

Određivanje prazikvantela tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tagliaretti, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:447463>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Tagliaretti

ODREĐIVANJE PRAZIKVANTELA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Diplomski rad

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

Zagreb, 2019. 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 vodioštvom Marijane Pocrnić, mag. chem.

Zahvale

Hvala mentorici profesorici Nives Galić što je pristala biti mentorica i omogućila mi izradu diplomskog rada na analitičkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, zahvaljujem se na vremenu i uloženom trudu.

Hvala mojoj neposrednoj voditeljici Marijani Pocrnić na uloženom trudu, ukazanom povjerenju, strpljenju, na stručnoj pomoći, uputama i mnogobrojnim savjetima koji su izradu i pisanje ovog diplomskog rada učinili puno lakšim.

Hvala svim mojim kolegama s faksa, koji su tokom godina studiranja postali prijatelji, kao i mojim prijateljima izvan faksa. Hvala na svakoj upućenoj riječi podrške te motivaciji u onim danima kada je nije bilo. Hvala jer ste slušali sve moje panične ispade svaki put iznova i imali neizmjereno strpljenja. Hvala na svakom razgovoru, svakoj kavi, svakom izlasku i svakom druženju, zbog Vas se studentsko vrijeme naziva najboljim razdobljem života.

I za kraj, najveću zahvalu upućujem mojim roditeljima i bratu te ostatku obitelji, bez Vas ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala Vam što ste moja pratnja kroz cijeli život. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, vjerovali ste u mene kada ja sama nisam, što ste mi bili neizmjerena podrška u svim trenucima nesigurnosti, a slavili sa mnom one lijepe. Hvala na bezuvjetnoj ljubavi koju ste mi pružili, ne samo tokom studija, nego tokom cijelog života. Zbog Vas sam danas, ovo što jesam.

Sadržaj

SAŽETAK.....	<u>IXX</u>
ABSTRACT	<u>XIXH</u>
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije	3
2.2. Teško topljivi lijekovi.....	4
2.3. Prazikvantel.....	5
2.4. Ciklodekstrini	6
2.4.1. Otkriće ciklodekstrina	6
2.4.2. Struktura ciklodekstrina.....	7
2.4.3. Svojstva ciklodekstrina.....	8
2.5. Inkluzijski kompleksi.....	11
2.5.1. Nastajanje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina.....	11
2.6. Određivanje topljivosti prema Higuchiju i Connorsu	16
2.6.1. Dijagrami topljivosti	16
2.6.2. Dijagram tipa A	17
2.6.3. Dijagram tipa B	18
2.6.4. Konstante stabilnosti.....	19
2.7. Efikasnost kompleksiranja	19
2.8. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Materijali	24
3.2. Instrumentacija	24
3.3. Validacija metode.....	25
3.3.1. Priprema ishodnih otopina	25
3.3.2. Specifičnost	25
3.3.3. Preciznost.....	25
3.3.4. Linearnost	26
3.3.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije	26
3.3.6. Robustnost.....	27
3.4. Probiranje („screening“)	27
3.5. Određivanje topljivosti	28

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Validacija metode.....	29
4.1.1. <i>Specifičnost</i>	<i>29</i>
4.1.2. <i>Preciznost.....</i>	<i>31</i>
4.1.3. <i>Linearnost</i>	<i>32</i>
4.1.4. <i>Granica detekcije i granica kvantifikacije</i>	<i>32</i>
4.1.5. <i>Robustnost.....</i>	<i>33</i>
4.2. Probiranje („screening“)	34
4.3. Određivanje topljivosti	35
§ 5. ZAKLJUČAK	42
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	43
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	XV
ŽIVOTOPIS.....	XVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ODREĐIVANJE PRAZIKVANTELA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Petra Tagliaretti

Prazikvantel (PZQ) je anthelmintik koji prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije spada u skupinu lijekova slabe topljivosti (skupina II). Međutim, utvrđeno je da mu se topljivost u biorelevantnom mediju povećava ukoliko je u kompleksu sa ciklodekstrinom. U ovom radu istražen je utjecaj β -ciklodekstrina i njegovih metil, sulfobutileter i hidroksipropil derivata na topljivost prazikvantela u vodenim otopinama. Također je ispitan utjecaj organskih kiselina (jabučna, jantarna, vinska i limunska) na poboljšanje topljivosti PZQ sa i bez prisutnosti ciklodekstrina. Koncentracija prazikvantela u vodenim otopinama određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti prethodno validiranom metodom za određivanje prazikvantela. Kompleksiranje prazikvantela ciklodekstrinima uzrokovalo je porast njegove topljivosti u vodi.

(43 stranica, 18 slika, 17 tablica, 47 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, HPLC, prazikvantel, 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. doc. dr. sc. Ilica Đilović
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 25. rujna 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF PRAZIQUANTEL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Petra Tagliaretti

Praziquantel is an anthelmintic that is categorized in Biofarmaceutical Classification System as a low solubility drug (BSC II class). However, studies have shown that its solubility in biorelevant medium increases with addition of cyclodextrin. In this thesis effect of β -cyclodextrin and its methyl, sulphobutylether and hydroxypropyl derivatives on solubility of praziquantel in aqueous solutions was studied. Improvement of solubility of PZQ with different organic acids (malic, succinic, tartaric and citric acid) with and without addition of cyclodextrins was studied as well. Validated high performance liquid chromatographic method was used for quantitative determination of PZQ in aqueous solutions. The solubility of PZQ in water was increased by complexation with cyclodextrines

(43 pages, 18 figures, 17 tables, 47 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, HPLC, inclusion complex, praziquantel, solubility

Mentor: Professor Nives Galić

Assistant mentor: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Reviewers:

1. Professor Nives Galić
2. Professor Ines Primožič
3. Assistant Professor Ivica Đilović
4. Substitute: Associate Professor Snežana Miljanić

Date of exam: 25th September 2019.

§ 1. UVOD

Najpoželjniji način dostave lijeka u organizam je oralnim putem. Međutim, nedostatak ovakve primjene je niska bioraspoloživost te niska topljivost lijeka u vodenom mediju. U slučaju slabo topljivih lijekova, otapanje je glavni korak koji ograničava brzinu u procesu apsorpcije lijeka.¹

Prazikvantel je anthelmintik koji ima široki aspekt djelovanja. Koristi se u humanoj medicini i veterini kao lijek protiv crijevnih nametnika, kao što su gliste ili trakavice te za liječenje bolesti shistosomijaze. Prema biokemijskom sustavu klasifikacije lijekova, spada u skupinu II, odnosno skupinu teško topljivih lijekova visoke permeabilnosti, što ograničava terapijsku učinkovitost lijeka. Za djelotvornu dozu tog lijeka nakon konzumacije, potrebna je njegova velika količina, stoga se istražuju mnogobrojni načini kako bi se topljivost lijeka u vodi, odnosno organizmu, mogla poboljšati, čime bi se doza lijeka mogla smanjiti.²

Najčešća metoda kojom se topljivost lijeka poboljšava je kompleksiranje sa ciklodekstrinima, iako to nije jedina mogućnost. Kompleksiranjem sa ciklodekstrinima mijenjaju se fizikalna i kemijska svojstva lijeka, što je preduvjet za bolju topljivost. Ciklodekstrini trenutno imaju široku primjenu u farmaceutskoj industriji za razvoj novih proizvoda s poboljšanim svojstvima. Ostale metode koje se koriste kako bi se topljivost lijekova povećala su priprava kokristala, kristalnih soli, mikronizacija, dobivanje nanokristala, promjena pH sustava.³

Cilj ovog rada je istražiti s kojim ciklodekstrinima, odnosno ternarnim komponentama prazikvantel pokazuje najveću topljivost.

Kao polazne supstance koristit će se β -ciklodekstrin i njegovi metil, sulfobutileter te hidroksipropil derivati u smjesi s prazikvantelom. Kako bi se vidjelo utječu li samo ciklodekstrini ili i ternarne komponente (vinska, limunska, jantarna i jabučna kiselina) na topljivost ciklodekstrina, prije određivanja topljivosti bit će napravljeno probiranje među uzorcima. Probiranjem će se dokazati s kojim tvarima je potrebno provesti daljnja, detaljnija određivanja topljivosti.²

Određivanja topljivosti provest će se za sustave u kojima su preliminarna ispitivanja, odnosno probir, pokazala najbolje rezultate. Otopine uzoraka će biti pripremljene tako što će se koncentracija ciklodekstrina povećavati, dok će količina prazikvantela biti konstantna.⁴

Sve otopine uzoraka analizirat će se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Odredit će se koncentracija prazikvantela u uzorcima, a posljedično i topljivost prazikvantela u vodi. Metoda tekućinske kromatografije za određivanja prazikvantela u uzorcima će prethodno biti validirana prema smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za farmaceutske proizvode za primjenu u ljudi (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH).⁵

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije

Biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. *biopharmaceutical classification system*, BCS) je sustav klasifikacije lijekova koji je omogućio lakšu regulaciju oralnih lijekova, a njegove zakone postavili su 1995. godine Amidon i suradnici. Svrha uvođenja BCS-a bila je smanjiti potrebu za *in vivo* istraživanjima te kao zamjenu koristiti *in vitro* istraživanja. Kao parametre proučavanja djelatne tvari BCS uzima topljivost, permeabilnost i brzinu otapanja. Poznavanje BCS-a pomaže znanstvenicima da razviju nove prikladne oblike doziranja lijekova.⁶

BCS kategorizira lijekove u jednu od četiri kategorije na temelju njihove topljivosti i permeabilnosti, te prema tome u skupinu I pripadaju lijekovi visoke topljivosti i visoke permeabilnosti. Takvi se lijekovi brzo otapaju i apsorbiraju u gastrointestinalnom sustavu. U skupinu II spadaju lijekovi niske topljivosti i visoke permeabilnosti, u skupinu III lijekovi visoke topljivosti i niske permeabilnosti, a u skupinu IV pripadaju spojevi niske topljivosti i niske permeabilnosti, kako je i prikazano u tablici 1.^{6, 7}

Tablica 1. Klasifikacija lijekova prema BCS-u⁷

Skupina I	Skupina II
Visoka topljivost	Niska topljivost
Visoka permeabilnost	Visoka permeabilnost
Skupina III	Skupina IV
Visoka topljivost	Niska topljivost
Niska permeabilnost	Niska permeabilnost

Lijek se smatra visoko permeabilnim kada se utvrdi da je stupanj apsorpcije kod ljudi 90 % ili više primjenjene doze. Također, određeni lijek se smatra dobro topljivim kada je najveća doza lijeka topljiva u 250 mL, ili manje, vodenog medija u pH području 1,2–6,8 pri 37 °C.⁶

Od 1995. godine do danas BCS je prošao kroz mnoge promjene kako bi se taj sustav još poboljšao. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) koristi sustav u navedene svrhe za lijekove koji pripadaju skupinama I i III, ali i za neke tvari iz skupine II. Lijekovima iz skupine II potrebno je poboljšati topljivost, čime se povećava i bioraspoloživost. Pri pokušajima poboljšanja topljivosti koriste se razne metode kao što su

kristalne modifikacije lijeka (priprava kokristala ili kristalnih soli), upotreba samoemulgirajućih sustava, kompleksiranje sa ciklodekstrinima, smanjenje veličine čestica (mikronizacija, dobivanje nanokristala), pH modifikacije te prevođenje lijekova u amorfno stanje.^{6,8}

2.2. Teško topljivi lijekovi

Topljivost je jedan od najznačajnijih parametara koji utječe na postizanje željene koncentracije lijeka u sistemske cirkulaciji, koji je u organizam unešen oralnim putem. Topljivost se definira kao koncentracija otopljene tvari u zasićenoj otopini pri određenoj temperaturi. Niska topljivost lijekova glavni je problem s kojim se susrećemo pri razvoju novih lijekova. Više od 40 % lijekova koji su trenutno dostupni na tržištu, pripadaju skupini slabo topljivih lijekova. Niska bioraspoloživost koja proizlazi iz slabe topljivosti lijekova u vodi otežava nova istraživanja i razvoj novih lijekova.⁹

Bioraspoloživost nekog lijeka predstavlja omjer koncentracije lijeka koji nepromijenjen dospijeva u krvotok nakon primjene bilo kojim putem (u slučaju prazikvantela oralnim putem) i koncentracije lijeka u krvi nakon intravenske primjene. Bioraspoloživost nakon intravenske primjene jednaka je 1 (100 %) dok je za druge puteve primjene uglavnom manja od 1.¹⁰

Do sada su razvijeni različiti pristupi s naglaskom na poboljšanje topljivosti i brzinu otapanja, a razvoj novih strategija za poboljšanje topljivosti ključan je za farmaceutski razvoj takvih lijekova. Osnovni pristupi koji se koriste za poboljšanje topljivosti su mikronizacija, samoemulgiranje, kristalna modifikacija, kompleksiranje ciklodekstrinima i promjena pH. Bolje razumijevanje fizikalno-kemijskih i biofarmaceutskih svojstava lijekova trebali bi dovesti do učinkovitog preoblikovanja lijekova koji su teško topljivi u vodi.³

Lijekovi se smatraju netopljivima ako je njihova topljivost manja od 100 g mL⁻¹. Topljivost lijeka u vodi je glavni parametar za određivanje brzine otapanja. Ograničena brzina otapanja proizlazi iz niske bioraspoloživosti lijekova. U takvim situacijama potrebno je povećanje doze lijeka dok njegova koncentracija u krvi ne dosegne terapijski raspon. Međutim, povećanje doze može dovesti do trovanja u gastrointestinalnom putu nakon oralne primjene.³

Dizajn novih lijekova općenito je zahtjevan postupak. Promjena kemijske strukture u optimizaciji novih lijekova smatra se dobrom mogućnošću za povećanje topljivosti lijekova, kao i uvođenje polarne funkcionalne skupine u strukturu molekule. Osim pri razvoju novih lijekova, mogućnosti poboljšanja topljivosti slabo topljivih spojeva istražuju se i za već

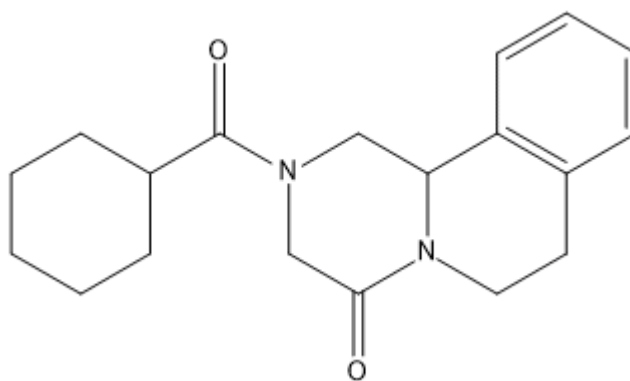
postojeće, komercijalno dostupne lijekove u svrhu poboljšanja njihove djelotvornosti. Primjerice, glimepirid, lijek koji pomaže pri liječenju dijabetesa tipa 2 i koji prema svojim svojstvima pripada BSC skupini II, je jedan od lijekova čije je poboljšanje topljivosti dobro istraženo. Istraživanja su pokazala više uspješnih načina poboljšanja topljivosti, kao što je dodatak uree ili polivinilpirolidona.¹¹ Također, kao i prazikvantel, topljivost glimepirida može se poboljšati kompleksiranjem sa ciklodekstrinima. Abhiman i suradnici su pokazali znatno povećanje topljivosti koristeći β -ciklodekstrin i hidriksipropil- β -ciklodekstrin za kompleksiranje glimepirida.¹

U svom istraživanju topljivosti glimepirida Ammar i suradnici koristili su hidriksipropil- β -ciklodekstrin, natrijevu sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina te β -ciklodekstrin u prisutnosti različitih topljivih polimera kao što su hidroksipropil metilceluloza (HPMC), polivinilpirolidon (PVP), polietilen glikol 4000 (PEG 4000) i polietilen glikol 6000 (PEG 6000). Istraživanje je pokazalo da brzina otapanja glimepirida u ovim sustavima jako ovisi o vrsti polimera koji se koristi kao i o njegovoj koncentraciji. Primjećeno je optimalno povećanje brzine otapanja lijeka pri koncentraciji polimera od 5 % za PEG 4000 ili PEG 6000, a 20 % za HPMC ili PVP. Najveću topljivost glimepirida je pokazao sustav glimepirida, hidroksipropil- β -ciklodekstrina i 5 %-tnog PEG 4000.¹²

2.3. Prazikvantel

Prazikvantel je anthelmintik širokog spektra djelovanja. Anthelmintici su lijekovi koji se koriste za liječenje parazitskih infekcija uzrokovanih glistama i trakavicama, crijevnim nametnicima na čovjeku i domaćim životinjama. Prazikvantel je lijek koji pomaže pri liječenju shistostomijaze, odnosno bilharcijaze, bolesti uzrokovane nametnicima, raširenim u Africi, Srednjoj Americi i na Dalekom istoku čiji uzročnici pripadaju metiljima iz roda *Shistosoma*.¹³

Molekulska formula prazikvantela je $C_{19}H_{24}N_2O_2$, a molekulska masa iznosi 312,5 g mol^{-1} . U prirodi prazikvantel postoji kao racemat, ali samo je R-enantiomer biološki aktivan.¹⁴ Njegova struktura prikazana je na slici 1.



Slika 1. Struktura prazikvantela

Prazikvantel je odobren za konzumaciju u SAD-u 1982. godine i danas se nalazi na popisu bitnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije, među najučinkovitijim i najsigurnijim lijekovima potrebnima u zdravstvu. Glavni nedostatak mu je niska bioraspoloživost, što ograničava njegovu primjenu. Neki spojevi kao što su karbamazepin, fenitoin i klorokvin smanjuju bioraspoloživost prazikvantela, te se ne mogu koristiti u kombinaciji s prazikvantelom, dok spoj cimetidin povećava njegovu raspoloživost.^{15, 16, 17}

Molekula prazikvantela je lipofilna i izrazito hidrofobna te slabo topljiva u vodi. PZQ se unosi u organizam samo oralnim putem, a potrebne su visoke doze da bi lijek prošao metabolizam prvog prolaza. Kako bi se u buduće vrijeme koristile manje doze lijeka, istraživanja su pokazala da se njegova topljivost u vodi može povećati raznim procesima, primjerice kompleksiranjem sa ciklodekstrinima (CD).²

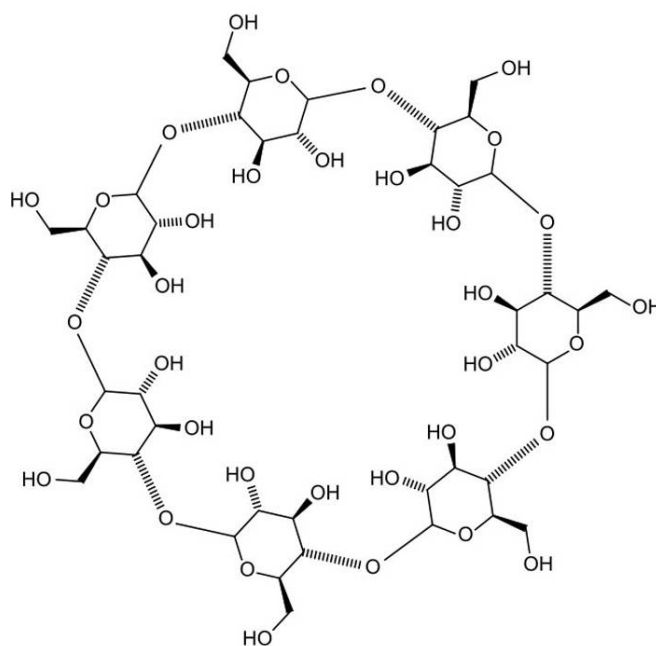
2.4. Ciklodekstrini

2.4.1. Otkriće ciklodekstrina

1904. godine Franz Schardinger izolirao je novu skupinu organizama imena *Bacillus macerans* koja je bila sposobna proizvesti organske spojeve aceton i etanol iz šećera i biljnog materijala koji sadrži škrob. Nekoliko godina kasnije ustanovio je da taj soj proizvodi velike količine kristaličnih dekstrina iz škroba. On je svoje produkte nazvao „kristalični dekstrin a“ i „kristalični dekstrin b“. Tek nakon 30 godina ciklodekstrin je izoliran, a njegova točna struktura određena je tek 1942. godine rendgenskom kristalografijom. Daljnjim proučavanjem ciklodekstrina, uočeno je da može tvoriti inkluzijske komplekse zbog svog oblika koji sadrži šupljinu.¹⁸

2.4.2. Struktura ciklodekstrina

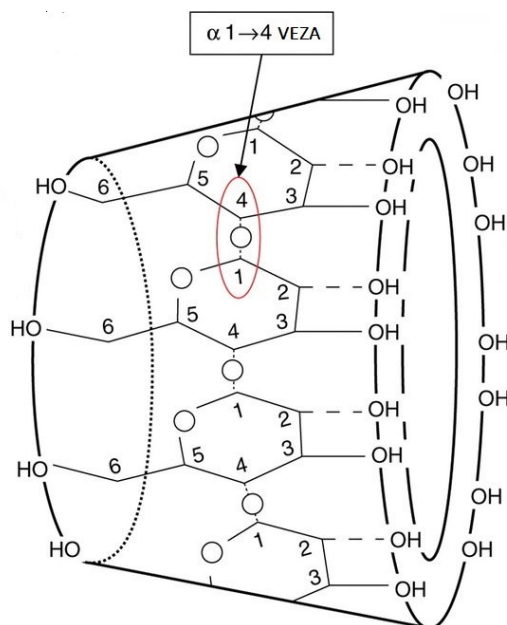
Ciklodekstrini (CD) su kristalne, homogene, nehigroskopne tvari, izgrađene od glukopiranoznih jedinica koje su međusobno povezane α -1,4 vezama. Prstenastu strukturu ciklodekstrina međusobno zatvaraju glukopiranozne jedinice, čiji broj n varira ovisno o vrsti ciklodekstrina. Najvažniji tipovi s obzirom na broj glukopiranoznih jedinica su α -, β - i γ -ciklodekstrini koji se sastoje od 6, 7, odnosno 8 glukopiranoznih jedinica. Ciklodekstrini s manje od šest glukopiranoznih jedinica ne mogu nastati zbog steričkih razloga, a oni s više od osam glukopiranoznih jedinica nemaju farmaceutski značaj.¹⁹ S porastom broja glukopiranoznih jedinica u strukturi povećava se i promjer centralne šupljine molekule ciklodekstrina. Svaka jedinica glukoze sadrži dva sekundarna alkohola i jedan primarni alkohol, koji osiguravaju 18–24 mjesta za kemijske modifikacije.¹⁸ Struktura β -ciklodekstrina, jednog od farmaceutski najčešće korištenih ciklodekstrina, prikazana je na slici 2.



Slika 2. Struktura β -ciklodekstrina.²⁰

Najstabilnija konformacija ciklodekstrina je oblik krnjeg stošca s centralnom šupljinom. Takva je struktura posljedica konformacije glukopiranoznih jedinica koje se nalaze u konformaciji stolice. Zbog svoje strukture i nemogućnosti slobodne rotacije oko α -1,4 veze, primarne i sekundarne hidroksilne skupine nalaze se na suprotnim krajevima šupljine. Hidroksilne skupine orijentirane su prema vanjskoj strani molekule, primarne na malom otvoru molekule, dok su sekundarne na velikom.²¹ Unutarnja strana stošca je hidrofobna zbog C–C, C–H i C–O–C veza,

dok je vanjska strana stošca hidrofilna zbog svojih hidroksilnih skupina. Struktura krnjeg stošca prikazana je na slici 3. na primjeru γ -ciklodekstrina.



Slika 3. Struktura ciklodekstrina u obliku krnjeg stošca²²

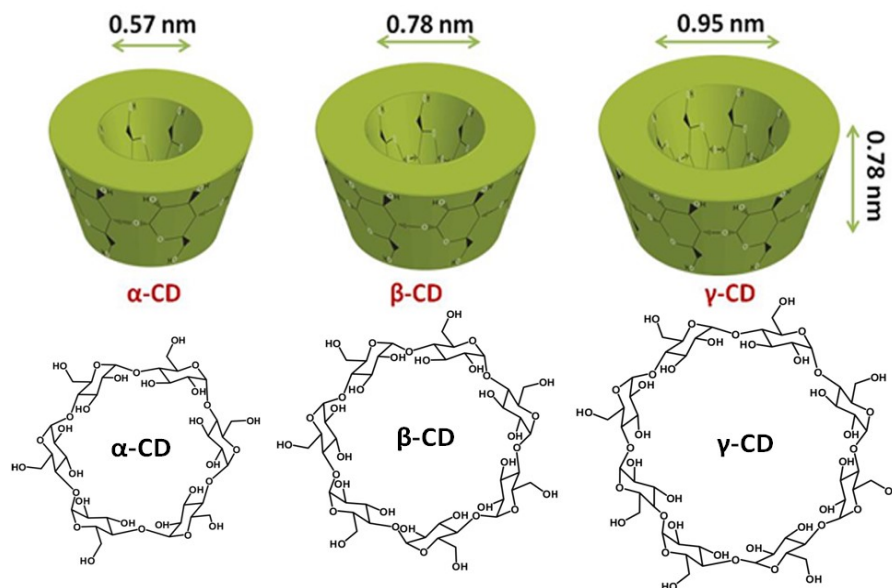
Upravo zahvaljujući takvoj strukturi i lipofilnom karakteru šupljine, ciklodekstrini mogu tvoriti inkluzijske komplekse s mnogim hidrofobnim molekulama, pri čemu mijenjaju svoja fizikalno-kemijska svojstva, kao i svojstva molekula (lijeka) koje se nalaze u unutrašnjosti šupljine.²²

2.4.3. Svojstva ciklodekstrina

Kao što je već navedeno, prirodni ciklodekstrini se dijele na α -, β -, i γ -ciklodekstrine. Svaki od navedenih ciklodekstrina ima specifična svojstva.²³ Neka svojstva α -, β -, i γ -ciklodekstrina prikazana su u tablici 2., a na slici 4. prikazane su njihove strukture.

Tablica 2. Svojstva α -, β - i γ - ciklodekstrina¹⁸

Svojstvo	α -ciklodekstrin	β -ciklodekstrin	γ -ciklodekstrin
broj glukopiranoznih jedinica	6	7	8
molekulska masa / g mol ⁻¹	972	1135	1297
toplјivost u vodi na 25°C / g L ⁻¹	145	18,5	232
volumen šupljine / Å ³	174	262	427

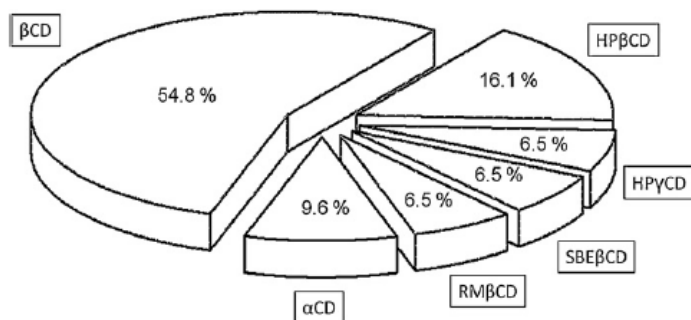


Slika 4. Strukture prirodnih ciklodekstrina²⁴

Gustoća ciklodekstrina iznosi 1,42–1,45 g mL⁻¹, ovisno o količini vezane vode. Pri potpunju dehidraciji ciklodekstrini prelaze u amorfnu formu. Tališta ciklodekstrina iznose između 240 °C i 265 °C, a visoka tališta posljedica su stabilne kristalne strukture ciklodekstrina. Objašnjenje smanjene topljivosti β -ciklodekstrina u vodi u usporedbi s α - i γ -ciklodekstrinima leži u jačini intramolekulskih vodikovih veza između sekundarnih hidroksilnih skupina, koje su smještene na široj strani stošca, jer te veze u značajnoj mjeri onemogućuju interakcije s otapalom. Unutar molekule ciklodekstrina nastaje prsten vodikovih veza susjednih glukopiranoznih jedinica. U molekuli β -ciklodekstrina nastaje 7 intramolekulskih vodikovih veza, koje uzrokuju rigidnost molekule zbog čega je topljivost β -ciklodekstrina čak 7,8 puta manja u odnosu na α -ciklodekstrin, kod kojeg nastaju 4 od mogućih 6 intramolekulskih vodikovih veza. Zbog svoje neplanarne i fleksibilnije strukture, γ -ciklodekstrin je najbolje topljiv u vodi.²⁵

Danas se zbog veličine centralne šupljine, jednostavnog načina dobivanja i ekonomskih razloga najčešće upotrebljava β -ciklodekstrin.²⁵ Njegov nedostatak je ograničena topljivost u vodi zbog koje s hidrofobnim lijekovima tvori teško topljive komplekse. Vodikove veze unutar strukture ciklodekstrina su vrlo jake te one smanjuju topljivost. Supstitucijom hidroksilnih skupina koje sudjeluju u nastanku vodikovih veza, može se znatno povećati topljivost β -ciklodekstrina. Uvođenjem izrazito lipofilnih supstituenata kao što su alkilne i acetilalkilne skupine, dobiven je niz lipofilnih derivata ciklodekstrina, koji su veće topljivosti u vodi, a prikladni su za izradu spojeva s produljenim oslobađanjem hidrofilnih lijekova te polipeptida i

proteina.²⁶ Ostali derivati β -ciklodekstrina koji su značajni za farmaceutsku upotrebu su natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE- β -CD), hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP- β -CD) i nasumično metilirani β -ciklodekstrin (RM- β -CD).²⁷ Njihova raspodjela u korištenju za farmaceutske svrhe prikazana je na slici 5.

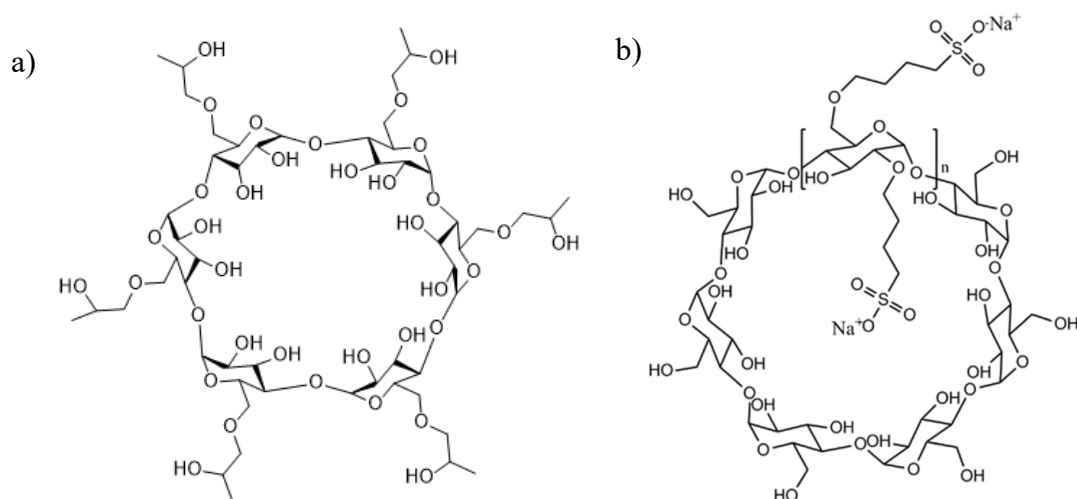


Slika 5. Raspodjela korištenih ciklodekstrina u farmakološke svrhe²⁸

U tablici 3. prikazana su neka fizikalno-kemijska svojstva derivata β -ciklodekstrina, a na slici 6. njihove strukture.

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva derivata ciklodekstrina

	HP- β -CD	SBE- β -CD	RM- β -CD
Broj glukopiranoznih jedinica	7	7	7
Molekulska masa / g mol⁻¹	1396,45	2163,3	1303,3
R-	-CH ₂ CHOHCH ₃	-(CH ₂) ₄ SO ³⁻	-CH ₃
Topljivost u čistoj vodi / mg mL⁻¹	>600	>500	>500



Slika 6. Struktura HP- β -CD²⁹ (a) i SBE- β -CD³⁰ (b)

2.5. Inkluzijski kompleksi

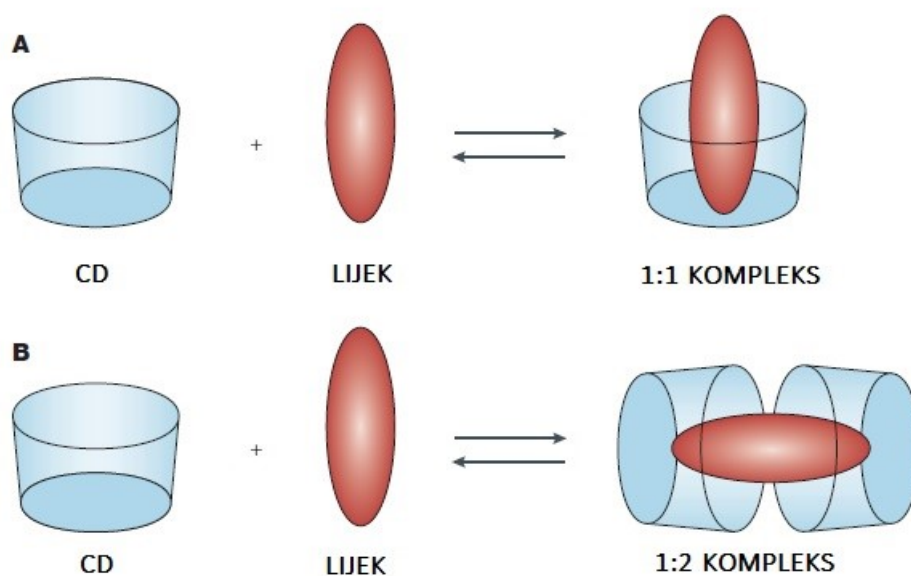
Inkluzijski kompleksi su kompleksi u kojima jedna komponenta (domaćin) tvori šupljinu, ili u slučaju kristala kristalnu rešetku, koja sadrži razmake u obliku dugačkih tunela ili kanala u kojima se nalaze molekule druge kemijske vrste, odnosno druga komponenta inkluzijskog kompleksa – gost. Ne postoji kovalentna veza između gosta i domaćina, nego su jedine veze koje ih povezuju van der Waalsove sile. Spojevi kod kojih su gostujuće vrste zatvorene u rešetci domaćina sa svih strana nazivaju se klatrati.³¹

2.5.1. Nastajanje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina

Važno svojstvo ciklodekstrina je stvaranje inkluzijskih, domaćin-gost kompleksa čime se mijenjaju fizikalna, kemijska i biološka svojstva molekule lijeka. Stoga se ciklodekstrini koriste za modifikaciju svojstava lijeka kao što je agregatno stanje, topljivost, brzina oslobađanja lijeka, stabilnost te bioraspoloživost.²³

Općenito, u vodenim otopinama ciklodekstrini mogu tvoriti inkluzijske komplekse s lijekovima preuzimanjem molekule lijeka ili njenog lipofilnog dijela u središnju šupljinu u kojoj su polarni dijelovi ciklodekstrinske šupljine zauzeti molekulama vode, koje su u energetski nepovoljnom stanju i stoga se lako zamjenjuju odgovarajućom molekulom koja je manje polarna od vode.²³

Na stvaranje inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina utječu dva ključna faktora, sterički faktor i termodinamički. Sterički faktor ovisi o relativnoj veličini molekule ciklodekstrina i molekule gosta ili o određenim ključnim funkcionalnim skupinama molekule gosta. Ako je gost premali ili preveliki u usporedbi s molekulom ciklodekstrina, neće se ispravno uklopiti u šupljinu, no za prevelike molekule moguće je uklapanje u molekule gosta u dvije centralne šupljine, kao što je prikazano na slici 7. Drugi faktor, termodinamički, ovisi o interakcijama između komponenti sustava. Da bi se kompleks formirao, mora postojati povoljna pokretačka sila koja privlači gosta u molekulu domaćina, odnosno ciklodekstrin.²³



Slika 7. Nastajanje kompleksa ciklodekstrina²⁰

Najčešće nastaju kompleksi molarnog omjera 1:1, ali mogući su i omjeri 1:2, 2:1, 2:2, ovisno o molekularnoj masi molekule gosta i o steričkim razlozima.²⁰

Strukture kristalnih kompleksa nisu nužno jednake strukturi kompleksa u otopini. U otopini, gostujuća molekula ili neki njeni dijelovi nalaze se unutar šupljine ciklodekstrina i cijeli je kompleks okružen višeslojnim molekulama vode. U kristalnom stanju gostujuća molekula ne mora nužno biti smještena unutar šupljine ciklodekstrina, već i između ciklodekstrinskih prstenova te tako formira klatrate. Pri stvaranju inkluzijskih spojeva s brojnim lijekovima u otopinama, molekule vode smještene u centralnoj šupljini molekule ciklodekstrina zamjenjuju se molekulom lijeka, ali češće samo nekim njenim dijelom pri čemu ne dolazi do nastajanja novih veza, niti kidanja postojećih veza u molekuli lijeka. Sile koje djeluju između molekule gosta i molekule domaćina su van der Waalsove sile i hidrofobne interakcije, a u nekim slučajevima dolazi i do nastanka vodikovih veza.²⁰

Nastajanje kompleksa je reverzibilan proces, a opisuje se konstantom stabilnosti (K_s) i izražava u M^{-1} , odnosno $\text{mol}^{-1} \text{ L}$. Prihvatljive vrijednosti konstante stabilnosti za primjenu kompleksa u farmaceutske svrhe su u rasponu $50\text{--}5000 \text{ M}^{-1}$. Niže vrijednosti pokazuju da je afinitet lijeka za stvaranje inkluzijskog kompleksa vrlo mali, a one veće vrijednosti koje karakteriziraju izrazito stabilne komplekse mogu znatno ograničiti bioraspoloživost lijeka.³² Nastajanje inkluzijskih kompleksa može utjecati i na kemijsku stabilnost lijekova. Ulaskom u centralnu šupljinu ciklodekstrina, lijek postaje zaštićen od vanjskih utjecaja, što pridonosi njegovoj kemijskoj stabilnosti. Poboljšanje topljivosti i kemijska stabilnost lijekova, koji su

posljedica nastajanja inkluzijskih kompleksa sa ciklodekstrinima, povećavaju bioraspoloživost lijekova neovisno o putu primjene. Potencijalno topljivost se može dodatno povećati dodatkom treće komponente u kompleks. Kao pomoćne supstance koriste se metalni ioni, organski ioni, polimeri i razne druge tvari, a u praksi se najčešće koriste organske kiseline kao što su limunska, vinska, jantarna i jabučna kiselina.³² Osim kiselina, za povećanje topljivosti lijekova, često se koriste i polimeri kao što je polivinilpirolidon.³³

Ako se lijek primijeni u obliku inkluzijskog kompleksa, dolazi do značajnog povećanja bioraspoloživosti lijeka, uz veliko smanjenje vremena potrebnog za postizanje prihvatljive koncentracije lijeka u krvi, pri čemu ciklodekstrini ne utječu na eliminaciju lijeka iz organizma. Ciklodekstrini mogu i povećati permeabilnost lijekova kroz biološke membrane interakcijom s lipofilnim komponentama membrana.²⁷

Popis molekula s kojima ciklodekstrini stvaraju komplekse je poprilično raznolik, a uključuje spojeve kao što su alifatski ugljikovodici razgranatih ili nerazgranatih lanaca, organske kiseline, masne kiseline, alkohole, plinove i polarne spojeve kao što su amini, halogeni i oksokiseline.²³

Zbog dostupnosti višestrukih reaktivnih hidroksilnih skupina, funkcionalnost ciklodekstrina može se povećati kemijskom modifikacijom. Ciklodekstrini su modificirani zamjenom hidroksilnih skupina na vanjskim stranama molekule, a kao takvi su korisni jer supstituirane funkcionalne skupine sudjeluju u molekularnom prepoznavanju. Isto se svojstvo koristi i za ciljanu isporuku lijekova jer modificirani ciklodekstrini pokazuju povećanu selektivnost u odnosu na izvorne ciklodekstrine.²³

Kompleksi se mogu formirati različitim tehnikama koje ovise o svojstvima aktivnog materijala, kinetici ravnoteže i željenom konačnom obliku doziranja. Svaki od procesa ovisi o maloj količini vode koja pomaže u upravljanju termodinamikom. Među najčešće korištenim metodama su međusobno miješanje suhih komponenata (gnječenje, mehanokemijska aktivacija), miješanje u otopinama ili suspenzijama i priprema pasti.²³

U tablici 4. prikazane su prednosti i nedostaci nastajanja inkluzijskih kompleksa.

Tablica 4. Prednosti i nedostaci nastajanja inkluzijskih kompleksa.²³

PREDNOSTI	NEDOSTACI
povećanje topljivosti	skupe metode pripreme
povećanje biodostupnosti	ponovljivost fizikalno-kemijskih svojstava
povećanje stabilnosti	pitanje stabilnosti
poboljšanje okusa i mirisa	samo male doze lijekova mogu biti kompleksirane
smanjenje isparavanja	poteškoće u ugradnji
smanjenje hemolize	

Utjecaj pojedinih ciklodekstrina na svojstva prazikvantela je već istražen te je objavljeno nekoliko radova na navedenu tematiku. Čvrsti kompleksi ciklodekstrina i prazikvantela mogu se pripremiti različitim metodama pripreme, a također se mogu analizirati raznim analitičkim tehnikama.

Maragos i suradnici istraživali su utjecaj HP- β -CD i β -CD na otapanje prazikvantela, uz ili bez zagrijavanja te uz ili bez prisutnosti polivinilpirolidona (PVP) kao polimera koji bi trebao povećati topljivost prazikvantela. U odsutnosti ciklodekstrina, PVP nije imao nikakav utjecaj na topljivost prazikvantela, a u prisutnosti ciklodekstrina imao je tek statistički neznatan pozitivan utjecaj na otapanje prazikvantela.³³

De Jesus i suradnici pripremali su uzorke PZQ i β -CD u acetonu, nakon čega su uzorci analizirani diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom i morfološkom analizom, čime su došli do podataka o nastajanju kompleksa. Pomoću difuzijskih NMR eksperimenata određene su konstante stabilnosti kompleksa PZQ i β -CD. U navedenom radu provedena su i *in vivo* istraživanja na miševima zaraženim *Shistosomom*, te je nakon 15 dana utvrđeno da je postotak preživjelih miševa, odnosno djelotvornost kompleksa PZQ/ β -CD bila 99 %, dok je sa samim PZQ djelotvornost bila tek 59 %.³⁴

Da Silva Mourão i suradnici istražili su učinak hidroksipropil metilceluloze (HPMC) na prazikvantel uz β -CD u otopini i čvrstom stanju. Fazna ispitivanja topljivosti izvedena su dodavanjem različitih koncentracija CD u suvišak prazikvantela u odsutnosti i prisutnosti polimera, sa i bez zagrijavanja na 120 °C. Binarni i ternarni sustavi karakterizirani su diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom, termogravimetrijom i infracrvenom spektroskopijom. Kompleksi su pripremljeni liofilizacijom te metodom gnječenja. Uzorci u tekućem stanju analizirani su spektrofotometrijski, a iz dobivenih rezultata određene su

konstanta stabilnosti i efikasnost kompleksiranja. Rezultati ukazuju na to da koncentracija polimera iznad 1,25 % smanjuje topljivost lijeka, jer veća koncentracija može uzrokovati promjene u viskoznosti sustava.³⁵ Ispitivanjem topljivosti prema Higuchi i Connorsu dobiveni su dijagrami tipa A_L. Dobivene konstante stabilnosti za binarne i ternarne sustave se razlikuju. Za binarni sustav konstanta je manja (227 M⁻¹), dok za ternarne sustave konstanta iznosi 332 M⁻¹, što dokazuje veću učinkovitost lijeka u sustavu gdje nastaje ternarni kompleks PZQ/β-CD/HPMC. Ternarni kompleksi su i zagrijavani kako bi se istražio utjecaj topline na kompleks, no uz zagrijavanje, konstanta stabilnosti se neznatno smanjila (320 M⁻¹). Efikasnost kompleksiranja za β-CD/PZQ iznosi 0,067, a za ternarni sustav s hidroksipropilmetilcelulozom 0,075.³⁵

Münster i suradnici istraživali su maskiranje okusa tekućeg prazikvantela *in vivo* i *in vitro*. Kao spojeve za prekrivanje gorkog okusa prazikvantela korišteni su HP-β-CD i SBE-β-CD, sa i bez prisutnosti maltodekstrina (MD). *In vitro* metoda je uključivala elektroničke sustave koji evaluiraju intenzitet okusa, a *in vivo* testiranje pomoću laboratorijskih štakora, tzv. BATA model (engl. *brief access taste aversion*). Istraživanja topljivosti lijeka rađena su prema Higuchi i Connors pristupu. Količina lijeka nakon miješanja sa ciklodekstrinom ili maltodekstrinom bila je određena tekućinskom kromatografijom te su izračunate konstante stabilnosti i efikasnost kompleksiranja. Oba ciklodekstrina znatno su povećala topljivost prazikvantela, čak 5–7 puta pri najvećoj koncentraciji prazikvantela. SBE-β-CD je pokazao najbolje rezultate jer su konstanta stabilnosti i efikasnost kompleksiranja za njega bili najpovoljniji.³⁶

Rodrigues i suradnici istraživali su komplekse prazikvantela s metil-β-ciklodekstrinom (Me-β-CD). Spojevi su okarakterizirani računalnom i fizikalno-kemijskom analizom. Čvrsti inkluzijski spojevi ispitivani su uporabom skenirajuće elektronske mikroskopije (engl. *scanning electron microscopy*, SEM), infracrvene spektroskopije (engl. *infrared spectroscopy*, IR) i diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC). Za ispitivanje otopina inkluzijskih kompleksa korištena je UV/VIS spektrofotometrija. Provjeravali su učinak otapala na topljivost prazikvantela pa su tako određene uzorke pripremali u različitim otapalima, vodi, etanolu i otopini Me-β-CD. Dijagrami topljivosti dobiveni su pomoću Higuchi i Connors metode, a rezultati NMR i IR analize pokazali su da dolazi do ugradnje prazikvantela u šuplinu ciklodekstrina i nastanka inkluzijskog kompleksa 1:1 stehiometrije.³⁷

Becket i suradnici istraživali su utjecaj α -, β - i γ -ciklodekstrina na topljivost prazikvantela. Tekući uzorci su bili pripremljeni na do sad opisan način, a analizirani su UV spektrofotometrijom. Konstante stabilnosti izračunate su prema Higuchi i Connors metodi. Rezultati su pokazali da α -CD kompleks daje linearni tip dijagrama A_L , a γ -CD nelinearni tip A_N . β -CD dosegao je granicu topljivosti te je njega karakterizirao dijagram tipa B_S . Iz dobivenih vrijednosti konstanti stabilnosti moglo se zaključiti da β -CD stvara najstabilnije komplekse, budući da je njegova konstanta stabilnosti 7, odnosno 27 puta veća od konstanti stabilnosti kompleksa α -CD i γ -CD. Stabilnost kompleksa β -CD može se objasniti mogućnosti primanja gostujuće molekule PZQ i uklapanja u svoju šupljinu. Niže stabilnosti α - i γ -CD kompleksa govore o slabijim interakcijama lijeka i ciklodekstrina, što može dovesti do preranog ispuštanja lijeka iz šupljine ciklodekstrina.³⁸

2.6. Određivanje topljivosti prema Higuchiju i Connorsu

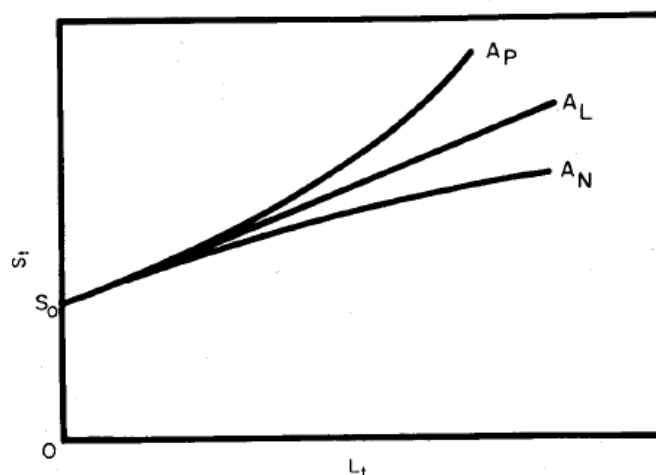
Higuchi i Connors razvili su metodu za određivanje topljivosti lijeka. Prema njima, analitičke tehnike za proučavanje topljivosti zahtijevaju da topljivost bude aditivna, odnosno da na topljivost svake komponente u smjesi ne utječe prisutnost drugih komponenata u istoj smjesi. Mnogi sustavi ne pokazuju takvo idealno ponašanje što uzrokuje veće pogreške u rezultatima. Higuchi i Connors navode da se takvo neidealno ponašanje može sistematizirati, a kada se to učini, takvi sustavi se mogu primjeniti za jednostavno određivanje topljivosti. Provedena su mnoga takva istraživanja koja su omogućila barem djelomično razumijevanja 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.⁴

2.6.1. Dijagrami topljivosti

Općenito, eksperimentalni postupak za određivanje topljivosti u sustavima koji uključuju molekulske interakcije (nastanak kompleksa) podrazumijeva dodavanje jednake količine slabo topljivog spoja S (supstrat) u znatnom suvišku u određeni broj tikvica u kojima se provodi eksperiment. U svaku tikvicu dodaje se konstantan volumen otapala, a nakon toga kompleksirajući spojevi (L–ligand) u određenom rasponu koncentracija koja se sukcesivno

povećava. Smjesa se miješa pri konstantnoj temperaturi i dovodi do ravnotežne topljivosti. Otopine se zatim analiziraju na bilo koji prikladan način pomoću kojeg se može odrediti koncentracija supstrata u pojedinim otopinama, odnosno topljivost analita. Tehnike koje se koriste za određivanje topljivosti lijeka su najčešće UV/VIS spektrofotometrija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Dijagram topljivosti konstruira se pomoću ovisnosti ukupne molarne koncentracije slabo topljivog supstrata S o molarnoj koncentraciji L koja je dodana u sustav. Dijagrami topljivosti mogu se podijeliti u dvije glavne skupine s nekim varijacijama unutar pojedinih skupina.⁴

2.6.2. Dijagram tipa A



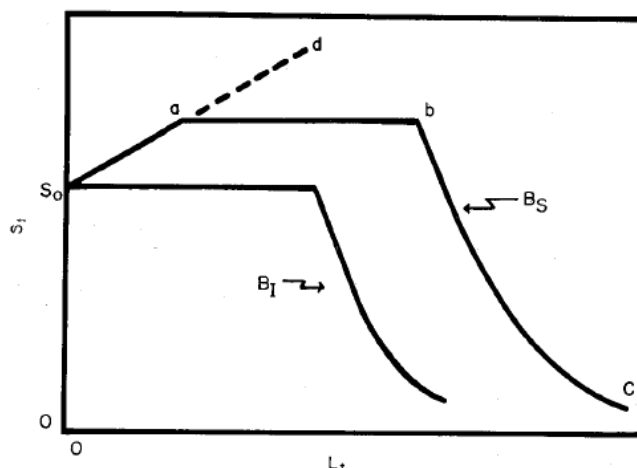
Slika 8. Dijagram tipa A⁴

Slika 8. prikazuje dijagram s krivuljama topljivosti koje se obično opažaju u ovim eksperimentima. Simbol S_t predstavlja ukupnu molaru koncentraciju slabo topljive tvari S , a simbol L_t predstavlja ukupnu molaru koncentraciju liganda L . Topljivost S se, kao što se vidi, povećava povećanjem koncentracije liganda L . S_0 je ravnotežna topljivost tvari S u odsutnosti L . Linearno povećanje topljivosti prikazano je linijom A_L , A_P je pozitivno odstupajuća izoterma, a A_N je negativno odstupajuća izoterma. Ovisnost tipa A_L uočava se ukoliko nastaju kompleksi tipa SL , S_2L , S_3L , odnosno kompleksi opće formule S_nL . Ukoliko nastaju kompleksi tipa SL_2 , SL_3 , odnosno kompleksi opće formule SL_n , krivulja topljivosti je tipa A_P . Za sada nije točno određeno što uvjetuje ovisnost tipa A_N . Takav izgled krivulje topljivosti može biti povezan s promjenom u prirodi otapala u prisutnosti velikih koncentracija L , što pak dovodi do

promjene u konstanti nastajanja kompleksa. Osim toga, pri velikim koncentracijama liganda može doći do njegovog samoudruživanja što onda utječe na stupanj kompleksiranja.

Svi dijagrami tipa A ukazuju na nastajanje topljivih kompleksa između S i L, čime se povećava ukupna količina S u otopini.⁴

2.6.3. Dijagram tipa B



Slika 9. Dijagram topljivosti tipa B⁴

Druga glavna skupina dijagrama topljivosti prikazana je na slici 9. Krivulje tipa B opisuju proces u kojem nastaju netopljivi kompleksi. Eksperimentalni dio provodi se na identičan način onome koji je opisan u potpoglavlju 2.6.1., a dijagram se interpretira na sljedeći način:

Krivulja B_S : u području od S_0 do a , sustav je sličan dijagramima tipa A, odnosno topljivost supstrata S se povećava zbog nastajanja topljivog kompleksa između S i L . U točki a postignuta je gornja granica topljivosti kompleksa. Daljnjim dodavanjem L dolazi do taloženja nastalog kompleksa, a koncentracija nekompleksiranog S održava se konstantnom zbog otapanja S u čvrstom stanju. U točki b je sav čvrsti S otopljen te daljnje dodavanje L rezultira smanjenjem S u otopini, zbog nastajanja i taloženja netopljivog kompleksa.⁴ Crtkana linija $a-d$ predstavlja prezasićenje otopine obzirom na početno nastali kompleks.

Krivulja B_L interpretira se na isti način, razlika je jedino u tome što reakcijom S i L nastaje toliko netopljiv kompleks da se početni porast koncentracije S ne može detektirati.

Ako je kompleks odgovoran za početni porast krivulje tipa B_S isti kao kompleks koji taloži (krivulja $b-c$), povećanje koncentracije S_0 do a mora biti jednako konačnoj koncentraciji S u c . Međutim, to stanje se rijetko primjećuje te se može zaključiti da sustav mora uključivati nastajanje dvaju ili više različitih kompleksa, od kojih je jedan odgovoran za početni porast

topljivosti, dok drugi taloži (kasnija faza krivulje). Ponekad se može uočiti i povećanje topljivosti nakon točke c , što se događa zbog nastajanja nove vrste kompleksa koji je topljiviji od onog koji je odgovoran za silazni dio krivulje $b-c$.⁴

2.6.4. Konstante stabilnosti

Zbog kompliciranih sustava i nastanka različitih kompleksa, teško je odrediti točan stehiometrijski omjer, što otežava i jednoznačno tumačenje konstante stabilnosti. Stoga se u većini slučajeva, kao rezultat uzima procjena konstante na temelju pretpostavljenog stehiometrijskog omjera, a dobivena prividna konstanta stabilnosti je adekvatna za određivanje opsega interakcije.⁴

Razmotrimo dijagram tipa A (uključujući i početak u dijagramu tipa B). Ako se pretpostavi da je samo jedan kompleks, opće formule S_mL_n , odgovoran za povećanje topljivosti S , tada je konstanta stabilnosti (nastajanja) dana formulom:

$$K = \frac{[S_mL_n]}{[S]^m[L]^n}$$

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 kompleksa stehiometrije 1:1, a koja se koja se može izračunati pomoću nagiba pravca A_L :

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

pri čemu je S_0 koncentracija supstrata kada je koncentracija kompleksirajućeg liganda jednaka 0, odnosno u odsutnosti liganda. Navedena formula za računanje konstante stabilnosti vrijedi samo kada nastaje kompleks 1:1. Iako postoji mogućnost nastanka serije kompleksa tipa SL , S_2L ... S_mL i dalje se opaža ovisnost prikazana tipom A_L te se često kao aproksimacija uzima da nastaju samo kompleksi omjera 1:1.⁴

2.7. Efikasnost kompleksiranja

Istraživanja su pokazala da ciklodekstrini s određenim lijekovima tvore inkluzijske komplekse i na taj način povećavaju njihovu topljivost. Konstante stabilnosti za komplekse lijek-ciklodekstrin određene na temelju dijagrama, odnosno krivulja topljivosti često su aproksimativne. Preciznija metoda za iskazivanje utjecaja ciklodekstrina je određivanje efikasnosti kompleksiranja (*engl. complexation efficiency*, CE). Efikasnost kompleksiranja

može se odrediti mjerenjem topljivosti određenog lijeka u prisutnosti različitih koncentracija ciklodekstrina u čistoj vodi ili nekom drugom mediju, kao što je npr. vodena otopina kapi za oči. Na temelju vrijednosti CE može se odrediti omjer lijeka i ciklodekstrina u kompleksu, kao i porast mase u čvrstom obliku doziranja.³⁹

Pretpostavka je da pri nastajanju kompleksa lijeka s ciklodekstrinom, određeni lipofilni dio molekule ulazi u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina, odnosno uvijek nastaje inkluzijski kompleks. Najčešća stehiometrija inkluzijskog kompleksa je 1:1, odnosno jedna molekula lijeka tvori kompleks s jednom molekulom ciklodekstrina. Istraživanja su pokazala da ciklodekstrini mogu tvoriti i inkluzijske i neinkluzijske komplekse te da nekoliko različitih vrsta kompleksa može koegzistirati u vodenim otopinama. Ciklodekstrini i njihovi derivati povećavaju topljivost lijekova i drugih hidrofobnih molekula mehanizmom micelnog tipa. Uobičajeni farmaceutski pomoćni sastojci, poput polimera i puferskih soli, mogu sudjelovati u nastajanju kompleksa. Stoga su konstante stabilnosti određene iz dijagrama topljivosti prividne konstante stabilnosti koje opisuju kombinirani učinak različitih složenih struktura na topljivost lijeka. Prividna konstanta stabilnosti izračunana je iz nagiba pravca i vrijednosti S_0 , odnosno koncentracije lijeka u otopini bez prisutnosti ciklodekstrina. U teoriji, vrijednost odsječka pravca na osi y bi trebala biti jednaka S_0 . Za slabo topljive lijekove s topljivošću $<0,1$ mM, S_0 je mnogo veći od te vrijednosti što rezultira nelinearnošću inače linearnog dijela krivulje topljivosti. To dovodi do pogrešnih vrijednosti za konstante stabilnosti kompleksa $K_{1:1}$ koje jako ovise o sastavu otopine. Točnija metoda za utvrđivanje topljivosti je određivanje efikasnosti kompleksiranja, CE.

$$CE = \frac{1 - \text{nagib}}{\text{nagib}}$$

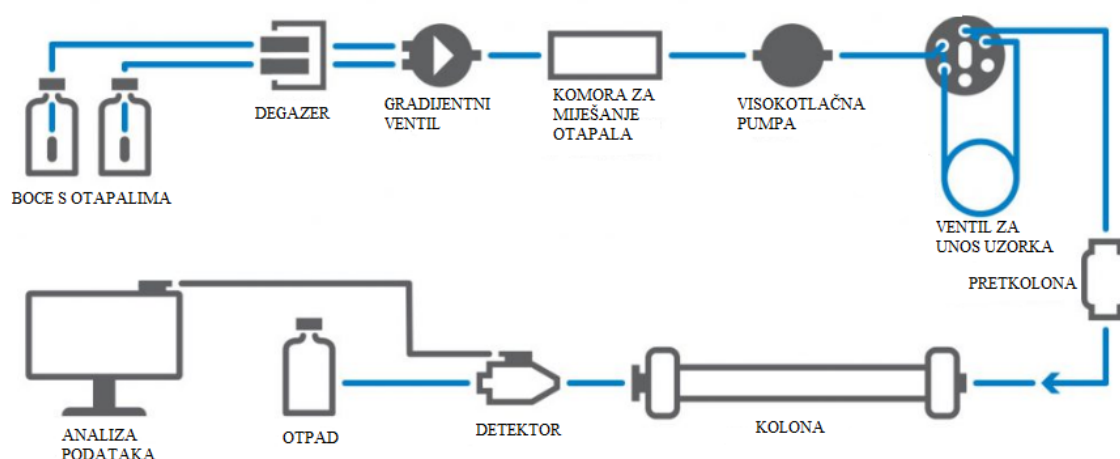
Efikasnost kompleksiranja predstavlja omjer koncentracija vezanog i slobodnog ciklodekstrina, a izračunava se iz nagiba pravca u dijagramu topljivosti i ne ovisi o S_0 , niti o odsječku pravca.³⁹

2.8. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je metoda razdvajanja sastojaka smjese koja se temelji na različitoj raspodjeli komponenti uzoraka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga je pokretna te se kreće u određenom smjeru. Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna tekuća (tekućinska kromatografija) ili plinovita (plinska kromatografija). Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju.⁴⁰

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) danas je jedna od najrasprostranjenijih tehnika u analitičkim laboratorijima. HPLC je vrsta tekućinske kromatografije koja se koristi za razdvajanje sastojaka smjese na temelju kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u koloni, kao i za identifikaciju i kvantitativno određivanje različitih smjesa. Komponente se razdvajaju na temelju različite raspodjele između dvije faze: mobilne koja nosi smjesu analita kroz porozni materijal (stacionarnu fazu), pri čemu uslijed različitih vrsta interakcija analita sa stacionarnom fazom, dolazi do razlike u vremenima prolaska komponenti analiziranog uzorka. Vrijeme koje je potrebno komponenti da prijeđe put od ulaska na kolonu do detektora pod određenim uvjetima (temperatura i tlak) naziva se vrijeme zadržavanja, te je karakteristično za pojedine analite. Grafički prikaz rezultata naziva se kromatogram.⁴¹

HPLC se dijeli na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. Kromatografiju obrnutih faza karakterizira nepolarna nepokretna faza, koja je najčešće silikagel s kemijski vezanom fazom i polarna pokretna faza, koja se sastoji od jednog ili više organskih otapala te vode, odnosno pufera.⁴¹ Na ovom kromatografskom sustavu, zadržavanje analita je jače što je nepokretna faza hidrofobnija. Redoslijed izlaska analita s kolone kreće se od hidrofilnijih prema hidrofobnijim spojevima. Kod kromatografije normalnih faza, nepokretna faza je polarna, a pokretna faza je nepolarna, a izlazak analita s kolone ide obrnutim redoslijedom nego kod kromatografije obrnutih faza. Na slici 10. je prikazana shema HPLC uređaja.

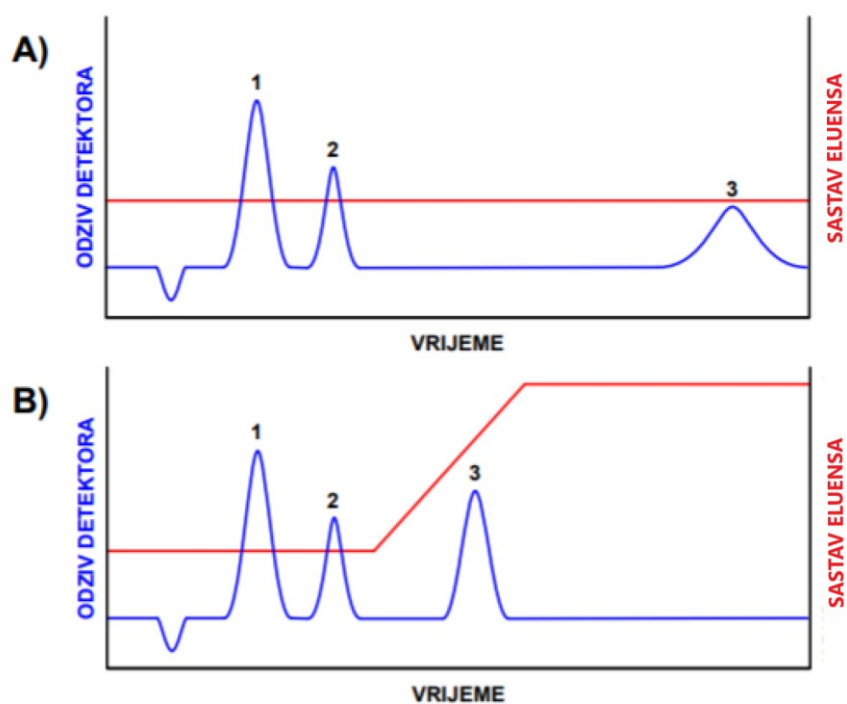


Slika 10. Shema HPLC uređaja⁴²

Na samom početku HPLC uređaja, nalaze se dvije boce s otapalima, koji miješanjem daju pokretnu fazu. Degazer (otplinjač) uklanja plinove koji su ostali otopljeni u otapalima. Gradijentni ventil kontrolira količinu otapala iz svake boce s otapalima i propušta točno određeni volumen pojedinog otapala. Miješanje otapala odvija se u komori za miješanje. Mobilna faza prolazi kroz visokotlačnu pumpu. Uzorci se unose pomoću ventila za unos uzoraka. Prije kolone, nalazi se pretkolona koja štiti glavnu kromatografsku kolonu. Nakon prolaska kroz kolonu, analiti se detektiraju na detektoru.⁴³

Izbor odgovarajućeg HPLC detektora ovisi o svojstvima analita. Postoje različiti tipovi detektora, kao što su UV/VIS detektori ili detektori koji se zasnivaju na mjerenju fluorescencije, a moguće je i povezivanje sa spektrometrom masa (engl. *mass spectrometry*, MS) ili spektrometrom nuklearne magnetske rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR). Najčešće se koristi UV/VIS detektor, a nakon njega detektor koji se zasniva na mjerenju fluorescencije, no iako taj detektor ima veću osjetljivost od UV/VIS detektora, njegov nedostatak je to što je mali broj spojeva prirodno fluorescentan. Spektrometar masa kao detektor je vrlo osjetljiv i selektivan, a detektira spojeve na temelju njihova omjera mase i naboja. Detektori koji se još mogu koristiti temelje se na mjerenju raspršenja svjetlosti ili refrakcije zračenja.⁴³

Kromatografsko eluiranje pri kojem sastav otapala tijekom analize ostaje nepromijenjen naziva se izokratnim eluiranjem. Osim izokratnog, za potrebe analize, koristi se i gradijentno eluiranje u kojem se sastav mobilne faze kontinuirano mijenja prilikom ispiranja.⁴⁴ Gradijentno eluiranje koristi se uglavnom kada je potrebno razdvojiti tvari čiji se afiniteti prema aktivnim mjestima nepokretne faze znatno razlikuju ili za eluiranje pri visokim koncentracijama kompeticijskih iona u eluensu. Razlike u kromatogramima između izokratnog i gradijentnog eluiranja prikazane su na slici 11.⁴



Slika 11. Shematski prikaz izokratnog (a) i gradijentnog eluiranja (b). Brojkama od 1 do 3 označena su tri analizirana sastojka iz uzorka.⁴⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za eksperimente su korišteni kruti prazikvantel (PZQ) dobiven s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (PubChem CID: 4891) te kruti ciklodekstrini: β -ciklodekstrin (β -CD), natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE- β -CD), hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP- β -CD) i nasumično metilirani β -ciklodekstrin (RM- β -CD) proizvođača Cyclolab. Jabučna kiselina (MA) proizvođača Merck-Schuchardt, vinska kiselina (TA) proizvođača Merck-Alkaloid, limunska kiselina (CA) proizvođača Kemika te jantarna kiselina (SA) bile su analitičkog stupnja čistoće kao i svi prethodno navedeni ciklodekstrini.

Za pripremu mobilne faze korišten je acetonitril HPLC čistoće proizvođača Fisher Chemicals te ultračista voda dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sistema za pročišćavanje (proizvođač Merck).

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

3.2. Instrumentacija

Analiza tekućinskom kromatografijom provedena je na instrumentu Agilent 1220 Infinity proizvođača Agilent Technologies opremljenog binarnom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatiranim pretincem za kolonu i detektorom varijabilne valne duljine. Kromatografsko razdvajanje bilo je provedeno na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μm , 150 $\times$ 4,6 mm) proizvođača Agilent Technologies. Mobilna faza sastojala se od acetonitrila i ultračiste vode u volumnom omjeru 45:55. Protok mobilne faze iznosio je 1 mL min⁻¹, a temperatura kolone bila je sobna (otprilike 27 °C). Valna duljina detekcije bila je postavljena na 210 nm, a volumen injektiranja bio je 20 μL .

Kromatografska metoda analize prazikvantela preuzeta je iz Europske farmakopeje.⁴⁶

3.3. Validacija metode

Validaciju analitičkih metoda možemo definirati kao postupak kojim se osiguravaju točni, precizni i reproducibilni rezultati tijekom dugoročnog korištenja metode.⁴⁷ U ovom eksperimentu određivani su parametri prema ICH sustavu validacije, a parametri koji su određivani su: specifičnost, preciznost, linearnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, i robustnost.⁵

3.3.1. Priprema ishodnih otopina

Pripremljene su ishodne otopine prazikvantela i odgovarajućih ciklodekstrina. Ishodna otopina PZQ koncentracije $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ pripremljena je otapanjem $5,04 \text{ mg}$ PZQ u odmjernu tikvicu od 5 mL . Ishodne otopine ciklodekstrina, koncentracije 10 mg mL^{-1} , pripremljene su otapanjem $50,43 \text{ mg}$ β -CD, $50,50 \text{ mg}$ SBE- β -CD, $50,90 \text{ mg}$ RM- β -CD, odnosno $50,18 \text{ mg}$ HP- β -CD u odmjernim tikvicama od 5 mL . Svaka je tikvica nadopunjena do oznake mobilnom fazom.

3.3.2. Specifičnost

Pripremljene su otopine prazikvantela konačne koncentracije $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ sa i bez prisustva ciklodekstrina konačne koncentracije 1 mg mL^{-1} , kao i otopina samog ciklodekstrina konačne koncentracije 1 mg mL^{-1} , tako da su određeni volumeni ishodnih otopina ciklodekstrina i prazikvantela otpipetirani i razrijeđeni do oznake mobilnom fazom.

Otopine su analizirane tekućinskom kromatografijom te je usporedbom kromatograma određeno ima li dodatak ciklodekstrina u otopinu utjecaj na vrijeme zadržavanja prazikvantela.

3.3.3. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka izražava blizinu slaganja između niza mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Određivane su tri vrste preciznosti:

- I. Preciznost metode:** pripremljene su standardne otopine PZQ na tri koncentracijske razine ($2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) i snimane po 3 puta
- II. Preciznost instrumenta:** pripremljena je standardna otopina PZQ koncentracije $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i injektirana 6 puta za redom.
- III. Intermedijarna preciznost:** pripremljena je standardna otopina PZQ koncentracije $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ dva dana za redom i snimljena oba dana.

Očitane su površine te su izračunate standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (%RSD) za svaku vrstu preciznosti.

3.3.4. Linearnost

Pripremljene su otopine prazikvantela različitih koncentracija u koncentracijskom području od 2 do 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tako što su u odmjerne tikvice od 5 mL otpipetirani određeni volumeni ishodne otopine PZQ te su tikvice nadopunjene do oznake mobilnom fazom (tablica 5.).

Pripremljene otopine su profiltrirane i prebačene u bočice te analizirane tekućinskom kromatografijom, pri čemu je svaka otopina injektirana šest puta. Iz dobivenih kromatograma su očitane površine pikova, izračunate srednje vrijednosti te je konstruiran baždarni pravac.

Tablica 5. Priprema otopina za određivanje linearnosti

broj	$\chi(\text{PZQ}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V(\text{PZQ}) / \text{mL}$
1	2	0,010
2	5	0,025
3	10	0,050
4	20	0,100
5	30	0,150
6	50	0,250
7	75	0,375
8	100	0,500
9	200	1,000

3.3.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) određene su na temelju kalibracijske krivulje pomoću regresijske analize. Pripremljen je niz otopina u koncentracijskom području 0,2–1,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ iz ishodne otopine koncentracije 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (tablica 6.)

Tablica 6. Priprema otopina za određivanje LOD i LOQ

broj	$\gamma(\text{PZQ}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$V(\text{PZQ}) / \mu\text{L}$
1	0,2	10
2	0,4	20
3	0,6	30
4	0,8	40
5	1,0	50
6	1,2	60
7	1,4	70

Nakon HPLC analize, konstruiran je graf ovisnosti površine ispod pika o koncentraciji prazikvantela. Iz regresijske analize uzeti su podaci za nagib i standardnu devijaciju te je određena granica detekcije (LOD) prema formuli

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \sigma}{\text{nagib pravca}}$$

te granica kvantifikacije (LOQ) prema formuli:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{\text{nagib pravca}}$$

gdje σ označava standardnu devijaciju odsjeka na osi y regresijskog pravca.

3.3.6. Robustnost

Kako bi se provjerila robusnost metode mijenjani su sljedeći parametri validacije:

- I. Sastav mobilne faze:** $\pm 2 \%$ organske faze (44 % i 46 % acetonitrila)
- II. Protok:** $\pm 0,2 \text{ mL min}^{-1}$ (0,8 mL min^{-1} i 1,2 mL min^{-1})
- III. Temperatura kolone:** 27 °C (odnosno sobna), 30 °C i 35 °C.

Pri svakom od uvjeta snimljen je uzorak standardne otopine prazikvantela koncentracije 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te su očitane površine i izračunate standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (%RSD).

3.4. Probiranje („screening“)

Pripremljene su otopine čistog prazikvantela, čistih ciklodekstrina i čistih organskih kiselina (limunska, jabučna, jantarna i vinska) te njihove smjese. Otopine su pripremljene tako da količina organskih kiselina i ciklodekstrina bude ekvimolarna 20 mg prazikvantela koji je odvagano u svaku tikvici. Potom je dodano 5 mL vode te su tikvice stavljene na tresilicu. Alikvoti od 1 mL uzimani su 24, 48 i 72 sata nakon pripreme uzoraka. Nakon filtriranja, uzorci su

dodatno razrijeđeni tako što je 20 µL uzorka otpipetirano u bočice za analizu i razrijeđeno sa vodom i acetonitrilom na 1 mL, kako bi konačni udio pojedinih otapala odgovarao mobilnoj fazi. Nakon analize uzoraka tekućinskom kromatografijom očitane su površine prazikvantela te su određene koncentracije u uzorcima. Iz omjera koncentracija prazikvantela u uzorcima binarnih i ternarnih smjesa sa onom u uzorku samog prazikvantela, određeno je do kolikog je povećanja/smanjenja topljivosti došlo u svakom uzorku.

Na temelju ovih podataka izabrane su komponente koje će biti korištene za ispitivanja topljivosti.

3.5. Određivanje topljivosti

Za ispitivanja topljivosti pripremljeni su uzorci prazikvantela sa svakim ciklodekstrinom, β-CD, HP-β-CD, SBE-β-CD i RM-β-CD.

Za svaki pojedini ciklodekstrin pripremljeni su uzorci u različitim rasponima koncentracija ciklodekstrina, dok je dodana količina prazikvantela u svakom uzorku bila jednaka (20 mg). Za β-CD raspon koncentracija ciklodekstrina bio je $0,0\text{--}12,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a za ostale ciklodekstrine raspon koncentracija bio je $0,0\text{--}40,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. U sve tikvice dodano je 5 mL vode. Tikvice su stavljene na tresilicu te su uzimani alikvoti 24, 48 i 72 sata nakon pripreme uzoraka. Nakon filtriranja, 50 µL uzorka je otpipetirano u bočice za analizu i razrijeđeno na 1 mL acetonitrilom i vodom, tako da je konačni omjer otapala odgovarao mobilnoj fazi.

Iz dobivenih kromatograma očitani su podaci o površini pikova te su pomoću baždarnog dijagrama izračunate koncentracije prazikvantela u otopinama. Konstruirani su fazni dijagrami i izračunate $K_{1:1}$ i CE prema formulama:

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

$$CE = \frac{1-\text{nagib}}{\text{nagib}}.$$

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

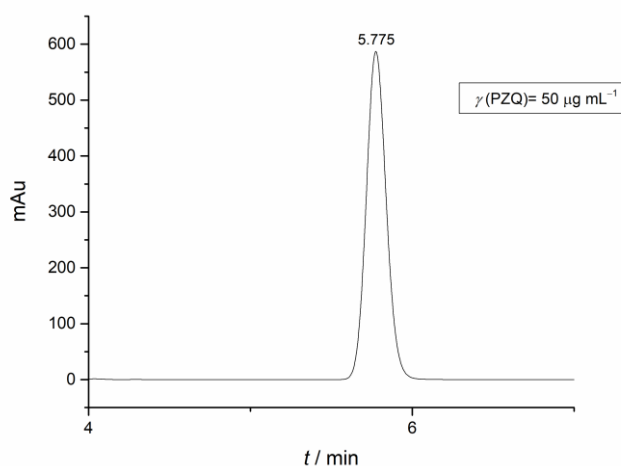
4.1. Validacija metode

4.1.1. Specifičnost

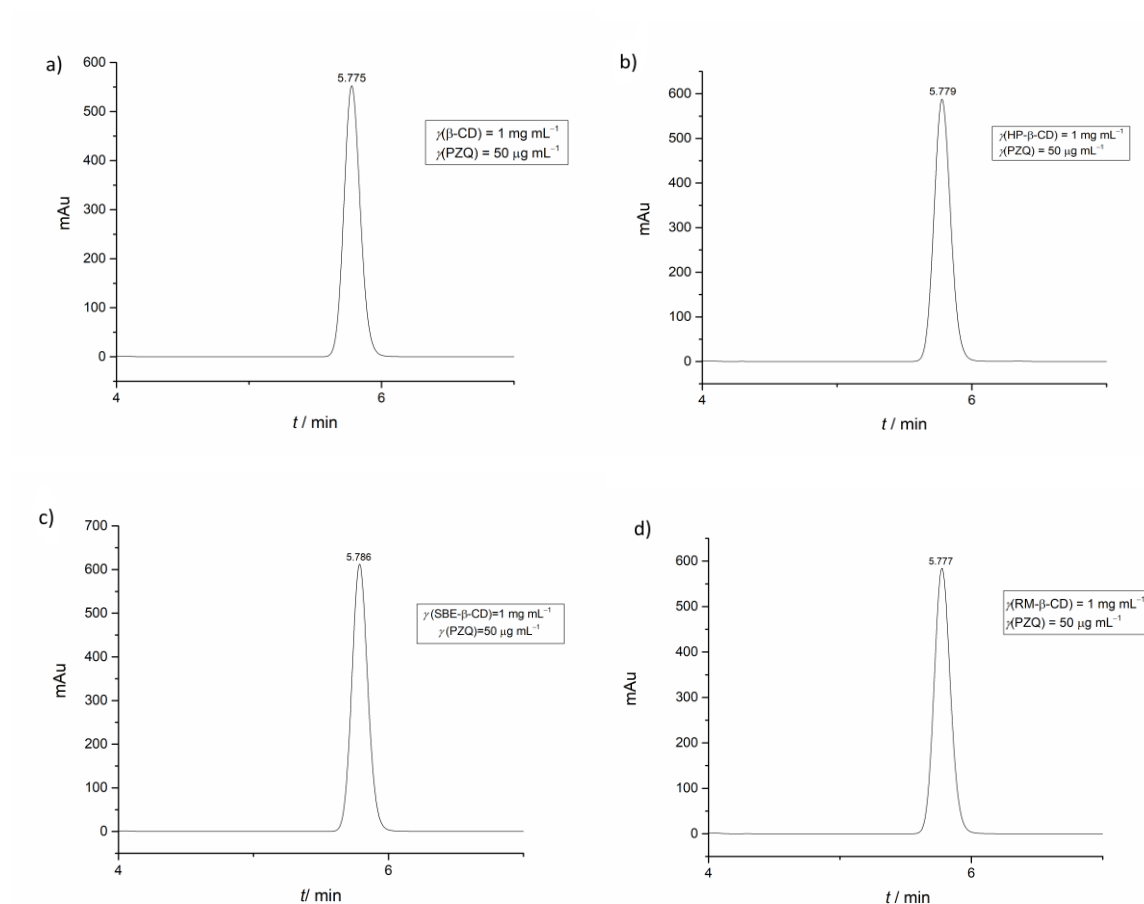
Istraživanjem specifičnosti, rezultati su pokazali kako prisutnost ciklodekstrina ne utječe znatno na vrijeme zadržavanja prazikvantela. Također, u kromatogramima otopina samih ciklodekstrina snimljenim pod istim ekperimentalnim uvjetima nisu uočeni pikovi ciklodekstrina. U tablici 7. prikazani su rezultati određivanja specifičnosti, odnosno vremena zadržavanja i površine ispod pikova prazikvantela za pojedine uzorke.

Tablica 7. Rezultati specifičnosti

	Površina	t_R / min
PZQ	5085,4	5,775
PZQ + β-CD	4778,2	5,775
PZQ + SBE-β-CD	5098,9	5,786
PZQ + RM-β-CD	5112,2	5,777
PZQ + HP-β-CD	5098,6	5,779



Slika 12. Kromatogram otopine prazikvantela koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 13. Kromatogrami prazikvantela u prisutnosti β -CD (a), HP- β -CD (b), SBE- β -CD (c) i RM- β -CD (d) ($\gamma(\text{PZQ}) = 50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; $\gamma(\text{CD}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$)

Prema rezultatima specifičnosti može se potvrditi da je ova metoda prikladna za određivanje koncentracije prazikvantela u uzorcima u kojima su prisutni ciklodekstrini.

4.1.2. Preciznost

Određene su tri vrste preciznosti, preciznost metode, preciznost instrumenta i intermedijarna preciznost.

I. Preciznost metode: izražena je kao standardna devijacija dobivenih površina za tri koncentracijske razine prazikvantela.

Tablica 8. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja preciznosti metode

$\gamma(\text{PZQ})/\mu\text{g mL}^{-1}$	Površina	Pros. površ.	SD	%RSD
2	186,7	193,3	6,8	3,5
	202,7			
	190,5			
30	2832,8	2900,2	94,8	3,3
	2833,4			
	3034,3			
200	18387,5	18387,3	141,1	0,8
	18560			
	18214,4			

II. Preciznost instrumenta: izražena je kao standardna devijacija dobivenih površina za jednu koncentracijsku razinu prazikvantela, mjerenu 6 puta za redom.

Tablica 9. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja preciznosti instrumenta

$\gamma(\text{PZQ})/\mu\text{g mL}^{-1}$	Površina						Pros. površ.	SD	%RSD
	1	2	3	4	5	6			
30	2832,8	2830	2825	2824,3	2823,2	2825,4	2826,8	3,8	0,1

III. Intermedijarna preciznost: izražena je kao standardna devijacija dobivenih površina za jednu koncentraciju prazikvantela pripremljenu dva puta.

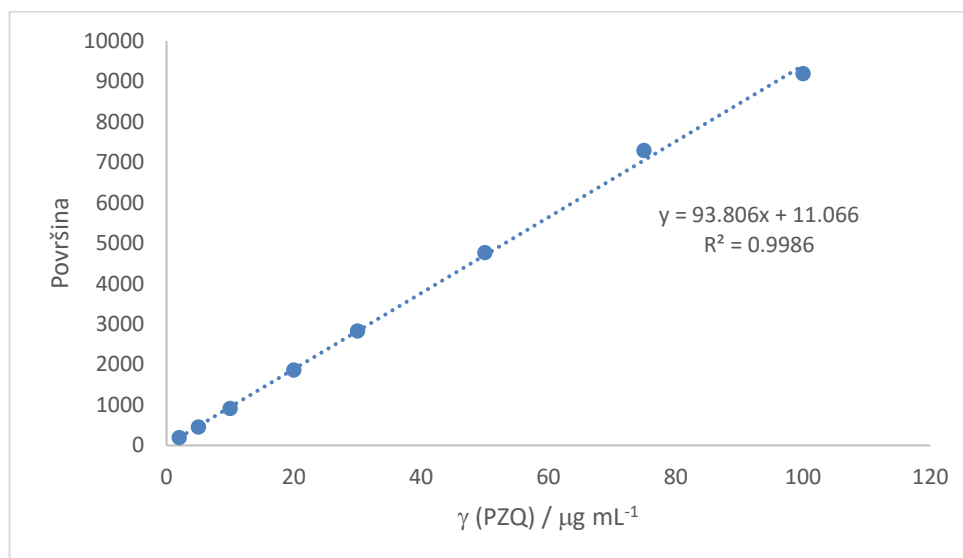
Tablica 10. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja intermedijarne preciznosti

	Površina			Pros. povr.	SD	%RSD
	1	2	3			
Prva priprema	2832,8	2833,4	3034,3	2841,4	107,1	3,8
Druga priprema	2704,6	2805,7	2837,4			

Na temelju dobivenih podataka o RSD, koji iznose 0,1–3,8 % za sva tri tipa preciznosti, može se zaključiti da su dobiveni zadovoljavajući rezultati. Dobivene vrijednosti %RSD moraju biti što niže kako bi metoda bila prihvatljiva, a ovi dobiveni rezultati su dovoljno niski da bi se ovom metodom mogli precizno analizirati uzorci.

4.1.3. Linearnost

Ispitana je linearnost ovisnosti površina pikova prazikvantela o koncentraciji te je konstruiran baždarni dijagram potreban za određivanje koncentracija prazikvantela za daljnja ispitivanja topljivosti. Jednadžba dobivenog baždarnog pravca glasila je $y = 93,806x + 11,066$, a pravac je prikazan na slici 14.



Slika 14. Ovisnost površine ispod pika o koncentraciji prazikvantela.

U ovom koncentracijskom području metoda je linearna. Vrijednost R^2 iznosi 0,9986, što je prihvatljivo za valjanost eksperimenta.

4.1.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije, odnosno LOD i LOQ, dobivene regresijskom analizom iznosile su $0,074 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $0,22 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.1.5. Robustnost

Mijenjano je nekoliko parametara kako bi se provjerila robustnost metode.

I. Utjecaj sastava mobilne faze (tablica 11.):**Tablica 11.** Provjera robustnosti uz mijenjanje sastava mobilne faze.

Mobilna faza	Površina	t_R / min
44 % ACN	3622,8	6,571
46 % ACN	3625,2	5,702
45 % ACN	3638,1	6,112
Prosječna vrijednost	3628,7	6,128
SD	8,2	0,435
%RSD	0,2	7,1

Iz rezultata dobivenih površina i vremena zadržavanja, pri promjeni sastava mobilne faze, može se zaključiti da je metoda dovoljno robusna te se može nastaviti ispitivanje ostalih uzoraka.

II. Utjecaj temperature kolone (tablica 12.):**Tablica 12.** Provjera robustnosti uz temperature kolone.

Temperatura	Površina	t_R / min
30 °C	3622,3	6,138
35 °C	3624,6	6,087
sobna	3638,1	6,112
Prosječna vrijednost	3628,3	6,122
SD	8,5	0,026
%RSD	0,2	0,417

Temperatura najmanje utječe na vrijeme zadržavanja i površine ispod pika. Na temelju %RSD vrijednosti, možemo zaključiti da se vrijeme zadržavanja i površine neznatno razlikuju međusobno, ali i od onih standardnih uvjeta. Vrijednosti %RSD su prihvatljive u sva tri slučaja.

III. Utjecaj protoka mobilne faze (tablica 13.)

Tablica 13. Provjera robustnosti uz promjenu protoka mobilne faze.

Protok	Površina	t_R / min
0,8 mL min ⁻¹	3016,7	5,113
1,2 mL min ⁻¹	4465,2	7,626
1,0 mL min ⁻¹	3638,1	6,112
Prosječna vrijednost	3706,7	6,284
SD	726,7	1,265
%RSD	19,6	20,1

Promjenom protoka mobilne faze, dolazi do većih odstupanja površina i vremena zadržavanja, što je i bilo za očekivati. Ako je protok kroz kolonu veći, vrijeme zadržavanja će biti manje, a površina ispod pika veća, dok je za manji protok vrijeme zadržavanja veće, a površina ispod pika je manja od optimalne.

Podaci ukazuju na to da je metoda robustna za daljnja ispitivanja te da male promjene kromatografskih parametara ne utječu značajno na rezultate, što je najbitnije za korištenje metode.

4.2. Probiranje („screening“)

Prije samog ispitivanja topljivosti potrebno je napraviti probiranje među potencijalnim uzorcima za naknadna ispitivanja topljivosti. Probiranje se izvodi kako bi se vidjelo kako ciklodekstrini i ternarne komponente (organske kiseline) utječu na otapanje prazikvantela. Probiranjem se dobiva gruba procjena o tome koje komponente pomažu, a koje odmažu ili ne utječu na otapanje prazikvantela.

Probiranjem je istraženo koliko se topljivost prazikvantela povećava, ili smanjuje, u ovisnosti o tome koja komponenta je dodana u smjesu. Istraživanje je pokazalo da se topljivost povećava 4–7 puta dodatkom svakog od istraživanih ciklodekstrina, pri čemu je najveće povećanje topljivosti (7,1 puta) pokazala smjesa prazikvantela i SBE-β-CD, a najmanje povećanje topljivosti smjesa prazikvantela i HP-β-CD, koja bila 4,9 puta veća od topljivosti samog prazikvantela u vodi. Smjese organskih kiselina i prazikvantela nisu pokazale znatno poboljšanje topljivosti u odnosu na sami prazikvantel, kao ni smjese organskih kiselina, ciklodekstrina i prazikvantela, već je u svim kombinacijama topljivost bila neznatno smanjena

ili slična. Stoga su ispitivanja topljivosti provedena samo na binarnim smjesama prazikvantela i ciklodekstrina.

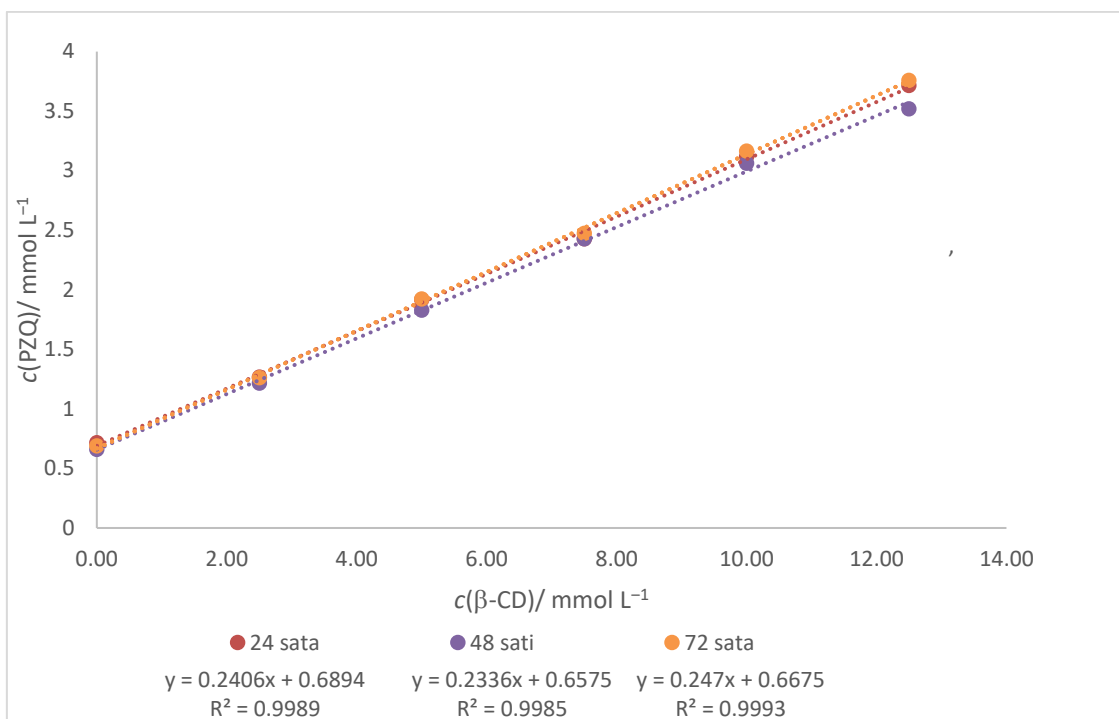
4.3. Određivanje topljivosti

Iz podataka dobivenih pri određivanju topljivosti konstruirani su dijagrami topljivosti prema Higuchiju i Connorsu za svaki pojedini ciklodekstrin. U tablici 14. prikazane su jednadžbe pravca za svaki pojedini ciklodekstrin.

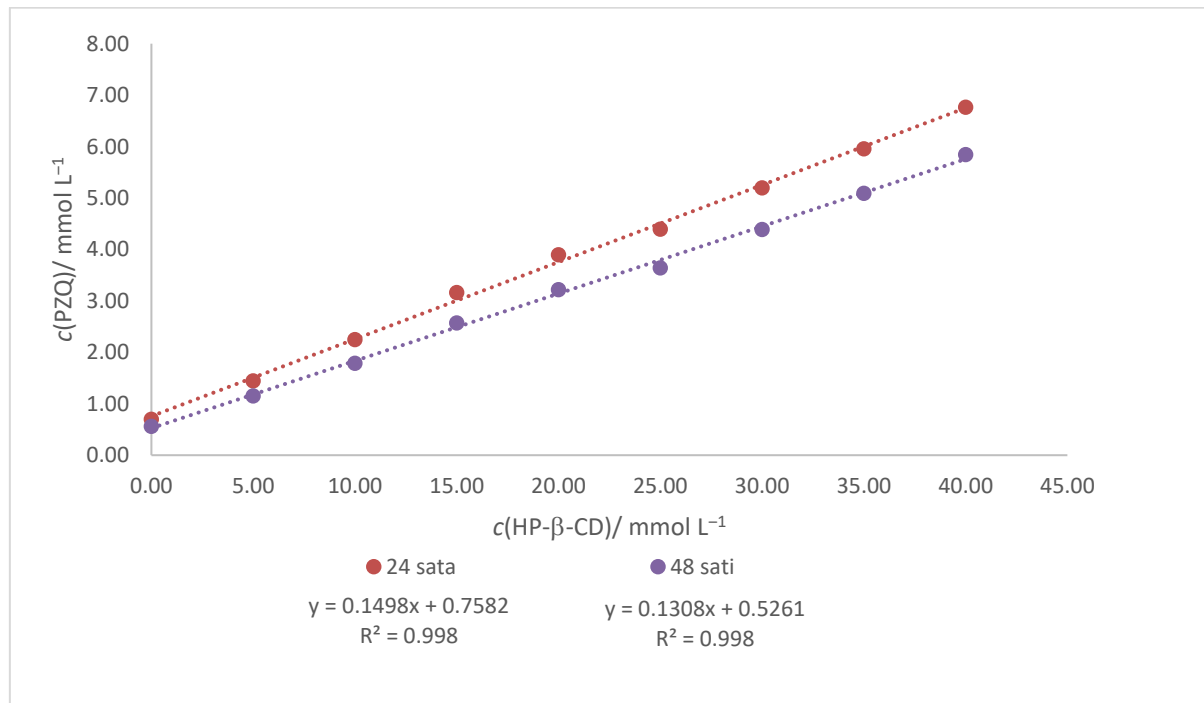
Tablica 14. Jednadžbe pravaca faznih dijagrama topljivosti PZQ i odabranih CD 24 sata nakon priprave uzoraka.

Jedn. pravaca	β -CD	HP- β -CD	SBE- β -CD	RM- β -CD
	$y = 0,247x + 0,6675$	$y = 0,1498x + 0,7582$	$y = 0,2278x + 0,8954$	$y = 0,2547x + 0,6223$

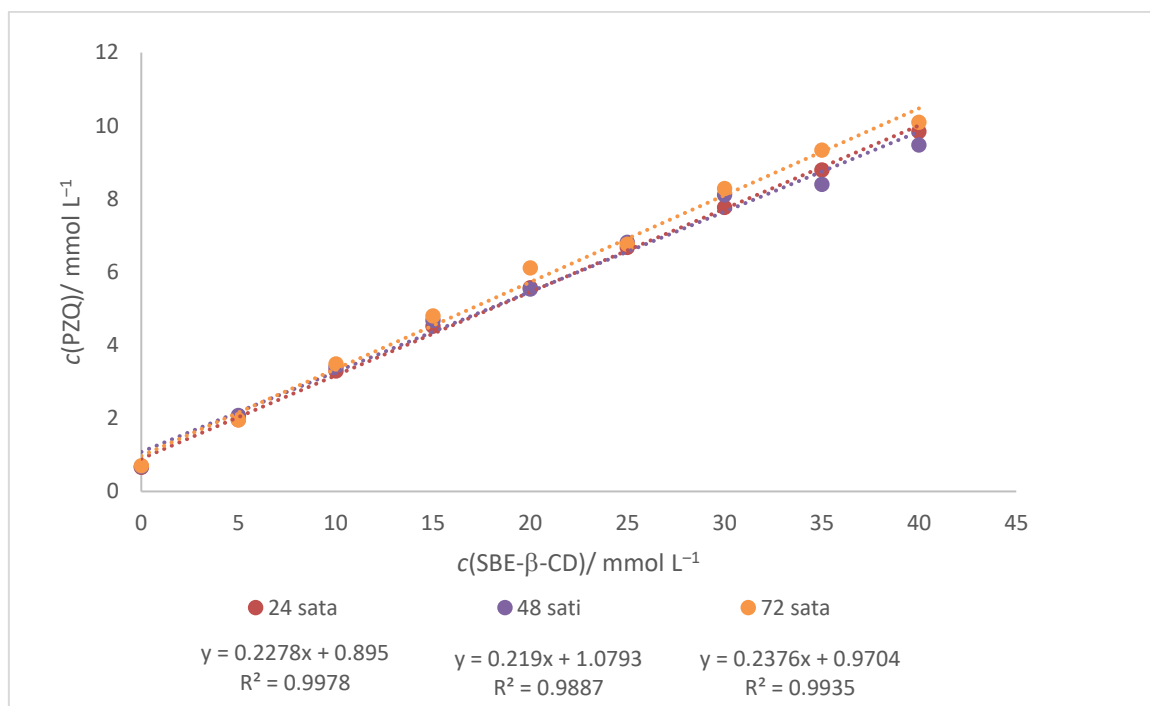
Na temelju rezultata određivanja topljivosti može se zaključiti da je ravnoteža uspostavljena unutar 24 sata, jer se podaci o topljivosti znatno ne razlikuju za analize provedene nakon 24, 48 i 72 sata od priprave uzoraka, što se može vidjeti iz slika 15., 16., 17. i 18. Iz tog razloga, za izračun konstante stabilnosti koristili su se podaci izmjereni nakon 24 sata od priprave otopina i mučkanja na tresilici.



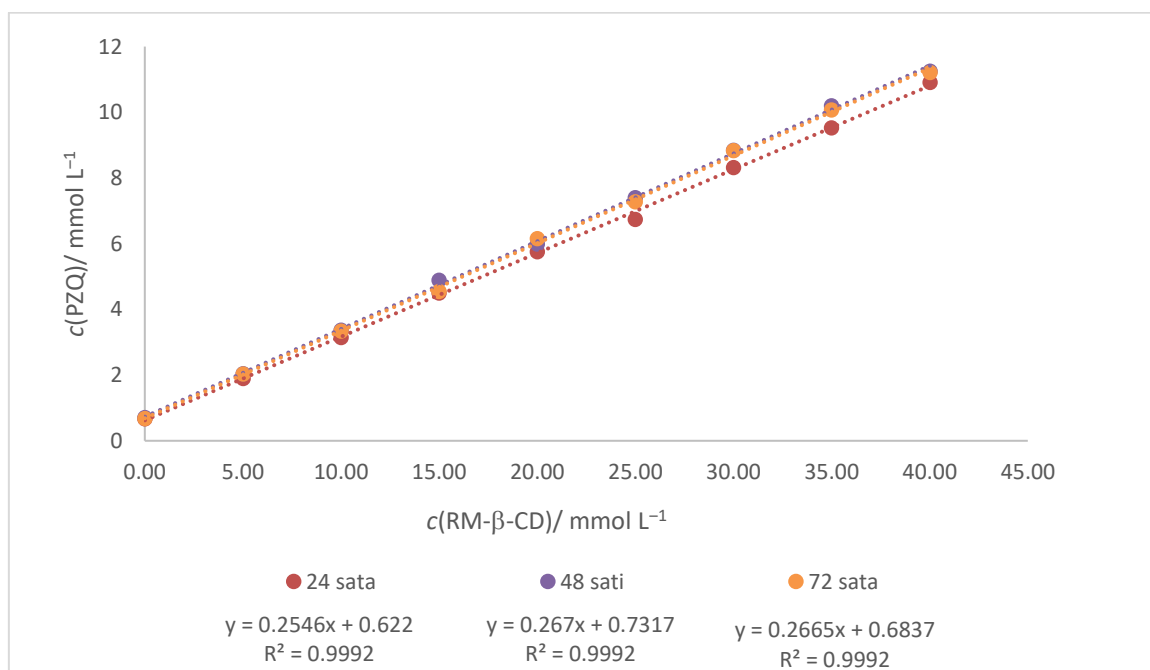
Slika 15. Ovisnost koncentracije prazikvantela o koncentraciji β -CD, mjereno 3 dana



Slika 16. Ovisnost koncentracije prazikvantela o koncentraciji HP- β -CD, mjereno dva dana



Slika 17. Ovisnost koncentracije prazikvantela o koncentraciji SBE- β -CD, mjereno tri dana



Slika 18. Ovisnost koncentracije prazikvantela o koncentraciji RM- β -CD, mjereno tri dana

Dobiveni dijagrami okarakterizirani su prema Higuchiju i Connorsu kao dijagrami tipa A, a krivulje topljivosti kao A_L , koje predstavljaju linearno povećanje topljivosti lijeka.⁴

Iz prikazanih jednadžbi određene su konstante stabilnosti za svaki pojedini ciklodekstrin, prema formuli

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

a efikasnost kompleksiranja za svaki ciklodekstrin izračunata je prema formuli

$$CE = \frac{1 - \text{nagib}}{\text{nagib}}$$

U tablici 15. prikazane su izračunate konstante zajedno sa eksperimentalno dobivenim S_0 i $S_{\max}$, pri čemu S_0 označava eksperimentalno dobivenu koncentraciju prazikvantela bez ciklodekstrina, a $S_{\max}$ koncentraciju prazikvantela pri najvećoj koncentraciji ciklodekstrina.

Tablica 15. Konstante stabilnosti i efikasnost kompleksiranja.

	β -CD	HP- β -CD	SBE- β -CD	RM- β -CD
$S_0/\text{ mmol L}^{-1}$	0,72	0,70	0,66	0,67
$S_{\max}/\text{ mmol L}^{-1}$	3,71	6,77	9,84	10,90
$K_{1:1}/\text{ mol}^{-1}\text{ L}$	442,22	251,01	448,72	512,64
CE	0,32	0,18	0,30	0,34

Na temelju vrijednosti konstanti stabilnosti može se zaključiti da je kompleks prazikvantela s RM- β -CD najstabilniji te da je taj ciklodekstrin najviše povećao topljivost prazikvantela u vodi.

Osim konstante stabilnosti, iz podataka o koncentraciji prazikvantela u uzorku s najvišom koncentracijom ciklodekstrina dobivaju se informacije o najvećoj topljivosti prazikvantela. Koncentracija prazikvantela, $S_{\max}$, je znatno povećana u odnosu na vrijednost S_0 , što nam također potvrđuje da je dodatak svakog ciklodekstrina povećao topljivost prazikvantela. Podaci o $S_{\max}$, kao i za $K_{1:1}$, pokazuju kako je RM- β -CD najviše povećao topljivost. $S_{\max}$ je kod β -CD nešto niža od očekivane, no najviša koncentracija β -CD je znatno niža od viših koncentracija ostalih korištenih ciklodekstrina. Topljivost β -CD u čistoj vodi puno je manja od topljivosti ostalih derivata ciklodekstrina te ona iznosi otprilike $0,016\text{ mol dm}^{-3}$, što znači da iznad te molarne koncentracije β -CD ne bi bio topljiv. Zbog toga koncentracija β -CD ne može biti veća od korištene.

Eksperimentalno dobivene vrijednosti S_0 međusobno se razlikuju, no u teoriji one bi trebale biti puno sličnije, budući da se u tim uzorcima nalazi samo jednaka količina

prazikvantela. Razlike u vrijednostima S_0 mogu biti posljedica pripreme i razrjeđivanja uzoraka za analizu. Budući da se te vrijednosti razlikuju, a pri izračunu konstante stabilnosti koristi se S_0 , to pokazuje da konstanta stabilnosti zapravo nije relevantan podatak o topljivosti kompleksa ciklodekstrin-lijek te je stoga, u nekim slučajevima, bolje koristiti podatke o efikasnosti kompleksiranja koji isključuju S_0 . Pri računanju efikasnosti kompleksiranja u obzir se uzima samo podatak o nagibu dobivenog baždarnog pravca i iz toga se mogu izvući daljnji zaključci o topljivosti kompleksa.

Konstante stabilnosti mogu se računati i pomoću S_0 koji je očitao iz baždarnog dijagrama, odnosno odsjeka na osi y. U tablici 16. prikazane su dobivene konstante te su uspoređene sa konstantama dobivenima kada se koristi eksperimentalno određen S_0 .

Tablica 16. Konstante stabilnosti

	β -CD	HP- β -CD	SBE- β -CD	RM- β -CD
S_0 /mmol L ⁻¹	0,69	0,76	0,90	0,62
$K_{1:1}$ / mol ⁻¹ L	459,51	232,38	329,46	549,16
S_0 /mmol L ⁻¹ eksp.	0,72	0,70	0,66	0,67
$K_{1:1}$ / mol ⁻¹ L eksp.	442,22	251,01	448,72	512,64

Vrijednosti S_0 očitane iz baždarnog dijagrama međusobno se razlikuju, kao što se razlikuju i od vrijednosti S_0 koje su dobivene eksperimentalno. S_0 očitane iz baždarnog pravca za β -CD i RM- β -CD nešto su niže nego eksperimentalno dobivene, a S_0 za HP- β -CD i SBE- β -CD su veće. Iz dobivenih konstanti stabilnosti zaključuje se da se one razlikuju, no ne znatno, od prethodno dobivenih konstanti. Najveća razlika u konstantama je za SBE- β -CD, dok se sve druge konstante djelomično poklapaju. Računanjem konstanti pomoću S_0 , dobivenih iz baždarnog dijagrama, može se ponovno potvrditi da $K_{1:1}$ nije najbolji pokazatelj topljivosti i stabilnosti nekog spoja u vodi, jer male razlike u vrijednostima S_0 mogu znatno utjecati na konačni rezultat.

Kao i kod prethodno dobivenih konstanti, najveće povećanje topljivosti pokazuje RM- β -CD, dok najmanje pokazuje HP- β -CD.

Iz svih prethodno navedenih zaključaka, ponovno se pokazalo da je puno preciznije topljivost iskazivati preko efikasnosti kompleksiranja, jer je ta veličina neovisna o S_0 (bila ona eksperimentalno dobivena ili očitana iz baždarnog dijagrama), dok $K_{1:1}$ ovisi o S_0 , što nije najpreciznija metoda, iako nam govori o stabilnosti kompleksa. Kod računanja konstante stabilnosti, osim S_0 , kao aproksimacija se uzima da nastaju kompleksi 1:1, što nije uvijek

najtočnije. U sustavu nastaju kompleksi različitih omjera, ali u znatno manjoj mjeri pa njihove koncentracije mogu biti zanemarene. Prilikom računanja efikasnosti kompleksiranja nije potrebna nikakva aproksimacija, budući da se S_0 ne koristi pri izračunu.

Konstanta stabilnosti za β -CD neznatno se razlikuje od konstante stabilnosti koju su eksperimentalno dobili Maragos i suradnici, a koja iznosi $412,2 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.³³ Konstanta stabilnosti za HP- β -CD razlikuje se nešto više od one dobivene u Maragosovim ispitivanjima ($365 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).³³ Variranje u konstantama može biti posljedica različitih priprema uzoraka i različitih metoda snimanja (UV/VIS). Osim toga, različite konstante mogu se pripisati i korištenjem različitog otapala, budući da je u ovom radu korišten $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer pri pH 7,4 umjesto vode.³³

Uspoređujući rezultate ovog eksperimenta i rezultate iz postojećih radova ponovno zaključujemo da se konstante stabilnosti za binarne sustave razlikuju. Za β -CD:PZQ konstanta dobivena iz prethodnog istraživanja koje su proveli Mourão i suradnici iznosi $233,25 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, a dobivena ovim eksperimentom $442,22 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Razlika u konstantama može se pripisati različitim izvorima S_0 te kao što je navedeno već prije, S_0 najviše utječe na vrijednost konstante stabilnosti. Na topljivost PZQ, koji je već u kompleksu s β -ciklodekstrinom, negativno utječe dodatak HPMC, koji smanjuje konstantu stabilnosti za 1 %.³⁶

Münster i suradnici odredili su konstante stabilnosti za prazikvantel uz HP- β -CD i SBE- β -CD. Radili su eksperimente i s maltodekstrinom, no maltodekstrin nije pokazao zadovoljavajuće rezultate. $K_{1:1}$ za PZQ:SBE- β -CD iznosi $365,11 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, a za PZQ:HP- β -CD $228,71 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Vrijednosti efikasnosti kompleksiranja redom iznose 0,26 i 0,16. Rezultati iz literature³⁷ dobro se poklapaju s rezultatima iz ovog rada.

Becketovim istraživanjem α -, β - i γ -ciklodekstrina ustanovljeno je da najveću uspješnost u povećanju topljivosti ima β -ciklodekstrin iako su sva tri tipa ciklodekstrina pokazala povećanje topljivosti. Konstante stabilnosti iznosile su redom $56,18 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, $396,91 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ i $15,17 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Becketova konstanta stabilnosti kompleksa prazikvantela i β -ciklodekstrina nešto je niža od one dobivene ovim eksperimentom.³⁹ Sve navedene konstante stabilnosti prikazane su u tablica 17.

Tablica 17. Vrijednosti konstanti stabilnosti iz različitih literaturnih izvora

	$K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{ L}$		
	$\beta\text{-CD}$	SBE- $\beta\text{-CD}$	HP- $\beta\text{-CD}$
Ovaj rad	459,51	329,46	232,38
Maragos	412,2	/	365
Mourão	233,25	/	/
Münster	/	365,11	228,71
Becket	396,91	/	/

Kao što se može uočiti, vrijednosti konstanti određene u ovom radu samo u nekim slučajevima se dobro podudaraju s onima iz literature. Razlike u izračunatim konstantama stabilnosti mogu se pripisati različitim analitičkim tehnikama kojima se određivala koncentracija prazikvantela, kao i razlike u vrijednostima S_0 koje znatno utječu na vrijednosti konstanti.

§ 5. ZAKLJUČAK

Validirana je metoda određivanja koncentracije prazikvantela tekućinskom kromatografijom. Metoda se pokazala linearna u širokom koncentracijskom rasponu s dovoljno niskim granicama detekcije i kvantifikacije. Robustnost i preciznost metode su bili zadovoljavajući, a prisutnost ciklodekstrina nije utjecala na kromatogram prazikvantela.

Na temelju rezultata ispitivanja topljivosti određene su konstante stabilnosti kompleksa prazikvantela s ciklodekstrinima prema Higuchijevom i Connorsovom pristupu. Dijagrami ovisnosti su tipa A, a krivulje tipa A_L , odnosno uočeno je linearno povećanje topljivosti prazikvantela s porastom koncentracije ciklodekstrina. Na temelju dobivenih dijagrama određene su i efikasnosti kompleksiranja. Efikasnost kompleksiranja je zbog svoje neovisnosti o vrijednosti S_0 puno bolji izbor za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa prazikvantela i ciklodekstrina. Konstante stabilnosti kompleksa PZQ s β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD redom iznose $442,22 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, $251,01 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, $448,72 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ i $512,64 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Iz vrijednosti konstanti stabilnosti može se zaključiti da je kompleks PZQ/RM- β -CD najstabilniji. Ujedno, taj kompleks najviše povećava topljivost PZQ, a time i bioraspoloživost lijeka. Vrijednosti efikasnosti kompleksiranja za svaki pojedini ciklodekstrin redom iznose 0,32, 0,18, 0,30 i 0,34. Jednako kao i vrijednosti $K_{1:1}$, vrijednosti CE pokazuju da je RM- β -CD najbolji izbor za povećanje topljivosti lijeka.

Usporedbom rezultata prijašnjih istraživanja, sa rezultatima dobivenim u ovom radu, mogu se vidjeti neslaganja u izračunatim konstantama stabilnosti. Međutim, te razlike se mogu pripisati različitim analitičkim tehnikama kojima se određivala koncentracija prazikvantela, kao i razlike u dobivenim S_0 koje znatno utječu na rezultate.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN - acetonitril

β -CD – β -ciklodekstrin

BCS – Biofarmaceutski sustav klasifikacije

CA – limunska kiselina

CE – efikasnost kompleksiranja

DSC – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

HP- β -CD – hidroksipropil- β -ciklodekstrin

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPMC – hidroksipropil metilceluloza

IR – infracrvena spektroskopija

LOD – granica detekcije

LOQ – granica kvantifikacije

MA – jabučna kiselina

MD – maltodekstrin

MS – spektrometrija mase

Me- β -CD – metil- β -ciklodekstrin

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

PEG – polietilen glikol

PVP – polivinilpirolidon

RM- β -CD – nasumično metilirani β -ciklodekstrin

RT – vrijeme zadržavanja

SA – jantarna kiselina

SD – standardna devijacija

RSD – relativna standardna devijacija

SBE- β -CD – sulfobutileter- β -ciklodekstrin

TA – vinska kiselina

UV/VIS – ultraljubičasto/vidljivo

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. C. T. Abhiman, J. H. Anantrao, *Indo Am. J. Pharm. Res.* **7** (2017) 604–612.
2. M. Cugovčan, J. Jablan, J. Lovrić, D. Cinčić, N. Galić, M. Jug, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137** (2017) 42–53.
3. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 1–10.
4. T. Higuchi, K. A. Connors, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **4** (1964) 117–210.
5. International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology Q2 (R1)*, (2015).
6. G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, J. R. Crison, *Pharm. Res.* **12** (1995) 413–420.
7. N. K. Sachan, A. Bhattacharya, S. Pushkar, A. Mishra, *Asian. J. Pharm.* **3** (2009) 76–81.
8. G. L. Amidon, R. Lobenberg, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (2000) 3–12.
9. K. T. Savjani, A. K. Gajjar, J. K. Savjani, *ISRN Pharm.* **100** (2012) 1–10.
10. <http://struna.ihjj.hr/naziv/bioraspolozivost/35628/> (datum pristupa 30. lipnja 2019.)
11. T. Ethiraj, R. Sujitha, V. Ganesan, *Int. J. Pharm.* **3(4)** (2013) 875–882.
12. H. O. Ammar, H. A. Salama, M. Ghorab, A. A. Mahmoud, *Int. J. Pharm.* **320** (2006) 53–57.
13. P. H. L. Lamberton, C. L. Faust, J. P. Webster, *Infect. Dis. Poverty.* **6** (2017) 1–11.
14. M. Woelfle, J. P. Seerden, J. de Gooijer, K. Pouwer, P. Olliaro, M.H. Todd, *PloS. Neglected Trop. Dis.* **5** (2011) 1–8.
15. D. I. Quinn, R. O. Day, *Drug Saf.* **12** (1995) 393–452.
16. C. M. Masimirembwa, Y. S. Naik, J. A. Hasler, *Biopharm. Drug Dispos.* **15** (1994) 33–43.
17. A. Metwally, J. L. Bennett, S. Botros, F. Ebeid, *Drug Res.* **45** (1995) 516–518.
18. E. M. M. Del Valle, *Process. Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
19. K. H. Frömming, J. Szejtli, *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1993)

20. http://atpchems.com/atpchemis/index.php?categoryid=32&m17_sectionid=10&m17_imageid=30 (datum pristupa 05. srpnja 2019.)
21. M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **3** (2004) 1023–1035.
22. A. Srivastava, J. M. Hunter, *Br. J. Anaesth.* **103** (2009) 115–129.
23. V. B. Chaudhary, S. S. Pharmacy, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **4** (2013) 68–76.
24. F. Kayaci T. Uyar, *Food Chem.* **133** (2012) 641–649.
25. J. Szejtli, *Chem. Rev.* **98** (1998) 1743–1745.
26. F. Hirayama, K. Uekama, *Adv. Drug Delivery Rev.* **36** (1999) 125–141.
27. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **63** (2011) 1119–1135.
28. S. V. Kurkov, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **453** (2013) 167–180.
29. <https://medkoo.com/products/10978> (datum pristupa 7. srpnja 2019)
30. <http://hr.cyclodextrin2.com/beta-cyclodextrin-sulfoethyl-ether-sodium> (datum pristupa 7. srpnja 2019.)
31. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/I02998> (datum pristupa 9. srpnja 2019.)
32. R. L. Carrier, L. A. Miller, I. Ahmed, *J. Controlled Release.* **123** (2007) 78–99.
33. S. Maragos, H. Archontaki, P. MacHeras, G. Valsami, *AAPS PharmSciTech* **10** (2009) 1444–1451.
34. M. B. de Jesus, L. D. M. A. Pinto, L. F. Fraceto, L. A. Magalhães, E. M. Zanotti–Magalhães, E. De Paula, *J. Drug Targeting* **18** (2010) 21–26.
35. L. C. da Silva Mourão, D. R. M. Ribeiro Batista, S. B. Honorato, et al., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **85** (2016) 151–160.
36. M. Münster, A. H. A. Mohamed-Ahmed, L. I. Immohr, et al., *Int. J. Pharm.* **529** (2017) 310–318.
37. S. G. Rodrigues, I. D. S. Chaves, N. F. S. De Melo, et al., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **70** (2011) 19–28.
38. G. Becket, L. J. Schep, M. Y. Tan, *Int. J. Pharm.* **179** (1999) 65–71.
39. T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **57** (2007) 545–552.
40. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=kromatografija> (datum pristupa 20. srpnja 2019.)
41. Y. Kazakevich, R. LoBrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, (2006) 10–11; 32.

42. <https://www.idex-hs.com/literature-tools/educational-materials/hplc-center/> (datum pristupa i obrade 21. srpnja 2019.)
43. H. O. Hashim, *Chromatography and HPLC principles*, University of Babylon, 2018., 5–9.
44. <https://struna.ihjj.hr/naziv/gradijentno-eluiranje/2963/> (datum pristupa 21. srpnja 2019.)
45. T. Bolanča, Š. Ukić, *Ionska kromatografija*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015., 6–7.
46. Europska farmakopeja 5. izd., Vijeće Europe, Strasbourg, 2005., 2294–2295.
47. <http://www.belupo-dd.ru/Default.aspx?sid=6941> (preuzeto 06.08.2019)

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Tagliaretti

Datum rođenja: 17. lipnja 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001–2009 Osnovna škola Zapruđe, Zagreb

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

2013–2017 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2017–2019 Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018. 11. Otvoreni dan kemijskog odsjeka

2019. 12. Otvoreni dan kemijskog odsjeka