnosti β -ciklodekstrina provedena su u vodenom mediju Higuchi-Connors metodom. Mjerenja su provedena na UV spektrofotometru pri 260 nm. Priprema inkluzijskog kompleksa

loratadina i β -ciklodekstrina u čvrstom stanju provedena je metodom gnječenja. Za potvrdu nastanka inkluzijskog kompleksa u čvrstom stanju korištene su metode SEM, DSC, FTIR te difrakcija rendgenskih zraka. Ispitivanjima topljivosti potvrdilo se linearno poboljšanje topljivosti loratadina s porastom koncentracije β -ciklodekstrina. Dijagram topljivosti okarakteriziran je kao dijagram tipa A_L što je dalo pretpostaviti nastajanje kompleksa omjera 1:1. Dobivena konstanta stabilnosti kompleksa iznosila je $2,13 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.²⁹

Rivas-Granizo i suradnici istraživali su fotostabilnost inkluzijskog kompleksa loratadina s α -, β - i γ -ciklodekstrinom. Kompleksi loratadina i ciklodekstrina pripremljeni su metodom isparavanja u omjerima 1:1, 1:2 i 1:3, a za potvrdu nastanka kompleksa korištene su metode DSC i TGA. Otopine kompleksa podvrgnute su zračenju u komori za ispitivanje fotostabilnosti u trajanju od 12 sati, te su potom analizirane tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Rezultati pokazuju kako α - i γ -ciklodekstrin znatno više povećavaju stabilnost loratadina u usporedbi sa β -ciklodekstrinom, posebice u slučaju kompleksa omjera 1:1 što ukazuje na povoljan utjecaj ciklodekstrina na fotostabilnost djelatnih tvari.³²

U tablici 3 nalazi se pregled dosad navedenih radova s konstantama stabilnosti dobivenih kompleksa, kao i odgovarajućim korištenim ciklodekstrinima.

Tablica 3. Pregled dobivenih konstanti stabilnosti inkluzijskih kompleksa loratadina s različitim ciklodekstrinima i u različitim medijima

Istraživačka skupina	Vrsta ciklodekstrina	Medij	$K_{1:1}$ (mol ⁻¹ L)
Omar i sur. ²⁴ (2007)	α-CD	Fosfatni pufer (pH 7)	1,76×10 ³
	β-CD		1,14×10 ⁵
	γ-CD		2,70×10 ³
	HPβCD		5,56×10 ⁴
Nacsa i sur. ¹ (2009)	DIMEB	Fosfatni pufer (pH 7,5)	1,48×10 ⁶
Lin i sur. ³ (2010)	HPβCD	Voda (pH 5,6)	2,22×10 ⁴
Lin i sur. ²⁶ (2012)	β-CD	Voda	2,17×10 ⁴
Singh i sur. ²⁹ (2013)	β-CD	Voda	2,13×10 ⁴

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za eksperimente korišteni su kruti loratadin (LOR) proizvođača Carbosynth, Ujedinjeno Kraljevstvo te kruti ciklodekstrini: β -ciklodekstrin (β -CD) i hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP β CD) proizvođača Cyclolab, Mađarska. Simulirani duodenalni medij (pH 4,5) i simulirani intestinalni medij (pH 6,8) pripremljeni su prema monografiji 5.17.1. Europske farmakopeje (9. izd.).³¹ Korišten je metanol (MeOH) proizvođača J. T. Baker, SAD.

Za pripremu mobilne faze $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ acetatnog pufera korišten je natrijev acetat trihidrat (proizvođač Laphoma, Skopje) i octena kiselina (proizvođač Alkaloid, Skopje) te ultračista voda dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sustava za pročišćavanje (proizvođač Merck, Njemačka).

Kalijev bromid (KBr) korišten za izradu pastila za infracrvenu spektroskopiju nabavljen je od proizvođača Kemika, Hrvatska.

Filteri korišteni za filtriranje otopina uzoraka prije analize bili su *Chromafil Xtra H-PTFE*, veličine pora 0,45 μm , proizvođača Macherey-Nagel, Njemačka.

3.2. Instrumentacija

Analiza tekućinskom kromatografijom provedena je na instrumentu Agilent 1220 Infinity proizvođača Agilent Technologies opremljenog binarnom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatiranim odjeljkom za kolonu i detektorom varijabilne valne duljine. Kromatografsko razdvajanje provedeno je na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μm , 4,5 \times 250 mm) proizvođača Agilent Technologies. Mobilna faza sastojala se od metanola (MeOH) i $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ acetatnog pufera (pH 4) 80:20 (v:v). Protok mobilne faze iznosio je 1 mL min⁻¹, a temperatura kolone iznosila je 40 °C. Valna duljina detekcije bila je postavljena na 250 nm, dok je volumen injektiranja bio 20 μL .

Apsorpcijski spektri snimljeni su pomoću Specord 200 spektrofotometra (proizvođač Analytik Jena, Njemačka) u rasponu valnih duljina 200–360 nm s postavljenom širinom

pukotine od 2 nm i brzinom snimanja od 10 nm s⁻¹. Korištene su konvencionalne kvarcne kivete ($l = 1$ cm).

Infracrveni spektri snimljeni su na spektrometru Vector 22 tvrtke Bruker opremljenim PIKE MIRacle ATR nosačem, pri čemu su snimani transmisijski i ATR spektri. Za snimanje transmisijskih spektara, svi uzorci su pripremani tehnikom KBr pastile tako da je uzeto otprilike 1 mg uzorka i 100 mg KBr te su zajedno usitnjeni u tarioniku i zatim isprešani u pastile. Transmisijski spektri snimani su u području valnih brojeva od 4000 do 600 cm⁻¹ pri rezoluciji od 4 cm⁻¹ i rezultat su uprosječivanja 32 snimanja. Za snimanje ATR spektara nije bilo potrebe za posebnom pripremom uzoraka te su uzorci izravno nanoseni na nosač od sloja ZnSe i dijamanta. ATR spektri snimani su u području valnih brojeva od 4000 do 600 cm⁻¹ pri rezoluciji od 4 cm⁻¹ i rezultat su uprosječivanja 32 snimanja.

Također su snimljeni i ATR spektri čistog loratadina, te čistih ciklodekstrina korištenih u ovom radu kako bi se odredio utjecaj mljevenja na spektre uzorka, budući da ti uzorci nisu bili izloženi sudarima u mikromlinu niti fizičkom miješanju u tarioniku.

Za pripremu kompleksa u čvrstom stanju koristio se visokoenergetski vibracijski mikromlin (Mixer Mill MM 200 proizvođača Retch, Njemačka).

3.3. Ispitivanje poboljšanja topljivosti

Za ispitivanje poboljšanja topljivosti loratadina, pripremljeni su uzorci loratadina s β -CD i s HP β CD u vodi, te u simuliranom duodenalnom mediju (pH 4,5) i simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8).

Ispitivanja su provedena tako da je odvagana određena količina loratadina u suvišku, ovisno o topljivosti pri različitim pH medija u kojima se izvode ispitivanja. Za ispitivanje topljivosti u vodi i u simuliranom intestinalnom mediju odvagano je 5 mg loratadina, a za ispitivanje topljivosti u simuliranom duodenalnom mediju 10 mg loratadina. U svaku tikvicu je potom odvagana određena količina ciklodekstrina tako da je konačna koncentracija ciklodekstrina iznosila $0,0\text{--}12,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (β -CD), odnosno $0,0\text{--}40,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (HP β CD), ovisno o topljivosti ciklodekstrina. U svaku tikvicu je otpipetirano 10 mL odgovarajućeg otapala, a tikvice su zatim stavljene na tresilicu te su uzimani alikvoti nakon 24, 48 i 72 sata. Alikvoti od 2 mL filtrirani su te primjereno razrijeđeni. Uzorci loratadina bez prisustva ciklodekstrina u svim medijima pripremljeni su za analizu tekućinskom

kromatografijom tako da se otpipetiralo 500 μL uzorka i 500 μL metanola u bočicu. Svi ostali uzorci analizirani su UV-Vis spektrofotometrijom. Uzorci su pripremani tako da je u tikvice od 5 mL otpipetiran 1 mL metanola i određeni volumen uzorka, te su tikvice nadopunjene do oznake odgovarajućim medijem. U tablicama 4 i 5 su navedeni volumeni uzoraka koji su otpipetirani.

Tablica 4. Priprema otopina za kvantitativno određivanje LOR u suspenzijama s β -CD UV/Vis spektrofotometrijom.

Voda		Simulirani duodenalni medij (pH 4,5)		Simulirani intestinalni medij (pH 6,8)	
$c(\text{CD}) / \text{mM}^*$	$V(\text{uzorak}) / \mu\text{L}$	$c(\text{CD}) / \text{mM}$	$V(\text{uzorak}) / \mu\text{L}$	$c(\text{CD}) / \text{mM}$	$V(\text{uzorak}) / \mu\text{L}$
2,5	200	2,5	200	2,5	200
5	200	5	200	5	200
7,5	200	7,5	200	7,5	200
10	200	10	100	10	200
12,5	200	12,5	100	12,5	200

* $\text{M} = \text{mol L}^{-1}$

Tablica 5. Priprema otopina za kvantitativno određivanje LOR u suspenzijama s HP β CD UV/Vis spektrofotometrijom.

Voda		Simulirani duodenalni medij (pH 4,5)		Simulirani intestinalni medij (pH 6,8)	
$c(\text{CD}) /$ mM*	$V(\text{uzorak}) /$ μL	$c(\text{CD}) /$ mM	$V(\text{uzorak}) /$ μL	$c(\text{CD}) /$ mM	$V(\text{uzorak}) /$ μL
5	200	5	200	5	200
10	200	10	200	10	200
15	200	15	200	15	200
20	200	20	100	20	200
25	200	25	100	25	200
30	200	30	100	30	200
35	200	35	100	35	200
40	200	40	100	40	200

*M = mol L⁻¹

Na temelju očitanih površina pikova i apsorbancija pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije (249 nm) izračunate su koncentracije loratadina u uzorcima s i bez prisutnosti ciklodekstrina. Konstruirani su pripadajući dijagrami topljivosti i određene su vrijednosti $K_{1:1}$ i CE prema jednadžbama (2) i (3).

Metode kvantifikacije loratadina tekućinskom kromatografijom i UV/Vis spektrofotometrijom su prethodno validirane, te su parametri validacije navedeni u tablici 6.

Tablica 6. Parametri validacije metoda za određivanje koncentracije LOR.

		Linearnost	Raspon linearnosti	LOD/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOQ / $\mu\text{g mL}^{-1}$
HPLC		$y = 44,223x - 13,024$	$0,5 - 15 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,0049	0,017
UV/Vis	voda	$y = 0,0389x - 0,0093$	$5 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,99	2,99
	pH 4,5	$y = 0,0356x - 0,0007$	$5 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,93	2,82
	pH 6,8	$y = 0,0399x - 0,0439$	$5 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,64	1,93

3.4. Priprava kompleksa u čvrstom stanju

Kompleksi loratadina s β -CD i s HP β CD u čvrstom stanju pripremljeni su mljevenjem u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu. Na isti način pripremljeni su i uzorci čistog loratadina, β -CD te HP β CD. Kompleksi su pripremljeni vaganjem ekvimolarnog omjera loratadina i ciklodekstrina tako da je ukupna masa iznosila 200 mg (tablica 7). Uzorci su pripremljeni na dva načina, suhim mljevenjem (NG) te uz dodatak 10 μL etanola (LAG). Uzorci su preneseni u posude za mljevenje volumena 10 mL koje su sadržavale 2 kuglice promjera 10 mm načinjene od nehrđajućeg čelika. Smjesa je mljevena 30 minuta pri 25 Hz. Radi usporedbe, pripremljene su i fizičke smjese loratadina i ciklodekstrina miješanjem u tarioniku.

Tablica 7. Mase LOR, β -CD i HP β CD korištene za pripravu smjese spojeva u ekvimolarnim količinama, ukupne mase 200 mg.

Kompleks	$m(\text{LOR}) / \text{mg}$	$m(\text{CD}) / \text{mg}$
LOR + β -CD	50,45	149,55
LOR + HP β CD	43,04	156,96

3.5. Ispitivanje topljivosti kompleksa u čvrstom stanju

Ispitivanje topljivosti kompleksa u čvrstom stanju provedeno je vaganjem određene količine prethodno pripremljenih kompleksa tako da loratadin bude u jednakom suvišku kao i prilikom ispitivanja poboljšanja topljivosti (tablica 8). U svaki uzorak je potom dodano 10 mL odgovarajućeg medija te su uzorci stavljeni na tresilicu. Uzimani su alikvoti 24, 48 i 72 sata nakon pripreme uzoraka koji su potom profiltrirani. Uzorci samog loratadina su pripremljeni za kvantitativnu analizu tekućinskom kromatografijom tako da je otpipetirano 500 μ L uzorka i dodano 500 μ L metanola. Uzorci pripremljenih kompleksa u čvrstom stanju su kvantificirani UV/Vis spektrofotometrijom, a pripremljeni su tako da je u tikvice od 5 mL otpipetirano 400 μ L uzorka (za ispitivanje u vodi i simuliranom intestinalnom mediju), odnosno 300 μ L uzorka (za ispitivanje u simuliranom duodenalnom mediju). U sve tikvice otpipetiran je 1 mL metanola te su nadopunjene do oznake odgovarajućim medijem.

Tablica 8. Odvagane mase loratadina i kompleksa loratadina i ciklodekstrina pripremljenih mljevenjem za ispitivanja topljivosti kompleksa u čvrstom stanju.

Uzorak	<i>m</i> / mg		
	Voda	pH 4,5	pH 6,8
LOR	5,08	10,03	5,07
LOR M	5,09	10,03	4,96
LOR + β -CD NG	19,88	39,70	19,84
LOR + β -CD LAG	19,90	39,60	19,88
LOR + HP β CD NG	23,20	46,40	23,25
LOR + HP β CD LAG	23,21	46,47	23,21

Koncentracije loratadina su izračunate na temelju očitanih površina i apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma te se odredilo koliko je povećanje topljivosti loratadina u prisutnosti raznih ciklodekstrina i pri različitim načinima mljevenja.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje poboljšanja topljivosti

Iz podataka dobivenih pri ispitivanju topljivosti konstruirani su dijagrami prema Higuchiju i Connorsu za svaki ciklodekstrin u određenom otapalu. Većina dobivenih dijagrama okarakterizirana je kao tip A, koji predstavlja linearno povećanje topljivosti loratadina, dok je samo jedan okarakteriziran kao tip B. Svi prikazani rezultati odnose se na vrijednosti dobivene 72 h od pripreme uzorka, kada je uočeno da je došlo do uspostavljanja ravnoteže te to vrijedi za svaki ciklodekstrin bez obzira na korišteno otapalo.

Konstante stabilnosti za pojedini ciklodekstrin u određenom otapalu određene su prema formuli (2):

$$K_{1:1} = \frac{\text{nagib}}{S_0(1 - \text{nagib})} \quad (2)$$

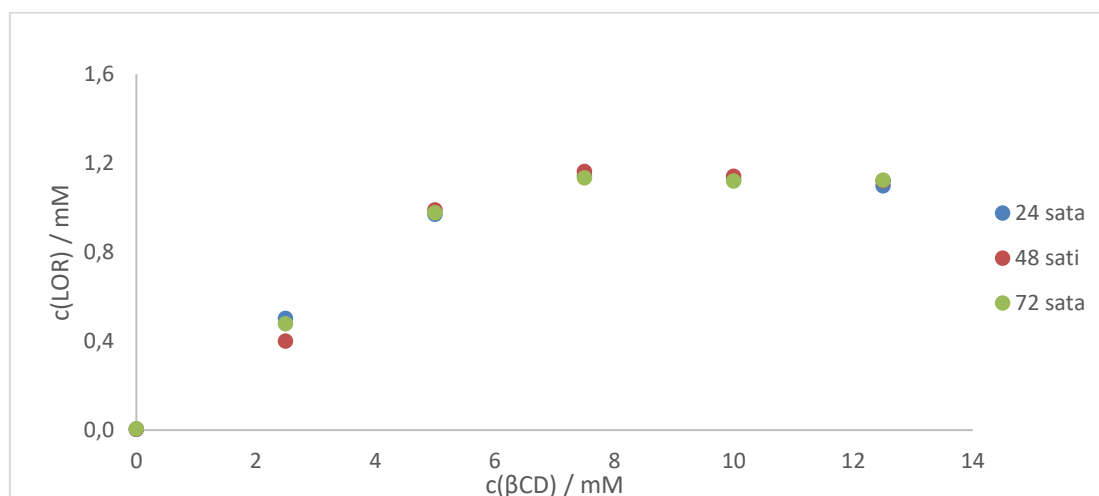
a učinkovitost kompleksiranja za svaki ciklodekstrin u određenom otapalu izračunata je prema formuli (3):

$$CE = \frac{\text{nagib}}{(1 - \text{nagib})} \quad (3)$$

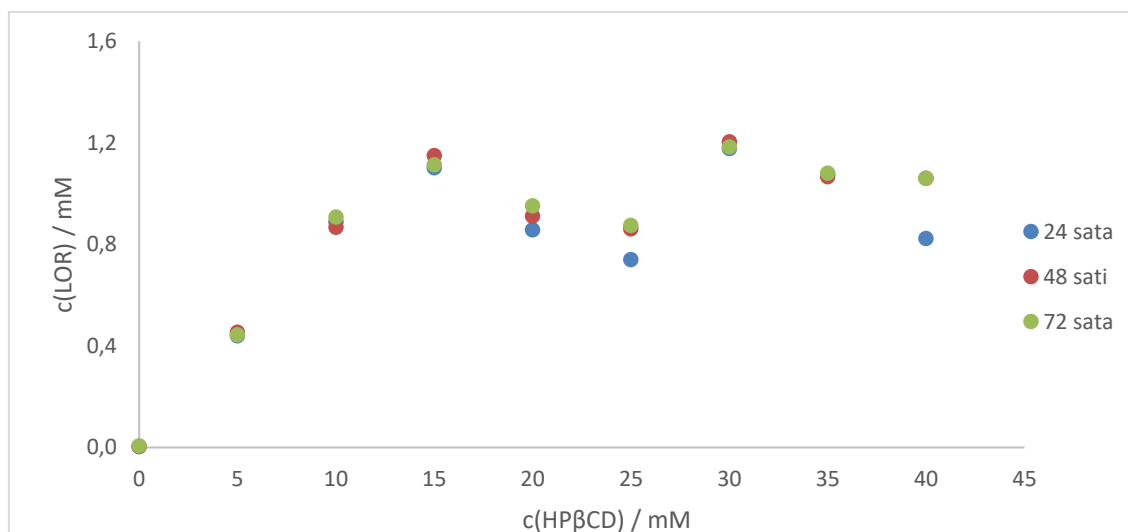
4.1.1. Ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u vodi

Provedena su ispitivanja topljivosti loratadina sa β -CD i HP β CD u vodi. Na slikama 12 i 13 prikazani su dijagrami topljivosti. Linearna ovisnost poboljšanja topljivosti loratadina o koncentraciji ciklodekstrina uočena je u koncentracijskom rasponu $0\text{--}5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (β -CD), odnosno $0\text{--}15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (HP β CD). Nakon toga se uočava smanjenje porasta krivulje, odnosno pojava platoa na dijagramu, budući da je loratadin dodan u nedovoljnom suvišku, te je pri koncentraciji ciklodekstrina $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, odnosno $15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sav otopljen. U prisutnosti HP β CD nakon početnog rasta krivulje, dolazi do pada koncentracije LOR u području koncentracije HP β CD $15\text{--}25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, te ponovnog rasta u području $25\text{--}30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ i pojave platoa u području $30\text{--}45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Područja pada mogu se objasniti nastankom netopljivog kompleksa pri čemu dolazi do taloženja loratadina i

smanjenja koncentracije u otopini, nakon čega ponovno nastaje topljivi kompleks pri čemu koncentracija loratadina u otopini ponovno raste. Ovakav trend nastanka topljivog i netopljivog kompleksa je karakterističan za krivulje tipa B, međutim kako bi se to sa sigurnošću moglo utvrditi, potrebno je ponoviti eksperimente s većim suviškom loratadina. Dijagram topljivosti loratadina u prisutnosti β -CD može se okarakterizirati kao dijagram tipa A, iako je također potrebno potvrditi ponavljanjem eksperimenta u većem suvišku loratadina. Za izračun konstante stabilnosti i učinkovitosti kompleksiranja korišten je raspon koncentracija $0-5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ za sustav LOR/ β -CD, dok je za sustav LOR/HP β CD korišten raspon $0-15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, odnosno područje linearnog povećanja koncentracije otopljenog loratadina. Dobivene konstante stabilnosti iznose $4,34 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ za sustav LOR/ β -CD i $1,47 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ za sustav LOR/HP β CD. Uspoređujući dobivene rezultate možemo zaključiti kako je stabilniji kompleks loratadina i β -CD, budući da je dobivena veća konstanta stabilnosti. Također, određene su i učinkovitosti kompleksiranja za korištene ciklodekstrine. Za kompleks LOR/ β -CD učinkovitost kompleksiranja iznosi 0,241, dok za kompleks LOR/HP β CD iznosi 0,082. Na temelju učinkovitosti kompleksiranja također se može zaključiti da je stabilniji kompleks dobiven kompleksiranjem loratadina sa β -CD. Vrijednost S_{\max}/S_0 , gdje S_0 označava eksperimentalno dobivenu koncentraciju loratadina bez prisustva ciklodekstrina, a S_{\max} predstavlja koncentraciju loratadina pri najvećoj koncentraciji ciklodekstrina, prikazuje povećanje topljivosti loratadina. Za kompleks LOR/ β -CD S_{\max}/S_0 iznosi 202,28, dok za kompleks LOR/HP β CD S_{\max}/S_0 iznosi 190,89. Iz tih podataka se može zaključiti kako je topljivost loratadina bolja kada se loratadin nalazi u kompleksu sa β -CD u vodi u odnosu na kompleks loratadina sa HP β CD.



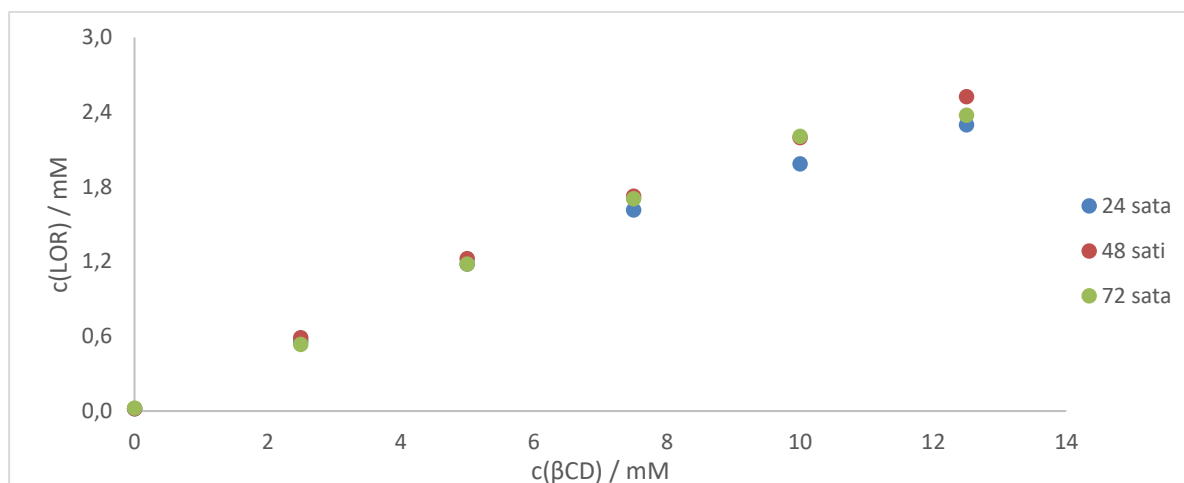
Slika 12. Ovisnost koncentracije loratadina o koncentraciji β -CD u vodi, mjereno 3 dana



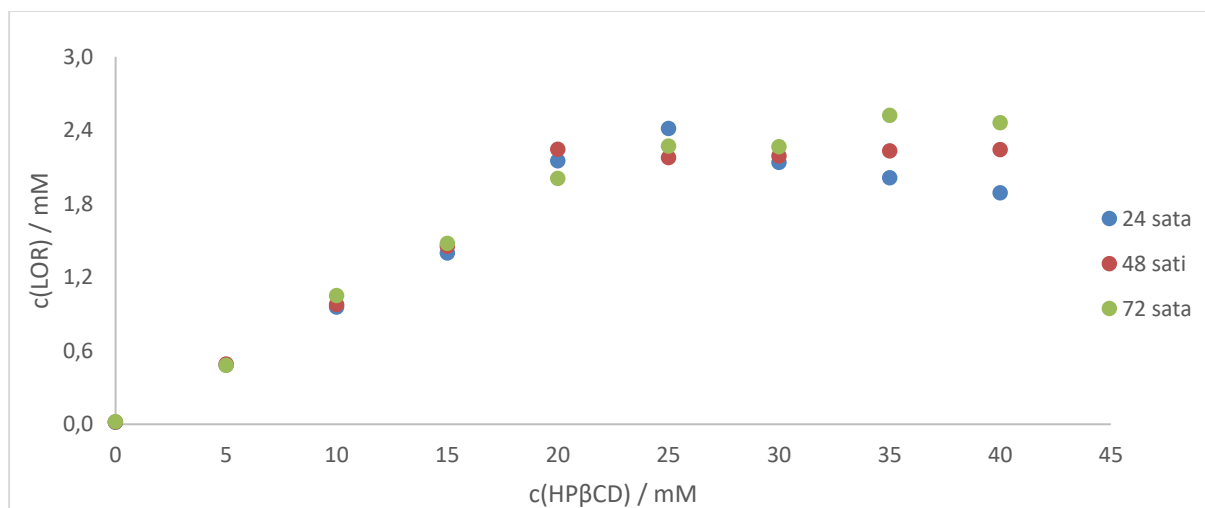
Slika 13. Ovisnost koncentracije loratadina o koncentraciji HPβCD u vodi, mjereno 3 dana

4.1.2. Ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u simuliranom duodenalnom mediju (pH 4,5)

Iz dijagrama topljivosti prikazanih na slikama 14 i 15 uočava se kako su dobiveni dijagrami okarakterizirani kao dijagrami tipa A prema modelu Higuchija i Connorsa, iako je ponovno uočena pojava platoa zbog nedovoljnog suviška loratadina u sustavu LOR/HPβCD. Za računanje konstante stabilnosti i učinkovitosti kompleksiranja uzeti su rasponi koncentracija CD gdje je uočeno linearno povećanje topljivosti loratadina, odnosno cijeli raspon koncentracija β-CD za sustav LOR/β-CD, te raspon 0–20 × 10⁻³ mol L⁻¹ za sustav LOR/HPβCD. Konstanta stabilnosti i učinkovitost kompleksiranja za kompleks LOR/β-CD iznosila je 1,08×10⁴ mol⁻¹ L, odnosno 0,246, dok su te vrijednosti za kompleks LOR/HPβCD iznosile 5,32×10³ mol⁻¹ L, odnosno 0,110. Na temelju konstante stabilnosti, kao i na temelju učinkovitosti kompleksiranja, može se zaključiti kako je stabilniji kompleks dobiven kompleksiranjem loratadina sa β-CD, što potvrđuje veća vrijednost konstante stabilnosti za taj kompleks. Za kompleks LOR/β-CD S_{\max}/S_0 , podatak koji prikazuje koliko se puta povećala topljivost loratadina, iznosi 104,31, dok za kompleks LOR/HPβCD S_{\max}/S_0 iznosi 118,62. Iz tih se podataka može zaključiti kako je topljivost loratadina bolja kada se loratadin nalazi u kompleksu sa HPβCD u simuliranom duodenalnom mediju (pH 4,5) u odnosu na kompleks loratadina sa β-CD u istom mediju.



Slika 14. Ovisnost koncentracije loratadina o koncentraciji β -CD u duodenalnom mediju (pH 4,5), mjereno 3 dana

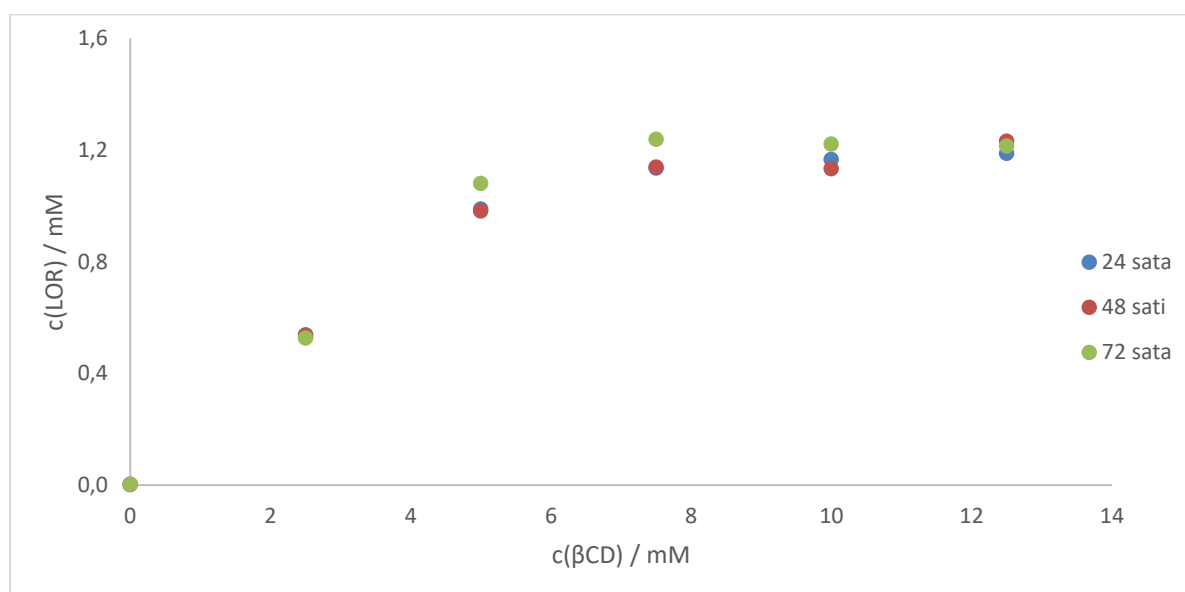


Slika 15. Ovisnost koncentracije loratadina o koncentraciji HP β CD u duodenalnom mediju (pH 4,5), mjereno 3 dana

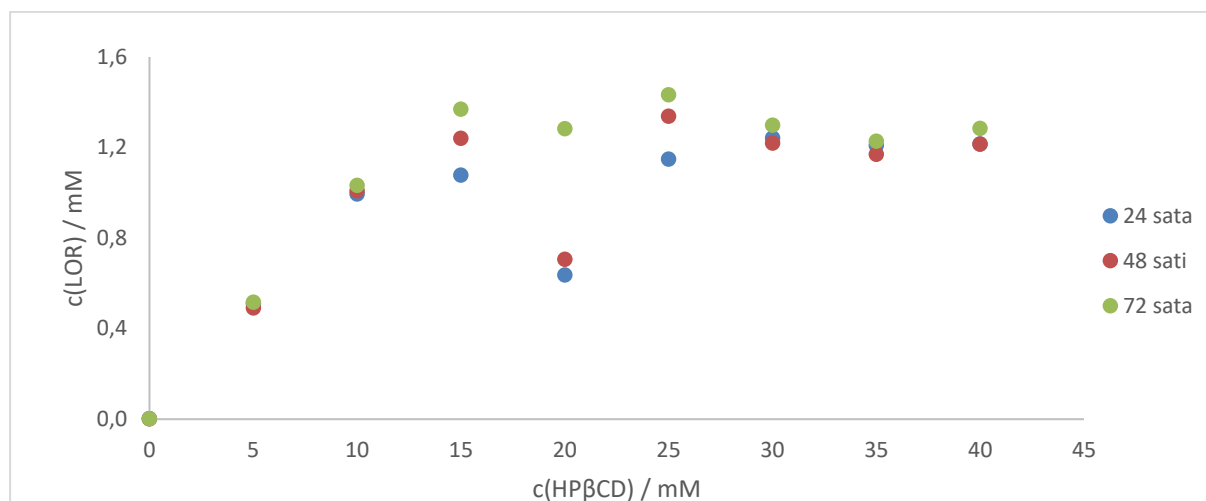
4.1.3. Ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8)

U ispitivanjima topljivosti loratadina u prisutnosti β -CD i HP β CD dobiveni su dijagrami topljivosti koji odgovaraju dijagramima tipa A (slika 16 i 17), iako su u oba slučaja uočeni platoi zbog potpunog otapanja loratadina. Za računanje konstante stabilnosti i učinkovitosti kompleksiranja kod kompleksa LOR/ β -CD korišten je raspon koncentracija β -CD gdje je uočeno linearno povećanje topljivosti loratadina, odnosno raspon koncentracija β -CD 0–5 \times

10^{-3} mol L⁻¹. Konstanta stabilnosti iznosi $8,15 \times 10^4$ mol⁻¹ L, a učinkovitost kompleksiranja iznosi 0,273. Za kompleks LOR/HP β CD korišten je raspon koncentracija HP β CD $0-15 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ u kojem je uočeno linearno povećanje topljivosti loratadina. Konstanta stabilnosti za taj kompleks u simuliranom intestinalnom mediju iznosi $3,02 \times 10^4$ mol⁻¹ L, a učinkovitost kompleksiranja je 0,102. Iz dobivenih podataka o konstantama stabilnosti i učinkovitosti kompleksiranja može se zaključiti kako je kompleks loratadina i β -CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) stabilniji u odnosu na kompleks loratadina sa HP β CD u istom mediju, što potvrđuju veće vrijednosti konstante stabilnosti i učinkovitosti kompleksiranja za taj kompleks. Vrijednost S_{\max}/S_0 , podatak koji pokazuje koliko se puta povećala topljivost loratadina, za kompleks LOR/ β -CD iznosi 361,57 dok za kompleks LOR/HP β CD iznosi 382,64. Na temelju tih podataka može se zaključiti kako je topljivost loratadina bolja kada se loratadin nalazi u kompleksu sa HP β CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) u odnosu na kompleks loratadina sa β -CD u istom mediju.



Slika 16. Ovisnost koncentracije loratadina o koncentraciji β -CD u intestinalnom mediju (pH 6,8), mjereno 3 dana



Slika 17. Ovisnost koncentracije loratadina o koncentraciji HPβCD u intestinalnom mediju (pH 6,8), mjereno 3 dana

U tablici 9 prikazane su izračunate konstante stabilnosti zajedno s eksperimentalno dobivenim S_0 i S_{max} gdje S_0 označava koncentraciju loratadina bez prisustva ciklodekstrina, a S_{max} koncentraciju loratadina pri najvećoj koncentraciji ciklodekstrina. Prikazani podaci odnose se na podatke dobivene 72 h nakon pripreme uzoraka kada je utvrđeno da je došlo do uspostavljanja ravnoteže.

Tablica 9. Konstante stabilnosti i učinkovitost kompleksiranja loratadina s β-CD i HPβCD.

	β-CD			HPβCD		
	Voda	Duodenalni medij (pH 4,5)	Intestinalni medij (pH 6,8)	Voda	Duodenalni medij (pH 4,5)	Intestinalni medij (pH 6,8)
S_0/mM^*	0,0056	0,0228	0,0034	0,0056	0,0207	0,0034
S_{max}/mM	1,1235	2,3757	1,2139	1,0603	2,4607	1,2847
S_{max}/S_0	202,28	104,31	361,57	190,89	118,62	382,64
$K_{1:1}/\text{M}^{-1}$	$4,34 \times 10^4$	$1,08 \times 10^4$	$8,15 \times 10^4$	$1,47 \times 10^4$	$5,32 \times 10^3$	$3,02 \times 10^4$
CE	0,241	0,246	0,273	0,082	0,110	0,102

*M = mol L⁻¹

Proučavajući rezultate prikazane u tablici 9 može se zaključiti kako je topljivost loratadina poboljšana sa svakim ciklodekstrinom neovisno o mediju u kojem se nalazi. Ipak, najveće povećanje topljivosti loratadina, koje se dobiva iz omjera koncentracije loratadina u uzorku s najvišom koncentracijom ciklodekstrina i intrinzične topljivosti loratadina (S_{\max}/S_0), vidljivo je kod kompleksa loratadina s HP β CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) gdje je uočeno povećanje topljivosti loratadina u iznosu od oko 380 puta.

Intrinzična topljivost LOR, odnosno S_0 , određena je jednom, osim u slučaju uzoraka pripremljenih u simuliranom duodenalnom mediju, gdje je određena dva puta, u setu mjerenja sa svakim od ciklodekstrina. Dobivene vrijednosti intrinzične topljivosti u simuliranom duodenalnom mediju ($0,0228 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ i $0,0207 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) se međusobno razlikuju, što može biti posljedica pripreme i razrjeđivanja uzoraka za analizu. Također se može uočiti da je topljivost loratadina različita ovisno o pH medija, te je vrijednost S_0 najveća u simuliranom duodenalnom mediju, a najmanja u simuliranom intestinalnom mediju. Ovi podaci odgovaraju teorijskoj pozadini topljivosti loratadina, čija topljivost raste kako se smanjuje pH otopine, odnosno loratadin postaje iznimno slabo topljiv povećanjem pH, zbog toga što je loratadin slaba dušikova baza koja je pri nižim vrijednostima pH protonirana i samim time bolje topljiva u vodi.¹

Dobivene konstante stabilnosti za komplekse loratadina ukazuju kako su nastali stabilni kompleksi s oba ciklodekstrina, iako se može zaključiti da β -CD tvori stabilnije komplekse. Stabilnosti kompleksa loratadina sa β -CD i HP β CD opadaju u nizu $\text{pH}_{6,8} > \text{pH}_{\text{voda}} > \text{pH}_{4,5}$. Može se uočiti da konstanta stabilnosti raste kako raste pH otopine. Dakle, povećanje konstante stabilnosti, kako se smanjuje topljivost loratadina, ukazuje na utjecaj hidrofobnog karaktera loratadina (pri višim vrijednostima pH) na poboljšano stvaranje inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima.²⁴

Budući da se S_0 koristi u izračunu konstante stabilnosti, razlike u dobivenim vrijednostima S_0 ukazuju da konstanta stabilnosti nije relevantan podatak o stabilnosti dobivenih kompleksa pa je bolje koristiti podatke o učinkovitosti kompleksiranja koji ne uključuju vrijednosti S_0 . Pri računanju učinkovitosti kompleksiranja koriste se podaci o nagibu dobivenog baždarnog pravca te se iz toga dobivaju informacije o stabilnosti kompleksa koje su vjerodostojnije. U ovom slučaju, ako usporedimo dobivene konstante stabilnosti s odgovarajućim vrijednostima učinkovitosti kompleksiranja, uočavamo slaganje rezultata konstante stabilnosti i dobivene vrijednosti učinkovitosti kompleksiranja. Obje

vrijednosti potvrđuju kako je najstabilniji kompleks dobiven kompleksiranjem loratadina s β -CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) te vrijednost konstante stabilnosti za taj kompleks iznosi $8,15 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, a vrijednost učinkovitosti kompleksiranja iznosi 0,273. Najniža vrijednost učinkovitosti kompleksiranja dobivena je za kompleks LOR/HP β CD u vodi te iznosi 0,082, dok konstanta stabilnosti za taj kompleks iznosi $1,47 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.

Uspoređujući rezultate ovog rada s rezultatima prethodnih istraživanja mogu se uočiti određene razlike. Konstanta stabilnosti kompleksa LOR/ β -CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) dobivena u ovom radu iznosi $8,15 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, dok u radu Omara i suradnika iz 2007. g. konstanta stabilnosti u fosfatnom puferu (pH 7,0) iznosi $1,14 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.²⁴ U svom radu iz 2012. g., Lin i suradnici su odredili konstantu stabilnosti kompleksa LOR/ β -CD u vodi koja je iznosila $2,17 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, a Singh i suradnici su za isti sustav prijavili sličnu vrijednost konstante koja je iznosila $2,13 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.^{26,29} Obje vrijednosti se razlikuju od vrijednosti dobivene u ovom radu ($4,34 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

Konstanta stabilnosti kompleksa LOR/HP β CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) u ovom radu iznosi $3,02 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, a u radu Omara i suradnika konstanta stabilnosti u fosfatnom puferu (pH 7,0) iznosila je $5,56 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.²⁴ Konstanta stabilnosti kompleksa LOR/HP β CD u vodi iznosila je $2,22 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ u radu Lin. i sur. iz 2010. g., što je relativno slično konstanti dobivenoj u ovom radu ($1,47 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

Razlike u konstantama mogu se pripisati različitim vrijednostima S_0 , koje najviše utječu na vrijednost konstante stabilnosti te različitim eksperimentalnim uvjetima kao što su tehnike pripreme uzorka i korištenje drugačijih otapala, primjerice fosfatni pufer pH vrijednosti 7,0 korišten u radu Omar i sur. se malo razlikuje u vrijednosti pH od fosfatnog pufera korištenog u ovom radu.²⁴ Također, vrijednosti prijavljene u literaturi predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja, dok su u ovom radu mjerenja izvedena samo jednom. Kako bi se dobili točniji rezultati, ispitivanja bi bilo potrebno provesti još dva puta. U tablici 10 su navedene konstante stabilnosti kompleksa LOR/ β -CD i LOR/HP β CD u vodi, simuliranom duodenalnom i intestinalnom mediju dobivene u ovom radu, te konstante stabilnosti istih kompleksa koje su dobivene u prethodnim istraživanjima.

Tablica 10. Vrijednosti konstanti stabilnosti iz različitih literaturnih izvora.

	Medij	$K_{1:1}$ ($\text{mol}^{-1} \text{L}$)	
		β -CD	HP β CD
Ovaj rad	voda	$4,34 \times 10^4$	$1,47 \times 10^4$
	simulirani duodenalni medij (pH 4,5)	$1,08 \times 10^4$	$5,32 \times 10^3$
	simulirani intestinalni medij (pH 6,8)	$8,15 \times 10^4$	$3,02 \times 10^4$
Omar i sur. ²⁴ (2007)	fosfatni pufer (pH 7,0)	$1,14 \times 10^5$	$5,56 \times 10^4$
Lin i sur. ³ (2010)	voda (pH 5,6)	-	$2,22 \times 10^4$
Lin i sur. ²⁶ (2012)	voda	$2,17 \times 10^4$	$2,22 \times 10^4$
Singh i sur. ²⁹ (2012)	voda	$2,13 \times 10^4$	-

4.2. Karakterizacija kompleksa u čvrstom stanju

Za karakterizaciju kompleksa u čvrstom stanju koristile su se spektroskopske tehnike FTIR i ATR. Kako bi se utvrdilo utječe li proces mljevenja na izgled IR spektara, snimljeni su FTIR spektri pojedinih komponenti obrađenih u mlinu (M) i u tarioniku (PM).

Usporedbom spektara LOR M i LOR PM, utvrđene su male, zanemarive razlike u položajima nekih vrpca. Primjerice, vrpca pri 1644 cm^{-1} u spektru uzorka LOR M pomaknuta je na 1643 cm^{-1} u spektru uzorka LOR PM. Spektri loratadina pripremljenog u mlinu i miješanjem u tarioniku te tablica asigniranih vrpca iz navedenih spektara su prikazani u dodatku (slika D1 i tablica D1).

Male promjene su također uočene usporedbom FTIR spektara β -CD M i β -CD PM kao i HP β CD M i HP β CD PM. U uzorku β -CD M uočena je vrpca pri 2929 cm^{-1} koja odgovara istezanju C–H veze, dok se ista vrpca u uzorku β -CD PM opaža pri 2925 cm^{-1} . Isto tako pomak se uočava i kod vrpce pri 1643 cm^{-1} što odgovara vibraciji deformacije OH skupine,

koja se u uzorku β -CD PM nalazi pri 1641 cm^{-1} . U uzorku HP β CD M vrpca koja odgovara vibraciji deformacije OH skupine nalazi se pri 1650 cm^{-1} , u uzorku HP β CD PM pri 1646 cm^{-1} (slika D2 te tablica D2).

Što se tiče ATR spektara, osim uzoraka iz mlina i onih iz tarionika, uspoređivali su se i uzorci loratadina, β -ciklodekstrina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina bez obrade u mlinu ili tarioniku. Također su uočene male promjene u položajima nekih vrpca (slike D5 i D6 i tablice D3 i D4).

Na temelju ovih spektara može se zaključiti kako mljevenje ne utječe znatno na izgled IR spektara loratadina i ciklodekstrina. Male promjene u položajima vrpca koje su uočene mogu se pripisati načinu obrade uzorka, budući da uzorci iz mlina, u usporedbi s fizičkim mješavinama iz tarionika, primaju više mehaničke energije u mlinu što dovodi do malih promjena u strukturi koje se onda očituju u malim pomacima položaja vrpca.

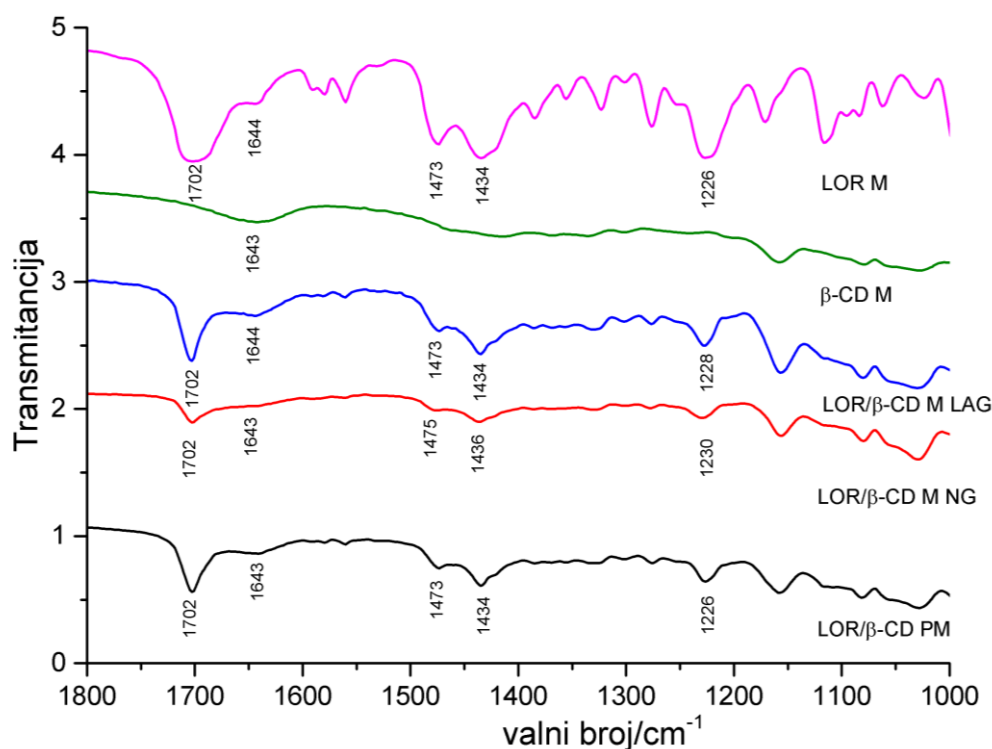
4.2.1. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina snimljeni FTIR tehnikom

Na slici 18 prikazani su spektri β -CD i LOR pripremljenih u mlinu (M) te smjese LOR i β -CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu sa (LAG) i bez dodatka male količine otapala (NG). Najveće promjene u spektru uočene su u području valnih brojeva $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, te je stoga samo to područje prikazano na slici, a u dodatku na slici D3 je prikazan cijeli spektar. Usporedbom spektra loratadina sa spektrima smjese loratadina i β -ciklodekstrina uočene su promjene u položajima i intenzitetima nekih vrpca. Može se uočiti da su sve vrpce znatno nižih intenziteta u spektrima smjese LOR/ β -CD, neovisno o načinu pripreme, iako su razlike u intenzitetima najveće u uzorku LOR/ β -CD pripremljenog suhim mljevenjem. Također, vrpca pri 1702 cm^{-1} je u spektru LOR M veoma široka, dok je u spektrima smjese LOR/ β -CD znatno uža, neovisno o načinu pripreme smjese. Vrpca koja odgovara istezanju C=N veze pri 1644 cm^{-1} u uzorku LOR M, pomaknuta je na 1643 cm^{-1} u spektrima LOR/ β -CD PM i LOR/ β -CD LAG, dok za LOR/ β -CD NG pomak nije uočen. Međutim, budući da je u spektru samog β -CD uočena široka vrpca pri 1643 cm^{-1} , ove male promjene u položaju vrpca mogu potjecati od preklapanja s vrpcom koja potječe od ciklodekstrina. Također, vrpce koje odgovaraju C=C istezanju pri 1473 cm^{-1} i 1434 cm^{-1} pomaknute su na 1475 cm^{-1} i 1436 cm^{-1} u uzorku smjese LOR/ β -CD NG. Najveće promjene uočene su kod vrpce pri 1226 cm^{-1} , koja odgovara istezanju esterske C–O veze, koja se u uzorku LOR/ β -CD NG i LOR/ β -CD LAG pojavljuje pri 1230 cm^{-1} , odnosno 1228 cm^{-1} .

Pomicanje karakterističnih vrpca loratadina u smjesi s β -CD u odnosu na sam spoj ukazuje na nastajanje, ili barem djelomično nastajanje, kompleksa između loratadina i β -CD. U tablici 11 prikazane su asignacije vrpca od interesa LOR, β -CD te smjese LOR/ β -CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu, sa (LAG) i bez (NG) malog dodatka etanola.

Tablica 11. Vrpce od interesa LOR, β -CD te smjese LOR/ β -CD pripremljene u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

Valni broj / cm^{-1}					Asignacija
LOR M	β -CD M	LOR/ β -CD			
		PM	NG	LAG	
1702	-	1702	1702	1702	ν C=O
1644	-	1643	1643	1644	ν C=N
-	1643	-	-	-	δ O-H
1473	-	1473	1475	1473	ν C=C
1434	-	1434	1436	1434	ν C=C
1323	-	1329	1329	1329	δ_{al} C-H
1226	-	1226	1230	1228	ν C-O



Slika 18. FTIR spektri LOR, β -CD, i smjese LOR/ β -CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

4.2.2. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina snimljeni FTIR tehnikom

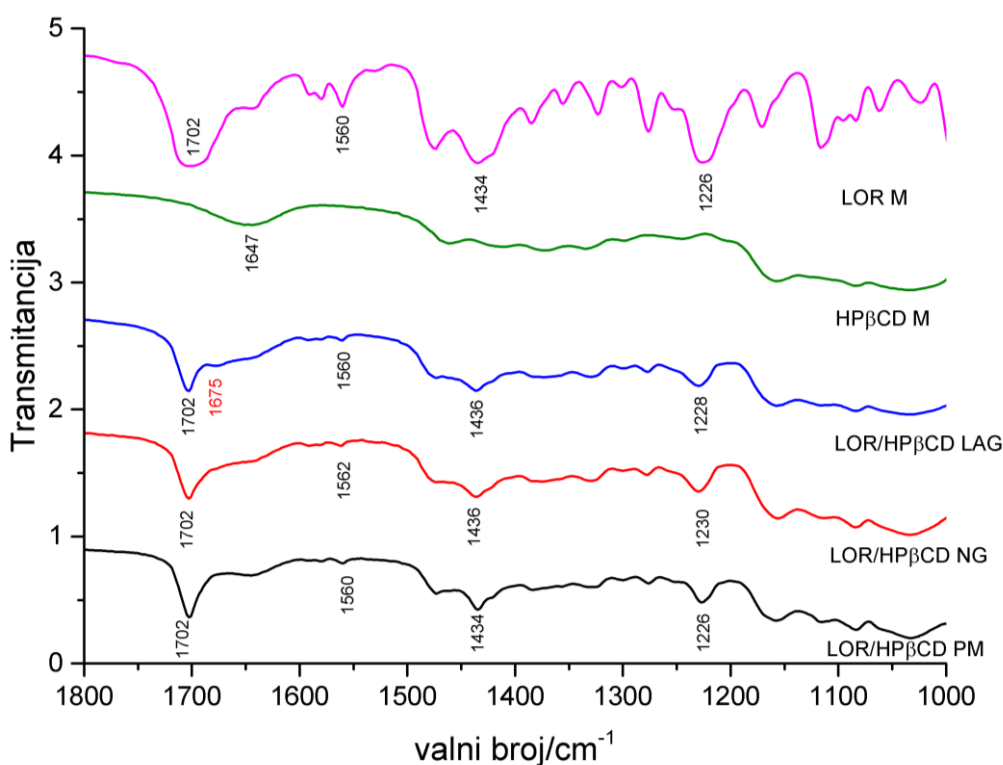
Na slici 19 prikazani su spektri HP β CD i LOR pripremljenih u mlinu (M) te smjese LOR i HP β CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu sa (LAG) i bez dodatka male količine otapala (NG). Prikazano je samo područje valnih brojeva 1800–1000 cm^{-1} budući da se u tom području nalaze vrpce od interesa, a cijeli spektar je prikazan u dodatku (Slika D4). Može se uočiti kako ne dolazi do promjene u položaju vrpce pri 1702 cm^{-1} koja odgovara istezanju C=O esterske veze, iako je ta vrpca mnogo uža u spektrima smjese LOR/HP β CD. Međutim, u spektru smjese LOR/HP β CD LAG uočena je pojava nove vrpce pri 1675 cm^{-1} . Također, intenziteti svih vrpce su znatno nižeg intenziteta u smjesi LOR/HP β CD u usporedbi sa samim LOR, neovisno o načinu pripreme smjese. Nadalje, uočen je pomak vrpce istezanja C=C veze benzenskog prstena s 1560 cm^{-1} u spektru uzorka LOR M na 1562 cm^{-1} u spektru uzorka LOR/HP β CD NG. Također je uočen pomak vrpce pri 1434 cm^{-1} na 1436 cm^{-1} u spektrima uzoraka LOR/HP β CD LAG i LOR/HP β CD NG. Još jedna vrpca koja nam može ukazivati na barem djelomičan nastanak kompleksa je ona pri 1226 cm^{-1} koja odgovara C–O

istežanju esterske veze, koja se u spektru uzorka LOR/HP β CD LAG nalazi pri 1228 cm⁻¹, u spektru LOR/HP β CD NG pri 1230 cm⁻¹, dok u spektru LOR/HP β CD PM ostaje nepromijenjena.

I u ovom se slučaju može zaključiti kako su pomaci karakterističnih vrpce posljedica barem djelomičnog nastanka kompleksa između loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Dodatna potvrda nastanka kompleksa je nastanak nove vrpce pri 1675 cm⁻¹ u spektru smjese LOR i HP β CD pripremljene mljevenjem uz mali dodatak etanola. U tablici 12 prikazane su asignacije vrpce od interesa LOR, HP β CD te smjese LOR/HP β CD pripremljenih miješanjem u tarioniku i u mlinu, sa (LAG) i bez (NG) malog dodatka etanola.

Tablica 12. Vrpce od interesa LOR, HP β CD te smjese LOR/HP β CD pripremljene u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

Valni broj / cm ⁻¹					Asignacija
LOR M	HP β CD M	LOR/HP β CD			
		PM	NG	LAG	
1702	-	1702	1702	1702	ν C=O
-	-	-	-	1675	ν C=O
1644	-	1641	1643	1643	ν C=N
-	1647	-	-	-	δ O-H
1560	-	1560	1562	1560	ν C=C
1434	-	1434	1436	1436	ν C=C
1323	-	1329	1329	1329	δ_{al} C-H
1226	-	1226	1230	1228	ν C-O



Slika 19. FTIR spektri LOR, HP β CD, i smjese LOR/HP β CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

4.2.3. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina snimljeni ATR tehnikom

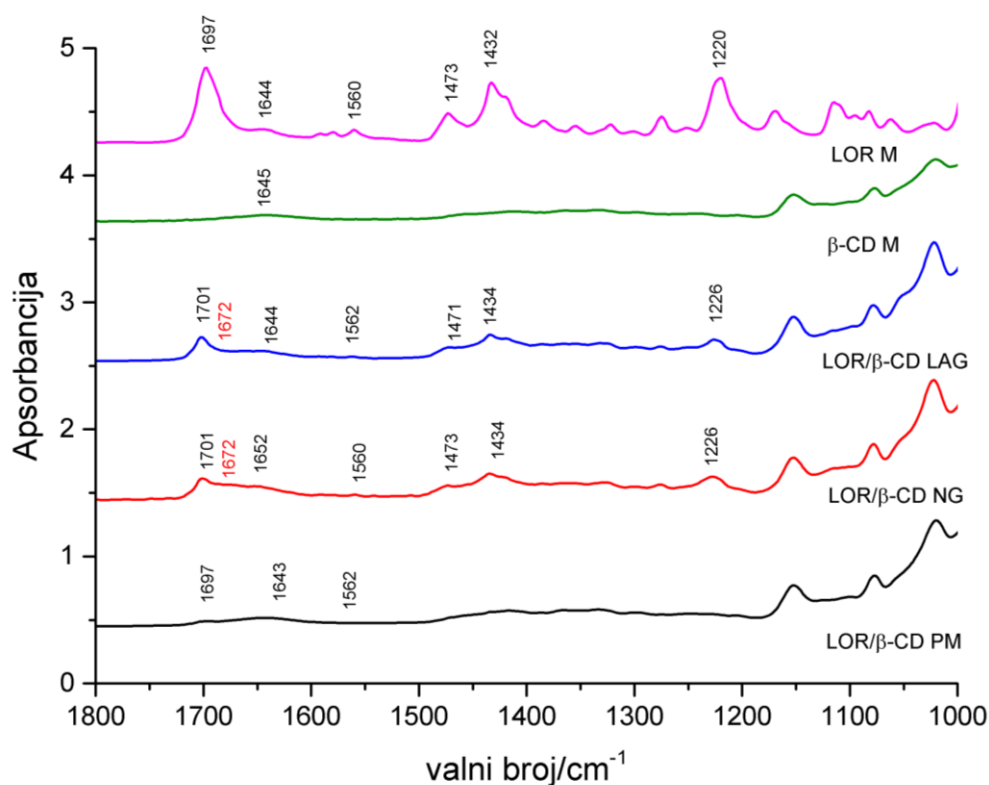
Slika 20 prikazuje ATR spektre loratadina i β -CD pripremljenih mljevenjem te smjese LOR/ β -CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu sa (LAG) i bez dodatka male količine etanola (NG). Prikazano je samo područje 1800–1000 cm^{-1} , a cijeli spektar je prikazan na slici D7 u dodatku. Usporedbom spektara može se vidjeti da su intenziteti svih vrpce znatno niži u svim spektrima smjese LOR/ β -CD nego u spektrima samog loratadina. Nadalje, uočeni su pomaci nekih vrpce u spektrima smjese LOR/ β -CD. Primjerice, vrpca C=O istezanja esterske veze u spektru LOR M pri 1697 cm^{-1} pomaknuta je na 1701 cm^{-1} u spektrima LOR/ β -CD NG i LOR/ β -CD LAG. Također je uočena pojava nove vrpce pri 1672 cm^{-1} u spektrima uzoraka LOR/ β -CD NG i LOR/ β -CD LAG. Vrpca kod koje se opaža pomak u spektrima LOR/ β -CD NG i LOR/ β -CD PM je ona pri 1644 cm^{-1} , koja odgovara istezanju C=N veze, koja se u navedenim spektrima nalazi pri 1652 cm^{-1} , odnosno pri 1643 cm^{-1} . Za vrpce koje odgovaraju istezanju C=C veza benzenskog prstena (1560 cm^{-1} , 1473 cm^{-1} , 1432 cm^{-1} u spektru uzorka LOR M) uočeni su različiti pomaci u spektrima uzoraka LOR/ β -CD

LAG (1562 cm^{-1} , 1471 cm^{-1} , 1434 cm^{-1}) i LOR/ β -CD NG (1560 cm^{-1} , 1473 cm^{-1} , 1434 cm^{-1}). U spektru uzorka LOR/ β -CD PM, zbog niskih intenziteta, jedino je uočljiva vrpca pri 1562 cm^{-1} dok je za ostale dvije vrpce nemoguće očitati vrijednosti. Promjene su se uočile i za vrpcu koja se pojavljuje pri 1220 cm^{-1} koja odgovara istezanju C–O esterske veze u spektru uzorka LOR M. Ta se vrpca u spektrima uzoraka LOR/ β -CD LAG i LOR/ β -CD NG pojavljuje pri 1226 cm^{-1} , dok je u spektru LOR/ β -CD PM tu vrpcu, zbog smanjenog intenziteta, nemoguće odrediti.

I ATR spektri, kao i FTIR spektri, daju naslutiti kako je došlo do nastanka kompleksa između loratadina i β -ciklodekstrina što nam potvrđuju različiti pomaci vrpce, odnosno pojava novih vrpca u spektru. Niski intenziteti vrpce u spektru uzorka LOR/ β -CD PM mogli bi ukazivati na nedovoljnu homogenizaciju uzorka, budući da su vrpce karakteristične za LOR veoma niskog intenziteta, dok su vrpce karakteristične za β -CD znatno izraženije. U tablici 13 prikazane su asignacije vrpce od interesa LOR, β -CD te smjese LOR/ β -CD pripremljenih miješanjem u tarioniku i u mlinu, sa (LAG) i bez (NG) malog dodatka etanola.

Tablica 13. Vrpce od interesa LOR, β -CD te smjese LOR/ β -CD pripremljene u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

Valni broj / cm^{-1}					Asignacija
LOR M	β -CD M	LOR/ β -CD			
		LAG	NG	PM	
1697	-	1701	1701	1697	ν C=O
-	-	1672	1672	-	ν C=O
1644	-	1644	1652	1643	ν C=N
-	1645	-	-	-	δ O–H
1560	-	1562	1560	1562	ν C=C
1473	-	1471	1473	-	ν C=C
1432	-	1434	1434	-	ν C=C
1220	-	1226	1226	-	ν C–O



Slika 20. ATR spektri LOR, β -CD i smjese LOR/ β -CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

4.2.4. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina snimljeni ATR tehnikom

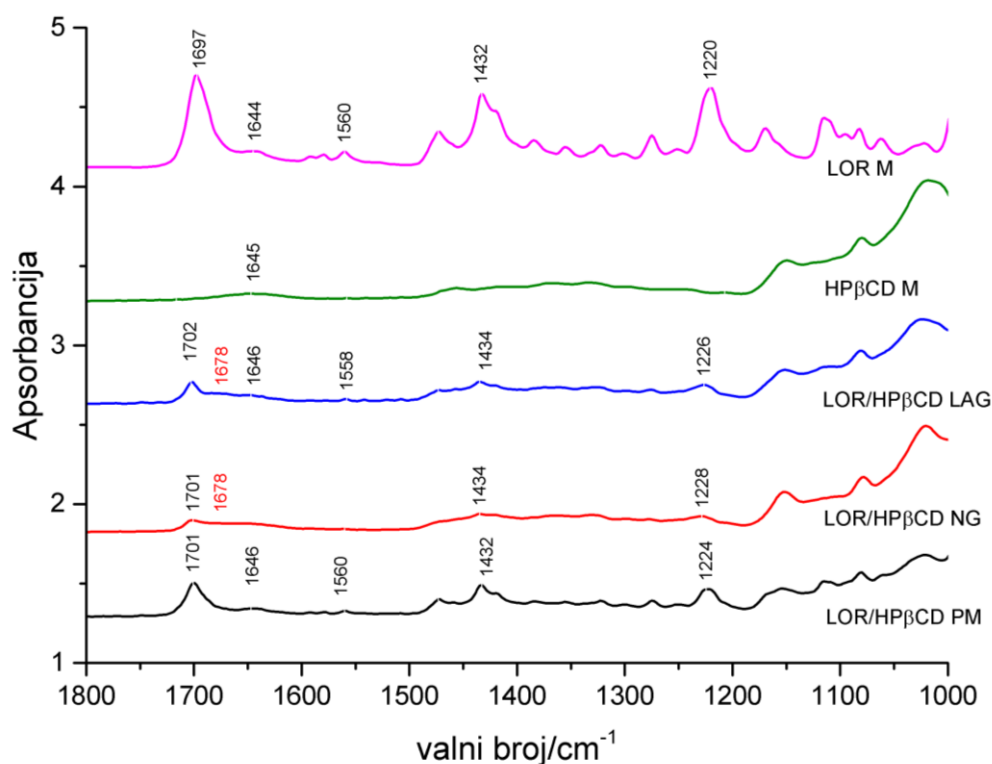
Na slici 21 prikazani su ATR spektri LOR i HP β CD pripremljenih mljevenjem te spektri smjese LOR/HP β CD pripremljeni miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine otapala (LAG). Prikazano je samo područje 1800–1000 cm^{-1} , a cijeli spektar je prikazan na slici D8 u dodatku. Može se uočiti da su intenziteti svih vrpce znatno niži u svim uzorcima smjese LOR/HP β CD. Nadalje, vidljiv je pomak vrpce istezanja C=O esterske veze s 1697 cm^{-1} u spektru uzorka LOR M na 1701 cm^{-1} (LOR/HP β CD NG i LOR/HP β CD PM), odnosno 1702 cm^{-1} (LOR/HP β CD LAG). Uočena je i pojava nove vrpce pri 1678 cm^{-1} u uzorku smjese LOR/HP β CD dobivene mljevenjem uz dodatak etanola (LAG) i bez dodatka etanola (NG). Vrpca kod koje se opaža pomak u spektrima uzoraka LOR/HP β CD LAG i LOR/HP β CD PM je ona pri 1644 cm^{-1} , koja odgovara istezanju C=N veze, te se u navedenim spektrima nalazi pri 1646 cm^{-1} , dok je u spektru uzorka LOR/HP β CD NG, zbog smanjenog intenziteta, nemoguće odrediti položaj te vrpce. Za vrpce istezanja C=C veza benzenskog prstena (1560 cm^{-1} , 1473 cm^{-1} , 1432 cm^{-1} u uzorku LOR M) uočeni su

različiti pomaci u spektru uzorka LOR/HP β CD LAG (1558 cm⁻¹, 1473 cm⁻¹, 1434 cm⁻¹), dok je u spektru uzorka LOR/HP β CD NG uočena samo vrpca pri 1434 cm⁻¹ budući da su druge dvije vrpce veoma niskog intenziteta. U spektru uzorka LOR/HP β CD PM nije došlo ni do kakvih promjena u pomacima tih vrpca. Promjene su se uočile i u položaju vrpce C–O istezanja esterske veze pri 1220 cm⁻¹ u spektru uzorka LOR M. Ta se vrpca u spektrima uzoraka LOR/HP β CD LAG i LOR/HP β CD NG pojavljuje pri 1226 cm⁻¹, odnosno pri 1228 cm⁻¹, dok se u spektru uzorka LOR/HP β CD PM ta vrpca nalazi pri 1224 cm⁻¹.

I ATR spektri, kao i FTIR spektri, daju naslutiti kako je došlo do nastanka kompleksa između loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina što nam potvrđuju različiti pomaci vrpca. U tablici 14 prikazane su asignacije vrpca od interesa LOR, HP β CD te smjese LOR/HP β CD pripremljenih miješanjem u tarioniku i u mlinu, sa (LAG) i bez (NG) malog dodatka etanola.

Tablica 14. Vrpce od interesa LOR, HP β CD te smjese LOR/HP β CD pripremljene u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

Valni broj / cm ⁻¹					Asignacija
LOR M	HP β CD M	LOR/HP β CD			
		LAG	NG	PM	
1697	-	1702	1701	1701	ν C=O
-	-	1678	1678	-	ν C=O
1644	-	1646	-	1646	ν C=N
-	1645	-	-	-	δ O–H
1560	-	1558	-	1560	ν C=C
1432	-	1434	1434	1432	ν C=C
1321	-	1329	1324	1322	δ_{al} C–H
1220	-	1226	1228	1224	ν C–O



Slika 21. ATR spektri LOR, HP β CD i smjese LOR/HP β CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG).

Na temelju ATR i FTIR spektara može se zaključiti kako je metodom mljevenja moguće pripremiti inkluzijski kompleks loratadina i odabranih ciklodekstrina. Usporedbom ATR i FTIR spektara čistih spojeva i spektara pripremljenih kompleksa uočeni su pomaci nekih karakterističnih vrpca loratadina kada se nalazi u kompleksu s β -CD i HP β CD u odnosu na spektar čistog loratadina. Osim toga, uočena je i pojava nove vrpce u spektrima uzoraka obrađenih u mlinu, što je u skladu s rezultatima prijavljenim u radovima Lina i suradnika.^{3,26} U ovom radu nove se vrpce pojavljuju pri 1672 cm^{-1} (ATR spektri LOR/ β -CD LAG i LOR/ β -CD NG), 1675 cm^{-1} (FTIR spektar LOR/HP β CD LAG) i 1678 cm^{-1} (ATR spektri LOR/HP β CD LAG i LOR/HP β CD NG), dok se u radu Lina i suradnika iz 2010. godine ta vrpca pojavljuje pri 1676 cm^{-1} u uzorcima LOR/HP β CD u pripremljenih u molarnim omjerima 1:1 i 1:2 i obrađenih u mlinu 15 minuta. U radu Lina i suradnika iz 2012. godine pojava nove vrpce uočena je pri 1680 cm^{-1} i 1678 cm^{-1} u uzorcima LOR/ β -CD i LOR/HP β CD pripremljenih u molarnim omjerima 1:1 i obrađenih u mlinu 15 minuta. Pojava te nove vrpce u spektru najviše, od svih drugih pomaka vrpca u spektru, ukazuje na nastajanje inkluzijskog kompleksa. Usporedbom suhog mljevenja (NG) i mljevenja uz dodatak otapala (LAG) ne

postoji nikakva značajna razlika pa možemo zaključiti kako su obje metode jednako efikasne kada je riječ o pripremi inkluzijskih kompleksa loratadina i odabranih ciklodekstrina.

4.3. Ispitivanje topljivosti kompleksa u čvrstom stanju

Provedeno je ispitivanje topljivosti smjese LOR/ β -CD i LOR/HP β CD pripremljenih mljevenjem u ekvimolarnom omjeru bez (NG) i s malim dodatkom etanola (LAG). Radi usporedbe, pripremljeni su i uzorci loratadina pripremljeni bez i s mljevenjem (M). Ispitivanja su provedena u tri medija, vodi te simuliranom duodenalnom i simuliranom intestinalnom mediju, a alikvoti su uzimani i analizirani 24, 48 i 72 sata nakon pripreme uzoraka, kako bi se utvrdilo vrijeme potrebno za uspostavljanje ravnoteže. Rezultati ispitivanja topljivosti kompleksa u čvrstom stanju prikazani su u tablicama 15, 16 i 17.

Tablica 15. Rezultati ispitivanja topljivosti loratadina u vodi u čvrstom stanju u prisutnosti ekvimolarne količine CD, 24, 48 i 72 h nakon pripreme otopina.

otapalo: voda	$\gamma(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$			S/S_0		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
LOR	0,92	1,08	1,73	1,0	1,0	1,0
LOR m	0,93	1,05	1,73	1,0	1,0	1,0
LOR/βCD NG	106,43	109,26	107,64	115,2	101,0	62,6
LOR/βCD LAG	110,86	116,74	119,23	120,0	107,9	69,3
LOR/HPβCD NG	52,66	55,51	50,53	57,0	51,3	29,4
LOR/HPβCD LAG	43,16	42,92	40,72	46,7	39,7	23,7

Tablica 16. Rezultati ispitivanja topljivosti loratadina u simuliranom duodenalnom mediju u čvrstom stanju u prisutnosti ekvimolarne količine CD, 24, 48 i 72 h nakon pripreme otopina.

otapalo: simulirani duodenalni medij (pH 4,5)	$\gamma(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$			S/S_0		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
LOR	6,12	6,04	7,87	1,0	1,0	1,0
LOR m	6,59	7,04	8,65	1,1	1,2	1,1
LOR/βCD NG	187,98	199,00	196,38	30,7	33,0	25,0
LOR/βCD LAG	194,61	195,89	206,50	31,8	32,4	26,3
LOR/HPβCD NG	100,82	98,73	93,72	16,5	16,4	11,9
LOR/HPβCD LAG	89,35	95,06	90,83	14,6	15,7	11,5

Tablica 17. Rezultati ispitivanja topljivosti loratadina u simuliranom intestinalnom mediju u čvrstom stanju u prisutnosti ekvimolarne količine CD, 24, 48 i 72 h nakon pripreme otopina.

otapalo: simulirani intestinalni medij (pH 6,8)	$\gamma(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$			S/S_0		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
LOR	0,84	0,91	1,37	1,0	1,0	1,0
LOR m	0,92	0,91	1,33	1,1	1,0	1,0
LOR/βCD NG	114,41	114,07	118,63	135,8	125,3	86,5
LOR/βCD LAG	117,94	115,69	118,25	140,0	127,1	86,2
LOR/HPβCD NG	57,80	53,57	56,17	68,6	58,9	41,0
LOR/HPβCD LAG	54,74	52,65	53,85	65,0	57,9	39,3

Ustanovljeno je kako topljivost loratadina raste sa smanjenjem vrijednosti pH, budući da je loratadin slaba baza, te je pri nižim vrijednostima pH protoniran što ga čini bolje topljivim. Loratadin je najmanje topljiv u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8), gdje mu topljivost iznosi $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$, što se također slaže s teorijskom pozadinom.^{1,33}

U radu Khana i suradnika pokazano je kako se topljivost samog loratadina smanjuje porastom pH, pa tako topljivost LOR u bazičnom mediju (pH 6,5–7,5) iznosi $4\text{--}6 \mu\text{g mL}^{-1}$, u pH 1,2 topljivost iznosi $4,59 \text{ mg mL}^{-1}$, dok se topljivost rapidno smanjuje kako raste pH što potvrđuje podatak da je pri pH 2,5 topljivost loratadina iznosila $0,60 \text{ mg mL}^{-1}$.³³ U ovom radu za topljivost samog loratadina u vodi dobivena je vrijednost $1,73 \mu\text{g mL}^{-1}$, u simuliranom

duodenalnom mediju (pH 4,5) $7,87 \mu\text{g mL}^{-1}$, a u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) topljivost loratadina je iznosila $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$. Također je istražena i topljivost uzoraka loratadina pripremljenih u mlinu. Rezultati topljivosti takvih uzoraka bili su: $1,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ u vodi, $8,65 \mu\text{g mL}^{-1}$ u simuliranom duodenalnom mediju (pH 4,5) i $1,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8). Usporedbom rezultata topljivosti samog loratadina s rezultatima topljivosti loratadina obrađenog u mlinu može se uočiti kako neke vrijednosti variraju. Najuočljivija razlika opaža se za topljivost loratadina u simuliranom duodenalnom mediju. Očekivano je da dolazi do boljeg otapanja loratadina koji je obrađen u mlinu zbog povećane dodirne površine čestica loratadina i otapala, no razlike u topljivosti su neznatne u većini slučajeva. Razlog može biti taj što je loratadin u vodi i mediju pH 6,8 jako slabo topljiv, pa samo mljevenje neće imati neki veliki značaj na njegovu topljivost. S druge strane, topljivost loratadina u mediju pH 4,5 je bolja te se mljevenjem njegova topljivost značajnije povećava.

Proučavajući rezultate topljivosti loratadina u prisutnosti ciklodekstrina, također se može zaključiti da je loratadin u kompleksu s β -CD i HP β CD najtopljiviji u simuliranom duodenalnom mediju (pH 4,5), gdje topljivost, nakon 72 sata od pripreme uzorka, iznosi $196,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LOR/ β -CD NG), $206,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LOR/ β -CD LAG), $93,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LOR/HP β CD NG) i $90,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LOR/HP β CD LAG).

Uočljivo je kako najbolje rezultate poboljšanja topljivosti loratadina daje kompleks sa β -CD u svim ispitivanim otapalima. Isto tako može se zaključiti kako je malo veće poboljšanje topljivosti lijeka pokazao kompleks pripremljen mljevenjem uz dodatak etanola (LAG) za komplekse loratadina i β -CD. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim IR spektroskopijom, budući da je u spektru uzorka LOR/ β -CD LAG uočena izraženija nova vrpca pri 1672 cm^{-1} , karakteristična za nastanak inkluzijskog kompleksa. U slučaju kompleksa sa HP β CD, nema značajne razlike između metode suhog mljevenja (NG) i metode mljevenja uz dodatak otapala (LAG). Veoma male razlike koje su uočene mogu biti uzrokovane statističkom pogreškom. Međutim, kako bi se potvrdili rezultati, potrebno je provesti ispitivanja u svim medijima još barem dva puta.

Iz prikazanih rezultata lako se uočava kako se najbolje povećanje topljivosti loratadina opaža u kompleksu s β -CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8), obzirom na topljivost čistog loratadina u istom mediju. Iako je loratadin vrlo slabo topljiv u bazičnim medijima, kad se nalazi u kompleksu s β -CD ili HP β CD njegova topljivost značajno poraste.

Taj zaključak ima veliki značaj s obzirom da je poznato kako se, iako je najbolje topljiv u kiselom mediju, loratadin apsorbira iz intestinalnog dijela probavnog trakta. Tvoreći kompleks s β -CD ili HP β CD povećava se topljivost loratadina u intestinalnom mediju (pH 6,8) čime bi se povećala količina apsorbiranog lijeka, a samim time i njegova bioraspoloživost.¹

Rezultati dobiveni u ovom radu bitno se razlikuju od rezultata dobivenih u radu Pooje i suradnika. Pokazali su kako je topljivost loratadina, kad je u 1:2 kompleksu s HP β CD u vodi, iznosila 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$.²⁷ Razlog tolikom odstupanju od rezultata dobivenih u ovom radu može biti različit način pripreme kompleksa, ali i različit molarni omjer loratadina i ciklodekstrina u dobivenom kompleksu. U ovom radu je pripremljen kompleks molarnog omjera 1:1 metodom mljevenja, dok su u radu Pooje i suradnika pripremljeni kompleksi molarnih omjera 1:2 metodom gnječenja te metodom isparavanja.

Još jedan rad koji pokazuje kako se topljivost loratadina povećava kada se on nalazi u kompleksu s ciklodekstrinima je rad Singh i suradnika.²⁹ U tom istraživanju metodom gnječenja je pripremljen kompleks loratadina i β -CD molarnog omjera 1:1. Ispitane su topljivosti loratadina i dobivenog kompleksa u vodi koje su iznosile 4,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za loratadin i 395,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za kompleks. Dobivene vrijednosti su znatno veće od onih dobivenih u ovom radu, a vjerojatan razlog je različit način pripreme kompleksa te način izvođenja eksperimenta ispitivanja topljivosti, budući da je u radu Singh i suradnika provođen pri 37 °C, a u ovom radu je ispitivanje provođeno na sobnoj temperaturi.

Dobiveni rezultati ukazuju da metoda mehanokemijske aktivacije nije toliko efikasna za pripravu kompleksa loratadina i ciklodekstrina. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja u kojima bi se istražio utjecaj vremena mljevenja i različitih molarnih omjera loratadina i ciklodekstrina.

§ 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ispitivanja poboljšanja topljivosti loratadina određene su konstante stabilnosti kompleksa loratadina s odabranim ciklodekstrinima prema Higuchijevom i Connorsovom modelu. Dobiveni dijagrami topljivosti okarakterizirani su kao dijagrami tipa A s pojavom platoa, osim u slučaju sustava LOR/HP β CD u vodi koji odgovara dijagramu tipa B. Plato na dijagramima se pojavljuje jer je došlo do potpunog otapanja loratadina, stoga je potrebno ponoviti ispitivanja korištenjem većeg suviška loratadina. Na temelju dobivenih dijagrama moguće je uočiti linearno povećanje topljivosti loratadina s porastom koncentracije odabranih ciklodekstrina sve do pojave platoa na dijagramima. Osim konstanti stabilnosti, određene su i učinkovitosti kompleksiranja koje su, zbog neovisnosti o vrijednosti S_0 , puno bolji izbor za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa loratadina i ciklodekstrina. Dobivene konstante stabilnosti kompleksa LOR s β -CD 72 sata nakon pripreme uzoraka iznosile su $4,34 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (voda), $1,08 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (simulirani duodenalni medij, pH 4,5) i $8,15 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (simulirani intestinalni medij, pH 6,8). Za kompleks LOR/HP β CD 72 sata nakon pripreme uzoraka dobivene su vrijednosti konstanti $1,47 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (voda), $5,32 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (simulirani duodenalni medij, pH 4,5) i $3,02 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (simulirani intestinalni medij, pH 6,8). Iz navedenih vrijednosti konstanti stabilnosti može se zaključiti kako je LOR/ β -CD kompleks u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) najstabilniji. Iako se povećanje topljivosti loratadina uočava u svakom uzorku, neovisno o korištenom ciklodekstrinu ili otapalu, najveće povećanje topljivosti loratadina uočeno je kod kompleksa LOR/HP β CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8), gdje omjer S_{\max}/S_0 iznosi 382,64, što znači da HP β CD uzrokuje 380 puta veće povećanje topljivosti loratadina. Učinkovitosti kompleksiranja dobivene za komplekse LOR s β -CD 72 sata nakon pripreme uzoraka iznosile su 0,241 (voda), 0,246 (simulirani duodenalni medij, pH 4,5) i 0,273 (simulirani intestinalni medij, pH 6,8). Za komplekse LOR/HP β CD 72 sata nakon pripreme uzoraka dobivene su vrijednosti 0,082 (voda), 0,110 (simulirani duodenalni medij, pH 4,5) i 0,102 (simulirani intestinalni medij, pH 6,8). Međutim, kako bi se točnije odredili dobiveni rezultati i statistički odredila standardna devijacija potrebno je ispitivanja provesti još barem dva puta.

Priprema inkluzijskih kompleksa loratadina i β -ciklodekstrina, odnosno 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina mehanokemijskom aktivacijom u čvrstom stanju pokazala se

kao relativno učinkovita metoda. Spektri čistih spojeva i pripremljenih kompleksa dobiveni su korištenjem FTIR i ATR tehnika. Usporedbom spektara mogu se uočiti pomaci karakterističnih vrpca loratadina kada se on nalazi u kompleksu s odabranim ciklodekstrinima. Usporedbe radi, pripremljen je kompleks loratadina i odabranih ciklodekstrina miješanjem sastojaka u tarioniku. Ovisno u uvjetima mljevenja uzoraka, bilo suho mljevenje ili mljevenje uz dodatak otapala, uočeni su veći pomaci karakterističnih vrpca u odnosu na pomake vrpca u uzorku pripremljenom u tarioniku. To ukazuje na bolje nastajanje kompleksa u mlinu, dok do slabih interakcija između loratadina i ciklodekstrina dolazi i u fizičkoj mješavini tih spojeva. Najčvršći dokaz nastajanja inkluzijskog kompleksa je pojava novih vrpca u spektrima uzoraka pripremljenih mljevenjem koje se javljaju pri 1672 cm^{-1} u spektrima LOR/ β -CD LAG i LOR/ β -CD NG dobivenih ATR tehnikom, pri 1675 cm^{-1} u spektru LOR/HP β CD LAG dobivenog korištenjem FTIR tehnike te pri 1678 cm^{-1} u spektrima LOR/HP β CD LAG i LOR/HP β CD NG dobivenih korištenjem ATR tehnike. Značajne razlike između uzoraka kompleksa pripremljenih suhim mljevenjem i onih pripremljenih mljevenjem uz dodatak otapala nisu uočene, iako je u spektrima LOR/ β -CD LAG uočena malo intenzivnija vrpca karakteristična za nastajanje kompleksa. Na temelju toga možemo zaključiti kako su obje metode relativno jednako učinkovite za pripremu kompleksa loratadina s β -CD i HP β CD. ATR i FTIR tehnike pokazale su se kao korisne metode u kvalitativnoj analizi i karakterizaciji spojeva u čvrstom stanju, no potrebno je korištenje i drugih tehnika koje bi dodatno potvrdile nastanak inkluzijskih kompleksa, kao što su termogravimetrijska analiza (engl. *thermogravimetric analysis*, TGA), diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) i difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (engl. *X-ray powder diffraction*, XRPD).

Ispitivanjima topljivosti kompleksa loratadina s β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom u čvrstom stanju u vodi, simuliranom duodenalnom mediju (pH 4,5) i simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) pokazano je kako je topljivost čistog loratadina najveća pri pH 4,5 i iznosi $7,87\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, a najmanja pri pH 6,8 te iznosi $1,37\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Pokazano je kako se nastajanjem inkluzijskog kompleksa povećava topljivost loratadina. Veća su povećanja topljivosti loratadina uočena kod kompleksa s β -ciklodekstrinom u odnosu na komplekse s 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom u svim otapalima. Za komplekse LOR/ β -CD u svim otapalima uočena je nešto bolja topljivost kod kompleksa pripremljenih metodom mljevenja uz dodatak otapala, dok se kod kompleksa LOR/HP β CD ne može ustanoviti je li

bolja metoda mljevenja uz dodatak otapala ili metoda suhog mljevenja jer su dobiveni rezultati slični. Promatrajući rezultate možemo zaključiti kako je najveće poboljšanje topljivosti zamijećeno kod kompleksa LOR/ β -CD u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8), gdje vrijednost S/S_0 iznosi 86,5 što bi onda uz poboljšanje topljivosti loratadina osiguralo i njegovu bolju bioraspoloživost.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ATR – metoda prigušene totalne refleksije
BCS – Biofarmaceutski sustav klasifikacije
CD – ciklodekstrin
CE – učinkovitost kompleksiranja
DM β CD – dimetil- β -ciklodekstrin
DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija
ESI– ionizacija elektroraspršenjem
FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama
HBu β CD – hidroksibutil- β -ciklodekstrin
HP β CD – 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin
HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IR – infracrvena spektroskopija
LAG – mljevenje uz dodatak otapala
LOD – granica detekcije
LOQ – granica kvantifikacije
LOR – loratadin
Me β CD – metil- β -ciklodekstrin
MeOH – metanol
MS – spektrometrija mase
NG – suho mljevenje
NMR – nuklearna magnetska rezonanca
PM – fizička mješavina
RAMEB – nasumično metilirani β -ciklodekstrin
SBE β CD – sulfobutileter- β -ciklodekstrin
SCF – superkritični fluid
USFDA – američka agencija za hranu i lijekove
UV/Vis – ultraljubičasto/vidljivo

§ 7. LITERATURNI IZVORI

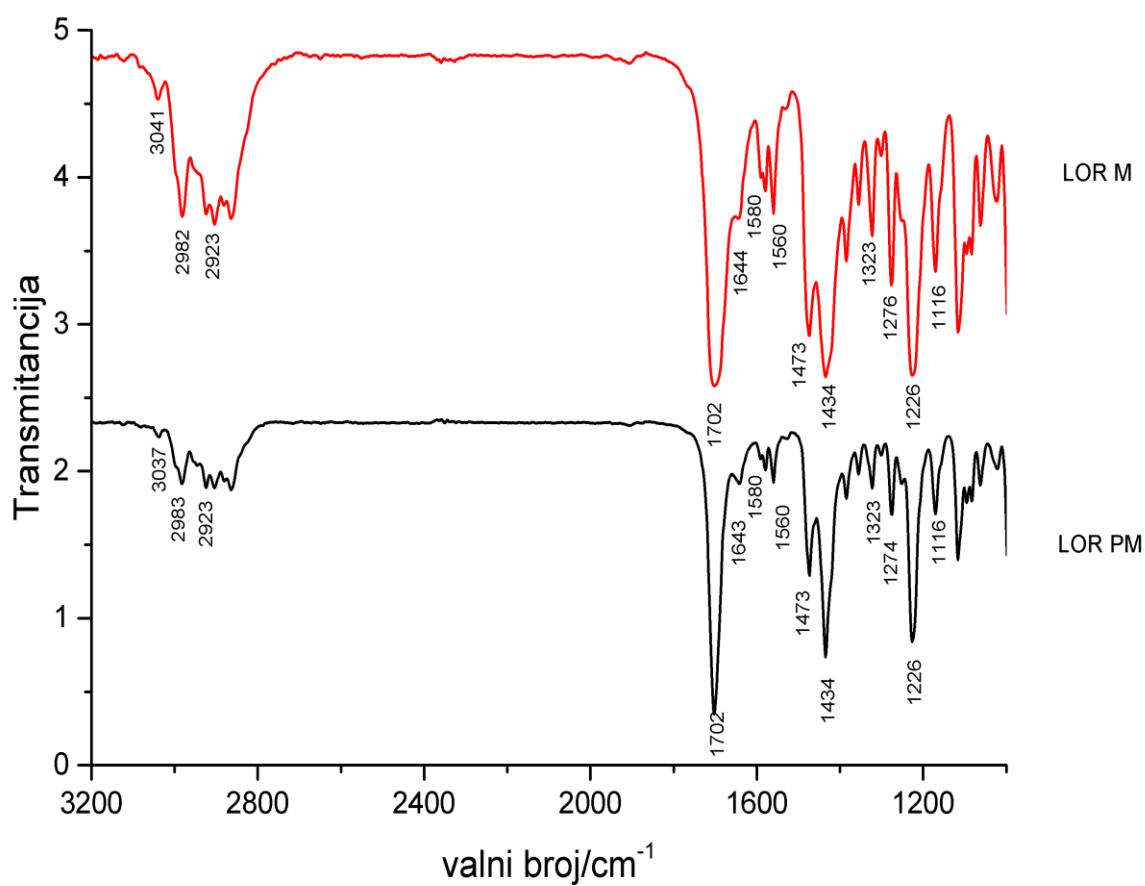
1. Á. Nacsá, O. Berkesi, P. Szabó-Révész, Z. Aigner, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **64** (2009) 249–254.
2. Á. Nacsá, R. Ambrus, O. Berkesi, P. Szabó-Révész, Z. Aigner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48** (2008) 1020–1023.
3. S. Y. Lin, C. H. Hsu, M. T. Sheu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 799–803.
4. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 1–10.
5. M. Jug, P. A. Mura, *Pharmaceutics* **10** (2018) 189–211.
6. L. X. Yu, G. L. Amidon, J. E. Polli, H. Zhao, M. U. Mehta, D. P. Conner, V. P. Shah, L. J. Lesko, M. L. Chen, V. H. L. Lee, A. S. Hussain, *Pharm. Res.* **19** (2002) 921–925.
7. M. Cugovčan, *Mehanokemijska priprava i karakterizacija polimernih disperzija i kokristala prazikvantela*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 12.
8. M. Yasir, M. Asif, A. Kumar, A. Aggarwal, *Int. J. PharmTech Res.* **2** (2010) 1681–1690.
9. J. N. Patel, D. M. Rathod, N. A. Patel, M. K. Modasiya, *Int. J. Pharm. Life Sci.* **3** (2012) 1459–1469.
10. A. Rogar, *Mogućnost povećanja topljivosti deksametazona primjenom neionskih površinski aktivnih tvari*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015., str. 13–14.
11. N. Pavlov, *Paediatr. Croat.*, **56** (2012) 128–134.
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Loratadine> (datum pristupa 3. studenog 2020.)
13. E. M. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
14. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607–1621.
15. S. Fourmentin, G. Crinl, E. Lichtfouse, *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*, Springer, Njemačka, 2018, str. 3–7.
16. J. C. Miranda, T. E. A. Martins, F. Veiga, H. G. Ferraz, *Braz. J. Pharm. Sci.* **47** (2011), 665–682.
17. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/I02998> (datum pristupa 01. listopada 2020.)

18. R. L. Carrier, L. A. Miller, I. Ahmed, *J. Controlled Release*. **123** (2007) 78–99.
19. T. Higuchi, K. A. Connors, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **4** (1964) 117–210.
20. T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **57** (2007) 545–552.
21. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 226–238.
22. <https://www.retsch.com/products/milling/ball-mills> (datum pristupa 24. rujna 2020.)
23. S. Miljanić, N. Galić, *Interna skripta Višeg praktikuma analitičke kemije 1*, Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb, 2019., str. 1–5.
24. L. Omar, M. I. El-Barghouthi, N. A. Masoud, A. A. Abdoh, M. M. Al Omari, M. B. Zughul, A. A. Badwan, *J. Solution Chem.* **36** (2007) 605–616.
25. Á. Szabados-Nacsa, P. Sipos, T. Martinek, I. Mándity, G. Blazsó, A. Balogh, P. Szabo-Révész, Z. Aigner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55** (2011) 294–300.
26. H. L. Lin, S. Y. Lin, C. C. Lin, C. H. Hsu, T. K. Wu, Y. T. Huang, *Carbohydr. Polym* **87** (2012) 512–517.
27. S. Pooja, B. Meenakshi, S. Shruti, *J. Pharm. Sci. Res.* **3** (2011) 1170–1175.
28. A. S. Pandya, S. Nayak, S. S. Kamath, D. M. Raulji, A. R. Shabaraya, *Am. J. PharmTech Res.* **3** (2013) 200–213.
29. R. M. P. Singh, A. Kumar, K. Pathak, *AAPS PharmSciTech* **14** (2013) 412–424.
30. P. E. Rivas-Granizo, L. Giorgetti, H. G. Ferraz, *Int. J. Photoenergy* **2015** (2015) 1–6.
31. 5.17.1. Recommendations on Dissolution Testing, European Pharmacopeia 9.0, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, 2017, 761–763.
32. M. Jug, *Ciklodekstrini u mukoadhezivnim mikročesticama lorazepam i risperidona*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 19.
33. M. Z. I. Khan, D. Raušl, R. Zanoški, S. Zidar, J. Horvat Mikulčić, L. Krizmanić, M. Eškinja, B. Mildner, Z. Knežević, *Biol. Pharm. Bull.* **27** (2004) 1630–1635.

§ 8. DODATAK

8.1. Spektri snimljeni FTIR tehnikom

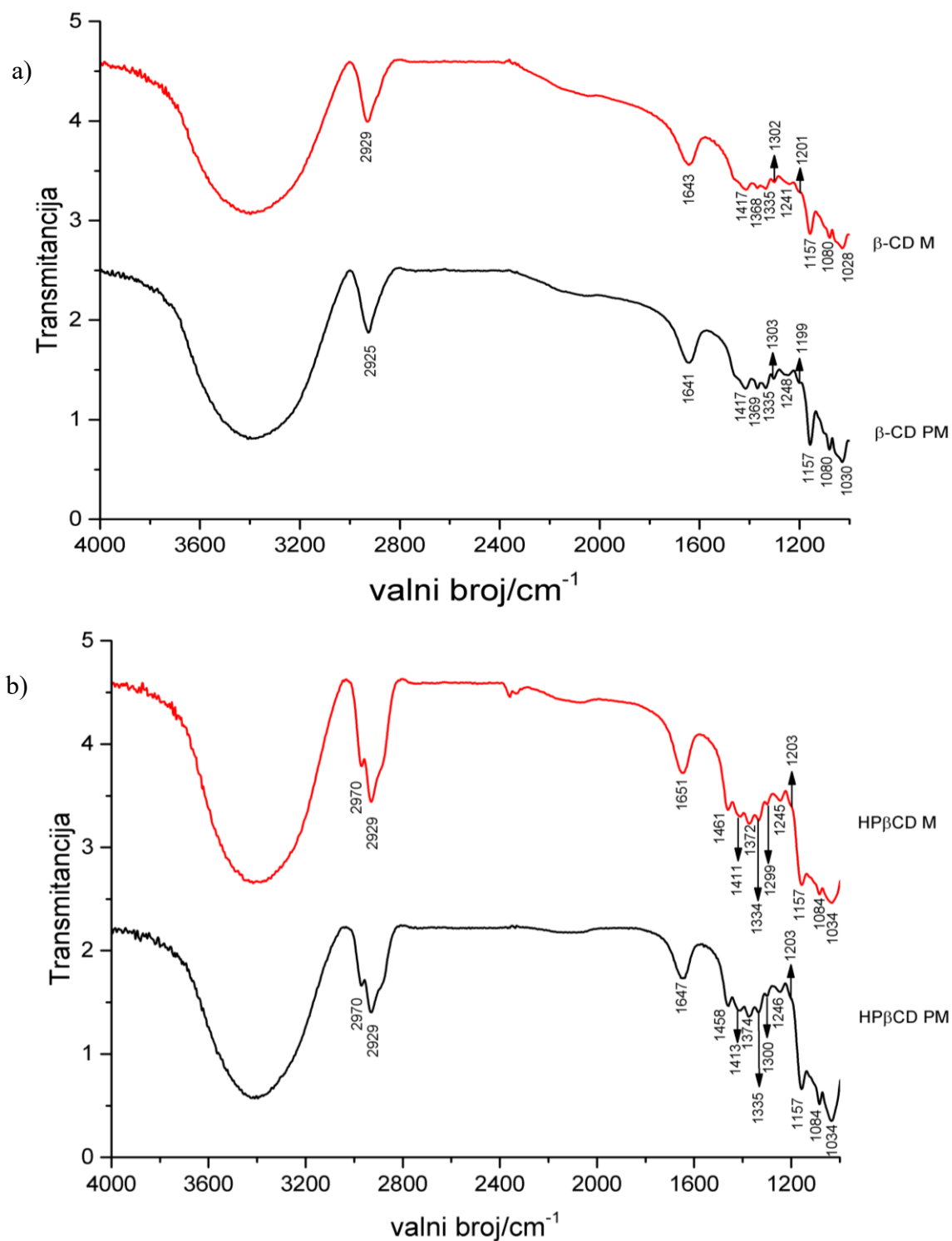
8.1.1. Loratadin



Slika D1. Transmisijski IR spektri LOR pripremljenog u mlinu (M) i miješanjem u tarioniku (PM).

Tablica D1. Asignacija vrpce LOR pripremljenog u mlinu (M) i miješanjem u tarioniku (PM).

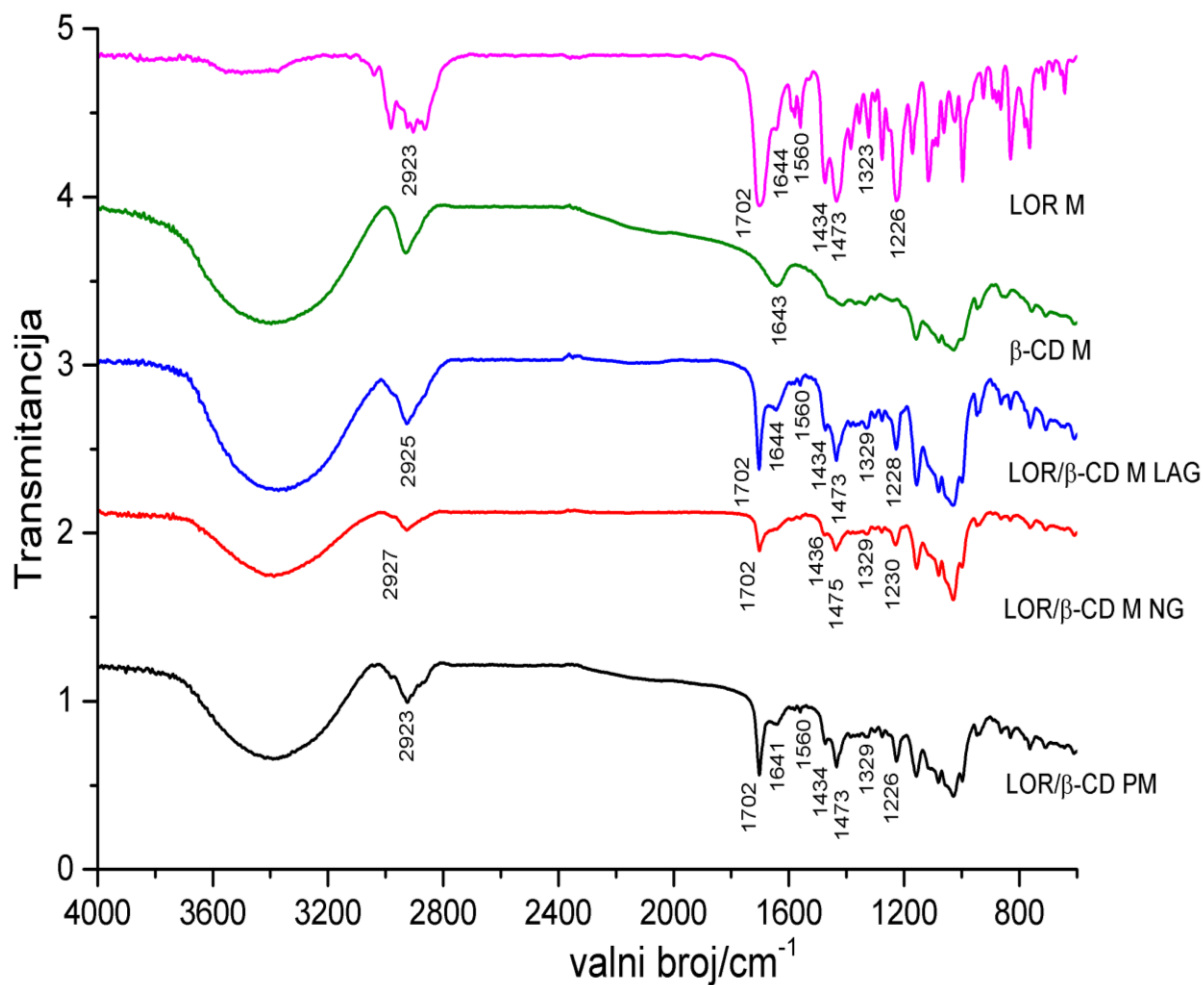
Valni broj / cm^{-1}		Asignacija
LOR M	LOR PM	
2982	2983	ν_{as} C–H
2923	2923	ν_{as} C–H
2881	2881	ν_{s} C–H
2864	2864	ν_{as} C–H
1702	1702	ν C=O
1644	1643	ν C=N
1580	1580	ν C=C
1560	1560	ν C=C
1473	1473	ν C=C
1434	1434	ν C=C
1323	1323	δ_{al} C–H
1276	1274	ν C–O
1226	1226	ν C–O
1116	1116	ν C–Cl

8.1.2. β -ciklodekstrin i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin

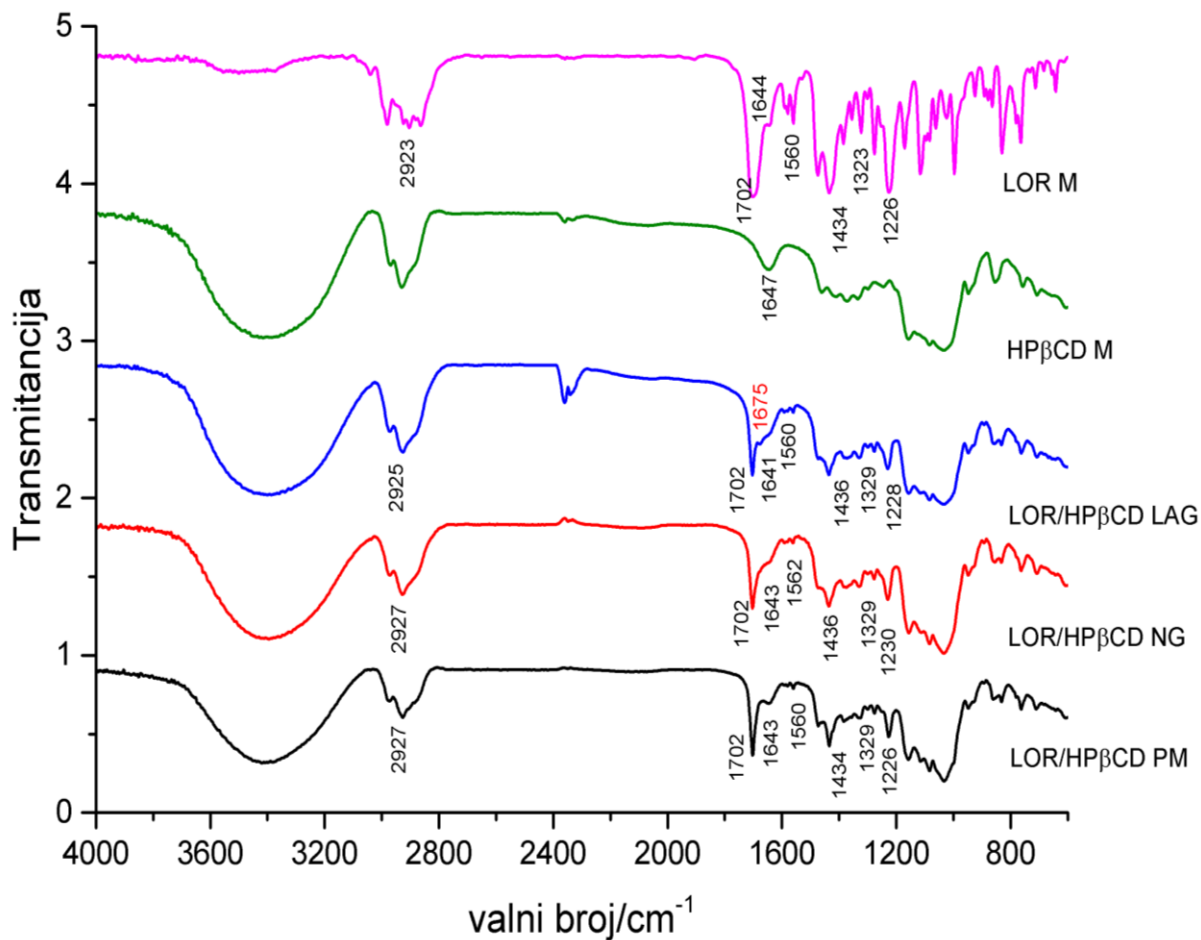
Slika D2. Transmisijski IR spektri β -CD (a) i HP β CD (b) pripremljenih u mlinu (M) i miješanjem u tarioniku (PM).

Tablica D2. Asignacija vrpca β -CD i HP β CD pripremljenih u mlinu (M) i miješanjem u tarioniku (PM).

Valni broj / cm^{-1}				Asignacija
β -CD M		HP β CD M		
M	PM	M	PM	
3395	3395	3404	3404	ν O–H
-	-	2970	2970	ν_{as} C–H
2929	2925	2929	2929	ν_{as} C–H
1643	1641	1651	1647	δ O–H
-	-	1461	1458	δ_{sc} CH ₂
1417	1417	1411	1413	δ O–H
1368	1369	1372	1374	δ_{s} CH ₃
1335	1335	1334	1335	δ_{s} CH ₂
1302	1303	1299	1300	δ_{tw} CH ₂
1241	1248	1245	1246	ν C–O
1201	1199	1203	1203	ν C–O
1157	1157	1157	1157	ν C–O–C
1080	1080	1084	1084	ν C–C + ν C–O
1028	1030	1034	1034	ν C–C + ν C–O

8.1.3. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina

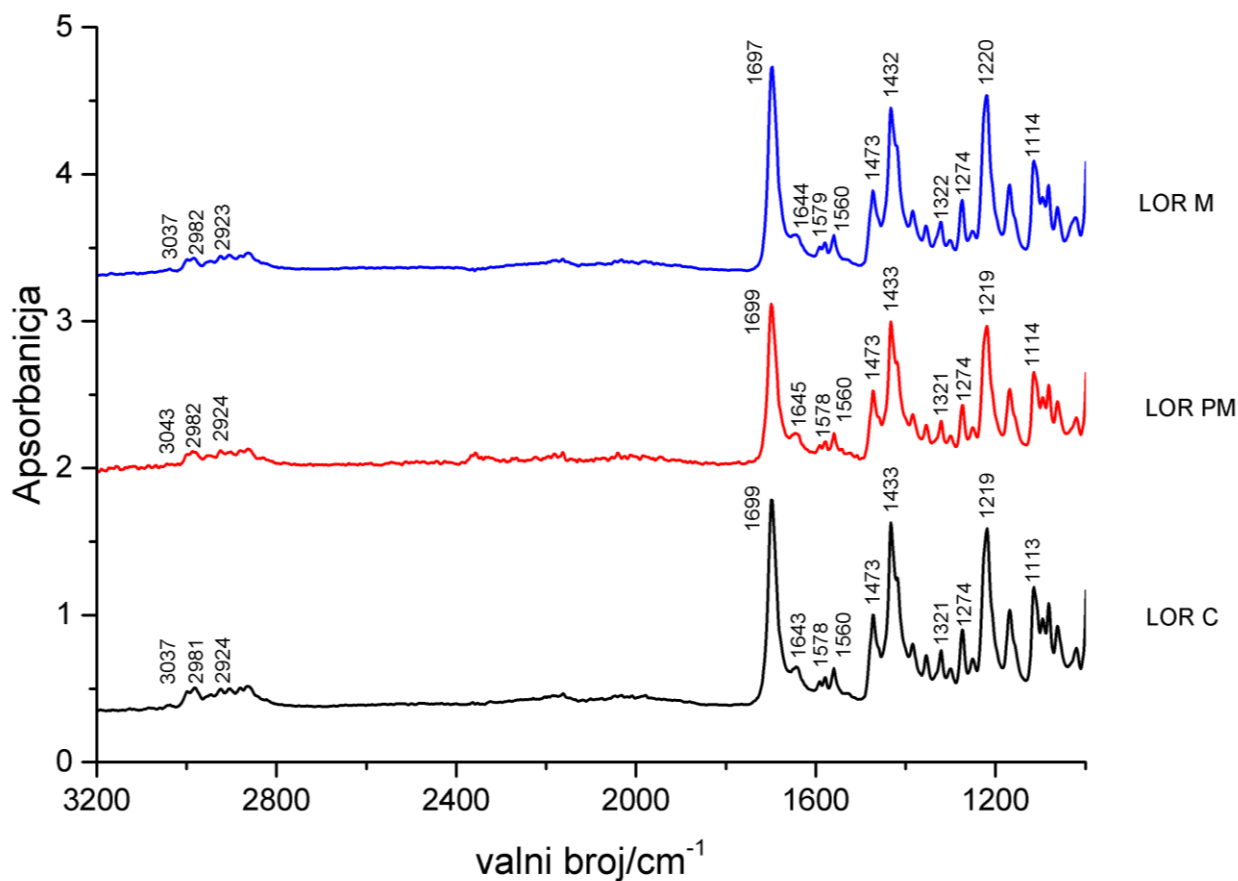
Slika D3. Transmisijski IR spektri LOR, β -CD, i smjese LOR/ β -CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG) u rasponu valnih brojeva 4000–600 cm⁻¹.

8.1.4. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina

Slika D4. Transmisijski IR spektri LOR, HP β CD, i smjese LOR/HP β CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG) u rasponu valnih brojeva 4000–600 cm⁻¹.

8.2. Spektri snimljeni ATR tehnikom

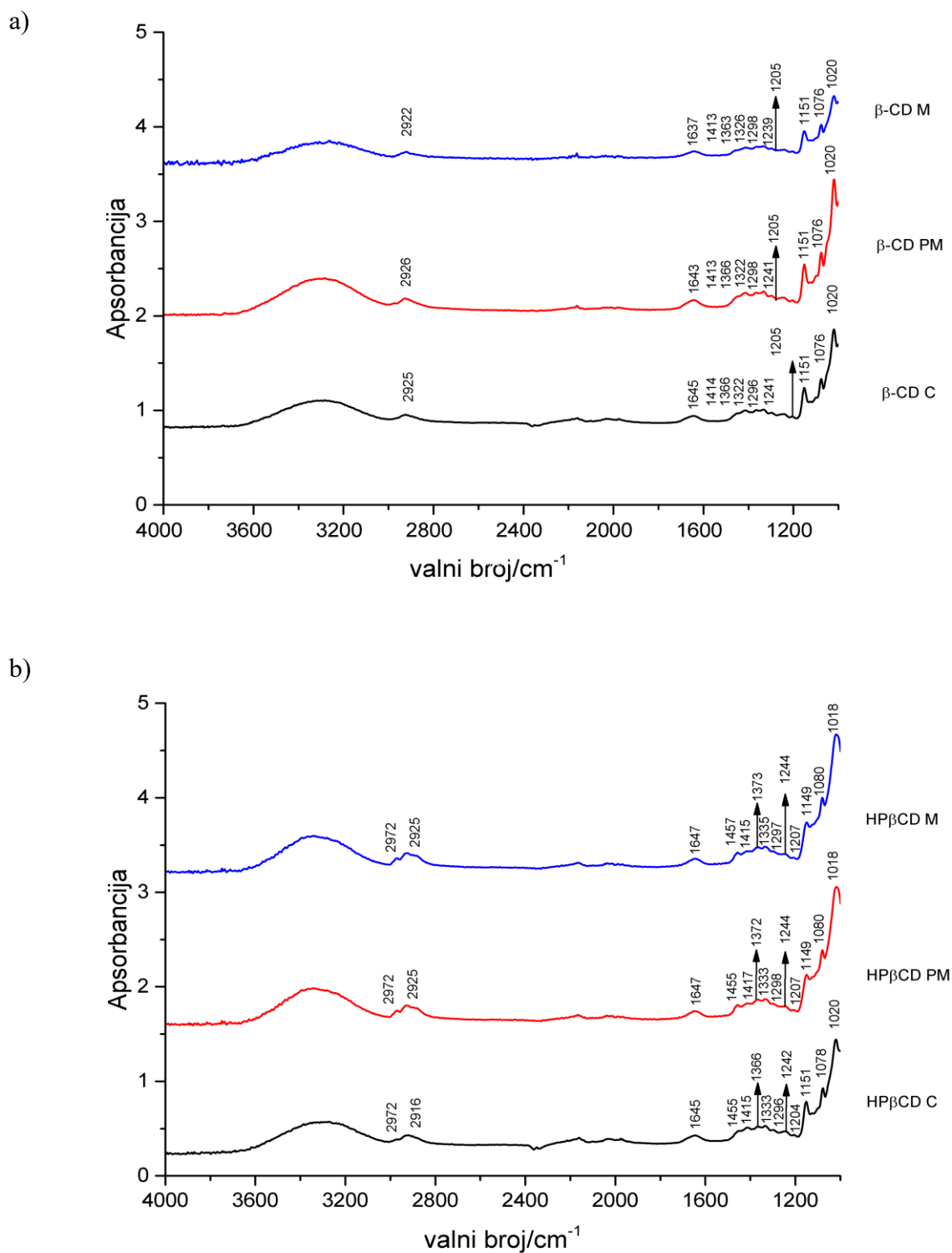
8.2.1. Loratadin



Slika D5. ATR spektri LOR pripremljenog u mlinu (M) i miješanjem u tarioniku (PM) te bez obrade (C).

Tablica D3. Asignacija vrpce LOR pripremljenih u mlinu (M), miješanjem u tarioniku (PM) te bez obrade (C).

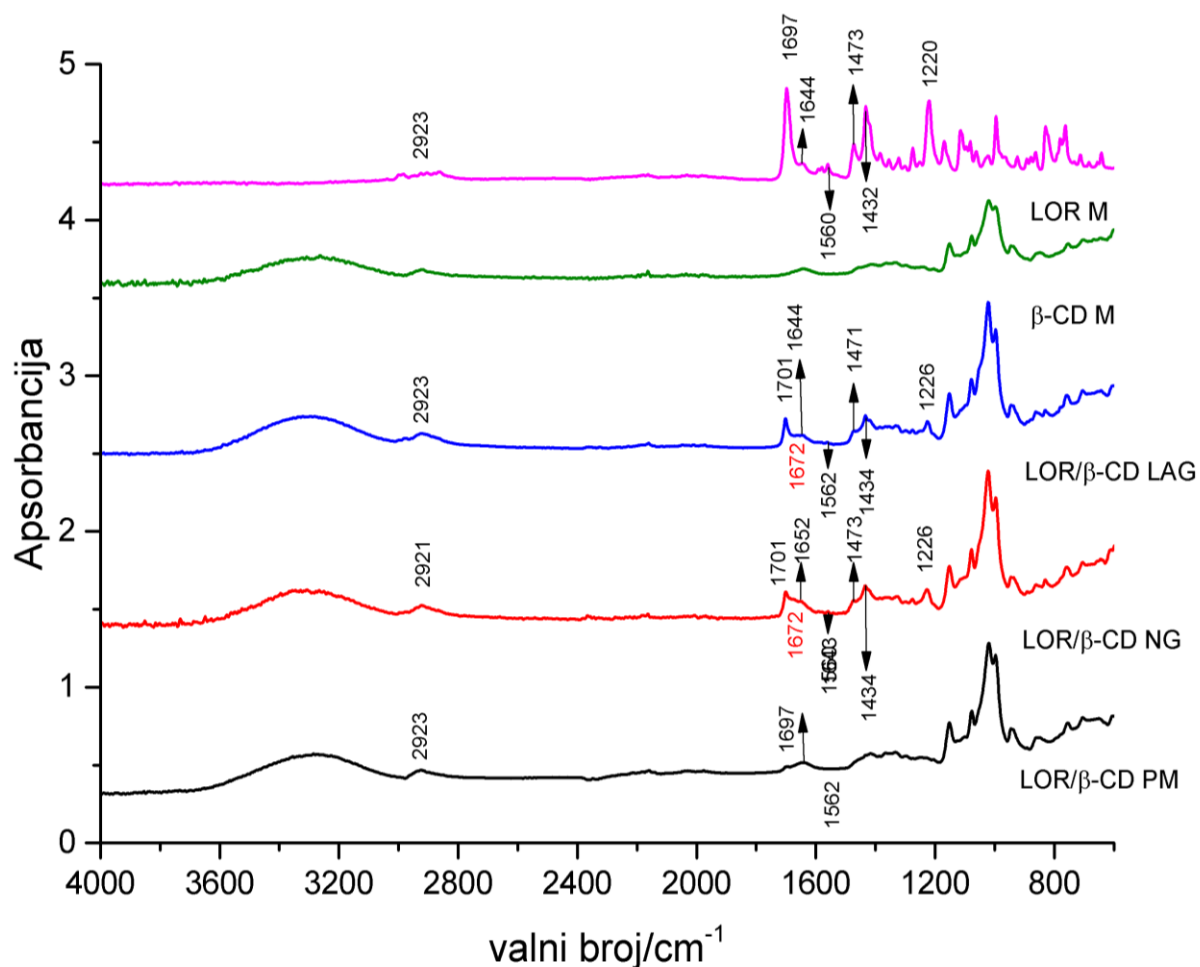
Valni broj / cm^{-1}			Asignacija
LOR M	LOR PM	LOR C	
2982	2982	2981	ν_{as} C–H
2923	2924	2924	ν_{as} C–H
2880	2880	2880	ν_{s} C–H
2862	2862	2862	ν_{s} C–H
1697	1699	1699	ν C=O
1644	1645	1643	ν C=N
1579	1578	1578	ν C=C
1560	1560	1560	ν C=C
1473	1473	1473	ν C=C
1432	1433	1433	ν C=C
1322	1321	1321	δ_{al} C–H
1274	1274	1274	ν C–O
1220	1219	1219	ν C–O
1114	1114	1113	ν C–Cl

8.2.2. β -ciklodekstrin i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin

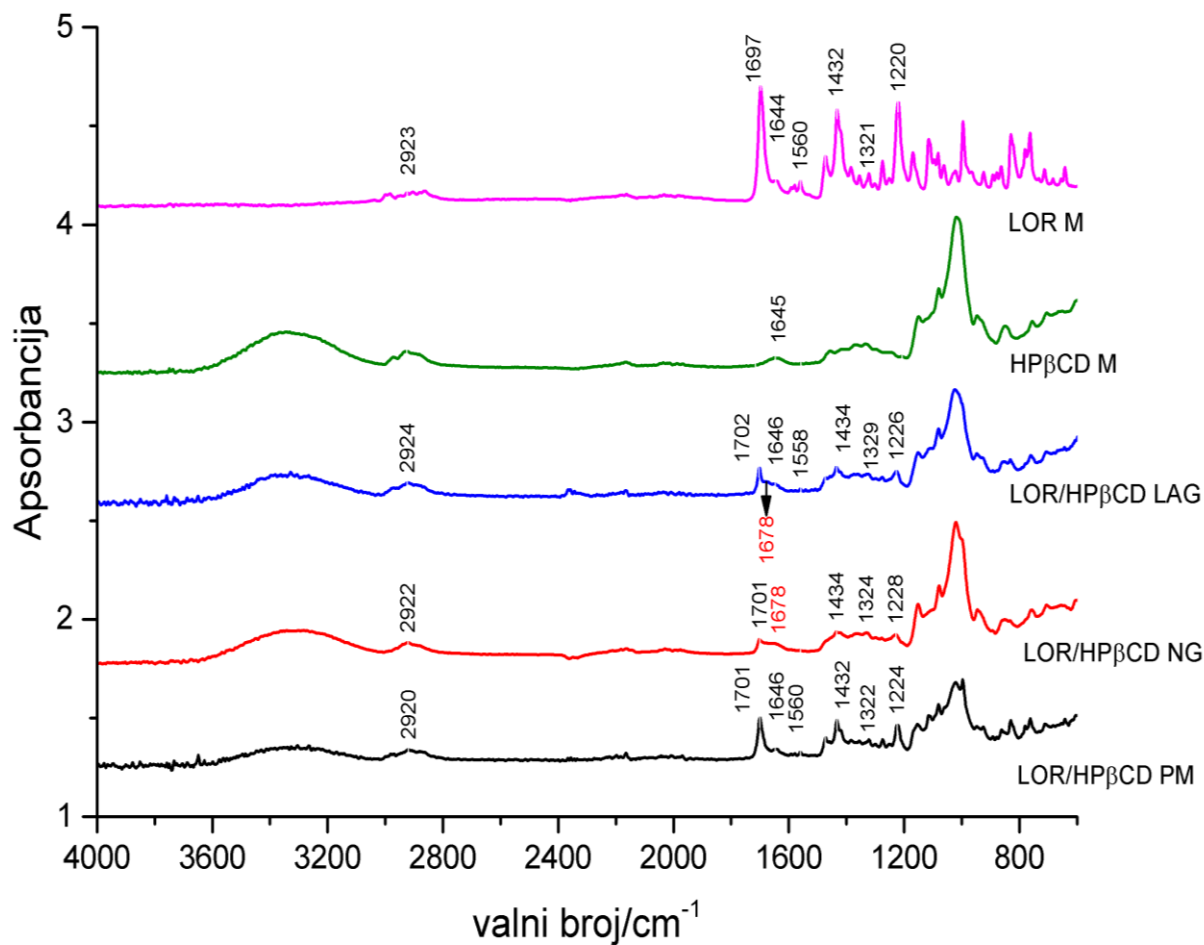
Slika D6. ATR spektri β -CD (a) i HP β CD (b) pripremljenih u mlinu (PM), miješanjem u tarioniku (PM) te bez obrade (C).

Tablica D4. Asignacija vrpce β -CD i HP β CD pripremljenih u mlinu (M), miješanjem u tarioniku (PM) te bez obrade (C).

Valni broj / cm^{-1}						Asignacija
β -CD			HP β CD			
M	PM	C	M	PM	C	
3293	3293	3293	3344	3344	3291	ν O–H
-	-	-	2972	2972	2972	ν_{as} C–H
2922	2926	2925	2925	2925	2916	ν_{as} C–H
1637	1643	1645	1647	1647	1645	δ O–H
-	-	-	1457	1455	1455	δ_{sc} CH ₂
1413	1413	1414	1415	1417	1415	δ_{al} O–H
1363	1366	1366	1373	1372	1366	δ_{s} CH ₃
1336	1332	1332	1335	1333	1333	δ_{s} CH ₃
1298	1298	1296	1297	1298	1296	δ_{tw} CH ₂
1239	1241	1241	1244	1244	1242	ν C–O
1205	1205	1205	1207	1207	1204	ν C–O
1151	1151	1151	1149	1149	1151	ν C–O–C
1076	1076	1076	1080	1080	1078	ν C–C + ν C–O
1020	1020	1020	1018	1018	1020	ν C–C + ν C–O

8.2.3. Kompleksi loratadina i β -ciklodekstrina

Slika D7. ATR spektri LOR, β -CD, i smjese LOR/ β -CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG) u rasponu valnih brojeva 4000–600 cm⁻¹.

8.2.4. Kompleksi loratadina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina

Slika D8. ATR spektri LOR, HP β CD, i smjese LOR/HP β CD pripremljene miješanjem u tarioniku (PM) i u mlinu bez (NG) i s dodatkom male količine etanola (LAG) u rasponu valnih brojeva 4000–600 cm⁻¹.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Nina Mamić

Datum rođenja: 14. listopada 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001–2007 Osnovna škola Malešnica, Zagreb

2007–2009 Osnovna škola Dragutin Tadijanović, Zagreb

2009–2013 X. Gimnazija „Ivan Supek“, Klaićeva 10, Zagreb

2013–2018 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb