

Priprava, karakterizacija i stabilnost supramolekulskih sustava nabumetona i derivata β -ciklodekstrina u čvrstom stanju i otopini

Klarić, David

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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:217:759313>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

David Klarić

**Priprava, karakterizacija i stabilnost
supramolekulskih sustava nabumetona i derivata
 β -ciklodekstrina u čvrstom stanju i otopini**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2024.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

David Klarić

**Preparation, characterization, and stability of
supramolecular systems of nabumetone and
 β -cyclodextrin derivatives in the solid state and in
solution**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. Nives Galić, Professor

Zagreb, 2024.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za analitičku kemiju pri Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Galić.

Doktorska disertacija izrađena je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom
„Priprava, karakterizacija i biokompatibilnost novih supramolekulskih kompleksa
lijek/ciklodekstrin i lijek/dekstrinske nanospužve s poboljšanim svojstvima“
(IP-2022-10-6033).

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Galić najprije na ukazanom povjerenju, korektnom i ljubaznom odnosu, a zatim i na prenesenom znanju, uloženom trudu, vodstvu, savjetima, konstantnoj podršci i motivaciji tijekom izrade ovog doktorskog rada, ali i općenito tijekom rada na Zavodu za analitičku kemiju. Zahvaljujem se i članovima povjerenstva, prof. dr. sc. Ines Primožič, prof. dr. sc. Željki Soldin i prof. dr. sc. Šimi Ukiću na konstruktivnim savjetima i ispravicima koji su ovaj rad učinili još kvalitetnijim.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Budimir na pomoći tijekom provođenja i interpretiranja rezultata mikrokalorimetrijskih titracija.

Veliko hvala prof. dr. sc. Mariju Jugu na velikoj pomoći i strpljenju, na svakom podijeljenom radu, savjetu i na vrlo ugodnoj suradnji tijekom izrade ovog rada!

Također, hvala dr. sc. Ani Čikoš na vrlo ugodnoj suradnji!

Veliko hvala dugujem svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na konstantnoj podršci i ugodnoj radnoj okolini. Posebno hvala Marijani Pocrnić na lijepoj atmosferi u uredu i jer je uvijek bila spremna pomoći!

Hvala Antunu, Marku, Karlu, Mirni, Dini, Ani, Katarini J., Zlatanu, Katarini R., Ediju, Nei, Ozani, Nikoli, Danijeli, Zoe i Juraju na svim kavama, druženjima i lijepim uspomnama! Jednako tako hvala prijateljima iz studentskih dana, Katarini, Lori, Ani, Ivani i Borni koji su uvijek bili velika podrška!

Na kraju, hvala mojoj obitelji, a posebno mojoj sestri, roditeljima i mojoj Dariji na neizmjerne podršci koju su mi uvijek pružali! Ovaj rad posvećujem njima.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XII
ABSTRACT	XIV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Slabo topljivi lijekovi	3
2.1.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari	3
2.1.2. Strategije poboljšanja topljivosti slabo topljivih djelatnih tvari.....	8
2.2. Ciklodekstrini	11
2.2.1. Povijest otkrića ciklodekstrina.....	11
2.2.2. Struktura i svojstva ciklodekstrina.....	12
2.2.3. Derivati ciklodekstrina.....	14
2.3. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina	17
2.3.1. Utjecaj ciklodekstrina na topljivost gosta.....	19
2.3.2. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost gosta.....	24
2.4. Analiza inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina.....	28
2.4.1. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u otopini.....	28
2.4.2. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju	32
2.5. Validacija analitičkih postupaka	35
2.6. Nabumeton.....	36
2.6.1. Inkluzijski kompleksi nabumetona s ciklodekstrinima	38
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	42
3.1. Kemikalije i materijali.....	42
3.1.1. Priprava simuliranih biorelevantnih medija.....	43
3.2. Metode.....	43
3.2.1. Solubilizacijska istraživanja	43
3.2.2. Spektrofluorimetrijske titracije nabumetona β -ciklodekstrinima.....	44
3.2.3. Mikrokolorimetrijske titracije nabumetona β -ciklodekstrinima	45
3.2.4. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa spektrometrijom masa	45
3.2.5. Priprava binarnih sustava NAB: β -CD u čvrstom stanju	47
3.2.6. Karakterizacija čvrstih sustava NAB: β -CD razlikovnom pretražnom kalorimetrijom	49
3.2.7. Karakterizacija čvrstih sustava NAB: β -CD difrakcijom rendgenskog zračenja u polikristalnom uzorku	49

3.2.8. Karakterizacija čvrstih sustava NAB:β-CD FT-IR ATR spektroskopijom.....	50
3.2.9. Određivanje brzine otapanja nabumetona in vitro.....	50
3.2.10. Određivanje saturacijske topljivosti čvrstih sustava NAB:β-CD.....	51
3.2.11. Provođenje studija stabilnosti.....	51
3.2.12. Validacija analitičkih postupaka.....	54
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	58
4.1. Solubilizacijska istraživanja – utjecaj različitih β-CD na topljivost nabumetona	60
4.2. Inkluzijski kompleksi nabumetona s različitim β-ciklodekstrinima u otopini	65
4.2.1. Spektrofluorimetrijske titracije nabumetona β-ciklodekstrinima.....	65
4.2.2. Mikrokolorimetrijske titracije nabumetona β-ciklodekstrinima	70
4.2.3. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa nabumetona i različitih β-ciklodekstrina spektrometrijom masa.....	72
4.2.3.1. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa trostrukim kvadrupolom	74
4.3. Karakterizacija NAB i smjesa NAB s različitim β-CD u čvrstom stanju	87
4.3.1. Analiza nabumetona u čvrstom stanju	88
4.3.2. Karakterizacija smjesa NAB:β-CD u čvrstom stanju	88
4.3.3. Karakterizacija smjesa NAB:HP-β-CD u čvrstom stanju.....	92
4.3.4. Karakterizacija smjesa NAB:RM-β-CD u čvrstom stanju	96
4.3.5. Karakterizacija smjesa NAB:SBE-β-CD u čvrstom stanju	99
4.3.6. Istraživanje brzine otapanja nabumetona in vitro iz smjesa s različitim β-CD.....	102
4.4. Utjecaj različitih β-CD na stabilnost nabumetona.....	108
4.4.1. Studije prisilne razgradnje na NAB i odabranim NAB:β-CD sustavima.....	108
4.4.1.1. Studije prisilne hidrolitičke razgradnje u kiselom mediju.....	112
4.4.1.2. Studije prisilne hidrolitičke razgradnje u neutralnom mediju	117
4.4.1.3. Studije prisilne hidrolitičke razgradnje u alkalnom mediju.....	118
4.4.1.4. Studije prisilne razgradnje u oksidativnom mediju.....	119
4.4.2. Studije fotostabilnosti.....	133
4.4.3. Studije dugotrajne stabilnosti	134
§ 5. ZAKLJUČAK	135
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	138
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	140
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXXXVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I STABILNOST SUPRAMOLEKULSKIH SUSTAVA NABUMETONA I DERIVATA β -CIKLODEKSTRINA U ČVRSTOM STANJU I OTOPINI

David Klarić

Kemijski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a,
Zagreb, Hrvatska

Nabumeton je nesteroidni protuupalni predlijek slabe topljivosti koja se može poboljšati kompleksiranjem s ciklodekstrinima. Detaljno je istražen utjecaj β -ciklodekstrina i njegovih hidroksipropiliranih, nasumično metiliranih i sulfobutiliranih derivata na topljivost nabumetona u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima (želučani, duodenalni i intestinalni medij). Inkluzijski kompleksi nabumetona i različitih β -ciklodekstrina u otopini okarakterizirani su spektrofotometrijom, izotermnom titracijskom kalorimetrijom i spektrometrijom masa te je određen sastav kompleksa i termodinamičke veličine ($\log K$, $\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r S^\circ$, i $\Delta_r G^\circ$). Na temelju rezultata solubilizacijskih istraživanja odabrani su pogodni binarni sustavi NAB:CD koji su u čvrstom stanju pripremljeni mehanokemijskom aktivacijom te detaljno okarakterizirani primjenom tehnika DSC, FT-IR i PXRD. Nakon određivanja topljivosti te brzine i opsega otapanja nabumetona *in vitro*, odabrani su sustavi NAB:CD optimalnih karakteristika, koji su podvrgnuti eksperimentima prisilne razgradnje, studijama dugotrajne stabilnosti te studijama fotostabilnosti. Stabilnost je praćena razvijenim i validiranim metodama tekućinske kromatografije. Strukture razgradnih produkata predložene su temeljem rezultata tandemne spektrometrije masa (HRMS/MS). Postignuti rezultati dobar su temelj za razvoj novih terapijskih oblika nabumetona poboljšanih svojstava.

(153+XCI stranice, 72 slike, 36 tablica, 158 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ciklodekstrini / inkluzijski kompleksi / nabumeton / stabilnost / topljivost

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Rad prihvaćen: 4. rujna 2024.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. prof. dr. sc. Šime Ukić



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND STABILITY OF SUPRAMOLECULAR SYSTEMS OF NABUMETONE AND β -CYCLODEXTRIN DERIVATIVES IN THE SOLID STATE AND IN SOLUTION

David Klarić

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia

Nabumetone is a NSAID prodrug with poor solubility that can be improved by complexing with cyclodextrins. The influence of β -cyclodextrin and its hydroxypropylated, randomly methylated, and sulfobutylated derivatives on the solubility of nabumetone in water and simulated biorelevant media (gastric, duodenal and intestinal media) was investigated in detail. The characterization of inclusion complexes of nabumetone and various β -cyclodextrins in solution was carried out using spectrofluorimetry, isothermal titration calorimetry, and mass spectrometry, and the complex stoichiometry and thermodynamic parameters ($\log K$, $\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r S^\circ$ and $\Delta_r G^\circ$) were determined. Based on the results of phase-solubility analysis, suitable binary systems NAB:CD were selected and prepared in the solid state by mechanochemical activation. They were characterized in detail using DSC, FT-IR, and PXRD techniques. Based on the determination of solubility and dissolution rate of nabumetone *in vitro*, NAB:CD systems with optimal characteristics were selected, and subjected to forced degradation experiments, long-term stability studies, and photostability studies. Stability was monitored by developed and validated liquid chromatography methods. Degradation product structures were proposed based on the results of tandem mass spectrometry experiments (HRMS/MS). The obtained results are a good basis for the development of new pharmaceutical formulations of nabumetone with improved properties.

(153+XCI pages, 72 figures, 36 tables, 158 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: cyclodextrins / inclusion complexes / nabumetone / solubility / stability

Supervisor: Dr. Nives Galić, Professor

Thesis accepted: September 4, 2024

Reviewers:

Dr. Ines Primožič, Professor

Dr. Željka Soldin, Professor

Dr. Šime Ukić, Professor

§ 1. UVOD

Niska topljivost nekih djelatnih tvari još uvijek je jedan od najizazovnijih problema s kojim se suočava farmaceutska industrija. Proces razvoja inovativnih terapijskih sustava koji su sadržavali teško topive lijekove tijekom posljednjih nekoliko desetljeća bio je znatno otežan. Budući da određen broj takvih sustava ne dopijeva na komercijalno tržište, industrija je bila u stalnoj potrazi za strategijama koje omogućavaju poboljšanje topljivosti novih sustava te reformulaciju postojećih. Kao rezultat suočavanja s takvim poteškoćama razvijen je velik broj različitih tehnologija koje se koriste za nadilaženje problema slabe topljivosti djelatnih tvari u vodenim otopinama, a posljedično i smanjene bioraspoloživosti takvih tvari. Krajnji cilj prilikom osmišljavanja i razvoja ovakvih tehnologija uvijek je bio jednak, ušteda financijskih sredstava i vremena uz ubrzanje razvoja novih formulacija.

Pretpostavlja se da oko 40 % djelatnih tvari koje su trenutno dostupne na komercijalnom tržištu spada u slabo topljive.^{1,2} Uslijed upotrebe automatiziranih probira visoke propusnosti (engl. *high-throughput screening*), računalnih metoda te kombiniranih kemijskih pristupa prilikom dizajna novih lijekova u modernoj farmaceutskoj industriji, udio takvih teško topljivih potencijalnih djelatnih tvari koje su još uvijek u fazi razvoja iznosi čak i do 90 %. Naime, kao rezultat ovakvih modernih pristupa čija je upotreba posljedica utjecaja genomike i molekularne biologije na biomedicinska i farmaceutska istraživanja, javljaju se potencijalno visokopotentne djelatne tvari pri čemu se njihova interakcija s ciljnim receptorima često temelji na hidrofobnim interakcijama. Većina takvih tvari posjeduje izražen hidrofoban, odnosno lipofilan karakter.²

Svaka djelatna tvar je jedinstvena i ne postoji jedan pristup koji bi riješio problem ograničene bioraspoloživosti za sve tvari. Potrebno je dobro razumijevanje farmakokinetičkog profila djelatne tvari kako bi se zaključilo je li njena niska bioraspoloživost posljedica ograničene apsorpcije ili nekog fiziološkog procesa kao što je primjerice metabolizam ili efluks.¹ Kako bi se pronašla optimalna strategija za rješavanje problema niske bioraspoloživosti uzrokovane ograničenom apsorpcijom potrebno je detaljno poznavanje fizikalnih, kemijskih i biofarmaceutskih svojstava i njihovog utjecaja na konačnu bioraspoloživost te djelatne tvari. Potrebno je utvrditi ograničavajući čimbenik apsorpcije, odnosno je li riječ o topljivosti, brzini otapanja ili permeabilnosti djelatne tvari. Problem ograničene topljivosti djelatnih tvari danas se u farmaceutskoj industriji nadilazi širokim spektrom različitih strategija koje možemo

razvrstati na one koje se temelje na fizikalnim ili kemijskim modifikacijama same djelatne tvari te na one koje se odnose na dizajn i oblikovanje terapijskog sustava, odnosno farmaceutske formulacije.^{1,3,4} Jedna od često korištenih strategija poboljšanja topljivosti, bioraspoloživosti, ali i stabilnosti djelatnih tvari je kompleksiranje ciklodekstrinima. Ovi karakteristični prirodni makrocikli su zahvaljujući svojoj multifunkcionalnosti postali sveprisutni u području oblikovanja novih terapijskih sustava. Njihova upotreba u farmaceutskoj industriji se do sada najčešće temeljila na njihovoj sposobnosti tvorenja nekovalentnih inkluzijskih kompleksa s hidrofobnim djelatnim tvarima što je rezultiralo velikim brojem komercijalno dostupnih terapijskih sustava koji sadrže ciklodekstrine. Ipak, današnja upotreba ciklodekstrina nije strogo ograničena na nekovalentne inkluzijske komplekse već se neke djelatne tvari sintetskim putem kompleksiraju ciklodekstrinima kovalentnim vezanjem pri čemu ciklodekstrin primjerice ima zadaću nosača djelatne tvari za dostavu na ciljno mjesto.⁵

Primjer djelatne tvari koja ima ograničenu bioraspoloživost uslijed vrlo niske topljivosti u vodenom mediju je nabumeton. Nabumeton je predlijek koji se svrstava u nesteroidne protuupalne lijekove (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) s analgetičkim i antipiretskim djelovanjem. Klinički se najčešće koristi za liječenje akutnog i reumatoidnog artritisa. Za razliku od većine ostalih NSAID lijekova nabumeton, uslijed izostanka kiselih svojstva, ne izaziva iritacije gastrointestinalnog (GI) sustava.⁶ Uzimajući u obzir činjenicu kako se radi o vrlo potentnom predlijeku s jako dobrim svojstvima može se zaključiti kako postoji interes za razvijanjem novih terapijskih oblika nabumetona koji bi poboljšali njegovu topljivost, a posljedično i njegovu bioraspoloživost.

U okviru ove doktorske disertacije provedena je detaljna analiza utjecaja β -ciklodekstrina i njegovih sintetskih derivata na topljivost nabumetona. Supramolekulski kompleksi nabumetona s navedenim ciklodekstrinima u otopini i u čvrstom stanju opsežno su okarakterizirani većim brojem analitičkih tehnika. Nakon detaljne karakterizacije odabrani su oni sustavi nabumetona koji su posjedovali najbolje karakteristike kako bi se provjerila njihova stabilnost. Saznanja dobivena u okviru ove doktorske disertacije daju detaljan uvid u mehanizme nastajanja inkluzijskih kompleksa nabumetona i β -ciklodekstrina na temelju kojih će se moći razviti novi terapijski sustavi, odnosno formulacije lijeka poboljšanih svojstava.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Slabo topljivi lijekovi

Primjena inovativnih metoda uz neka druga napredovanja u farmaceutskoj industriji u bliskoj prošlosti dovela je do mnogih uzbudljivih otkrića u području dizajna novih lijekova. Ipak, čak i kada nova djelatna tvar pokazuje iznimna svojstva i terapijski učinak, ukoliko ona ne može dosegnuti dovoljnu koncentraciju u sistemskej cirkulaciji ukupna strategija dostave djelatne tvari na ciljno mjesto može biti kompromitirana. Ograničena bioraspodijelivost uzrokovana nedovoljnom apsorpcijom djelatne tvari, a koja je posljedica njene slabe topljivosti trenutno je jedan od najvećih problema s kojim se farmaceutska industrija nosi budući da se čak i do 90 % djelatnih tvari u fazi razvoja može okarakterizirati kao slabo topljivo.^{1,2,4,7} Kada se govori o topljivosti važno je razlikovati nekoliko različitih termina. Termodinamička, odnosno ravnotežna topljivost je vrijednost koncentracijskog ograničenja neke tvari koji je dosegnut pri termodinamičkoj ravnoteži. Prividna topljivost (engl. *apparent solubility*) označava eksperimentalno određenu koncentraciju neke otopljene tvari izvan ravnotežnih uvjeta. Ona može biti veća od termodinamičke topljivosti ukoliko dolazi do prezasićenja, ili može biti niža od nje ukoliko je vrijeme za dostizanje termodinamičke topljivosti bilo nedovoljno. Intrinzička topljivost se odnosi na koncentraciju neionizirane tj. neutralne otopljene tvari te se može odrediti u specifičnom području pH-vrijednosti u kojem su nenabijene molekule otopljene tvari dominantne.⁸

2.1.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari

Amidon i sur. su 1995. godine predložili jedinstven način klasificiranja djelatnih tvari prema njihovoj topljivosti i intestinalnoj permeabilnosti.⁹ Biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. *biopharmaceutics classification system*, BCS) dijeli djelatne tvari u četiri skupine (slika 1). Prvu skupinu čine dobro topljive i dobro permeabilne djelatne tvari, drugu čine slabo topljive i dobro permeabilne tvari, treću čine dobro topljive i slabo permeabilne tvari, dok četvrtu skupinu čine djelatne tvari slabe topljivosti i slabe permeabilnosti.



Slika 1. Podjela djelatnih tvari u četiri skupine prema BCS-u

Matematički model BCS-a počiva na Noyes-Whitneyjevoj jednadžbi iz 1897. godine koja opisuje brzinu otapanja čvrstih tvari, a koja je proporcionalna topljivosti te tvari.^{7,10} Prema tome, topljivost djelatne tvari glavni je parametar BCS-a. Danas je poznato da na opseg apsorpcije djelatne tvari s oralnom primjenom utječu fizikalno-kemijski čimbenici (topljivost, stabilnost, pK_a -vrijednost djelatne tvari, veličina čestica, kristalni oblik itd.), fiziološki čimbenici (pH-vrijednosti GI sustava, prokrvljenost GI sustava itd.), čimbenici svojstveni različitim terapijskim sustavima (tablete, kapsule, suspenzije, gelovi itd.) te vrijeme zadržavanja djelatne tvari i razlike u apsorpcijskim mehanizmima koji utječu na permeabilnost u različitim dijelovima GI sustava.¹¹ Prema spomenutom Amidonovom istraživanju, cjelokupna podjela djelatnih tvari na četiri skupine zasniva se na tri bezdimenzijske veličine koje u obzir uzimaju fizikalno-kemijske te fiziološke čimbenike i definiraju apsorpciju bilo koje djelatne tvari s oralnom primjenom, a to su apsorpcijski broj (A_n), broj brzine oslobađanja (D_n) te dozni broj (D_0)¹¹:

$$A_n = \frac{P_{\text{eff}}}{R} \cdot t_{\text{res}} = \frac{t_{\text{res}}}{t_{\text{aps}}} \quad (1)$$

pri čemu P_{eff} označava permeabilnost, R označava polumjer lumena crijeva, t_{res} označava srednje vrijeme zadržavanja djelatne tvari u GI sustavu, a t_{aps} konstantu brzine apsorpcije.

$$D_n = \frac{DC_s}{r_0} \cdot \frac{4\pi r_0^2}{(4/3)\pi r_0^3 \rho} = \frac{t_{\text{res}} \cdot 3DC_s}{\rho \cdot r_0^2} = \frac{t_{\text{res}}}{t_{\text{dis}}} \quad (2)$$

pri čemu t_{res} označava srednje vrijeme zadržavanja djelatne tvari u GI sustavu, t_{dis} označava vrijeme potrebno za otapanje čestice djelatne tvari, D označava difuznost, ρ gustoću, a r_0 inicijalni polumjer čestica;

$$D_0 = \frac{M_0/V_0}{C_s} \quad (3)$$

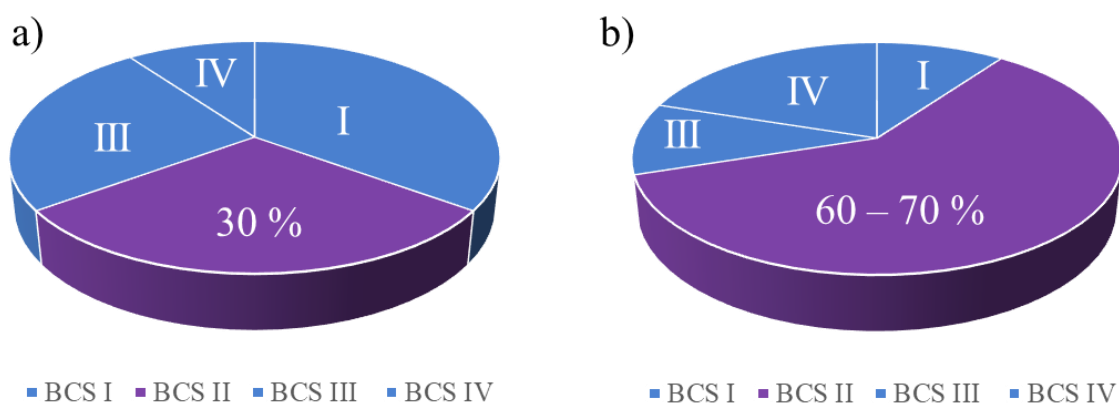
pri čemu M_0 označava dozu lijeka, V_0 označava volumen tekućine s kojom se lijek uzima (uglavnom 250 mL), a C_s označava ravnotežnu topljivost lijeka. Djelatna tvar će pokazivati dobru apsorpciju kada A_n iznosi > 1 , D_n iznosi > 1 , a D_0 iznosi < 1 .¹¹

Danas je BCS odobren od strane većine regulatornih agencija poput Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *United States Food and Drug Administration*, USFDA) te Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), a inkorporiran je u smjernice za odobravanje izuzimanja od obveze provođenja *in vivo* istraživanja bioekvivalencije za peroralne lijekove s trenutnim oslobađanjem.⁷ Primjer takve smjernice je *M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers*^{12,13}, službeni dokument koje je izdalo Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za ljudsku primjenu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), a koje se u upotrebi nalazi od 2020. godine. Navedene četiri BCS skupine zapravo predstavljaju četiri različita očekivanja *in vitro* - *in vivo* korelacija (IVIVC) koja omogućuju pretpostavljanje *in vivo* farmakokinetičkog učinka neke djelatne tvari na temelju *in vitro* rezultata brzine oslobađanja te djelatne tvari iz nekog terapijskog oblika.⁷ Glavi razlozi prihvaćanja BCS klasifikacije te IVIVC modela su izbjegavanje nepotrebnog rizika izlaganja zdravih ispitanika lijekovima, poboljšanje efikasnosti i ubrzanje razvoja terapijskih sustava te smanjenje troškova razvoja generičkih lijekova.¹³ Velik broj lijekova s peroralnom primjenom koji spadaju u BCS skupinu I izuzet je od obveze provođenja *in vivo* istraživanja bioekvivalencije kao rezultat primjene IVIVC modela.⁷

Uspostava BCS sustava uvelike je utjecala na farmaceutsku industriju i znanstvenu zajednicu, a posebice je utjecala na razumijevanje *in vivo* farmakokinetičkog učinka za lijekove

BCS skupine II te na osmišljavanje strategija za poboljšanje njihove bioraspoloživosti. Pretpostavlja se da oko 30 % trenutno komercijalno dostupnih lijekova, a čak do 70 % lijekova u fazi razvoja spada upravo u BCS skupinu II te ih karakterizira slaba topljivost i dobra permeabilnost (slika 2).

Postoje i određena ograničenja BCS sustava kao primjerice problem lijekova s pH-ovisnom topljivošću, problem lijekova koji kompleksiraju sa sadržajima gastrointestinalnog sustava te problem lijekova nestabilnih u gastrointestinalnom sustavu.⁹ Neka od ograničenja BCS sustava su se pokušala riješiti uvođenjem novih ili poboljšanih sustava klasificiranja djelatnih tvari. Primjerice, Wu i Benet su prepoznali jaku poveznicu između razine intestinalne permeabilnosti te opsega metaboliziranja djelatne tvari. Na temelju svojih saznanja predložili su Biofarmaceutski sustav dispozicije djelatnih tvari (engl. *biopharmaceutics drug disposition classification system*, BDDCS) koji prilikom kategoriziranja lijekova već u početnim fazama procesa razvoja lijeka uključuje utjecaj načina transporta lijeka do ciljnog mjesta, načina eliminacije iz organizma kao i lijek-lijek interakcije. Ovaj sustav kategorizacije lijekova izuzima intestinalnu permeabilnost kao čimbenik, a zamjenjuje ga opsegom metabolizma lijeka.^{14,15}



Slika 2. Raspodjela djelatnih tvari prema BCS skupinama za: a) komercijalno dostupne i b) djelatne tvari u fazi razvoja¹

Butler i Dressman¹⁶ su 2010. godine modificirali postojeći BCS sustav klasifikacije djelatnih tvari i predložili novi sustav, odnosno razvojno – formulacijski sustav klasificiranja djelatnih tvari¹⁷ (engl. *developability classification system*, DCS), a kojeg su zajedno s Rosenbergerom revidirali 2018. godine u rDCS sustav klasificiranja.^{18,19} Ovaj sustav

klasificiranja osmišljen je kako bi olakšao razvoj lijeka odmah u ranim fazama procesa, a podjelu djelatnih tvari osim na permeabilnosti bazira i na brzini oslobađanja i topljivosti u biorelevantnom mediju, odnosno intestinalnom mediju koji simulira stanje gladi (engl. *fasted state simulated intestinal fluid*, FaSSIF) prema DCS-u¹⁶ ili humanom intestinalnom mediju koji simulira stanje gladi (engl. *fasted state human intestinal fluid*, FaHIF) prema rDCS-u.^{18,19} Na ovaj se način topljivost djelatne tvari određuje u mediju koji najvjernije simulira mjesto apsorpcije u organizmu, za razliku od BCS klasifikacije koja predlaže određivanje topljivosti u širokom području pH-vrijednosti gornjeg dijela gastrointestinalnog sustava. Djelatne tvari slabe topljivosti, a dobre permeabilnosti se prema DCS-u i rDCS-u klasificiraju u drugu skupinu koja se dijeli na dvije podskupine, odnosno IIa i IIb. Bioraspoloživost, odnosno apsorpcija djelatnih tvari IIa ograničena je brzinom otapanja, a poboljšava se konvencionalnim tehnikama poput smanjenja veličine čestica djelatne tvari. Bioraspoloživost djelatnih tvari IIb ograničena je topljivošću, a poboljšanje nije moguće postići konvencionalnim tehnikama već se postiže pravilnim dizajnom terapijskog sustava, odnosno formulacije¹⁷⁻¹⁹ kao što je primjerice kompleksacija djelatne tvari ciklodekstrinima.¹⁷

Trenutno vrijedeće smjernice najbitnijih svjetskih regulatornih tijela za metodologiju utvrđivanja topljivosti djelatnih tvari i klasificiranje prema topljivosti su vrlo slične, ali ipak s nekim određenim razlikama.^{13,20} Djelatne tvari se prema EMA-i klasificiraju kao dobro topljive ukoliko se najveća pojedinačna terapijska doza te tvari potpuno otapa u 250 mL vodenog medija unutar raspona pH-vrijednosti od 1,0 do 6,8 i temperaturi od 37 ± 1 °C. Preporuka je da se topljivost tvari provjeri metodom zasićene otopine (engl. *shake-flask method*) pri pH-vrijednostima od 1,0, 4,5, 6,8 te pri pK_a -vrijednosti ukoliko se radi o ionizabilnom spoju.¹³ Prema trenutnim smjernicama koje predlaže USFDA, djelatne se tvari smatraju dobro topljivima ukoliko se najjača terapijska doza te tvari otapa u ≤ 250 mL vodenog medija pri temperaturi od 37 ± 1 °C i unutar raspona pH-vrijednosti od 1,0 do 6,8 te pri pH-vrijednostima koje odgovaraju pK_a , $pK_a + 1$ i $pK_a - 1$ ukoliko se radi o ionizabilnom spoju.^{7,13} Preporuka je da se topljivost tvari provjeri već spomenutom metodom zasićene otopine¹³ pri čemu se suvišak djelatne tvari dodaje u solubilizacijski medij te se nastala suspenzija miješa u određenom vremenskom periodu nakon čega se neotopljena tvar izdvoji filtriranjem ili centrifugiranjem, a koncentracija otopljene tvari odredi u supernatantu nakon određenih vremenskih intervala kako bi se utvrdilo postizanje ravnotežne topljivosti.⁸

2.1.2. *Strategije poboljšanja topljivosti slabo topljivih djelatnih tvari*

Djelatne tvari BCS skupine II karakterizira slaba topljivost u vodenim otopinama i dobra intestinalna permeabilnost. Vrijednost broja brzine oslobađanja (uglavnom je $D_n < 1$) te odnos s doznim brojem D_0 kritični su parametri koji određuju opseg apsorpcije ovih djelatnih tvari. Općenito, bioraspoloživost djelatnih tvari BCS skupine II ograničena je brzinom otapanja ili njihovom topljivošću. Prema tome, poboljšavanje topljivosti ili brzine otapanja *in vivo* rezultirat će povećanjem bioraspoloživosti ovih djelatnih tvari. Osmišljene su različite strategije poboljšavanja topljivosti i/ili brzine otapanja^{1,3,4,21}, a posljedično i bioraspoloživosti djelatnih tvari BCS skupine II (ili čak IV) čiji je krajnji cilj razviti novi terapijski oblik koji će imati svojstva koja karakteriziraju BCS skupinu I (ili skupinu III) što u konačnici osigurava status *biowaiver*.¹¹ Uz već navedeni kriterij topljivosti potrebno je osigurati i brzo oslobađanje djelatne tvari iz terapijskog oblika u vodenim medijima unutar fiziološkog raspona pH-vrijednosti, odnosno $\geq 85\%$ upotrijebljene doze lijeka mora biti oslobođeno unutar perioda od ≤ 30 min.^{7,11}

Jedan od pristupa poboljšanja topljivosti slabo topljivih lijekova uključuje kemijske modifikacije poput sinteze predlijekova uvođenjem polarnih funkcijskih skupina u kemijsku strukturu djelatne tvari.^{1,3} Drugi način kemijskog modificiranja djelatne tvari je tvorenje njihovih soli uvođenjem odgovarajućih protuiona. Ovaj način poboljšavanja topljivosti primjenjiv je samo na slabo bazične ili kisele, odnosno ionizabilne djelatne tvari ograničene topljivosti.^{1,3}

Prevođenje iz kristalnih u amorfne oblike jedna je od najčešćih strategija poboljšavanja topljivosti i/ili brzine otapanja teško topljivih lijekova.^{1,3,4,22} Ipak, entalpijski i entropijski suvišak te suvišak slobodne energije amorfni oblika takvih lijekova ih čini podložnim kristalizaciji. Stabilizacija takvih amorfni oblika najčešće se postiže pravilnim dizajnom tzv. čvrstih disperzija. U njima je amorfni lijek disperziran u nekom čvrstom nosaču, odnosno matrici poput polimera ili surfaktanata koji sprječavaju nukleaciju, odnosno prelazak lijeka u kristalni oblik.^{23–27} U slučaju kada se amorfni lijekovi ne miješaju dovoljno dobro s polimernim nosačima upotreba velikih količina takvih polimera je neizbježna, a to bi uvelike povećalo masu konačnog terapijskog oblika. Alternativan način stabiliziranja takvih amorfni lijekova jest pravilan dizajn tzv. ko-amorfni oblika, odnosno upotrebe amorfni pomoćni tvari male molekulske mase poput aminokiselina, malih organskih kiselina, različitih saharida ili čak amorfni lijekova koji imaju jednak ili sinergistički farmakološki učinak s lijekom čiji je

terapijski oblik potrebno razviti.^{28,29} Najčešće korišteni postupci za pripremu čvrstih disperzija i ko-amornih oblika su sušenje raspršivanjem, liofilizacija, ekstrudiranje taljenjem itd.^{1,25,26}

Budući da je već dugo poznato da topljivost čestica čvrstih tvari ovisi o površini koja je u interakciji s otapalom, usitnjavanje kristalnih lijekova do mikrometarskih^{1,3} ili čak nanometarskih dimenzija^{30–32} također je jedna od široko primjenjivanih strategija poboljšavanja njihove topljivosti te posljedično i bioraspoloživosti. Usitnjavanje se najčešće postiže konvencionalnim mehaničkim tehnikama poput različitih načina mljevenja i homogeniziranja^{1,3,31,32}, ali i modernijim pristupima kao što je primjerice upotreba superkritičnih fluida.^{33–35}

Kristalno inženjerstvo koje uključuje postupke modificiranja kristalne strukture teško topljivog lijeka prevođenjem u metastabilne polimorfe,^{3,36} soli,^{37–40} i kokristale^{38–43} također je vrlo raširen pristup poboljšanja topljivosti lijekova.

Posljednjih se godina osmišljavaju nove strategije za rješavanje problema ograničene topljivosti visoko lipofilnih lijekova u obliku samoemulgirajućih sustava za dostavu lijekova (engl. *self-emulsifying drug delivery systems*, SEDDS). Ovakve formulacije su izotropne smjese ulja, surfaktanata, kosurfaktanata, kootapala i otopljenog lijeka. Uslijed peristaltičkog gibanja i razrjeđenja u GI sustavu dolazi do nastajanja mikro- (SMEDDS, 100 – 250 nm) te nano-emulzija ulja u vodi (SNEDDS, < 100 nm). Komercijalno dostupni proizvodi zasnovani na SEDDS tehnologiji nalaze se uglavnom u kapsulama u tekućem obliku. Zbog određenih ograničenja koja ovakvi sustavi mogu imati, osmišljavaju se i čvrsti SEDDS sustavi poboljšanih svojstava.^{44–46}

Uklapanje teško topljivih lijekova u različite nosače spada u nešto modernije pristupe za poboljšavanje njihove topljivosti. Tvorenje polimernih micela jedan je od takvih pristupa. Ove karakteristične sustave za dostavu lijekova tvore amfifilni polimeri koji u razrijeđenim vodenim otopinama postoje kao zasebne molekule koje smanjuju površinsku napetost tih otopina. Pri koncentraciji polimera koja je viša od tzv. kritične micelizacijske koncentracije uslijed hidrofobnog efekta dolazi do njihovog samoudruživanja čime nastaju supramolekulski sustavi, odnosno micide koje karakterizira unutrašnji, hidrofobni i vanjski, hidrofilni dio. Razvijen je velik broj tzv. kopolimera u dvostrukom ili trostrukom bloku čiji se hidrofilni dio sastoji primjerice od polietilenglikola, polivinilpirolidona ili nekog drugog polimera, dok se hidrofobni dio sastoji od primjerice polipropilenoksida. Uklapanjem lijekova u ovakve supramolekulske sustave može doći do promjene njihovih svojstava poput topljivosti, stabilnosti i dr.^{47–50} Jedni

od najčešće korištenih nanosustava za dostavu lijekova na ciljno mjesto jesu liposomi uslijed svoje biokompatibilnosti i biorazgradivosti. Radi se o sfernim vezikulama koje nastaju samoudruživanjem fosfolipida s diacilnim lancima. Zbog svoje dvojne prirode liposomi mogu uklopiti lijekove unutar svoje hidrofilne jezgre ili unutar svoje lipofilne membrane.⁵¹⁻⁵³ Još je jedan način dostave teško topljivih lijekova baziran na lipidima. Čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN) uglavnom su sfernog oblika, a sastoje se od lipida u čvrstom stanju pri sobnoj i fiziološkoj temperaturi čiji hidrofobni lanci čine jezgru čestice koja je presvučena i stabilizirana nekim surfaktantom.⁵²⁻⁵⁵ Nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *nanostuctured lipid carriers*, NLC) razvijeni su kako bi otklonili nedostatke SLN-ova poput niske efikasnosti uklapanja lijekova i rizika od isključivanja lijeka iz jezgre SLN-a uslijed polimorfni prijelaza kristalnih lipida.⁵²⁻⁵⁴ Kod njih je dio čvrstih lipida zamijenjen tekućim lipidima^{53,54} koji prilikom kristaliziranja narušavaju savršeno gusto kristalno slaganje hidrofobne jezgre tvoreći amorfne dijelove u njenoj strukturi.⁵² Posljednjih su godina dendrimeri zadobili veliku pozornost kao potencijalni novi nosači lijekova. To su globularni sintetski spojevi nanometarskih dimenzija koji se sastoje od razgranatih polimernih lanaca. Dendrimeri posjeduju vrlo karakterističnu i dobro definiranu strukturu koju poprimaju uslijed kontrolirane sinteze u koracima. Jezgru im čini jedan ili skupina atoma na koje se nadograđuju slojevi ponavljajućih podjedinica koje nazivamo „generacijama“ s mnogobrojnim funkcijskim skupinama na svojoj površini koje određuju njihova svojstva. Lijekove mogu uklopiti, adsorbirati na svojoj površini ili čak kovalentno vezati pomoću površinskih terminalnih skupina. Slično kao i ostali nabrojani supramolekulski sustavi, dendrimeri su se pokazali korisnima u poboljšavanju topljivosti lijekova.⁵⁶⁻⁵⁸

Između svih nabrojanih tehnika poboljšavanja topljivosti i bioraspoloživosti lijekova BCS skupine II, kompleksiranje ciklodekstrinima (CD) izdvaja se kao obećavajuća i još uvijek nedovoljno istražena strategija. Već je neko vrijeme poznato kako kompleksiranje lijekova ovim multifunkcionalnim nosačima uz pravilan dizajn terapijskog oblika poboljšava topljivost, stabilnost, smanjuje iritacije te maskira neugodne okuse ili mirise lijekova. Pola stoljeća nakon njihovog prvog izoliranja CD su pronašli svoju primjenu kao nosači lijekova. Danas, uslijed uspostavljenja naprednih biotehnoloških procesa njihove proizvodnje, CD se mogu pronaći u komercijalno dostupnim terapijskim oblicima, a još veći broj je trenutni predmet kliničkih istraživanja.⁵⁹

2.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi koji nastaju prirodnom enzimskom razgradnjom škroba. Ove višefunkcionalne makrocikličke molekule se zahvaljujući svojim jedinstvenim svojstvima danas koriste u nekoliko grana industrije poput farmaceutske, kozmetičke, medicinske, tekstilne, industrije hrane itd.

2.2.1. Povijest otkrića ciklodekstrina

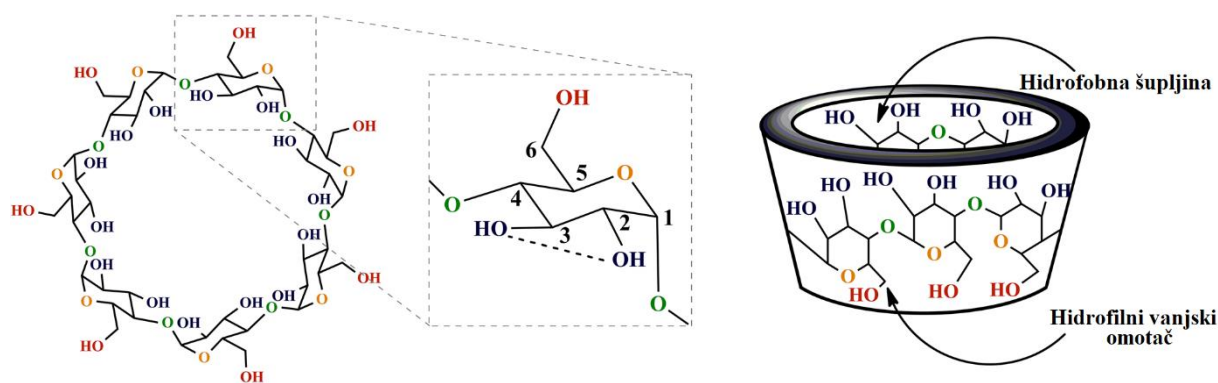
Ciklodekstrine je 1891. godine otkrio Antoine Villiers, francuski kemičar i farmaceut, proučavajući produkte razgradnje krumpirovog škroba korištenjem mikroorganizma *Bacillus amylobacter*. Nakon pročišćavanja produkata frakcijskom kristalizacijom opazio je do tada nepoznate produkte te ih nazvao „novim kristalnim dekstrinima“ jer su pokazivali zanimljiva optička svojstva koja nisu bila karakteristična za dekstrine koji su bili poznati već od 1821. godine. Različitim promjenama eksperimentalnih uvjeta njihove izolacije Villiers je dobio dvije vrste ovih kristalnih dekstrina, a vjerojatno se radilo o α -ciklodekstrinu i β -ciklodekstrinu. Predložio je njihovu empirijsku formulu, $[(C_6H_{10}O_5) + 3H_2O]$. Budući da su im karakteristike i svojstva bila bitno drugačija od do tada poznatih saharida i polisaharida nazvao ih je „celulozinima“ jer nisu pokazivali podložnost kiseloj hidrolizi, slično celulozi. Franz Schardinger, austrijski kemičar, se ipak smatra najzaslužnijim znanstvenikom u sveukupnoj povijesti ciklodekstrina. Detaljno ih je proučavao od 1903. do 1911. godine, a vrlo brzo je utvrdio da nastaju kao produkti enzimske razgradnje škroba od strane mikroorganizma *Bacillus macerans*. Kasnije je utvrđeno kako Villiers nije koristio pročišćene sojeve mikroorganizma *Bacillus amylobacter*, već su sadržavali određen udio mikroorganizma *Bacillus macerans*. Iako je Schardinger prvi postavio hipotezu o cikličkoj strukturi ovih spojeva on je nikada nije uspio potvrditi i objasniti. 1948. godine, nakon skoro dva desetljeća izučavanja ovih spojeva njemački znanstvenik Karl Johann Freudenberg i njegov tadašnji doktorand Friedrich Cramer su na temelju rezultata istraživanja optičke aktivnosti prvi objasnili cikličku strukturu tzv. „Schardingerovih dekstrina“. Iste godine, u odvojenim istraživanjima, Dexter French i W. Borchert su također utvrdili cikličku strukturu ovih spojeva na temelju rezultata rendgenske kristalografske analize. Freudenberg i Cramer su 1948. godine po prvi put izolirali γ -ciklodekstrin⁶⁰ čije je postojanje ustanovio Freudenberg 1935. godine.⁶¹ Do nekih najvažnijih saznanja o strukturi CD došao je već spomenuti D. French. Prvi je utvrdio točne molekulske mase CD te točan broj glukopiranoznih podjedinica α -CD i β -CD na osnovu kristalografskih

podataka pobijajući neke netočne tvrdnje koje je prethodno postavio Freudenberg. Primijetio je kako se sekundarne i primarne hidroksilne skupine CD orijentiraju na suprotnim obodima molekule uslijed 4C_1 konformacije glukopiranoznih podjedinica. French je 1950. u potpunosti objasnio strukturu CD, a zaključio je kako sva tri prirodna CD imaju cikličku strukturu u kojoj su D-glukopiranozne podjedinice međusobno povezane α -D-1,4-glikozidnom vezom tvoreći tako cilindričnu strukturu s nepolarnom središnjom šupljinom. Kasnije je French potvrđujući ranija Cramerova istraživanja ustanovio kako CD zapravo karakterizira struktura krnjeg stošca, odnosno „kapsule“. Termin „ciklodekstrin“ prvi je upotrijebio Cramer 1949. godine u svojoj doktorskoj disertaciji pod naslovom „Die Cyclodextrine aus Stärke“, a ova nomenklatura se zbog svoje jednostavnosti, usprkos prijeporima u znanstvenoj zajednici, zadržala do danas.⁶⁰

2.2.2. *Struktura i svojstva ciklodekstrina*

Prirodni ciklodekstrini sastoje se od šest (α -ciklodekstrin), sedam (β -ciklodekstrin) ili osam (γ -ciklodekstrin) D-glukopiranoznih podjedinica međusobno povezanih α -D-1,4-glikozidnom vezom. Proces proizvodnje ova tri prirodna ciklodekstrina uključuje bakterijsku fermentaciju i izoliranje ciklodekstrin-glikoziltransferaze, a zatim i obradu škroba djelovanjem navedenog enzima nakon čega se produkti odjeljuju i pročišćavaju kristalizacijom iz vodenih otopina.⁶² Prirodni ciklodekstrini su zbog takvog procesa pročišćavanja najčešće dostupni u obliku hidrata.^{63,64} Ciklodekstrini s većim brojem glukopiranoznih podjedinica su također poznati, no proces njihove proizvodnje je zahtjevan i skup, a njihova svojstva kompleksiranja su slabija u odnosu na tri nabrojana CD.⁶² Danas je primjenom metoda genetičkog inženjerstva moguće izolirati različite tipove ciklodekstrin-glikoziltransferaza koje imaju izraženiju i specifičniju aktivnost za određene tipove CD.⁶¹

Budući da glukopiranozne podjedinice CD imaju konformaciju stolca (4C_1 konformacija) struktura CD podsjeća na krnji stožac s užim obodom na kojem se nalaze primarne hidroksilne skupine (na 6. ugljikovom atomu) i širim obodom na kojem se nalaze sekundarne hidroksilne skupine (na 2. i 3. ugljikovom atomu). Zbog ovakvog pozicioniranja hidroksilnih skupina CD mogu tvoriti vodikove veze s molekulama vode pa njihov vanjski omotač ima hidrofilan karakter (slika 3). Međutim, budući da središnju šupljinu ciklodekstrina omeđuju nepolarni dijelovi molekule poput 3. ugljikovog atoma, glikozidnih kisikovih atoma te 5. ugljikovog atoma (C5–CH veza) ona ima izrazit hidrofoban karakter.^{61,63}



Slika 3. Prikaz strukture β -ciklodekstrina⁶⁵

Iako CD karakterizira hidrofilan karakter uz velik broj akceptorskih i donorskih skupina vodikove veze, topljivost u vodenim otopinama im je znatno niža u usporedbi s njihovim linearnim dekstrinskim analogima. Povećanjem broja glukopiranoznih podjedinica povećava se i volumen središnje šupljine te ukupne dimenzije CD. Međutim, takav trend ne prati i topljivost ovih molekula u vodenim medijima. Naime, α -CD karakterizira topljivost od 145 mg mL^{-1} , γ -CD od 232 mg mL^{-1} , dok topljivost β -CD iznosi samo $18,5 \text{ mg mL}^{-1}$.^{59,61,66} Uzrok niske topljivosti β -CD je relativno velika energija kristalne rešetke koja je posljedica postojanja intramolekulskih vodikovih veza u kristalnom stanju. Nastajanje vodikovih veza između hidroksilnih skupina 2. i 3. ugljikovog atoma susjednih glukopiranoznih podjedinica vodi ka formiranju tzv. potpunog sekundarnog pojasa koji čini molekulu znatno rigidnijom te u vodenim otopinama priječi nastajanje vodikovih veza s okolnim molekulama vode i na taj način znatno ograničava topljivost ovog prirodnog ciklodekstrina.^{63,66} S druge strane, α -CD je bolje topljiv u vodenom mediju jer ne može tvoriti potpuni pojas intramolekulskih vodikovih veza, dok γ -CD karakterizira fleksibilnost i izostanak koplanarne strukture^{63,66} uslijed distorzija glukopiranoznih podjedinica.⁶⁷ Ciklodekstrini su u vodenom mediju podložni fenomenu samoudruživanja⁶⁸ čak i pri niskim koncentracijama tvoreći tako manje klastere nanometarskih dimenzija ili čak agregate dimenzija od 200 do 300 nm.⁶⁹ Nastajanje takvih agregata može povoljno ili nepovoljno utjecati na kompleksacijsku sposobnost CD.^{64,69,70}

Ciklodekstrini su izuzetno stabilne molekule koje su hidrolizi podložne tek pri niskim pH-vrijednostima pri čemu dolazi do otvaranja njihove cikličke strukture uslijed pucanja α -acetalnih veza i nastajanja različitih linearnih oligosaharida i molekula glukoze i maltoze. U neutralnom i bazičnom mediju su stabilni te ne dolazi do njihove hidrolize. Do deprotoniranja

hidroksilnih skupina na obodima CD dolazi pri pH-vrijednosti ≈ 12 . Njihove pK_a -vrijednosti su unutar raspona 12,1 – 13,5, ovisno o položaju hidroksilne skupine i metodi određivanja vrijednosti.⁶⁶ Osnovne karakteristike tri prirodna ciklodekstrina sažete su u tablici 1.

Tablica 1. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva prirodnih ciklodekstrina

	α -ciklodekstrin	β -ciklodekstrin	γ -ciklodekstrin
broj glukopiranoznih podjedinica	6	7	8
molarna masa / g mol ⁻¹	972,84	1134,98	1297,12
topljivost u vodi / mg mL ⁻¹ (25 °C)	145	18,5	232
volumen šupljine / nm ³	0,174	0,262	0,472
promjer centralne šupljine / nm	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
ukupan promjer / nm	1,46	1,54	1,75
broj donora vodikove veze	18	21	24
broj akceptora vodikove veze	30	35	40
broj molekula vode u šupljini	2	6	8,8
temperaturni raspon taljenja / °C	255 – 260	255 – 265	240 – 245

Prirodni ciklodekstrini nisu podložni enzimskoj razgradnji β -amilazama koje hidroliziraju složene ugljikohidrate s nereducirajućeg kraja, no podložne su sporij razgradnji α -amilazama koje su prisutne u slini te u gušteračnom soku, a koje složene ugljikohidrate razgrađuju hidrolizom α -D-1,4-glikozidne veze između glukozilnih podjedinica. Kompleksi koje tvore CD su otporniji na djelovanje ovih enzima u usporedbi sa slobodnim molekulama CD, a razlog tomu je činjenica kako se svi atomi kisika putem kojih se ostvaruju glikozidne veze nalaze duboko u središnjoj šupljini CD. Brzina hidrolize ovisi i o veličini CD pa je γ -CD najpodložniji enzimskoj razgradnji te je gotovo u potpunosti razgrađen u GI sustavu nakon oralne primjene, dok α -CD i β -CD bivaju razgrađeni tek u debelom crijevu uslijed djelovanja bakterija.^{68,69}

2.2.3. Derivati ciklodekstrina

Prirodni ciklodekstrini, a posebice β -CD imaju nisku topljivost u vodenim otopinama što u nekim slučajevima može ograničavati njihovu primjenu u farmaceutskoj industriji. Problem niske topljivosti prirodnih CD nadilazi se njihovom kemijskom derivatizacijom sekundarnih i/ili primarnih hidroksilnih skupina različitim supstituentima. Na taj se način narušava njihova sposobnost formiranja intramolekulskih vodikovih veza, a potiču interakcije s okolnim

molekulama vode u otopini. Derivatizacija prirodnih CD najčešće se provodi zbog povećavanja njihovog solubilizacijskog potencijala, no može se provesti i s nekim drugim ciljevima poput uklanjanja zagađivala iz okoliša itd. Uvođenjem različitih supstituenata topljivost CD se najčešće višestruko povećava.

Budući da tri hidroksilne skupine glukopiranozne podjedinice imaju nešto drugačiju reaktivnost CD se mogu selektivno modificirati. Primjerice, primarne hidroksilne skupine su najbazičnije i najlakše se modificiraju pa je taj način ujedno i najčešći. Sekundarne hidroksilne skupine na 2. ugljikovom atomu imaju najkiselija svojstva, dok su one na 3. ugljikovom atomu pod najvećim steričkim utjecajem zbog čega selektivno modificiranje na 2. ili 3. ugljikovom atomu nije jednostavan postupak. Osim selektivnim modificiranjem, derivati CD često se sintetiziraju i nasumičnim modificiranjem hidroksilnih skupina.⁵⁹

Modificiranje CD može se provoditi zamjenom hidroksilnih skupina nekim drugim funkcijskim skupinama čime nastaju deoksi-modificirani CD. Drugi način je supstitucijom na kisikovom atomu neke od hidroksilnih skupina različitim kemijskim reakcijama. Tim načinom se sintetiziraju komercijalno najkorišteniji derivati CD poput 2-hidroksipropiliranih (HP- β -CD), nasumično metiliranih (RM- β -CD) te alkilsulfoniranih derivata (SPE- β -CD ili SBE- β -CD).⁵⁹ Derivati CD najčešće su amorfnе smjese izomera/homologa različitog stupnja supstituiranosti (engl. *degree of substitution*, DS) pri čemu ta vrijednost ukazuje na prosječan broj supstituenata na jednoj molekuli CD, a ima velik utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva CD i njihovu sposobnost kompleksiranja.⁶⁶ Broj potencijalnih izomera/homologa može biti izuzetno velik. Primjerice, u slučaju monosupstituiranog 2-hidroksipropiliranog derivata β -CD broj mogućih izomera/homologa iznosi čak 2 097 151 $(2^{21} - 1)^{71,72}$ zbog dodatnog kiralnog središta.⁶⁴ Usporedba osnovnih karakteristika β -CD i njegovih najkorištenijih sintetskih derivata prikazana je u tablici 2.

Tablica 2. Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava β -CD i njegovih sintetskih derivata: natrijeve soli sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE- β -CD), 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD) i nasumično metiliranog β -ciklodekstrina (RM- β -CD)

	β -CD	SBE- β -CD	HP- β -CD	RM- β -CD
toplјivost u vodi / mg mL⁻¹ (25 °C)	18,5	> 1200	> 1200	> 500
supstituent	/	-(CH ₂) ₄ -SO ₃ Na	-CH ₂ -CHOH-CH ₃	-CH ₃
broј donora vodikove veze	21	21	25	9
broј akceptora vodikove veze	35	35	39	35
DS	/	6,2 – 6,9	2,8 – 10,5	9,7 – 13,6

*DS – stupanj supstituiranosti (engl. *degree of substitution*)

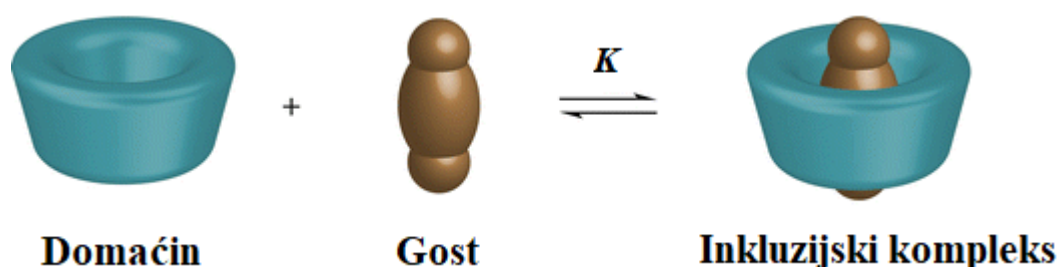
Oralna bioraspoloživost prirodnih ciklodekstrina i njihovih najkorištenijih derivata je uglavnom < 4 % uslijed njihove hidrofilnosti, velike molekulske mase, velikog broja donora i akceptora vodikove veze i podložnosti bakterijskog razgradnji. Toksikološka istraživanja utvrdila su kako su ciklodekstrini najčešće netoksični uslijed izostanka apsorpcije u GI sustavu. Iznimka je nasumično metilirani derivat β -CD zbog nešto veće lipofilnosti i manjeg broja donora vodikove veze zbog čega njegova bioraspoloživost iznosi i do 12 % pa je i primjena ovog derivata ograničena samo na nazalni i topikalni način zbog potencijalne oralne toksičnosti. Najveći broj odobrenih parenteralnih terapijskih oblika s CD sadrži HP- β -CD, SBE- β -CD, γ -CD te HP- γ -CD, dok se β -CD i RM- β -CD izbjegavaju zbog potencijalne renalne toksičnosti, povećanog hemolitičkog efekta na humane eritrocite (ali i niske toplјivosti u slučaju β -CD).⁶² Danas su derivati ciklodekstrina dostupni kao gotovi komercijalni proizvodi za primjenu u terapijskim sustavima s različitim načinima primjene, poput HP- β -CD (Cavasol W7 HP⁶², Kleptose HPB^{61,62}), HP- γ -CD (Cavasol W8 HP⁶²), SBE- β -CD (Captisol^{61,62,73,74}), RM- β -CD (Cavasol W7 M⁶²) itd.

Prirodne ciklodekstrine i neke njihove derivate USFDA je još početkom 2000.-ih počela uvrštavati u svoju listu GRAS (engl. *Generally Recognized as Safe*) te se danas koriste kao aditivi prehrani ili pomoćne tvari u terapijskim oblicima.⁶¹ To je rezultiralo velikim brojem patenata te komercijalno dostupnih terapijskih oblika u kojima CD imaju zadaću poboljšanja toplјivosti, poboljšanja stabilnosti ili maskiranja neugodnih okusa/mirisa djelatnih tvari. Upotreba CD u terapijskim oblicima više nije ograničena samo na one s oralnom primjenom

već i na terapijske oblike s parenteralnom, bukalnom, sublingvalnom, okularnom, topikalnom i transdermalnom, vaginalnom, rektalnom te pulmonalnom primjenom.⁷⁵

2.3. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina

Utjecaj ciklodekstrina na fizikalno-kemijska svojstva različitih tvari tvorenjem inkluzijskih kompleksa temelj je njihove primjene u različitim granama industrije. Inkluzijske komplekse s čvrstim, tekućim ili plinovitim tvarima ciklodekstrini tvore po principu domaćin:gost (slika 4) pri čemu ciklodekstrin pruža mikrookolinu nekoj lipofilnoj molekuli (ili dijelu molekule) pogodne veličine uklapajući je u svoju središnju šupljinu.



Slika 4. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskih kompleksa⁶⁰

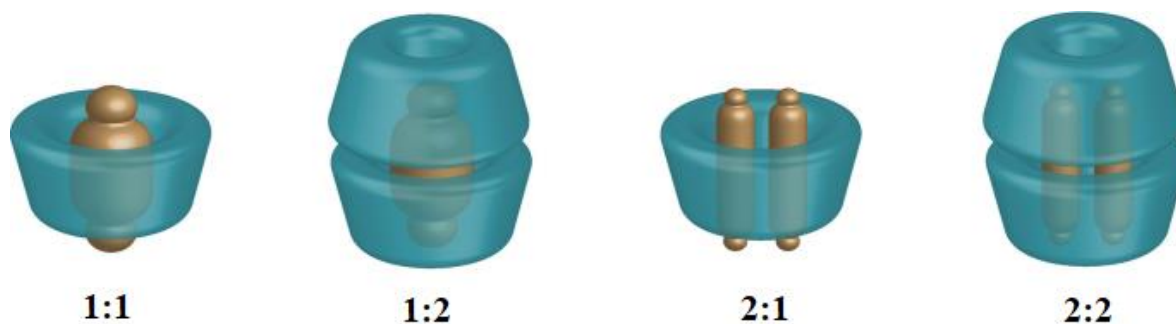
Prilikom uklapanja gosta u središnju šupljinu CD ne dolazi do formiranja novih ili pucanja postojećih kovalentnih veza jer su međusobne interakcije nekovalentne prirode. Ovakav način interakcije nije fiksna, odnosno trajna već predstavlja dinamičku ravnotežu između kompleksa i slobodnih molekula gosta i CD. Prema tome, inkluzijski kompleksi u otopini kontinuirano nastaju te disociraju.⁷⁶ Razumijevanju fenomena uklapanja molekula gosta u središnju šupljinu CD najviše je pridonio već spominjani Friedrich Cramer, najprije u svojoj doktorskoj disertaciji, a zatim i u brojnim istraživanjima na temelju kojih je 1967. godine prvi objasnio mehanizam nastajanja inkluzijskih kompleksa.⁶⁰

Uklapanje molekule gosta u središnju šupljinu CD ovisi o dva glavna čimbenika. Prvi je sterički koji ovisi o kompatibilnosti dimenzije središnje šupljine CD i dimenzije molekule gosta ili dijela molekule gosta. Na temelju dimenzija središnje šupljine CD (tablica 1) jasno je kako α -CD inkluzijske komplekse tvori s manjim molekulama ili onima koje u strukturi imaju alifatske lance, β -CD tvori komplekse s aromatima i heterociklima, dok γ -CD može uklapati veće molekule poput makrocikala ili steroida. Drugi čimbenik o kojem ovisi nastajanje kompleksa je termodinamički koji ovisi o molekuli gosta, CD i okolišu. Cijeli proces nastajanja

inkluzijskog kompleksa mora imati povoljan ukupan energijski učinak kako bi uopće došlo do uklapanja molekule gosta u središnju šupljinu CD.

U vodenim otopinama nepolarne tvari poput lijekova BCS skupine II ne ostvaraju interakcije putem vodikovih veza s okolnim molekulama vode već agregiraju kako bi smanjili kontaktnu površinu s otapalom pri čemu molekule vode tvore strukturirane slojeve oko njih. S druge strane, molekule vode međusobno ili s hidrofilnim spojevima poput CD tvore vodikove veze što je termodinamički povoljno. Svaka glukopiranozna podjedinica CD tvori oko 4 do 5 vodikovih veza s okolnim molekulama vode.⁶⁴ Prilikom kompleksiranja dolazi do istiskivanja polarnih molekula vode iz nepolarne središnje šupljine CD pri čemu se takve nepovoljne interakcije zamjenjuju povoljnijim hidrofobnim interakcijama između lipofilne molekule gosta i središnje šupljine CD.⁷⁶ Svaka molekula vode u čistoj, odnosno *bulk* vodi tvori u prosjeku 3,6 vodikovih veza, dok u središnjoj šupljini α -CD, β -CD i γ -CD može tvoriti 1,5, 1,9, odnosno 2,2 vodikove veze čime ne zadovoljavaju u potpunosti svoj potencijal za ostvarivanjem vodikovih veza pa su entalpijski bogate. Prema tome, istiskivanje molekula vode iz središnje šupljine je termodinamički povoljno.⁶⁴ Nastajanje inkluzijskih kompleksa CD stoga je rezultat nekoliko bitnih procesa: dehidracije središnje šupljine CD, povećanja broja vodikovih veza koje ostvaruju istisnute molekule vode, smanjenja repulzija između hidrofobnih molekula gosta i vodenog medija te ostvarivanja hidrofobnih interakcija između molekule gosta i središnje šupljine CD.⁷⁶ Glavne sile odgovorne za nastajanje inkluzijskih kompleksa CD jesu hidrofobne interakcije, elektrostatske sile, van der Waalsove interakcije, vodikove veze te smanjenje konformacijskih ograničenja.⁶⁸ Iako se početna ravnoteža nastajanja inkluzijskih kompleksa CD uspostavlja vrlo brzo, uspostavljanje konačne ravnoteže ponekad traje dulje budući da nakon kompleksiranja molekula gosta prolazi kroz različite konformacijske promjene kako bi se maksimalno iskoristile slabe van der Waalsove interakcije koje ostvaruje.⁷⁶

Molekule gosta s molekulama CD najčešće tvore inkluzijske komplekse u stehiometrijskom omjeru 1:1, iako su poznati i kompleksi viših redova u kojima jedna molekula gosta tvori kompleks s više molekula CD ili obrnuto (slika 5).⁶⁶



Slika 5. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskih kompleksa različitih stehiometrija⁶⁰

2.3.1. Utjecaj ciklodekstrina na topljivost gosta

Ciklodekstrini ostvaruju interakcije sa slabo topljivim lijekovima, odnosno tvore inkluzijske komplekse čime se poboljšava topljivost, a posljedično i bioraspoloživost takvih lijekova. Ipak, poznato je da CD tvore i neinkluzijske komplekse i to najčešće putem vodikovih veza koje ostvaruju hidroksilne skupine šireg i užeg oboda CD s molekulama lijeka. S povećanjem koncentracije CD u sustavu dolazi i do njihove agregacije pri čemu takvi agregati mogu imati potpuno drugačiji utjecaj na topljivost lijeka u usporedbi s utjecajem slobodnih molekula CD.^{61,77}

Ukoliko m molekula gosta (G), odnosno supstrata tvori kompleks s n molekula liganda, odnosno ciklodekstrina (CD), tada taj reverzibilni proces opisuje ravnoteža:



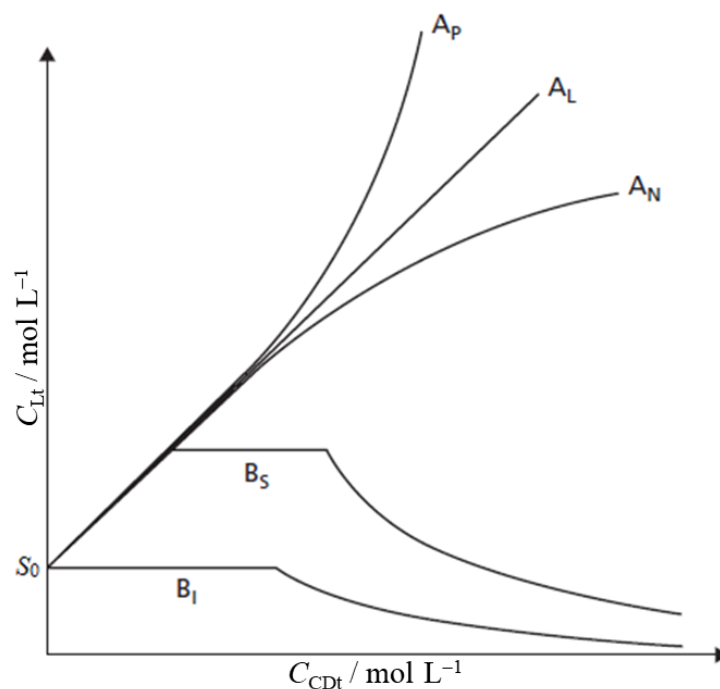
pri čemu je $K_{m:n}$ konstanta stabilnosti, odnosno konstanta nastajanja tj. asocijacije kompleksa supstrat:ligand, odnosno gost:domaćin:

$$K_{m:n} = \frac{[G_m CD_n]}{[G]^m \cdot [CD]^n} \quad (4)$$

Ciklodekstrini najčešće tvore inkluzijske komplekse sa slabo topljivim lijekovima u stehiometrijskom omjeru 1:1⁶⁴, a u tom slučaju konstantu stabilnosti možemo izraziti kao:

$$K_{1:1} = \frac{[G CD]}{[G] \cdot [CD]} \quad (5)$$

Većina metoda za određivanje konstanti stabilnosti temelji se na titracijama i praćenju promjena fizikalno-kemijskih svojstava molekule gosta (lijeka) uslijed nastajanja kompleksa s CD pri čemu se analizira njihova koncentracijska ovisnost. Najčešće se prati promjena svojstva poput molarne apsorptivnosti, kemijskih pomaka korištenjem spektroskopije NMR itd.^{61,62,69,78} Ipak, za određivanje solubilizacijskog potencijala nekog CD najčešće se primjenjuje analiza poboljšanja topljivosti tj. solubilizacijska istraživanja (engl. *phase-solubility analysis*). Ovu metodu su 1964. godine razvili Takeru Higuchi i Kenneth Connors.⁷⁹ Solubilizacijska istraživanja provode se u određenom nizu koncentracijskih razina liganda, odnosno ciklodekstrina tzv. metodom zasićene otopine. Suvišak supstrata, odnosno lijeka (s obzirom na njegovu topljivost u odsustvu CD) se dodaje najčešće u niz tikvica za miješanje u kojem koncentracija CD sukcesivno raste. Tako pripremljene suspenzije miješaju se pri konstantnoj temperaturi do postizanja ravnotežne topljivosti lijeka nakon čega se sadržaj tikvica profiltrira, a koncentracija otopljenog lijeka određuje nekom unaprijed razvijenom i validiranom metodom za kvantitativno određivanje. Na temelju dobivenih rezultata konstruiraju se tzv. dijagrami topljivosti (slika 6) koji predstavljaju ovisnost ukupne množinske koncentracije supstrata, lijeka o ukupnoj množinskoj koncentraciji ciklodekstrina. Ovisno o obliku dobivene solubilizacijske krivulje dijagrame topljivosti dijelimo na dijagrame tipa A ili tipa B.⁶¹



Slika 6. Shematski prikaz tipova dijagrama topljivosti prema Higuchiu i Connorsu⁶¹

Dijagrami topljivosti s krivuljama tipa A rezultat su nastajanja topljivih kompleksa lijek:ciklodekstrin. Izoterma, odnosno krivulja tipa A_L označava linearan porast topljivosti lijeka kao funkcije koncentracije ciklodekstrina. Kompleksi su u ovom slučaju prvog reda s obzirom na ligand, odnosno ciklodekstrin ($n = 1$), a prvog ili višeg reda s obzirom na supstrat, odnosno lijek ($m \geq 1$). Ukoliko je nagib A_L izoterme manji od 1 tada se u odsustvu drugih relevantnih informacija smatra kako je stehiometrijski omjer lijeka i CD u kompleksu 1:1, iako se nastajanje kompleksa viših redova ne može isključiti.^{61,62,69,79} Ukoliko je taj nagib veći od 1 tada se smatra kako su u solubilizacijskom procesu prisutni i kompleksi viših redova s obzirom na lijek.⁶¹ U slučaju kompleksa stehiometrije 1:1 nagib izoterme topljivosti možemo izraziti kao:

$$\text{nagib} = \frac{S_0 \cdot K_{1:1}}{(S_0 \cdot K_{1:1} + 1)} \quad (6)$$

pri čemu $K_{1:1}$ označava konstantu stabilnosti kompleksa, a S_0 topljivost lijeka u odsutnosti ciklodekstrina. U ovom slučaju vrijednost nagiba je uvijek manja od 1, pa za izračun vrijednosti konstante stabilnosti koristimo sljedeći izraz:

$$K_{1:1} = \frac{\text{nagib}}{S_0(1 - \text{nagib})} \quad (7)$$

U slučaju kompleksa stehiometrije 2:1 nagib izoterme možemo izraziti kao:

$$\text{nagib} = \frac{2S_0^2 \cdot K_{2:1}}{(S_0^2 \cdot K_{2:1} + 1)} \quad (8)$$

Izoterma topljivosti s pozitivnom devijacijom od linearnosti, odnosno ona tipa A_P označava nastajanje kompleksa višeg reda s obzirom na ciklodekstrin ($n > 1$). Stehiometrija kompleksa se u ovom slučaju može procijeniti na temelju provjere slaganja dobivene krivulje s kvadratnom (1:2) ili kubnom funkcijom (1:3). Tumačenje izoterme s negativnom devijacijom od linearnosti, odnosno onih tipa A_N je nešto kompleksnije. Pretpostavlja se da u ovom slučaju ciklodekstrini djeluju kao kaotropne ili kozmotropne tvari koje mijenjaju svojstva solubilizacijskog medija

(vode) poput viskoznosti, površinske napetosti ili provodljivosti. Negativna devijacija također može biti rezultat agregacije ciklodekstrina pri višim koncentracijama.^{61,62}

Dijagrami topljivosti s krivuljama tipa B rezultat su nastajanja kompleksa lijek:ciklodekstrin ograničene topljivosti, a što je često slučaj kod prirodnih CD, osobito β -CD. Kod krivulja topljivosti tipa B_s u početnom dijelu prisutan je linearan porast topljivosti lijeka s povećanjem koncentracije CD pri čemu nastaje topljiv kompleks lijek:ciklodekstrin. Pri određenoj koncentraciji CD koju označava područje platoa krivulje dosegnuta je maksimalna topljivost lijeka pri čemu je ona jednaka zbroju S_0 (koncentracija, odnosno topljivost u odsutnosti CD) i koncentracije kompleksiranog lijeka.^{61,62,69,79} Konstantno otapanje lijeka u čvrstom stanju osigurava konstantu koncentraciju otopljenog, nekompleksiranog lijeka u mediju. Daljnjim dodatkom CD dolazi do dodatnog nastajanja kompleksa koji taloži. U trenutku kada je cijeli suvišak lijeka potrošen, odnosno kompleksiran, daljnji dodatak CD rezultira dodatnim taloženjem netopljivog kompleksa čime se dodatno smanjuje koncentracija otopljenog lijeka čemu odgovara padajući dio krivulje nakon platoa. Stehiometrijski omjer lijeka i CD u ovom slučaju se može odrediti na temelju kemijske analize precipitiranog kompleksa, ali i na temelju platoa krivulje dijagrama topljivosti. Naime, količina CD u području platoa krivulje odgovara onoj količini koja kompleksira lijek, a količina lijeka koji tvori kompleks odgovara neotopljenoj količini lijeka u točki koja označava početak područja platoa. Prema tome, količina lijeka koja tvori kompleks odgovara razlici ukupne dodane količine lijeka i ukupne otopljene količine lijeka u točki koja označava početak područja platoa. Omjer $[G]/[CD]$ tada daje vrijednost stehiometrije kompleksa.^{61,79} Tako određena stehiometrija kompleksa često nije realna vrijednost jer je poznato da je moguće nastajanje više različitih vrsta kompleksa. Naime, ukoliko u sustavu nastaje više od jedne vrste kompleksa tada će vrijednosti izračunate stehiometrije biti odraz doprinosa svake kompleksne vrste koja nastaje prilikom solubilizacije lijeka.⁷⁹ Krivulje ovisnosti tipa B₁ tumače se na sličan način s razlikom da odmah nastaje netopljiv kompleks lijek:ciklodekstrin pa nema ni početnog linearnog porasta topljivosti supstrata, odnosno lijeka.^{61,62,69,79} Kako je već spomenuto, solubilizacijska istraživanja utjecaja β -CD na topljivost slabo topljivih lijekova često rezultiraju dijagramima topljivosti s krivuljama B tipa, dok derivati β -CD s njima uglavnom tvore topljive komplekse pa takva istraživanja rezultiraju krivuljama tipa A.^{69,76}

Bitno je zapamtiti kako solubilizacijska istraživanja ne daju informaciju tvore li ciklodekstrini inkluzijske komplekse s molekulom gosta već samo kakav je solubilizacijski

utjecaj ciklodekstrina na njihovu topljivost.^{62,69,78} Ovakva istraživanja provode se u sustavima koji su zasićeni gostom pa kažemo kako se provode u neidealnim uvjetima. U takvim se uvjetima može očekivati i pojava agregiranja potencijalnih kompleksa ili komponenti koje ga čine.^{61,62,78} Često se inkluzijski kompleksi CD karakteriziraju spektroskopskim tehnikama pri čemu se takva istraživanja provode u razrijeđenim vodenim otopinama, odnosno u idealnim uvjetima.⁶² Rezultati dobiveni u ovakvim uvjetima ne mogu se direktno uspoređivati s rezultatima solubilizacijskih istraživanja jer se u nekim slučajevima mogu bitno razlikovati.⁶⁴

Konstante stabilnosti izračunate na temelju solubilizacijskih istraživanja često se koriste kako bi se usporedio solubilizacijski učinak različitih CD na neki specifičan slabo topljiv lijek. Ipak, izračunate vrijednosti su podložne greškama i osjetljive su na način interpretacije dobivenih rezultata. Primjerice, vrijednost konstante stabilnosti je izuzetno osjetljiva na promjene vrijednosti topljivosti lijeka u odsustvu CD, odnosno na S_0 . U teoriji bi S_0 vrijednost bila identična vrijednosti S_{int} , odnosno odsječku na y-osi. Međutim, to uglavnom nije slučaj kod slabo topljivih lijekova ($S_0 < 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$).⁶¹ Molekule takvih lijekova u vodenim otopinama često tvore dimere, trimere ili čak agregate viših redova koji ne mogu tvoriti inkluzijske komplekse s molekulama CD. U takvim slučajevima vrijednosti S_0 i S_{int} neće biti jednake, odnosno vrijednost S_0 će biti višestruko veća od S_{int} što može dovesti do pogrešaka prilikom izračuna konstanti stabilnosti čije će vrijednosti iznositi manje nego što bi u stvarnosti trebale biti.^{64,80} S druge strane, prilikom solubilizacijskih ispitivanja ionizabilnih lijekova s nabijenim ciklodekstrinima vrijednost S_{int} će biti veća od vrijednosti S_0 pa će i izračunata vrijednost konstante stabilnosti biti veća nego što bi u stvarnosti trebala biti. Uzrok takvoj devijaciji je pojava ionskih interakcija između lijeka i CD uz nastajanje inkluzijskog kompleksa.⁸⁰ Zbog toga se solubilizacijski potencijal CD često izražava u obliku vrijednosti kompleksacijske efikasnosti (CE) koja predstavlja omjer koncentracije CD u obliku kompleksa i koncentracije slobodnog CD. Kompleksacijska efikasnost je potpuno neovisna o vrijednostima S_0 i S_{int} , a računa se prema izrazu:

$$CE = S_0 \cdot K_{1:1} = \frac{nagib}{(1 - nagib)} \quad (9)$$

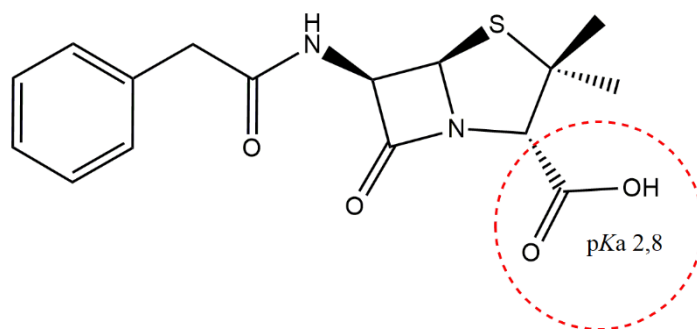
pri čemu $nagib$ predstavlja nagib krivulje dijagrama topljivosti. Usporedba vrijednosti CE je zbog toga pouzdaniji način usporedbe solubilizacijskih potencijala različitih CD.^{62,64,68,77,80,81}

2.3.2. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost gosta

Kemijska stabilnost jedan je od ključnih parametara koji utječe na učinkovitost i sigurnost lijekova, te diktira odabir proizvodnih procesa, oblikovanje terapijskih oblika, način pakiranja i skladištenja. Mnoge farmakološki aktivne tvari su podložne kemijskoj razgradnji zbog labilnih funkcijskih grupa u njihovoj molekulskoj strukturi. Najčešći načini kemijske razgradnje takvih tvari uključuju hidrolizu, oksidaciju, izomerizaciju itd. Neki lijekovi su podložni i fizičkoj razgradnji poput primjerice faznih pretvorbi.

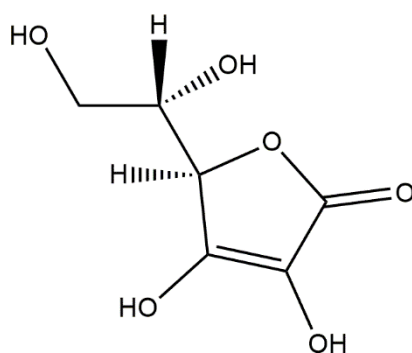
Ciklodekstrini tvorenjem inkluzijskih kompleksa osim na topljivost mogu utjecati i na stabilnost farmakološki aktivnih tvari. U nekim slučajevima inkluzijski kompleksi pokazuju veću kemijsku ili fizičku stabilnost u odnosu na sam lijek, dok se u drugim slučajevima narušava stabilnost lijeka i ubrzava njegova razgradnja uslijed interakcija s molekulama CD.⁸²⁻⁸⁴ Prilikom istraživanja utjecaja CD na stabilnost lijeka nužno je detaljno proučiti strukturu inkluzijskog kompleksa kojeg tvore kao i mehanizam razgradnje samog lijeka. Struktura inkluzijskih kompleksa ključna je za objašnjavanje utjecaja CD na stabilnost lijeka.⁸² U nastavku ovog poglavlja spomenut će se neki zanimljivi primjeri stabiliziranja, odnosno destabiliziranja lijekova uslijed interakcija s ciklodekstrinima.

Benzilpenicil (slika 7) najznačajniji je spoj iz skupine β -laktamskih antibiotika, a karakterizira ga niska oralna bioraspoloživost te podložnost hidrolizi u vodenim otopinama koja dovodi do potpunog gubitka protubakterijskog djelovanja. Ciklodekstrini smanjuju stupanj hidrolize bezilpenicilina u kiselom mediju, dok u neutralnom i bazičnom mediju neki kataliziraju njegovu hidrolizu.^{82,84} Pri niskoj pH-vrijednosti benzilpenicil je nenabijen što ga čini lipofilnijim te zbog toga lakše tvori inkluzijske komplekse s CD što štiti β -laktamski prsten od hidrolize. Pri neutralnim i bazičnim pH-vrijednostima karboksilna skupina benzilpenicilina je deprotonirana, a sam spoj je zbog toga hidrofilniji te ima manji afinitet prema središnjoj šupljini CD što vodi do lakše hidrolize β -laktamskog prstena. Neki CD poput HP- β -CD kataliziraju razgradnju benzilpenicilna u bazičnom mediju, što je slično utjecaju nekih oligosaharida poput glukoze na katalizu razgradnje β -laktama. Ipak, lipofilniji ciklodekstrini poput RM- β -CD pokazuju manji destabilizacijski učinak na benzilpenicilin. Metiliranjem hidroksilnih skupina CD kao u slučaju RM- β -CD priječi se formiranje vodikovih veza s β -laktamskim prstenom i nastajanje neinkluzijskih kompleksa, a potiče nastajanje inkluzijskih kompleksa čime se β -laktamski prsten štiti od nukleofilnog napada hidroksilnih iona.^{85,86}



Slika 7. Molekulska struktura benzilpenicilina

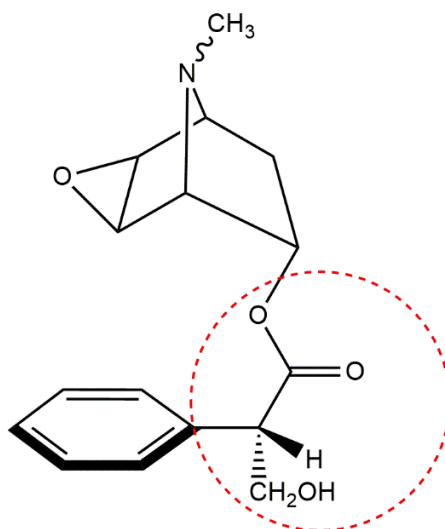
L-askorbinska kiselina, odnosno vitamin C (slika 8) jedan je od najčešće korištenih antioksidanasa u različitim terapijskim oblicima. Ipak, vrlo lako se oksidira u vodenim otopinama do dehidroaskorbinske kiseline. Eksperimentalno je potvrđeno kako hidroksipropilirani derivat β -ciklodekstrina inhibira oksidativnu razgradnju askorbinske kiseline, ali samo pri kiselim pH-vrijednostima, dok u lužnatom mediju katalizira njenu razgradnju sinergističkim učinkom. Razlog tomu je činjenica kako neutralna askorbinska kiselina ima veći afinitet prema središnjoj šupljini HP- β -CD, dok je u bazičnom mediju esterski dio askorbinske kiseline u interakciji s hidroksilnim skupinama ciklodekstrina koje su u ovakvim uvjetima prisutne u obliku alkoksidnih iona.⁸⁷ Pozitivan utjecaj na stabilnost askorbinske kiseline uočen je i u slučaju γ -CD.⁸⁸



Slika 8. Molekulska struktura *L*-askorbinske kiseline

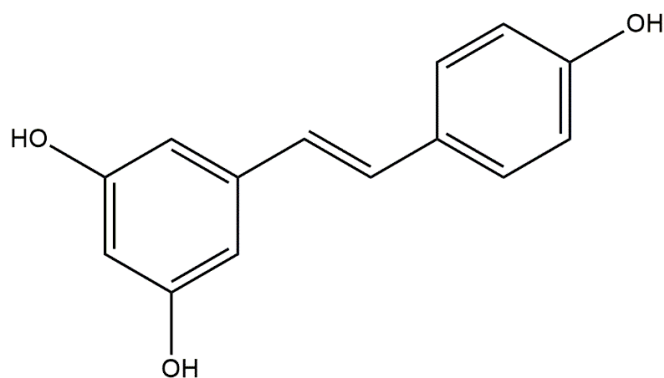
Kompleksiranje ciklodekstrinima ponekad može imati i utjecaj na izomerizaciju lijeka. U vodenim otopinama tropanski alkaloid *S*-skopolamin je podložan racemizaciji i hidrolizi. Ciklodekstrini su pokazali stabilizirajući ili destabilizirajući učinak na ovaj spoj, ovisno o njihovoj strukturi. Primjerice, α -CD je imao destabilizirajući učinak potičući izomerizaciju i

hidrolizu skopolamina, dok su ga metilirani, hidroksipropilirani i hidroksietilirani derivati β -CD, kao i prirodni β - i γ -CD stabilizirali. Stabiliziranje je posljedica inkluzije u šupljinu CD zbog koje su kiralni ugljikov atom i esterska skupina zaštićeni od hidroksilnog napada u vodenoj otopini (slika 9).⁸⁹



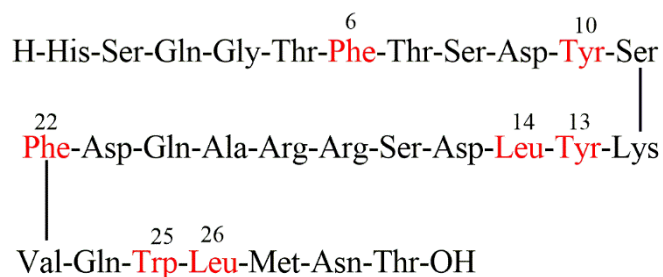
Slika 9. Molekulska struktura *S*-skopolamina s naznačenim dijelom koji je uklopljen u šupljinu CD

Resveratrol (slika 10) je prirodan stilben prisutan u velikom broju biljaka, a pokazuje protuupalno i protutumorsko djelovanje.⁸² Pa iako postoji velik potencijal za razvoj novog terapijskog oblika ovog lijeka s pulmonarnom primjenom koji bi poslužio kao moguća alternativna za konvencionalne kemoterapeutike koji se primjenjuju za liječenje tumora pluća njegova primjena je još uvijek ograničena. Resveratrol je uz problem ograničene topljivosti i bioraspoloživosti podložan i hidrolizi u neutralnom i bazičnom mediju. Utjecaj alkilsulfoniranog derivata β -CD na topljivost i stabilnost resveratrola detaljno je istražen pri čemu je utvrđeno da osim topljivosti, SBE- β -CD višestruko poboljšava stabilnost ovog potencijalnog lijeka pri fiziološkoj pH-vrijednosti od 7,4 kao i u biološkim matricama, odnosno u ljudskoj krvnoj plazmi. Uz to, inkluzijski kompleksi resveratrola sa SBE- β -CD su zadržali citotoksični učinak ovog lijeka na stanične linije nemikrocelularnog karcinoma pluća.⁹⁰



Slika 10. Molekulska struktura resveratrola

Ciklodekstrini ne stabiliziraju samo male organske molekule već imaju sposobnost stabiliziranja i bioloških makromolekula. Kao vrlo zanimljiv primjer ističe se stabilizacija glukagona γ -ciklodekstrinom. Glukagon (slika 11) je peptidni hormon gušterače građen od 29 aminokiselina, a koristi se za liječenje hipoglikemije u hitnim slučajevima pri čemu se parenteralno primjenjuje u obliku kisele vodene otopine. Kao i velik broj drugih peptida glukagon podilazi kemijskoj i fizičkoj razgradnji u kiselom mediju što predstavlja ozbiljan problem koji može ograničiti njegov terapijski učinak. Već neko vrijeme je poznato kako je γ -CD najsigurniji od svih prirodnih CD za parenteralnu primjenu. Na temelju rezultata spektroskopije NMR zaključeno je kako γ -CD tvori inkluzijske komplekse s bočnim ograncima svih aromatskih aminokiselina glukagona, odnosno s Tyr, Phe i Trp kao i s bočnim ogrankom Leu. Uslijed nastajanja inkluzijskih kompleksa γ -CD s bočnim ograncima aromatskih aminokiselina dolazi do smanjenja agregacije, odnosno do poboljšanja fizičke stabilnosti glukagona što je također dokaz kako navedene aminokiseline hidrofobnim intermolekulskim interakcijama započinju agregaciju ovog peptida. Kemijska stabilnost glukagona u kiselom mediju narušava se cijepanjem amidnih, odnosno peptidnih veza između asparaginske kiseline i susjednih aminokiselina. Do takvog cijepanja dolazi na C-terminalnom kraju Asp na 9. i 21. poziciji te na C- i N-terminalnom kraju Asp na 15. poziciji. Poboljšanje kemijske stabilnosti glukagona u kiselom mediju objašnjeno je nastajanjem inkluzijskih kompleksa γ -CD s bočnim ograncima Leu na 14. poziciji te Tyr i Phe na 10. i 22. poziciji polipeptidnog lanca. Zbog steričkih smetnji koje takvo kompleksiranje γ -CD uzrokuje dolazi do inhibiranja kemijske razgradnje ovog peptida.⁹¹



Slika 11. Aminokiselinska sekvenca glukagona u kojoj su crveno označene aminokiseline čiji bočni ogranci ostvaruju interakcije s γ -CD

2.4. Analiza inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina

Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina, odnosno njihovih interakcija s molekulama gosta prvi je i temeljni korak u njihovoj potencijalnoj primjeni u cilju poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava lijeka ili neke druge ciljane molekule. Potvrda nastajanja inkluzijskog kompleksa i njegova potpuna karakterizacija nije jednostavan zadatak i uglavnom zahtjeva primjenu velikog broja analitičkih tehnika, a dobivene rezultate treba objediniti budući da većina tehnika istražuje neko određeno svojstvo molekule gosta ili inkluzijskog kompleksa. Samo takva opsežna karakterizacija može omogućiti bolje i dublje razumijevanje interakcija između ciklodekstrina i gosta, a time i odabir najprikladnijeg ciklodekstrina ili njegovog derivata za neku određenu primjenu. Potvrda nastajanja inkluzijskog kompleksa u otopini ne znači i potvrdu njihovog nastajanja u čvrstom stanju. Odabir tehnike za pripremu inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju jako utječe na svojstva konačnog produkta. Potpuna karakterizacija inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju ima ključnu ulogu u konačnom odabiru tehnike za njihovu učinkovitu pripremu.

2.4.1. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u otopini

Glavne tehnike za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa u otopini možemo podijeliti na spektroskopske, elektroanalitičke, tehnike odjeljivanja te na polarimetriju i izotermnu titracijsku kalorimetriju. U nastavku rada detaljno će se opisati one tehnike za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa CD koje su korištene u sklopu ovog doktorskog rada.

U spektroskopske tehnike za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa CD ubrajamo UV/Vis apsorpcijsku spektroskopiju, fluorescencijsku spektroskopiju, spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije, cirkularni dikroizam i elektronsku spinsku rezonanciju. Upotreba većine spektroskopskih tehnika u karakterizaciji inkluzijskih kompleksa temelji se na mjerenju

promjene nekog karakterističnog svojstva uslijed inkluzije gosta u središnju šupljinu ciklodekstrina.⁹² Mjerenja se najčešće provode pri stalnoj koncentraciji supstrata uz variranje koncentracije ciklodekstrina, odnosno pravilnim dizajnom titrimetrijske metode. Prilikom korištenja UV/Vis apsorpcijske spektroskopije prati se promjena apsorpcijskog spektra supstrata uslijed inkluzije u šupljinu CD ukoliko taj proces utječe na promjenu mikrookoline kromofora. Kao posljedicu nastajanja inkluzijskog kompleksa moguće je očekivati hipsokromne ili batokromne pomake apsorpcijskih maksimuma supstrata kao i hiperkromni ili hipokromni učinak. Sami ciklodekstrini nisu spektralno aktivne vrste u UV/Vis području što uvelike olakšava ovakve eksperimente.^{92,93}

Fluorescencijska spektroskopija vrlo je osjetljiva tehnika čija je primjena u izučavanju inkluzijskih kompleksa CD ograničena samo na supstrate koji posjeduju mogućnost fluorescentne emisije. Kao i u prethodno opisanom slučaju, najčešće se provode titrimetrijski eksperimenti pri čemu dolazi do promjena emisijskog spektra supstrata uslijed inkluzije u šupljinu CD. Fluorescencijska spektroskopija i UV/Vis apsorpcijska spektroskopija su korisne tehnike za određivanje konstanti stabilnosti i stehiometrije inkluzijskih kompleksa tritrimetrijskim metodama.^{61,92,93} Fluorescencijska spektroskopija smatra se dobrom alternativom za UV/Vis apsorpcijsku spektroskopiju zbog svoje izuzetne osjetljivosti koja omogućava rad pri vrlo niskim koncentracijama analita što je posebno iskoristivo u području izučavanja slabo topljivih lijekova. Eksperimentalno dobiveni podaci titracijskih analiza (promjena apsorpcije ili intenziteta fluorescentne emisije) analiziraju se različitim matematičkim modelima koji su izvedeni za određenu stehiometriju kompleksa te se podvrgavaju sada već zastarjelim metodama linearne regresijske analize poput Benesi-Hildebrandove, Scottove ili Scatchardove metode koje često uključuju različite aproksimacije.^{93,94} Uzmimo za primjer Benesi-Hildebrand metodu:

$$\frac{1}{\Delta_i} = \frac{1}{K_f \cdot \Delta_{MAX} \cdot [CD]_i} + \frac{1}{\Delta_{MAX}} \quad (10)$$

pri čemu Δ_i označava promjenu fizikalne veličine koju se prati uslijed dodatka CD (primjerice apsorpcija ili relativni intenzitet emisije), Δ_{MAX} označava vrijednost fizikalne veličine kada su sve molekule supstrata kompleksirane ciklodekstrinima, a $[CD]_i$ označava koncentraciju CD u toj točki titracije. U njoj se aproksimira da je $C_{CD} = [CD]$ te kako su promjene praćene fizikalne veličine proporcionalne koncentraciji kompleksa. Također, pretpostavlja se kako je

sav supstrat kompleksiran na kraju titracijskog eksperimenta pri visokim koncentracijama CD.⁹³ Benesi-Hildebrand metoda uz ostale metode linearne regresijske analize se zbog svoje jednostavnosti i dalje široko primjenjuju za određivanje konstanti stabilnosti i stehiometrija kompleksa iako je poznato da su podložne relativno velikim greškama. Kako bi vrijednosti konstanti stabilnosti za komplekse stehiometrije 1:1 bile reprezentativne, a greške svedene na minimum ($\approx 1\%$) potrebno je osigurati da početni omjer koncentracije ciklodekstrina i supstrata prilikom titracije bude $C_{CD}/C_G \geq 100$.^{93,95}

Spektroskopija NMR je tehnika od izbora za strukturnu karakterizaciju inkluzijskih kompleksa CD u otopini. Na temelju rezultata analize spektroskopijom NMR moguće je direktno odrediti orijentaciju molekule gosta u šupljini CD, dok ostale spektroskopske tehnike daju samo neke indirektne informacije o geometriji kompleksa u otopini. Najjednostavniji dokaz o inkluziji gosta u šupljinu CD proizlazi iz razlika ^1H ili ^{13}C NMR kemijskih pomaka (δ / ppm) molekula gosta i CD u slobodnom obliku te u kompleksiranom obliku. Uslijed inkluzije molekule gosta u šupljinu CD najčešće dolazi do izraženih razlika u ^1H NMR kemijskim pomacima za H-3 i H-5 protone koji se nalaze unutar središnje šupljine CD.^{92,93} Izvedene tehnike NMR poput NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) te ROESY (engl. *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*) se zasnivaju na fenomenu nuklearnog Overhauserovog efekta, a primjenjuju za određivanje prostorne udaljenosti atoma što je korisno prilikom utvrđivanja trodimenzionalnih struktura i konformacija organskih molekula i biomolekula pa se često koriste i za strukturnu karakterizaciju inkluzijskih kompleksa koje tvore ciklodekstrini.⁹² Uz navedene tehnike valja spomenuti i NMR DOSY (engl. *diffusion ordered spectroscopy*) tehniku koja se često koristi za izučavanje višekomponentnih kompleksnih sustava pa tako i za inkluzijske komplekse CD. Sve NMR tehnike pate od niske osjetljivosti što je njihova velika mana prilikom izučavanja inkluzijskih kompleksa koje tvore CD sa slabo topljivim lijekovima pa se zbog toga često pribjegava korištenju različitih drugih otapala kojima se njihova topljivost poboljšava što svakako utječe na interakcije između gosta i domaćina u usporedbi s jednostavnim vodenim otopinama.⁹²

Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) jedina je analitička tehnika koja omogućava istovremeno i direktno određivanje konstante stabilnosti, stehiometrije te termodinamičkih parametara ($\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r S^\circ$, i $\Delta_r G^\circ$) koji karakteriziraju nastajanje inkluzijskih kompleksa CD. Eksperimenti se najčešće provode titriranjem otopine gosta poznate koncentracije koji se nalazi u reakcijskoj ćeliji kalorimetra. Kao titrant koristi se otopina CD koja se postupno dodaje u

ćeliju pri čemu uslijed nastajanja inkluzijskog kompleksa dolazi do promjene entalpije.^{92,93} Alternativni pristup kod kojeg se otopina CD titrira otopinom gosta koji ima ulogu titranta je posebno prikladan za slabo topljive lijekove.⁹³ Prilikom provođenja eksperimenta reakcijska ćelija je termostatirana pri konstantnoj temperaturi, a uslijed interakcije gosta i liganda dolazi do oslobađanja topline koja je direktno proporcionalna količini titransa koji je dodan u reakcijsku ćeliju. Količina oslobođene topline bilježi se u obliku vremenski ovisnog termograma.⁹⁶⁻⁹⁸ Kako reakcijska ćelija postepeno postaje sve više zasićena molekulama ciklodekstrina signal oslobođene topline se progresivno smanjuje sve dok ne dosegne vrijednost pozadinske entalpije razrjeđenja. Po završetku eksperimenta vrijednosti entalpije se integriraju i prikazuju u obliku funkcije molarnog omjera komponenti u ćeliji, a dobiveni rezultati se analiziraju različitim matematičkim modelima prema kojima je moguće izračunati konstantu stabilnosti, stehiometriju te termodinamičke parametre kompleksiranja. Na temelju izračunatih vrijednosti termodinamičkih parametara moguće je procijeniti doprinos različitih vrsta nekovalentnih interakcija ukupnom kompleksiranju molekule gosta ciklodekstrinima.^{96,97}

Uz prethodno opisane tehnike za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa CD u otopini koriste se i elektroanalitičke tehnike poput polarografije, voltametrije, potenciometrije i konduktometrije. Tehnike odjeljivanja koje se koriste za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa su tekućinska kromatografija i kapilarna elektroforeza.

Spektrometrija masa (MS) se ne može direktno svrstati s prethodno nabrojanim tehnikama za izučavanje inkluzijskih kompleksa CD u otopini budući da izučava kemijske procese u plinskoj fazi. Ipak, razvojem blagih ionizacijskih tehnika poput elektroraspršenja ili matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) koje omogućavaju prijenos inkluzijskih kompleksa iz čvrste ili tekuće u plinsku fazu bez disocijacije kompleksa spektrometrija masa se sve više koristi u njihovoj karakterizaciji. Na temelju MS rezultata moguće je odrediti stehiometriju kompleksa, a na temelju rezultata tandemne spektrometrije masa (MS/MS) moguće je provesti strukturnu karakterizaciju takvih kompleksa te dobiti informacije o energiji vezanja. Rezultate MS analiza potrebno je pažljivo obraditi budući da je poznato kako MS može dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate, posebice prilikom korištenja elektroraspršenja kao ionizacijskog izvora.^{99,100} Nastajanje nespecifičnih adukata koji su rezultat elektrostatskih interakcija između ciklodekstrina i molekule gosta u ionskom izvoru te disocijacija inkluzijskih kompleksa su potencijalni problemi koji mogu dovesti do pogrešnih zaključaka. Naime, polarne interakcije

poput elektrostatskih interakcija i vodikovih veza su dosta slabije u otopini u odnosu na plinsku fazu pa je u MS spektrima moguće opaziti klastere nekih spojeva koji u otopini ne postoje. S druge strane, nepolarne interakcije su u plinskoj fazi slabije u odnosu na otopinu pa se kompleksi čije je postojanje u otopini potvrđeno drugim tehnikama često ne mogu opaziti u MS spektrima. Zbog toga se kompleksiranje CD često uspoređuje s njihovim odgovarajućim linearnim oligosaharidnim analogima kako bi se isključio nastanak nespecifičnih adukata. Drugi način razlikovanja „stvarnih“ inkluzijskih kompleksa od nespecifičnih adukata je konstruiranjem grafova ovisnosti relativne zastupljenosti iona kompleksa o primijenjenoj kolizijskog energiji (engl. *breakdown curves*) pomoću kojih je moguće usporediti energije vezanja.^{100,101} U posljednje se vrijeme za razlikovanje inkluzijskih kompleksa od nespecifičnih adukata nastalih elektrostatskim interakcijama u ionskom izvoru sve više koristi i spektrometrija ionske pokretljivosti spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *ion mobility-mass spectrometry*).¹⁰¹

2.4.2. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju

Inkluzijske komplekse CD u čvrstom stanju moguće je pripremiti većim brojem metoda koje možemo klasificirati na metode u otopini, metode u polučvrstom stanju te na metode u čvrstom stanju.^{102,103} Kod metoda u otopini gost i CD su otopljeni u vodi ili u nekoj kombinaciji vode s organskim otapalom uz podešavanje uvjeta kako bi se postigla njihova maksimalna interakcija. Produkt u čvrstom stanju se zatim u slučaju prirodnih CD koji daju netopljive komplekse (B_s solubilizacijske krivulje) izolira kristalizacijom, dok se u slučaju topljivih kompleksa dobiva tehnikama sušenja poput sušenja raspršivanjem, liofilizacije itd. U metode u polučvrstom stanju ubrajamo metodu zagrijavanja u hermetički zatvorenim posudama i metodu gnječenja koja nije osobito učinkovita jer često dovodi samo do djelomičnog kompleksiranja. U metode u čvrstom stanju ubrajamo pripremu kompleksa mikrovalnim ozračivanjem te mehanokemijsku aktivaciju mljevenjem u različitim vrstama visokoenergijskih mlinova. Među navedenim metodama mehanokemijska aktivacija mljevenjem se ističe kao brza, učinkovita i održiva metoda koja zadovoljava načela zelene kemije jer najčešće isključuje upotrebu organskih otapala.¹⁰³

Bez obzira na metodu pripreme inkluzijskih kompleksa CD u čvrstom stanju, karakterizacija konačnih produkata zahtjeva upotrebu većeg broja analitičkih tehnika pri čemu se rezultati objedinjuju i zajednički interpretiraju kao i u slučaju karakterizacije kompleksa u otopini. Bez

obzira na korištenu tehniku općenit protokol prilikom karakterizacije uključuje zasebnu analizu pojedinih komponenti, analizu fizičke smjese tih komponenti te analizu čvrstog produkta koji je dobiven nekom od prethodno nabrojanih metoda. Krajnji cilj je potvrditi razlike u dobivenim rezultatima analize fizičke smjese komponenti i analize čvrstog produkta, odnosno potencijalnog inkluzijskog kompleksa. Tehnike za karakterizaciju u čvrstom stanju dijelimo na tehnike termičke analize, tehnike temeljene na difrakciji rendgenskih zraka, spektroskopske tehnike te pretražnu elektronsku mikroskopiju (engl. *scanning electron microscopy*, SEM).

Razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) jedna je od najšire korištenih tehnika za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa CD u čvrstom stanju. Na temelju usporedbe DSC krivulja zasebnih komponenti, njihove fizičke smjese i uzorka čvrstog produkta moguće je izvesti zaključke o postojanju ili izostanku interakcija u čvrstom stanju. DSC krivulja fizičke smjese komponenti uglavnom je superpozicija krivulja pojedinih komponenti. Promjene DSC krivulje čvrstog produkta u odnosu na krivulju fizičke smjese poput smanjenja ili širenja endotermnog signala taljenja molekule gosta te pomicanja prema nižim temperaturama tumače se kao gubitak kristalne strukture gosta uslijed uspostavljanja interakcija s CD. Potpun izostanak signala taljenja gosta na DSC krivulji čvrstog produkta često se tumači kao valjan dokaz inkluzije u šupljinu CD iako je ova pojava samo direktan dokaz gubitka kristalne strukture, odnosno prelaska u amorfni oblik što zasigurno može biti posljedica inkluzije, ali i nekih drugih procesa. Ukoliko je signal taljenja gosta i dalje prisutan na DSC krivulji čvrstog produkta moguće je procijeniti njegovu kristalnost na temelju uspoređivanja vrijednosti entalpija taljenja iz krivulje čvrstog produkta, fizičke smjese ili zasebne komponente.

U tehnike termičke analize ubrajamo još i termogravimetrijsku analizu te mikroskopiju s grijacom pločom (engl. *hot-stage microscopy*).

Tehnika difrakcije rendgenskog zračenja u polikristalnom uzorku (engl. *powder X-ray diffraction*, PXRD) je tehnika koja se često primjenjuje za potkrepljivanje rezultata DSC analize. Najveća prednost ove tehnike je njena nedestruktivna priroda pri čemu ne dolazi do bilo kakve fizikalno-kemijske promjene uzorka prilikom analize za razliku od tehnika termičke analize. Usporedbom difraktograma zasebnih komponenti, difraktograma fizičkih smjesi koji su njihova superpozicija s difraktogramima čvrstih produkata moguće je izvesti zaključke o interakciji komponenti u čvrstoj fazi. Ukoliko je čvrsti produkt amorfne prirode (kao što je najčešće slučaj prilikom mehanokemijske aktivacije), tada PXRD nije prikladna tehnika za

strukturnu analizu, no može poslužiti za dodatnu potvrdu i objašnjavanje fenomena uočenih prilikom DSC analize. Primjerice, opažen gubitak kristalnosti ili potpuna amorfizacija može biti posljedica termički inducirane interakcije između gosta i CD prilikom DSC analize, a taj fenomen se može potvrditi ili isključiti na temelju rezultata PXRD analize za isti produkt.

Spektroskopske tehnike najčešće služe kao komplementarne tehnike prethodno nabrojanim za karakterizaciju potencijalnih inkluzijskih kompleksa CD u čvrstom stanju. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infra-red spectroscopy*, FT-IR) koristi se za proučavanja utjecaja interakcije gost:CD na njihova vibracijska stanja. Najčešće se interpretiraju promjene karakterističnih vrpce gosta poput nestajanja, širenja, promjena intenziteta, ali i nastajanja novih vrpce što sugerira uspostavu interakcija u čvrstom stanju. Takvi spektralni fenomeni mogu nastati kao rezultat ograničavanja vibracija istezanja molekule gosta zbog promjene mikrookoline uslijed inkluzije u šupljinu CD. Iako ova tehnika ima brojne prednosti kao što je vrlo dobra osjetljivost te financijski i vremenski nezahtjevne analize treba napomenuti kako pati od bitnih ograničenja. Naime, karakteristične vrpce molekule gosta i CD se često preklapaju, odnosno vrpce CD često maskiraju vrpce gosta. To je posebice slučaj u uzorcima u kojima su komponente prisutne u ekvimolarnom odnosu pri čemu je maseni udio CD uglavnom bitno veći od molekule gosta. Problem predstavlja i priprema uzoraka u obliku KBr pastila pri čemu može doći do induciranja fizikalno-kemijskih promjena komponenti u uzorku kao i do poticanja njihovih interakcija uslijed upotrebe sile pri čemu dobiven rezultat, odnosno spektar nije odraz realnog stanja u uzorku. Ipak, takav nepovoljan način pripreme uzorka moguće je izbjeći ukoliko se FT-IR spektroskopija koristi u obliku tehnike prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR). Uzorak se nanosi na potpuno reflektirajuću površinu te se pritisne dijamantnim klipom pri čemu ne postoji osjetljivost na promjene u debljinama uzorka ili načinu disperzije uzorka u KBr matrici kao što je slučaj kod klasične FT-IR analize. ATR tehnika je vrlo prikladna za analize razlika u kristalnim formama (polimorfizam), što je osobito korisno za karakterizaciju farmaceutskih formulacija. Ova tehnika pogodna je za istraživanje vodikovih veza, budući da omogućava dobivanje spektara bez poteškoća uzrokovanih intenzivnom apsorpcijom vibracija istezanja O–H veza.¹⁰²

Uz prethodno nabrojane tehnike za karakterizaciju sustava gost:CD u čvrstom stanju u posljednje se vrijeme sve više koriste i različite tehnike spektroskopije NMR u čvrstom stanju.¹⁰⁴

Odgovarajuća karakterizacija sustava gost:CD ima ključnu ulogu prilikom odabira optimalne metode pripreme inkluzijskih kompleksa kao i odgovarajućih eksperimentalnih uvjeta, ali i za odabir najprikladnijeg ciklodekstrina za molekulu gosta kako bi maksimalno povećale njihove međusobne interakcije i razvio novi terapijski sustav s poboljšanim svojstvima.

2.5. Validacija analitičkih postupaka

Prikladnost bilo kojeg analitičkog postupka, odnosno metode za njenu namjenu provjerava se validacijom. Glavni cilj svake validacije je pružanje dokaza kako navedeni analitički postupak može dati pouzdane rezultate. Smjernice za validaciju analitičkih postupaka su brojne i različite što uzrokuje i veliku diskrepanciju između njih. Moguće ih je podijeliti u nekoliko kategorija prema: matrici uzorka, razini (nacionalna ili međunarodna), području ili disciplini, analitičkoj tehnici i ciljnom analitu.¹⁰⁵ Validacija svih razvijenih analitičkih postupaka za kvantitativno određivanje nabumetona u ovom radu provedena je prema smjernicama iz poglavlja Q2(R1) i Q2(R2) koje propisuje ICH.^{106,107} Riječ je o trenutno međunarodno važećim smjernicama za analitičku primjenu u području farmacije. Validacijski parametri čiju provjeru nalažu navedene smjernice jesu: specifičnost/selektivnost, raspon metode i kalibracijski model (linearan, nelinearan itd.), granice detekcije i kvantifikacije, preciznost, točnost i robusnost. Svaki od navedenih validacijskih parametara je ukratko opisan:

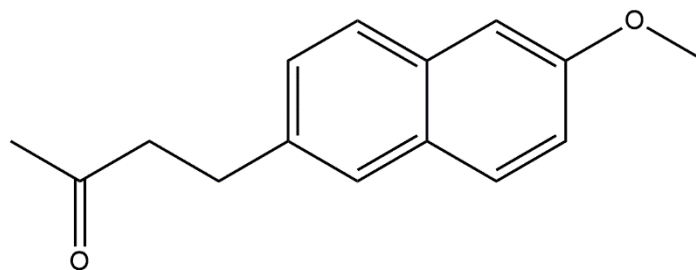
- *Specifičnost i selektivnost metode* – procjena sposobnosti metode da nedvojbeno određuje analit ili više njih u prisutnosti ostalih komponenti uzorka poput onečišćenja ili matrice uzorka.
- *Raspon metode* – područje između najniže i najviše koncentracije, odnosno rezultata za koje je utvrđena zadovoljavajuća razina točnosti, preciznosti i odziva na temelju nekog kalibracijskog modela (npr. linearni).
- *Linearni kalibracijski model* – kalibracijski model koji pokazuje linearnu ovisnost koncentracije analita o odzivu detektora unutar raspona metode.
- *Granica detekcije metode* – najmanje količina ciljnog analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i nužno točno kvantificirati.
- *Granica kvantifikacije metode* – najmanja količina ciljnog analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću preciznost i točnost.

- *Preciznost metode* – opisuje stupanj slaganja između rezultata niza višestrukih mjerenja koja su provedena pod istim i unaprijed određenim uvjetima. Procjenjuje se na temelju tri validacijska parametra: ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost, a izražava se kao nepreciznost u obliku relativne standardne devijacije, koeficijenta varijacije ili varijance.
- *Točnost metode* – opisuje stupanj slaganja između izmjerene vrijednosti i konvencionalne točne vrijednosti ili prihvaćene referentne vrijednosti
- *Robusnost metode* – opisuje dosljednost, odnosno sposobnost metode da ostane nepromijenjena i ispunji očekivane kriterije tijekom normalnog korištenja. Provjerava se namjernim promjenama različitih eksperimentalnih parametara

2.6. Nabumeton

Iako je naftalen najjednostavniji biciklički aromatski spoj, njegovi derivati su izuzetno potentni spojevi koji pokazuju antitumorsko, antimikrobno, protuupalno i antivirusno djelovanje. Neki se koriste za liječenje kardiovaskularnih te neuroloških poremećaja, ili pak djeluju kao antituberkulotici. Derivati naftalena koji se koriste kao lijekovi odobreni od strane USFDA su: tolnaftat, naftifin, nafcilin, terbinafin, propranolol, duloksetin, nafimidon, lasofoksifen, bedakvilin, rifampicin, naproksen te nabumeton.¹⁰⁸

Nabumeton (NAB), odnosno 4-(6-metoksinaftalen-2-il)butan-2-on je nesteroidni protuupalni predlijek s analgetičkim i antipiretskim djelovanjem,⁶ a karakterizira ga iznimno ograničena topljivost u vodenim medijima pa se stoga svrstava u BCS skupinu II.^{109,110} Klinički se koristi za ublažavanje boli i upala kod pacijenata s osteoartritisom i reumatoidnim artritisom te za liječenje akutnih ozljeda mekog tkiva.¹¹¹ Prema strukturi (slika 12) nabumeton svrstavamo u ketone, a kao predlijek on je biološki neaktivna tvar koja uslijed opsežnog hepatičkog metabolizma i djelovanja enzima citokroma P450 1A2 prelazi u svoj farmakološki aktivan oblik, 6-metoksi-2-naftiloctenu kiselinu (6-MNA).¹¹² Ona pokazuje inhibitorско djelovanje na enzime ciklooksigenaza i to najvjerojatnije preferentno kao inhibitor izoforme COX-2 čime sprječava nastajanje prostaglandina, odnosno upalnih medijatora. Prema nekim istraživanjima 6-MNA pokazuje 3 do 5 puta veću aktivnost prema COX-2 u usporedbi s COX-1 izoformom.¹¹¹



Slika 12. Strukturna formula nabumetona

Nabumeton se nakon apsorpcije u GI sustavu u potpunosti metabolizira kroz tri glavna metabolička puta. Već spomenuta 6-MNA nastaje kao rezultat oksidativnog cijepanja bočnog alifatskog lanca. Ostali metaboliti NAB nastaju *O*-demetilacijom te redukcijom ketona do alkohola. 6-MNA se dalje metabolizira djelovanjem citokroma P450 2C9 do 6-hidroksi-2-naftiloctene kiseline.^{111,113} Budući da sam NAB, kao i njegovi ostali metaboliti (izuzev 6-MNA) ne pokazuju farmakološku aktivnost, kažemo da je on neutralni predlijek 6-MNA. Za razliku od uobičajenih neselektivnih inhibitora COX koji često pokazuju nepovoljan utjecaj na sluznicu GI sustava u vidu iritacija, krvarenja te nastanka perforacija i čireva, NAB i 6-MNA pokazuju višestruko manji utjecaj. Pretpostavlja se da je za to zaslužan izostanak kiselih svojstava ovog predlijeka, manjka enterohepatičke recirkulacije i preferentne inhibicije COX-2. Iako se isprva mislilo da je uzrok nepovoljnog utjecaja neselektivnih inhibitora COX na sluznicu GI sustava inhibicija COX-1 aktivnosti u želučanoj sluznici, novija eksperimentalna i klinička istraživanja ne potvrđuju u potpunosti ovu hipotezu. Misli se da je mehanizam utjecaja neselektivnih inhibitora COX na gastrointestinalni trakt kompleksniji nego što se isprva pretpostavljalo. Buduća dugotrajnija istraživanja utjecaja neselektivnih i COX-2 selektivnih inhibitora poput nabumetona na učestalost iritacija GI sustava dat će detaljnija objašnjenja.¹¹¹

Ograničena topljivost (ali i bioraspodivnost) NAB već ranije je bila predmet određenog broja istraživanja. Kumar i sur.¹¹⁴ pripravili su potencijalnu formulaciju NAB s kontroliranim oslobađanjem u obliku SLN čestica kombiniranjem tehnike homogenizacije taljenjem i ultrasoniciranjem. Pripravljene SLN čestice okarakterizirane su većim brojem analitičkih tehnika te im je provjerena citotoksičnost i *in vitro* brzina oslobađanja. Pripravljene SLN čestice zadovoljavajuće su efikasnosti enkapsuliranja lijeka s kontroliranom brzinom oslobađanja kroz šest dana. Međutim, pripravljene SLN čestice nabumetona pokazivale su određenu razinu citotoksičnosti. Isti autor⁶ je objavio pripravu SLN čestica NAB korištenjem stearinske kiseline

kao lipidne jezgre. Pripravljene SLN čestice pokazale su se kao potencijalni terapijski oblik za kontroliranu brzinu oslobađanja NAB kroz tri dana. Nisu pokazivale citotoksičnost. Kawish i sur.¹⁰⁹ pripravili su NLC čestice NAB korištenjem identične kombinacije tehnika kao u dva prethodno opisana istraživanja. Na temelju rezultata utvrđivanja brzine oslobađanja *in vitro* zaključeno je kako je pripravljena potencijalno nova formulacija NAB s mnogo bržim oslobađanjem djelatne tvari u usporedbi s njenom suspenzijom. Njena *in vivo* protuupalna djelotvornost je bila čak duplo veća, ali i dugotrajnija u usporedbi s običnom suspenzijom NAB. Goodwin i sur.¹¹⁵ mljevenjem su pripravili nanokristale NAB koje su uspjeli stabilizirati na vremenski period dulji od godine dana korištenjem različitih polimera, i tako dobiti potencijalno nove formulacije ovog lijeka s poboljšanim svojstvima. Slično istraživanje proveli su Frank i sur.¹¹⁶. Oni su detaljno istraživali utjecaj većeg broja polimera na stabilizaciju amorfnog oblika NAB. Utvrdili su da polimeri koji se dobro miješaju s NAB u čvrstom stanju značajno stabiliziraju NAB, odnosno priječe njegov prelazak u kristalnu formu. Zanimljivo je da prisutnost funkcijskih grupa s obilježjima donora vodikovih veza (NAB je akceptor vodikove veze) ne znači nužno veću stabilizaciju NAB u amorfnom obliku. Utjecaj CD kao potencijalnih pomoćnih tvari u novim terapijskim oblicima NAB s poboljšanim svojstvima nije dovoljno istražen. Goyenechea i sur.¹¹⁷ su istražili utjecaj α -CD i γ -CD na topljivost NAB u vodenim otopinama. Niske vrijednosti konstanti stabilnosti njihovih kompleksa upućivale su na vrlo slabe interakcije. Ipak, kompleksi NAB i γ -CD u čvrstom stanju pripremljeni su kristalizacijom iz otopine. Brzina oslobađanja *in vitro* NAB iz ovog kompleksa bila je velika te je nakon 10 minuta čak 80 % lijeka bilo otpušteno u medij. U usporedbi s tim, brzina oslobađanja NAB iz obične fizičke smjese NAB s γ -CD je bila mnogo manja, a manje od 40 % lijeka bilo je otpušteno u medij nakon 120 min. Nabumeton je u odsustvu γ -CD imao najmanju brzinu oslobađanja s postotkom otpuštenog lijeka od samo 3 % nakon 120 min. Utjecaj β -CD na topljivost i stabilnost NAB do sada nije istražen.

2.6.1. Inkluzijski kompleksi nabumetona s ciklodekstrinima

Inkluzijski kompleksi nabumetona i nekih ciklodekstrina u otopini i u čvrstom stanju već su u manjoj mjeri istraživani. Kompleksiranje nabumetona ciklodekstrinima u otopini najčešće je istraživano fluorescencijskom spektroskopijom,^{118–121} dok su termodinamički parametri određivani indirektno na temelju Van't Hoffove jednadžbe.^{118–120} Eksperimentalno dobiveni podaci fluorimetrijskih titracijskih analiza podvrgnuti su metodama linearne regresijske

analize. Vrijednosti konstanti stabilnosti i ostalih termodinamičkih parametara iz dostupne literature prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Vrijednosti konstanti stabilnosti i ostalih termodinamičkih parametara kompleksiranja nabumetona različitim ciklodekstrinima

CD	$T / ^\circ\text{C}$	$K / \text{mol}^{-1} \text{L}$	$\Delta_r H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S^\circ / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$\Delta_r G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$
α -CD	20 ^[a]	$42,8 \pm 3$	$-25,0 \pm 0,3$	$-54,9 \pm 1,2$	$-8,9 \pm 0,2$
β -CD	15 ^[b]	2420 ± 390	$-28,8 \pm 0,8^{\text{[a]}}$ $-17,11 \pm 0,05^{\text{[b]}}$	$-32,8 \pm 0,8^{\text{[a]}}$ $5,31 \pm 0,04^{\text{[b]}}$	$-19,2 \pm 0,7^{\text{[a]}}$
	20 ^[a]	2864 ± 143			
	25 ^[b]	1800 ± 70			
	37 ^[b]	1450 ± 80			
HP- β -CD	45 ^[b]	1230 ± 70	$-16,7 \pm 0,4^{\text{[a]}}$ $-18,01 \pm 0,09^{\text{[b]}}$	$9,8 \pm 0,4^{\text{[a]}}$ $5,82 \pm 0,07^{\text{[b]}}$	$-19,6 \pm 0,4^{\text{[a]}}$
	15 ^[b]	3350 ± 350			
	20 ^[a]	3048 ± 122			
	25 ^[b]	2880 ± 230			
RM- β -CD	37 ^[b]	2160 ± 140	$-9,61 \pm 0,07$	$36,86 \pm 0,07$	
	45 ^[b]	1820 ± 70			
	15 ^[b]	4610 ± 530			
	25 ^[b]	4170 ± 370			
γ -CD	37 ^[b]	3320 ± 180	$-22,90 \pm 0,06$	$12,80 \pm 0,05$	
	45 ^[b]	3200 ± 260			
	15 ^[c]	2900 ± 400			
	25 ^[c]	2200 ± 100			
	35 ^[c]	1700 ± 100			
	45 ^[c]	1200 ± 100			

^[a] ref. 118; ^[b] ref. 119; ^[c] ref. 120

Todorova i Schwarz¹²² su jedini direktno odredili termodinamičke parametre kompleksiranja NAB i β -CD korištenjem ITC tehnike. Mjerenja su provedena u 10 mmol L^{-1} fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,1$) pri različitim temperaturama, a eksperimentalno dobiveni podaci analizirani su matematičkim modelom koji je izveden za stehiometrijski omjer 1:1. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Vrijednosti konstanti stabilnosti i ostalih termodinamičkih parametara kompleksiranja nabumetona β -ciklodekstrinom pri pH -vrijednosti od 7,1 prema ref. 122

CD	$T / ^\circ\text{C}$	$K / \text{mol}^{-1} \text{L}$	$-\Delta_r H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S^\circ / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$-\Delta_r G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$
β -CD	20	3300 ± 360	$13,3 \pm 0,3$	$22,1 \pm 0,6$	$19,7 \pm 0,3$
	25	3790 ± 690	$11,7 \pm 1,9$	$29,4 \pm 4,9$	$20,4 \pm 0,4$
	30	2940 ± 650	$13,6 \pm 2,3$	$21,6 \pm 3,6$	$20,1 \pm 0,1$
	35	2370 ± 540	$14,7 \pm 1,3$	$16,8 \pm 1,6$	$19,9 \pm 0,6$
	40	1970 ± 210	$17,7 \pm 4,0$	$6,55 \pm 1,48$	$19,8 \pm 0,3$

Strukturnu karakterizaciju inkluzijskog kompleksa NAB s β -CD proveli su Valero i sur.¹¹⁸ te Goyenechea i sur.¹¹⁹ za danas vrlo primitivnom analizom spektroskopijom ^1H NMR. Na temelju rezultata zaključeno je kako je naftalenska jezgra NAB enkapsulirana u šupljini CD, a sama molekula NAB se orijentira na dva načina pri čemu 6-metoksi i 2-butanon supstituenti prolaze kroz uži ili širi obod molekule CD.

Strukturna karakterizacija inkluzijskih kompleksa NAB s β -CD u otopini u najvećoj je mjeri provedena računalnim istraživanjima.^{123–126} Chen i sur.¹²³ su zaključili kako u interakcijama dominiraju van der Waalsove interakcije pri čemu se 2-metoksi supstituent orijentira kroz uži obod CD, dok se fleksibilni 2-butanonski supstituent nalazi na suprotnoj strani pri čemu nema interakcije karbonilne skupine s CD. Vrijednosti izračunatih standardnih reakcijskih Gibbsovih energija iz ovog istraživanja pokazale su dobro slaganje s eksperimentalno određenim vrijednostima iz ref. 122. Wickstrom i sur.¹²⁴ su kasnije korištenjem naprednijih metoda izučavali termodinamiku interakcije 57 modelnih spojeva s β -CD, a među njima i nabumetona pri čemu su dobili vrlo dobro slaganje s eksperimentalnim vrijednostima iz ref. 122. Suárez i Diaz¹²⁵ su na temelju simulacija molekulske dinamike procijenili kako je nabumeton karbonilnom skupinom u interakciji s širim obodom β -CD pri čemu molekule vode posreduju u formiranju vodikove veze ($\text{C}=\text{O}\cdots(\text{H}_2\text{O})-\text{OH}$). Bensouilah i sur.¹²⁶ su na temelju različitih kvantno-kemijskih proračuna zaključili kako van der Waalsove interakcije dominiraju u inkluzijskom kompleksu NAB i β -CD uz postojanje slabih vodikovih veza. Njihovi rezultati sugeriraju kako je optimalna orijentacija NAB u šupljini CD ona pri kojoj se 2-butanonski supstituent pruža kroz širi obod CD.

Goyenechea i sur.¹¹⁷ istraživali su interakcije NAB s α -, γ - i β -CD te s njegovim nasumično metiliranim i hidroksipropiliranim derivatom u čvrstom stanju. Čvrsti produkti pripremljeni su kristalizacijom i gnječenjem u slučaju α -, β -, HP- β -CD i RM- β -CD, a u slučaju γ -CD dodatno su pripremljeni i taloženjem netopljivog kompleksa. Interakcije u čvrstom stanju potvrđene su na temelju FT-IR, PXRD i termičke analize. Na temelju usporedbe s rezultatima koji su dobiveni za fizičke smjese komponenti zaključeno je kako dolazi do djelomične uspostave interakcija u čvrstom stanju koju prati i određen stupanj amorfizacije NAB.

Prema svemu navedenom jasno je kako su eksperimentalni podaci koji objašnjavaju interakcije NAB s β -CD, a posebice s derivatima β -CD izuzetno oskudni. Detaljnija objašnjenja kompleksiranja NAB u vodenim otopinama su nužna kako bi se osmislila kvalitetna strategija za pripremu binarnih smjesi ovih komponenti u čvrstom stanju. Na temelju provedenih

solubilizacijskih istraživanja i karakterizacije u otopini bilo bi moguće procijeniti koji od β -ciklodekstrina bi mogao biti najpovoljniji kandidat za pripravu produkata s NAB u čvrstom stanju. Važno je istaknuti kako utjecaj β -CD i njegovih derivata na stabilnost NAB u vodenim otopinama i u čvrstom stanju do sada nije dovoljno istražen. Sveobuhvatna karakterizacija inkluzijskih kompleksa NAB s β -CD i njegovim hidroksipropiliranim, metiliranim i alkilsulfoniranim derivatima u otopini i u čvrstom stanju, te njihov utjecaj na topljivost i stabilnost NAB cilj su ovog doktorskog rada. Kao što je već spomenuto, za kvantitativno određivanje nabumetona u ovom radu razvijene su odgovarajuće analitičke metode koje su validirane prema smjernicama iz poglavlja Q2(R1) i Q2(R2) koje propisuje ICH.^{106,107}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i materijali

U radu su korištene sljedeće kemikalije i materijali:

- 4-(6-metoksinaftalen-2-il)butan-2-on, nabumeton ($C_{15}H_{16}O_2$); Cayman Chemical, SAD
- β -ciklodekstrin, β -CD ($C_{42}H_{70}O_{35}$); CycloLab, Mađarska
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, HP- β -CD ($C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_3H_7O)_n$), DS = 4,5; CycloLab, Mađarska
- nasumično metilirani β -ciklodekstrin, RM- β -CD ($C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n$), DS = 12; CycloLab, Mađarska
- natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina, SBE- β -CD; $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8O_3SNa)_n$, DS = 6,5; CycloLab, Mađarska
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , *pro analysi* stupnja čistoće; Kemika, Hrvatska
- klorovodična kiselina, HCl ($w = 37\%$), *pro analysi* stupnja čistoće; GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
- natrijev klorid, NaCl, *pro analysi* stupnja čistoće; GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
- simulirani želučani medij, pH = 1,0; pripremljen prema uputama iz desetog izdanja europske farmakopeje
- simulirani duodenalni medij, pH = 4,5; pripremljen prema uputama iz desetog izdanja europske farmakopeje
- simulirani intestinalni medij, pH = 6,8; pripremljen prema uputama iz desetog izdanja europske farmakopeje
- natrijev hidroksid, NaOH, *pro analysi* stupnja čistoće; Carlo Erba Reagents, Francuska
- vodikov peroksid, H_2O_2 ($w = 30\%$), *pro analysi* stupnja čistoće; VWR Chemicals BDH, Francuska
- acetonitril, HPLC stupnja čistoće; J. T. Baker, SAD
- metanol, HPLC stupnja čistoće; J. T. Baker, SAD
- metanol, LC-MS stupnja čistoće; Carlo Erba Reagents, Francuska
- etanol, *pro analysi* stupnja čistoće; GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska

- mravlja kiselina, LC-MS stupnja čistoće; Carlo Erba Reagents, Francuska
- ultračista voda dobivena korištenjem Mili-Q Advantage A10 sustava za pročišćavanje; Merck, Njemačka
- membranski filteri Chromafil Xtra H-PTFE-45/25, veličina pora 0,45 μm , Macherey-Nagel, Njemačka
- membranski filteri Chromafil O-20/15 MS, veličina pora 0,20 μm , Macherey-Nagel, Njemačka

3.1.1. Priprava simuliranih biorelevantnih medija

Svi korišteni simulirani biorelevantni mediji pripremljeni su prema uputama iz desetog izdanja europske farmakopeje.¹²⁷ Prilikom pripreme medija korišten je pH-metar *MP220 Mettler Toledo*, kalibriran acetatnim (pH = 4) i fosfatnim (pH = 7) puferom.

Otopina simuliranog želučanog medija (pH = 1,0) pripravljena je pipetiranjem 250 mL otopine NaCl koncentracije 0,2 mol L⁻¹ i 425 mL otopine HCl koncentracije 0,2 mol L⁻¹ u odmjernu tikvicu volumena 1000 mL. Odmjerna tikvica je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

Otopina simuliranog duodenalnog medija (pH = 4,5) pripravljena je u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL otapanjem 13,61 g KH₂PO₄ u 750,0 mL ultračiste vode. Kada je to bilo potrebno pH-vrijednost je ugođena pomoću 0,1 mol L⁻¹ otopine NaOH ili pomoću 0,1 mol L⁻¹ otopine HCl. Odmjerna tikvica je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

Otopina simuliranog intestinalnog medija (pH = 6,8) pripravljena je u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL pipetiranjem 250,0 mL otopine KH₂PO₄ koncentracije 0,2 mol L⁻¹ i 112,0 mL otopine NaOH koncentracije 0,2 mol L⁻¹. Odmjerna tikvica je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

3.2. Metode

3.2.1. Solubilizacijska istraživanja

Solubilizacijska istraživanja provedena su metodom zasićene otopine (engl. *shake-flask method*) u vodi i u simuliranim biorelevantnim medijima, odnosno u simuliranom želučanom (pH = 1,0), simuliranom duodenalnom (pH = 4,5) te u simuliranom intestinalnom mediju (pH = 6,8).

Utjecaj različitih β -ciklodekstrina na topljivost nabumetona u vodi praćen je u periodu od 72 h (svaka 24 h) pomoću razvijenih i validiranih spektrofotometrijskih i spektrofluorimetrijskih metoda. U tikvice za miješanje odvagan je suvišak nabumetona s obzirom na njegovu topljivost (≈ 20 mg) te određene količine β -CD (konačne koncentracije 0, 2,5, 5, 7,5, 10 i 12,5 mmol L⁻¹) ili njegovih derivata (konačne koncentracije 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 i 40 mmol L⁻¹), a zatim je dodan volumen od po 10 mL medija. Suspenzije su miješane na orbitalnim tresalicama *Tehnica EV-402* i *Tehnica Vibromix 403 EVT* (250 – 300 RPM). Alikvoti suspenzija filtrirani su nakon predviđenog perioda korištenjem Chromafil Xtra H-PTFE-45/25 filtera.

Analiza UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom provedena je spektrofotometrom *Analytik Jena Specord 200*. Apsorpcijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina (200 – 400) nm s postavljenom širinom pukotine od 1 nm i brzinom snimanja od 10 nm s⁻¹. Nabumeton je kvantitativno određivan mjerenjem apsorbancije pri apsorpcijskom maksimumu od 232 nm. Prije svakog mjerenja provedena je referentna korekcija instrumenta otopinom slijepa probe koja je po svom sastavu odgovarala sustavu otapala koji je korišten za pripravu uzoraka (acetonitril:H₂O = 70:30). Korištene su standardne kvarcne kivete dimenzija 10 · 10 mm.

Analiza fluorescencijskom spektroskopijom provedena je spektrofluorimetrom *PerkinElmer LS55*. Emisijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina (290 – 450) nm, pri čemu je valna duljina pobude iznosila 315 nm, dok je maksimum emisije nabumetona bilježen pri 353 nm. Širina ulazne i izlazne pukotine iznosila je 5 nm. Korištene su standardne kvarcne kivete dimenzija 10 · 10 mm. Sustav otapala u mjernim otopinama bio je identičan sustavu koji se koristio prilikom spektrofotometrijskih mjerenja.

3.2.2. Spektrofluorimetrijske titracije nabumetona β -ciklodekstrinima

Utjecaj β -CD i njegovih derivata HP- β -CD, RM- β -CD i SBE- β -CD na emisijski spektar nabumetona u vodi praćen je 1 h po pripravi smjese NAB+ β -CD. Svaka *batch* titracija provedena je barem tri puta.

U odmjerne tikvice volumena 5 mL pipetirani su određeni volumeni radne otopine nabumetona (koncentracije 100 μ g mL⁻¹, a koja je pripravljena razrjeđivanjem ishodne otopine nabumetona koncentracije 1 mg mL⁻¹ u acetonitrilu) i ishodne otopine ciklodekstrina (10 mg mL⁻¹ u vodi) nakon čega se odmjerne tikvice dopunila ultračistom vodom do oznake.

Ishodna otopina β -CD pripravljena je otapanjem 50,05 mg spoja u 5 mL ultračiste vode, otopina HP- β -CD otapanjem 50,21 mg spoja u mL ultračiste vode, otopina RM- β -CD otapanjem 49,97 mg spoja u 5 mL ultračiste vode i otopina SBE- β -CD otapanjem 50,69 mg spoja u 5 mL ultračiste vode. Ishodna otopina NAB pripravljena je u acetonitrilu zbog niske topljivosti spoja u vodi. Konačan sustav otapala u mjernim otopinama bio je acetonitril:H₂O \approx 1:450. Konačna koncentracija NAB u tikvicama (nije se mijenjala tijekom titracija) iznosila je $1 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, dok je koncentracija svakog β -CD sukcesivno rasla od 0 do $2,25 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹. Omjer koncentracija β -CD/NAB rastao je od početne vrijednosti 100 do 2250.

Emisijski spektri snimani su u rasponu valnih duljina od 250 do 450 nm, pri čemu je valna duljina pobude iznosila 262 nm. Širina ulazne i izlazne pukotine iznosila je 5 nm. Svi eksperimentalno dobiveni spektralni podaci obrađeni su računalnim programom *SPECFIT*.

3.2.3. Mikrokalorimetrijske titracije nabumetona β -ciklodekstrinima

Termodinamički parametri kompleksiranja nabumetona β -ciklodekstrinima u vodi određeni su na temelju mikrokalorimetrijskih titracija koje su provedene korištenjem *Malvern MicroCal PEAQ-ITC* mikrokalorimetra. Koncentracija otopine nabumetona ($V = 0,20$ mL) koja se nalazila u reakcijskoj ćeliji iznosila je $4,34 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ (ili $4,89 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹), dok su koncentracije korištenih otopina β -ciklodekstrina koje su pipetirane u reakcijsku ćeliju iznosile barem 175 puta više. Promjene entalpije koje su bilježene prilikom provođenja ITC titracija nabumetona β -ciklodekstrinima korigirane su s obzirom na promjene entalpija razrjeđenja ciklodekstrina koje su dobivene u odvojenim kontrolnim eksperimentima. Promjene entalpije uzrokovane razrjeđenjem nabumetona ili β -ciklodekstrina ultračistom vodom bile su zanemarive. Sve titracije provedene su pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Svi eksperimentalno dobiveni podaci obrađeni su računalnim programom *MicroCal PEAQ ITC Analysis Software*, pri čemu je stehiometrija kompleksiranja u korištenom modelu *single binding site* podešena na 1:1 jer je bila poznata iz rezultata prethodno provedenih spektrofotometrijskih titracija i analiza spektrometrijom masa.

3.2.4. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa spektrometrijom masa

Karakterizacija inkluzijskih kompleksa spektrometrijom masa provedena je korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije (*Agilent 1290 infinity II*) i spektrometrije masa (*Agilent 6550 iFunnel Q-TOF*) injektiranjem mjernih otopina u protok pokretne faze (engl. *flow*

injection analysis, FIA) bez upotrebe kromatografske kolone. Kao pokretna faza korišten je sustav: 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (MF_A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (MF_B) u omjeru MF_A:MF_B = 30:70 uz protok od 0,4 mL min⁻¹. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 5,0 µL.

Svi spektri masa snimani su u rasponu vrijednosti m/z (100 – 3200) pri rezoluciji od 2 GHz u pozitivnom načinu ionizacije (ESI+). Početni parametri ionskog izvora ugođeni su na temelju praćenja zastupljenosti dvostruko nabijenih iona kompleksa [NAB+β-CD+Na+H]²⁺ (m/z 693,2326) i [NAB+2β-CD+2H]²⁺ (m/z 1249,4374) analizom otopine molarnog omjera $n_{\text{NAB}}:n_{\beta\text{-CD}} = 1:1$ ($c_{\text{NAB}} = c_{\beta\text{-CD}} = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹). Konačan sustav otapala u mjernim otopinama bio je metanol:H₂O = 50:50. Eksperimentalno određeni optimalni parametri ionskog izvora koji su korišteni za snimanje svih spektara masa na navedenoj instrumentaciji prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Optimalni parametri utvrđeni nakon ugađanja ionskog izvora korištenjem otopine nabumetona s β-CD u molarnom omjeru $n_{\text{NAB}}:n_{\beta\text{-CD}} = 1:1$ ($c_{\text{NAB}} = c_{\beta\text{-CD}} = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹)

Temperatura protočnog plina	250 °C
Protok protočnog plina	10 L min ⁻¹
Tlak raspršivača	25 psi
Potencijal kapilare	3 000 V
Potencijal mlaznice	1500 V
Temperatura plina za desolvataciju	225 °C
Protok plina za desolvataciju	15 L min ⁻¹
Potencijal fragmentora	350 V

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa (MS/MS) provedeni su kolizijom izazvanom disocijacijom (engl. *collision-induced dissociation*, CID) u pozitivnom načinu rada ionskog izvora pri čemu se kao kolizijski plin koristio N₂, uz korištenje kolizijskih potencijala pri vrijednostima od 5, 10, 20 i 40 V. Svi spektralni podaci obrađeni su korištenjem računalnog programa *Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0*.

Karakterizacija inkluzijskih kompleksa spektrometrijom masa provedena je i korištenjem spektrometra masa *Sciex triple quad 6500+* s *Turbo V* ionskim izvorom (Zavod za analitičku kemiju, Kemijski institut, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Pečuhu, Mađarska) uz direktno injektiranje mjernih otopina u instrument s brzinom injektiranja od 10 µL min⁻¹. Mjerne otopine pripremljene su u sustavu otapala 0,1 % mravlja kiseline metanol:H₂O = 50:50. Konačna koncentracija NAB u mjernim otopinama iznosila je

$4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, dok je koncentracija β -CD varirana kako bi se postigli različiti molarni omjeri $n_{\text{NAB}}:n_{\beta\text{-CD}} = 5:1, 2:1, 1:1, 1:2$ i $1:5$. Svi spektri masa snimani su u rasponu vrijednosti m/z (100 – 2000) u pozitivnom načinu ionizacije (ESI+). Parametri ionskog izvora automatski su ugođeni (tablica 6) korištenjem opcije *compound optimization* u sklopu računalnog programa *Analyst Software*.

Eksperimenti tandemne spektrometrije masa provedeni su tehnikom CID u pozitivnom načinu rada ionskog izvora pri čemu se kao kolizijski plin koristio N_2 , uz korištenje kolizijskih potencijala u rasponu vrijednosti od 5 V do 40 V ovisno o stabilnosti ciljnog iona.

Tablica 6. Parametri ionskog izvora korišteni prilikom snimanja MS spektara na *Sciex triple quad 6500+* spektrometru masa

Protok protočnog plina	20 L min ⁻¹
Potencijal kapilare	5500 V
Tlak raspršivača protočnog plina	60 psi
Tlak raspršivača plina za desolvaciju	60 psi
Potencijal fragmentora	50 V

3.2.5. Priprava binarnih sustava NAB: β -CD u čvrstom stanju

Binarni sustavi NAB: β -CD u čvrstom stanju pripremljeni su na tri načina kako bi se usporedila učinkovitost i utjecaj različitih metoda na nastajanje inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju.

Metoda 1: Binarni sustavi pripremljeni su mljevenjem u periodu od 30 min pri frekvenciji od 25 Hz korištenjem kugličnog vibracijskog mlina *Retsch Mixer Mill MM 200* (Zavod za opću i anorgansku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Uzorci fizičkih smjesa pripremljeni su blagim tretiranjem smjese komponenti pomoću keramičkog tarionika i tučka. Komponente uzoraka NAB: β -CD u čvrstom stanju su prije tretiranja u mlinu ili tarioniku odvagane u ekvimolarnim omjerima tako da je ukupna masa smjese iznosila $200 \pm 1 \text{ mg}$ (tablica 7). Smjese su nakon vaganja smještene u posudice za mljevenje od nehrđajućeg čelika ($V = 10 \text{ mL}$) u kojima su se nalazile po dvije kuglice od identičnog materijala promjera 7 mm. Mehanokemijskoj aktivaciji podvrgnute su i zasebne komponente kako bi se provjerio utjecaj mljevenja na njihova svojstva.

Tablica 7. Odvage komponenti za pripremu binarnih sustava NAB: β -CD u čvrstom stanju korištenjem visokoenergijskog vibracijskog mlina *Retsch Mixer Mill MM 200*

Uzorak	$m_{\text{NAB}} / \text{mg}$	$m_{\beta\text{-CD}} / \text{mg}$
NAB: β -CD	33,49	166,51
NAB:HP- β -CD	28,10	171,90
NAB:RM- β -CD	29,82	170,18
NAB:SBE- β -CD	19,09	180,91

Metoda 2: Binarni sustavi pripremljeni su i mljevenjem u kugličnom vibracijskom mlinu *Retsch Mixer Mill MM 500 NANO* (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Mljevenja su se provodila u periodu od 90 ili 120 minuta te pri frekvenciji od 20 ili 30 Hz ovisno o sustavu NAB: β -CD, uz periode od 1 min pri frekvenciji od 5 Hz svakih 15 minuta kako bi se smjesa dodatno homogenizirala. Komponente uzoraka NAB: β -CD u čvrstom stanju su prije tretiranja u mlinu odvagane u ekvimolarnim omjerima tako da je ukupna masa smjese iznosila 6000 ± 10 mg (tablica 8). Smjese su nakon vaganja smještene u posudice za mljevenje od cirkonijskog oksida, ZrO_2 ($V = 50$ mL) u kojima se nalazilo po petnaest kuglica promjera 5 mm i petnaest kuglica promjera 10 mm od identičnog materijala. Mehanokemijskoj aktivaciji podvrgnut je i uzorak nabumetona kako bi se provjerio utjecaj mljevenja na njegova svojstva.

Tablica 8. Odvage komponenti za pripremu binarnih sustava NAB: β -CD u čvrstom stanju korištenjem visokoenergijskog vibracijskog mlina *Retsch Mixer Mill MM 500 NANO*

Uzorak	$m_{\text{NAB}} / \text{mg}$	$m_{\beta\text{-CD}} / \text{mg}$	Uvjeti mljevenja
NAB: β -CD	1000	5000	120 min, 20 Hz
NAB:HP- β -CD	840	5160	120 min pri 20 Hz 90 min pri 30 Hz
NAB:RM- β -CD	890	5110	120 min, 20 Hz
NAB:SBE- β -CD	570	5430	120 min pri 20 Hz 120 min pri 30 Hz

Metoda 3: Binarni sustavi pripremljeni su prema metodologiji iz publikacije Goyenecheae i sur.¹¹⁷ Ciklodekstrini su otopljeni u 20 mL ultračiste vode, dok je nabumeton otopljen u 20 mL etanola (tablica 9). Tako pripremljene otopine pomiješane su kako bi se postigao ekvimolarni odnos komponenti i ostavljene na termostataranu orbitalnu tresilicu *IKA KS 4000i control* na temperaturu od 50 °C uz blago miješanje kako bi se potaknulo isparavanje otapala i kristalizacija konačnog produkta. Kristalizaciji iz otopine podvrgnut je i uzorak nabumetona kako bi se provjerio utjecaj ovakvog načina pripreme na njegova svojstva.

Tablica 9. Odvage komponenti za pripremu binarnih sustava NAB: β -CD u čvrstom stanju kristalizacijom iz otopine

Uzorak	$m_{\text{NAB}} / \text{mg}$	$m_{\beta\text{-CD}} / \text{mg}$
NAB: β -CD	50,04	248,57
NAB:HP- β -CD	50,34	305,60
NAB:RM- β -CD	50,00	285,80
NAB:SBE- β -CD	50,49	474,33

3.2.6. Karakterizacija čvrstih sustava NAB: β -CD razlikovnom pretražnom kalorimetrijom

Karakterizacija pripremljenih sustava u čvrstom stanju razlikovnom pretražnom kalorimetrijom provedena je korištenjem uređaja *Perkin Elmer Pyris Diamond 7* (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Mjerenja su provedena u atmosferi dušika nakon kalibracije uređaja indijem. Uzorci pripremljenih binarnih smjesa ($3,50 \pm 0,50$ mg) i zasebnih komponenti ($1,50 \pm 0,50$ mg) odvagani su u aluminijskim posudicama, a DSC krivulje su snimljene pri brzini zagrijavanja od $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ u temperaturnom rasponu od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ do $120 \text{ }^\circ\text{C}$. Za određivanje temperature tališta NAB korištena je temperatura maksimuma signala u svim slučajevima. Udio kristalne frakcije nabumetona u uzorcima (RDC) određivan je u periodima od 15 min tijekom mljevenja, a izračunat je prema izrazu:

$$RDC \% = \frac{\Delta H_{\text{UZORAK}}}{\Delta H_{\text{LIJEK}}} \cdot 100 \quad (11)$$

pri čemu ΔH_{UZORAK} i ΔH_{LIJEK} označavaju izmjerene vrijednosti entalpije taljenja nabumetona iz tretiranog uzorka i netretiranog kristalnog nabumetona, a normirane su s obzirom na udio lijeka u uzorku. Promjena relativne kristalnosti nabumetona u uzorcima smjesa s različitim β -CD korištena je kao indikator njihove interakcije u čvrstom stanju.

3.2.7. Karakterizacija čvrstih sustava NAB: β -CD difrakcijom rendgenskog zračenja u polikristalnom uzorku

Uzorci su prije analize usitnjeni i homogenizirani. Karakterizacija difrakcijom rendgenskog zračenja u polikristalnom uzorku provedena je korištenjem *Malvern Panalytical Aeris* difraktometra Bragg - Brentano geometrije s bakrenom anodom ($\text{CuK}\alpha$, $1,5406 \text{ \AA}$) kao izvorom zračenja, Ni filtrom i PIXcel1D-Medipix3 detektorom pri sobnoj temperaturi na nosaču od silicija. Intenzitet difraktiranog zračenja bilježen je *continuous scan* načinom pretraživanja u rasponu vrijednosti kutova 2θ od 5° do 50° s brzinom pretraživanja od $0,022^\circ \text{ s}^{-1}$ pri čemu se

brojač u pojedinoj točki zadržavao 18,87 s. Difraktogrami su prikazani kao ovisnosti relativnog intenziteta difrakcijskih maksimuma o kutu 2θ .

3.2.8. Karakterizacija čvrstih sustava NAB: β -CD FT-IR ATR spektroskopijom

FT-IR (ATR) spektri prethodno pripremljenih uzoraka snimljeni su (kao rezultat uprosječenja 32 snimanja) u rasponu valnih brojeva ($4000 - 600$) cm^{-1} , uz rezoluciju od 2 cm^{-1} korištenjem instrumenta IR spektrometra *Bruker Vector 22* uz *Pike MIRacle* ATR nosač s dijamant/ZnSe plohom. Svi spektri obrađeni su računalnim programom *Opus* pri čemu je provedena ATR korekcija te korekcija s obzirom na pozadinsko zračenje. Spektri su izgladnjeni Savitzky-Golay algoritmom kroz 25 podatkovnih točaka.

3.2.9. Određivanje brzine otapanja nabumetona *in vitro*

Brzina otapanja nabumetona iz pripremljenih čvrstih sustava *in vitro* istražena je metodom s lopaticama (Aparatura 2)¹²⁷ korištenjem instrumenta *Agilent 708-DS Dissolution Apparatus* (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) prema uputama iz desetog izdanja europske farmakopeje.¹²⁷ Nabumeton ili njegovi mljeveni binarni sustavi s različitim β -CD u čvrstom stanju (tablica 10) dodali bi se u 125 mL medija za otapanje, termostetiranog na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Odvage su preračunate s obzirom na količinu nabumetona u tipičnom terapijskom obliku (tablete, $m_{\text{NAB}} = 500 \text{ mg}$)¹²⁸ i s obzirom na korišteni volumen medija. Kao medij za otapanje korišten je simulirani želučani medij ($\text{pH} = 1,2$) pripremljen prema uputama iz desetog izdanja europske farmakopeje.¹²⁷ Brzina miješanja podešena je na 100 RPM. Alikvoti volumena 5 mL uzimani su u vremenskim intervalima od 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 i 60 minuta od početka eksperimenta, a nakon svakog uzimanja nadomjestili bi se jednakim volumenom termostetiranog medija za oslobađanje kako bi se osigurao njegov konstantan volumen tijekom cijelog eksperimenta. Nakon filtriranja alikvota kroz membranske filtere ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$ veličina pora) pripravile bi se mjerne otopine u simuliranom želučanom mediju nakon čega se NAB određivao spektrofotometrijski bilježenjem apsorbancije pri apsorpcijskom maksimumu od 230 nm korištenjem *Agilent Cary 60 UV/Vis* spektrofotometra (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Sva mjerenja provedena su tri puta osim za sustave NAB:SBE- β -CD koja su provedena dva puta.

Tablica 10. Odvage sustava NAB i NAB: β -CD u čvrstom stanju za istraživanje brzine otapanja *in vitro*

Uzorak	m_{UZORKA} / mg
NAB	250,00
NAB: β -CD	1492,54
NAB:HP- β -CD	1779,36
NAB:SBE- β -CD	2617,80

3.2.10. Određivanje saturacijske topljivosti čvrstih sustava NAB: β -CD

Određivanja saturacijske topljivosti čvrstih sustava NAB: β -CD provedena su metodom zasićene otopine (engl. *shake-flask method*) u simuliranom želučanom mediju (pH = 1,2) kako bi se dobiveni rezultati mogli korelirati s rezultatima istraživanja oslobađanja nabumetona *in vitro* iz čvrstih sustava NAB: β -CD. Simulirani želučani medij pripremljen je prema uputama iz desetog izdanja europske farmakopeje.¹²⁷ U tikvice za miješanje odvagane su određene količine NAB ili sustava NAB: β -CD (tablica 11), a zatim je dodan volumen od po 15 mL medija. Suspenzije su miješane 48 sati na orbitalnoj tresilici *IKA KS 4000i control* (150 RPM) koja je termostatirana na temperaturu od 37 °C. Alikvoti suspenzija filtrirani su svaka 24 h kroz membranske filtere (0,45 μm veličina pora) nakon čega bi se pripravile mjerne otopine u simuliranom želučanom mediju, a NAB određivao spektrofotometrijski bilježenjem apsorbancije pri apsorpcijskom maksimumu od 230 nm korištenjem *Agilent Cary 60 UV/Vis* spektrofotometra (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Sva mjerenja provedena su dva puta.

Tablica 11. Odvage sustava NAB i NAB: β -CD u čvrstom stanju za određivanje saturacijske topljivosti

Uzorak	m_{UZORKA} / mg
NAB	30,00
NAB: β -CD	179,10
NAB:HP- β -CD	213,52
NAB:SBE- β -CD	314,14

3.2.11. Provođenje studija stabilnosti

Kako bi se procijenila stabilnost nabumetona u pripremljenim čvrstim sustavima s ciklodekstrinima provele su se dugotrajne stabilitetne studije prema smjernicama iz poglavlja Q1A(R2) koje propisuje ICH.¹²⁹ Uzorci NAB i njegovih sustava s CD u čvrstom stanju odvagani su ($200 \pm 50 \text{ mg}$) u *ependorf* plastične posudice volumena 1,5 mL koje su smještene u stabilitetne komore *Memmert ICH110L eco* (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) termostatirane na temperaturu od

25 °C uz relativnu vlažnost od 60 %. Uzorci su tako uskladišteni na ukupan period od 6 mjeseci, a stabilnost nabumetona procijenjena je nakon 0, 1, 2, 3 i 6 mjeseci. Uzorci nabumetona (5,00 mg) otopljeni su u 5 mL metanola LC-MS stupnja čistoće u odmjernim tikvicama volumena 10 mL, nakon čega je tikvica nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Uzorci binarnih sustava nabumetona β -CD u čvrstom stanju (10,00 mg) pripremljeni su na identičan način. Prilikom otapanja korištena je ultrazvučna kupelj. Svi uzorci su analizirani u triplicatu.

Fotostabilnost nabumetona procijenjena je prema smjernicama iz poglavlja Q1B koje propisuje ICH.¹³⁰ Uzorci NAB i njegovih sustava s β -CD u čvrstom stanju prosijani su ravnomjerno u staklene Petrijeve zdjelice promjera 5 cm pri čemu je debljina sloja uzorka bila 1 mm. Kontrolni uzorci pripremljeni su na identičan način nakon čega su poklopljeni staklenim poklopcima i zamotani u aluminijsku foliju. Svi uzorci smješteni su u stabilitetne komore *Memmert ICH110L eco* te su izloženi izvoru dnevnog svjetla (8,5 klux) u trajanju od 141,2 h te izvoru UV zračenja (5 W m^{-2}) u trajanju od 40 h kako bi se osigurali standardni uvjeti osvjetljenosti od 1 200 000 lux h i 200 W h m^{-2} koje propisuje ICH.

Za kvantitativno određivanje nabumetona i stupnja njegove razgradnje, ali i za kvalitativno određivanje i strukturnu karakterizaciju njegovih razgradnih produkata razvijene su UHPLC-DAD i UHPLC-HRMS metode korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije (*Agilent 1290 infinity II*) i spektrometrija masa (*Agilent 6550 iFunnel Q-TOF*). Za potrebe validacije parametra selektivnosti navedene metode bilo je potrebno provesti studije prisilne razgradnje u uvjetima hidrolitičkog i oksidativnog stresa. Ishodne otopine nabumetona i mljevenog nabumetona (1 mg mL^{-1}) pripremljene su u metanolu LC-MS stupnja čistoće, dok su ishodne otopine njegovih binarnih sustava s različitim CD u čvrstom stanju (1 mg mL^{-1}) pripremljene u sustavu otapala metanol:H₂O = 50:50. Za hidrolitičku razgradnju u kiselom i alkalnom mediju korištene su otopine stresora (klorovodična kiselina i natrijev hidroksid) koncentracije $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Prilikom hidrolitičke razgradnje u kiselom mediju u odmjerne tikvice volumena 10 mL pipetiran je 1 mL ishodne otopine nabumetona ili otopine njegovog binarnog sustava s CD, a nakon toga je u tikvicu pipetirano 1 mL otopine klorovodične kiseline. Tako pripremljene otopine ostavljene su 10 sati u termostatu *Lauda n/D8/17* pri povišenoj temperaturi od 80 °C. Nakon 10 sati u tikvicu je pipetiran 1 mL otopine natrijevog hidroksida zbog neutralizacije te je nadopunjena do oznake metanolom i vodom tako da je konačan sustav otapala bio metanol:H₂O = 50:50. Prisilna hidrolitička razgradnja u alkalnom mediju provedena je na identičan način korištenjem otopine natrijevog hidroksida, uz neutralizaciju otopinom

klorovodične kiseline. Prisilna hidrolitička razgradnja u neutralnom mediju provedena je na identičan način uz korištenje ultračiste vode kao stresora. Prisilna razgradnja nabumetona i njegovih binarnih sustava u oksidativnim uvjetima provedena je korištenjem 3 %-tne otopine vodikovog peroksida u periodu od 10 sati uz zagrijavanje na 80 °C te u periodu od 7 dana pri sobnoj temperaturi pri čemu je konačan sustav otapala u odmjernim tikvicama bio metanol:H₂O = 50:50 kao i u prethodno opisanim eksperimentima.

Prilikom provođenja svih prisilnih razgradnji nabumetona pripremljeni su i odgovarajući kontrolni uzorci kod kojih nije provedena razgradnja. Kontrolni uzorci pripremljeni su na identičan način kao i otopine podvrgnute prisilnoj razgradnji ali uz trenutno razrjeđivanje do konačnog sustava otapala i skladištenja u hladnjak. Sve pripremljene otopine profiltrirane su u kromatografske posudice (2 mL) korištenjem membranskih filtera Chromafil O-20/15 MS nakon čega su uskladištene u hladnjaku do pripreme mjernih otopina za UHPLC-HRMS analizu. Mjerne otopine pripremljene su na način da je konačna koncentracija nabumetona u njima iznosila 2 µg mL⁻¹, a konačan sustav otapala bio metanol:H₂O = 50:50 u svim slučajevima. Analiza pripremljenih otopina provedena je prema parametrima koji su prikazani u tablici 12. Kao pokretna faza koristio se sustav 0,1 % otopine mravlje kiseline u vodi (MF_A) te 0,1 % otopine mravlje kiseline u metanolu (MF_B) uz gradijentno eluiranje i protok od 0,20 mL min⁻¹. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 1 µL. Upotrijebljena je kromatografska kolona Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 dimenzija (2,1 · 50) mm i veličine čestica nepokretne faze od 1,8 µm. Parametri ionskog izvora koji su korišteni prilikom UHPLC-HRMS analiza prikazani su u tablici 13. Eksperimenti tandemne spektrometrije masa (MS/MS) provedeni su tehnikom CID uz pozitivni način rada ionskog izvora. Kao kolizijski plin koristio se dušik (N₂), uz kolizijske potencijale koji su iznosili 10, 20, 30 ili 40 V. MS/MS eksperimenti provedeni su na karakterističnim ionima nabumetona te na svim detektiranim ionima potencijalnih razgradnih produkata nabumetona ili β-ciklodekstrina.

Tablica 12. Parametri kromatografske UHPLC-DAD, odnosno UHPLC-HRMS metode

Kromatografska kolona	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18		
MF _A	0,1 % (v/v) otopina mravlje kiseline u vodi		
MF _B	0,1 % (v/v) otopina mravlje kiseline u metanolu		
Gradijentni profil eluiranja	Vrijeme / min	MF _A / %	MF _B / %
	0	95	5
	15	5	95
Volumen injektiranja (UHPLC-HRMS)	1 µL		
Volumen injektiranja (UHPLC-DAD)	2 µL		
Protok mobilne faze	0,20 mL min ⁻¹		
Temperatura kromatografske kolone	40 °C		
Detekcija (DAD)	231, 254, 260, 266 i 275 nm		
Detekcija (MS)	ESI+ (100 – 1300 m/z)		

Tablica 13. Parametri ESI+ ionskog izvora prema kojima su snimljeni kromatogrami ukupne ionske struje (engl. *total ion chromatogram*, TIC)

Temperatura pomoćnog plina	250 °C
Protok pomoćnog plina	11 L min ⁻¹
Tlak raspršivača	25 psi
Potencijal kapilare	2500 V
Potencijal mlaznice	1000 V
Temperatura plina za desolvaciju	200 °C
Protok plina za desolvaciju	17 L min ⁻¹
Potencijal fragmentora	100 V

3.2.12. Validacija analitičkih postupaka

Svi analitički postupci razvijeni za kvantitativno određivanje nabumetona u ovom doktorskom radu validirani su prema smjernicama iz poglavlja Q2(R1) i Q2(R2) koje propisuje ICH.^{106,107}

Kvantitativno određivanje nabumetona prilikom solubilizacijskih istraživanja provedeno je spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom.

Specifičnost spektrofotometrijske metode provjerena je snimanjem UV/Vis apsorpcijskih spektara pripremljenih standardnih otopina nabumetona ($\gamma = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) uz prisutnost višestruko veće koncentracije svih korištenih β -CD ($\gamma = 20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) kako bi se utvrdio njihov utjecaj na apsorpciju lijeka u području valnih duljina od 200 nm do 400 nm. Specifičnost spektrofluorimetrijske metode provjerena je na isti način snimanjem emisijskih spektara standardnih otopina nabumetona ($\gamma = 0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$) uz prisutnost višestruko veće koncentracije svih korištenih β -CD ($\gamma = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) kako bi se utvrdio njihov utjecaj na emisiju lijeka u području valnih duljina od 300 nm do 450 nm. Specifičnost obje metode provjerena je i s obzirom na utjecaj vodene faze na apsorpcijski ($\gamma = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$), odnosno emisijski spektar

nabumetona ($\gamma = 0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) pri čemu je umjesto ultračiste vode u konačnom sustavu otapala upotrijebljen simulirani želučani, duodenalni ili intestinalni medij. Provjeren je i utjecaj filtriranja kroz membranske filtere Chromafil Xtra H-PTFE-45/25 na apsorpcijski spektar ($\gamma = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) te na emisijski spektar nabumetona ($\gamma = 0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Linearna ovisnost koncentracije nabumetona o odzivu detektora utvrđena je za koncentracijski raspon od $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u slučaju UV/Vis apsorpcijske metode te za raspon od $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $1,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ u slučaju spektrofotometrijske metode. Sve standardne otopine nabumetona pripravljene su tri puta.

Preciznost metode provjerena je kroz tri validacijska parametra, odnosno kroz ponovljivost metode, međupreciznost metode i preciznost korištene instrumentacije. Ponovljivost spektrofotometrijske metode provjerena je za tri koncentracijske razine nabumetona: $0,25$, $1,50$ i $3,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je ponovljivost spektrofotometrijske metode provjerena za koncentracijske razine: $0,15$, $0,50$ i $0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sve standardne otopine nabumetona pripravljene su tri puta. Međupreciznost metoda provjerena je pripremom i analizom standardnih otopina nabumetona iste koncentracijske razine kroz tri različita dana. U slučaju spektrofotometrijske metode pripravljane su standardne otopine nabumetona koncentracije $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je u slučaju spektrofotometrijske metode koncentracija iznosila $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Preciznost instrumentacije provjerena je uzastopnom trostrukom analizom istih standardnih otopina nabumetona. U slučaju spektrofotometrijske metode pripravljene su standardne otopine nabumetona koncentracija $0,25$, $1,50$, i $3,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok su u slučaju spektrofotometrijske metode koncentracije iznosile $0,10$, $0,50$ i $0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) ove dvije metode određene su na temelju izraza:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad (12)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \quad (13)$$

pri čemu a označava nagib kalibracijskog pravca, a σ označava standardnu devijaciju odsjeka na y -osi. Granice detekcije spektrofotometrijske i spektrofotometrijske metode iznose $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok granice kvantifikacije spektrofotometrijske i spektrofotometrijske metode iznose $0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Robusnost ove dvije metode provjerena je uvođenjem malih namjernih promjena u eksperimentalne uvjete analize. Robusnost spektrofotometrijske metode provjerena je analizama standardnih otopina nabumetona koncentracije $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ s obzirom na valnu duljinu detekcije nabumetona (230 nm i 234 nm) i s obzirom na omjer acetonitrila i vodene faze u konačnom sustavu otapala (acetonitril:H₂O = 75:25 i 65:35). Vrijednosti apsorbancija uspoređene su s nominalnom vrijednosti apsorbancije koja je dobivena analizom standardne otopine nabumetona koncentracije $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (acetonitril:H₂O = 70:30) uz detekciju pri valnoj duljini od 232 nm. Robusnost spektrofotometrijske metode provjerena je na sličan način analizama standardnih otopina nabumetona koncentracije $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ s obzirom na valne duljine pobude (313 nm i 317 nm), emisije (351 nm i 355 nm) i s obzirom na omjer acetonitrila i vodene faze u konačnom sustavu otapala (acetonitril:H₂O = 75:25 i 65:35). Vrijednosti relativnih intenziteta fluorescentne emisije uspoređene su s nominalnom vrijednosti koja je dobivena analizom standardne otopine nabumetona koncentracije $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (acetonitril:H₂O = 70:30) uz pobudu pri valnoj duljini od 315 nm i bilježenje relativnog intenziteta emisije pri 353 nm.

Stabilnost standardnih otopina provjerena je za koncentracijsku razinu nabumetona od $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ u slučaju spektrofotometrijske metode te za $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u slučaju spektrofotometrijske metode. Pripravljene su standardne otopine kod kojih je vodenu fazu činila ultračista voda, simulirani želučani, duodenalni ili intestinalni medij. Apsorpcijski i emisijski spektri snimani su odmah po pripravi standardnih otopina te u vremenskim periodima od 1, 2, 24 i 48 h od njihove priprave.

Za kvantitativno određivanje nabumetona i stupnja njegove razgradnje, razvijena je kromatografska UHPLC-DAD metoda. Selektivnost ove metode provjerena je na temelju provedenih studija prisilne razgradnje nabumetona u hidrolitičkim kiselim, neutralnim i alkalnim uvjetima uz povišenu temperaturu te u oksidativnim uvjetima pri povišenoj i sobnoj temperaturi. Otopine ovako razgrađenih uzoraka analizirane su identičnom metodom uz HRMS detekciju kako bi se uz što veću osjetljivost analize provjerilo u kojoj mjeri navedena tekućinsko kromatografska metoda odjeljuje nabumeton od njegovih razgradnih produkata.

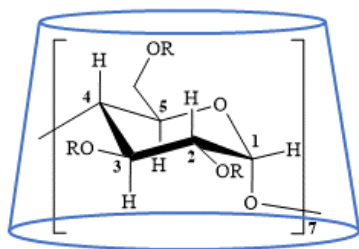
Linearna ovisnost koncentracije nabumetona o odzivu DAD detektora pri valnim duljinama od 231, 254, 260, 266 i 275 nm utvrđena je za koncentracijski raspon od $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $20,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sve standardne otopine nabumetona pripravljene su tri puta.

Preciznost metode provjerena je kroz tri validacijska parametra, odnosno kroz ponovljivost metode, međupreciznost metode i preciznost injektiranja. Ponovljivost metode provjerena je za tri koncentracijske razine nabumetona: 0,5, 3,0, i 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sve standardne otopine nabumetona pripravljene su tri puta. Međupreciznost metode provjerena je pripremom i analizom standardnih otopina nabumetona koncentracijskih razina 0,5, 3,0 i 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kroz tri različita dana. Preciznost injektiranja provjerena je uzastopnom trostrukom analizom istih standardnih otopina nabumetona koncentracijskih razina 0,5, 3,0 i 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Za potrebe određivanja LOD i LOQ ove metode pripravljene su standardne otopine nabumetona koncentracija 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 i 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koje su analizirane nakon čega je provedena linearna regresijska analiza. Vrijednosti granice detekcije i granice kvantifikacije ove metode određene su na temelju već prikazanih izraza 12 i 13.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Glavni cilj ovog doktorskog rada bio je odrediti utjecaj β -ciklodekstrina te njegovog hidroksipropiliranog, nasumično metiliranog i alkilsulfoniranog derivata (slika 13) na stabilnost i topljivost nabumetona u vodi i u simuliranim biorelevantnim medijima u rasponu pH-vrijednosti od 1,0 do 6,8.



β -CD: R = H₂₁

RM- β -CD: R = H_{21-n} ili (-CH₃)_n, n = 9–15

HP- β -CD: R = H_{21-n} ili (-CH₂CH(OH)CH₃)_n, n = 2–8

SBE- β -CD: R = H_{21-n} ili -(CH₂)₄SO₃Na)_n, n = 3–7

Slika 13. Ciklodekstrini korišteni u ovom doktorskome radu

Kompleksiranje nabumetona različitim β -ciklodekstrinima u otopini i u čvrstom stanju detaljno je proučeno korištenjem različitih analitičkih tehnika (UV/Vis spektroskopija, spektrofluorimetrija, tekućinska kromatografija visoke i ultravisoke djelotvornosti, spektrometrija masa, izotermna titracijska mikrokalorimetrija, razlikovna pretražna kalorimetrija, difrakcija rendgenskog zračenja u polikristalnom uzorku, infracrvena spektroskopija). Na temelju svih dobivenih rezultata odabrani su najprikladniji β -ciklodekstrini i metoda pripreve sustava u čvrstom stanju za potencijalni razvoj novog terapijskog oblika nabumetona s poboljšanim svojstvima.

Rezultati ove doktorske disertacije podijeljeni su u četiri cjeline. U prvom dijelu opisana su solubilizacijska istraživanja na temelju kojih je procijenjen učinak svakog β -CD na topljivost nabumetona u vodi i u simuliranim biorelevantnim medijima. Konstruiranjem dijagrama topljivosti nabumetona u prisutnosti svih β -CD, računanjem vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja te njihovom usporedbom izvedeni su zaključci o utjecaju različitih β -CD na topljivost nabumetona.

U drugom dijelu ovog poglavlja detaljno je opisana karakterizacija sustava NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD, NAB:RM- β -CD i NAB:SBE- β -CD u vodenim otopinama fluorescencijskom spektroskopijom, izotermnom titracijskom mikrokalorimetrijom i spektrometrijom masa. Na

temelju eksperimentalnih rezultata potvrđena je hipoteza o nastajanju inkluzijskih kompleksa NAB s različitim β -CD te je određen sastav kompleksa i termodinamičke veličine ($\log K$, $\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r S^\circ$). Vrijednosti konstanti stabilnosti svih inkluzijskih kompleksa određene spektrofluorimetrijskim titracijama u skladu su s onima dobivenim titracijskom mikrokalorimetrijom.

U trećem dijelu opisana je strategija pripreme sustava NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD, NAB:RM- β -CD i NAB:SBE- β -CD u čvrstom stanju mehanokemijskom aktivacijom pri čemu su varirani različiti eksperimentalni uvjeti (vrijeme mljevenja, frekvencija mljevenja, vrsta mlina, odnosno posuda za mljevenje) kako bi se maksimalno povećale interakcije između domaćina i gosta. Učinkovitost mehanokemijske aktivacije na nastanak inkluzijskih kompleksa praćena je korištenjem razlikovne pretražne kalorimetrije tijekom procesa mljevenja. Nakon utvrđivanja optimalnih parametara mehanokemijske aktivacije pripremljeni su sustavi u većoj količini te su sustavno okarakterizirani primjenom tehnika DSC, PXRD i FT-IR ATR. Budući da su prema dostupnim literaturnim podacima navedeni čvrsti sustavi do sada pripremljeni jedino tehnikom koevaporacije, odnosno kristalizacijom iz otopine, taj postupak je ponovljen i u ovom radu prema metodologiji opisanoj u publikaciji Goyenecheae i sur.,¹¹⁷ kako bi se usporedila učinkovitost pripreme čvrstih sustava NAB: β -CD ovim dvjema metodama. Procijenjena je i brzina oslobađanja nabumetona iz čvrstih sustava pripremljenih mehanokemijskom aktivacijom, a zatim je utvrđena i njihova topljivost u simuliranom želučanom mediju (pH = 1,2).

U četvrtom dijelu ovog poglavlja procijenjen je utjecaj različitih β -CD na stabilnost nabumetona. Prethodno je na temelju rezultata karakterizacije ovih sustava u otopini i u čvrstom stanju proveden odabir onih β -CD koji su pokazali najveći potencijal za pripravu novih terapijskih oblika nabumetona s poboljšanim svojstvima. Ti sustavi su podvrgnuti uvjetima dugotrajnih stabilitetnih studija te procjeni fotostabilnosti u za to predviđenim stabilitetnim komorama. Nadalje, uzorci su podvrgnuti i stresnim uvjetima (hidroliza u neutralnom, kiselom i bazičnom mediju, oksidacija peroksidom). Uzorci su analizirani kromatografskom UHPLC-DAD metodom koja je razvijena upravo za ovu potrebu. Strukturna karakterizacija svih razgradnih produkata NAB i različitih β -CD čije je nastajanje opaženo prilikom procjene stabilnosti nabumetona u prisutnosti proučavanih β -CD provedena je analognom UHPLC-HRMS(/MS) metodom.

4.1. Solubilizacijska istraživanja – utjecaj različitih β -CD na topljivost nabumetona

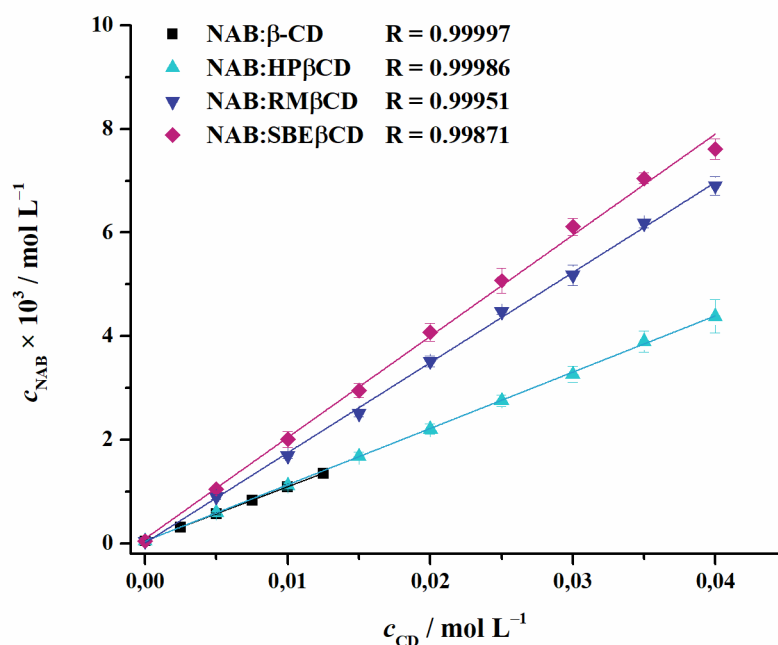
Kako bi se uspješno istražio utjecaj različitih β -CD na topljivost nabumetona u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima prema već spomenutoj Higuchi-Connors metodi, bilo je potrebno razviti i validirati analitički postupak za kvantitativno određivanje nabumetona. U ovoj doktorskoj disertaciji razvijena je i validirana spektrofotometrijska metoda za kvantitativno određivanje nabumetona u prisutnosti različitih β -CD. Budući da je već odavno poznato kako naftalen i njegovi derivati imaju sposobnost fluorescentne emisije^{131,132} razvijena je i spektrofluorimetrijska metoda te su rezultati solubilizacijskih istraživanja dobiveni ovim dvjema metodama uspoređeni.

Prilikom razvoja navedenih metoda najprije je istražen utjecaj sastava otapala (različiti omjeri acetonitrila i vode, odnosno metanola i vode) na apsorpcijski i emisijski spektar nabumetona. Apсорpcijski i emisijski spektri nabumetona u smjesi različitih omjera acetonitrila, odnosno metanola i vode prikazani su na slikama D1 i D2. Različiti omjeri organske i vodene faze nisu imali značajan utjecaj na izgled apсорpcijskog spektra i na vrijednost apсорbancije NAB. Međutim, emisijski spektri su se ipak bitno razlikovali, pri čemu je veći relativni intenzitet fluorescentne emisije (RIF) NAB izmjeren u sustavu acetonitrila i vode pa je kao konačan sustav otapala za pripremu mjernih otopina odabrana kombinacija acetonitril:voda = 70:30. Iako je poznato kako je nabumeton podložan fotolitičkoj razgradnji u vodenim i organskim medijima^{133–135} taj fenomen nije opažen prilikom snimanja emisijskih spektara nabumetona u navedenom sustavu otapala uz valnu duljinu pobude (λ_{EX}) od 315 nm.

Obje navedene metode za kvantitativno određivanje nabumetona u prisutnosti različitih β -CD validirane su prema smjernicama iz poglavlja Q2(R1) i Q2(R2) koje propisuje ICH^{106,107}, kako je već prethodno i opisano u poglavlju 3.2.12. Konačni validacijski parametri prikazani su u tablici D1. Prisutnost različitih β -CD nije imala utjecaj na apсорpcijski, odnosno emisijski spektar NAB u odabranom sustavu otapala (slika D3).

Solubilizacijski učinak različitih β -CD na topljivost NAB u vodi praćen je u ukupnom periodu od 72 h od pripreve suspenzija, a nabumeton se kvantitativno određivao svaka 24 h. Na temelju dobivenih podataka konstruirani su dijagrami topljivosti prema Higuchiju i Connorsu.⁶⁹ Dijagrami topljivosti su, neovisno o upotrijebljenoj metodi za kvantitativno određivanje NAB, okarakterizirani kao tip A s krivuljom ovisnosti A_L za β -CD i sve njegove derivata korištene u ovom doktorskom radu. Takva krivulja ovisnosti predstavlja linearno povećanje topljivosti

nabumetona s povećanjem koncentracije upotrijebljenog ciklodekstrina. Na temelju konstruiranih dijagrama topljivost procijenjeno je da nabumeton ravnotežnu topljivost u prisutnosti svih β -CD postiže već nakon 24 h (slike D4 i D5). Na slici 14 prikazani su dijagrami topljivosti konstruirani na temelju rezultata spektrofotometrijskih određivanja koncentracija NAB u prisutnosti različitih β -CD u vodi. Navedeni rezultati bili su u vrlo dobrom slaganju s rezultatima spektrofluorimetrijskih mjerenja (slika D6).



Slika 14. Dijagram topljivosti NAB u prisutnosti različitih β -CD; spektrofotometrijski određena koncentracija NAB 24 h od priprave suspenzija u vodi ($N = 3$)

Svi β -CD korišteni u ovom doktorskom radu višestruko su povećali topljivost NAB u vodi. Budući da je do uspostave ravnotežne topljivosti nabumetona u prisutnosti svih β -CD došlo 24 h od priprave suspenzija, za određivanje vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa i efikasnosti kompleksiranja nabumetona i odabranih β -CD korišteni su samo podaci dobiveni mjerenjima 24 h od priprave suspenzija. Nagib krivulje dijagrama topljivosti u svim slučajevima iznosio je manje od 1,0 što sugerira nastajanje kompleksa stehiometrije 1:1. U tablici 14 prikazane su izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti ($\log K_{1:1}$), efikasnosti kompleksiranja (CE) te solubilizacijskog učinka svakog β -CD pri čemu ta vrijednost odgovara

omjeru izmjerene vrijednosti koncentracije NAB u prisutnosti najviše upotrijebljene koncentracije CD (S_{MAX}) i vrijednosti koncentracije otopljenog NAB u odsustvu CD (S_0).

Tablica 14. Izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti, efikasnosti kompleksiranja te solubilizacijskog učinka za komplekse NAB s različitim β -CD u vodi pri sobnoj temperaturi nakon 24 sata ($N = 3$)

		β -CD	HP- β -CD	RM- β -CD	SBE- β -CD
$\log K_{1:1} \pm SE / L \text{ mol}^{-1}$	UV/Vis	$3,43 \pm 0,05$	$3,44 \pm 0,04$	$3,68 \pm 0,02$	$3,73 \pm 0,04$
	Fluor.	$3,42 \pm 0,02$	$3,41 \pm 0,01$	$3,67 \pm 0,03$	$3,71 \pm 0,02$
CE	UV/Vis	$0,12 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$	$0,243 \pm 0,003$
	Fluor.	$0,122 \pm 0,002$	$0,13 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,02$
S_{MAX}/S_0	UV/Vis	31 ± 3	99 ± 7	158 ± 6	169 ± 15
	Fluor.	30 ± 1	93 ± 3	155 ± 13	166 ± 6

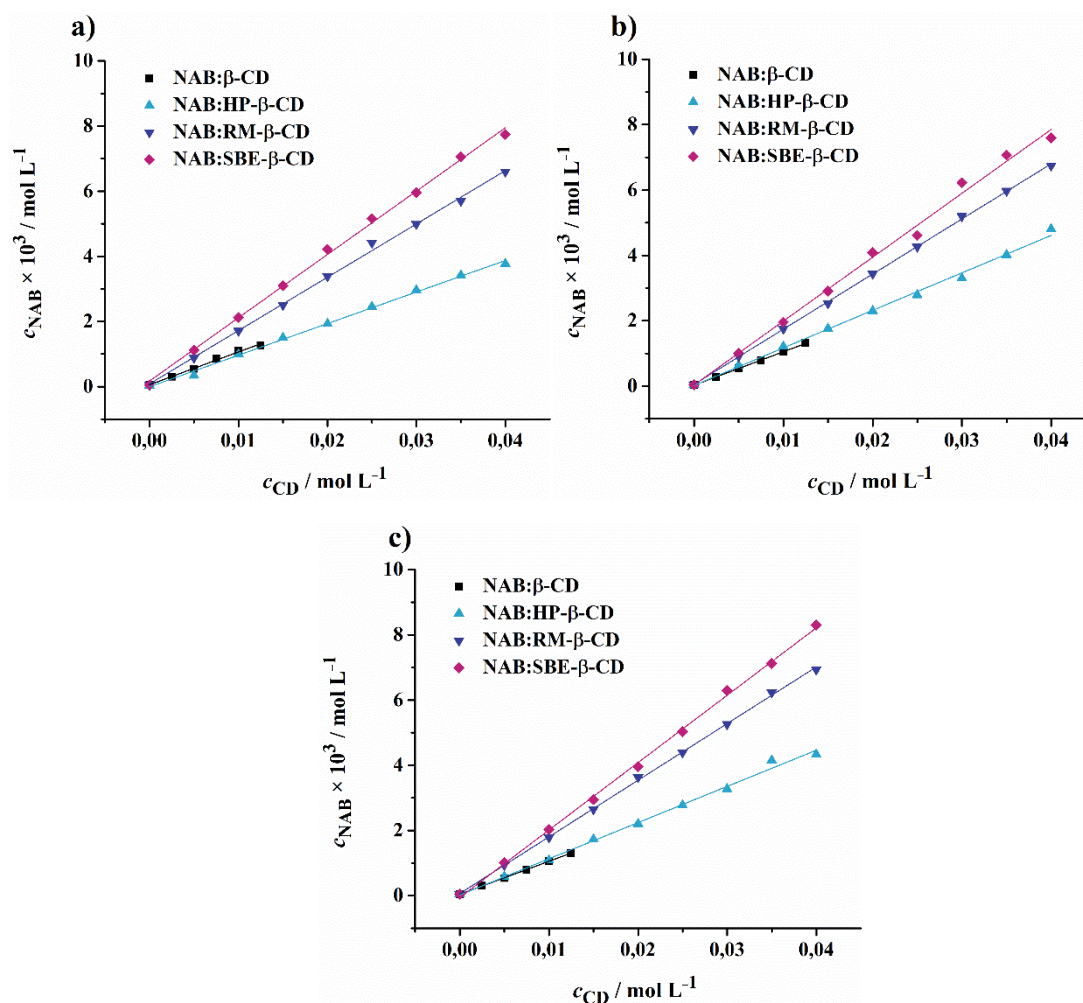
*SE – standardna pogreška aritmetičke sredine rezultata tri odvojena mjerenja

Najstabilnije komplekse s NAB tvorio je alkilsulfonirani derivat β -CD pri čemu je on pokazivao i najučinkovitiji solubilizacijski učinak na NAB u vodi. SBE- β -CD je povećavao topljivost NAB čak i do 170 puta. Krivulje dijagrama topljivosti za β -CD i njegov hidroksipropilirani derivat se preklapaju, no solubilizacijski učinak navedenog derivata je tri puta veći zbog njegove veće topljivosti u usporedbi s nativnim β -CD čija je topljivost ograničena.

Nabumeton je ravnotežnu topljivost u prisutnosti različitih β -CD u biorelevantnim medijima također postizao nakon 24 h. Upotreba različitih biorelevantnih medija nije utjecala na izgled i tip dijagrama topljivosti, kao ni na izračunate vrijednosti $\log K_{1:1}$, CE ili S_{MAX}/S_0 (tablica 15).

Tablica 15. Izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti, efikasnosti kompleksiranja te solubilizacijskog učinka za komplekse NAB s različitim β -CD u simuliranom želučanom, duodenalnom i intestinalnom mediju pri sobnoj temperaturi nakon 24 sata ($N = 1$)

			β -CD	HP- β -CD	RM- β -CD	SBE- β -CD
pH = 1,0	$\log K_{1:1} \pm SE / L \text{ mol}^{-1}$	UV/Vis	3,39	3,50	3,67	3,69
		Fluor.	3,40	3,46	3,64	3,69
	CE	UV/Vis	0,11	0,11	0,20	0,24
		Fluor.	0,11	0,12	0,20	0,22
	S_{MAX}/S_0	UV/Vis	28	111	156	158
		Fluor.	29	103	148	157
pH = 4,5	$\log K_{1:1} \pm SE / L \text{ mol}^{-1}$	UV/Vis	3,48	3,51	3,69	3,81
		Fluor.	3,47	3,48	3,66	3,72
	CE	UV/Vis	0,11	0,13	0,20	0,24
		Fluor.	0,11	0,13	0,21	0,23
	S_{MAX}/S_0	UV/Vis	35	121	163	204
		Fluor.	34	110	154	167
pH = 6,8	$\log K_{1:1} \pm SE / L \text{ mol}^{-1}$	UV/Vis	3,45	3,47	3,67	3,81
		Fluor.	3,46	3,50	3,70	3,73
	CE	UV/Vis	0,11	0,12	0,21	0,26
		Fluor.	0,11	0,12	0,21	0,23
	S_{MAX}/S_0	UV/Vis	33	103	154	204
		Fluor.	33	115	169	172



Slika 15. Dijagrami topljivosti NAB u prisutnosti različitih β -CD; spektrofotometrijski određena koncentracija 24 h od pripreve suspenzija u a) simuliranom želučanom mediju, b) simuliranom duodenalnom mediju i c) simuliranom intestinalnom mediju ($N = 1$)

Ovako dobro slaganje između izračunatih vrijednosti $\log K_{1:1}$, CE ili S_{MAX}/S_0 u različitim biorelevantnim medijima bilo je u skladu s očekivanjima ako se u obzir uzme činjenica da je NAB neionizabilan spoj. Kao što je vidljivo na slikama 15. i D7 solubilizacijska istraživanja u svim korištenim biorelevantnim medijima rezultirala su dijagramom topljivosti tipa A s krivuljom ovisnosti A_L .

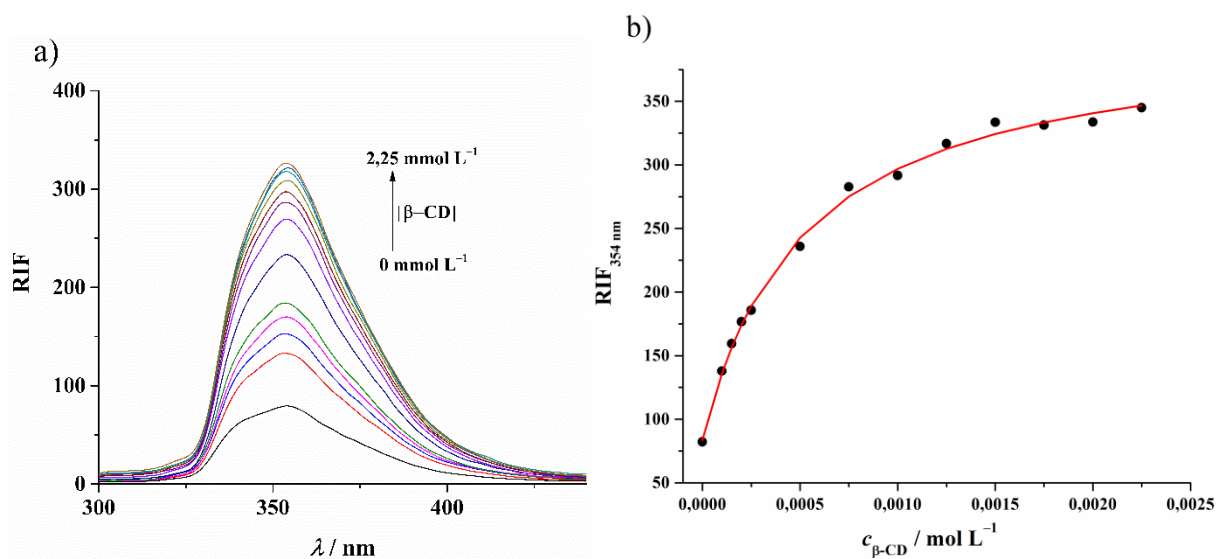
Alkilsulfonirani derivat β -CD pokazao se kao najpotentniji solubilizator NAB neovisno u upotrijebljenom mediju (voda, simulirani biorelevantni mediji). Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom pokazali su vrlo dobro međusobno slaganje pa se može zaključiti kako su obje razvijene metode primjenjive za kvantitativno određivanje NAB u prisutnosti β -CD i njegovih derivata korištenih u ovom doktorskom radu.

4.2. Inkluzijski kompleksi nabumetona s različitim β -ciklodekstrinima u otopini

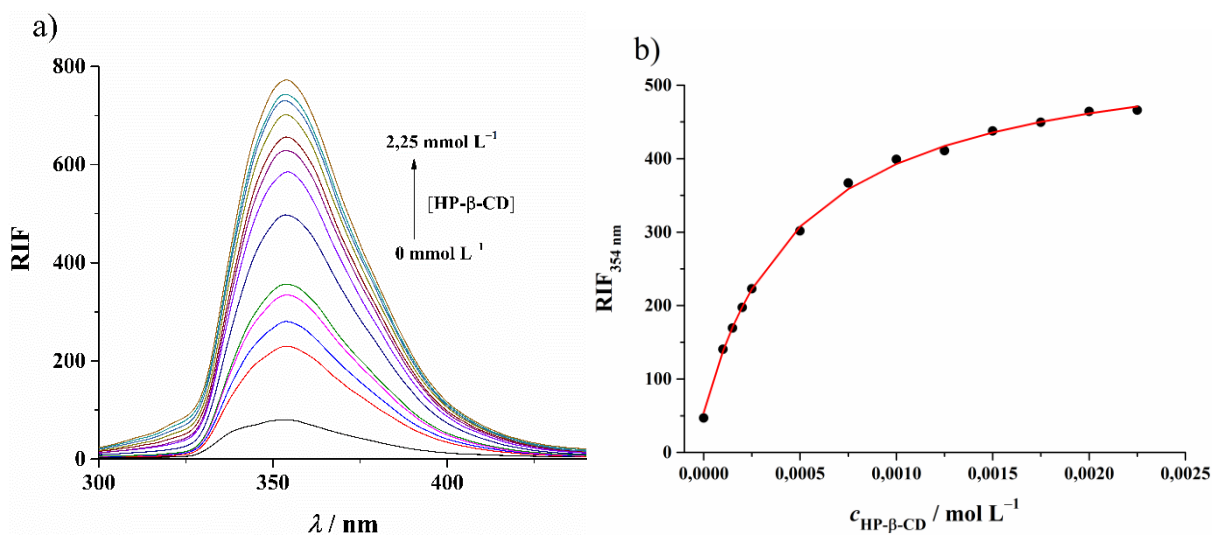
Sustavi NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD, NAB:RM- β -CD i NAB:SBE- β -CD u otopini proučavani su primjenom spektrofluorimetrije, izotermne titracijske mikrokalorimetrije i spektrometrije masa visokog i niskog razlučivanja. Prevedene su *batch* spektrofluorimetrijske titracije na temelju kojih su određeni stehiometrijski omjeri i konstante stabilnosti kompleksa. Svi termodinamički parametri ($\log K$, $\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r S^\circ$) određeni su mikrokalorimetrijskim titracijama. Rezultati dobiveni različitim tehnikama uspoređeni su kako bi se dobila cjelovita slika o navedenim sustavima.

4.2.1. Spektrofluorimetrijske titracije nabumetona β -ciklodekstrinima

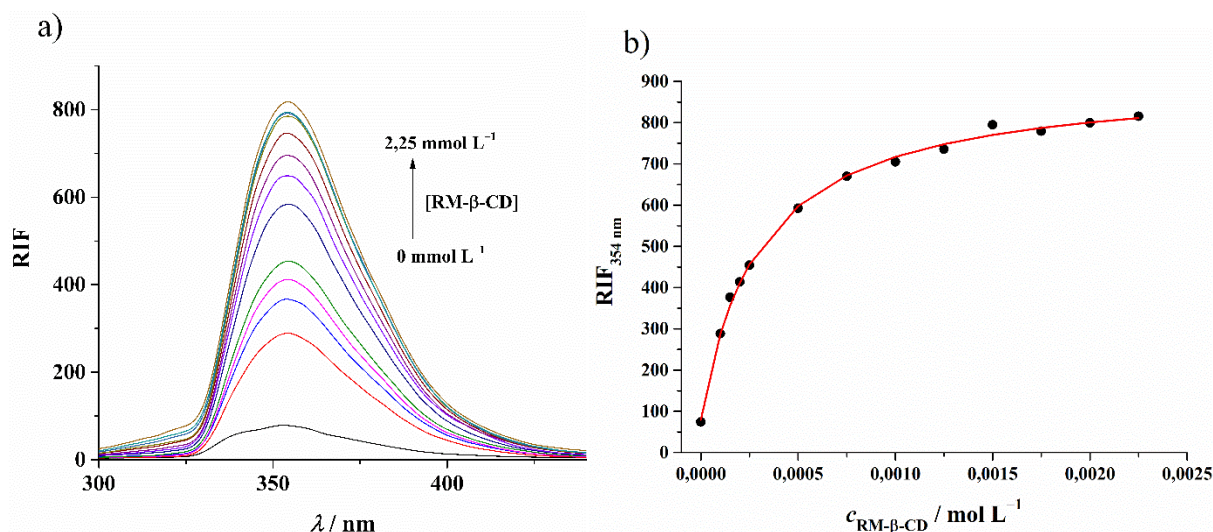
Početni korak u analizi inkluzijskih kompleksa CD određivanje je sastava kompleksa i vrijednosti konstante stabilnosti. Interakcija NAB s različitim β -CD u vodenim sustavima praćena je spektrofluorimetrijski provođenjem *batch* titracija. Fluorescencijska spektroskopija izabrana je zbog svoje višestruko veće osjetljivosti u usporedbi s ostalim spektroskopskim tehnikama što je posebice korisno kod proučavanja kompleksiranja slabo topljivih vrsta kao što je NAB. Praćen je utjecaj sukcesivnog porasta koncentracije različitih β -CD (0 do $2,25 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹) na emisijski spektar NAB ($1 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) uz pobudu pri valnoj duljini od 262 nm. Na slici 16 prikazana je spektrofluorimetrijska titracija NAB nativnim β -CD te ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 354 nm o porastu koncentracije β -CD. Dodatak spektralno neaktivnog β -CD u otopine NAB uzrokovao je porast relativnog intenziteta fluorescentne emisije što se pripisuje uspostavi interakcija između ove dvije komponente pri čemu se nepolarna molekula NAB uklapa u hidrofobnu šupljinu β -CD. Pretpostavlja se da uklapanje NAB u centralnu šupljinu CD uzrokuje ograničenje slobode rotacije molekule NAB (povećana rigidnost^{136,137}) i/ili promjenu polarnosti mikrookoline^{137,138} NAB što dovodi do porasta kvantnog iskorištenja fluorescencije (Φ). Isti fenomen uočen je i prilikom titracija NAB sa svim derivatima β -CD u vodi (slike 17, 18 i 19).



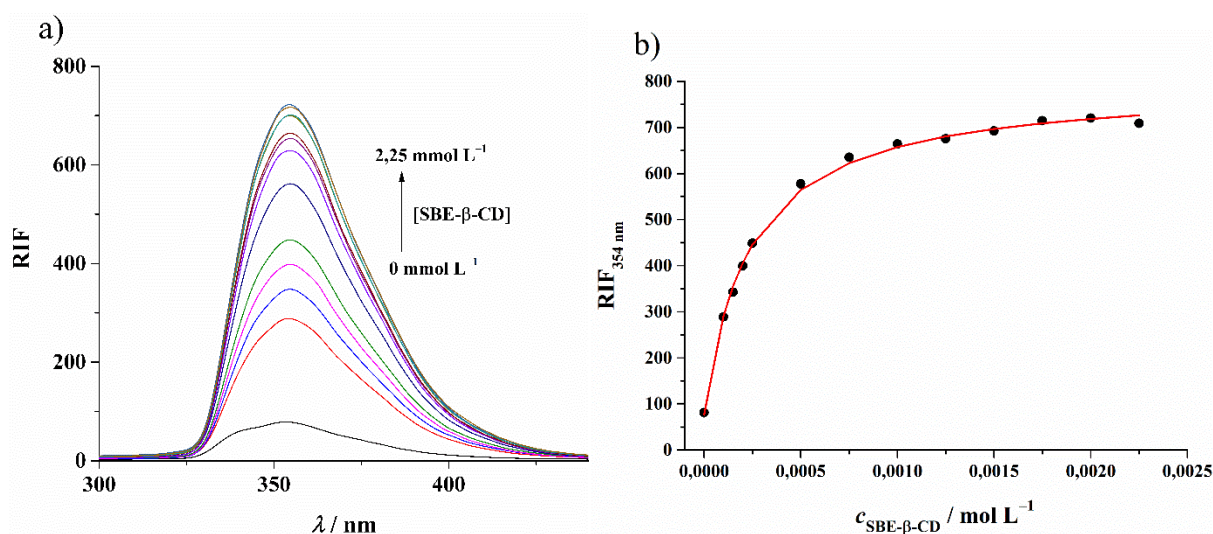
Slika 16. a) Spektrofluorimetrijska titracija NAB ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) s β -CD (0 do $2,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O ; $\lambda_{\text{EX}} = 262 \text{ nm}$, širine pukotina: 5 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije NAB pri 354 nm o koncentraciji β -CD. ● eksperimentalno; – izračunato.



Slika 17. a) Spektrofluorimetrijska titracija NAB ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) s HP- β -CD (0 do $2,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O ; $\lambda_{\text{EX}} = 262 \text{ nm}$, širine pukotina: 5 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije NAB pri 354 nm o koncentraciji HP- β -CD. ● eksperimentalno; – izračunato.



Slika 18. a) Spektrofluorimetrijska titracija NAB ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) s RM- β -CD (0 do $2,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O ; $\lambda_{\text{EX}} = 262 \text{ nm}$, širine pukotina: 5 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije NAB pri 354 nm o koncentraciji RM- β -CD. ● eksperimentalno; – izračunato.



Slika 19. a) Spektrofluorimetrijska titracija NAB ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sa SBE- β -CD (0 do $2,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O ; $\lambda_{\text{EX}} = 262 \text{ nm}$, širine pukotina: 5 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije NAB pri 354 nm o koncentraciji SBE- β -CD. ● eksperimentalno; – izračunato.

Na temelju rezultata spektrofluorimetrijskih titracija izračunate su vrijednosti konstanti stabilnosti i procijenjen je afinitet kompleksiranja nabumetona različitim β -CD. Matematički model za kompleksiranje NAB s različitim β -CD u stehiometrijskom omjeru 1:1 dao je najbolje rezultate u svim slučajevima što je u slaganju s procjenom stehiometrijskog omjera na temelju

rezultata solubilizacijskih istraživanja. Sve izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti odnose se na taj model. Vrijednosti su prikazane u tablici 16.

Tablica 16. Vrijednosti konstanti stabilnosti ($\log K$) izračunate prema rezultatima spektrofotometrijskih titracija NAB s različitim β -CD u H_2O za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 ($N = 3$)

	β -CD	HP- β -CD	RM- β -CD	SBE- β -CD
$\log K \pm SE / L \text{ mol}^{-1}$	$3,34 \pm 0,04$	$3,28 \pm 0,05$	$3,49 \pm 0,04$	$3,62 \pm 0,04$

*SE – standardna pogreška aritmetičke sredine rezultata tri odvojena mjerenja

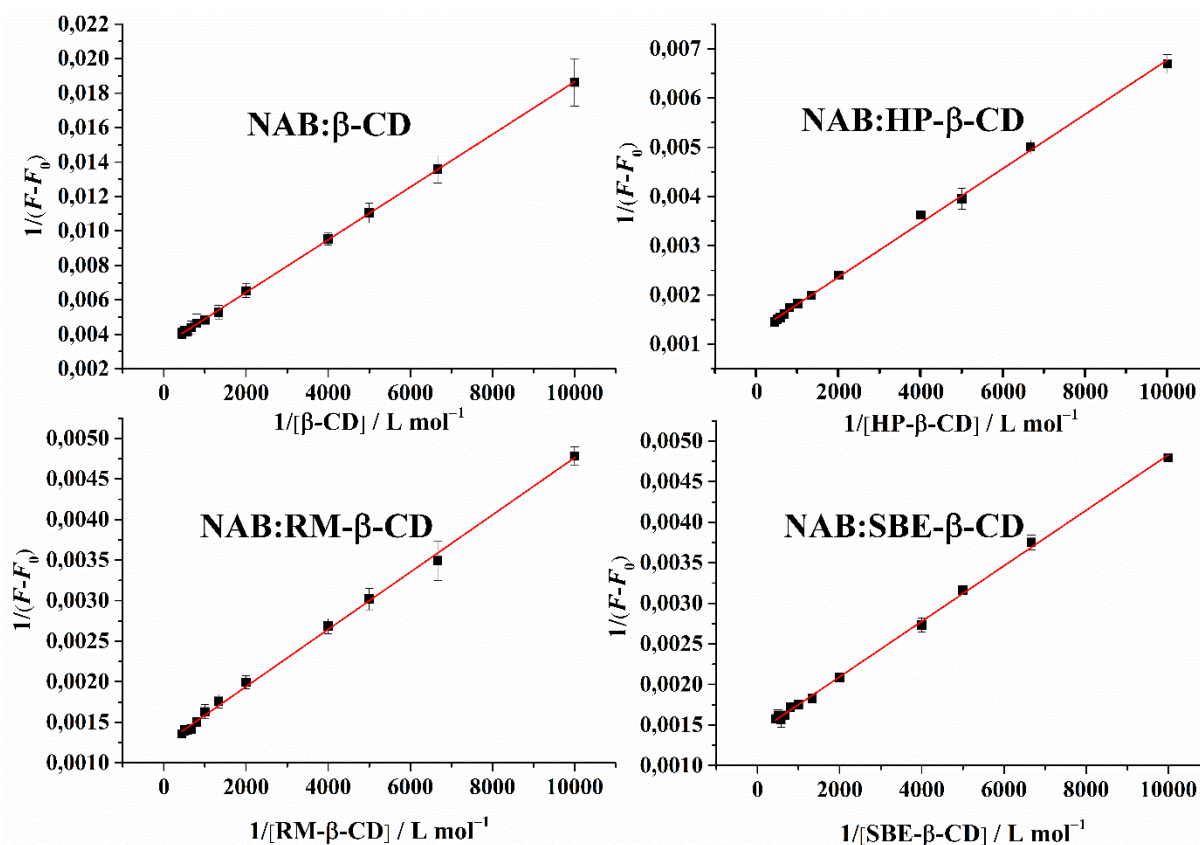
Prema navedenim rezultatima može se zaključiti kako NAB ima najveći afinitet te tvori najstabilnije komplekse s alkilsulfoniranim derivatom β -CD, dok najmanji afinitet ima prema središnjoj šupljini nativnog β -CD i njegovog hidroksipropiliranog derivata. Zanimljivo je kako su izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti u jako dobrom slaganju s vrijednostima koje su određene u sklopu solubilizacijskih istraživanja iako se ove dvije vrste eksperimenta provode na potpuno drugačiji način.

Eksperimentalno dobiveni rezultati spektrofotometrijskih titracija NAB s različitim β -CD podvrgnuti su i Benesi-Hildebrand metodi prema izrazu (10) koji je izveden za izračun vrijednosti konstanti stabilnosti linearnom regresijskom analizom za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1. Vrijednosti konstanti stabilnosti izračunate su prema vrijednostima nagiba krivulje i odsjeka na y-osi Benesi-Hildebrand dijagrama te su prikazane u tablici 17. Vrijednosti su u dobrom slaganju s vrijednostima iz tablice 16. Benesi-Hildebrand dijagrami za različite NAB: β -CD sustave prikazani su na slici 20. Na ovaj način potvrđeno je kako stehiometrijski omjer NAB i β -CD u inkluzijskim kompleksima iznosi 1:1 u svim slučajevima.

Tablica 17. Vrijednosti konstanti stabilnosti ($\log K$) izračunate Benesi-Hildebrand metodom prema rezultatima spektrofotometrijskih titracija NAB s različitim β -CD u H_2O za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 ($N = 3$)

	β -CD	HP- β -CD	RM- β -CD	SBE- β -CD
$\log K \pm SE / L \text{ mol}^{-1}$	$3,34 \pm 0,01$	$3,36 \pm 0,01$	$3,54 \pm 0,01$	$3,62 \pm 0,01$

*SE – standardna pogreška aritmetičke sredine rezultata tri odvojena mjerenja

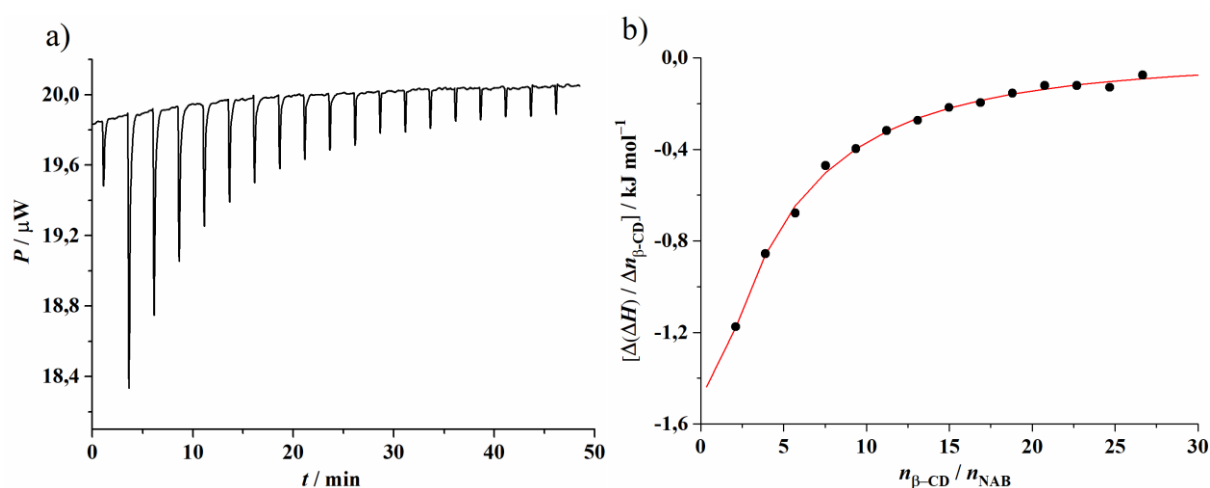


Slika 20. Benesi-Hildebrand dijagrami dobiveni linearnom regresijskom analizom za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 za sustave NAB sa svim korištenim β-CD

Kompleksiranje nabumetona različitim β-ciklodekstrinima u vodenim otopinama uspješno je okarakterizirano fluorescencijskom spektroskopijom. Usporedbom dobivenih rezultata utvrđeno je kako alkilsulfonirani derivat β-CD pokazuje najveći afinitet za kompleksiranje nabumetona pri čemu stabilnost inkluzijskih kompleksa opada u nizu NAB:SBE-β-CD > NAB:RM-β-CD > NAB:β-CD ≈ NAB:HP-β-CD što je u dobrom slaganju s rezultatima koji su dobiveni prilikom solubilizacijskih istraživanja. Usporedbom vrijednosti konstanti stabilnosti s literaturnim podacima iz publikacije Goyenecheae i sur.¹¹⁹ za kompleksiranje nabumetona s β-CD i njegovim derivatima pri temperaturi od 25 °C utvrđeno je djelomično slaganje. Vrijednosti su usporedive za sustave NAB:β-CD i NAB:RM-β-CD, dok je odstupanje opaženo za sustav NAB:HP-β-CD. Razlog ovakvog odstupanja može biti posljedica korištenja derivata β-CD s različitim stupnjem supstituiranosti. Vrijednosti stupnja supstituiranosti derivata β-CD koji su korišteni u istraživanju iz publikacije Goyenecheae i sur. nažalost nisu navedene.

4.2.2. Mikrokolorimetrijske titracije nabumetona β -ciklodekstrinima

Kompleksiranje nabumetona različitim β -CD istraženo je mikrokolorimetrijskim titracijama u vodi pri temperaturi od 298 K. Eksperimentalno dobivene vrijednosti obrađene su nelinearnom regresijskom analizom za kompleksiranje domaćin-gost u stehiometrijskom omjeru 1:1. Određeni su osnovni termodinamički parametri kompleksiranja, odnosno vrijednosti konstante stabilnosti ($\log K / \text{L mol}^{-1}$), promjena reakcijske Gibbsove energije ($\Delta_r G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$), promjena reakcijske entalpije ($\Delta_r H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$) i reakcijske entropije ($\Delta_r S^\circ / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$). Na slikama 21, D8, D9 i D10 prikazani su termogrami mikrokolorimetrijskih titracija vodene otopine NAB otopinama β -CD, HP- β -CD, RM- β -CD i SBE- β -CD. Uz njih se nalaze i grafički prikazi ovisnosti sukcesivnih promjena entalpije podijeljenih s množinom dodanog CD o omjeru titranta (CD) i analita (NAB).



Slika 21. a) Termogram mikrokolorimetrijske titracije NAB ($c_0 = 48,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $V_0 = 200 \mu\text{L}$) s β -CD ($c_0 = 8,80 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O pri 25 °C; b) Ovisnost normaliziranih sukcesivnih promjena entalpije o molarnom omjeru β -CD/NAB. ● eksperimentalno; – izračunato.

Vrijednosti konstanti stabilnosti, reakcijskih entalpija, reakcijskih Gibbsovih energija i reakcijskih entropija za kompleksiranje NAB različitim β -CD prikazane su u tablici 18.

Tablica 18. Termodinamički parametri kompleksiranja nabumetona različitim β -CD u H_2O pri 298 K za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 ($N \geq 3$)

Ciklodekstrin	$\log K \pm SE / L \text{ mol}^{-1}$	$\Delta_r G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S^\circ / \text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
β -CD	$3,42 \pm 0,03$	$-19,6 \pm 0,2$	$-12,6 \pm 0,9$	24 ± 3
HP- β -CD	$3,41 \pm 0,03$	$-19,5 \pm 0,2$	$-10,3 \pm 0,7$	31 ± 3
RM- β -CD	$3,47 \pm 0,01$	$-19,8 \pm 0,1$	$-8,5 \pm 0,7$	38 ± 2
SBE- β -CD	$3,62 \pm 0,07$	$-20,6 \pm 0,4$	$-9,7 \pm 0,7$	37 ± 4

*SE – standardna pogreška aritmetičke sredine rezultata najmanje tri odvojena mjerenja

Pregledom vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa NAB s različitim β -CD utvrđeno je kako alkilsulfonirani derivat β -CD pokazuje najveći afinitet za kompleksiranje nabumetona pri čemu stabilnost inkluzijskih kompleksa opada u nizu $NAB:SBE\text{-}\beta\text{-CD} > NAB:RM\text{-}\beta\text{-CD} > NAB:\beta\text{-CD} \approx NAB:HP\text{-}\beta\text{-CD}$ što je u jako dobrom slaganju s rezultatima spektrofluorimetrijskih *batch* titracija. Vrijednosti konstanti stabilnosti koje su izračunate na temelju rezultata koji su dobiveni ovim različitim tehnikama su usporedive.

S termodinamičkog stajališta jače interakcije gosta i domaćina ne definira samo veća vrijednost konstante stabilnosti nego i negativnija vrijednost reakcijske entalpije i reakcijske Gibbsove energije, a što upućuje i na spontanost kompleksiranja. Opis termodinamičkih parametara kompleksiranja, odnosno reakcijske entalpije i entropije omogućuje identifikaciju glavnih sila koje su odgovorne za kompleksiranje. Smatra se da hidrofobne interakcije definira velika i pozitivna vrijednost entropije, dok je entalpija mala pa kažemo da je takvo kompleksiranje entropijski kontrolirano ($|\Delta H| < |T\Delta S|$). S druge strane, van der Waalove interakcije termodinamički se definiraju kao entalpijski kontrolirane pri čemu je entropijski doprinos mali ili nepovoljan ($|\Delta H| > |T\Delta S|$). Pored navedenih, u fenomenu kompleksiranja ciklodekstrinima doprinose i elektrostatske interakcije poput vodikovih veza.^{96,97} U slučaju kompleksiranja nabumetona različitim β -CD možemo tvrditi kako dolazi do nastajanja inkluzijskih kompleksa umjerene stabilnosti. Kompleksiranje je egzotermno u svim slučajevima što je posljedica više procesa poput endoternog narušavanja vodikovih veza između molekula vode u šupljini CD nakon čega slijedi izrazito egzoterman proces ostvarivanja većeg broja vodikovih veza po jednoj molekuli vode u okolnom *bulk* otapalu kao što je objašnjeno u poglavlju 2.3. Dehidracija molekule nabumetona ima endoterman doprinos ukupnoj entalpiji kompleksiranja, dok uspostava van der Waalovih interakcija sa središnjom šupljinom CD ima egzoterman doprinos. Vrijednosti reakcijskih entropija su pozitivne u svim slučajevima kompleksiranja što se može objasniti desolvatacijom uklopljenog dijela molekule

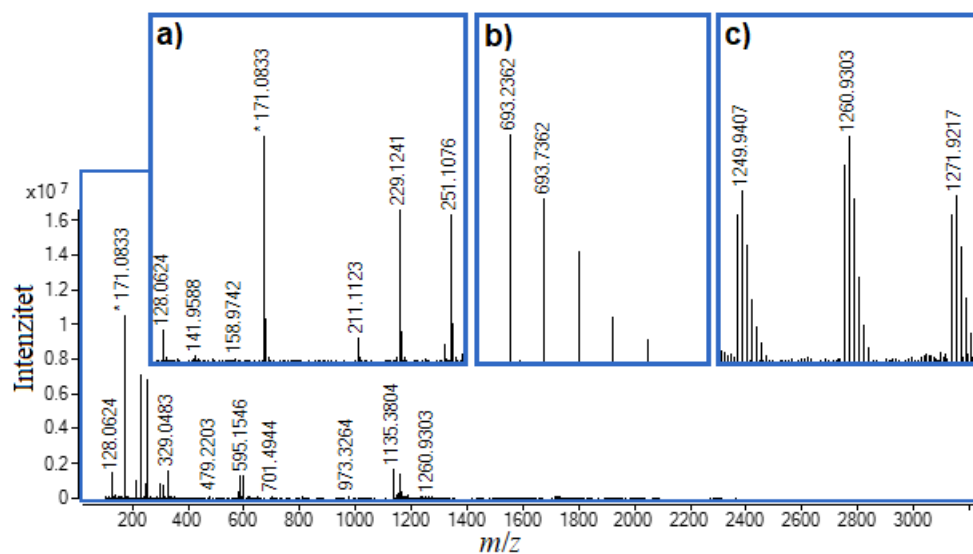
NAB uslijed inkluzije i razmještanjem molekula vode iz središnje šupljine CD u *bulk* otapalo. Konačno, može se zaključiti kako je kompleksiranje nabumetona različitim β -CD entalpijski i entropijski povoljan proces pri čemu je entropijski doprinos reakcijskoj Gibbsovoj energiji izraženiji za kompleksiranje nabumetona s RM- β -CD i SBE- β -CD u usporedbi s nativnim β -CD i njegovim hidroksipropiliranim derivatom.

Vrijednosti izračunatih termodinamičkih parametara za kompleksiranje NAB s β -ciklodekstrinom u relativno su dobrom slaganju s vrijednostima koje su prikazali Todorova i Schwarz¹²² za kompleksiranje u fosfatnom puferu pH-vrijednosti 7,1 pri 25 °C (tablica 4). Termodinamički parametri kompleksiranja NAB s derivatima β -CD do sada nisu direktno određivani ITC mjerenjima.

4.2.3. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa nabumetona i različitih β -ciklodekstrina spektrometrijom masa

Kompleksiranje nabumetona različitim β -CD istraženo je spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem koje kao blagi način ionizacije uz MALDI, APCI i APPI omogućuje prijenos inkluzijskih kompleksa CD i ostalih kompleksa nekovalentne prirode iz otopine u plinsku fazu.

Na slici 22 prikazan je spektar masa visokog razlučivanja otopine nabumetona i β -CD molarnog omjera 1:1 ($c_{\text{NAB}} = c_{\beta\text{-CD}} = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Bazni signal u prikazanom HRMS spektru pripisan je ionu m/z vrijednosti od 171,0833 koji pripada stabilnom *in source* fragmentu NAB, odnosno stabilnom karbokationu koji je rezultat β -cijepanja C–C veze u odnosu na karbonilnu skupinu molekule NAB uslijed procesa ionizacije. Uz navedeni signal ionima nabumetona pripisani su i signali jednostruko nabijenih vrsti pri m/z 229,1241 $[\text{M}+\text{H}]^+$ i 251,1076 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Signali pri vrijednostima m/z od 1135,3804 i 1157,3625 karakteristični su signali β -CD, a pripisani su jednostruko protoniranom molekulskom ionu te aduktu s Na^+ . Detaljnim pregledom spektra masa uočen je veći broj signala vrlo niskog intenziteta koji su pripisani kompleksu NAB i β -CD u plinskoj fazi. Signal pri m/z 693,2362 dvostruko je nabijeni ion kompleksa NAB i β -CD u stehiometrijskom odnosu 1:1, $[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$. Ioni pri m/z 1249,4374, 1260,4285 i 1271,4196 dvostruko su nabijene vrste kompleksa NAB s dvije molekule β -CD. Takve vrste nisu rezultat kompleksiranja u stehiometrijskom odnosu 1:2, nego posljedica nespecifičnog vezanja kompleksa stehiometrijskog odnosa 1:1 s dodatnom molekulom β -CD uslijed ionizacije elektroraspršenjem. Spektar masa prikazan je i tablično (tablica 19).



Slika 22. HRMS spektar otopine nabumetona i β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 350,0 V.

Tablica 19. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopine nabumetona i β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1.

Izmjeren m/z	Točan m/z	Rel. int. / %	Asignacija signala
1271,4196	1271,4165	0,83	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{Na}]^{2+}$
1260,4285	1260,4255	1,08	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
1249,4374	1249,4346	0,82	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$
1157,3625	1157,3575	13,22	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}+\text{Na}]^{+}$
1135,3804	1135,3756	15,97	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}+\text{H}]^{+}$
693,2362	693,2406	0,18	$[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
595,1546	594,6923	12,62	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}+\text{CH}_3\text{OH}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
587,1683	587,1704	12,00	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$
579,1798	579,1834	3,30	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
251,1076	251,1043	65,17	$[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2+\text{Na}]^{+}$
229,1241	229,1223	67,72	$[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2+\text{H}]^{+}$
171,0833	171,0804	100	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}]^{+}$
128,0624	128,0621	13,47	$[\text{C}_{10}\text{H}_8]^{\bullet+}$

Svi karakteristični ioni NAB, β -CD i njihovih kompleksa podvrgnuti su analizi tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) korištenjem tehnike CID uz upotrebu kolizijskih potencijala od 10, 20 i 40 V. Način fragmentiranja karakterističnih iona NAB bit će objašnjen u dijelu doktorskog rada koji se odnosi na studije njegove prisilne razgradnje.

MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona $[\beta\text{-CD}+\text{H}]^{+}$ (m/z 1135,3804) pri kolizijskom potencijalu od 20 V prikazan je na slici D11. Način i mehanizam fragmentiranja karakterističnih iona β -CD prilikom MS/MS analize po prvi put je detaljno opisan u nedavno objavljenom radu

Bruni i Scürcha.¹³⁹ Inicijalni korak prilikom fragmentacije jednostruko protoniranog molekulskog iona β -CD tehnikom CID otvaranje je makrocikla i njegova linearizacija uslijed pucanja glikozidne C₁-O veze. Fragmentacija se nastavlja eliminiranjem glukopiranoznih podjedinica (m/z 973,3232, 811,2701, 649,2182, 487,1660) sve do dimernog (m/z 325,1130) ili monomernog fragmentnog iona (m/z 163,0600) uz naknadno eliminiranje molekula vode (m/z 289,0920 ili 127,0384) i formaldehida u obliku neutralnih vrsta.

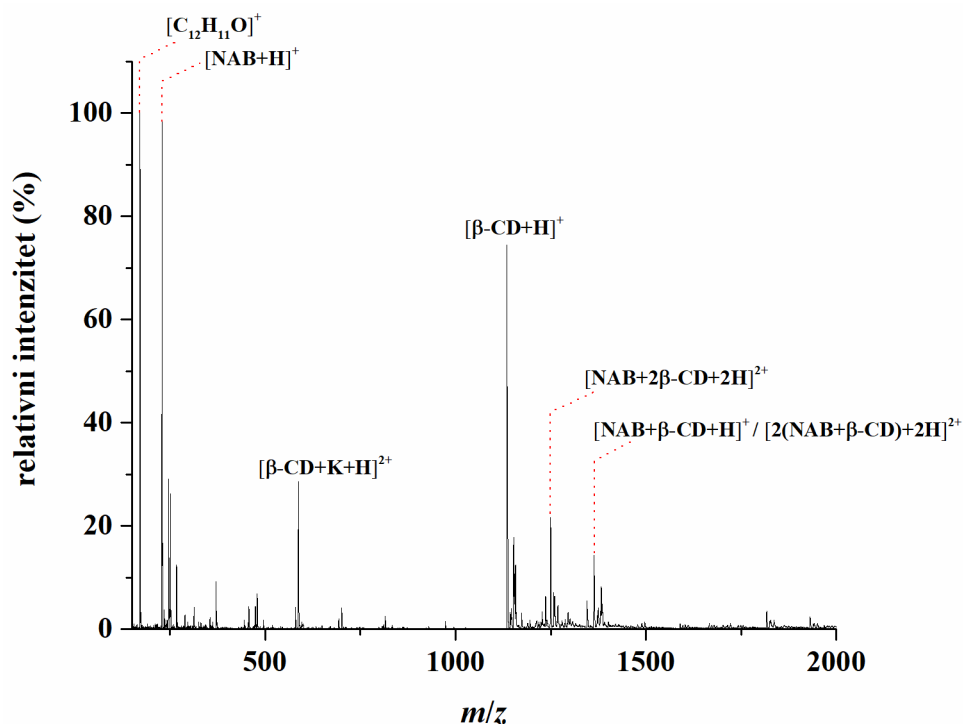
Analizi tandemnom spektrometrijom masa podvrgnuti su ioni kompleksa pri m/z 693,2362, 1249,4374, 1260,4285 i 1271,4196. MS/MS spektri dobiveni primjenom kolizijskog potencijala od 20 V prikazani su na slici D12. Tablični oblici MS/MS spektara navedenih iona pri svim primijenjenim kolizijskim potencijalima prikazani su u tablicama D2, D3 i D4. Način fragmentiranja svih iona kompleksa vrlo je sličan. Ion kompleksa disocira pri čemu pozitivan naboj zaostaje na molekuli β -CD koja fragmentira identično kao što je prethodno opisano, eliminiranjem glukopiranoznih podjedinica. Ion pri m/z 1271,4196 stabiliziran je prisustvom Na⁺ iona pa fragmentira tek do iona m/z 1157,3571 koji odgovara natrijevom aduktu jedne molekule β -CD, čak i pri kolizijskom potencijalu od 40 V. Takvo ponašanje oligosaharidnih adukata s Na⁺ i drugim alkalijskim metalima prilikom MS/MS analiza tehnikom CID već je neko vrijeme poznato. Pretpostavlja se da ion alkalijskog metala koordinira s atomima kisika glikozidnih veza čime je struktura stabilizirana.^{140,141}

Analiza spektrometrijom masa visokog razlučivanja kompleksa NAB s derivatima β -CD nije bila moguća čak ni uz fino ugađanje parametara ionskog izvora. Pretpostavlja se da je uzrok niska učinkovitost ionizacije¹⁰¹, geometrija analizatora masa (Q-TOF) koja ne pogoduje analizi nekovalentnih kompleksa i činjenica kako NAB tvori inkluzijske komplekse s velikim brojem različito supstituiranih molekula β -CD u slučaju svih korištenih derivata za razliku od nativnog β -CD gdje je NAB kompleksiran isključivo jednom vrstom. Analiza je stoga uspješno nastavljena korištenjem spektrometra masa s trostrukim kvadrupolnim analizatorom masa.

4.2.3.1. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa trostrukim kvadrupolom

Na slici 23 prikazan je spektar masa otopine NAB i β -CD u molarnom omjeru 1:1 ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹), dok su na slikama D13, D14, D15 i D16 prikazani MS spektri otopina molarnih omjera 5:1, 2:1, 1:2 i 1:5 u kojima je koncentracija NAB bila konstantna, a koncentracija β -CD varirana kako bi se postigao željeni molarni omjer. Učinkovitost ionizacije je u ovom slučaju bila mnogo veća. U prikazanom spektru masa signal baznog iona pripisan je

stabilnom karbokationu $[C_{12}H_{11}O]^+$, a uz njega se lako uočava i vrlo intenzivan signal jednostruko protoniranog molekulskog iona NAB pri m/z 229,1 koji je u spektrima otopina molarnih omjera 1:1, 1:2 i 1:5 bazni signal tih spektara.



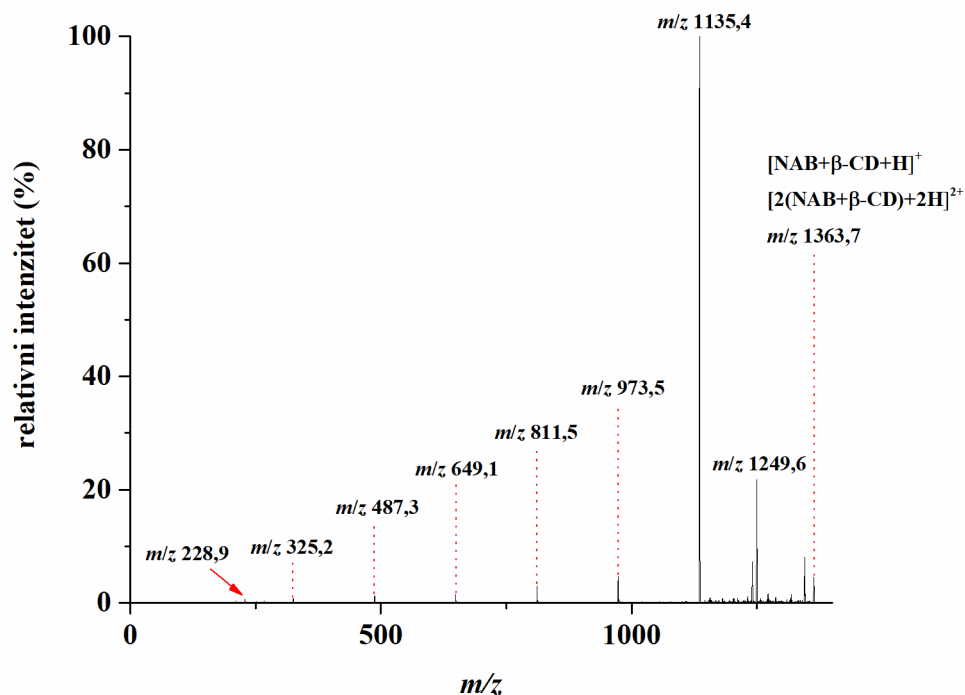
Slika 23. MS spektar otopine nabumetona i β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

Spektri masa prikazani su i tablično (tablica 20). Najzanimljiviji signal koji u prethodnoj MS analizi nije opažen je onaj pri m/z 1363,4 koji odgovara jednostruko nabijenom kompleksu NAB s β -CD stehiometrijskog odnosa 1:1. Na temelju rezultata kasnije provedene MS/MS analize (slika 24) utvrđeno je kako taj signal rezultat preklapanja signala za ion $[NAB+\beta\text{-CD}+2H]^+$ i dvostruko nabijenog dimera kompleksa $[2(NAB+\beta\text{-CD})+2H]^{2+}$ koji se zbog identičnih m/z vrijednosti javljaju kao jedan signal. Njihove inače različite izotopne profile nije moguće razlikovati na temelju MS spektara niskog razlučivanja koji su dobiveni analizom uz kvadrupolni analizator masa. Povećanje koncentracije β -CD u mjernim otopinama uzrokuje pojavu agregiranja kako samog β -CD, tako i njegovih kompleksa s NAB u plinskoj fazi pa se tako mogu uočiti signali pri m/z 1931, 1816,9, 1741,8, 1665,8 itd. koji odgovaraju kompleksima višeg reda ili signali pri m/z 1702,9, 1513,7 itd. koji odgovaraju vrstama koje su rezultat agregiranja β -CD. Povećanjem koncentracije β -CD intenziteti signala koji odgovaraju

kompleksima stehiometrijskog odnosa 1:1 poput m/z 693,3, 701,3, 1363,4, 1380,3 i 1385,1 opadaju, dok intenziteti vrsta koje su rezultat različitih načina agregiranja rastu. Agregacija β -ciklodekstrina i njegovih inkluzijskih kompleksa u otopini već je odavno poznat fenomen, a prema ovim rezultatima jasno je kako se javlja i u plinskoj fazi prilikom MS analize.

Tablica 20. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektra otopina nabumetona i β -CD molarnih omjera 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 i 1:5 u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %					Asignacija signala
	5:1	2:1	1:1	1:2	1:5	
1931	-	-	-	4,17	3,06	$[2\text{NAB}+3\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$
1816,9	0,50	1,87	3,51	7,69	9,57	$[\text{NAB}+3\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$
1741,8	-	-	-	2,04	2,29	$[3\text{NAB}+4\beta\text{-CD}+3\text{H}]^{3+}$
1702,9	-	-	-	-	3,66	$[3\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$
1665,8	-	-	-	3,57	4,88	$[2\text{NAB}+4\beta\text{-CD}+3\text{H}]^{3+}$
1589,7	-	-	-	6,04	8,19	$[\text{NAB}+4\beta\text{-CD}+3\text{H}]^{3+}$
1513,7	-	-	-	-	6,17	$[4\beta\text{-CD}+3\text{H}]^{3+}$
1385,1	3,22	3,77	-	3,57	2,50	$[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$
1382,4	2,84	4,59	8,26	6,04	3,79	$[2\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$
1380,3	3,56	3,44	-	2,78	1,66	$[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{NH}_4]^+$
1374,4	1,29	2,70	-	4,17	2,94	$[2\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
1371,8	1,20	1,96	-	2,97	1,90	$[2\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$
1363,4	10,98	15,55	14,26	16,83	10,70	$[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{H}]^+ / [2(\text{NAB}+\beta\text{-CD})+2\text{H}]^{2+}$
1260,4	1,29	3,26	6,36	8,50	10,03	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
1257,9	1,96	4,02	7,03	10,05	9,66	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$
1249,4	5,80	14,73	21,59	36,22	41,11	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$
1173,0	0,99	1,57	3,07	2,99	5,02	$[\beta\text{-CD}+\text{K}]^+$
1157,0	5,29	7,74	12,40	11,61	13,19	$[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$
1154,3	-	-	-	11,29	14,89	$[2\beta\text{-CD}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$
1152,1	9,90	11,81	17,74	20,08	22,17	$[\beta\text{-CD}+\text{NH}_4]^+$
1146,3	-	-	-	6,39	11,13	$[2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
1143,8	-	-	-	-	10,10	$[2\beta\text{-CD}+\text{NH}_4+\text{H}]^2$
1135,0	35,89	59,12	74,42	87,26	93,80	$[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$
973,2	0,68	1,13	1,50	973,1	2,42	$[1135,0\text{-C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$
701,3	1,63	2,34	4,15	2,29	1,72	$[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$
693,3	-	1,21	-	1,79	1,75	$[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
587,2	9,17	14,20	28,56	18,98	17,11	$[\beta\text{-CD}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$
579,2	1,10	1,67	4,21	2,39	2,42	$[\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
479,0	8,75	7,96	6,77	4,05	2,60	$[2\text{NAB}+\text{Na}]^+$
474,1	8,54	5,77	4,34	3,15	1,84	$[2\text{NAB}+\text{NH}_4]^+$
457,1	7,07	6,23	4,33	3,94	3,00	$[2\text{NAB}+\text{H}]^+$
266,9	13,09	11,40	12,46	8,02	8,11	$[\text{NAB}+\text{K}]^+$
251,0	27,57	26,77	26,25	18,21	14,20	$[\text{NAB}+\text{Na}]^+$
248,1	13,91	11,66	13,79	5,46	2,92	$[2\text{NAB}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$
246,0	47,34	34,21	29,13	21,27	13,42	$[\text{NAB}+\text{NH}_4]^+$
229,1	100	100	98,25	90,89	83,56	$[\text{NAB}+\text{H}]^+$
170,9	96,77	97,31	100	100	100	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}]^+$



Slika 24. MS/MS spektar iona $[NAB+\beta\text{-CD}+H]^+$ / $[2(NAB+\beta\text{-CD})+2H]^{2+}$ (m/z 1363,4). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20 V.

Tablica 21. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[NAB+\beta\text{-CD}+H]^+$ / $[2(NAB+\beta\text{-CD})+2H]^{2+}$ (m/z 1363,4) dobivenih pri kolizijskim potencijalima od 5, 10, 20 i 40 V.

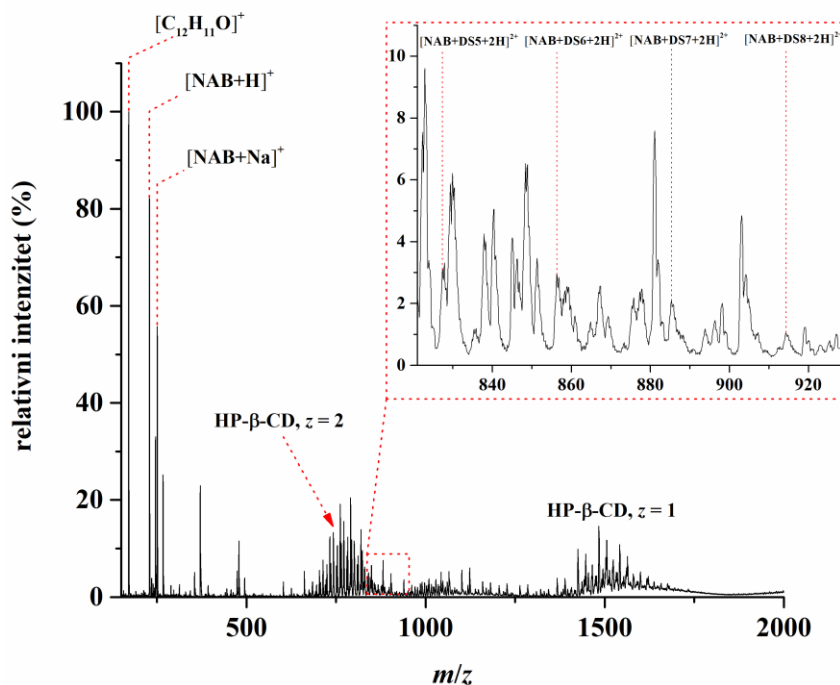
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
1363,5	100	91,63	4,59	1,51	$[NAB+\beta\text{-CD}+H]^+$ / $[2(NAB+\beta\text{-CD})+2H]^{2+}$
1354,7	4,93	10,87	-	-	$[1363,5-H_2O]^{2+}$
1345,4	23,20	55,14	8,06	-	$[1363,5-2\cdot H_2O]^{2+}$
1249,6	9,09	52,23	21,73	0,95	$[NAB+2\beta\text{-CD}+2H]^{2+}$
1240,5	1,00	5,65	7,28	0,71	$[1249,6-H_2O]^{2+}$
1135,4	15,05	100	100	11,08	$[\beta\text{-CD}+H]^+$
973,5	0,53	1,38	4,64	17,23	$[glc_6+H]^+$
811,5	0,57	1,06	2,99	36,47	$[glc_5+H]^+$
649,1	-	0,50	1,51	71,86	$[glc_4+H]^+$
487,3	0,47	0,50	1,25	100	$[glc_3+H]^+$
325,2	-	-	0,82	89,80	$[glc_2+H]^+$
289,0	-	-	-	2,27	$[325,2-2\cdot H_2O]^+$
228,9	-	0,67	0,65	1,49	$[NAB+H]^+$
163,2	-	-	-	3,71	$[glc+H]^+$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

Na slici 26 i u tablici 21 prikazani su MS/MS spektri iona $[NAB+\beta\text{-CD}+H]^+$ / $[2(NAB+\beta\text{-CD})+2H]^{2+}$. Signal dvostruko nabijenog iona

$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$ pri m/z 1249,6 koji nastaje kao rezultat fragmentiranja iona $[2(\text{NAB}+\beta\text{-CD})+2\text{H}]^{2+}$ govori u prilog tvrdnji kako je u osnovnom MS spektru došlo do već navedenog preklapanja signala iona $[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$ i $[2(\text{NAB}+\beta\text{-CD})+2\text{H}]^{2+}$. Osim signala iona pri m/z 1363,4 za daljnju MS/MS analizu izoliran je i ion sa signalom pri 1249,4 koji odgovara $[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$ te signali jednostruko protoniranog molekulskog iona $\beta\text{-CD}$ pri m/z 1135,0 i m/z 587,2 koji odgovara dvostruko nabijenom ionu $[\beta\text{-CD}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$ vrlo intenzivnog signala. Njihovi MS/MS spektri u grafičkom i tabličnom prikazu nalaze se u dodatku (slike D17, D18 i D19 te tablice D5, D6 i D7).

Derivati $\beta\text{-CD}$ koji su korišteni u ovom doktorskom radu smjesa su različito supstituiranih molekula $\beta\text{-CD}$ sa stupnjem supstitucije koji varira od 4 do čak 18 u nekim slučajevima što izuzetno otežava MS analizu. Iako su otopine samih derivata $\beta\text{-CD}$ zasebno analizirane, njihovi MS spektri se neće prikazati u ovom doktorskom radu zbog opsega tih rezultata. Ipak, ti spektri su uvelike olakšali identifikaciju iona kompleksa u vrlo kompliciranim MS spektrima otopina NAB s derivatima $\beta\text{-CD}$. Karakteristični signali iona derivata $\beta\text{-CD}$ stoga su opisani u sklopu karakterizacije spektara njihovih otopina s NAB.



Slika 25. MS spektar otopine nabumetona i HP- $\beta\text{-CD}$ ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

Na slici 25 prikazan je MS spektar otopine NAB i HP- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Kao što je vidljivo na slici, spektar masa otopine NAB s HP- β -CD kompliciran je zbog velikog broja signala koji se pripisuju dvostruko nabijenim ionima HP- β -CD ($z = 2$) u rasponu vrijednosti m/z od 655,2 do 887,4 te jednostruko nabijenim ionima HP- β -CD ($z = 1$) u rasponu vrijednosti m/z od 1309,3 do 1657,5. Detaljna karakterizacija navedenih signala iz MS spektra samog HP- β -CD nalazi se u dodatku u tablicama D8 i D9. Najintenzivniji signali u spektru pripisani su karakterističnim signalima NAB. Signali koji potječu od dvostruko nabijenih iona kompleksa NAB s HP- β -CD obilježeni su crvenim kvadratom te je taj dio spektra uvećan. Spektri masa otopina različitih molarnih omjera NAB i HP- β -CD prikazani su tablično (tablica 22).

Tablica 22. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektara otopina nabumetona i HP- β -CD molarnih omjera 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 i 1:5 u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

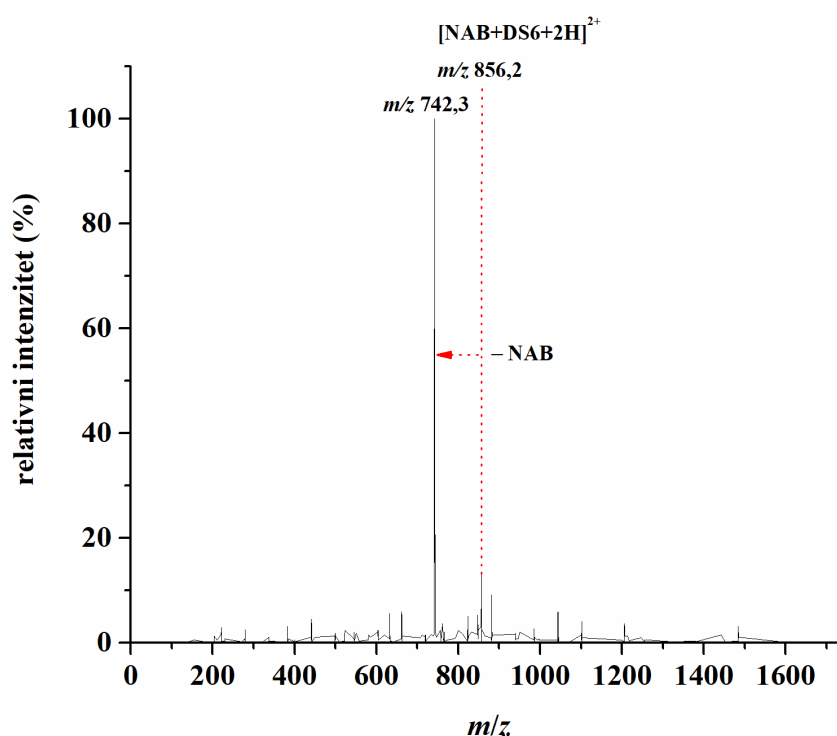
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %					Asignacija signala
	5:1	2:1	1:1	1:2	1:5	
914,3	0,95	1,07	1,05	1,30	1,69	[NAB+DS8+2H] ²⁺
904,3	-	1,74	-	-	-	[NAB+DS7+H+K] ²⁺
896,4	-	0,97	1,46	1,03	1,18	[NAB+DS7+H+Na] ²⁺
893,9	0,99	1,19	1,18	1,06	1,18	[NAB+DS7+H+NH ₄] ²⁺
885,4	1,93	2,08	2,09	2,48	2,23	[NAB+DS7+2H] ²⁺
875,3	1,14	1,62	1,89	1,17	-	[NAB+DS6+H+K] ²⁺
864,9	1,27	1,53	1,40	1,22	1,26	[NAB+DS6+H+NH ₄] ²⁺
856,3	2,87	3,00	2,94	3,15	3,58	[NAB+DS6+2H] ²⁺
846,3	1,91	2,73	3,45	2,25	2,98	[NAB+DS5+H+K] ²⁺
835,9	0,92	1,20	1,20	0,85	0,94	[NAB+DS5+H+NH ₄] ²⁺
827,4	2,81	3,01	3,12	2,64	2,71	[NAB+DS5+2H] ²⁺
495,0	1,89	2,13	3,98	-	-	[2NAB+K] ⁺
479,0	7,05	6,85	11,56	3,92	1,18	[2NAB+Na] ⁺
474,0	8,77	7,25	5,39	3,80	-	[2NAB+NH ₄] ⁺
457,1	4,98	2,70	1,57	1,48	-	[2NAB+H] ⁺
266,9	11,60	14,38	25,18	10,05	5,57	[NAB+K] ⁺
250,9	25,28	31,01	55,74	21,63	11,98	[NAB+Na] ⁺
248,2	14,01	9,30	4,76	2,32	-	[2NAB+K+H] ²⁺
246,0	47,82	42,86	33,05	24,20	16,07	[NAB+NH ₄] ⁺
229,0	99,75	95,08	82,19	71,42	60,27	[NAB+H] ⁺
170,9	100	100	100	100	100	[C ₁₂ H ₁₁ O] ⁺

*DS – stupanj supstituiranosti (engl. *degree of substitution*)

Nabumeton s različito supstituiranim HP- β -CD u plinskoj fazi tvori komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 koji su u spektru vidljivi kao signali dvostruko nabijenih iona.

Najintenzivniji signali takvih vrsta pripisani su kompleksima NAB sa šesterostruko supstituiranom molekulom β -CD što je i očekivano budući da je taj derivat β -CD imao i najveći intenzitet u MS spektru otopine samog HP- β -CD (tablice D8 i D9).

Analizi tandemnom spektrometrijom masa podvrgnut je jednostruko nabijeni ion šesterostruko supstituirane molekule β -CD (slika D20 i tablica D10) kao i ioni kompleksa NAB sa šesterostruko- (slika 26 i tablica D11) i sedmerostruko supstituiranom molekulom β -CD (tablica D12).

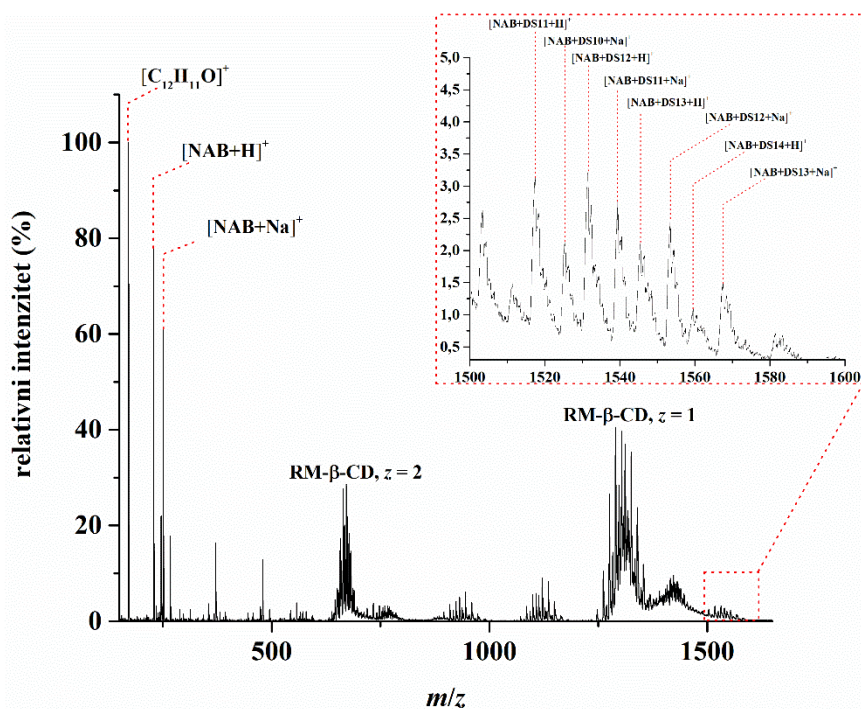


Slika 26. MS/MS spektar iona $[NAB+DS6+2H]^{2+}$ (m/z 856,3). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 10 V.

Prilikom MS/MS eksperimenata već pri kolizijskom potencijalu od 5 V dolazi disocijacije kompleksa pri čemu se naboj zadržava na molekuli HP- β -CD (m/z 742,3), identično kao i prilikom fragmentiranja kompleksa NAB s nativnim β -CD. Daljnjim povećavanjem kolizijskog potencijala dolazi do izrazitije fragmentacije molekule HP- β -CD, pri čemu kao fragmentni ioni zaostaju jednostruko ili dvostruko nabijeni ioni različito supstituiranih glukopiranoznih podjedinica.

Na slici 27 prikazan je MS spektar otopine NAB i RM- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Kao i u prethodnom slučaju radi se o kompliciranom

spektru masa s velikim brojem signala koje možemo pripisati jednostruko i dvostruko nabijenim ionima RM- β -CD te jednostruko nabijenim ionima kompleksa NAB s RM- β -CD čiji su signali obilježeni crvenim kvadratom.



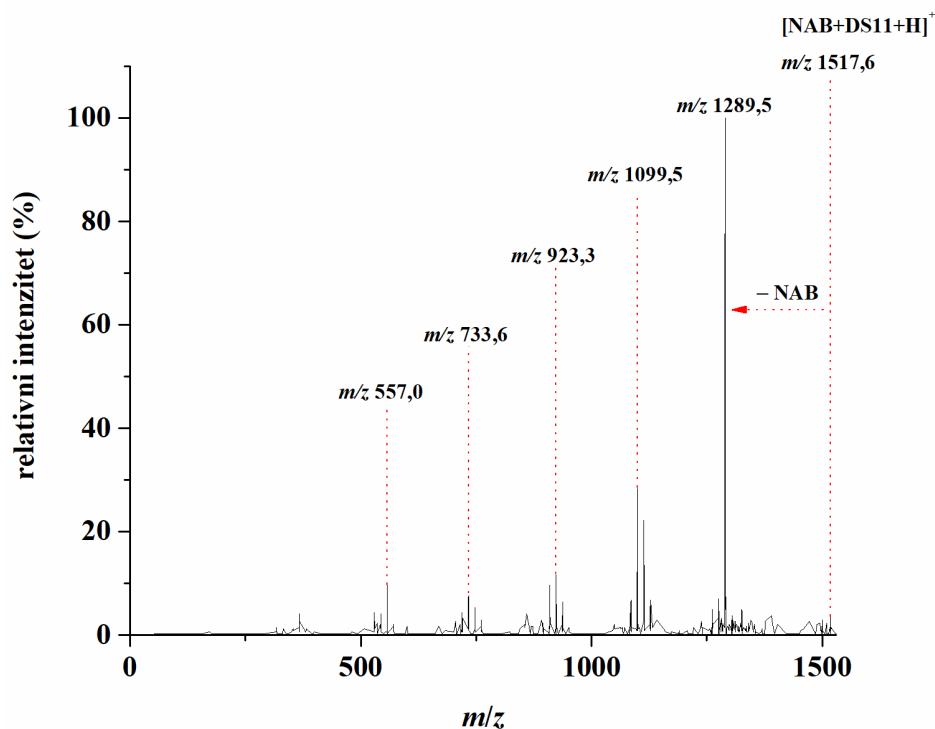
Slika 27. MS spektar otopine nabumetona i RM- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

Bazni signali u ovom MS spektru pripadaju karakterističnim ionima NAB. Jednostruko nabijeni ioni RM- β -CD ($z = 1$) nalaze se u rasponu m/z od 1247,4 do 1404,4, dok se dvostruko nabijeni ioni RM- β -CD ($z = 2$) nalaze u rasponu m/z od 650,2 do 685,3. Između ta dva navedena raspona vrijednosti m/z mogu se uočiti tri skupine signala za koje se pretpostavlja da pripadaju višestruko nabijenim agregatima RM- β -CD. Detaljna karakterizacija navedenih signala iz MS spektra samog RM- β -CD nalazi se u dodatku u tablicama D13 i D14. NAB i RM- β -CD u plinskoj fazi tvore komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 u rasponu m/z vrijednosti od 1503,5 do 1581,5. Najintenzivniji signali kompleksa mogu se pripisati onima koje tvore RM- β -CD stupnja supstituiranosti 11 i 12 što ne iznenađuje budući da oni daju i najintenzivnije signale u MS spektru samog ciklodekstrina pa se može zaključiti kako se radi o najzastupljenijim vrstama u smjesi ovih različito supstituiranih β -CD. Spektri masa otopina različitih molarnih omjera NAB i RM- β -CD prikazani su tablično (tablica 23).

Tablica 23. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektara otopina nabumetona i RM- β -CD molarnih omjera 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 i 1:5 u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %					Asignacija signala
	5:1	2:1	1:1	1:2	1:5	
1581,4	0,91	0,57	0,72	-	-	[NAB+DS14+Na] ⁺
1567,5	1,21	1,02	1,48	1,13	1,25	[NAB+DS13+Na] ⁺
1559,5	1,06	0,97	1,10	1,40	1,50	[NAB+DS14+H] ⁺
1553,4	1,62	1,49	2,42	1,82	1,86	[NAB+DS12+Na] ⁺
1545,4	1,35	1,71	2,11	3,34	3,74	[NAB+DS13+H] ⁺
1539,4	1,69	1,67	2,76	1,76	1,78	[NAB+DS11+Na] ⁺
1531,5	1,65	2,42	3,20	5,28	5,39	[NAB+DS12+H] ⁺
1525,5	1,51	1,40	2,14	1,46	1,39	[NAB+DS10+Na] ⁺
1517,5	1,63	2,41	3,13	4,89	4,68	[NAB+DS11+H] ⁺
1511,5	1,32	1,14	1,48	-	-	[NAB+DS9+Na] ⁺
1503,4	1,54	1,97	2,63	3,37	3,04	[NAB+DS10+H] ⁺
495,1	5,32	2,58	2,53	-	-	[2NAB+K] ⁺
479,0	27,52	14,49	12,87	3,33	1,29	[2NAB+Na] ⁺
474,0	3,80	4,18	3,12	1,58	-	[2NAB+NH ₄] ⁺
457,0	2,84	2,64	1,79	1,19	-	[2NAB+H] ⁺
266,9	31,94	16,95	17,82	5,94	3,08	[NAB+K] ⁺
250,9	85,84	58,02	60,90	27,52	19,39	[NAB+Na] ⁺
248,2	13,64	6,80	3,12	-	-	[2NAB+K+H] ²⁺
246,0	23,60	27,00	22,05	13,48	4,50	[NAB+NH ₄] ⁺
229,0	89,91	88,60	77,99	62,05	33,36	[NAB+H] ⁺
170,9	100	100	100	100	66,91	[C ₁₂ H ₁₁ O] ⁺

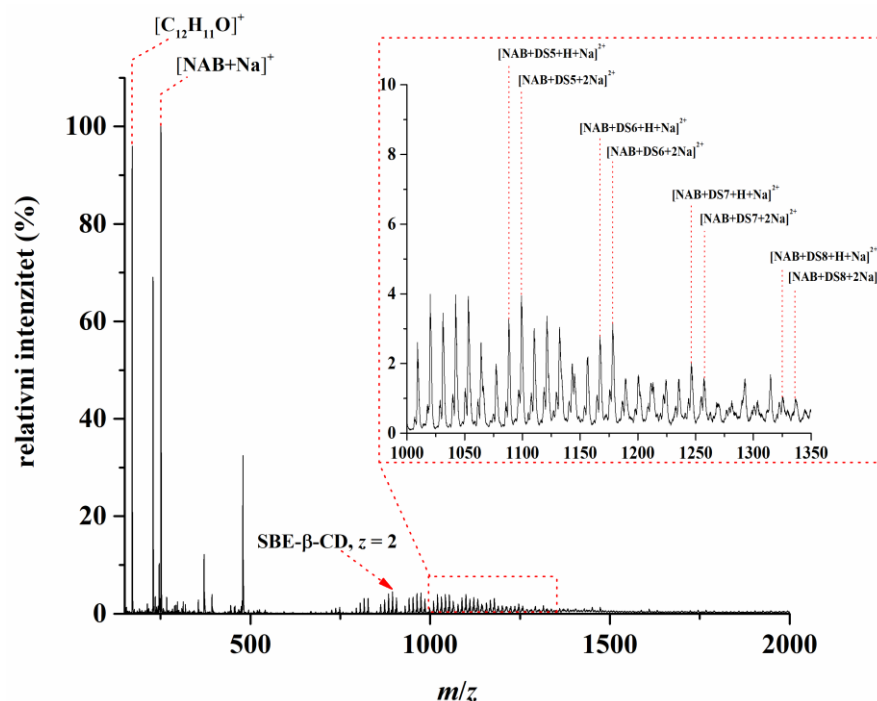
Analizi tandemnom spektrometrijom masa podvrgnut je jednostruko protonirani ion molekule β -CD s jedanaest metilnih supstituenata (slika D21 i tablica D15) kao i ioni kompleksa NAB s tim istim RM- β -CD DS 11 (slika 28 i tablica D16) i s RM- β -CD DS 12 (tablica D17). Ion kompleksa NAB s RM- β -CD DS 11 je pri primijeni kolizijskog potencijala od 5 V stabilan te ne dolazi do fragmentacije za razliku od prethodno opisane fragmentacije iona kompleksa NAB s HP- β -CD DS 6. Ipak, u ovom slučaju je za MS/MS analizu izoliran jednostruko nabijeni ion kompleksa NAB s RM- β -CD DS 11 za kojeg se očekuje da je veće stabilnosti u odnosu na dvostruko nabijene ione koji su analizirani u prethodnom slučaju pa se samim time stabilnost ova dva kompleksa u plinskoj fazi ne može uspoređivati. Daljnjim povećavanjem kolizijskog potencijala kompleks disocira te dolazi do fragmentiranja CD i eliminiranja različito supstituiranih glukopiranoznih podjedinica. Takav način fragmentiranja odgovara već prethodno opisanom načinu fragmentiranja kompleksa NAB s β -CD i HP- β -CD, ali i načinu fragmentiranja CD prilikom analize tehnikom CID općenito.



Slika 28. MS/MS spektar iona $[NAB+DS11+H]^+$ (m/z 1517,5). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20 V.

Analiza otopina NAB i SBE- β -CD bila je zahtjevnija u usporedbi s prethodno provedenim analizama otopina NAB s β -CD, HP- β -CD i RM- β -CD. Naime, SBE- β -CD je anionski derivat β -CD za kojeg je očekivana mnogo učinkovitija ionizacija u negativnom načinu ioniziranja elektroraspršenjem što se pokazalo točnim. SBE- β -CD je jaka kiselina koja zadržava negativan naboj čak i pri vrlo niskim pH-vrijednostima.¹⁴² Međutim, kompleksi NAB sa SBE- β -CD u negativnom načinu ioniziranja su se ionizirali s mnogo manjom učinkovitošću u usporedbi sa samim SBE- β -CD pa su analize konačno provedene uz pozitivan način ionizacije elektroraspršenjem. Drugi problem ove analize posljedica je instrumentalnih ograničenja. Korištena instrumentacija ograničena je gornjom granicom mjerljivih m/z vrijednosti od 2000, što je bliska vrijednost masama najzastupljenijih derivata SBE- β -CD različitih stupnjeva supstitucije. Samim time bilo je nemoguće detektirati jednostruko nabijene ione kompleksa NAB sa SBE- β -CD pa se analiza spektrometrijom masa u ovom slučaju morala ograničiti na one dvostruko nabijene čiji su se signali mogli uočiti. Na slici 29 prikazan je MS spektar otopine NAB i SBE- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Bazni signali ponovno su pripisani karakterističnim ionima NAB. U području m/z vrijednosti od 715,1 do 1143,1 uočeni su karakteristični signali dvostruko nabijenih iona SBE- β -CD, dok su signali

dvostruko nabijenih iona kompleksa NAB sa SBE- β -CD uočeni u području vrijednosti m/z od 1088,2 do 1336,5.

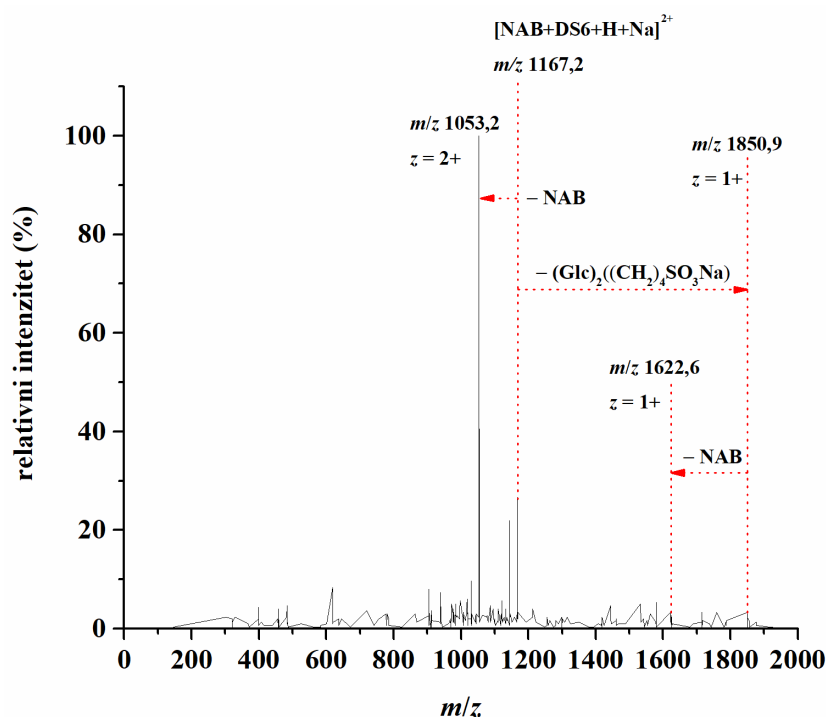


Slika 29. MS spektar otopine nabumetona i SBE- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

Spektri masa otopina različitih molarnih omjera NAB i SBE- β -CD prikazani su u tablici 24. Karakteristični ioni SBE- β -CD okarakterizirani su u sklopu dodatka u tablici D18. Analizi tandemnom spektrometrijom masa podvrgnut je dvostruko protonirani ion molekule β -CD s šest alkilsulfonskih supstituenata (slika D22 i tablica D19) kao i ioni kompleksa NAB s istim SBE- β -CD DS 6 (slika 30, tablica D20 i tablica D21).

Tablica 24. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS spektara otopina nabumetona i SBE- β -CD molarnih omjera 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 i 1:5 u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

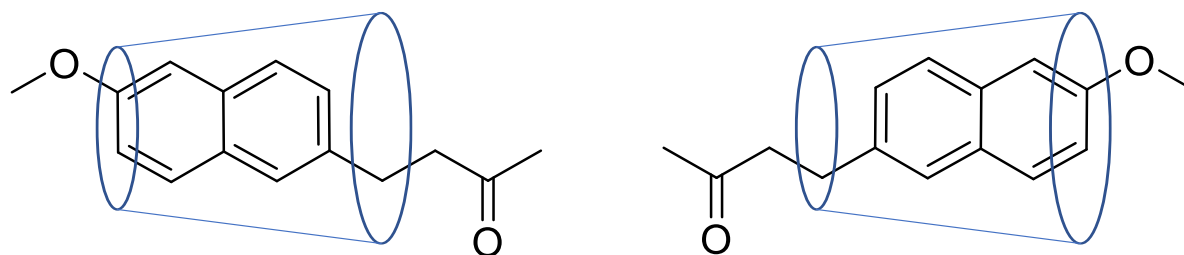
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %					Asignacija signala
	5:1	2:1	1:1	1:2	1:5	
1336,5	0,24	0,54	0,99	1,67	2,82	$[\text{NAB}+\text{DS8}+2\text{Na}]^{2+}$
1325,2	-	0,55	1,03	1,41	1,54	$[\text{NAB}+\text{DS8}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$
1257,2	0,30	0,67	1,59	2,55	4,65	$[\text{NAB}+\text{DS7}+2\text{Na}]^{2+}$
1246,2	0,31	0,78	2,01	2,65	4,55	$[\text{NAB}+\text{DS7}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$
1178,2	0,36	1,10	3,14	4,18	7,62	$[\text{NAB}+\text{DS6}+2\text{Na}]^{2+}$
1167,2	-	1,18	2,78	2,83	2,91	$[\text{NAB}+\text{DS6}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$
1099,2	0,51	1,65	3,95	4,69	7,04	$[\text{NAB}+\text{DS5}+2\text{Na}]^{2+}$
1088,2	0,80	1,76	3,28	2,76	2,46	$[\text{NAB}+\text{DS5}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$
495,1	-	1,97	0,77	-	-	$[\text{2NAB}+\text{K}]^+$
479,0	26,89	32,06	32,48	21,03	1,18	$[\text{2NAB}+\text{Na}]^+$
474,2	3,91	2,70	1,55	0,98	-	$[\text{2NAB}+\text{NH}_4]^+$
457,1	3,75	2,39	1,57	0,86	-	$[\text{2NAB}+\text{H}]^+$
266,9	5,55	12,28	25,18	2,43	1,19	$[\text{NAB}+\text{K}]^+$
250,9	88,95	100	100	100	100	$[\text{NAB}+\text{Na}]^+$
248,2	10,52	8,56	3,15	-	-	$[\text{2NAB}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$
246,0	24,02	16,93	10,30	6,48	1,73	$[\text{NAB}+\text{NH}_4]^+$
229,0	92,33	83,37	69,10	40,80	21,33	$[\text{NAB}+\text{H}]^+$
171,1	100	99,34	96,00	78,02	49,56	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}]^+$



Slika 30. MS/MS spektar iona $[\text{NAB}+\text{DS6}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ (m/z 1167,2). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 30 V.

Tumačenje rezultata MS/MS analiza odabranih iona samog SBE- β -CD i njegovih kompleksa s NAB zahtjevno je zbog eliminiranja različito supstituiranih glukopiranoznih podjedinica prilikom fragmentacije prekursorskih iona. Sam SBE- β -CD koji je kao komercijalno dostupna tvar korištena u ovom radu postoji u obliku natrijeve soli pri čemu je natrijev sulfonat vezan butilnom skupinom na glukopiranozne podjedinice. Detaljna asignacija iona produkata nalazi se u dodatku ovog rada. Zanimljivo je da je osim tipične, već objašnjene disocijacije kompleksa CD prilikom fragmentacije tehnikom CID uočen i gubitak dvije glukopiranozne podjedinice koje su supstituirane jednom alkilsulfonskom skupinom pri čemu je u rezultirajućem produktnom ionu NAB u kompleksu s preostalim pet glukopiranoznih podjedinica. Time je potvrđeno već ranije opažanje kako NAB sa SBE- β -CD tvori najstabilnije komplekse u usporedbi s ostalim β -CD korištenim u ovom radu.

Strukturna karakterizacija inkluzijskih kompleksa NAB s β -CD i način inkluzije u središnju šupljinu utvrđen je na temelju rezultata detaljne analize spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije koju je provela dr. sc. Ana Čikoš, znanstvena suradnica s Instituta Ruđer Bošković zajedno sa svojom tadašnjom diplomandicom Melitom Kelrajter. Kompleksiranje NAB β -ciklodekstrinom okarakterizirano je u DMSO- d_6 i D_2O primjenom jednodimenzijskih (1H i ^{13}C) i dvodimenzijskih NMR tehnika (COSY, NOESY, ROESY, HSQCe, HMBC i DOSY). Na temelju velikih razlika 1H kemijskih pomaka za 1-H, 5-H i 8-H (naftalenska jezgra) molekule NAB u kompleksiranom i slobodnom obliku zaključeno je kako dolazi do inkluzije u središnju šupljinu β -CD. Potvrda takvog zaključka bila je velika razlika u 1H kemijskim pomacima 3-H, 5-H i 6- CH_2 β -CD u kompleksiranom i slobodnom obliku.¹⁴³ Takva značajna razlika 1H kemijskih pomaka za 3-H i 5-H protone koji se nalaze u središnjoj šupljini β -CD najčešće se tumači kao potvrda inkluzije molekule gosta.⁹² Način inkluzije NAB i geometrija inkluzijskog kompleksa NAB: β -CD određena je provođenjem ROESY eksperimenata na temelju čijih je rezultata zaključeno kako se 3-H i 5-H β -CD nalaze u interakciji sa svim aromatskim protonima naftalenske jezgre NAB. Takvi rezultati upućuju na istodobno postojanje dvije konformacije NAB u šupljini β -CD u vodenim otopinama (slika 31). U prvoj je NAB svojim metoksi- supstituentom orijentiran ka užem obodu, dok je u drugoj orijentiran ka širem obodu β -CD što predstavlja prvi eksperimentalan dokaz¹⁴³ nekih ranijih *in silico* istraživanja kompleksiranja NAB β -ciklodekstrinom^{123,125,126}.



Slika 31. Prikaz obje konformacije NAB u središnjoj šupljini β -CD.¹⁴³

Kompleksiranje NAB različitim β -CD u vodenim otopinama istraženo je fluorescencijskom spektroskopijom i izotermnom titracijskom mikrokalorimetrijom. Dobiveni rezultati potvrdili su da NAB sa svim β -CD stupa u nekovalentne interakcije u stehiometrijskom omjeru 1:1 što je dodatno potvrđeno i provođenjem masenospektrometrijskih eksperimenata u plinskoj fazi. Nabumeton tvori inkluzijske komplekse umjerene stabilnosti sa svim korištenim β -CD pri čemu stabilnost opada u nizu NAB:SBE- β -CD > NAB:RM- β -CD > NAB: β -CD \approx NAB:HP- β -CD čime su potvrđeni rezultati ranije provedenih solubilizacijskih istraživanja. Na temelju navedenih rezultata osmislile su se strategije za pripremu sustava NAB: β -ciklodekstrini u čvrstom stanju. Priprava i analiza sustava u čvrstom stanju opisana je u sljedećim potpoglavljima.

4.3. Karakterizacija NAB i smjesa NAB s različitim β -CD u čvrstom stanju

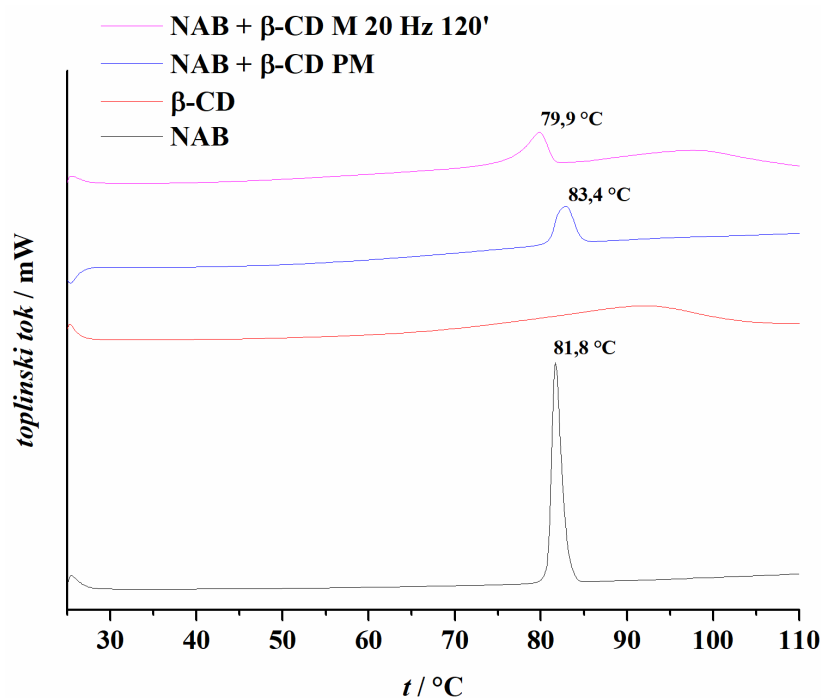
Binarne smjese nabumetona i različitih β -CD pripravljene su u ekvimolarnim omjerima u obliku fizičkih smjesa (PM), mehanokemijskom aktivacijom mljevenjem u posudicama od cirkonijevog oksida i posudicama od čelika korištenjem kugličnog vibracijskog mlina, te metodom koevaporacije iz smjese etanola i H₂O prema metodologiji opisanoj u publikaciji Goyenecheae i sur., budući da je to jedini literaturni izvor koji opisuje pripremu čvrstih sustava NAB s različitim β -CD.¹¹⁷ Kako bi se razvio optimalan postupak mljevenja koji će maksimalno povećati međusobne interakcije NAB i različitih β -CD prilagođavani su eksperimentalni uvjeti mehanokemijske aktivacije poput duljine trajanja mljevenja i frekvencije mljevenja. Učinkovitost mljevenja procijenjena je prema vrijednostima udjela kristalne faze NAB (*RDC* %) u sustavu, izračunate na temelju promjene entalpije taljenja NAB praćene tehnikom DSC. Na kraju su uspoređeni rezultati analiza sustava NAB-CD pripremljenih na tri različita načina. Prije analize smjesa provedena je detaljna analiza čistog lijeka.

4.3.1. Analiza nabumetona u čvrstom stanju

Kristalnu prirodu nabumetona karakterizira postojanje dvije polimorfne forme, I i II¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ pri čemu je polimorf II metastabilna forma koja već pri blagom mehaničkom kontaktu transformacijom prelazi u stabilniju formu I. Osim na temelju različite morfologije, ove dvije forme moguće je razlikovati na temelju DSC, PXRD i FT-IR analiza. Formu I karakterizira početak taljenja pri temperaturi od oko 80 °C s oštrim endotermnim signalom na DSC krivulji, dok formu II karakterizira početak taljenja pri temperaturi od oko 65 °C.^{145,146} Ove dvije forme moguće je razlikovati i na temelju PXRD difraktograma pri čemu formu II karakteriziraju pikovi pri 6,50, 9,77, 13,04 i 19,61 ° koji se ne mogu uočiti u difraktogramima forme I.¹⁴⁶ FT-IR spektar forme I karakterizira intenzivna vrpca istezanja karbonilne skupine $\nu(\text{C}=\text{O})$ pri 1706 cm^{-1} , dok se u slučaju forme II ista vrpca nalazi pri 1715 cm^{-1} . Pregledom DSC krivulja (slika D23), PXRD difraktograma (slika D24) i FT-IR ATR spektara (slika D25) polazne sirovine NAB, uzorka NAB mljevenog u ZrO_2 posudicama (M1), uzorka NAB mljevenog u čeličnim posudicama (M2) te uzorka NAB koji je dobiven koevaporacijom iz smjese $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ i H_2O može se zaključiti kako je u svim slučajevima prisutna samo forma I te da ne dolazi do transformacije u formu II. Ipak, treba naglasiti kako se difraktogram uzorka NAB koji je dobiven koevaporacijom iz smjese $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ i H_2O razlikuje od difraktograma ostalih uzoraka NAB. Male razlike u vrijednostima temperatura taljenja prilikom DSC analiza mogu se objasniti različitim vrijednostima veličina analiziranih čestica. Detaljna asignacija karakterističnih vrpca nabumetona iz FT-IR ATR spektara prema dostupnim literaturnim podacima¹⁴⁷ nalazi se u dodatku u tablici D22.

4.3.2. Karakterizacija smjese NAB: β -CD u čvrstom stanju

Sustavi NAB: β -CD u čvrstom stanju pripremljeni su mljevenjem pri frekvenciji od 20 Hz u posudicama od ZrO_2 u ukupnom trajanju od 120 min pri čemu se mljevenje prekidalo svakih 15 min kako bi se provela DSC analiza i provjerio udio zaostale kristalne faze NAB u ukupnoj smjesi ove dvije komponente. Na slici 32 prikazana je usporedba DSC krivulja nabumetona, β -CD, njihove fizičke smjese i smjese koja je mljevena 120 min.



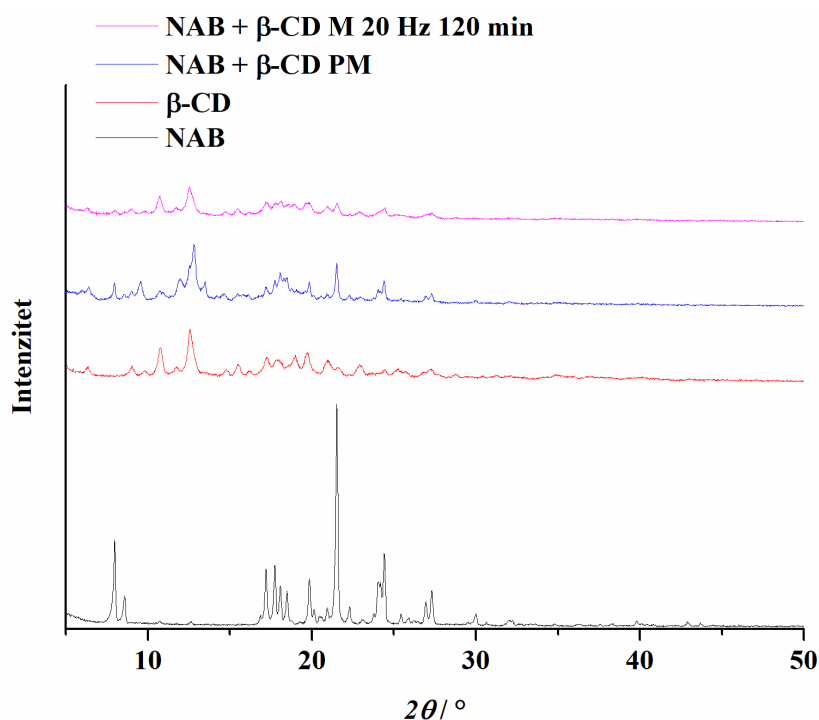
Slika 32. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO_2 (—).

Na DSC krivulji polazne sirovine NAB jasno je vidljiv oštar endoterman signal taljenja pri 81,8 °C, dok je na krivulji β -CD vidljiv vrlo širok signal koji odgovara gubitku H_2O (~ 95 °C). Na DSC krivulji fizičke smjese NAB: β -CD vidljiv je signal taljenja NAB pri nešto višoj temperaturi u usporedbi sa signalom na DSC krivulji polazne sirovine (83,4 °C). U usporedbi s tim krivulju mljevene smjese NAB: β -CD karakterizira signal taljenja NAB koji se nalazi pri nižoj temperaturi (79,9 °C) u odnosu na onaj od polazne sirovine NAB. Izračunati udio zaostale kristalne faze NAB ukazuje kako je došlo do djelomične amorfizacije NAB u mljevenom uzorku (tablica 25). Vrijednost *RDC* izračunata za krivulju uzorka fizičke smjese ukazuje na izostanak interakcije komponenti. Pregledom vrijednosti iz prikazane tablice jasno se može zaključiti kako duljim trajanjem mljevenja udio zaostalog kristalnog NAB u uzorku opada. Takav rezultat zajedno s pomakom signala taljenja NAB prema nižoj temperaturi tumači se kao potvrda postojanja interakcija između komponenti u čvrstom stanju.¹⁰² Na slici D26 prikazane su DSC krivulje uzoraka mljevene smjese NAB: β -CD tijekom vremena.

Tablica 25. Izmjerene vrijednosti temperature početka signala taljenja (t_1), maksimuma signala taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) te izračunata vrijednost udjela zaostale kristalne faze NAB (RDC %) u čvrstom sustavu NAB: β -CD nakon 120 min mljevenja u posudici od ZrO_2 pri 20 Hz.

Uzorak	$t_1 / ^\circ C$	$t_2 / ^\circ C$	$\Delta H / J g^{-1}$	$RDC / \%$
NAB	80,8	81,8	136,1	100
FIZIČKA SMJESA	81,6	83,4	120,5	88,5
SMJESA MLJEVENA 15 min	79,5	81,0	111,3	81,8
SMJESA MLJEVENA 30 min	79,1	80,9	111,6	82,0
SMJESA MLJEVENA 45 min	79,6	81,4	103,4	76,0
SMJESA MLJEVENA 60 min	78,8	80,6	99,4	73,1
SMJESA MLJEVENA 75 min	79,9	82,2	100,9	74,1
SMJESA MLJEVENA 90 min	77,9	80,4	97,7	71,8
SMJESA MLJEVENA 120 min	76,7	79,9	92,3	67,8

Kako bi se upotpunila karakterizacija sustava NAB: β -CD u čvrstom stanju i dobila dodatna potvrda objašnjenih fenomena snimljeni su PXRD difraktogrami konačnih produkata. Na slici 33 prikazani su PXRD difraktogrami uzoraka polazne sirovine NAB, β -CD, njihove fizičke smjese i smjese koja je mljevena 120 min pri frekvenciji od 20 Hz. PXRD difraktogram NAB pokazuje velik broj oštrih signala koji karakteriziraju ovu kristalnu tvar. Difraktogram nativnog β -CD također potvrđuje kako je ovaj prirodni CD kristalna tvar. Difraktogram fizičke smjese ove dvije komponente jednostavna je superpozicija difraktograma čistih spojeva. Ipak, u difraktogramu čvrstog sustava koji je pripremljen mljevenjem očit je pad intenziteta karakterističnih pikova NAB i β -CD čime se potvrđuju rezultati DSC analize. Prilikom mljevenja dolazi do djelomične amorfizacije lijeka u uzorku.



Slika 33. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (–), β-CD (–), uzorka njihove fizičke smjese (–) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (–).

Usporedbom FT-IR ATR spektra fizičke smjese NAB:β-CD i spektra mljevene smjese (slika D27, tablica D23) uočeni su pomaci karakterističnih vrpca NAB s 1705 na 1706 cm⁻¹ ($\nu(\text{C}=\text{O})$), s 1633 na 1635 cm⁻¹ i s 1228 na 1230 cm⁻¹ ($\nu(\text{CC})+\tau(\text{HCOC})$). Detaljnim pregledom navedenih spektara može se zaključiti da je spektar fizičke smjese NAB:β-CD superpozicija spektara ove dvije komponente. Nasuprot tome, spektar mljevene smjese svojim izgledom nalikuje spektru samog β-CD uz primjetno smanjenje intenziteta karakterističnih vrpca NAB. Takav fenomen opisan je prilikom analize čvrstih sustava prirodnog estrogena kumestrola s različitim β-CD koji su pripremljeni precipitacijom te je tumačen kao eksperimentalni dokaz interakcije komponenti u čvrstom stanju, odnosno uklapanja molekule gosta u središnju šupljinu CD u čvrstom stanju.¹⁴⁸

Ako opisane rezultate usporedimo s rezultatima DSC (slika D28 i tablica D24) i PXRD analiza (slika D29) uzoraka samog NAB koji su mljeveni i kasnije analizirani na identičan način može se zaključiti kako prisutnost β-CD vodi do višestruko većeg stupnja amorfizacije ovog lijeka. Naime, nakon 120 min mljevenja samog NAB udio zaostale kristalne faze NAB u uzorku iznosio je čak 90,9 %, a to potvrđuju i intenzivni karakteristični pikovi NAB u PXRD

difraktogramu istog uzorka. Jasno je da NAB svoju kristalnu prirodu zadržava čak i nakon 120 min mljevenja.

Priprava smjese NAB: β -CD mljevenjem u posudicama od ZrO_2 pokazala je umjerenu učinkovitost pri čemu je udio zaostale kristalne faze NAB nakon 120 min pri frekvenciji od 20 Hz iznosio 67,8 %. Mljevenje smjese NAB: β -CD frekvencijom od 25 Hz korištenjem posudica od čelika u ukupnom trajanju od 30 min pokazalo je nešto veću učinkovitost jer je udio zaostale kristalne faze NAB iznosio 42,0 %, što je upola manje u usporedbi s vrijednosti *RDC* koja je izračunata za jednak period mljevenja u posudicama od ZrO_2 . Izračunata vrijednost *RDC* nabumetona za produkt dobiven koevaporacijom iz smjese etanola i H_2O iznosila je samo 26,6 %. DSC krivulje i PXRD difraktogrami smjese mljevene u čeličnim posudicama i produkta koji je dobiven koevaporacijom prikazani su na slikama D30, D31, D32 i D33. PXRD difraktogram smjese mljevene u čeličnim posudicama potvrđuje da je došlo do amorfizacije NAB, no difraktogram produkta koji je dobiven koevaporacijom (slika D33) karakteriziran je brojnim pikovima koji se mogu pripisati kristalnom β -CD, ali i oštrim pikovima pri vrijednostima 2θ od 5,81, 6,62, 6,94 i 11,66 ° koji ranije nisu uočeni u difraktogramima samog NAB ili β -CD, kao ni u difraktogramu njihove fizičke smjese. To je u slaganju s rezultatima iz publikacije Goyenecheae i sur. u kojoj se također navodi pojava novog oštrog pika pri 11,50 °.¹¹⁷ FT-IR ATR spektar smjese mljevene u čeličnim posudicama (slika D34) nije se značajno razlikovao od spektra smjese mljevene u posudicama od ZrO_2 , osim u položaju karakteristične vrpce NAB pri 1228 cm^{-1} ($\nu(CC)+\tau(HCOC)$) koja je u ovom slučaju uočena pri 1231 cm^{-1} . Položaji karakterističnih vrpce NAB u spektru produkta koji je dobiven koevaporacijom se nisu razlikovale u odnosu na spektar smjese dobivene mljevenjem u posudicama od ZrO_2 . Intenzitet tih vrpce ipak je drastično opao kao što je vidljivo na slici D35.

4.3.3. Karakterizacija smjese NAB:HP- β -CD u čvrstom stanju

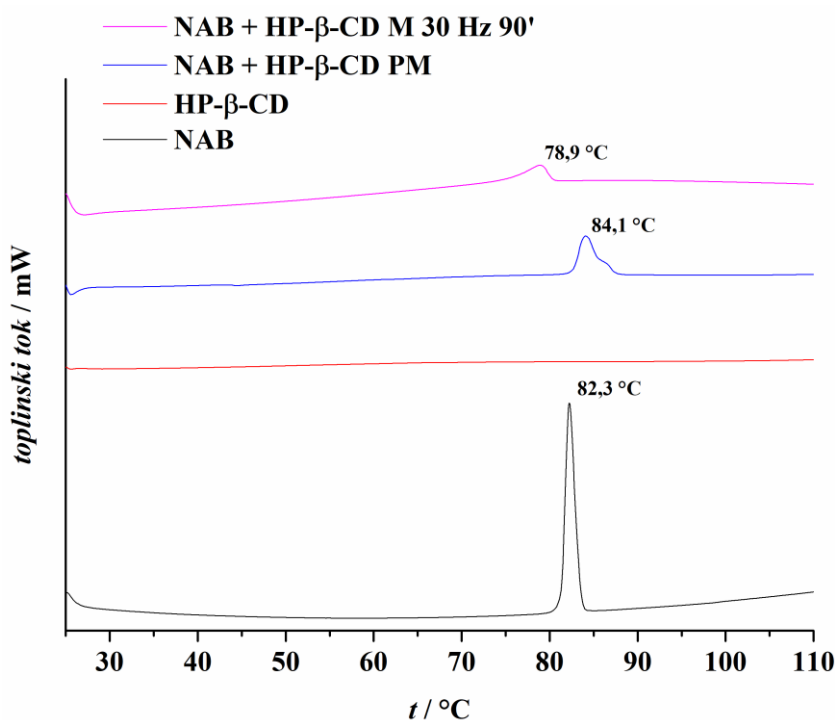
Mljevenje smjese NAB:HP- β -CD u posudicama od ZrO_2 pri jednakim uvjetima kao u slučaju smjese NAB: β -CD rezultiralo je tek djelomičnom amorfizacijom NAB pri čemu je *RDC* vrijednost nakon 120 min mljevenja iznosila čak 75,1 % (tablica D25). Signal taljenja NAB na DSC krivulji uzorka koji je mljeven ukupno 120 min opažen je pri 80,0 °C, što je izrazit pomak u odnosu na isti signal na DSC krivulji uzorka fizičke smjese NAB:HP- β -CD (84,1 °C). Takav fenomen se može protumačiti kao dokaz postojanja interakcija u čvrstoj fazi. Ipak, budući da je vrijednost stupnja kristalnosti NAB nakon mljevenja ostala relativno visoka smjesa

NAB:HP- β -CD podvrgnuta je mehanokemijskoj aktivaciji uz prilagodbu frekvencije mljevenja s 20 na 30 Hz. Izračunati udio zaostale kristalne frakcije NAB ukazuje kako je došlo do potpune amorfizacije NAB u mljevenom uzorku nakon 120 min mljevenja (tablica 26) što je bilo vidljivo pregledom DSC krivulja (slika D36) koje su snimane nakon različitih perioda mljevenja. Nakon 120 min dolazi do potpunog nestanka signala taljenja NAB.

Tablica 26. Izmjerene vrijednosti temperature početka signala taljenja (t_1), maksimuma signala taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) te izračunata vrijednost udjela zaostale kristalne faze NAB (RDC %) u čvrstom sustavu NAB:HP- β -CD nakon 120 min mljevenja u posudici od ZrO_2 pri 30 Hz.

Uzorak	$t_1 / ^\circ C$	$t_2 / ^\circ C$	$\Delta H / J g^{-1}$	$RDC / \%$
NAB	81,3	82,3	134,4	100,0
FIZIČKA SMJESA	82,7	84,1	136,3	101,4
SMJESA MLJEVENA 15 min	80,4	82,5	117,9	87,7
SMJESA MLJEVENA 30 min	78,1	80,2	113,2	84,2
SMJESA MLJEVENA 45 min	78,1	80,3	112,9	84,0
SMJESA MLJEVENA 60 min	77,7	80,4	91,3	67,9
SMJESA MLJEVENA 75 min	76,8	79,8	76,4	56,8
SMJESA MLJEVENA 90 min	75,4	78,9	66,1	49,2
SMJESA MLJEVENA 120 min	-	-	-	0,0

Ipak, mljevenje u ukupnom periodu od 120 min imalo je velik utjecaj na svojstva smjese NAB:HP- β -CD koja se u potpunosti stvrdnula uz stijenke posudice od ZrO_2 što je onemogućilo sakupljanje konačnog produkta. Mljevenje smjese NAB:HP- β -CD je stoga provedeno pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 90 min. Udio zaostale kristalne frakcije NAB iznosio je 49,2 %. Signal taljenja NAB na DSC krivulji uzorka koji je mljeven ukupno 90 min (slika 34) pomaknut je prema nižoj temperaturi (78,9 $^\circ C$) u odnosu na isti signal na DSC krivulji uzorka fizičke smjese (84,1 $^\circ C$).

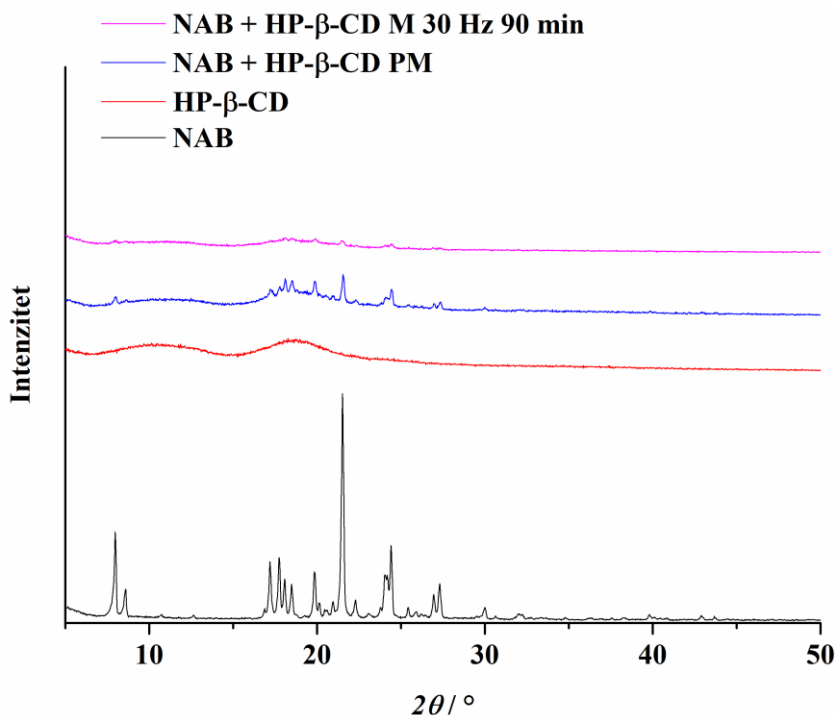


Slika 34. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), HP-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 90 min u posudicama od ZrO₂ (—).

Velik stupanj amorfizacije nabumetona uslijed mljevenja s HP-β-CD pri 30 Hz u trajanju od 90 min potvrđen je PXRD analizom. Usporedbom PXRD difraktograma fizičke smjese NAB:HP-β-CD i smjese mljevene 90 min jasno se uočava izostajanje karakterističnih pikova kristalnog NAB uslijed amorfizacije zbog utjecaja mljevenja (slika 35).

Dodatna karakterizacija ovog sustava provedena je FT-IR ATR analizom. Osim činjenice da u spektru mljevene smjese NAB:HP-β-CD dolazi do izrazitog opadanja intenziteta karakterističnih vrpca NAB, opaženi su i značajni pomaci u pozicijama nekih karakterističnih vrpca NAB i HP-β-CD (slika D37, tablica D26). Karakteristične vrpce NAB pri 1451 ($\delta(\text{HCH})+\delta(\text{HCC})$), 1362 ($\nu(\text{CC})$) i 1228 cm^{-1} ($\nu(\text{CC})+\tau(\text{HCOC})$) koje u spektru fizičke smjese ne mijenjaju poziciju, u spektru mljevene smjese javljaju se pri 1455, 1365 i 1231 cm^{-1} . Također, vrpce NAB pri 1159 ($\tau(\text{HCOC})$) i 1028 cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{O})$) se u spektru fizičke smjese preklapaju s karakterističnim vrpcama HP-β-CD pri 1153 ($\nu(\text{COC})+\nu(\text{CC})+\delta(\text{COC})$) i 1026 cm^{-1} ($\nu(\text{CC})+\delta(\text{OCH})+\delta(\text{CCH})+\delta(\text{CCO})$). U spektru fizičke smjese navedene vrpce nalaze se pri 1155 i 1028 cm^{-1} , dok u spektru mljevene smjese mijenjaju svoj položaj i nalaze se pri 1153 i 1030 cm^{-1} . Vrpce u spektru mljevene smjese svojih oblikom podsjećaju na spektar

samog makrocikla, dok je spektar fizičke smjese superpozicija komponenti, jednako kao u već opisanim spektrima smjesa NAB:β-CD.



Slika 35. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), HP-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 90 min u posudicama od ZrO₂ (—).

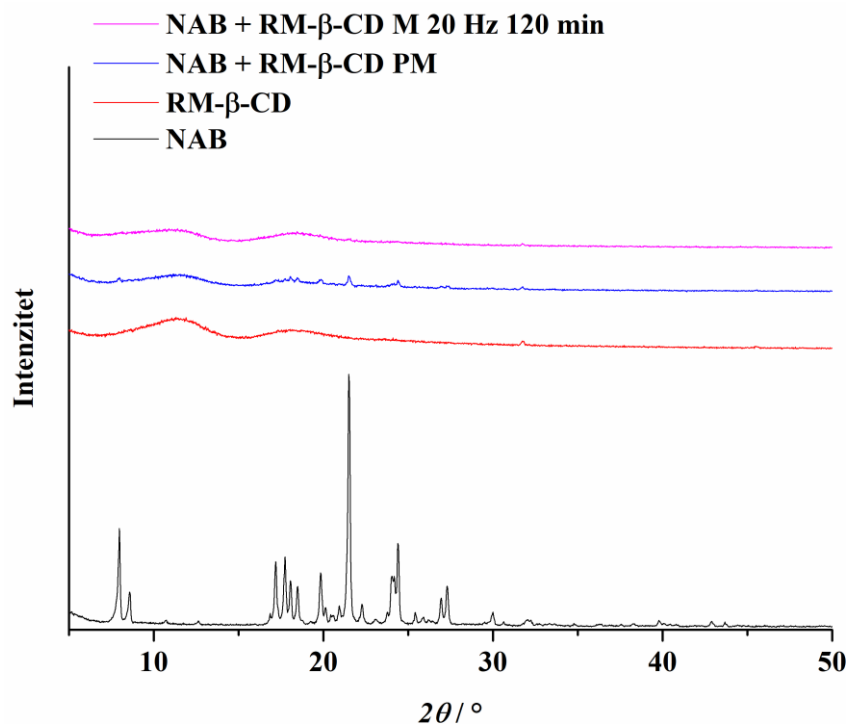
Mljevenje smjese u čeličnim posudicama pri 25 Hz u ukupnom trajanju od 30 min bilo je slične učinkovitosti kao mljevenje u posudicama od ZrO₂ pri nešto većoj frekvenciji u jednakom trajanju. Udio zaostale kristalne frakcije NAB iznosio je 76,6 %. S druge strane, priprema sustava NAB:HP-β-CD u čvrstom stanju koevaporacijom iz smjese etanola i H₂O pokazala se neučinkovitom. Izračunata *RDC* vrijednost za NAB iznosila je čak 96,9 %. Visok stupanj kristalnosti u ovom slučaju potvrđen je i PXRD analizom. DSC krivulje i PXRD difraktogrami navedenih sustava nalaze se u dodatku (slike D38, D39, D40 i D41).

Prilikom FT-IR ATR analize smjese koja je mljevena u čeličnim posudicama primijećene su već opisane spektralne promjene kao u slučaju smjese koja je mljevena u posudicama od ZrO₂. Ipak, pomaci karakterističnih vrpca NAB i HP-β-CD nisu bili toliko izraženi. Također, pad intenziteta karakterističnih vrpca NAB nije bio toliko intenzivan. U slučaju produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese etanola i H₂O spektralne promjene su bile još manje izražene. Primijećen je samo blagi pomak karakteristične vrpce NAB pri 1387 cm⁻¹ ($\delta(\text{HCH})$)

koja se u spektru fizičke smjese nalazila pri 1388 cm^{-1} , dok se u spektru navedenog produkta nalazila pri 1386 cm^{-1} . FT-IR ATR spektar smjese koja je mljevena u čeličnim posudicama se nalazi na slici D42, dok se spektar produkta dobivenog koevaporacijom iz smjese etanola i H_2O nalazi na slici D43. U oba su slučaja karakteristične vrpce NAB jasno vidljive u spektru. FT-IR ATR karakterizacija je u ovom slučaju potvrdila da je priprava sustava NAB:HP- β -CD u čvrstom stanju u posudicama od ZrO_2 pri primijenjenim uvjetima mljevenja bila učinkovitija od pripreve mljevenjem u čeličnim posudicama, a posebice od pripreve koevaporacijom iz smjese etanola i H_2O .

4.3.4. Karakterizacija smjesa NAB:RM- β -CD u čvrstom stanju

Signal taljenja NAB se na DSC krivulji uzoraka fizičke smjese NAB:RM- β -CD nalazi pri $79,5\text{ }^\circ\text{C}$, dok na krivuljama uzoraka koje su snimljene nakon 15, 30, 45, 60, 75, 90 i 120 min mljevenja u posudicama od ZrO_2 pri frekvenciji od 20 Hz u potpunosti izostaje (slika D44). Mljevenje smjese NAB:RM- β -CD rezultiralo je potpunom amorfizacijom NAB već nakon samo 15 min mljevenja. Potpuna amorfizacija NAB u uzorku smjese s RM- β -CD koja je mljevena 120 min potvrđena je PXRD analizom (slika 36).



Slika 36. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), RM-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (—).

Afinitet RM-β-CD za interakciju s NAB u čvrstom stanju potvrđen je i izračunom vrijednosti *RDC* NAB nakon DSC analize uzorka njihove fizičke smjese. Naime, vrijednost *RDC* je iznosila samo 63,3 % što upućuje na termički uvjetovanu interakciju između lijeka i RM-β-CD, a to ukazuje kako tehnike termičke analize nisu prikladne za karakterizaciju sustava NAB:RM-β-CD u čvrstom stanju. Takav fenomen opažen je i prilikom karakterizacije binarnih sustava lijeka zaleplona s RM-β-CD u čvrstom stanju.¹⁴⁹

Dodatna karakterizacija ovog sustava provedena je FT-IR ATR analizom. Osim činjenice da u spektru mljevene smjese NAB:RM-β-CD kao i u slučaju prethodno opisanih sustava s HP-β-CD dolazi do izrazitog opadanja intenziteta karakterističnih vrpca NAB, opaženi su i značajni pomaci u pozicijama nekih karakterističnih vrpca NAB i RM-β-CD (slika D45, tablica D27). Karakteristične vrpce NAB pri 1706 ($\nu(\text{C}=\text{O})$) i 1228 cm^{-1} ($\nu(\text{CC})+\tau(\text{HCOC})$) koje se u spektru fizičke smjese nalaze pri 1706, odnosno 1227 cm^{-1} , u spektru mljevene smjese pomiču se na 1707 i 1229 cm^{-1} . Također, vrpca NAB pri 1028 cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{O})$) se u spektru fizičke smjese preklapa s vrpcom RM-β-CD pri 1035 cm^{-1} ($\nu(\text{CC})+\delta(\text{OCH})+\delta(\text{CCH})+\delta(\text{CCO})$) pri čemu se uočavaju kao jedna vrpca pri 1032 cm^{-1} . U spektru mljevene smjese ta vrpca se uočava pri 1039 cm^{-1} . Svojstva smjese NAB:RM-β-CD mljevene u posudicama od ZrO₂ bitno su se

razlikovala u usporedbi s uzorcima smjese NAB: β -CD ili NAB:HP- β -CD koji su mljeveni pri jednakim eksperimentalnim uvjetima. Naime, smjesa NAB:RM- β -CD je već nakon 15 minuta mljevenja potpuno očvrsla što je otežavalo uzorkovanje. Daljnje mljevenje dodatno je pojačavalo takav učinak na svojstva smjese. Takva nepovoljna svojstva produkta mljevenja smjese NAB:RM- β -CD zbog kojih nije bilo moguće pripremiti dovoljne količine uzoraka za daljnju karakterizaciju ovih sustava onemogućila su procjenu saturacijske topljivosti i brzine *in vitro* otapanja kao i provođenje dugotrajnih stabilitetnih studija.

Mljevenje smjese NAB:RM- β -CD u čeličnim posudicama pri frekvenciji od 25 Hz u ukupnom trajanju od 30 min također je rezultiralo skoro potpunom amorfizacijom NAB što je moguće zaključiti nakon pregleda difraktograma koji je prikazan na slici D46. Iz njega je jasno vidljivo da uslijed mljevenja dolazi do skoro potpunog izostanka karakterističnih pikova kristalnog NAB. Udio preostale kristalne frakcije nije bilo moguće procijeniti na osnovu DSC analize iz krivulje koja je prikazana na slici D47 budući da je uslijed već spomenute termički uvjetovane interakcije između lijeka i RM- β -CD signal taljenja NAB u potpunosti izostao.

Priprava sustava NAB:RM- β -CD u čvrstom stanju koevaporacijom iz smjese etanola i H₂O pokazala se nedovoljno učinkovitom. Pregledom difraktograma koji je prikazan na slici D48 jasno je moguće utvrditi prisutnost karakterističnih pikova kristalnog NAB. Zanimljivo je da se i na DSC krivulji ovog produkta može uočiti signal taljenja NAB (slika D49) za razliku od prethodno dobivenih krivulja za uzorke fizičke smjese i mljevenih smjesa NAB:RM- β -CD. Udio zaostale kristalne frakcije NAB određen na temelju DSC analize iznosio je čak 75,4 % što je više i u usporedbi s *RDC* vrijednosti NAB u fizičkoj smjesi. Na temelju rezultata karakterizacije ovog produkta može se zaključiti kako su njegova svojstva bitno drugačija u usporedbi sa svojstvima fizičke smjese i mljevenih smjesa.

Prilikom FT-IR ATR analize smjese koja je mljevena u čeličnim posudicama (slika D50) primijećene su već opisane spektralne promjene kao u slučaju smjese koja je mljevena u posudicama od ZrO₂. Pomak karakteristične vrpce NAB pri 1706 cm⁻¹ (ν (C=O)) bio je nešto izraženiji u spektru smjese mljevene u posudicama od čelika te je ta vrpca uočena pri 1708 cm⁻¹. S druge strane, spektralne promjene u FT-IR ATR spektru produkta koji je dobiven koevaporacijom su bile nešto drugačije (slika D51). Opadanje intenziteta karakterističnih vrpca NAB u ovom slučaju nije bilo toliko izraženo, a primijećeni su i dodatni pomaci nekih vrpca. Naime, vrpca NAB pri 1485 cm⁻¹ (ν (C=C)) se u spektru fizičke smjese nalazila pri 1482 cm⁻¹, dok se u spektru produkta nalazila pri 1484 cm⁻¹. Pomak ove vrpce u spektrima mljevenih

produkata u odnosu na spektar fizičke smjese nije uočen. Također je uočen i drugačiji pomak već opisane vrpce pri 1032 cm^{-1} iz spektra fizičke smjese koja je rezultat preklapanja dvije vrpce NAB i RM- β -CD. Ona se u spektru produkta koji je dobiven koevaporacijom nalazila pri 1029 cm^{-1} , za razliku od spektra uzorka koji je dobiven mljevenjem u posudicama od ZrO_2 ili od čelika (1039 cm^{-1}).

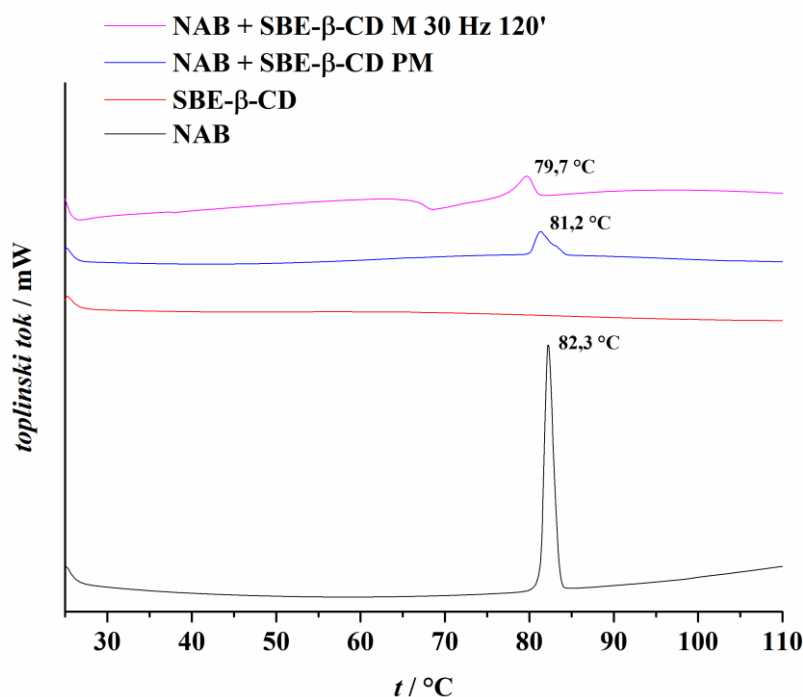
4.3.5. Karakterizacija smjesa NAB:SBE- β -CD u čvrstom stanju

Mljevenje smjese NAB:SBE- β -CD u posudicama od ZrO_2 pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min rezultiralo je tek djelomičnom amorfizacijom NAB pri čemu je RDC vrijednost nakon 120 min mljevenja iznosila čak 84,3 % (tablica D28). Signal taljenja NAB na DSC krivulji uzorka koji je mljeven ukupno 120 min opažen je pri $79,4\text{ }^\circ\text{C}$, što je značajan pomak u odnosu na isti signal na krivulji uzorka fizičke smjese NAB:SBE- β -CD ($81,2\text{ }^\circ\text{C}$). Takav fenomen se može protumačiti kao dokaz postojanja interakcija u čvrstoj fazi. Ipak, budući da je udio kristalne frakcije NAB nakon mljevenja ostao visok smjesa NAB:SBE- β -CD podvrgnuta je mehanokemijskoj aktivaciji uz prilagodbu frekvencije mljevenja s 20 na 30 Hz, slično kao i u već opisanom slučaju pripreme sustava NAB:HP- β -CD u čvrstom stanju. Povećavanje frekvencije mljevenja pogodovalo je dodatnoj amorfizaciji NAB u konačnom produktu (tablica 27), što je bilo vidljivo pregledom DSC krivulja (slika D52) koje su snimani nakon različitih perioda mljevenja.

Tablica 27. Izmjerene vrijednosti temperature početka signala taljenja (t_1), maksimuma signala taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) te izračunata vrijednost udjela zaostale kristalne faze NAB (RDC %) u čvrstom sustavu NAB:SBE- β -CD nakon 120 min mljevenja u posudici od ZrO_2 pri 30 Hz.

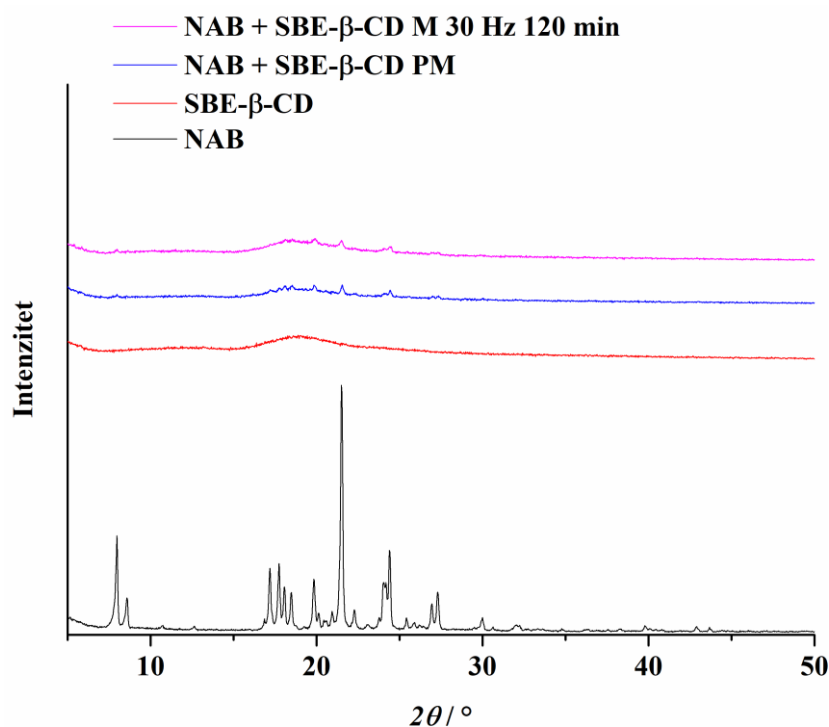
Uzorak	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
NAB	81,3	82,3	134,4	100,0
FIZIČKA SMJESA	80,0	81,2	123,1	91,6
SMJESA MLJEVENA 15 min	78,5	80,0	100,9	75,1
SMJESA MLJEVENA 30 min	80,0	81,8	107,4	79,9
SMJESA MLJEVENA 45 min	78,0	79,8	107,7	80,1
SMJESA MLJEVENA 60 min	78,1	80,2	106,1	78,9
SMJESA MLJEVENA 75 min	77,3	79,4	106,6	79,3
SMJESA MLJEVENA 90 min	77,0	79,2	91,9	68,4
SMJESA MLJEVENA 120 min	77,5	79,7	80,2	59,7

Udio kristalne frakcije NAB u konačnom produktu iznosio je 59,7 %. Signal taljenja NAB na DSC krivulji uzorka koji je mljeven ukupno 120 min (slika 37) pomaknut je prema nižoj temperaturi (79,7 °C) u odnosu na isti signal na krivulji uzorka fizičke smjese (81,2 °C).



Slika 37. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (–), SBE-β-CD (–), uzorka njihove fizičke smjese (–) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (–).

Djelomična amorfizacija NAB uslijed mljevenja uz prisutnost SBE-β-CD pri navedenim eksperimentalnim uvjetima potvrđena je i kasnijom PXRD analizom. Na slici 38 prikazana je usporedba difraktograma uzoraka polazne sirovine NAB, SBE-β-CD, njihove fizičke smjese i smjese koja je mljevena 120 min u posudicama od ZrO₂. Vidljiv je blagi pad intenziteta karakterističnih pikova NAB u difraktogramu mljevenog uzorka u odnosu na uzorak fizičke smjese.



Slika 38. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), SBE-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (—).

Dodatna karakterizacija ovog sustava provedena je FT-IR ATR analizom (slika D53, tablica D29). Slično kao u slučaju mljevenih smjesa NAB:HP-β-CD i NAB:RM-β-CD i u FT-IR ATR spektru mljevene smjese NAB:SBE-β-CD dolazi do primjetnog pada intenziteta većine karakterističnih vrpca NAB u odnosu na spektar analogne fizičke smjese. Uz to dolazi i do spektralnih promjena u vidu pomaka položaja vrpca. Naime, karakteristične vrpce NAB pri 1608 ($\nu(\text{C}=\text{C})$), 1387 ($\delta(\text{HCH})$) i 1362 cm^{-1} ($\nu(\text{CC})$) se u spektru fizičke smjese nalaze pri 1608, 1387 i 1363 cm^{-1} , dok se u spektru mljevene smjese nalaze pri 1610, 1389 i 1365 cm^{-1} . Također, vrpca pri 1031 cm^{-1} u spektru fizičke smjese koja je rezultat preklapanja karakterističnih vrpca NAB ($\nu(\text{C}-\text{O})$) i SBE-β-CD ($\nu(\text{CC})+\nu(\text{SO})+\delta(\text{OCH})+\delta(\text{CCH})+\delta(\text{CCO})$) se u spektru mljevene smjese pomiče za 10 cm^{-1} te se nalazi pri 1041 cm^{-1} .

Mljevenje smjese NAB:SBE-β-CD u posudicama od čelika pri 25 Hz u trajanju od 30 min se nije pokazalo učinkovitijim načinom pripreme. Udio kristalne frakcije NAB nakon 30 min iznosio je 71,6 %, slično kao i nakon mljevenja u jednakom trajanju uz korištenje posudica od ZrO₂. Na slikama D54 i D55 prikazane su usporedbe DSC krivulja i PXRD difraktograma polaznih sirovina NAB i SBE-β-CD te njihovih fizičkih i mljevenih smjesa. Iako se signal taljenja NAB na DSC krivulji mljevene smjese pomiče prema nižim temperaturama (79,7 °C)

u odnosu na isti signal na krivulji fizičke smjese (81,2 °C) udio kristalne frakcije NAB je još relativno velik, što potvrđuje i prisutnost karakterističnih pikova NAB u difraktogramu mljevene smjese.

Priprava sustava NAB:SBE- β -CD u čvrstom stanju koevaporacijom iz smjese etanola i H₂O se pokazala neznatno učinkovitijom u odnosu na mljevenje smjese u čeličnim posudicama i neučinkovitijom u odnosu na mljevenje smjese u posudicama od ZrO₂. Udio kristalne frakcije NAB iznosio je 66,7 %. Na slikama D56 i D57 prikazane su usporedbe DSC krivulja i PXRD difraktograma polaznih sirovina NAB i SBE- β -CD te njihove fizičke smjese i produkta dobivenog koevaporacijom. Signal taljenja NAB se na DSC krivulji produkta dobivenog koevaporacijom (83,6 °C) ne pomiče prema nižim temperaturama u odnosu na isti signal na krivulji fizičke smjese (81,2 °C), što je neuobičajeno kod čvrstih sustava u kojima postoje interakcije između CD i molekule gosta. Pregledom difraktograma istog produkta jasno je moguće uočiti vrlo intenzivne karakteristične pikove kristalnog NAB čime se dodatno potvrđuje neučinkovitost ovakvog načina pripreme sustava NAB:SBE- β -CD u čvrstom stanju. Smjesa mljevena u posudicama od čelika te produkt koevaporacije dodatno su okarakterizirani i FT-IR ATR analizom. U FT-IR ATR spektru smjese mljevene u čeličnim posudicama (slika D58) primijećene su slične spektralne promjene u odnosu na spektar fizičke smjese kao u prethodno opisanoj FT-IR ATR analizi smjese mljevene u posudicama od ZrO₂. Izostanak interakcije između NAB i SBE- β -CD u produktu koji je dobiven koevaporacijom iz smjese etanola i H₂O potvrđen je FT-IR ATR analizom (slika D59). Spektar produkta bio je identičan spektru fizičke smjese komponenti, osim u slučaju slabe promjene u poziciji vrpce pri 1031 cm⁻¹ iz spektra fizičke smjese koja se u spektru produkta dobivenog koevaporacijom nalazila pri 1035 cm⁻¹. Karakteristične vrpce NAB u spektru produkta dobivenog koevaporacijom nisu bile smanjenog intenziteta u odnosu na iste vrpce u spektru fizičke smjese.

4.3.6. Istraživanje brzine otapanja nabumetona *in vitro* iz smjesa s različitim β -CD

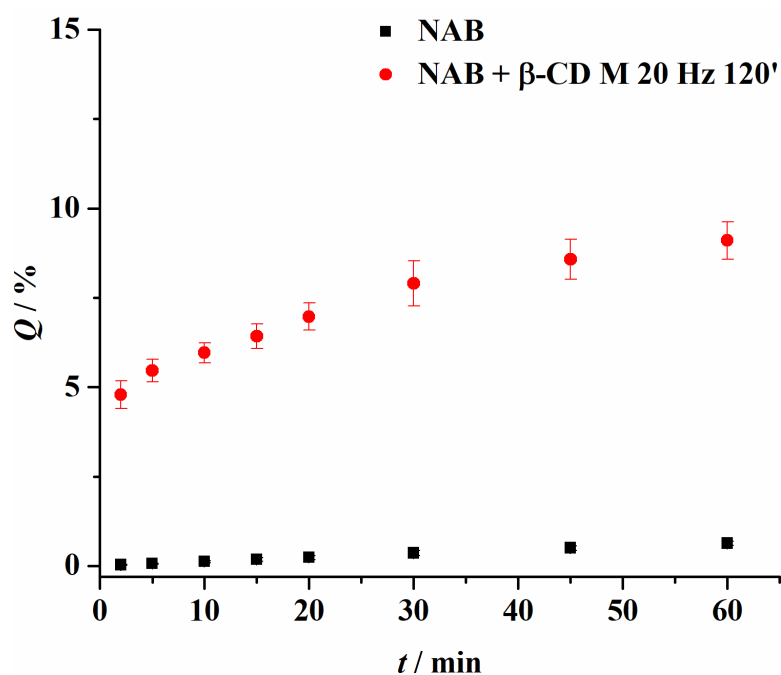
Brzina otapanja nabumetona iz uzoraka mljevenih smjesa istražena je u simuliranom želučanom mediju (pH = 1,2) pri 37 °C. Učinak mljevenja na oslobađanje NAB te učinak mljevenja s različitim β -CD vrednovan je na temelju izračuna faktora sličnosti, f_2 prema izrazu :

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ 100 \cdot \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \right\} \quad (14)$$

pri čemu n označava ukupan broj vremenskih točaka uzorkovanja prilikom eksperimenta, dok R_t i T_t označavaju srednju postotnu vrijednost otopljene količine lijeka iz referentnog, odnosno testnog sustava u nekoj vremenskoj točki t ($1 \leq t \leq n$). Usporedbu profila otapanja (oslobađanja), odnosno procjenu njihove ekvivalencije na temelju faktora sličnosti f_2 predložili su Moore i Flanner 1996. godine. Vrijednosti f_2 veće od 50 (50 – 100) ukazuju na ekvivalentnost dva profila otapanja, a razlika između otapanja lijeka iz referentnog i testnog sustava u svakoj vremenskoj točki je ≤ 10 %. Danas je ovakav način uspoređivanja profila otapanja referentnog i testnog sustava inkorporiran u smjernice koje predlažu EMA i USFDA.^{150,151}

Mljevenje samog NAB u posudicama od ZrO_2 nije imalo značajan utjecaj na brzinu i opseg njegovog otapanja. Usporedba profila otapanja uzorka netretiranog NAB i uzorka mljevenog u posudicama od ZrO_2 prikazana je grafički na slici D60. Vrijednost faktora sličnosti iznosila je $99,66 \pm 0,23$ % što ukazuje na ekvivalentnost ova dva profila otapanja. Kao što je već ranije opisano, mljevenje NAB u posudicama od ZrO_2 nije uzrokovalo njegovu značajnu amorfizaciju, stoga je i profil otapanja uzorka mljevenog NAB sličan profilu uzorka netretiranog NAB.

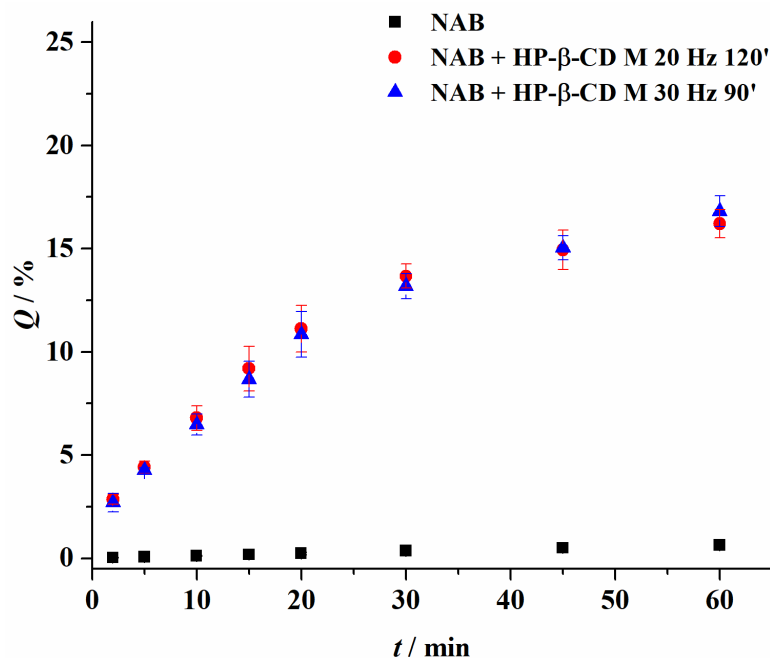
Prisutnost β -CD ili prisutnost njegovih derivata u mljevenim binarnim smjesama s NAB uvelike je utjecala na profil otapanja NAB. Na slici 39 prikazana je usporedba profil otapanja uzorka čistog NAB i uzorka smjese NAB: β -CD mljevene u posudicama od ZrO_2 .



Slika 39. *In vitro* profili otapanja polazne sirovine NAB (■) te uzorka smjese NAB: β -CD koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO_2 (●).

Iako poboljšano u odnosu na uzorke čistog NAB, njegovo otapanje iz mljevene smjese NAB: β -CD je i dalje sporo i nepotpuno pri čemu se nakon 60 minuta otopi manje od 10 % doze lijeka. Veću brzinu i opseg otapanja NAB u ovom slučaju moguće je objasniti njegovom djelomičnom amorfizacijom u prisutnosti β -CD tijekom procesa mljevenja te nastajanjem topljivog inkluzijskog kompleksa nakon otapanja lijeka. Unatoč bržem i opsežnijem otapanju NAB iz smjese NAB: β -CD vrijednost faktora sličnosti za usporedbu s profilom otapanja čistog NAB iznosila je $58,32 \pm 1,15$ što je relativno visoka vrijednost koja ukazuje na ekvivalentnost ova dva profila otapanja.

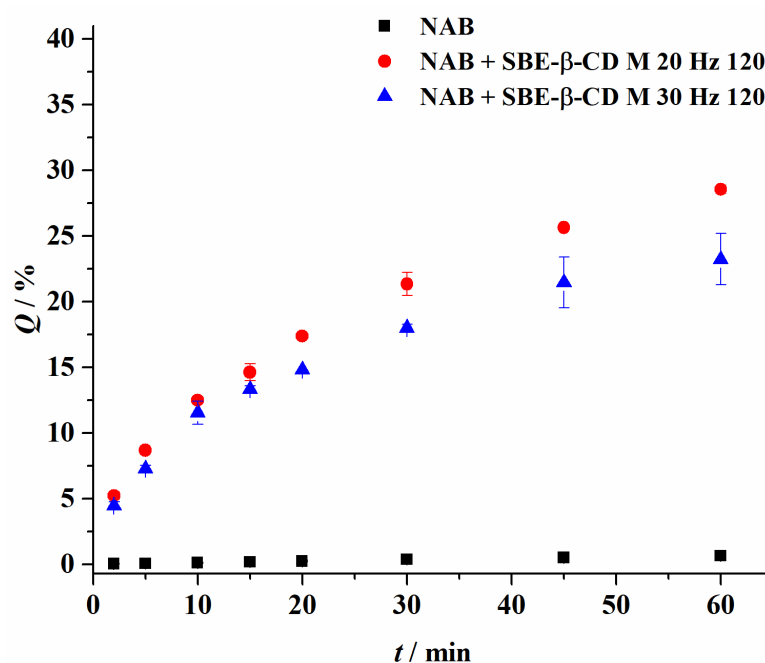
Na brzinu i opseg otapanja NAB iz binarnih smjesa s različitim β -CD značajan utjecaj imala je vrsta CD. Naime, derivati β -CD su višestruko povećavali brzinu i opseg otapanja NAB. Na slici 40 prikazana je usporedba profila otapanja čistog NAB i NAB u smjesama NAB:HP- β -CD mljevenih pri različitim uvjetima. Vrijednost faktora sličnosti za usporedbu profila otapanja čistog NAB i smjese NAB:HP- β -CD mljevene pri 20 Hz u trajanju od 120 min iznosila je $48,61 \pm 0,76$, dok je za smjesu mljevenu pri 30 Hz u trajanju od 90 min iznosila $48,74 \pm 0,16$. Profili otapanja smjesa NAB:HP- β -CD koje su mljevene pri različitim uvjetima su ekvivalentni jer vrijednost njihovog faktora sličnosti iznosi $93,90 \pm 3,38$.



Slika 40. *In vitro* profili otapanja polazne sirovine NAB (■) te uzoraka smjese NAB:HP- β -CD koje su mljevene pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min (●) i pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 90 min u posudicama od ZrO₂ (▲).

Sličan, odnosno nešto veći stupanj amorfizacije NAB nakon mljevenja u prisutnosti HP- β -CD u usporedbi s β -CD, kao i veća topljivost navedenog derivata u usporedbi s nativnim CD rezultirali su većom brzinom i opsegom otapanja.

Najveći utjecaj na brzinu i opseg otapanja NAB imala je prisutnost SBE- β -CD tijekom procesa mljevenja. Vrijednost faktora sličnosti za usporedbu profila otapanja čistog NAB i smjese NAB:SBE- β -CD mljevene pri 20 Hz u trajanju od 120 min iznosila je $37,13 \pm 0,05$, dok je za smjesu mljevenu pri 30 Hz u trajanju od 120 min iznosila $40,87 \pm 0,87$. Na slici 41 prikazana je usporedba profila otapanja čistog NAB i NAB u smjesama NAB:SBE- β -CD mljevenih pri različitim uvjetima. Iako je mljevenje pri višim frekvencijama u prisutnosti SBE- β -CD rezultiralo značajno većim stupnjem amorfizacije NAB kao što je već ranije objašnjeno u ovoj disertaciji, brzina i opseg otapanja NAB su bili nešto veći u slučaju smjese koja je mljevena pri nižoj frekvenciji. Ipak, profili otapanja smjesa NAB:SBE- β -CD koje su mljevene pri različitim uvjetima značajno se ne razlikuju jer vrijednost njihovog faktora sličnosti iznosi $75,42 \pm 4,49$.



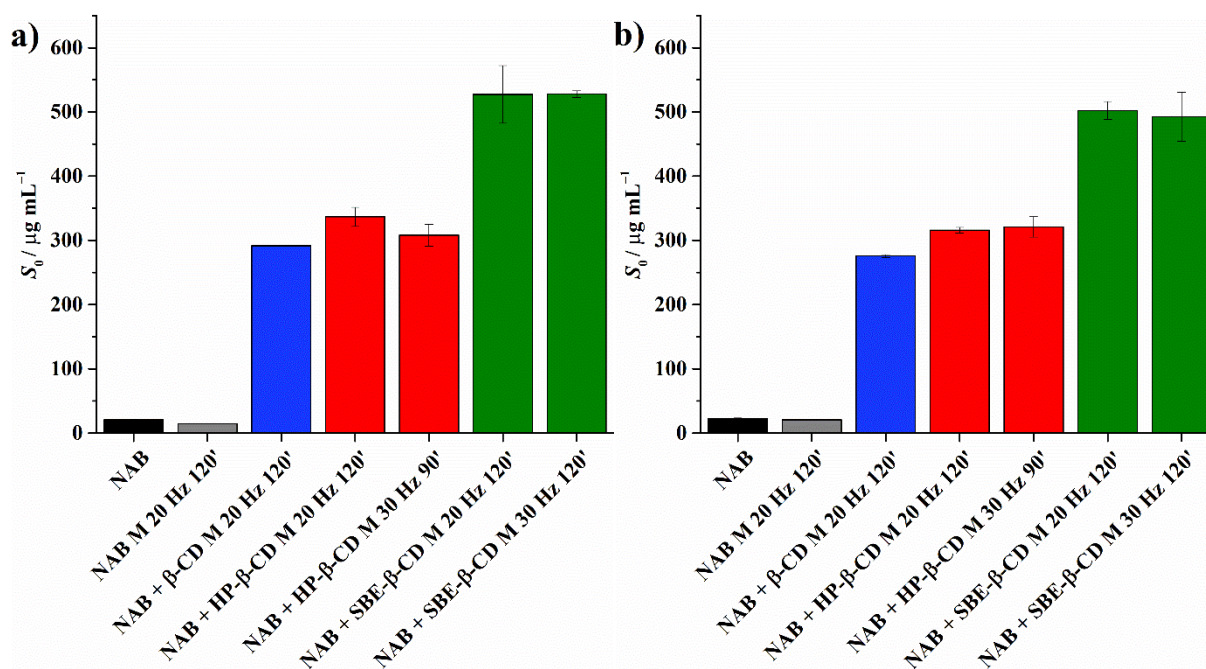
Slika 41. *In vitro* profili otapanja polazne sirovine NAB (■) te uzoraka smjese NAB:SBE- β -CD koje su mljevene pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min (●) i pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (▲).

Rezultati izračuna vrijednosti faktora sličnosti f_2 između profila otapanja čistog, netretiranog NAB i profila otapanja mljevenih smjesi NAB s različitim β -CD prikazani su i u tablici 28.

Tablica 28. Vrijednosti faktora sličnosti f_2 za usporedbe profila otapanja NAB s profilima otapanja mljevenih smjesi NAB i različitih β -CD.

		NAB/NAB: β -CD	NAB/NAB:HP- β -CD	NAB/NAB:SBE- β -CD
f_2 / %	20 Hz	$58,32 \pm 1,15$	$48,61 \pm 0,76$	$37,13 \pm 0,05$
	30 Hz	-	$48,74 \pm 0,16$	$40,87 \pm 0,87$

Rezultati istraživanja brzine otapanja *in vitro* bili su u skladu s rezultatima koji su dobiveni prilikom određivanja saturacijske topljivosti mljevenih smjesa NAB s različitim β -CD u simuliranom želučanom mediju. Mljevenje samog NAB nije utjecalo na njegovu topljivost ($22,70 \pm 0,96 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok je mljevenje u prisutnosti različitih β -CD višestruko poboljšavalo topljivost NAB. Najveće povećanje topljivosti utvrđeno je za mljevene smjese NAB:SBE- β -CD, a topljivost NAB opada u nizu NAB:SBE- β -CD > NAB:HP- β -CD > NAB: β -CD > NAB M \approx NAB. Promjene parametara mljevenja u slučaju smjesi NAB:SBE- β -CD i NAB:HP- β -CD nisu imale utjecaja na konačnu topljivost NAB. Ravnotežnu topljivost NAB je dosežao nakon 24 h u svim slučajevima. Rezultati istraživanja saturacijske topljivosti prikazani su grafički na slici 42 te u tablici 29.



Slika 42. Rezultati istraživanja saturacijske topljivosti nakon a) 24 h i b) 48 h za uzorak netretiranog NAB (■) te za uzorke NAB (■), NAB:β-CD (■), NAB:HP-β-CD (■) i NAB:SBE-β-CD (■) mljevene u posudicama od ZrO₂.

Tablica 29. Vrijednosti saturacijske topljivosti izmjerene nakon 48 h za uzorak NAB te za uzorke NAB, NAB:β-CD, NAB:HP-β-CD i NAB:SBE-β-CD mljevene u posudicama od ZrO₂.

		NAB M	NAB:β-CD	NAB:HP-β-CD	NAB:SBE-β-CD
$S / \mu\text{g mL}^{-1}$	20 Hz	$20,69 \pm 0,16$	$275,77 \pm 2,37$	$315,88 \pm 4,31$	$502,33 \pm 13,93$
	30 Hz	-	-	$321,11 \pm 15,83$	$492,71 \pm 38,16$

S obzirom na prikazane rezultate koji su u dobrom slaganju s rezultatima solubilizacijskih istraživanja može se zaključiti kako bi binarni sustavi NAB pripremljeni mljevenjem s HP-β-CD ili SBE-β-CD mogli imati velik potencijal za razvoj i primjenu novog terapijskog oblika NAB s poboljšanim svojstvima.

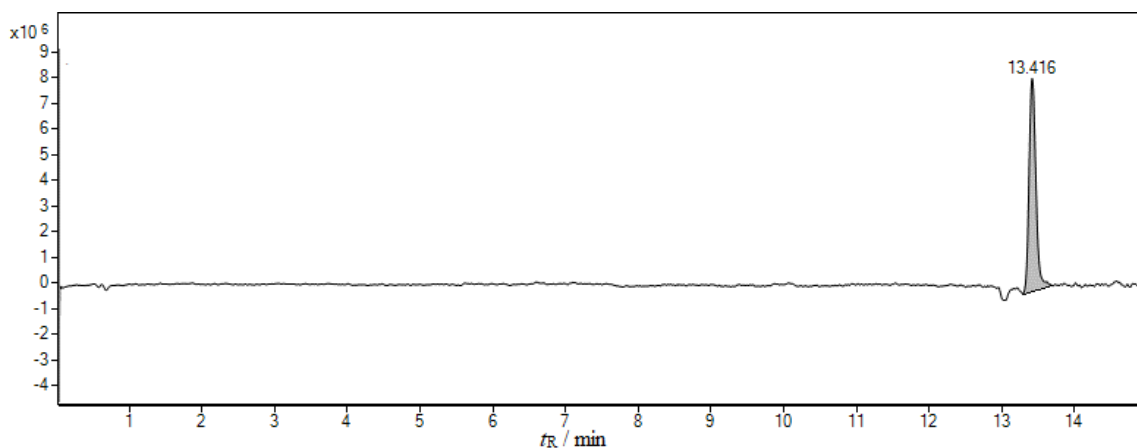
4.4. Utjecaj različitih β -CD na stabilnost nabumetona

Budući da prisutnost CD može imati pozitivan ili negativan utjecaj na stabilnost farmakološki aktivnih tvari u sklopu ove doktorske disertacije provedene su opsežne dugotrajne stabilitetne studije prema spomenutim smjernicama iz poglavlja Q1A(R2), kao i procjena fotostabilnosti uzoraka NAB i njegovih mljevenih binarnih smjesa s različitim β -CD prema smjernicama iz poglavlja Q1B koje propisuje ICH. Na temelju provedene karakterizacije smjesa NAB s različitim β -CD u čvrstom stanju za podvrgavanje stabilitetnim studijama odabrani su uzorci netretiranog NAB, mljevenog NAB, smjese NAB: β -CD mljevene pri 20 Hz te smjesa NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD koje su mljevene pri 30 Hz u posudicama od ZrO₂. Kako bi navedeni uzorci bili pravilno analizirani najprije je bilo potrebno razviti kromatografsku UHPLC-DAD metodu koja osigurava nedvojbeno kvantitativno određivanje NAB u prisutnosti različitih β -CD. Metoda je validirana prema smjernicama iz poglavlja Q2(R1) i Q2(R2) koje propisuje ICH. Konačni validacijski parametri prikazani su u tablici D30.

4.4.1. Studije prisilne razgradnje na NAB i odabranim NAB: β -CD sustavima

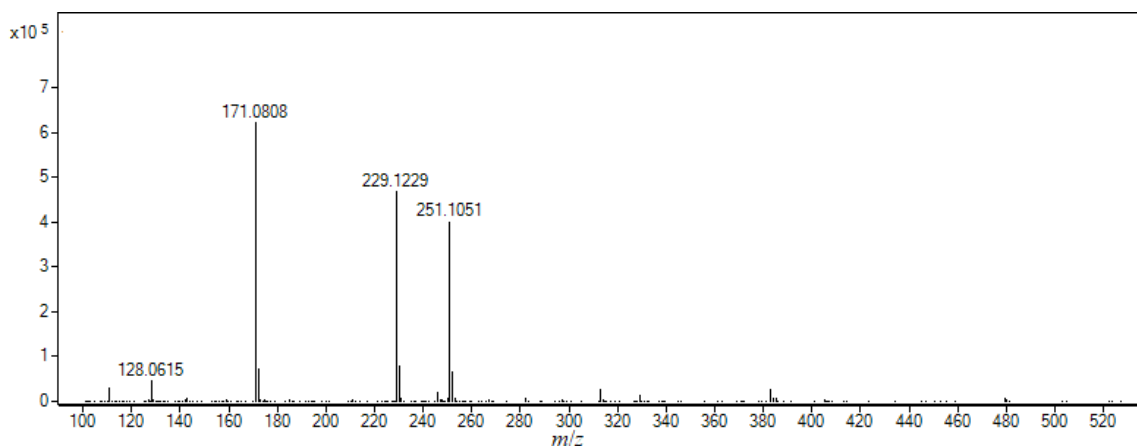
Provođenje studija prisilne razgradnje jedan je od ključnih dijelova ukupnog procesa razvoja lijekova ili novih terapijskih oblika čime se dobiva uvid u intrinzičnu stabilnost lijeka, ali je i osnova pravilnog razvoja i validacije prikladne kromatografske metode za kvantitativno određivanje lijeka. Glavni cilj ovakvih studija je u kratkom periodu generirati razgradne produkte koji se potencijalno mogu pojaviti tijekom proizvodnje, skladištenja ili primijene lijeka. Na ovaj način provjerava se i selektivnost kromatografske metode kojom bi se trebali moći kvantitativno odrediti svi razgradni produkti koji nastaju tijekom dugotrajnih stabilitetnih studija.¹⁵² Sve veće regulatorne zahtjeve za kontrolom nečistoća i razgradnih produkata lijekova paralelno prati i napredak u razvoju instrumentalnih tehnika za karakterizaciju razgradnih produkata pri čemu se danas koriste moderne *on-line* izvedbe različitih spregnutih sustava poput GC-MS, LC-MS, CE-MS, SFC-MS, LC-NMR, LC-FT-IR itd.¹⁵³ Ipak, između prethodno nabrojanih sustava, spregnuti sustavi LC-MS se zbog svoje osjetljivosti danas smatraju tehnikom od izbora za nedvosmislenu strukturnu karakterizaciju razgradnih produkata i nečistoća lijekova.¹⁵⁴ U ovoj doktorskoj disertaciji stoga je provedena opsežna strukturna karakterizacija korištenjem UHPLC-HRMS tehnike uz eksperimente tandemne spektrometrije masa (MS/MS) tehnikom CID.

Na slici 43 prikazan je kromatogram ukupne ionske struje (engl. *total ion current chromatogram*, TIC) jednog od kontrolnih uzoraka NAB. Vrijeme zadržavanja NAB iznosilo je 13,4 min.



Slika 43. Kromatogram ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB.

Kromatografski pik pri 13,4 min karakterizira MS spektar prikazan na slici 44, a u kojem je moguće identificirati veći broj signala (tablica 29).



Slika 44. MS spektar NAB ($t_R = 13,4$ min).

Kao bazni signal u ovom MS spektru ističe se signal iona pri m/z 171,0808 koji je posljedica fragmentacije unutar ionskog izvora (engl. *in-source fragmentation*, ISF). Signali pri m/z 229,1229 i 251,1051 pripisani su jednostruko protoniranom molekulskom ionu NAB, odnosno njegovom aduktu s Na^+ . Signal pri m/z 128,0615 je kao i 171,0808 pripisan ISF. Riječ je o kationskom radikalju naftalena kojeg su ranije opisali West i sur.¹⁵⁵ Nastajanje kationskih

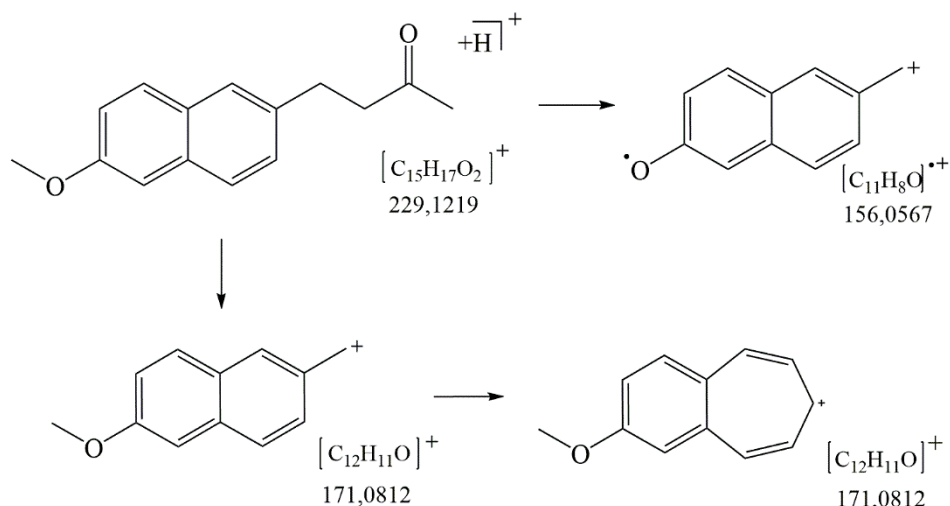
radikala uobičajeno je pri ionizaciji elektronima, ali je također moguće prilikom fragmentiranja iona tehnikom CID uz prethodnu ionizaciju elektroraspršenjem. Procesom elektroraspršenja nastaju ioni parnog broja elektrona (engl. *even-electron ion*, EE^+), koji mogu biti protonirani $[M+H]^+$, deprotonirani $[M-H]^-$ i/ili ioni adukata npr. $[M+Na]^+$. Općenito, nakon fragmentacije EE^+ nastaje novi kation s parnim brojem elektrona i neutralna molekula. Međutim, postoji manja vjerojatnost cijepanja uz gubitak radikala pri čemu nastaje kationski radikal, odnosno ion s neparnim brojem elektrona (engl. *odd-electron ion*, OE^{*+}). Nastali OE^{*+} mora biti stabilan, što ovisi o njegovoj strukturi i mogućnosti rezonancijske stabilizacije slobodnog elektrona.¹⁵⁶ Odstupanje monoizotopnih (točnih) od izmjerenih (eksperimentalnih) m/z izračunato je prema izrazu:

$$\text{Odstupanje (ppm)} = \frac{m/z_{\text{teor.}} - m/z_{\text{exp.}}}{m/z_{\text{teor.}}} \cdot 10^6 \quad (15)$$

Tablica 30. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru NAB ($t_R = 13,4$ min).

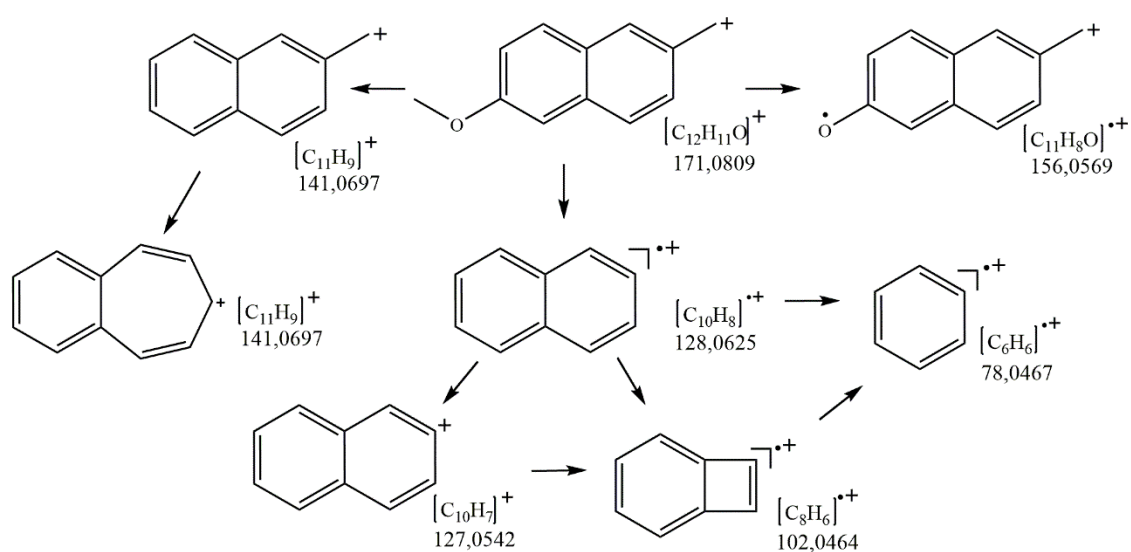
Izmjeren m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
479,2190	479,2193	0,63	1,86	$[2M+Na]^+$
251,1051	251,1043	3,38	64,54	$[M+Na]^+$
229,1229	229,1223	2,59	75,46	$[M+H]^+$
171,0808	171,0804	2,10	100	$[M+H-58]^+$
128,0615	128,0621	-4,31	7,69	$[C_{10}H_8]^{*+}$

Kako bi se karakteristični ioni NAB strukturno okarakterizirali provedena je analiza tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) na ionima m/z 229,1229, 171,0808 i 128,0615 pri različitim kolizijskim potencijalima. Na slikama D61 i D62 prikazani su njihovi MS/MS spektri snimljeni pri kolizijskom potencijalu od 10, odnosno 20 V. Tablični prikaz svih MS/MS spektara ova dva iona nalazi se u tablicama D31 i D32. Sheme fragmentiranja ova dva iona prikazane su na slikama 45 i 46.



Slika 45. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona NAB (m/z 229,1229).

Kao što je već rečeno, signal iona m/z 171,0808 uočen je u MS spektru nabumetona kao bazni signal, te u MS/MS spektrima jednostruko protoniranog iona NAB (m/z 229,1229) čime je potvrđeno kako se radi o ISF.

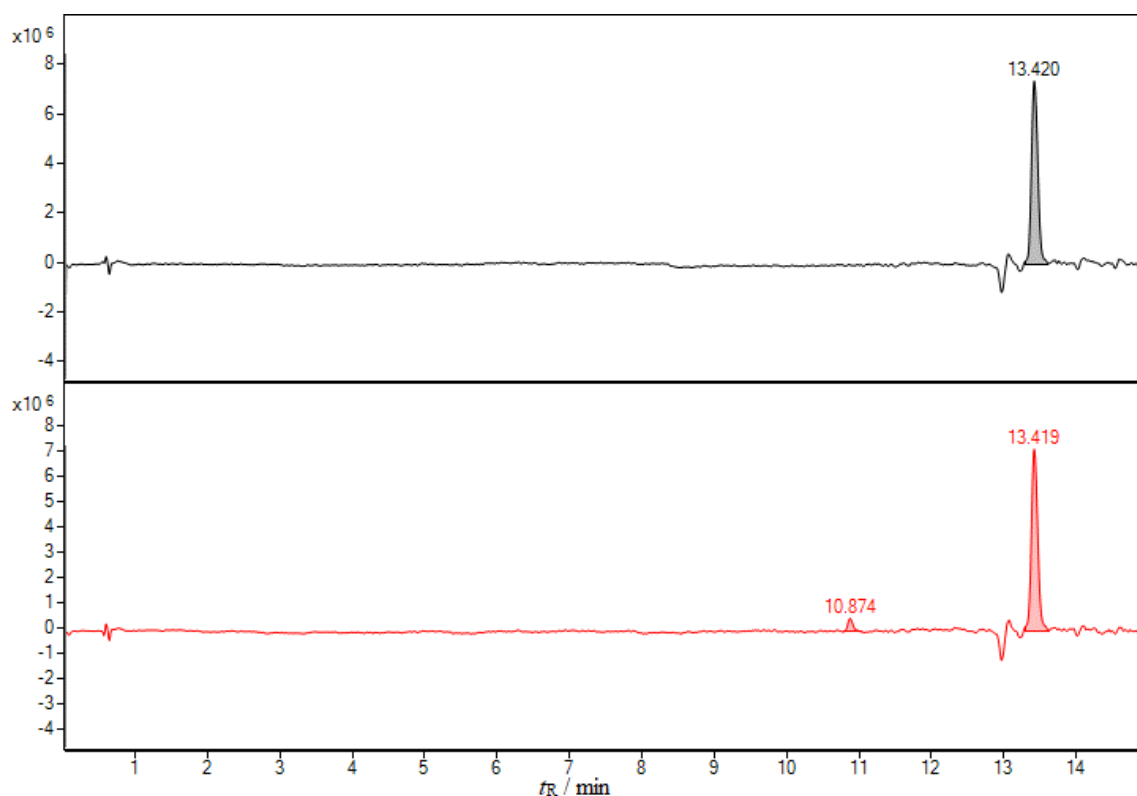


Slika 46. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 171,0808.

Prilikom MS/MS analize iona m/z 171,0808 dolazilo je do nastajanja nekoliko kationskih radikala uz već spomenuti ion 128,0625. Kationski radikal m/z 102,0464, čija je struktura također predložena u već spomenutoj publikaciji West i sur.¹⁵⁵, nastaje gubitkom C_2H_2 i formiranjem četveročlanog prstena iz m/z 127,0542 i/ili iz m/z 128,0625. Ion pri m/z 78,0467 fenilni je kationski radikal.

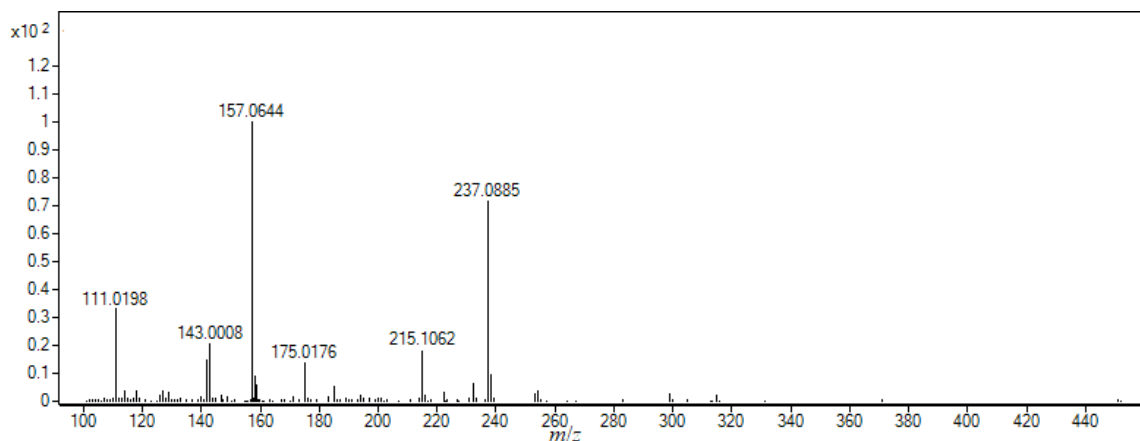
4.4.1.1. Studije prisilne hidrolitičke razgradnje u kiselom mediju

Nabumeton se pokazao osjetljivim pri kiselim hidrolitičkim uvjetima. Na slikama 47 i D63 prikazane su usporedbe TIC kromatograma kontrolnih uzoraka netretiranog NAB i mljevenog NAB s TIC kromatogramima uzoraka podvrgnutih razgradnji.



Slika 47. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB (–) i uzorka podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (–).

Uz kromatografski pik NAB s vremenom zadržavanja od 13,4 min u kromatogramu se uočava dodatni kromatografski pik razgradnog produkta 1 (DP1) s vremenom zadržavanja od 10,9 min. MS spektar ovog razgradnog produkta NAB prikazan je na slici 48 i u tablici 31, a karakterizira ga veći broj signala. Signal pri m/z 215,1062 pripisan je jednostruko protoniranom molekulskom ionu razgradnog produkta, $[M+H]^+$, dok je signal m/z 237,0885 pripisan aduktu natrija. Ovaj spoj je također karakteriziran pojavom ISF fragmenta poput m/z 157,0644 što je i dokazano kasnijom MS/MS analizom. Upravo je ovaj signal bazni signal ovog MS spektra.

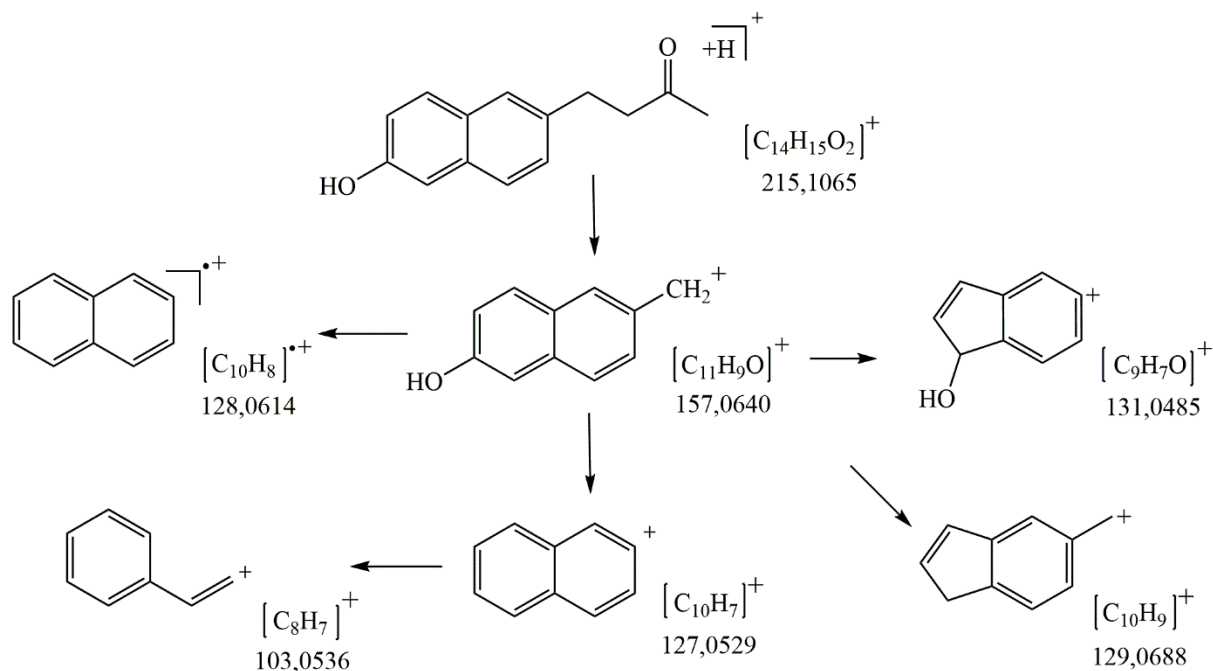


Slika 48. HRMS spektar DP1 ($t_R = 10,9$ min).

Tablica 31. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru DP1 ($t_R = 10,9$ min).

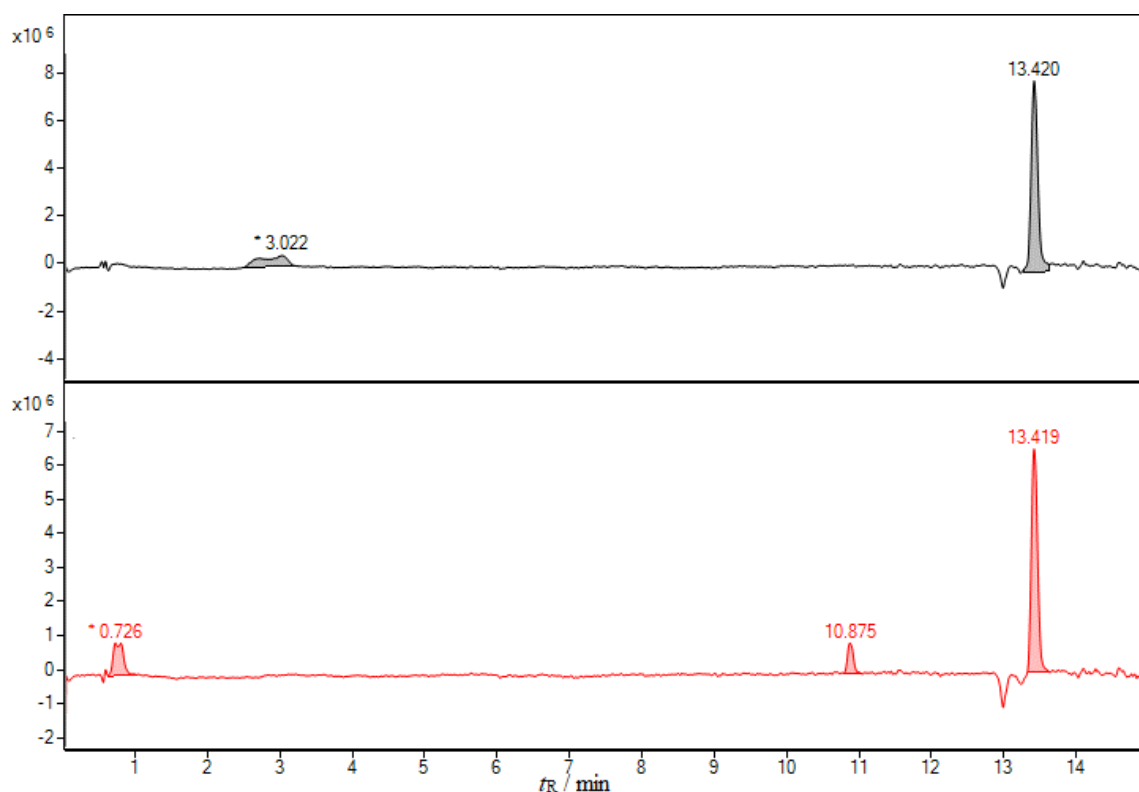
Izmjeren m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
237,0885	237,0886	0,42	71,45	$[M+Na]^+$
215,1062	215,1067	2,32	18,23	$[M+H]^+$
157,0644	157,0648	2,55	100	$[M+H-58]^+$

Ion pri m/z 215,1067 podvrgnut je MS/MS analizi. Na slici D64 prikazan je njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 10 V, dok su svi MS/MS spektri prikazani u tabličnom obliku (tablica D33). Ion pri m/z 157,0644 također je podvrgnut MS/MS analizi. Njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 20 V prikazan je na slici D65. Shema fragmentiranja DP1 prikazana je na slici 49.



Slika 49. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona DP1 (m/z 215,1062).

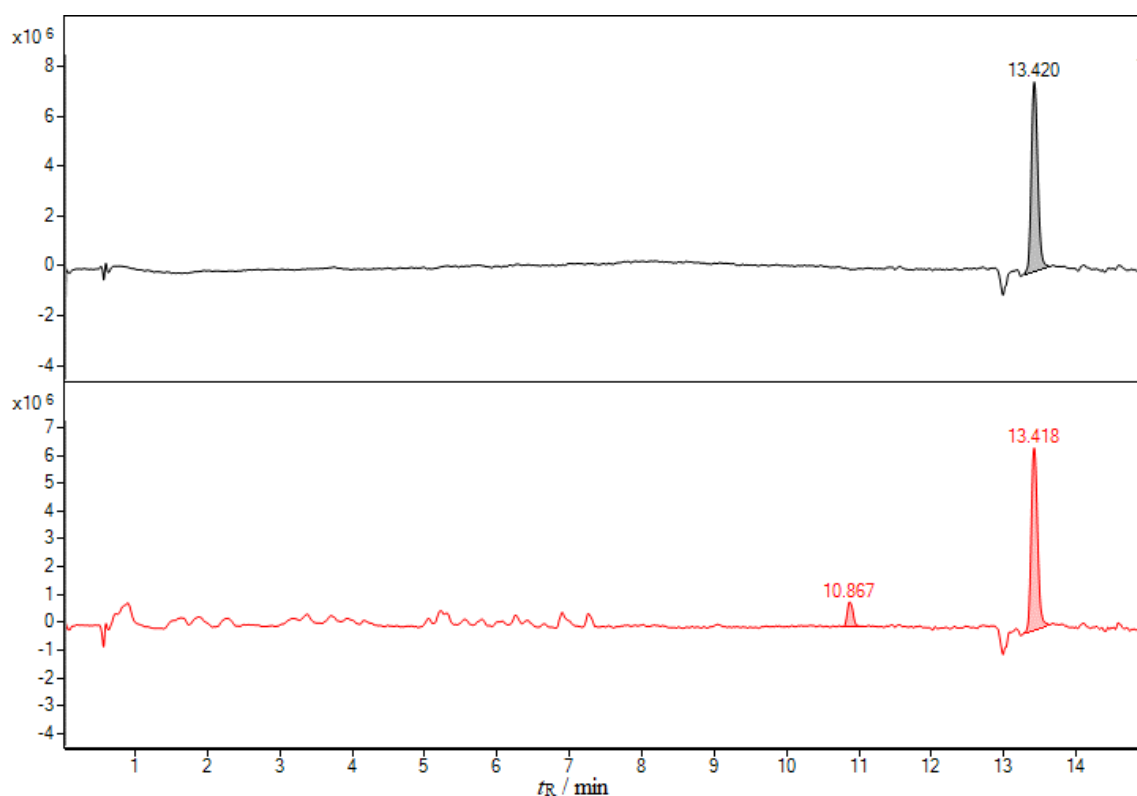
Nastajanje DP1 uočeno je i u slučaju podvrgavanja uzoraka NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD te NAB:SBE- β -CD hidrolitičkoj razgradnji u kiselom mediju. Na slici 50 prikazana je usporedba TIC kromatograma kontrolnog uzorka mljevene smjese NAB: β -CD te uzorka koji je podvrgnut hidrolitičkoj razgradnji. U kromatogramu kontrolnog uzorka uz uobičajeni kromatografski pik NAB s vremenom zadržavanja od 13,4 min, uočava se i vrlo raširen kromatografski pik s vremenom zadržavanja od 3,0 min. Taj kromatografski pik pripada β -CD budući da MS spektre ovog pika karakteriziraju signali pri m/z 1135,3766 $[\beta\text{-CD}+H]^+$, 595,1533 $[\beta\text{-CD}+CH_3OH+Na+H]^{2+}$ te 587,1661 $[\beta\text{-CD}+K+H]^{2+}$. U kromatogramu uzorka NAB: β -CD koji je podvrgnut hidrolitičkoj razgradnji u kiselom mediju uočava nešto širi kromatografski pik s vrlo niskim vremenom zadržavanja od 0,7 min. Njega karakteriziraju MS signali pri m/z 217,0696 i 411,1482 koji su rezultat hidrolitičke razgradnje β -CD. Naime, glikozidna veza je podložna hidrolizi u kiselim uvjetima.¹⁵⁷ Struktura ovog razgradnog produkta β -CD prikazana je na slici D66. Navedeni signali iz MS spektra pripisani su aduktu s Na^+ te dimeru razgradnog produkta u obliku adukta s Na^+ .



Slika 50. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:β-CD (–) i uzorka NAB:β-CD podvrgnutog kiseljoj hidrolitičkoj razgradnji (–).

Uz već spomenuti DP1 prilikom razgradnje uzorka NAB:HP-β-CD nastao je veći broj razgradnih produkata pri čemu je uočeno koeluiranje većeg broja kromatografskih pikova. Na slici 51 prikazana je usporedba TIC kromatograma kontrolnog uzorka mljevene smjese NAB:HP-β-CD te uzorka koji je podvrgnut hidrolitičkoj razgradnji. Kako bi se sa sigurnošću moglo utvrditi koji razgradni produkti su posljedica razgradnje samog NAB dodatnoj hidrolitičkoj razgradnji je podvrgnut i uzorak čistog HP-β-CD pri čemu je njegova koncentracija bila ekvivalentna koncentraciji u uzorku NAB:HP-β-CD. Primijećeno je da je HP-β-CD nešto podložniji razgradnji u prisutnosti NAB. Na slici D67 prikazana je usporedba TIC kromatograma uzoraka NAB:HP-β-CD i HP-β-CD. Signali razgradnih produkata HP-β-CD koji su nastali uslijed hidrolitičke razgradnje u oba slučaja bili su: m/z 243,0831, 261,0956, 301,1255, 319,1360. Signali razgradnih produkata HP-β-CD koji su nastali samo u slučaju hidrolitičke razgradnje uzorka NAB:HP-β-CD bili su: m/z 275,1100 i 333,1513. Na slikama D68, D69, D70, D71, D72 i D73 prikazani su kromatogrami iona odabranih vrijednosti m/z (engl. *extracted ion chromatogram*, EIC) navedenih iona. Nedvojbeno strukturalna karakterizacija produkata hidrolitičke razgradnje HP-β-CD gotovo je nemoguća jer je sam

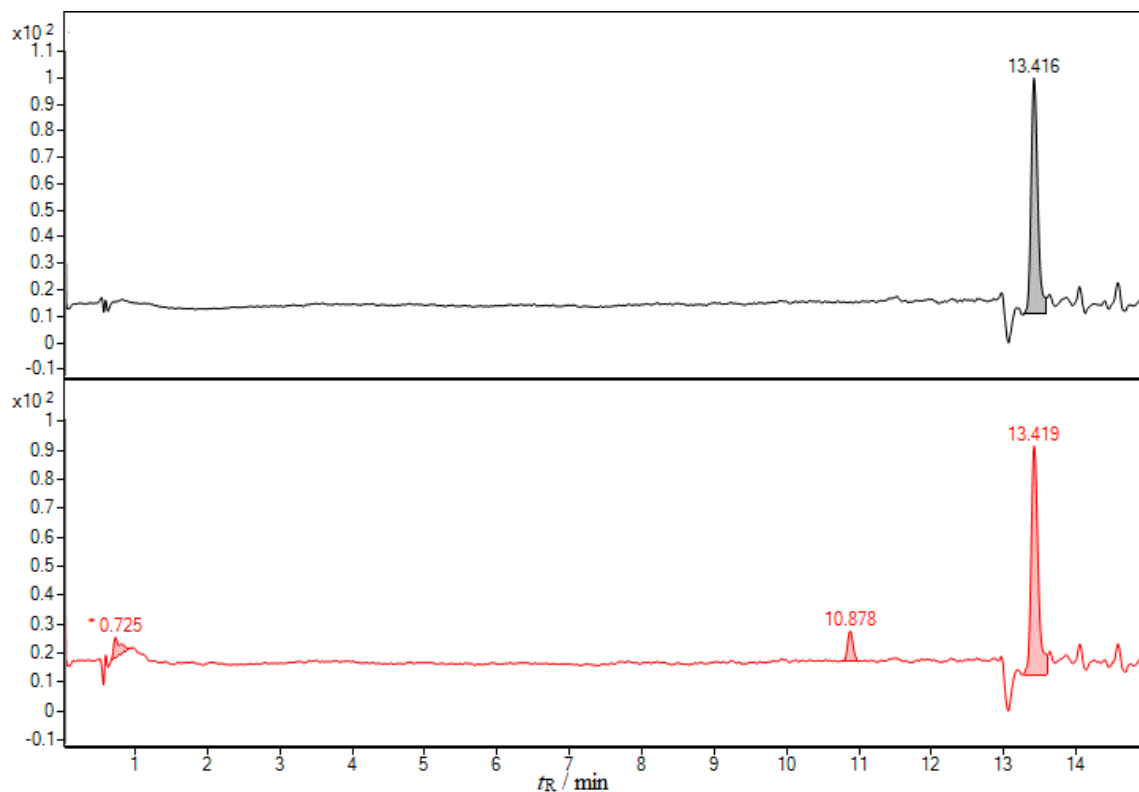
HP- β -CD smjesa stotina tisuća izomernih vrsta. Ipak, na osnovu rezultata prijašnjih HPLC-MS analiza kao i teorijskih studija može se zaključiti kako su njegovi razgradni produkti hidroksipropilirani linearni maltooligomeri.¹⁵⁷ Prijedlozi struktura razgradnih produkata HP- β -CD opaženih tijekom eksperimenata kisele hidrolitičke razgradnje u sklopu ove doktorske disertacije dani su na slici D74. Uglavnom se radilo o hidroksipropiliranim glukopiranoznim podjedinicama. MS/MS analiza iona navedenih produkata razgradnje je bila otežana budući da se radilo o strukturama stabiliziranim s Na^+ , dok signali protoniranih vrsti nisu bili prisutni u MS spektrima. MS analiza provedena je i uz negativan način ioniziranja elektroraspršenjem, međutim signali razgradnih produkata nisu uočeni u kromatogramima ukupne ionske struje.



Slika 51. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:HP- β -CD (–) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiselj hidrolitičkoj razgradnji (–).

Na slici 52 prikazana je usporedba TIC kromatograma kontrolnog uzorka mljevene smjese NAB:SBE- β -CD te uzorka koji je podvrgnut hidrolitičkoj razgradnji. Uz već spomenuti DP1 prilikom razgradnje uzorka NAB:SBE- β -CD nastao je i razgradni produkt CD čiji se kromatografski pik uočava pri vremenu zadržavanja od 0,7 min. Ovaj kromatografski pik

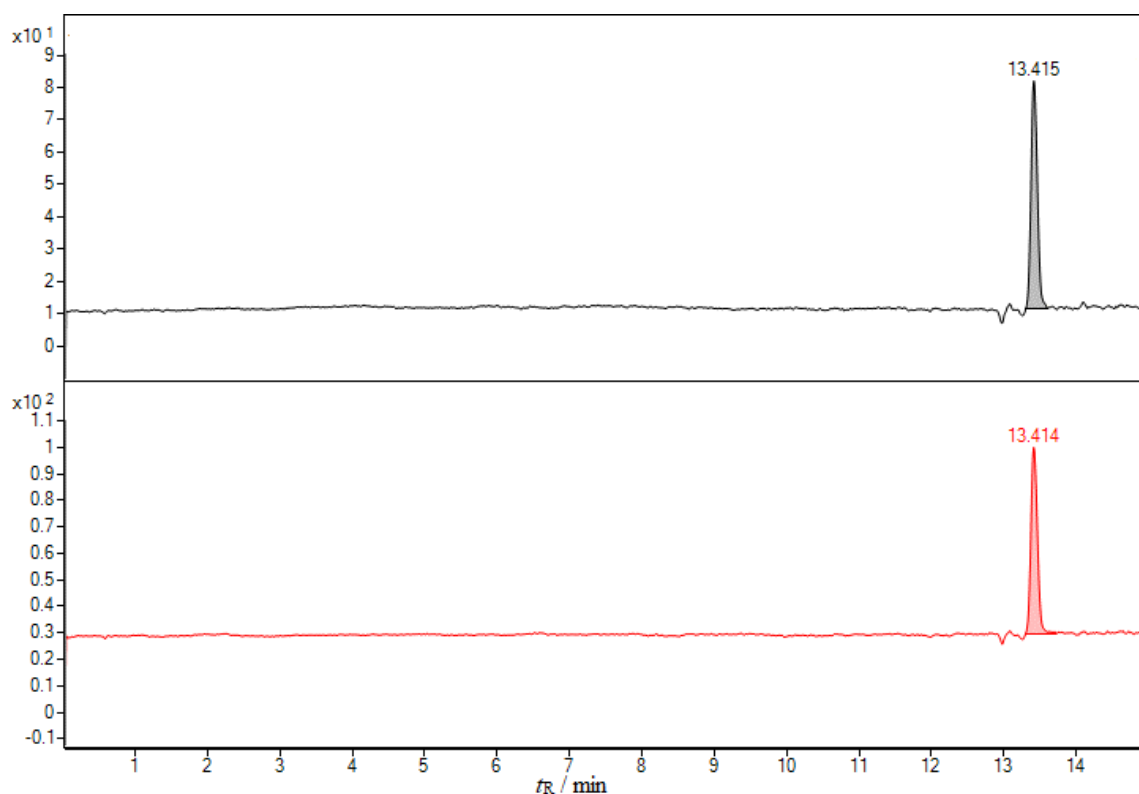
karakterizirao je MS spektar u kojem su uočeni ioni m/z 217,0688 i 411,1482 koji su već opisani prilikom analize razgradnih produkata kisele hidrolitičke razgradnje uzorka NAB: β -CD.



Slika 52. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:SBE- β -CD (–) i uzorka NAB:SBE- β -CD podvrgnutog kiselj hidrolitičkoj razgradnji (–).

4.4.1.2. Studije prisilne hidrolitičke razgradnje u neutralnom mediju

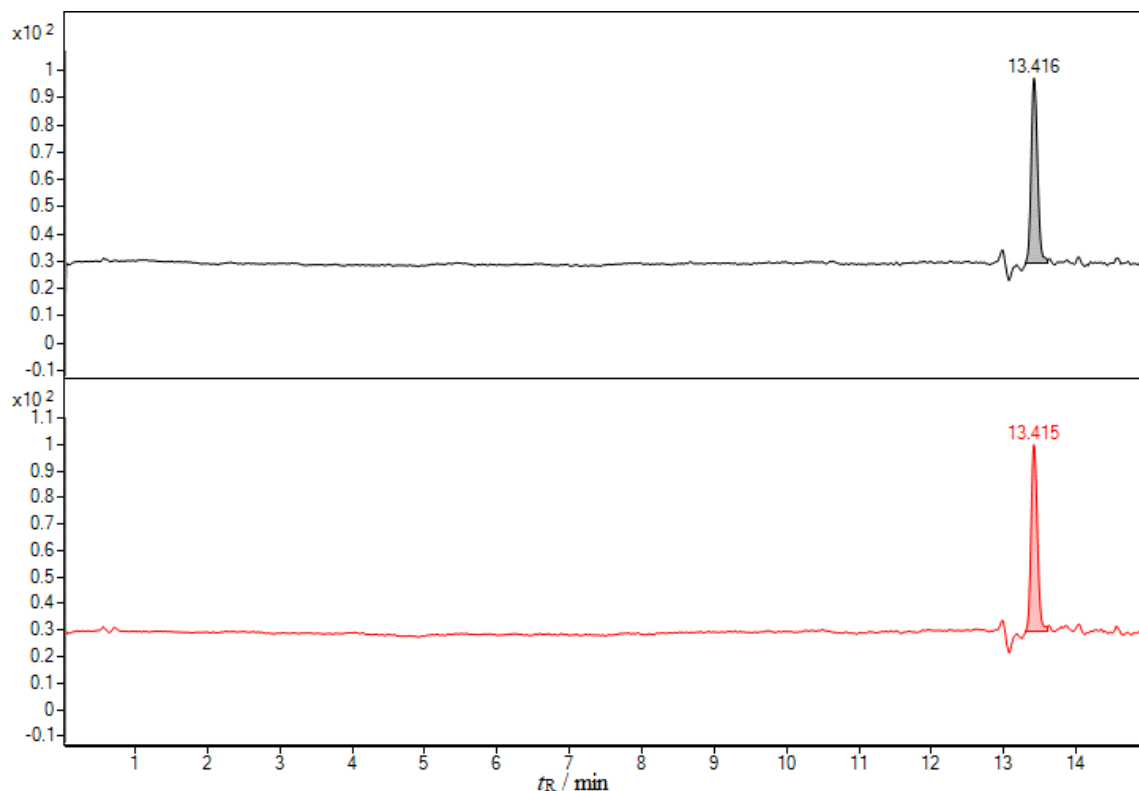
Nabumeton i njegovi sustavi s različitim β -CD bili su stabilni pri neutralnim hidrolitičkim uvjetima pri čemu nije opaženo nastajanje produkta kisele hidrolitičke razgradnje, DP1. Na slici 53 prikazana je usporedba TIC kromatograma kontrolnog uzorka netretiranog NAB i uzorka podvrgnutog razgradnji. U kromatogramima je moguće opaziti samo kromatografski pik NAB pri 13,4 min. Kromatogrami uzorka mljevenog NAB kao i uzoraka mljevenih binarnih smjesa NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD bili su identični. Usporedbe navedenih TIC kromatograma prikazane su na slikama D75, D76, D77 i D78. U njima se opažao samo kromatografski pik NAB. Razgradni produkti CD koji su opaženi prilikom kisele hidrolitičke razgradnje također nisu opaženi u kromatogramima uzoraka koji su podvrgnuti hidrolitičkoj razgradnji u neutralnim uvjetima. Primjerice, širok kromatografski pik β -CD prisutan je i u kontrolnom uzorku, kao i u uzorku koji je podvrgnut razgradnji (slika D76).



Slika 53. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB (–) i uzorka podvrgnutog neutralnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).

4.4.1.3. Studije prisilne hidrolitičke razgradnje u alkalnom mediju

Nabumeton i njegovi sustavi s različitim β -CD su se kao i u slučaju neutralne hidrolitičke razgradnje pokazali stabilnim pri alkalnim hidrolitičkim uvjetima pri čemu nije opaženo nastajanje novih razgradnih produkata. Na slici 54 prikazana je usporedba TIC kromatograma kontrolnog uzorka netretiranog NAB i uzorka podvrgnutog razgradnji. U kromatogramima je moguće opaziti samo kromatografski pik NAB pri 13,4 min. Kromatogrami uzorka mljevenog NAB kao i uzorka mljevenih binarnih smjesa NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD bili su identični, a prikazani su na slikama D79, D80, D81 i D82. Razgradni produkti CD ponovno nisu opaženi. Primjerice, široki kromatografski pik β -CD prisutan je i u kontrolnom uzorku, kao i u uzorku koji je podvrgnut razgradnji (slika D80). Ovakav rezultat u skladu je s literaturnim podacima u kojima se navodi da su CD stabilni u neutralnom i bazičnom mediju te da ne dolazi do njihove hidrolize.⁶⁶

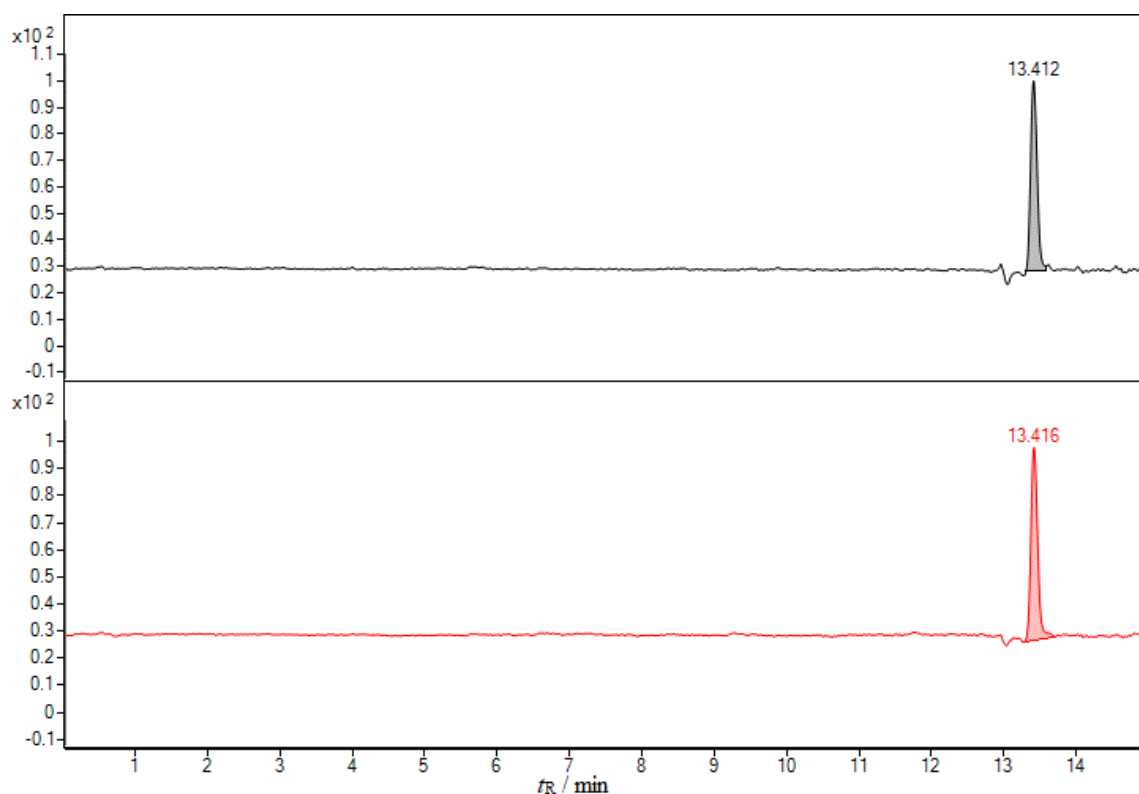


Slika 54. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB (–) i uzorka podvrgnutog alkalnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).

4.4.1.4. Studije prisilne razgradnje u oksidativnom mediju

U sklopu ove doktorske disertacije uzorci čistog NAB, mljevenog NAB kao i uzorci mljevenih smjesa NAB s različitim β -CD izlagani su utjecaju 3 %-tne otopine vodikovog peroksida u trajanju od 7 dana pri sobnoj temperaturi, ali i u trajanju od 10 sati pri povišenoj temperaturi od 80 °C.

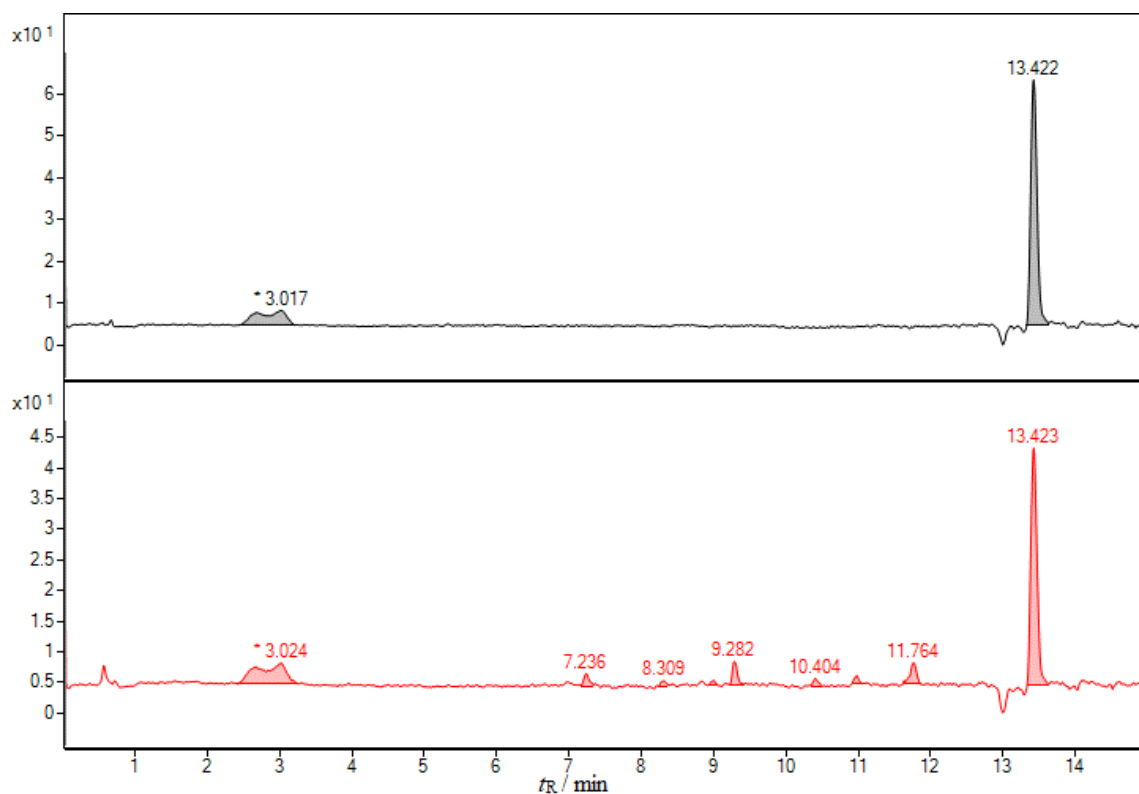
Uzorci NAB pokazali su se stabilnim pod utjecajem oksidativnog stresa i pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana (slika D83), ali i pri povišenoj temperaturi u trajanju od 10 h (slika 55). Uzorci mljevenog NAB također su se pokazali stabilnima bez obzira na primijenjene eksperimentalne uvjete (slike D84 i D85) pa je moguće zaključiti kako mljevenje nije utjecalo na dodatnu podložnost razgradnji ovog lijeka pri hidrolitičkim ili oksidativnim uvjetima. U navedenim kromatogramima moguće je uočiti samo pik NAB s vremenom zadržavanja od 13,4 min.



Slika 55. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB (–) i uzorka podvrgnutog oksidativnoj razgradnji pri 80 °C u trajanju od 10 h (–).

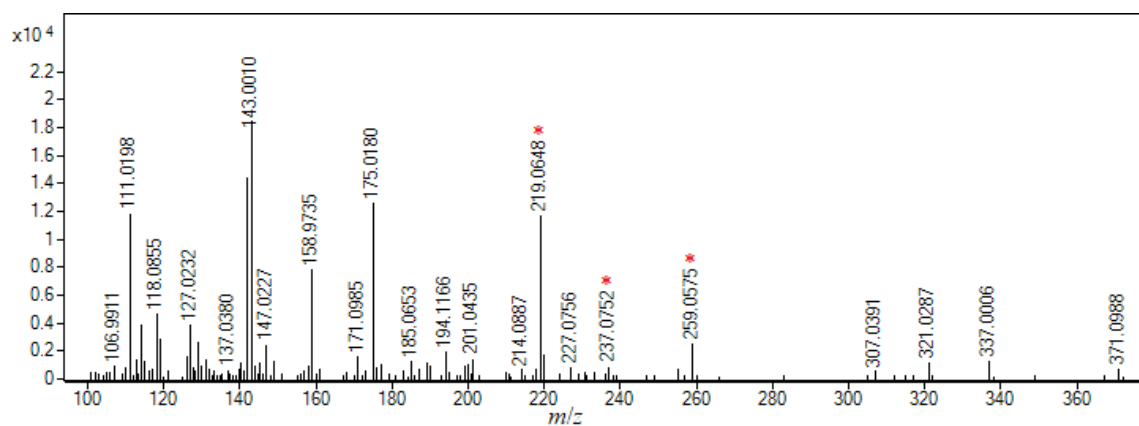
Prisutnost β -CD koji su korišteni u ovoj doktorskoj disertaciji nije narušavala stabilnost NAB prilikom izlaganja oksidativnim uvjetima pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana (slika D86). Ipak, utvrđeno je da prisutnost svih β -CD narušava stabilnost NAB prilikom oksidativne razgradnje pri povišenoj temperaturi pri čemu nastaje veći broj različitih razgradnih produkata. Prilikom podvrgavanja uzoraka prisilnoj oksidativnoj razgradnji korištenjem vodikovog peroksida uz temperature > 40 °C vrlo lako dolazi do homolitičkog cijepanja O–O veze pri čemu nastaju vrlo reaktivne oksidacijske vrste u obliku hidroksilnih radikala. Ovako nastali razgradni produkti farmakološki aktivnih tvari najčešće ne nastaju prilikom uobičajenih proizvodnih procesa ili načina skladištenja.^{152,158} Na slici 56 prikazana je usporedba TIC kromatograma kontrolnog uzorka NAB: β -CD i uzorka koji je podvrgnut oksidativnoj razgradnji pri povišenoj temperaturi. U oba kromatograma može se uočiti tipični kromatografski pik NAB pri 13,4 min te širok kromatografski pik pri 3,0 min koji je već ranije pripisan β -CD. Međutim, u kromatogramu razgrađenog uzorka jasno se uočava šest dodatnih kromatografskih pikova s vremenima zadržavanja od 7,2, 8,3, 9,0 9,3, 10,4, 11,0 i 11,8 min, a

koji pripadaju razgradnim produktima nabumetona. Veći broj istih kromatografskih pikova uočen je i prilikom razgradnje uzoraka NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD (slike D87 i D88).



Slika 56. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB: β -CD (—) i uzorka NAB: β -CD podvrgnutog oksidativnoj razgradnji pri 80 °C u trajanju od 10 h (—).

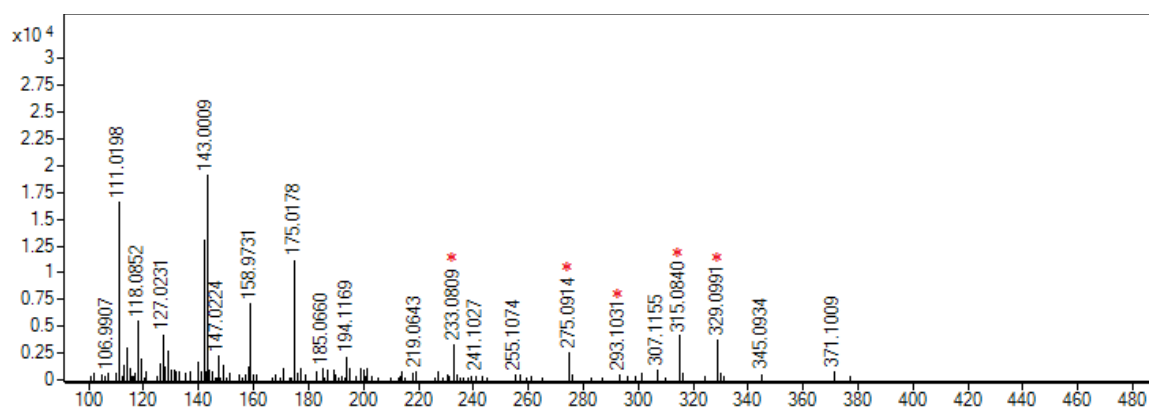
Na slici 57 prikazan je MS spektar razgradnog produkta DP2 s vremenom zadržavanja od 7,2 min. U njemu su obilježeni ioni koji nisu uočeni u MS spektru kontrolnog uzorka pri istom vremenu zadržavanja.



Slika 57. HRMS spektar DP2 ($t_R = 7,2$ min).

Pretpostavlja se da signal iona m/z 259,0575 odgovara aduktu natrija ovog razgradnog produkta, dok signal iona m/z 237,0752 odgovara njegovom jednostruko protoniranom molekulskom ionu. Naime, razlika njihovih m/z vrijednosti iznosi 21,9823 što odgovara točnoj razlici m/z vrijednosti između natrijevog adukta nekog iona i jednostruko protonirane vrste. Strukturna karakterizacija ovog razgradnog produkta nije bila moguća budući da se signal iona m/z 237,0752 nije mogao izolirati za potrebe eksperimenata tandemne spektrometrije masa.

Na slici 58 prikazan je MS spektar razgradnog produkta DP3 s vremenom zadržavanja od 8,3 min. U njemu su obilježeni ioni koji nisu uočeni u MS spektru kontrolnog uzorka pri istom vremenu zadržavanja.



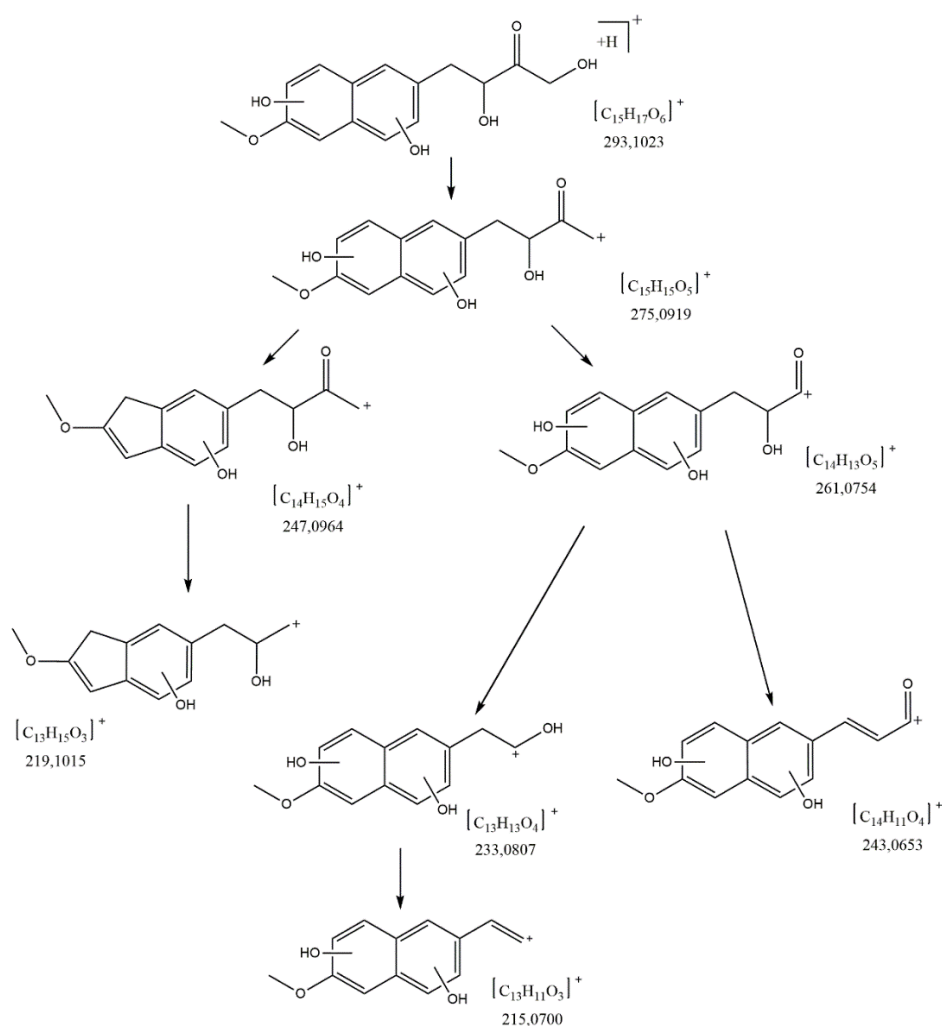
Slika 58. HRMS spektar DP3 ($t_R = 8,3$ min).

Signal pri m/z 293,1031 pripisan je jednostruko protoniranom molekulskom ionu razgradnog produkta DP3, $[M+H]^+$, dok je signal m/z 315,0840 pripisan aduktu s natrijem. Ovaj spoj također je karakteriziran pojavom ISF fragmenta poput m/z 275,0914 te 233,0809 što je i dokazano kasnijom MS/MS analizom.

Tablica 32. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru DP3 ($t_R = 8,3$ min).

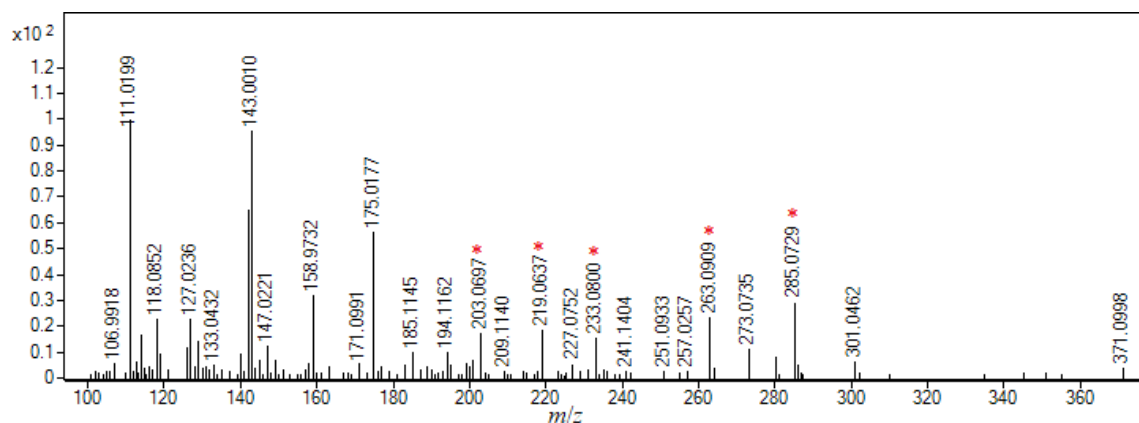
Izmjeren m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
315,0840	315,0839	-0,32	21,39	$[M+Na]^+$
293,1031	293,1020	-3,75	2,38	$[M+H]^+$
275,0914	275,0914	-	13,63	$[M+H-H_2O]^+$
233,0809	233,0808	-0,43	17,34	$[C_{13}H_{13}O_4]^+$

Ion pri m/z 293,1031 podvrgnut je MS/MS analizi. Na slici D89 prikazan je njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 10 V, dok su svi MS/MS spektri prikazani u tabličnom obliku (tablica D34). Shema fragmentiranja DP3 prikazana je na slici 59. Ovaj DP odgovara molekuli NAB na koju su adirane četiri hidroksilne skupine. Nakon detaljnog proučavanja MS/MS spektara pretpostavljeno je da se dvije hidroksilne skupine nalaze na naftalenskoj jezgri molekule, međutim nije bilo moguće odrediti njihovu točnu poziciju samo na osnovu MS/MS analize. Neutralnim gubitkom molekule vode iz iona m/z 293,1022 nastaje ion m/z 275,0915. Iz tog iona daljnjim fragmentiranjem dolazi do nastanka iona m/z 247,0961 s peteročlanim prstenom, koji dalje fragmentira na ion m/z 219,1019. Fragmentiranjem iona m/z 275,0915 također može nastati ion m/z 261,0749 iz kojeg gubitkom vode nastaje ion m/z 243,0654, odnosno neutralnim gubitkom CO ion m/z 233,0802. Daljnjim gubitkom vode iz iona m/z 233,0802 nastaje ion m/z 215,0703.



Slika 59. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona DP3 (m/z 293,1031).

Na slici 60 prikazan je MS spektar razgradnog produkta DP4 s vremenom zadržavanja od 9,0 min. U njemu su obilježeni ioni koji nisu uočeni u MS spektru kontrolnog uzorka pri istom vremenu zadržavanja.



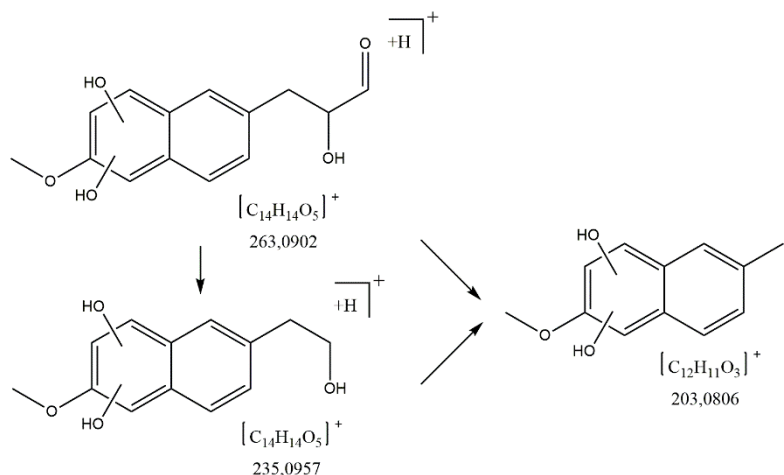
Slika 60. HRMS spektar DP4 ($t_R = 9,0$ min).

Signal pri m/z 263,0909 pripisan je jednostruko protoniranom molekulskom ionu razgradnog produkta DP4, $[M+H]^+$, dok je signal m/z 285,0729 pripisan aduktu s natrijem. Ovaj spoj također je karakteriziran pojavom ISF fragmenta poput m/z 203,0697 što je i dokazano kasnijom MS/MS analizom.

Tablica 33. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru DP4 ($t_R = 9,0$ min).

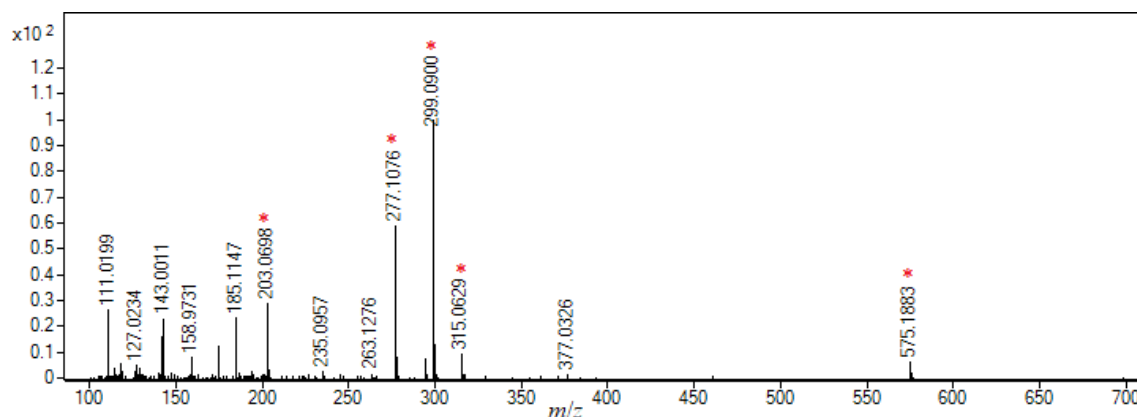
Izmjeren m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
285,0729	285,0739	3,51	21,39	$[M+Na]^+$
263,0909	263,0914	1,90	2,38	$[M+H]^+$
203,0697	203,0703	2,95	13,63	$[C_{12}H_{11}O_3]^+$

Ion pri m/z 263,0909 podvrgnut je MS/MS analizi. Na slici D90 prikazan je njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 10 V, dok su svi MS/MS spektri prikazani u tabličnom obliku (tablica D35). Shema fragmentiranja DP4 prikazana je na slici 61.



Slika 61. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona DP4 (m/z 263,0909).

Na slici 62 i u tablici 34 prikazan je MS spektar razgradnog produkta DP5 s vremenom zadržavanja od 9,3 min. U njemu su obilježeni ioni koji nisu uočeni u MS spektru kontrolnog uzorka pri istom vremenu zadržavanja.

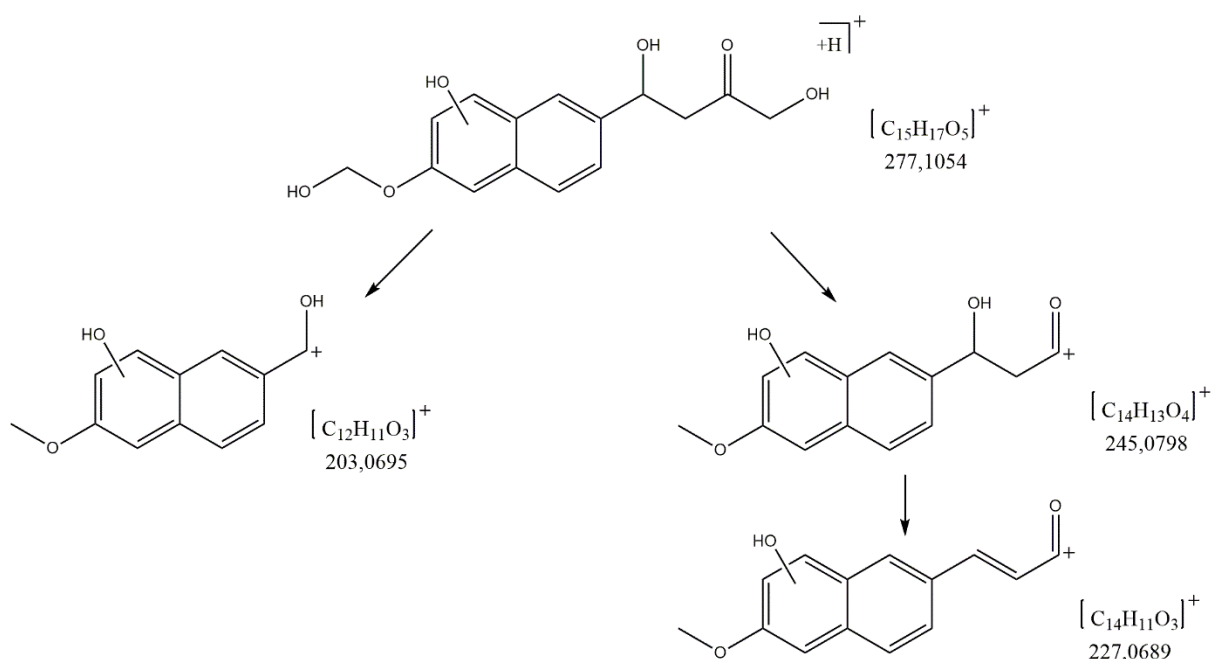


Slika 62. HRMS spektar DP5 ($t_R = 9,3$ min).

Tablica 34. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru DP5 ($t_R = 9,3$ min).

Izmjeren m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
575,1883	575,1888	-0,81	6,40	$[2M+Na]^+$
315,0629	315,0629	-0,10	9,21	$[M+K]^+$
299,0900	299,0890	3,36	100	$[M+Na]^+$
277,1076	277,1071	1,98	58,83	$[M+H]^+$
203,0698	203,0708	-5,02	28,87	$[C_{12}H_{11}O_3]^+$

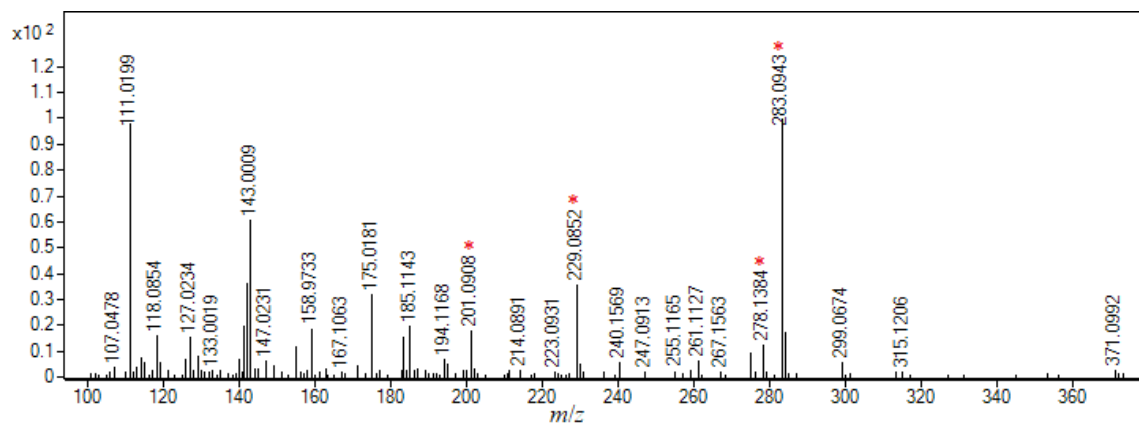
Signal pri m/z 277,1076 pripisan je jednostruko protoniranom molekulskom ionu razgradnog produkta DP5, $[M+H]^+$, dok je signal m/z 299,0900 pripisan aduktu s natrijem. U MS spektru je vidljiv i adukt kalija pri m/z 315,0629, te adukt natrija dimera DP5 pri m/z 575,1883. Ovaj spoj također je karakteriziran pojavom ISF fragmenta poput m/z 203,0697 što je i dokazano kasnijom MS/MS analizom. Analizi tandemnom spektrometrijom masa podvrgnut je jednostruko protonirani molekulski ion. Na slici D91 prikazan je njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 10 V, dok su svi MS/MS spektri prikazani u tabličnom obliku (tablica D36). Shema fragmentiranja DP5 prikazana je na slici 63.



Slika 63. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona DP5 (m/z 277,1076).

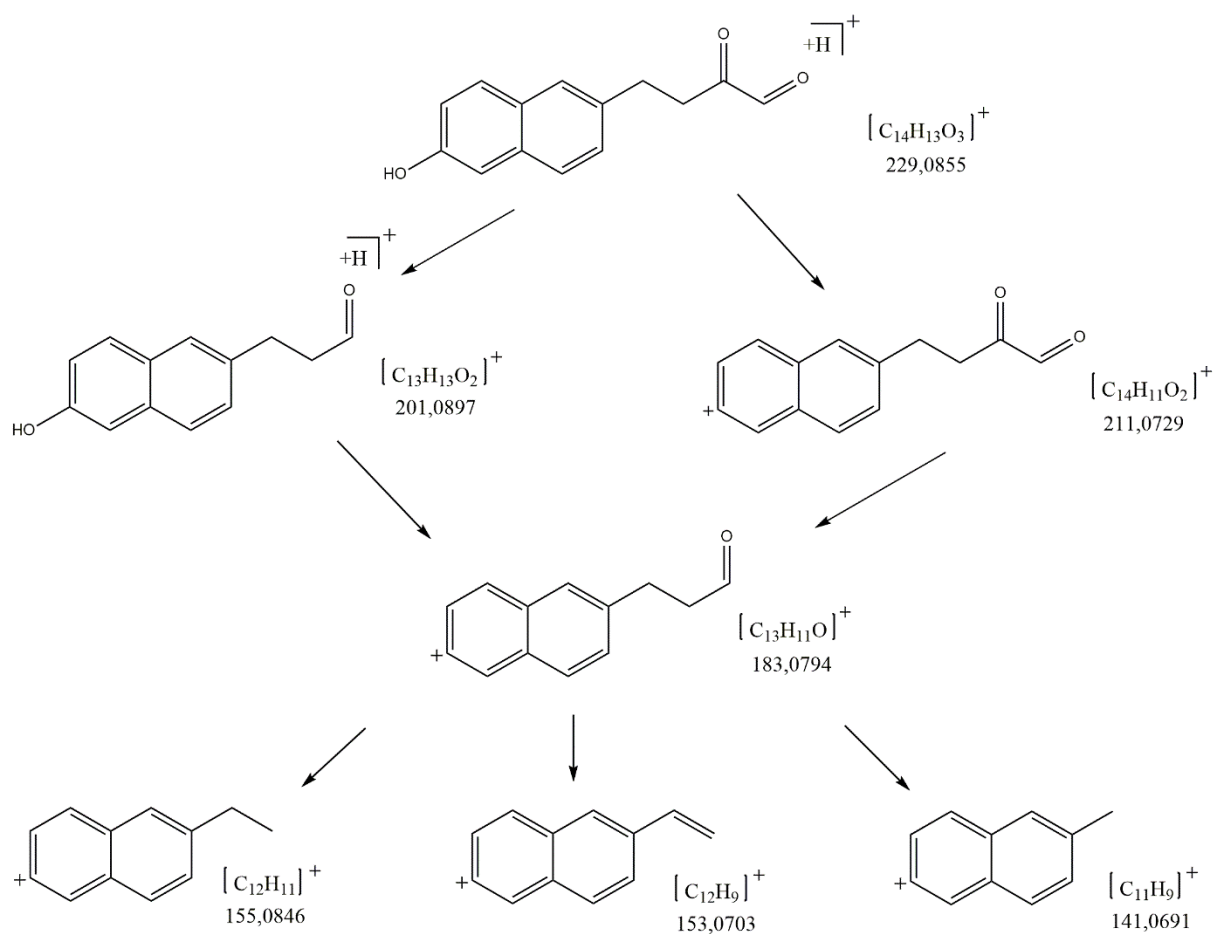
Na slici 64 prikazan je MS spektar razgradnog produkta DP6 s vremenom zadržavanja od 10,4 min. U njemu su obilježeni ioni koji nisu uočeni u MS spektru kontrolnog uzorka pri istom vremenu zadržavanja. Ion pri m/z 229,0868 svojom nominalnom masom odgovara jednostruko protoniranom ionu NAB. Ipak, zbog značajne razlike u točnim masama zaključeno je kako se radi o različitim strukturama, što je kasnije potvrđeno MS/MS analizom i činjenicom kako s kromatografske kolone eluiraju s različitim vremenima zadržavanja. Signal pri m/z 229,0852 pripisan je jednostruko protoniranom molekulskom ionu razgradnog produkta DP6, $[M+H]^+$. Ion pri m/z 201,0908 pripisan je ISF fragmentu što je i dokazano kasnijom MS/MS analizom. MS/MS analizi podvrgnut je jednostruko protonirani molekulski ion. Na slici D92 prikazan je

njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 10 V, dok su svi MS/MS spektri prikazani u tabličnom obliku (tablica D37).



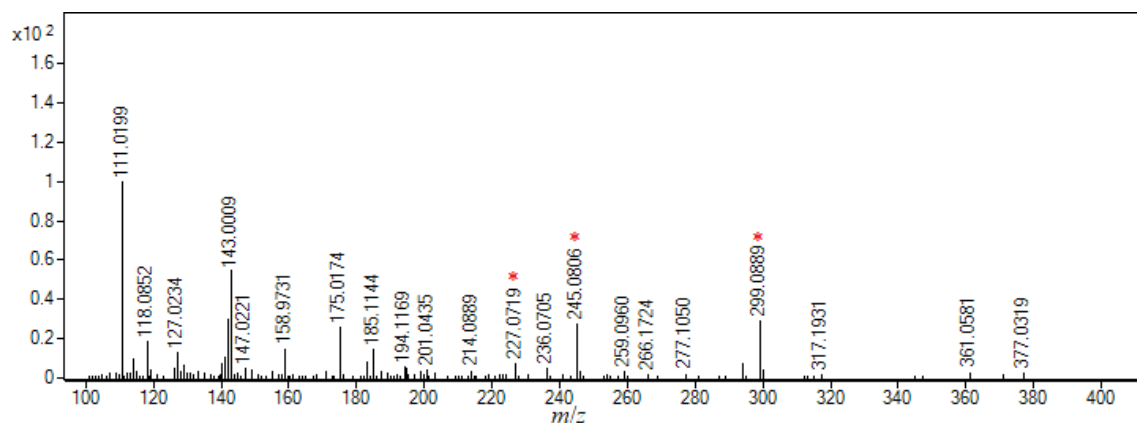
Slika 64. HRMS spektar DP6 ($t_R = 10,4$ min).

Shema fragmentiranja razgradnog produkta DP6 prikazana je na slici 65.



Slika 65. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona DP6 (m/z 229,0852).

Na slici 66 i u tablici 35 prikazan je MS spektar razgradnog produkta DP7 s vremenom zadržavanja od 11,0 min. U njemu su obilježeni ioni koji nisu uočeni u MS spektru kontrolnog uzorka pri istom vremenu zadržavanja.

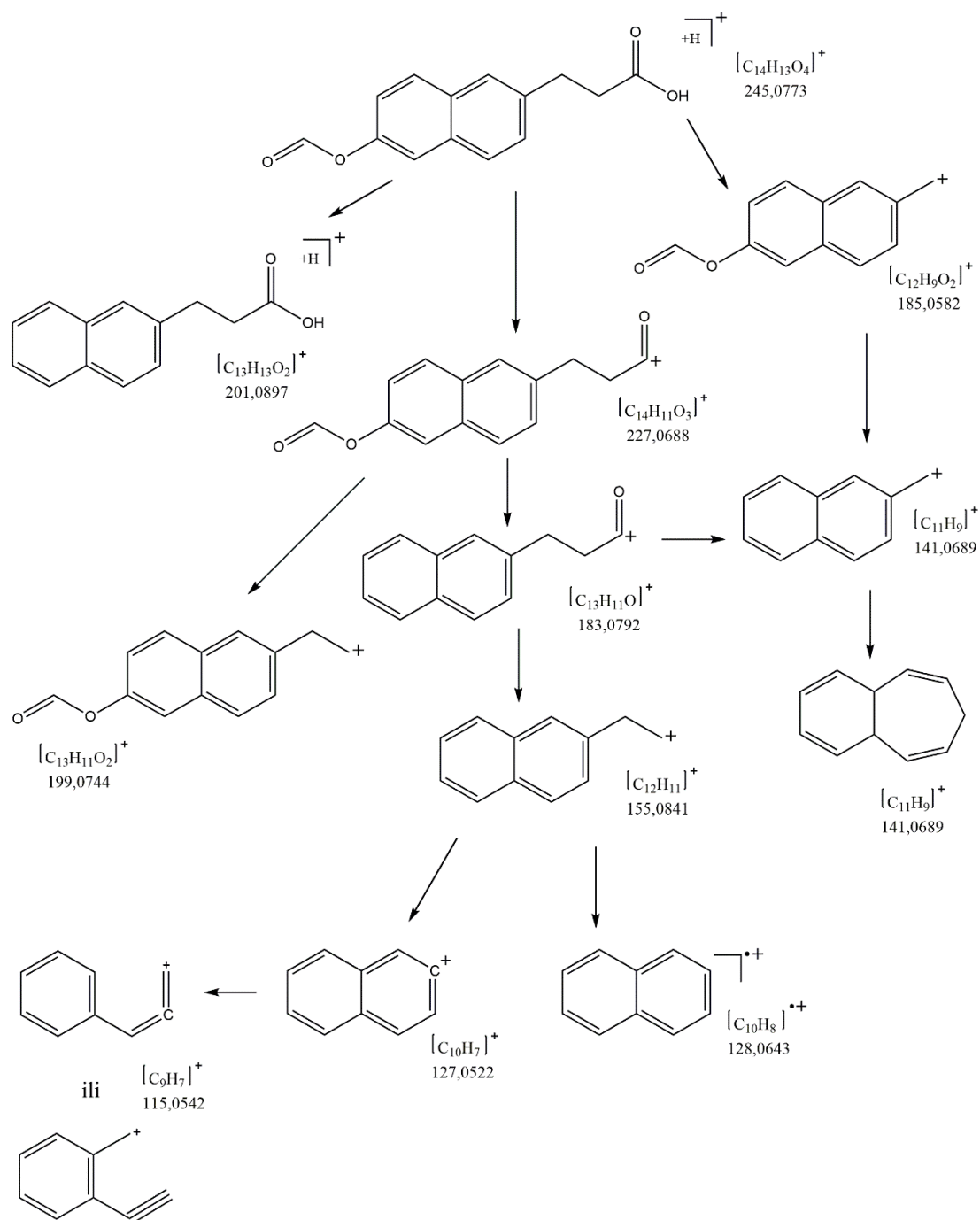


Slika 66. HRMS spektar DP7 ($t_R = 11,0$ min).

Tablica 35. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru DP7 ($t_R = 11,0$ min).

Izmjeren m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
245,0806	245,0808	-0,96	27,80	$[M+H]^+$
227,0719	203,0708	4,76	7,20	$[C_{14}H_{11}O_3]^+$

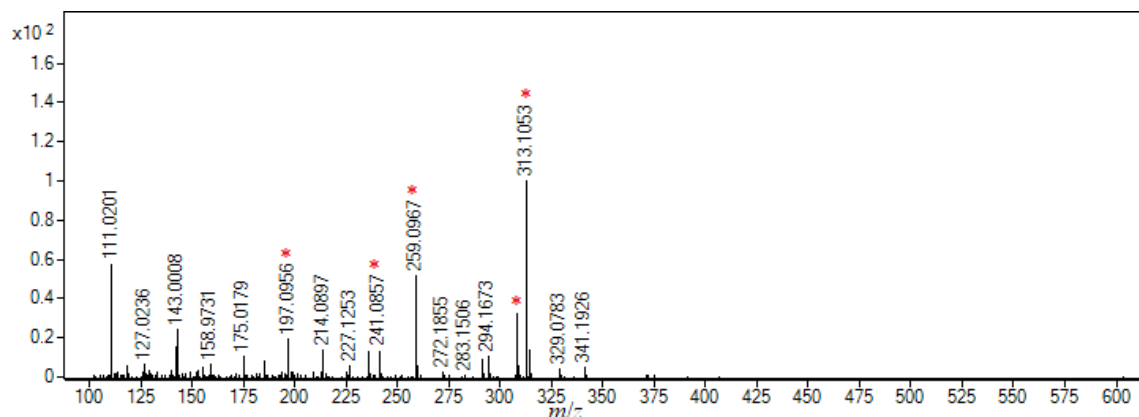
Signal pri m/z 245,0806 odgovara jednostruko protoniranom molekulskom ionu razgradnog produkta DP7, $[M+H]^+$. Ovaj spoj također je karakteriziran pojavom ISF fragmenta poput m/z 227,0719 što je i dokazano kasnijom MS/MS analizom. Analizi tandemnom spektrometrijom masa podvrgnut je jednostruko protonirani molekulski ion. Na slici D93 prikazan je njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 10 V, dok su svi MS/MS spektri prikazani u tabličnom obliku (tablica D38). Shema fragmentiranja DP7 prikazana je na slici 67.



Slika 67. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona DP7 (m/z 245,0806).

Na slici 68 prikazan je MS spektar razgradnog produkta DP8 s vremenom zadržavanja od 11,8 min. U njemu su obilježeni ioni koji nisu uočeni u MS spektru kontrolnog uzorka pri istom vremenu zadržavanja. Signal pri m/z 259,0967 odgovara jednostruko protoniranom molekulsom ionu razgradnog produkta DP8, $[M+H]^+$. Ovaj spoj također je karakteriziran

pojavom ISF fragmenta poput m/z 241,0857 te 197,0956 što je i dokazano kasnijom MS/MS analizom.

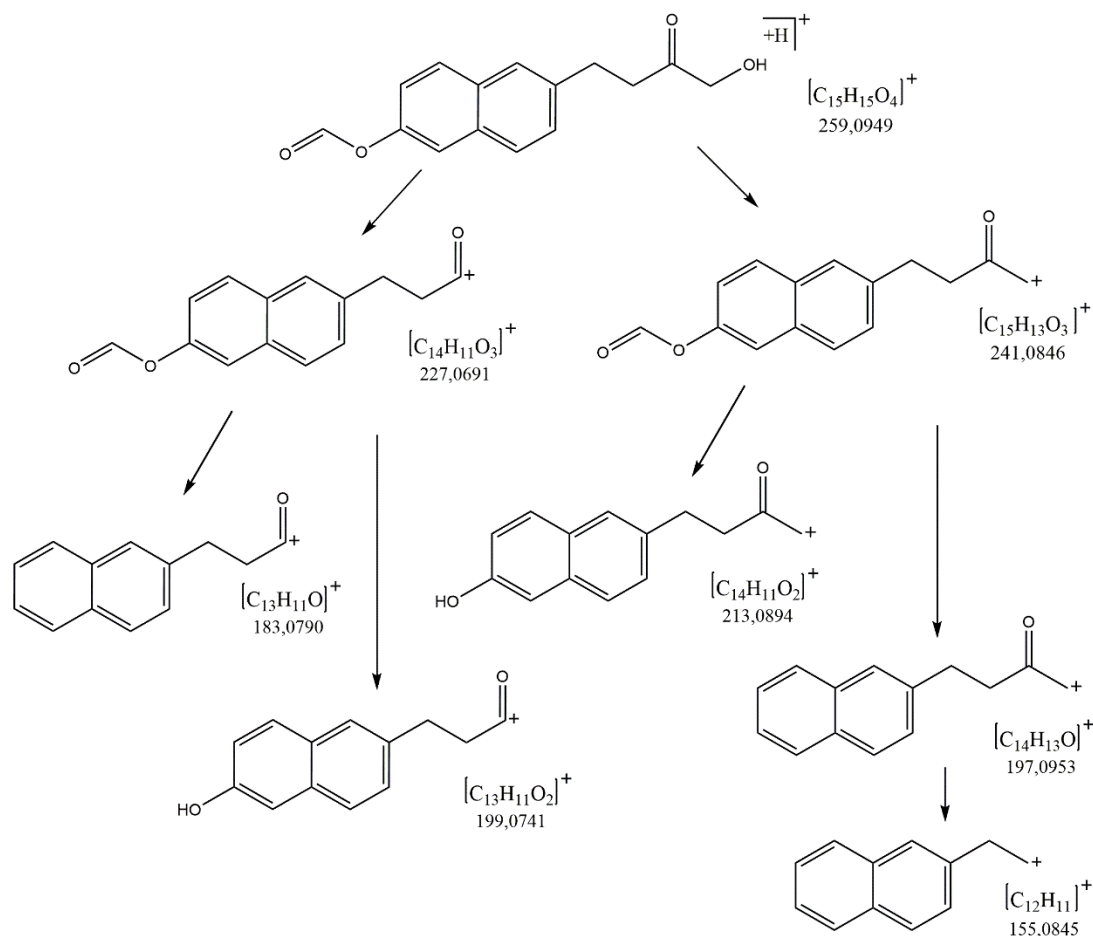


Slika 68. HRMS spektar DP8 ($t_R = 11,8$ min).

Tablica 36. Izmjerene i točne vrijednosti m/z , relativni intenziteti, izračunata odstupanja te asignacija signala u MS spektru DP8 ($t_R = 11,8$ min).

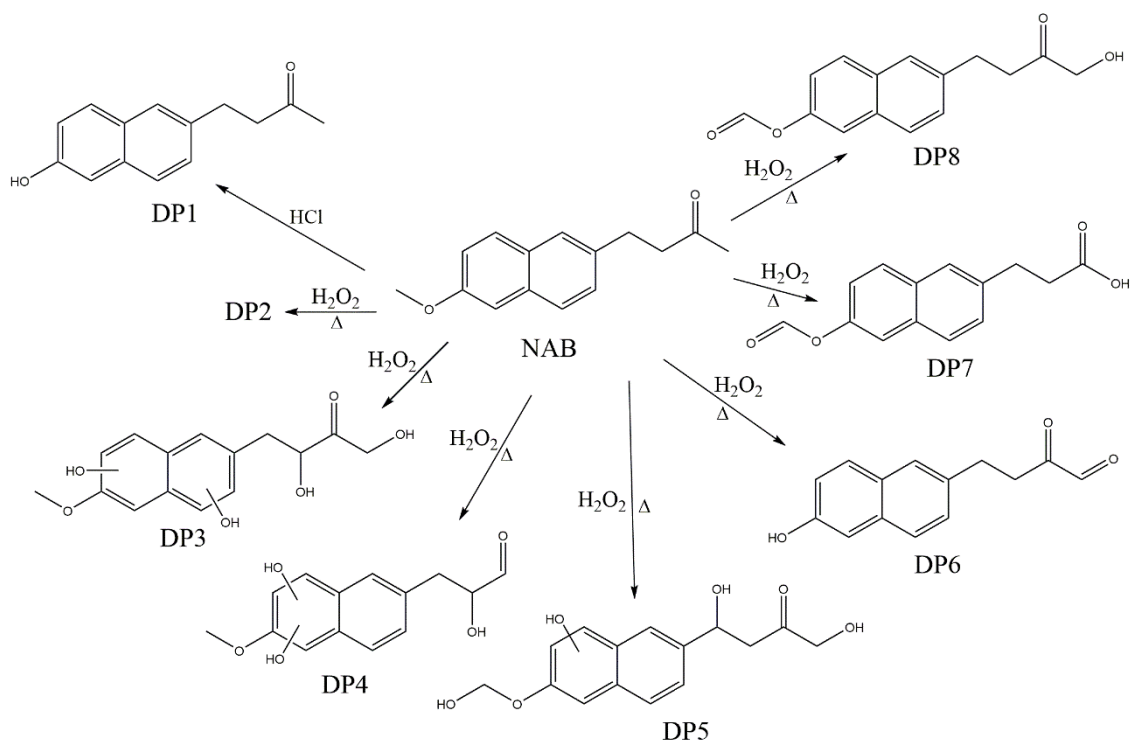
Izmjeren m/z	Monoizotopni m/z	Odstupanje / ppm	Relativan intenzitet / %	Asignacija
259,0967	259,0965	0,83	51,39	$[M+H]^+$
241,0857	241,0865	-3,19	13,52	$[C_{15}H_{13}O_3]^+$
197,0956	197,0966	-5,28	19,60	$[C_{14}H_{13}O]^+$

Analizi tandemnom spektrometrijom masa podvrgnut je jednostruko protonirani molekularni ion. Na slici D94 prikazan je njegov MS/MS spektar pri kolizijskom potencijalu od 10 V, dok su svi MS/MS spektri prikazani u tabličnom obliku (tablica D39). Shema fragmentiranja DP8 prikazana je na slici 69.



Slika 69. Predložena shema fragmentiranja jednostruko protoniranog iona DP8 (m/z 259,0967).

U sklopu ove doktorske disertacije provedeni su eksperimenti prisilne hidrolitičke i oksidativne razgradnje na uzorcima NAB, mljevenog NAB te na uzorcima mljevenih binarnih smjesa NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD. NAB je bio podložan kiselj hidrolitičkoj razgradnji u svim slučajevima pri čemu je opaženo nastajanje jednog razgradnog produkta. Svi korišteni β -CD također su bili podložni kiselj hidrolitičkoj razgradnji pri čemu je uočeno nastajanje nekoliko različitih razgradnih produkata. Sam NAB je otporan na oksidativnu razgradnju pri sobnoj, ali i pri povišenoj temperaturi. Ipak, u prisutnosti svih β -CD bio je podložan oksidativnoj razgradnji pri povišenoj temperaturi. Njegova razgradnja najvjerojatnije je uvjetovana prisutnošću CD i nastajanjem vrlo reaktivnih hidroksilnih radikala uslijed raspada vodikovog peroksida pri povišenoj temperaturi. Strukturno je okarakterizirano šest od ukupno sedam njegovih razgradnih produkata koji su rezultat oksidativne razgradnje. Predložene strukture svih razgradnih produkata, okarakteriziranih na temelju njihovih MS i MS/MS spektara, prikazane su na slici 70.

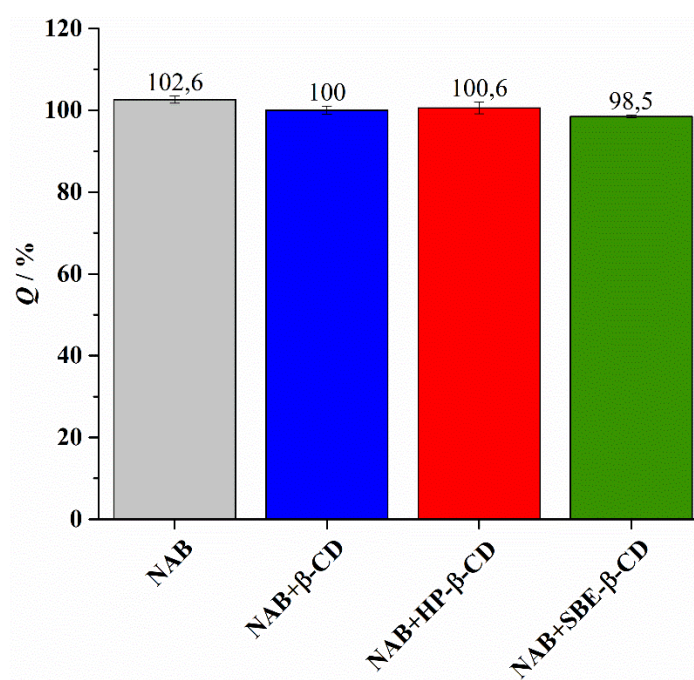


Slika 70. Predložene strukture opaženih razgradnih produkata nabumetona.

Strukture razgradnih produkata nabumetona predložene su samo na temelju rezultata eksperimenata tandemne spektrometrije masa te se u nastavku istraživanja planiraju izolirati razgradni produkti preparativnom kromatografijom i analizirati spektroskopijom NMR. Nakon toga sintetizirat će se razgradni produkti obilježeni deuterijem i ponoviti analize tandemnom spektrometrijom masa visokog razlučivanja.

4.4.2. Studije fotostabilnosti

Fotostabilnost uzoraka NAB te mljevenih binarnih smjesa NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD istražena je prema smjernicama iz poglavlja Q1B koje propisuje ICH. Iako su se uzorci značajno morfološki promijenili nakon izlaganja zračenju u fotostabilitetnim komorama, razgradnja nabumetona nije opažena ni u jednom slučaju. Stabilnost nabumetona moguće je procijeniti na temelju grafičkog prikaza sa slike 71, a izračunata je kao postotna vrijednost omjera analitičkih povrata nabumetona iz kontrolnih, odnosno referentnih uzoraka i uzoraka podvrgnutih razgradnji.



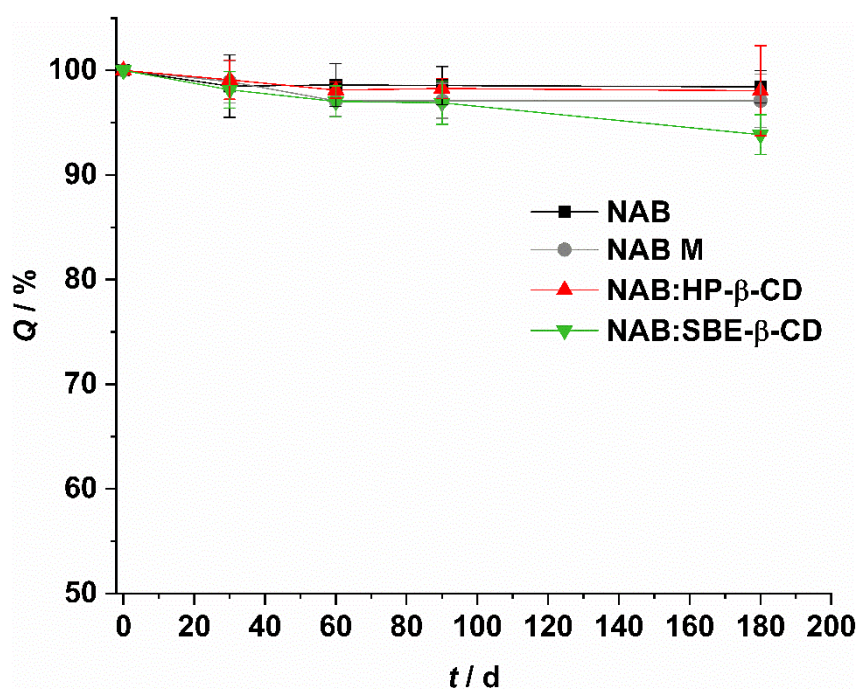
Slika 71. Rezultati istraživanja fotostabilnosti za uzorke NAB (■), NAB: β -CD (■), NAB:HP- β -CD (■) i NAB:SBE- β -CD (■).

Navedeni kontrolni uzorci i uzorci podvrgnuti razgradnji u fotostabilitetnim komorama kvalitativno su analizirani i analognom UHPLC-HRMS metodom. Kromatogrami ukupne ionske struje uzoraka podvrgnutih razgradnji prikazani su na slici D95. U svim navedenim kromatogramima vidljiv je samo pik NAB pri vremenu zadržavanja od 13,4 min. U kromatogramu uzorka NAB: β -CD moguće je primijetiti i već spominjani široki kromatografski pik β -CD pri vremenu zadržavanja od 3,0 min.

4.4.3. Studije dugotrajne stabilnosti

Na temelju solubilizacijskih istraživanja, istraživanja saturacijske topljivosti te brzine i opsega otapanja, procijenjeno je da najveći potencijal za dizajn novog terapijskog oblika nabumetona imaju binarne smjese NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD. Studije dugotrajne stabilnosti stoga su osim na uzorcima čistog i mljevenog NAB provedene i na uzorcima NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD. Studije stabilnosti provedene su prema smjernicama iz poglavlja Q1A(R2) koje propisuje ICH. Uzorci su pohranjeni u stabilitetne komore pri uvjetima temperature od 25 °C i uz relativnu vlažnost od 60 %.

Stabilnost nabumetona moguće je procijeniti na temelju grafičkog prikaza sa slike 72, a izračunata je kao postotna vrijednost omjera analitičkih povrata nabumetona iz nultog, odnosno referentnog uzorka i uzoraka podvrgnutih razgradnji. Značajna razina razgradnje nabumetona nije ustanovljena nakon perioda od šest mjeseci.



Slika 72. Rezultati studija dugotrajne stabilnosti na uzorcima NAB (■), mljevenog NAB (●), NAB:HP- β -CD (▲) i NAB:SBE- β -CD (▼).

§ 5. ZAKLJUČAK

Detaljno su istraženi inkluzijski kompleksi slabo topljivog lijeka nabumetona s prirodnim β -CD te njegovim hidroksipropiliranim, nasumično metiliranim i alkilsulfoniranim derivatima kako bi se procijenio njihov potencijal za dizajn novog terapijskog oblika nabumetona s poboljšanim svojstvima. Sustavi nabumetona s navedenim ciklodekstrinima proučavani su u vodenim otopinama te u čvrstom stanju.

Budući da je već od ranije poznato kako se topljivost slabo topljivih lijekova poput nabumetona može poboljšati kompleksiranjem s ciklodekstrinima, najprije su provedena tzv. solubilizacijska istraživanja na temelju kojih se procijenio solubilizacijski potencijal svakog korištenog β -CD u vodi te u simuliranom želučanom (pH = 1,0), duodenalnom (pH = 4,5) i intestinalnom mediju (pH = 6,8). Za potrebe ovog dijela istraživanja razvijene su i validirane spektrofotometrijske i spektrofluorimetrijske metode za kvantitativno određivanje nabumetona u prisutnosti β -CD. Na temelju određenih vrijednosti konstanti stabilnosti, kompleksacijskih efikasnosti i solubilizacijskih učinaka procijenjeno je kako nasumično metilirani i alkilsulfonirani derivati β -CD imaju najizraženiji solubilizacijski potencijal, a ujedno tvore i najstabilnije komplekse s nabumetonom bez obzira na solubilizacijski medij pri čemu solubilizacijski učinak CD opada u nizu $SBE\text{-}\beta\text{-CD} > RM\text{-}\beta\text{-CD} > HP\text{-}\beta\text{-CD} \approx \beta\text{-CD}$. U svim istraženim medijima postignuto je jako dobro slaganje rezultata solubilizacijskih istraživanja dobivenih spektrofotometrijskim i spektrofluorimetrijskim određivanjem.

Solubilizacijska istraživanja provode se u sustavima koji su zasićeni gostom pa kažemo kako se provode u neidealnim uvjetima. U takvim se uvjetima može očekivati agregiranje potencijalnih kompleksa ili komponenti koje ga čine, a konstante stabilnosti izračunate na temelju solubilizacijskih istraživanja često se koriste samo kako bi se usporedio solubilizacijski učinak različitih CD na neki specifičan slabo topljiv lijek. Interakcije nabumetona s različitim β -CD u otopini su stoga detaljno proučene fluorescencijskom spektroskopijom, izotermnom titracijskom mikrokolorimetrijom te spektrometrijom masa. Na temelju rezultata *batch* spektrofluorimetrijskih titracija u vodi utvrđeno je da nabumeton i odabrani β -ciklodekstrini tvore komplekse u stehiometrijskom omjeru 1:1 pri čemu njihova stabilnost opada u nizu $NAB:SBE\text{-}\beta\text{-CD} > NAB:RM\text{-}\beta\text{-CD} > NAB:HP\text{-}\beta\text{-CD} \approx NAB:\beta\text{-CD}$. Osnovni termodinamički parametri kompleksiranja u stehiometrijskom omjeru 1:1 određeni su mikrokolorimetrijskim

titracijama u vodi. U svim slučajevima kompleksiranje je egzotermno, što je posljedica nekoliko različitih fenomena koji pridonose ukupnoj entalpiji kompleksiranja, te su vrijednosti reakcijskih entropija pozitivne. Kompleksiranje nabumetona različitim β -CD je entalpijski i entropijski povoljan proces pri čemu je entropijski doprinos reakcijskoj Gibbsovoj energiji izraženiji za kompleksiranje nabumetona s RM- β -CD i SBE- β -CD u usporedbi s nativnim β -CD i njegovim hidroksipropiliranim derivatom. Izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti bile su u dobrom slaganju s vrijednostima koje su izračunate na temelje spektrofluorimetrijskih titracija. Zanimljivo je kako su ove vrijednosti konstanti stabilnosti bile usporedive s vrijednostima dobivenima u sklopu solubilizacijskih istraživanja, odnosno u neidealnim uvjetima. Općenito, nabumeton s odabranim β -ciklodekstrinima tvori komplekse umjerene stabilnosti stoga se može zaključiti kako postoji velik potencijal njihove primjene u dizajnu novih terapijskih oblika ovog lijeka. Kompleksiranje je istraženo i korištenjem spektrometrije masa te je zaključeno kako nabumeton i različiti β -CD u plinskoj fazi tvore komplekse u stehiometrijskom omjeru 1:1, što je u korelaciji s rezultatima dobivenim prilikom izučavanja kompleksiranja u vodenim otopinama. S porastom koncentracije β -CD nastaju agregati koji mogu biti pogrešno protumačeni kao kompleksi višeg stehiometrijskog reda. Inkluzija molekule nabumetona u središnju hidrofobnu šupljinu β -CD dokazana je analizama spektroskopijom NMR koje je provela dr. sc. Ana Čikoš u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković.

Binarne smjese nabumetona i različitih β -CD pripremljene su mehanokemijskom aktivacijom u visokoenergijskim vibracijskim mlinovima uz korištenje čeličnih posudica manjeg volumena te posudica većeg volumena izrađenih od ZrO_2 . Cjelokupni proces mljevenja praćen je DSC analizama pri čemu se učinkovitost mljevenja procjenjivala na temelju izračunate vrijednosti udjela kristalne frakcije nabumetona u ukupnom produktu. Na temelju postignutih rezultata mijenjali su se eksperimentalni uvjeti mljevenja kako bi se potaknula što veća amorfizacija nabumetona. Nastali produkti dodatno su okarakterizirani primjenom tehnika PXRD i FT-IR ATR. Zaključeno je kako se mehanokemijska aktivacija može primjenjivati za pripremu binarnih smjesa NAB: β -CD, NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD, dok nije pogodna za pripremu smjese NAB:RM- β -CD zbog nepovoljnih svojstava konačnog produkta mljevenja. Mljevenje samog nabumetona nije uzrokovalo njegovu amorfizaciju. Značajna amorfizacija postignuta je mljevenjem njegovih binarnih smjesa s različitim β -CD te se može zaključiti kako su uslijed mljevenja uspostavljene interakcije između lijeka i CD. Na temelju određivanja saturacijske topljivosti te brzine i opsega otapanja nabumetona *in vitro* iz konačnih produkata

zaključeno je kako binarne smjese NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD pripravljene mljevenjem imaju najveći potencijal za dizajn novih terapijskih oblika ovog lijeka.

Provedene su studije dugotrajne stabilnosti te fotostabilnosti na uzorcima nabumetona i njegovih odabranih binarnih smjesa. U tu svrhu najprije je razvijena i validirana UHPLC-DAD metoda, a validacijski parametar specifičnosti ove metode procijenjen je na temelju eksperimenata prisilne razgradnje nabumetona i njegovih binarnih smjesa u hidrolitičkim kiselim, neutralnim i alkalnim uvjetima te u oksidativnim uvjetima. Uzorci podvrgnuti prisilnoj razgradnji analizirani su analognom UHPLC-HRMS metodom uz elektroraspršenje kao način ioniziranja. Nabumeton je podložan hidrolizi u kiselim uvjetima uz nastajanje jednog razgradnog produkta, a prisutnost različitih β -CD nije imala utjecaj na njegovu razgradnju. Korišteni β -CD također su podložni kiselj hidrolitičkoj razgradnji, pri čemu su kao konačni produkti nastale supstituirane ili nesupstituirane glukopiranozne podjedinice. Nabumeton nije podložan oksidativnoj razgradnji. Međutim, u oksidativnim uvjetima uz povišenu temperaturu prisutnost β -CD, HP- β -CD i SBE- β -CD nepovoljno je djelovala na stabilnost nabumetona te je nastao veći broj njegovih razgradnih produkata koji su strukturno okarakterizirani eksperimentima tandemne spektrometrije masa. Na temelju rezultata studija fotostabilnosti i dugotrajne stabilnosti zaključeno je kako prisutnost različitih β -CD ne utječe na stabilnost NAB što dodatno ide u prilog njihovoj potencijalnoj primjeni u novim terapijskim oblicima NAB.

S obzirom na sve rezultate može se zaključiti kako:

- (i) β -CD, HP- β -CD, RM- β -CD i SBE- β -CD povećavaju topljivost NAB u vodi i biorelevantnim medijima (želučani, duodenalni i intestinalni medij),
- (ii) interakcijom NAB i CD u vodi nastaju inkluzijski kompleksi,
- (iii) svojstva sustava NAB:CD u čvrstom stanju ovise o metodi pripreme (koevaporacija, mljevenje u posudicama od čelika ili ZrO₂),
- (iv) mljevenje u visokoenergijskim vibracijskim mlinovima prikladna je metoda za pripravu novih terapijskih oblika NAB i CD, osim u slučaju RM- β -CD,
- (v) istraženi CD ne utječu na dugotrajnu stabilnost i fotostabilnost nabumetona,
- (vi) obzirom na saturacijsku topljivost i opseg otapanja nabumetona *in vitro*, binarne smjese NAB:HP- β -CD i NAB:SBE- β -CD imaju najveći potencijal za dizajn novih terapijskih oblika lijeka.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

- BCS – Biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. *biopharmaceutics classification system*)
- BDDCS – Biofarmaceutski sustav dispozicije djelatnih tvari (engl. *biopharmaceutics drug disposition classification system*)
- CD – ciklodekstrin
- DS – stupanj supstituiranosti ciklodekstrinskog derivata
- DSC – razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*)
- EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)
- ESI – ionizacija elektroraspršenjem
- GI – gastrointestinalni sustav
- GRAS – engl. *Generally Recognized as Safe*
- HP- β -CD – hidroksipropilirani derivat β -ciklodekstrina
- HRMS – spektrometrija masa visokog razlučivanja
- ICH – Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za ljudsku primjenu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)
- IVIVC – *in vivo* – *in vitro* korelacija
- LOD – granica detekcije analitičke metode
- LOQ – granica kvantifikacije analitičke metode
- MS – spektrometrija masa
- MS/MS – tandemna spektrometrija masa
- NAB – nabumeton
- NLC – nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *nanostructured lipid carriers*)
- NSAID - nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)
- PXRD – difrakcija rendgenskog zračenja u polikristalnom uzorku (engl. *powder X-ray diffraction*)
- rDCS (DCS) – razvojno - formulacijski sustav klasificiranja djelatnih tvari (engl. *developability classification system*)

- RM- β -CD – nasumično metilirani derivat β -ciklodekstrina
- SBE- β -CD – sulfobutileterski derivat β -ciklodekstrina
- SEDDS – samoemulgirajući sustavi za dostavu lijekova (engl. *self-emulsifying drug delivery systems*)
- SLN – čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*)
- USFDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *United States Food and Drug Administration*)
- α -CD – α -ciklodekstrin
- β -CD – β -ciklodekstrin
- γ -CD – γ -ciklodekstrin
- WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. D. V. Bhalani, B. Nutan, A. Kumar, A. K. Singh Chandel, Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics, *Biomedicines* **10** (2022) 2055.
2. J. M. Ting, W. W. Porter, J. M. Mecca, F. S. Bates, T. M. Reineke, Advances in Polymer Design for Enhancing Oral Drug Solubility and Delivery, *Bioconjug. Chem.* **29** (2018) 939–952.
3. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 1–10.
4. S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm. Sin. B* **5** (2015) 442–453.
5. J. Ghitman, S. I. Voicu, Controlled drug delivery mediated by cyclodextrin-based supramolecular self-assembled carriers: From design to clinical performances, *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **5** (2023) 100266.
6. R. Kumar, A. Singh, K. Sharma, D. Dhasmana, N. Garg, P. F. Siril, Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of Fenofibrate and Nabumetone loaded solid lipid nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C* **106** (2020) 110184.
7. A. Charalabidis, M. Sfouni, C. Bergström, P. Macheras, The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines, *Int. J. Pharm.* **566** (2019) 264–281.
8. B. J. Boyd, C. A. S. Bergström, Z. Vinarov, M. Kuentz, J. Brouwers, P. Augustijns, M. Brandl, A. Bernkop-Schnürch, N. Shrestha, V. Prétat, A. Müllertz, A. Bauer-Brandl and V. Jannin, Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Sci.* **137** (2019) 104967.
9. G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, J. R. Crison, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability, *Pharm. Res.* **12** (1995) 413–420.
10. A. Dokoumetzidis, P. Macheras, A century of dissolution research: From Noyes and

- Whitney to the Biopharmaceutics Classification System, *Int. J. Pharm.* **321** (2006) 1–11.
11. A. Dahan, G. L. Amidon u D. J. Abraham, M. Myers (ur.), Provisional BCS Classification of the Leading Oral Drugs on the Global Market, *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development*, Vol. 8, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2021, str. 1.
 12. WHO, Guideline on Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers (2023).
 13. P. Bransford, J. Cook, M. Gupta, S. Haertter, H. He, R. Ju, J. Kanodia, H. Lennernäs, D. Lindley, J. E. Polli, L. Wenning, Y. Wu, ICH M9 Guideline in Development on Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers: An Industrial Perspective from the IQ Consortium, *Mol. Pharm.* **17** (2020) 361–372.
 14. C. Y. Wu, L. Z. Benet, Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharm. Res.* **22** (2005) 11–23.
 15. L. Z. Benet, F. Broccatelli, T. I. Oprea, BDDCS applied to over 900 drugs, *AAPS J.* **13** (2011) 519–547.
 16. J. M. Butler, J. B. Dressman, The Developability Classification System: Application of Biopharmaceutics Concepts to Formulation Development, *J. Pharm. Sci.* **99** (2010) 4940–4954.
 17. J. Lovrić, A. Hafner, M. Radiković, M. Juretić, M. Dürriegl, G. Perina Lakoš, I. Pepić, Nanokristali djelatne tvari : fizičko-kemijska , *Farm. Glas.* **71** (2015) 355–384.
 18. J. Rosenberger, J. Butler, J. Dressman, A Refined Developability Classification System, *J. Pharm. Sci.* **107** (2018) 2020–2032.
 19. J. Rosenberger, J. Butler, U. Muenster, J. Dressman, Application of a Refined Developability Classification System, *J. Pharm. Sci.* **108** (2019) 1090–1100.
 20. B. M. Davit, I. Kanfer, Y. C. Tsang, J. M. Cardot, BCS biowaivers: Similarities and differences among EMA, FDA, and WHO requirements, *AAPS J.* **18** (2016) 612–618.
 21. P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun, J. Lee, Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability, *Asian J. Pharm. Sci.* **9** (2014) 304–316.
 22. P. Kanaujia, P. Poovizhi, W. K. Ng, R. B. H. Tan, Amorphous formulations for dissolution and bioavailability enhancement of poorly soluble APIs, *Powder Technol.*

- 285 (2015) 2–15.
23. S. Baghel, H. Cathcart, N. J. O'Reilly, Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs, *J. Pharm. Sci.* **105** (2016) 2527–2544.
 24. K. Edueng, D. Mahlin, C. A. S. Bergström, The Need for Restructuring the Disordered Science of Amorphous Drug Formulations, *Pharm. Res.* **34** (2017) 1754–1772.
 25. S. V. Jermain, C. Brough and R. O. Williams, Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery – An update, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 379–392.
 26. P. Pandi, R. Bulusu, N. Kommineni, W. Khan and M. Singh, Amorphous solid dispersions: An update for preparation, characterization, mechanism on bioavailability, stability, regulatory considerations and marketed products, *Int. J. Pharm.* **586** (2020) 119560.
 27. A. Schittny, J. Huwyler, M. Puchkov, Mechanisms of increased bioavailability through amorphous solid dispersions: a review, *Drug Deliv.* **27** (2020) 110–127.
 28. R. B. Chavan, R. Thipparaboina, D. Kumar, N. R. Shastri, Co amorphous systems: A product development perspective, *Int. J. Pharm.* **515** (2016) 403–415.
 29. J. Han, Y. Wei, Y. Lu, R. Wang, J. Zhang, Y. Gao, S. Qian, Co-amorphous systems for the delivery of poorly water-soluble drugs: Recent advances and an update, *Expert Opin. Drug Deliv.* **17** (2020) 1411–1435.
 30. F. Kesisoglou, S. Panmai, Y. Wu, Nanosizing - Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59** (2007) 631–644.
 31. J. Leleux, R. O. Williams, Recent advancements in mechanical reduction methods: Particulate systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **40** (2014) 289–300.
 32. B. M. Couillaud, P. Espeau, N. Mignet and Y. Corvis, State of the Art of Pharmaceutical Solid Forms: from Crystal Property Issues to Nanocrystals Formulation, *ChemMedChem* **14** (2019) 8–23.
 33. S. M. Abuzar, S. M. Hyun, J. H. Kim, H. J. Park, M. S. Kim, J. S. Park, S. J. Hwang, Enhancing the solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs using supercritical antisolvent (SAS) process, *Int. J. Pharm.* **538** (2018) 1–13.
 34. N. Esfandiari, Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical

- carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* **100** (2015) 129–141.
35. L. Padrela, M. A. Rodrigues, A. Duarte, A. M. A. Dias, M. E. M. Braga, H. C. de Sousa, Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals – A comprehensive review, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **131** (2018) 22–78.
 36. L. Nicoud, F. Licordari, A. S. Myerson, Estimation of the Solubility of Metastable Polymorphs: A Critical Review, *Cryst. Growth Des.* **18** (2018) 7228–7237.
 37. D. Gupta, D. Bhatia, V. Dave, V. Sutariya, S. V. Gupta, Salts of therapeutic agents: Chemical, physicochemical, and biological considerations, *Molecules* **23** (2018) 1719.
 38. X. L. Dai, J. M. Chen, T. B. Lu, Pharmaceutical cocrystallization: An effective approach to modulate the physicochemical properties of solid-state drugs, *CrystEngComm* **20** (2018) 5292–5316.
 39. R. Thakuria, B. Sarma, Drug-drug and drug-nutraceutical cocrystal/salt as alternative medicine for combination therapy: A crystal engineering approach, *Crystals* **8** (2018) 101.
 40. G. Bolla, B. Sarma, A. K. Nangia, Crystal Engineering of Pharmaceutical Cocrystals in the Discovery and Development of Improved Drugs, *Chem. Rev.* **122** (2022) 11514–11603.
 41. I. Sathisaran, S. V. Dalvi, Engineering cocrystals of poorly water-soluble drugs to enhance dissolution in aqueous medium, *Pharmaceutics* **10** (2018) 108.
 42. M. Rodrigues, B. Baptista, J. A. Lopes, M. C. Sarraguça, Pharmaceutical cocrystallization techniques. Advances and challenges, *Int. J. Pharm.* **547** (2018) 404–420.
 43. N. Qiao, M. Li, W. Schlindwein, N. Malek, A. Davies, G. Trappitt, Pharmaceutical cocrystals: An overview, *Int. J. Pharm.* **419** (2011) 1–11.
 44. R. K. Ameta, K. Soni, A. Bhattarai, Recent Advances in Improving the Bioavailability of Hydrophobic/Lipophilic Drugs and Their Delivery via Self-Emulsifying Formulations, *Colloids Interfaces* **7** (2023) 16.
 45. P. Joyce, T. J. Dening, T. R. Meola, H. B. Schultz, R. Holm, N. Thomas, C. A. Prestidge, Solidification to improve the biopharmaceutical performance of SEDDS: Opportunities and challenges, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **142** (2019) 102–117.
 46. I. Maji, S. Mahajan, A. Sriram, P. Medtiya, R. Vasave, D. K. Khatri, R. Kumar, S. B.

- Singh, J. Madan, P. K. Singh, Solid self emulsifying drug delivery system: Superior mode for oral delivery of hydrophobic cargos, *J. Control. Release* **337** (2021) 646–660.
47. B. Ghosh, S. Biswas, Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art, *J. Control. Release* **332** (2021) 127–147.
48. M. Ghezzi, S. Pescina, C. Padula, P. Santi, E. Del Favero, L. Cantù, S. Nicoli, Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions, *J. Control. Release* **332** (2021) 312–336.
49. Y. H. A. Hussein, M. Youssry, Polymeric micelles of biodegradable diblock copolymers: Enhanced encapsulation of hydrophobic drugs, *Materials (Basel)*. **11** (2018) 688.
50. D. Hwang, J. D. Ramsey, A. V. Kabanov, Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **156** (2020) 80–118.
51. H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, W. Alshaer, Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications, *Heliyon* **8** (2022) e09394.
52. M. Haider, S. M. Abdin, L. Kamal, G. Orive, Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review, *Pharmaceutics* **12** (2020) 288.
53. D. J. McClements, Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals, *Biotechnol. Adv.* **38** (2020) 107287.
54. A. Gordillo-Galeano, C. E. Mora-Huertas, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **133** (2018) 285–308.
55. Y. Duan, A. Dhar, C. Patel, M. Khimani, S. Neogi, P. Sharma, N. Siva Kumar, R. L. Vekariya, A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems, *RSC Adv.* **10** (2020) 26777–26791.
56. A. S. Chauhan, Dendrimers for Drug Delivery, *Molecules* **23** (2018) 938.
57. A. P. Sherje, M. Jadhav, B. R. Dravyakar, D. Kadam, Dendrimers: A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting, *Int. J. Pharm.* **548** (2018) 707–720.
58. A. Aurelia Chis, C. Dobrea, C. Morgovan, A. M. Arseniu, L. L. Rus, A. Butuca, A. M. Juncan, M. Totan, A. L. Vonica-Tincu, G. Cormos, A. C. Muntean, M. L. Muresan, F. G. Gligor, A. Frum, Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine, *Molecules* **25** (2020) 3982.

59. G. Kali, S. Haddadzadegan, A. Bernkop-Schnürch, Cyclodextrins and derivatives in drug delivery: New developments, relevant clinical trials, and advanced products, *Carbohydr. Polym.* **324** (2024) 121500.
60. N. Morin-Crini, S. Fourmentin, É. Fenyvesi, E. Lichtfouse, G. Torri, M. Fourmentin, G. Crini, 130 Years of Cyclodextrin Discovery for Health, Food, Agriculture, and the Industry: a Review, *Environ. Chem. Lett.* **19** (2021) 2581–2617.
61. M. E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59** (2007) 645–666.
62. T. Loftsson, M. E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607–1621.
63. B. G. Poulson, Q. A. Alsulami, A. Sharfalddin, E. F. El Agammy, F. Mouffouk, A.-H. Emwas, L. Jaremko, M. Jaremko, Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications, *Polysaccharides* **3** (2022) 1–31.
64. T. Loftsson, H. H. Sigurdsson, P. Jansook, Anomalous Properties of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions, *Materials (Basel)* **16** (2023) 2223.
65. A. C. Pereira, A. E. F. Oliveira, G. B. Bettio, β -Cyclodextrin electropolymerization: mechanism, electrochemical behavior, and optimization, *Chem. Pap.* **73** (2019) 1795–1804.
66. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, T. Loftsson, Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes, *Molecules* **23** (2018) 1161.
67. X. Kou, Y. Zhang, D. Su, H. Wang, X. Huang, Y. Niu, Q. Ke, Z. Xiao, Q. Meng, Study on host-guest interaction of aroma compounds/ γ -cyclodextrin inclusion complexes, *Lwt* **178** (2023) 114589.
68. S. V. Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* **453** (2013) 167–180.
69. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 272–284.
70. T. Loftsson, P. Saokham, A. R. Sá Couto, Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes in aqueous solutions, *Int. J. Pharm.* **560** (2019) 228–234.
71. T. Wang, D. Zhang, D. Sun, J. Gu, Current status of in vivo bioanalysis of nano drug delivery systems, *J. Pharm. Anal.* **10** (2020) 221–232.
72. L. Szenté, J. Szejtli, Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36** (1999) 17–28.

73. V. J. Stella, R. A. Rajewski, Sulfobutylether- β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* **583** (2020) 119396.
74. J. Huang, X. Wang, T. Huang, Y. Yang, J. Tu, J. Zou, H. Yang, R. Yang, Application of sodium sulfobutylether- β -cyclodextrin based on encapsulation, *Carbohydr. Polym.* **333** (2024) 121985.
75. J. Rincón-López, Y. C. Almanza-Arjona, A. P. Riascos, Y. Rojas-Aguirre, Technological evolution of cyclodextrins in the pharmaceutical field, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **61** (2021) 102156.
76. E. M. M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses : a review, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
77. T. Loftsson, M. E. Brewster, Cyclodextrins as Functional Excipients : Methods to Enhance Complexation Efficiency, *J. Pharm. Sci.* **101** (2012) 3019–3032.
78. T. Loftsson, M. Másson, M. E. Brewster, Self-Association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes, *J. Pharm. Sci.* **93** (2004) 1091–1099.
79. T. Higuchi, K. Connors, *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* (Interscience Publishers, John Wiley & Sons, Inc., 1964).
80. T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, *Int. J. Pharm.* **302** (2005) 18–28.
81. T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, The complexation efficiency, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **57** (2007) 545–552.
82. V. Aiassa, C. Garnerio, A. Zoppi, M. R. Longhi, Cyclodextrins and Their Derivatives as Drug Stability Modifiers, *Pharmaceuticals* **16** (2023) 1074.
83. D. Boczar, K. Michalska, Cyclodextrin Inclusion Complexes with Antibiotics and Antibacterial Agents as Drug-Delivery Systems—A Pharmaceutical Perspective, *Pharmaceutics* **14** (2022) 1389.
84. A. Popielec, T. Loftsson, Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs, *Int. J. Pharm.* **531** (2017) 532–542.
85. A. Popielec, Fenyvesi, K. Yannakopoulou, T. Lofton, Effect of cyclodextrins on the degradation rate of benzylpenicillin, *Pharmazie* **71** (2016) 68–75.
86. A. Popielec, M. Agnes, K. Yannakopoulou, É. Fenyvesi, T. Loftsson, Effect of β - and γ -cyclodextrins and their methylated derivatives on the degradation rate of benzylpenicillin, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **91** (2018) 199–209.

87. C. Garnero, M. Longhi, Study of ascorbic acid interaction with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine, separately and in combination, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45** (2007) 536–545.
88. P. Saokham, K. Burapapadh, P. Praphanwittaya, T. Loftsson, Characterization and evaluation of ternary complexes of ascorbic acid with γ -cyclodextrin and poly(Vinyl alcohol), *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 4399.
89. G. Blaschke, E. Lamparter, J. Schlüter, Racemization and hydrolysis of tropic acid alkaloids in the presence of cyclodextrins, *Chirality* **5** (1993) 78–83.
90. X. Wang, V. Parvathaneni, S. K. Shukla, D. D. Kanabar, A. Muth, V. Gupta, Cyclodextrin Complexation for Enhanced Stability and Non-invasive Pulmonary Delivery of Resveratrol—Applications in Non-small Cell Lung Cancer Treatment, *AAPS PharmSciTech* **21** (2020) 183.
91. L. Matilainen, K. Lambersten Larsen, R. Wimmer, P. Keski-Rahkonen, S. Auriola, T. Jarvinen, P. Jarho, The Effect of Cyclodextrins on Chemical and Physical Stability of Glucagon and Characterization of Glucagon/ γ -CD Inclusion Complexes, *J. Pharm. Sci.* **97** (2007) 2720–2729.
92. P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 238–250.
93. M. Kfoury, D. Landy, S. Fourmentin, Characterization of cyclodextrin/volatile inclusion complexes: A review, *Molecules* **23** (2018) 1204.
94. D. Landy u S. Fourmentin, G. Crini, E. Lichtfouse (ur.), Measuring Binding Constants of Cyclodextrin Inclusion Compounds, *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis (Environmental Chemistry for a Sustainable World)*, Vol. 16, Springer International Publishing AG, Cham, 2018, str. 223.
95. R. Wang, Z. Yu, Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method, *Acta Physico-Chimica Sin.* **23** (2007) 1353–1359.
96. K. Bouchemal, New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry, *Drug Discov. Today* **13** (2008) 960–972.
97. K. Bouchemal, S. Mazzaferro, How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions, *Drug Discov. Today* **17** (2012) 623–629.
98. C. Schönbeck, J. Kari, P. Westh, ITC analysis of polydisperse systems: Unravelling the

- impact of sample heterogeneity, *Anal. Biochem.* **687** (2023) 115446.
99. J. L. Casas-Hinestroza, M. Bueno, E. Ibáñez, A. Cifuentes, Recent advances in mass spectrometry studies of non-covalent complexes of macrocycles - A review, *Anal. Chim. Acta* **1081** (2019) 32–50.
100. M. Sillion, A. Fifere, A. L. Lungoci, N. L. Marangoci, S. A. Ibanescu, R. Zonda, A. Rotaru, M. Pinteală u A. G. Woods, C. C. Darie (ur.), Mass Spectrometry as a Complementary Approach for Noncovalently Bound Complexes Based on Cyclodextrins, *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, Vol. 1140, Springer International Publishing AG, Cham, 2019, str. 685.
101. E. Zlibut, J. C. May, Y. Wei, D. Gessmann, C. S. Wood, B. A. Bernat, T. E. Pugh, L. Palmer-Jones, R. P. Cosquer, E. Dybeck, J. A. McLean, Noncovalent Host-Guest Complexes of Artemisinin with α -, β -, and γ - Cyclodextrin Examined by Structural Mass Spectrometry Strategies, *Anal. Chem.* **95** (2023) 8180–8188.
102. P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 226–238.
103. M. Jug, P. A. Mura, Grinding as solvent-free green chemistry approach for cyclodextrin inclusion complex preparation in the solid state, *Pharmaceutics* **10** (2018) 189.
104. A. H. Mazurek, Ł. Szeleszczuk, A Review of Applications of Solid-State Nuclear Magnetic Resonance (ssNMR) for the Analysis of Cyclodextrin-Including Systems, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 3648.
105. F. Raposo, C. Ibelli-Bianco, Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **129** (2020) 115913.
106. ICH, Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (1995).
107. ICH, Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures (2024).
108. S. Makar, T. Saha, S. K. Singh, Naphthalene, a versatile platform in medicinal chemistry: Sky-high perspective, *Eur. J. Med. Chem.* **161** (2019) 252–276.
109. S. M. Kawish, S. Ahmed, A. Gull, M. Aslam, J. Pandit, M. Aqil, Y. Sultana, Development of nabumetone loaded lipid nano-scaffold for the effective oral delivery; optimization, characterization, drug release and pharmacodynamic study, *J. Mol. Liq.* **231** (2017) 514–522.
110. S. Chaudhary, M. Aqil, Y. Sultana, M. A. Kalam, Self-nanoemulsifying drug delivery

- system of nabumetone improved its oral bioavailability and anti-inflammatory effects in rat model, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **51** (2019) 736–745.
111. T. Hedner, O. Samulesson, P. Währborg, H. Wadenvik, K. A. Ung, A. Ekblom, *Drugs* **64** (2004) 2315–2343.
112. Y. Guo, H. Lee, H. Jeong u J. Sun (ur.), Gut microbiota in reductive drug metabolism, *The Microbiome in Health and Disease (Progress in Molecular Biology and Translational Science)*, Vol. 171, Elsevier B.V., Amsterdam, 2020, str. 61.
113. K. Matsumoto, T. Hasegawa, K. Ohara, C. Takei, T. Kamei, J. Koyanagi, T. Takahashi, M. Akimoto, A metabolic pathway for the prodrug nabumetone to the pharmacologically active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA) by non-cytochrome P450 enzymes, *Xenobiotica* **50** (2020) 783–792.
114. R. Kumar, A. Singh, N. Garg, P. F. Siril, Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Ultrason. Sonochem.* **40** (2018) 686–696.
115. D. J. Goodwin, L. G. Martini, M. J. Lawrence, Production of nabumetone nanoparticles: Effect of molecular weight, concentration and nature of cellulose ether stabiliser, *Int. J. Pharm.* **514** (2016) 428–444.
116. D. S. Frank, A. J. Matzger, Probing the Interplay between Amorphous Solid Dispersion Stability and Polymer Functionality, *Mol. Pharm.* **15** (2018) 2714–2720.
117. N. Goyenechea, M. Sánchez, I. Vélaz, C. Martín, C. Martínez-Ohárriz, A. Zornoza, Interactions of nabumetone with cyclodextrins in solution and in the solid state, *J. Incl. Phenom.* **44** (2002) 283–288.
118. M. Valero, S. M. B. Costa, J. R. Ascenso, M. M. Velázquez, L. J. Rodríguez, Complexation of the non-steroidal anti-inflammatory drug Nabumetone with modified and unmodified cyclodextrins, *J. Incl. Phenom.* **35** (1999) 663–677.
119. N. Goyenechea, M. Sánchez, I. Vélaz, C. Martín, M. C. Martínez-Ohárriz, G. González-Gaitano, Inclusion complexes of nabumetone with β -cyclodextrins: Thermodynamics and molecular modelling studies. Influence of sodium perchlorate, *Luminescence* **16** (2001) 117–127.
120. N. A. F. Al-Rawashdeh, Interactions of nabumetone with γ -cyclodextrin studied by fluorescence measurements, *J. Incl. Phenom.* **51** (2005) 27–32.
121. M. Valero, J. Tejedor, L. J. Rodríguez, Encapsulation of nabumetone by means of -drug:

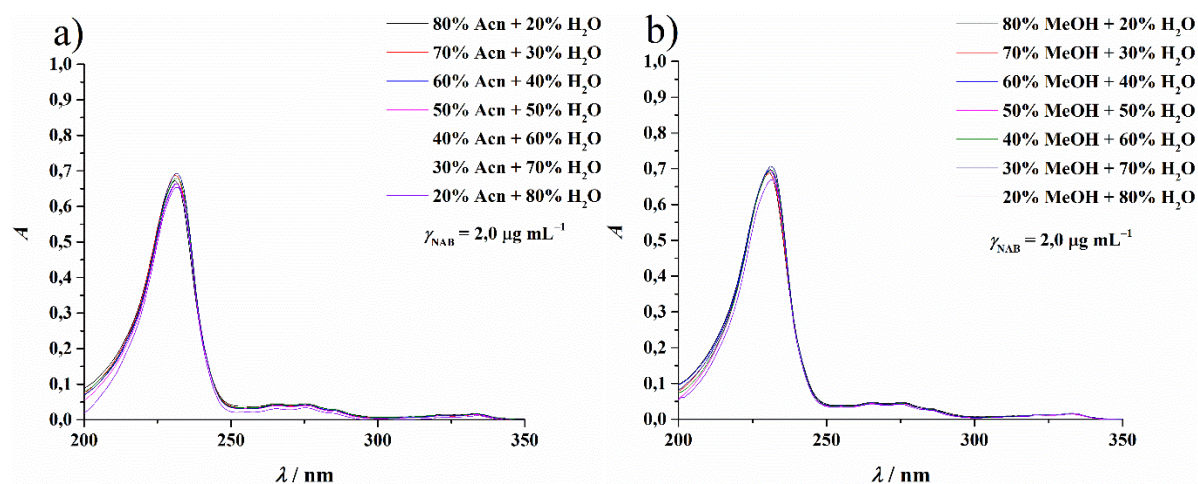
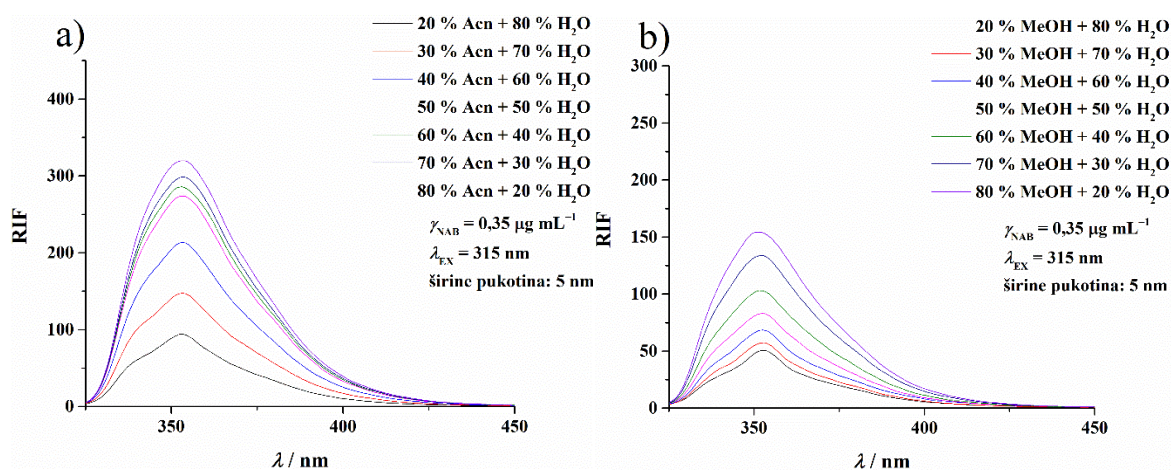
- (β -cyclodextrin)₂:polyvinylpyrrolidone ternary complex formation, *J. Lumin.* **126** (2007) 297–302.
122. N. A. Todorova, F. P. Schwarz, The role of water in the thermodynamics of drug binding to cyclodextrin, *J. Chem. Thermodyn.* **39** (2007) 1038–1048.
123. W. Chen, C. E. Chang, M. K. Gilson, Calculation of cyclodextrin binding affinities: Energy, entropy, and implications for drug design, *Biophys. J.* **87** (2004) 3035–3049.
124. L. Wickstrom, P. He, E. Gallicchio, R. M. Levy, Large scale affinity calculations of cyclodextrin host-guest complexes: Understanding the role of reorganization in the molecular recognition process, *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 3136–3150.
125. D. Suárez, N. Díaz, Conformational and entropy analyses of extended molecular dynamics simulations of α -, β - and γ -cyclodextrins and of the β -cyclodextrin/nabumetone complex, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19** (2017) 1431–1440.
126. N. Bensouilah, B. Boutemour-Kheddis, H. Bensouilah, I. Meddour, M. Abdaoui, Host-guest complex of nabumetone: β -cyclodextrin: quantum chemical study and QTAIM analysis, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **87** (2017) 191–206.
127. European pharmacopoeia, *Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare* (2019).
128. <https://reference.medscape.com/drug/relafen-nabumetone-343295>. (datum pristupa 15.05.2024.)
129. ICH, Q1A(R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products (2003).
130. ICH, Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products (1998).
131. N. Mataga, M. Tomura, H. Nishimura, Fluorescence decay times of naphthalene and naphthalene excimers, *Mol. Phys.* **9** (1965) 367–375.
132. F. P. Schwarz, S. P. Wasik, Fluorescence Measurements of Benzene, Naphthalene, Anthracene, Pyrene, Fluoranthene, and Benzo[e]pyrene in Water, *Anal. Chem.* **48** (1976) 524–528.
133. M. Valero, S. M. B. Costa, Photodegradation of Nabumetone in aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **157** (2003) 93–101.
134. M. Valero, Photodegradation of Nabumetone in n-butanol solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **163** (2004) 159–164.
135. M. Valero, P. P. Levin, N. B. Sultimova, J. E. Houston, Photochemistry of nabumetone

- in aqueous solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles, *J. Mol. Liq.* **319** (2020) 114093.
136. N. Al-Dubaili, N. Saleh, Sequestration effect on the open-cyclic switchable property of warfarin induced by cyclodextrin: Time-resolved fluorescence study, *Molecules* **22** (2017) 1326.
137. T. Sivasankar, A. Antony Muthu Prabhu, M. Karthick, N. Rajendiran, Encapsulation of vanillylamine by native and modified cyclodextrins: Spectral and computational studies, *J. Mol. Struct.* **1028** (2012) 57–67.
138. Y. Sueishi, T. Fujita, S. Nakatani, N. Inazumi, Y. Osawa, The enhancement of fluorescence quantum yields of anilino naphthalene sulfonic acids by inclusion of various cyclodextrins and cucurbit[7]uril, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **114** (2013) 344–349.
139. P. S. Bruni, S. Schürch, Fragmentation mechanisms of protonated cyclodextrins in tandem mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* **504** (2021) 108316.
140. K. Fukui, A. Kameyama, Y. Mukai, K. Takahashi, N. Ikeda, Y. Akiyama, H. Narimatsu, A computational study of structure-reactivity relationships in Na-adduct oligosaccharides in collision-induced dissociation reactions, *Carbohydr. Res.* **341** (2006) 624–633.
141. H. Suzuki, A. Kameyama, K. Tachibana, H. Narimatsu, K. Fukui, Computationally and experimentally derived general rules for fragmentation of various glycosyl bonds in sodium adduct oligosaccharides, *Anal. Chem.* **81** (2009) 1108–1120.
142. M. Másson, T. Loftsson, S. Jónsdóttir, H. Fridriksdóttir, D. S. Petersen, Stabilisation of ionic drugs through complexation with non-ionic and ionic cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* **164** (1998) 45–55.
143. D. Klarić, M. Kelrajter, A. Čikoš, A. Budimir, N. Galić, Inclusion complexes of nabumetone with β -cyclodextrins: Spectroscopic, spectrometric and calorimetric studies in solution, *J. Mol. Liq.* **397** (2024) 124152.
144. M. Türk, D. Bolten, Polymorphic properties of micronized mefenamic acid, nabumetone, paracetamol and tolbutamide produced by rapid expansion of supercritical solutions (RESS), *J. Supercrit. Fluids* **116** (2016) 239–250.
145. L. J. Chyall, J. M. Tower, D. A. Coates, T. L. Houston, S. L. Childs, Polymorph Generation in Capillary Spaces: The Preparation and Structural Analysis of a Metastable

- Polymorph of Nabumetone, *Cryst. Growth Des.* **2** (2002) 505–510.
146. C. P. Price, A. L. Grzesiak, M. Lang, A. J. Matzger, Polymorphism of Nabumetone, *Cryst. Growth Des.* **2** (2002) 501–503.
147. P. Govindasamy, S. Gunasekaran, Experimental and theoretical studies of (FT-IR, FT-Raman, UV-Visible and DFT) 4-(6-methoxynaphthalen-2-yl) butan-2-one, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **149** (2015) 800–811.
148. C. Cannavà, V. Crupi, P. Ficarra, M. Guardo, D. Majolino, R. Stancanelli, V. Venuti, Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008) 172–178.
149. J. Jablan, G. Szalontai, M. Jug, Comparative analysis of zaleplon complexation with cyclodextrins and hydrophilic polymers in solution and in solid state, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **71** (2012) 35–44.
150. D. A. Diaz, S. T. Colgan, C. S. Langer, N. T. Bandi, M. D. Likar, L. Van Alstine, Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations?, *AAPS J.* **18** (2016) 15–22.
151. J. Muselík, A. Komersová, K. Kubová, K. Matzick, B. Skalická, A critical overview of FDA and EMA statistical methods to compare in vitro drug dissolution profiles of pharmaceutical products, *Pharmaceutics* **13** (2021) 1703.
152. T. Zelesky, S. W. Baertschi, C. Foti, L. R. Allain, S. Hostyn, J. R. Franca, Y. Li, S. Marden, S. Mohan, M. Ultramari, Z. Huang, N. Adams, J. M. Campbell, P. J. Jansen, D. Kotoni, C. Laue, Pharmaceutical Forced Degradation (Stress Testing) Endpoints: A Scientific Rationale and Industry Perspective, *J. Pharm. Sci.* **112** (2023) 2948–2964.
153. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 148–173.
154. M. Narayanam, T. Handa, P. Sharma, S. Jhajra, P. K. Muthe, P. K. Dappili, R. P. Shah, S. Singh, Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2013) 191–217.
155. B. West, C. Joblin, V. Blanchet, A. Bodi, B. Sztáray, P. M. Mayer, On the dissociation of the naphthalene radical cation: New iPEPICO and tandem mass spectrometry results, *J. Phys. Chem. A* **116** (2012) 10999–11007.

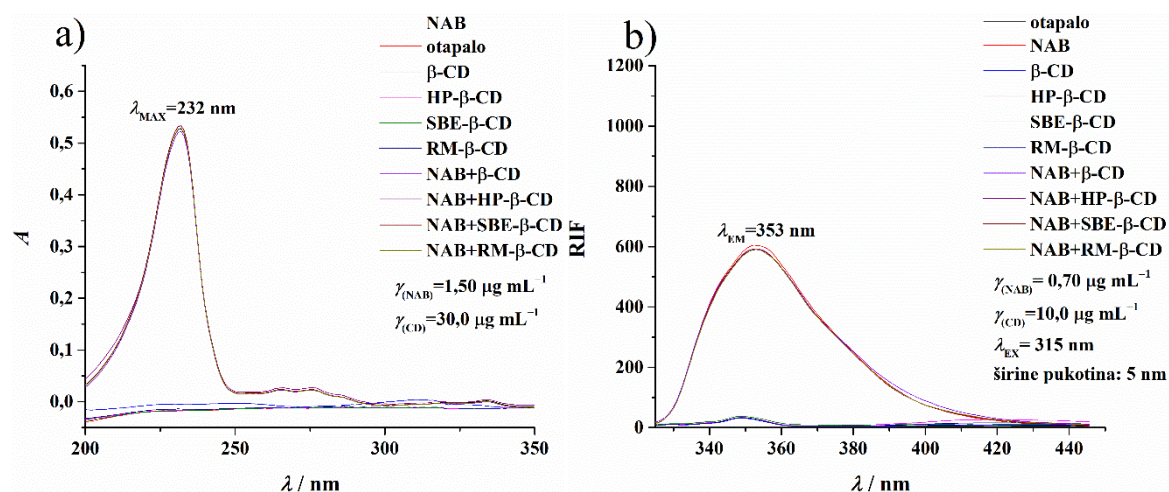
156. E. Fornal, Formation of odd-electron product ions in collision-induced fragmentation of electrospray-generated protonated cathinone derivatives: Aryl α -primary amino ketones, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27** (2013) 1858–1866.
157. L. Szente, J. Szemán, T. Sohajda, Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **130** (2016) 347–365.
158. P. Harmon, G. Boccardi u S. W. Baertschi, K. M. Alsante, R. A. Reed, *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*, Vol. 2, CRC Press-Informa Healthcare, 2011, str 168.

§ 8. DODATAK

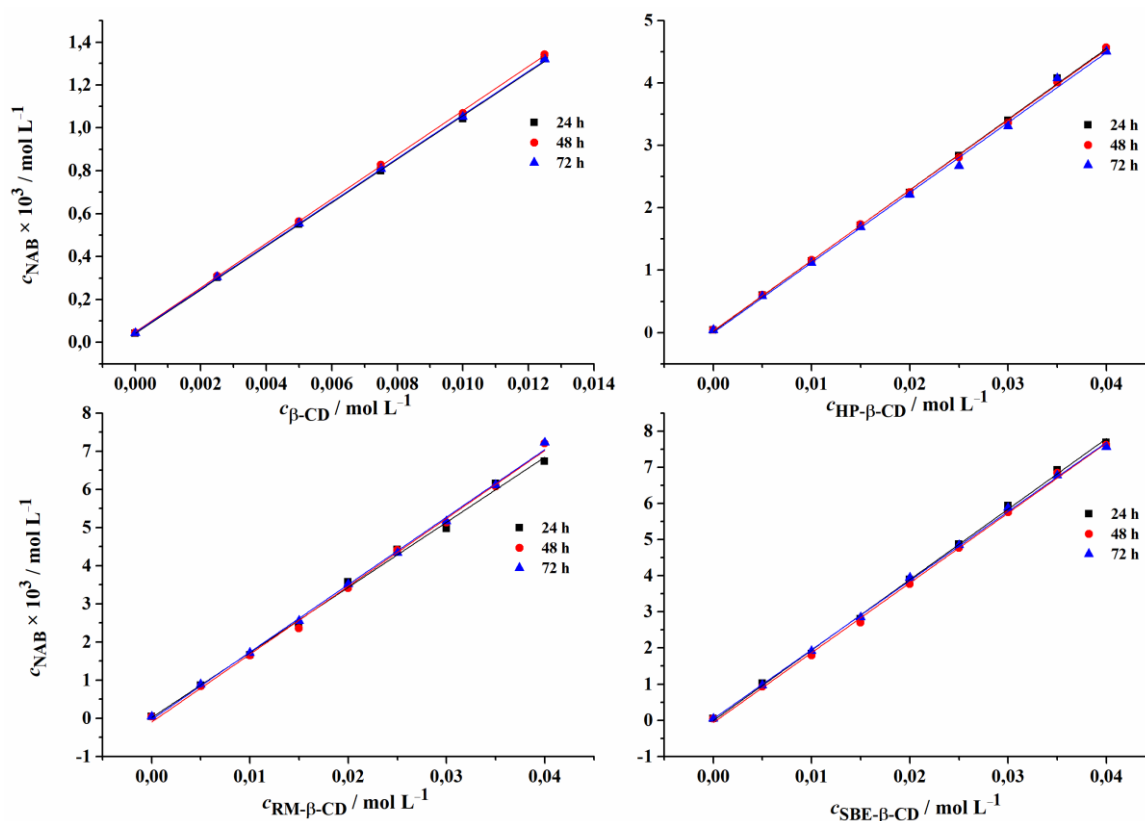
Slika D1. ApSORPCIJSKI spektri NAB u smjesi otapala a) acetonitrila i H₂O te b) metanola i H₂O.Slika D2. Emisijski spektri NAB u smjesi otapala a) acetonitrila i H₂O te b) metanola i H₂O; $\lambda_{EX} = 315$ nm, širine pukotina: 5 nm.

Tablica D1. Validacijski parametri razvijene spektrofotometrijske i spektrofluorimetrijske metode za kvantitativno određivanje NAB u prisutnosti različitih β -CD.

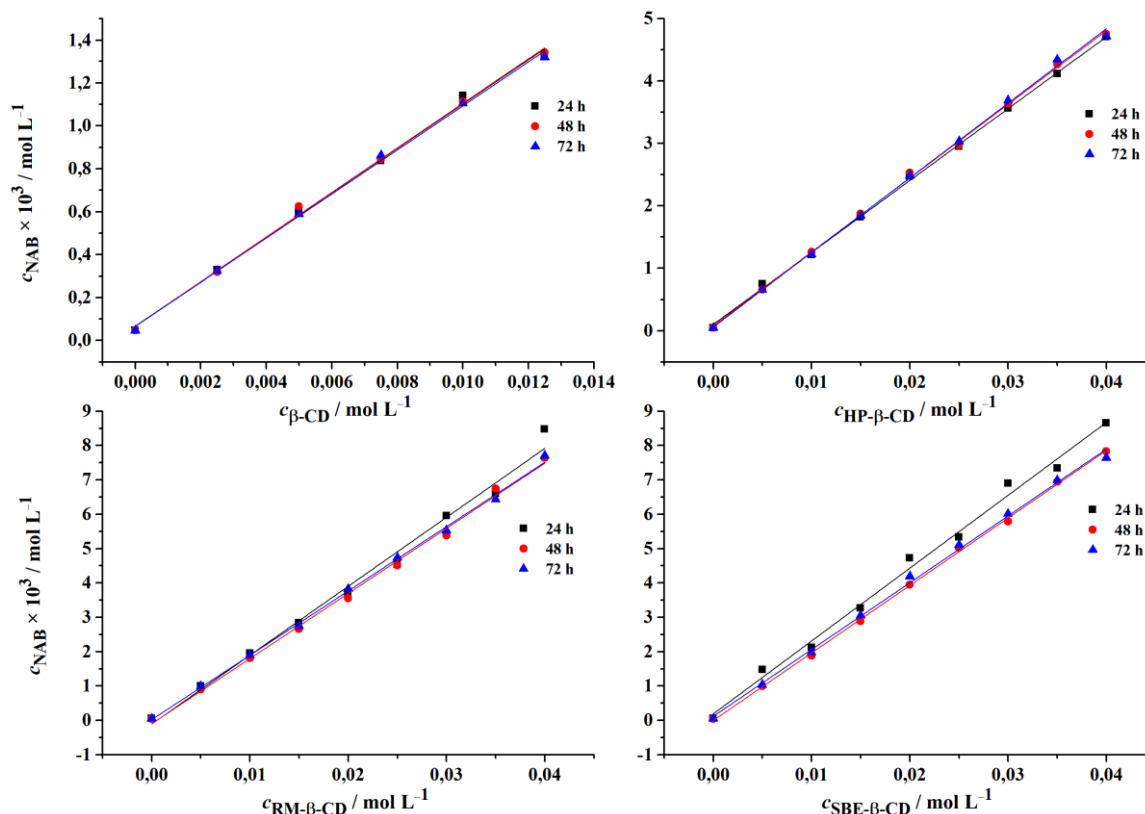
	UV/Vis spektrofotometrija	Fluorescencijska spektroskopija
Linearnost	$y = 0,3530x - 0,0232$ $R^2 = 0,9999$	$y = 794,4497x + 24,1822$ $R^2 = 0,9997$
Raspon - $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,25 – 4,0	0,05 – 1,20
LOD - $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,03	0,02
LOQ - $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,09	0,05
Ponovljivost	$\text{RSD} \leq 1\%$	$\text{RSD} \leq 3,02\%$
Međupreciznost	$\text{RSD} = 0,31\%$	$\text{RSD} = 0,95\%$
Preciznost instrumenta	$\text{RSD} \leq 0,14\%$	$\text{RSD} \leq 0,53\%$



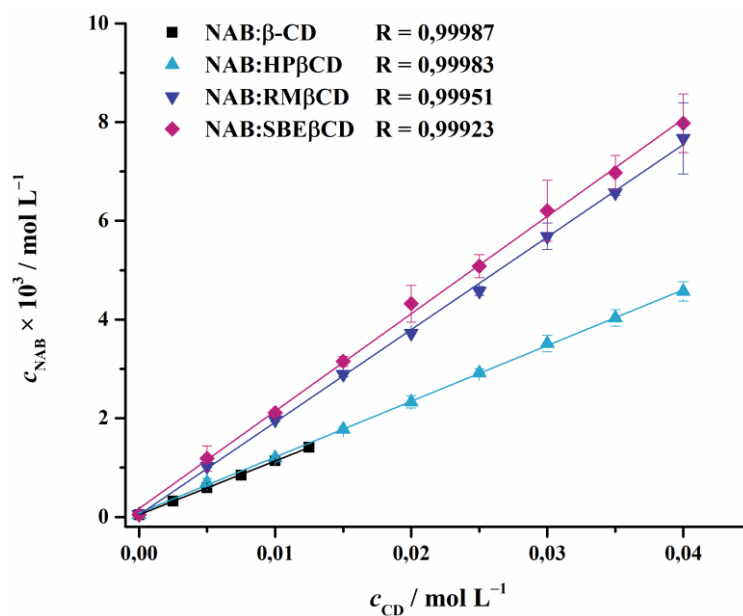
Slika D3. Utjecaj prisutnosti različitih β -CD na a) apsorpcijski i b) emisijski spektar NAB.



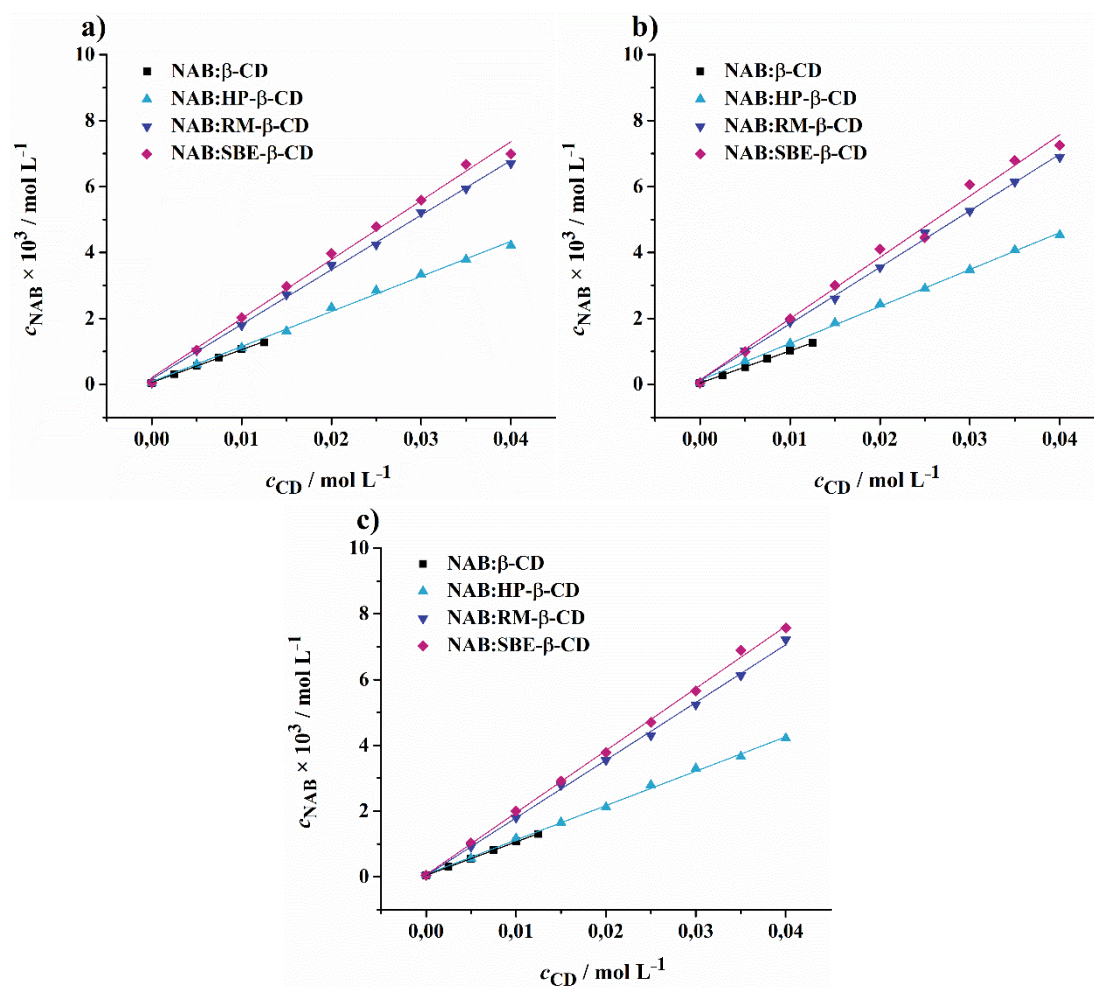
Slika D4. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije NAB otopljenog o koncentraciji CD; mjereno spektrofotometrijski 24, 48 i 72 h od pripreve suspenzija u vodi.



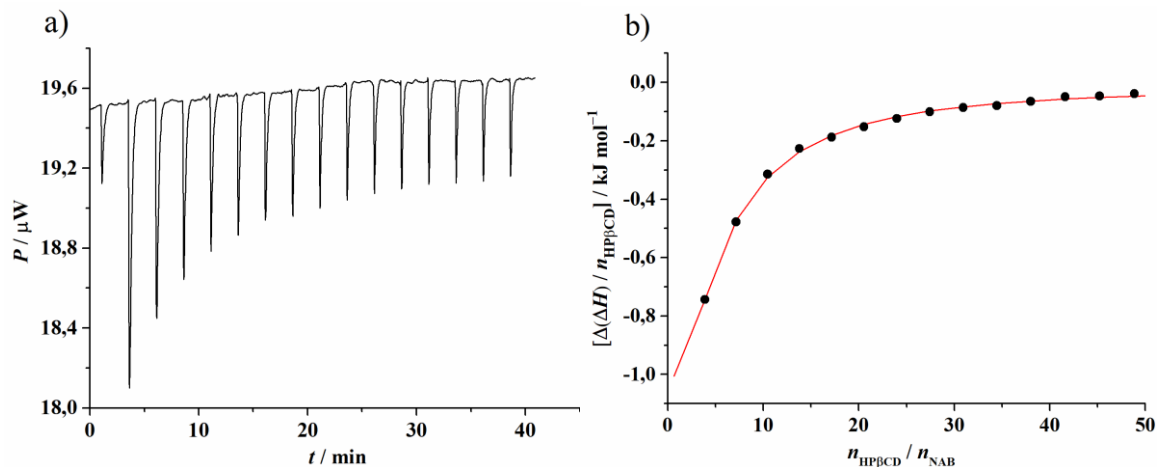
Slika D5. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije otopljenog NAB o koncentraciji CD; mjereno spektrofotometrijski 24, 48 i 72 h od pripreve suspenzija u vodi.



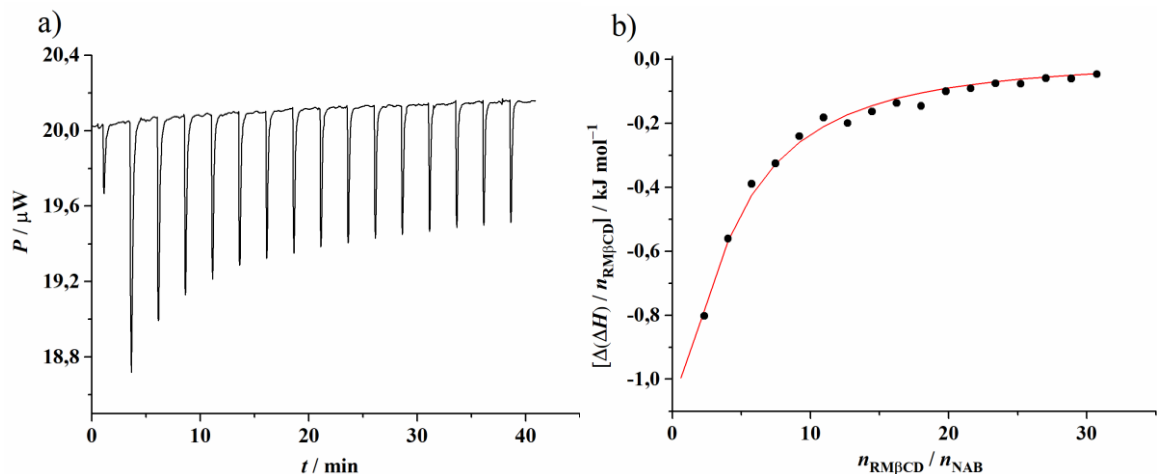
Slika D6. Dijagram topljivosti nabumetona u prisutnosti različitih β -CD; mjereno spektrofotometrijski 24 h od pripreve suspenzija u vodi ($N = 3$).



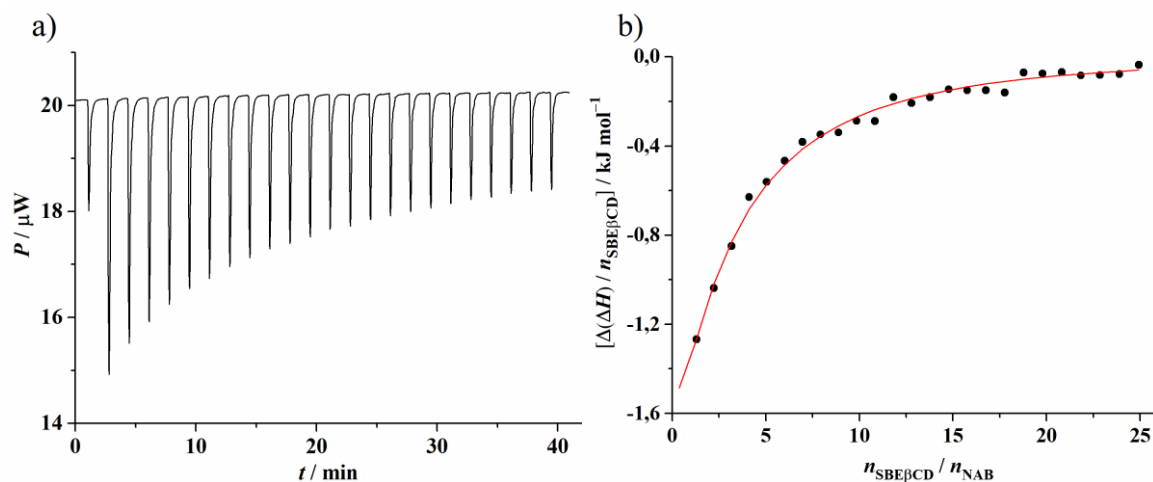
Slika D7. Dijagrami topljivosti NAB u prisutnosti različitih β -CD; spektrofotometrijski određena koncentracija 24 h od pripreve suspenzija u a) simuliranom želučanom mediju, b) simuliranom duodenalnom mediju i c) simuliranom intestinalnom mediju ($N = 1$).



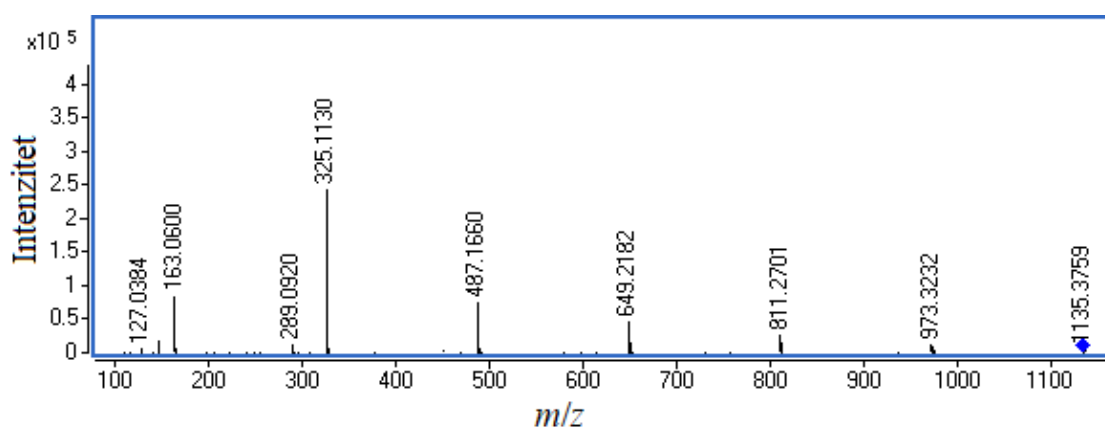
Slika D8. a) Termogram mikrokolorimetrijske titracije NAB ($c_0 = 43,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $V_0 = 200 \mu\text{L}$) s HP- β -CD ($c_0 = 14,30 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$; b) Ovisnost normaliziranih sukcesivnih promjena entalpije o molaranom omjeru HP- β -CD-NAB. ● eksperimentalno; – izračunato.



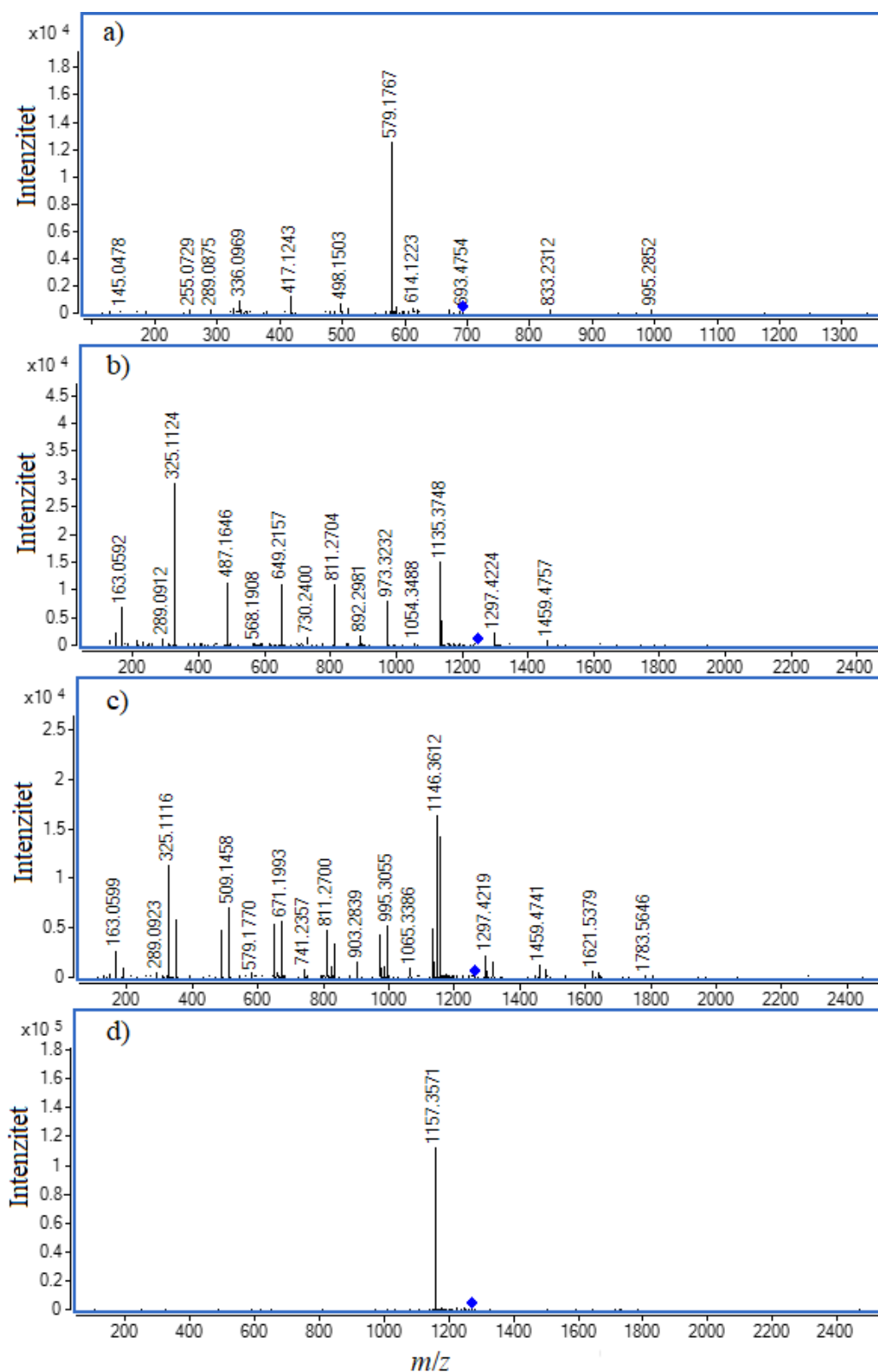
Slika D9. a) Termogram mikrokolorimetrijske titracije NAB ($c_0 = 48,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $V_0 = 200 \mu\text{L}$) s RM- β -CD ($c_0 = 15,40 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$; b) Ovisnost normaliziranih sukcesivnih promjena entalpije o molaranom omjeru RM- β -CD-NAB. ● eksperimentalno; – izračunato.



Slika D10. a) Termogram mikrokalorimetrijske titracije NAB ($c_0 = 48,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $V_0 = 200 \mu\text{L}$) s SBE- β -CD ($c_0 = 9,26 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u H_2O pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$; b) Ovisnost normaliziranih sukcesivnih promjena entalpije o molarnom omjeru SBE- β -CD-NAB. ● eksperimentalno; – izračunato.



Slika D11. MS/MS spektar iona $[\beta\text{-CD+H}]^+$ (m/z 1135,3804). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora $350,0 \text{ V}$, kolizijski potencijal 20 V .



Slika D12. MS/MS spektri iona a) $[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ (m/z 693,2362), b) $[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 1249,4374), c) $[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ (m/z 1260,4285) i d) $[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{Na}]^{2+}$ (m/z 1271,4196). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 350,0 V, kolizijski potencijal 20 V.

Tablica D2. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ (m/z 693,2362) dobivenih pri kolizijskim potencijalima od 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	40 V	
1157,3494	0,10	-	9,01	$[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$
833,2389	-	1,28	11,25	$[\text{glc}_5+\text{Na}]^+$
671,1810	-	1,07	8,94	$[\text{glc}_4+\text{Na}]^+$
579,1767	100	100	-	$[\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
509,1375	-	2,68	59,82	$[\text{glc}_3+\text{Na}]^+$
498,1503	0,61	5,51	-	$[\text{glc}_6+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
417,1243	1,07	9,00	-	$[\text{glc}_5+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
347,0763	0,19	0,33	22,48	$[\text{glc}_2+\text{Na}]^+$
336,0969	1,77	6,98	25,19	$[\text{glc}_4+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
255,0725	-	1,29	100	$[\text{glc}_3+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
185,0940	-	-	11,09	$[\text{glc}+\text{Na}]^+$
174,0464	-	-	34,42	$[\text{glc}_2+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
163,0591	-	-	6,20	$[\text{glc}+\text{H}]^+$
145,0490	-	1,20	24,79	$[\text{glc}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$
127,0387	0,22	0,49	34,46	$[\text{glc}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$
109,0285	-	-	13,52	$[\text{glc}-3\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

Tablica D3. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 1249,4374) dobivenih pri kolizijskim potencijalima od 10, 20 i 40 V.

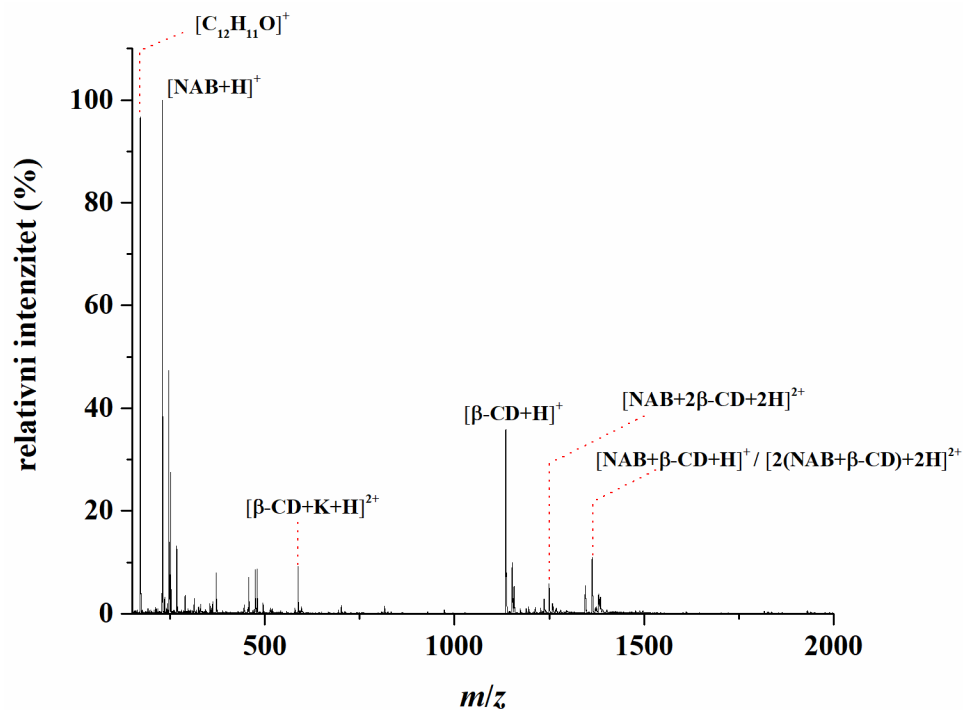
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	40 V	
1297,4224	2,66	7,62	-	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}+\text{H}]^+$
1249,4314	13,56	-	-	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+2\text{H}]^{2+}$
1240,4302	7,21	0,65	-	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}-\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$
1135,3748	100	51,46	-	$[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$
973,3232	8,52	27,37	1,66	$[\text{glc}_6+\text{H}]^+$
811,2704	7,20	37,54	2,87	$[\text{glc}_5+\text{H}]^+$
649,2157	4,37	37,96	5,36	$[\text{glc}_4+\text{H}]^+$
487,1646	4,94	38,74	12,68	$[\text{glc}_3+\text{H}]^+$
325,1124	15,37	100	100	$[\text{glc}_2+\text{H}]^+$
289,0905	0,23	3,51	6,02	$[\text{glc}_2-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$
163,0592	3,89	23,47	43,30	$[\text{glc}+\text{H}]^+$
145,0497	0,60	7,75	17,85	$[\text{glc}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$
127,0382	-	2,62	7,42	$[\text{glc}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

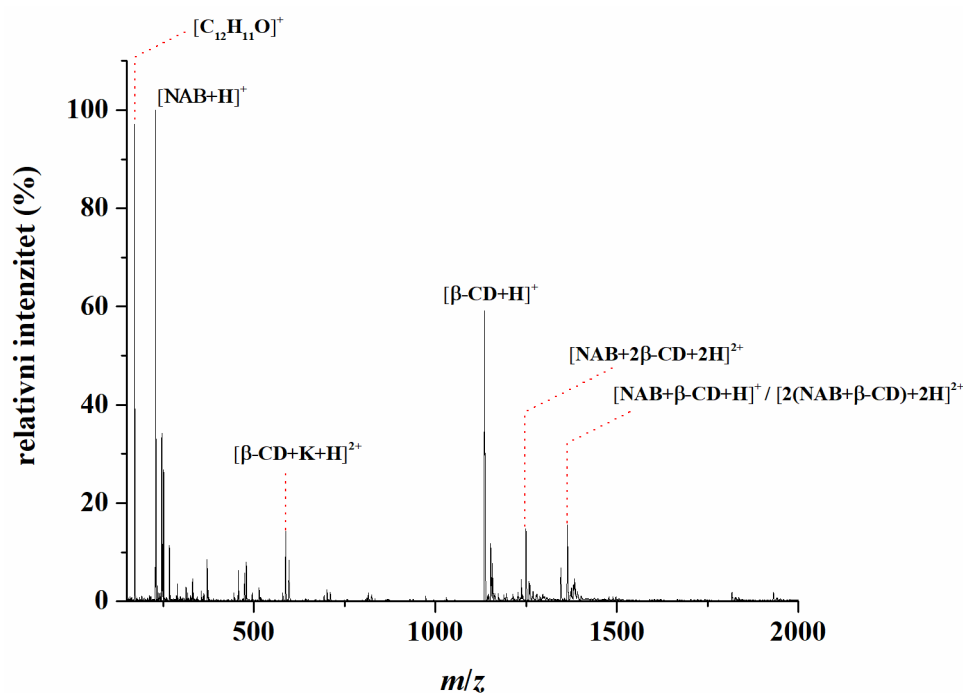
Tablica D4. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ (m/z 1260,4285) dobivenih pri kolizijskim potencijalima od 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	40 V	
1459,4741	0,78	7,33	-	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}_2+\text{H}]^+$
1319,4067	1,93	9,52	4,98	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}+\text{Na}]^+$
1297,4219	1,33	13,43	-	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}+\text{H}]^+$
1260,4238	15,88	-	-	$[\text{NAB}+2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
1157,3558	5,39	86,46	62,51	$[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$
1146,3612	100	100	21,96	$[2\beta\text{-CD}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
1135,3738	3,69	29,20	0,45	$[\beta\text{-CD}+\text{H}]^+$
1065,3386	2,48	5,50	-	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}_6+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
995,3055	2,12	31,20	11,88	$[\text{glc}_6+\text{Na}]^+$
984,3147	1,62	6,86	-	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}_5+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
973,3239	2,08	26,55	-	$[\text{glc}_6+\text{H}]^+$
903,2839	1,53	9,00	0,85	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}_4+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
833,2521	1,68	20,39	12,40	$[\text{glc}_5+\text{Na}]^+$
822,2587	0,53	6,24	-	$[\beta\text{-CD}+\text{glc}_3+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$
811,2700	2,17	29,15	2,95	$[\text{glc}_5+\text{H}]^+$
671,1993	2,68	34,86	11,22	$[\text{glc}_4+\text{Na}]^+$
649,2178	1,72	32,27	4,75	$[\text{glc}_4+\text{H}]^+$
509,1458	2,98	43,07	18,38	$[\text{glc}_3+\text{Na}]^+$
487,1638	1,70	29,05	17,10	$[\text{glc}_3+\text{H}]^+$
347,0946	1,33	35,69	21,80	$[\text{glc}_2+\text{Na}]^+$
325,1116	2,85	69,35	100	$[\text{glc}_2+\text{H}]^+$
289,0923	0,36	2,39	7,31	$[\text{glc}_2-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$
185,0419	-	5,84	4,59	$[\text{glc}+\text{Na}]^+$
163,0599	1,44	16,23	42,32	$[\text{glc}+\text{H}]^+$
145,0493	0,30	1,66	11,56	$[\text{glc}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$
127,0380	0,15	-	6,05	$[\text{glc}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$

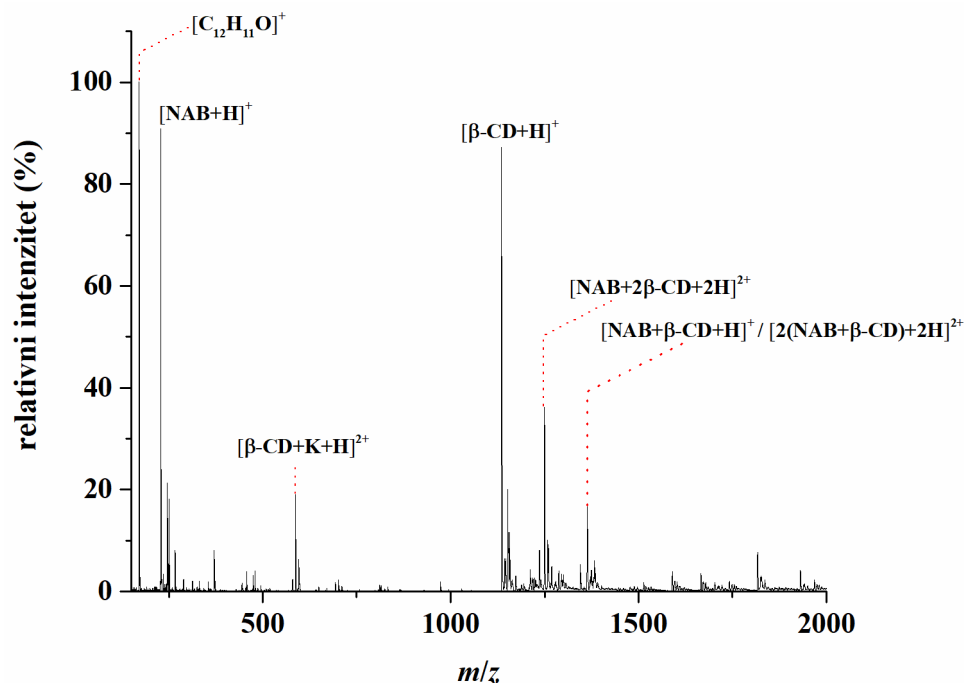
*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu



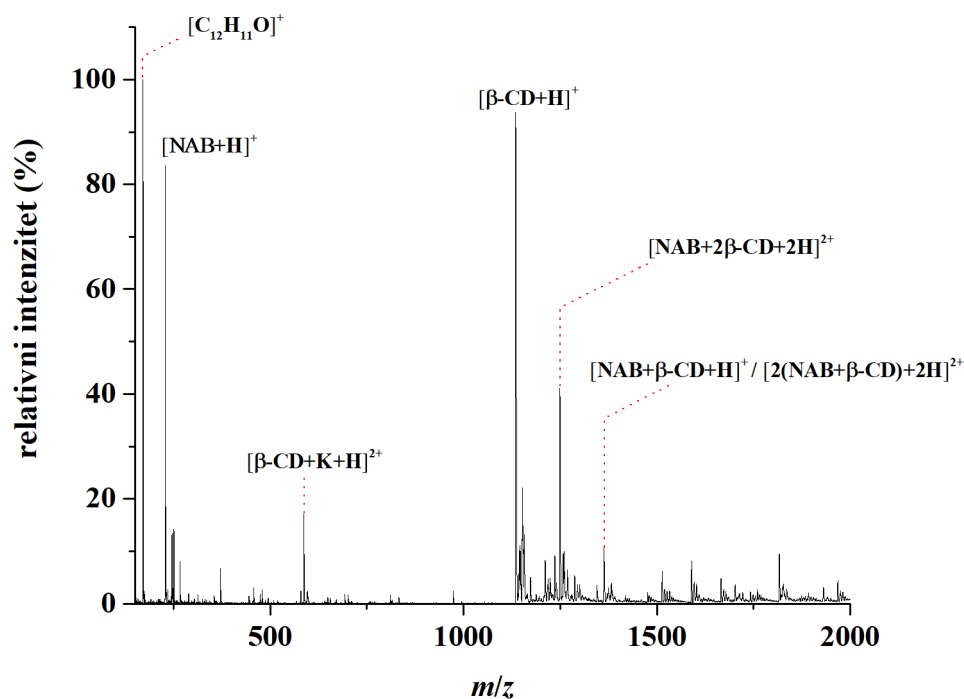
Slika D13. MS spektar otopine nabumetona ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i β -CD ($c = 8,80 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.



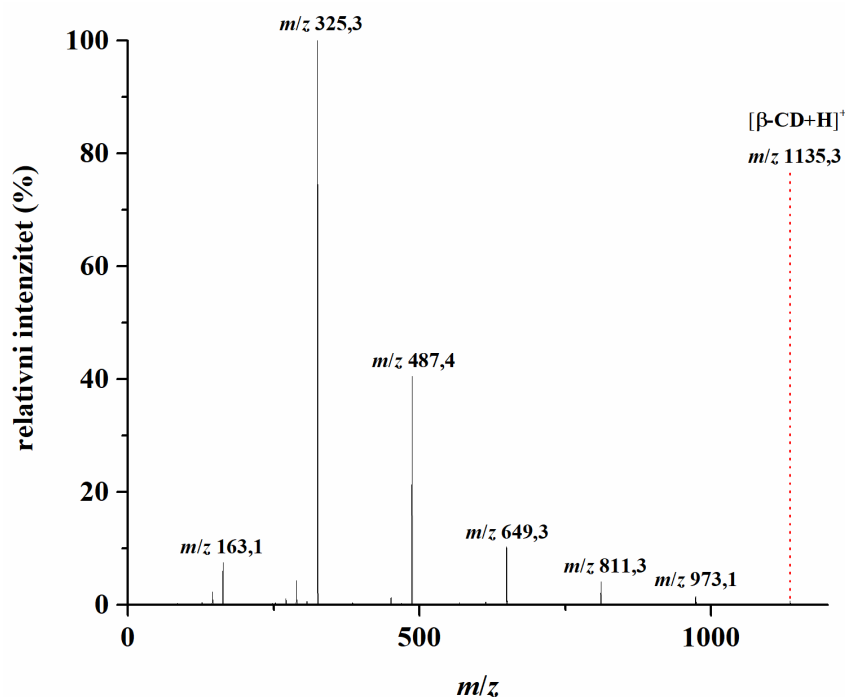
Slika D14. MS spektar otopine nabumetona ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i β -CD ($c = 2,20 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.



Slika D15. MS spektar otopine nabumetona ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i β -CD ($c = 8,80 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.



Slika D16. MS spektar otopine nabumetona ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i β -CD ($c = 2,20 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.



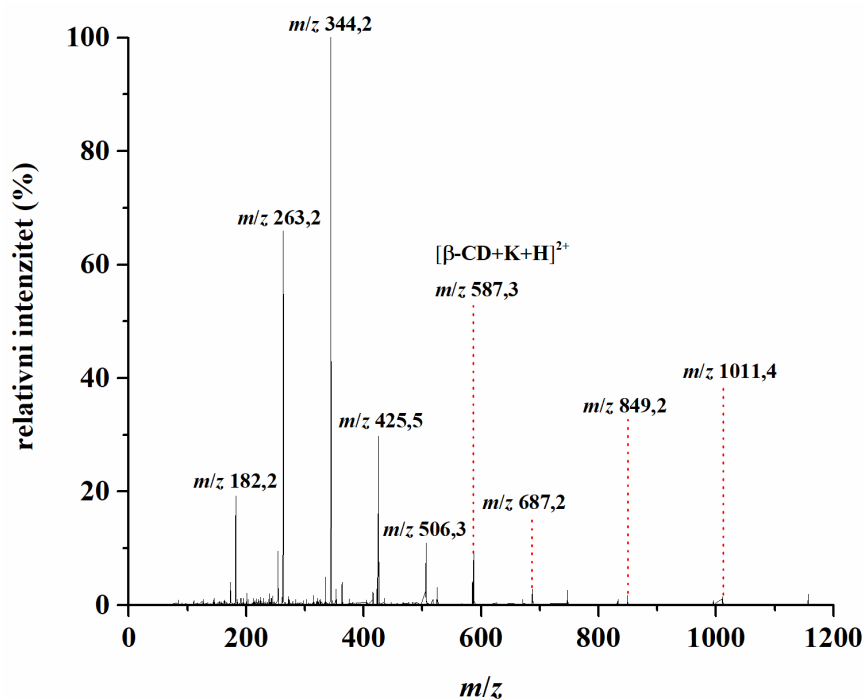
Slika D17. MS/MS spektar iona $[\beta\text{-CD+H}]^+$ (m/z 1135,0). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40 V.

Tablica D5. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\beta\text{-CD+H}]^+$ (m/z 1135,0) dobivenih pri kolizijskim potencijalima od 5, 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
1135,3	100	100	100	0,70	$[\beta\text{-CD+H}]^+$
1054,4	-	-	1,38	-	$[\text{glc}_{13}+2\text{H}]^{2+}$
973,1	0,64	1,87	29,39	1,45	$[\text{glc}_6+\text{H}]^+$
892,2	-	-	1,98	-	$[\text{glc}_{11}+2\text{H}]^{2+}$
811,3	0,81	1,49	26,36	4,05	$[\text{glc}_5+\text{H}]^+$
730,4	-	-	1,13	-	$[\text{glc}_9+2\text{H}]^{2+}$
649,3	0,52	0,82	15,38	10,27	$[\text{glc}_4+\text{H}]^+$
487,4	0,34	0,59	10,16	40,53	$[\text{glc}_3+\text{H}]^+$
325,3	-	0,44	4,69	100	$[\text{glc}_2+\text{H}]^+$
289,2	-	-	-	4,29	$[325,3-2\cdot\text{H}_2\text{O}]^+$
163,1	-	-	0,40	7,45	$[\text{glc}+\text{H}]^+$
145,2	-	-	-	2,31	$[163,1-\text{H}_2\text{O}]^+$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

**dvostruko nabijeni ioni u MS/MS spektru pri 20 V vjerojatno su posljedica izoliranja iona dvostruko protoniranog dimera β -CD (preklapa se sa signalom jednostruko protoniranog molekuskog iona β -CD u osnovnom MS spektru)

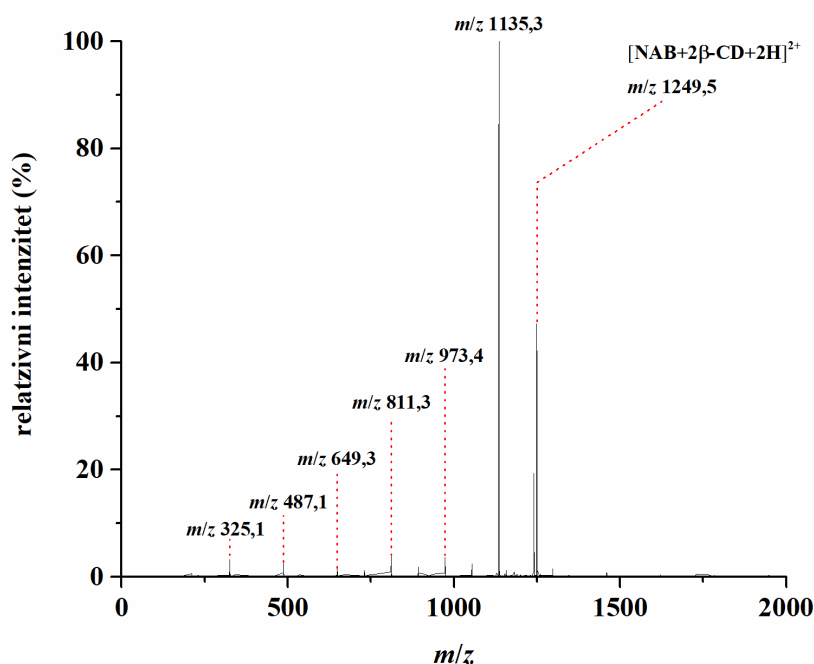


Slika D18. MS/MS spektar iona $[\beta\text{-CD+K+H}]^{2+}$ (m/z 587,2). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40 V.

Tablica D6. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\beta\text{-CD+K+H}]^{2+}$ (m/z 587,2) dobivenih pri kolizijskim potencijalima od 5, 10 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	5 V	10 V	40 V	
1011,4	-	0,45	1,52	$[\text{glc}_6+\text{K}]^+$
849,2	-	-	1,75	$[\text{glc}_5+\text{K}]^+$
687,2	-	-	2,85	$[\text{glc}_4+\text{K}]^+$
587,3	100	100	9,32	$[\beta\text{-CD+K+H}]^+$
525,1	-	-	3,08	$[\text{glc}_3+\text{K}]^+$
506,3	-	0,45	10,93	$[\text{glc}_6+\text{K+H}]^{2+}$
425,5	-	0,66	29,75	$[\text{glc}_5+\text{K+H}]^{2+}$
363,3	-	-	4,04	$[\text{glc}_2+\text{K}]^+$
344,2	-	0,56	100	$[\text{glc}_4+\text{K+H}]^{2+}$
334,9	-	-	4,96	$[344,2-\text{H}_2\text{O}]^+$
263,2	-	-	65,89	$[\text{glc}_3+\text{K+H}]^{2+}$
254,3	-	-	9,50	$[263,2-\text{H}_2\text{O}]^+$
201,3	-	-	2,11	$[\text{glc}+\text{K}]^+$
182,2	-	-	19,19	$[\text{glc}_2+\text{K+H}]^{2+}$
173,1	-	-	4,04	$[182,2-\text{H}_2\text{O}]^+$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu



Slika D19. MS/MS spektar iona $[NAB+2\beta\text{-CD}+2H]^{2+}$ (m/z 1249,4). Ionizacija ESI⁺, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20 V.

Tablica D7. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[NAB+2\beta\text{-CD}+2H]^{2+}$ (m/z 1249,4) dobivenih pri kolizijskim potencijalima od 5, 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
1296,9	-	-	1,54	2,70	$[NAB+glc_6+H]^+$
1249,5	100	100	47,29	-	$[NAB+2\beta\text{-CD}+2H]^{2+}$
1240,7	6,98	16,18	19,36	-	$[1249,5-H_2O]^{2+}$
1135,3	3,49	6,69	100	6,97	$[\beta\text{-CD}+H]^+$
1054,6	-	0,61	2,47	-	$[glc_{13}+2H]^{2+}$
973,4	0,41	0,74	3,64	17,19	$[glc_6+H]^+$
937,3	-	-	-	1,29	$[973,4-2\cdot H_2O]^+$
892,4	0,35	-	1,82	-	$[glc_{11}+2H]^{2+}$
811,3	0,06	0,69	4,04	26,86	$[glc_5+H]^+$
730,4	-	-	1,72	3,45	$[glc_9+2H]^{2+}$
649,3	0,28	0,47	1,46	45,06	$[glc_4+H]^+$
568,4	-	-	-	3,65	$[glc_7+2H]^{2+}$
487,1	0,31	0,33	2,59	67,79	$[glc_3+H]^+$
451,3	-	-	-	2,10	$[487,1-2\cdot H_2O]^+$
325,1	0,47	0,61	3,19	100	$[glc_2+H]^+$
289,0	-	-	-	3,92	$[325,1-2\cdot H_2O]^+$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

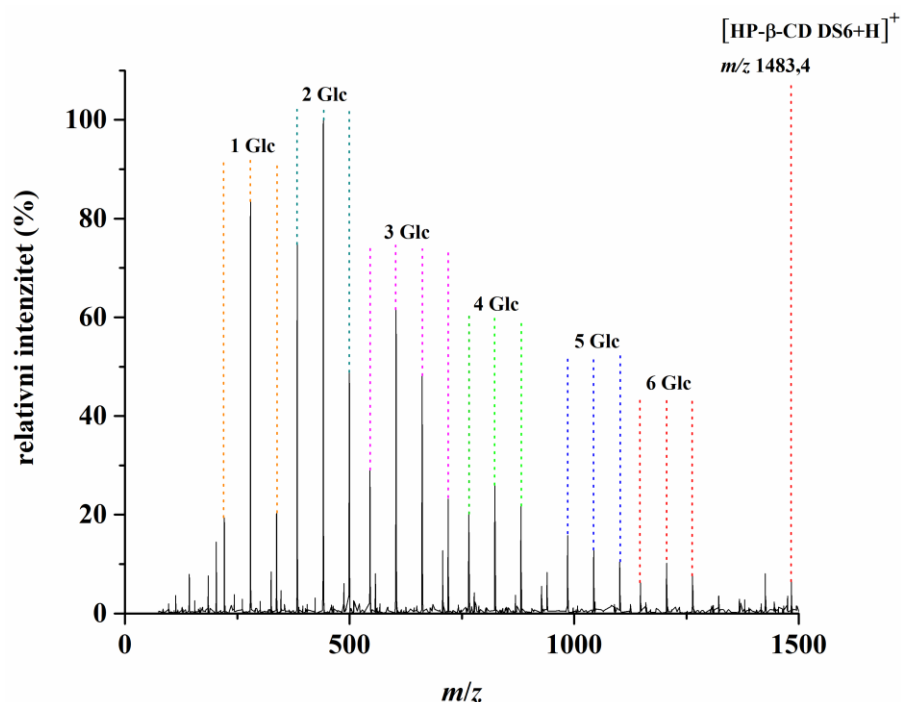
Tablica D8. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala jednostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine HP- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

[M+H] ⁺		Asignacija signala
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %	
1309,3	4,98	C ₅₁ H ₈₈ O ₃₈ , DS 3
1367,3	17,15	C ₅₄ H ₉₄ O ₃₉ , DS 4
1425,4	52,90	C ₅₇ H ₁₀₀ O ₄₀ , DS 5
1483,5	100	C ₆₀ H ₁₀₆ O ₄₁ , DS 6
1541,5	75,33	C ₆₃ H ₁₁₂ O ₄₂ , DS 7
1599,5	29,18	C ₆₆ H ₁₁₈ O ₄₃ , DS 8
1657,5	7,77	C ₆₉ H ₁₂₄ O ₄₄ , DS 9

Tablica D9. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala dvostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine HP- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

[M+2H] ²⁺		[M+H+NH ₄] ²⁺		[M+H+Na] ²⁺		[M+H+K] ²⁺		Asignacija signala
Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	
655,2	3,50	-	-	-	-	674,2	4,45	C ₅₁ H ₈₈ O ₃₈ , DS 3
684,3	17,01	692,8	6,05	695,3	5,72	703,3	15,00	C ₅₄ H ₉₄ O ₃₉ , DS 4
713,3	42,34	721,8	16,07	724,3	15,72	732,3	34,69	C ₅₇ H ₁₀₀ O ₄₀ , DS 5
742,4	78,10	750,9	28,50	753,4	25,49	761,4	56,86	C ₆₀ H ₁₀₆ O ₄₁ , DS 6
771,3	96,49	779,9	34,78	782,4	32,78	790,4	60,35	C ₆₃ H ₁₁₂ O ₄₂ , DS 7
800,3	84,89	808,9	26,91	811,4	22,35	819,4	39,06	C ₆₆ H ₁₁₈ O ₄₃ , DS 8
829,4	46,11	837,9	15,50	840,2	16,92	848,4	18,14	C ₆₉ H ₁₂₄ O ₄₄ , DS 9
858,3	17,34	866,9	6,69	869,3	4,98	877,3	5,79	C ₇₂ H ₁₃₀ O ₄₅ , DS 10
887,4	4,95	-	-	-	-	-	-	C ₇₅ H ₁₃₆ O ₄₆ , DS 11

*DS – stupanj supstituiranosti (engl. *degree of substitution*)



Slika D20. MS/MS spektar iona $[\text{HP-}\beta\text{-CD DS6+H}]^+$ (m/z 1483,5). Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 40 V.

Tablica D10. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{HP-}\beta\text{-CD DS6+H}]^+$ (m/z 1483,5). Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
1483,4	100	100	100	6,44	$[\text{DS6+H}]^+$
1455,1	-	-	8,42	2,34	1483,4-CO
1425,2	-	-	5,78	8,08	1483,4-C ₃ H ₆ O
1263,4	-	-	9,02	7,84	1483,4-C ₉ H ₁₆ O ₆
1205,4	-	-	7,31	10,19	1483,4-C ₉ H ₁₆ O ₆ -C ₃ H ₆ O
1147,4	-	-	1,68	6,21	1483,4-C ₉ H ₁₆ O ₆ -(2·C ₃ H ₆ O)
1101,4	-	-	6,53	10,42	1483,4-C ₉ H ₁₆ O ₆ -C ₆ H ₁₀ O ₅
1043,5	-	-	8,59	12,76	$[(\text{glc})_5(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4]^+$
985,5	-	-	4,67	15,81	$[(\text{glc})_5(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
939,6	-	-	1,43	8,31	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_5]^+$
881,6	-	-	3,89	22,01	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4]^+$
823,2	-	-	3,78	25,88	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
765,2	-	-	1,93	20,02	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
719,4	-	-	1,53	23,19	$[(\text{glc})_3(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4]^+$
661,4	-	-	3,21	48,36	$[(\text{glc})_3(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
603,4	-	-	2,39	61,59	$[(\text{glc})_3(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
545,1	-	-	1,18	28,92	$[(\text{glc})_3(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})]^+$

Tablica D10. (nastavak)

499,4	-	-	1,82	48,71	$[(\text{glc})_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
441,4	-	-	3,17	100	$[(\text{glc})_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
383,4	-	-	1,07	74,71	$[(\text{glc})_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})]^+$
337,4	-	-	1,07	20,37	$[(\text{glc})(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
279,3	-	-	2,21	83,37	$[(\text{glc})(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
220,9	-	-	1,25	19,44	$[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6+\text{H}]^+$
203,1	-	-	-	14,52	220,9–H ₂ O
185,4	-	-	-	7,61	220,9 – (2·H ₂ O)
142,9	-	-	-	7,96	220,9–H ₂ O–CH ₃ OH–CO

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu**Tablica D11.** Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+\text{DS6}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 856,3). Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 5, 10 i 20 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	
1483,4	-	3,04	-	$[\text{DS6} + \text{H}]^+$
1264,4	-	-	19,81	1483,4–C ₉ H ₁₆ O ₆
1205,5	1,78	3,58	-	1483,4–C ₉ H ₁₆ O ₆ –C ₃ H ₆ O
1101,6	-	4,11	19,81	1483,4–C ₉ H ₁₆ O ₆ –C ₆ H ₁₀ O ₅
1043,6	-	5,90	25,47	$[(\text{glc})_5(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4]^+$
985,6	-	2,63	-	$[(\text{glc})_5(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
939,5	-	-	14,15	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_5]^+$
881,4	-	9,12	19,81	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4]^+$
856,2	64,00	13,06	20,75	$[\text{NAB}+\text{DS6}+2\text{H}]^{2+}$
823,3	-	5,01	37,74	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
765,2	-	-	25,47	$[(\text{glc})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
742,3	100	100	-	856,2–NAB
719,6	-	-	16,98	$[(\text{glc})_3(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4]^+$
661,6	-	5,90	33,02	$[(\text{glc})_3(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
632,6	-	5,55	14,15	742,3–C ₉ H ₁₆ O ₆
603,3	3,33	2,33	43,40	$[(\text{glc})_3(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
499,5	-	1,79	36,79	$[(\text{glc})_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3]^+$
441,3	5,33	4,47	86,79	$[(\text{glc})_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
383,2	2,22	3,04	55,66	$[(\text{glc})_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})]^+$
279,1	2,22	2,50	100	$[(\text{glc})(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_2]^+$
221,5	-	2,86	68,87	$[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6+\text{H}]^+$
203,1	-	-	33,96	221,5–H ₂ O
185,1	-	-	23,58	221,5–(2·H ₂ O)
143,2	-	-	42,45	221,5–H ₂ O–CH ₃ OH–CO

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

Tablica D12. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+\text{DS7}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 885,4). Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 5, 10 i 20 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	
1263,1	-	3,16	38,09	771,4-C ₉ H ₁₆ O ₆ -C ₃ H ₆ O
1101,5	-	2,95	22,62	771,4-(2·C ₉ H ₁₆ O ₆)
1043,3	-	3,80	-	[(glc) ₅ (C ₃ H ₇ O) ₄] ⁺
939,7	-	2,53	30,95	[(glc) ₄ (C ₃ H ₇ O) ₅] ⁺
884,9	63,54	11,81	-	[\text{NAB}+\text{DS7}+2\text{H}]^{2+}
881,1	-	-	32,14	[(glc) ₄ (C ₃ H ₇ O) ₄] ⁺
771,4	100	100	/	884,9-NAB
765,7	-	-	26,19	[(glc) ₄ (C ₃ H ₇ O) ₂] ⁺
719,2	-	3,38	34,52	[(glc) ₃ (C ₃ H ₇ O) ₄] ⁺
691,0	-	5,06	-	771,4-C ₆ H ₁₀ O ₅
662,0	5,25	7,81	66,67	[(glc) ₃ (C ₃ H ₇ O) ₃] ⁺
604,0	-	2,95	27,38	[(glc) ₃ (C ₃ H ₇ O) ₂] ⁺
580,5	-	-	32,14	691,0-C ₉ H ₁₆ O ₆
499,4	-	5,27	61,90	[(glc) ₃ (C ₃ H ₇ O) ₂] ⁺
441,6	2,21	3,80	70,24	[(glc) ₂ (C ₃ H ₇ O) ₂] ⁺
382,8	-	-	32,14	[(glc) ₂ (C ₃ H ₇ O)] ⁺
337,3	-	-	22,62	[(glc)(C ₃ H ₇ O) ₃] ⁺
279,5	2,76	5,06	100	[(glc)(C ₃ H ₇ O) ₂] ⁺
221,3	-	4,85	53,57	[C ₉ H ₁₆ O ₆ +H] ⁺
203,1	-	-	45,24	221,3-H ₂ O
185,1	-	-	35,71	221,3-(2·H ₂ O)
143,1	-	-	26,19	221,3-H ₂ O-CH ₃ OH-CO

*glc označava α-D-glukopiranoznu podjedinicu

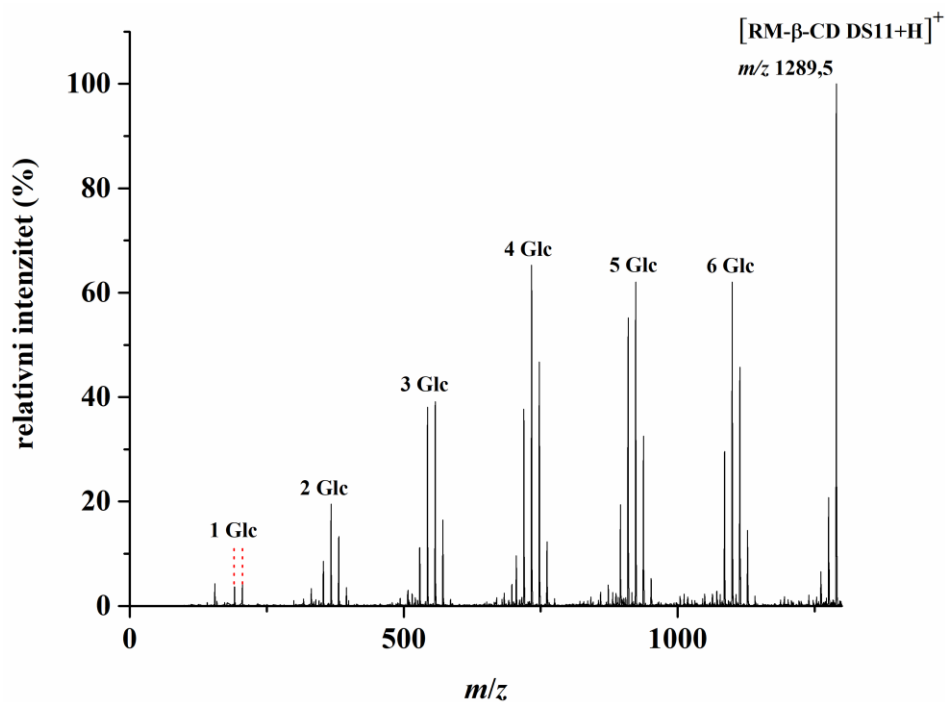
Tablica D13. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala jednostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine RM- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

[M+H] ⁺		[M+NH ₄] ⁺		[M+Na] ⁺		Asignacija signala
Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	
1247,4	6,04	-	-	-	-	C ₅₀ H ₈₆ O ₃₅ , DS 8
1261,3	26,58	-	-	-	-	C ₅₁ H ₈₈ O ₃₅ , DS 9
1275,4	67,63	-	-	1297	58,33	C ₅₂ H ₉₀ O ₃₅ , DS 10
1289,5	100	-	-	1311,5	45,68	C ₅₃ H ₉₂ O ₃₅ , DS 11
1303,5	95,70	1320,5	41,57	1325,5	31,10	C ₅₄ H ₉₄ O ₃₅ , DS 12
1317,5	56,68	1334,5	27,59	1339,3	20,39	C ₅₅ H ₉₆ O ₃₅ , DS 13
1331,5	22,58	1348,5	15,35	1353,4	10,58	C ₅₆ H ₉₈ O ₃₅ , DS 14
1345,5	7,06	1362,5	8,15	-	-	C ₅₇ H ₁₀₀ O ₃₅ , DS 15
-	-	1376,5	7,75	-	-	C ₅₈ H ₁₀₂ O ₃₅ , DS 16
-	-	1390,4	9,50	-	-	C ₅₉ H ₁₀₄ O ₃₅ , DS 17
-	-	1404,4	8,62	-	-	C ₆₀ H ₁₀₆ O ₃₅ , DS 18

Tablica D14. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala dvostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine RM- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

[M+2H] ²⁺		[M+2Na] ²⁺		[M+H+K] ²⁺		Asignacija signala
Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	
-	-	/	-	650,2	4,77	C ₅₁ H ₈₈ O ₃₅ , DS 9
638,3	5,22	659,4	13,28	657,3	12,09	C ₅₂ H ₉₀ O ₃₅ , DS 10
645,3	12,56	667,3	10,19	664,3	20,97	C ₅₃ H ₉₂ O ₃₅ , DS 11
652,3	17,76	674,3	10,66	671,4	23,64	C ₅₄ H ₉₄ O ₃₅ , DS 12
659,4	13,28	681,4	7,98	678,3	16,42	C ₅₅ H ₉₆ O ₃₅ , DS 13
-	-	-	-	685,3	6,68	C ₅₆ H ₉₈ O ₃₅ , DS 14

*DS – stupanj supstituiranosti (engl. *degree of substitution*)



Slika D21. MS/MS spektar iona [RM-β-CD DS11+H]⁺ (m/z 1289,5). Ionizacija ESI⁺, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 20 V.

Tablica D15. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona [RM-β-CD DS11+H]⁺ (m/z 1289,5). Ionizacija ESI⁺, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
1289,5	100	100	100	-	[DS12+H]⁺
1275,5	-	2,99	20,76	-	1289,5-CH ₂
1261,5	-	-	6,61	-	1289,5-(2·CH ₂)
1127,6	-	-	14,48	-	1289,5-C ₆ H ₁₀ O ₅
1113,5	-	3,38	45,76	-	1289,5-C ₇ H ₁₂ O ₅
1099,5	-	4,24	62,05	-	1289,5-C ₈ H ₁₄ O ₅
1085,6	-	1,57	29,61	-	1289,5-C ₉ H ₁₆ O ₅
951,5	-	/	5,27	-	1289,5-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₇ H ₁₂ O ₅
937,6	-	1,32	32,56	-	1289,5-(2·C ₇ H ₁₂ O ₅)
923,5	-	2,00	62,05	-	1289,5-C ₇ H ₁₂ O ₅ -C ₈ H ₁₄ O ₅
909,5	-	1,38	55,23	-	[(glc) ₅ (CH ₃) ₇] ⁺
895,4	-	-	19,42	-	[(glc) ₅ (CH ₃) ₆] ⁺
761,5	-	-	12,33	-	[(glc) ₄ (CH ₃) ₈] ⁺
747,4	-	1,00	46,74	4,09	[(glc) ₄ (CH ₃) ₇] ⁺
733,3	-	1,22	65,30	7,13	[(glc) ₄ (CH ₃) ₆] ⁺
719,2	-	-	37,71	5,57	[(glc) ₄ (CH ₃) ₅] ⁺

Tablica D15. (nastavak)

705,5	-	-	9,65	2,81	[(glc) ₄ (CH ₃) ₄] ⁺
571,4	-	-	16,50	5,49	[(glc) ₃ (CH ₃) ₆] ⁺
557,4	-	-	39,14	26,08	[(glc) ₃ (CH ₃) ₅] ⁺
543,2	-	-	38,10	33,99	[(glc) ₃ (CH ₃) ₄] ⁺
529,4	-	-	11,17	17,42	[(glc) ₃ (CH ₃) ₃] ⁺
395,2	-	-	3,46	7,43	[(glc) ₂ (CH ₃) ₅] ⁺
381,5	-	-	13,32	50,80	[(glc) ₂ (CH ₃) ₄] ⁺
367,1	-	-	19,51	100	[(glc) ₂ (CH ₃) ₃] ⁺
353,2	-	-	8,58	48,02	[(glc) ₂ (CH ₃) ₂] ⁺
205,4	-	-	2,05	25,80	[C ₉ H ₁₆ O ₅ +H] ⁺
191,3	-	-	3,63	38,20	[C ₈ H ₁₄ O ₅ +H] ⁺
177,1	-	-	-	6,28	[C ₇ H ₁₂ O ₅ +H] ⁺
155,2	-	-	4,29	32,25	205,4-H ₂ O-CH ₃ OH

*glc označava α-D-glukopiranoznu podjedinicu

Tablica D16. Izmjerene vrijednosti *m/z*, relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona [NAB+DS11+H]⁺ (*m/z* 1517,5). Ionizacija ESI⁺, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 40 V.

Izmjeren <i>m/z</i>	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
1517,6	100	32,53	3,80	-	[NAB+DS11+H]⁺
1289,5	60,89	100	100	8,64	1517,6-NAB
1275,5	6,43	5,02	7,02	-	1289,5-CH ₂
1261,4	5,45	3,21	4,97	-	1289,5-2·CH ₂
1127,9	-	1,81	6,73	-	1289,5-C ₆ H ₁₀ O ₅
1113,5	3,47	3,82	22,22	4,86	1289,5-C ₇ H ₁₂ O ₅
1099,5	2,97	2,61	28,36	-	1289,5-C ₈ H ₁₄ O ₅
1085,5	-	1,41	6,73	-	1289,5-C ₉ H ₁₆ O ₅
937,5	-	1,61	6,43	9,19	1289,5-(2·C ₇ H ₁₂ O ₅)
923,3	-	1,61	11,70	9,19	1289,5-C ₇ H ₁₂ O ₅ -C ₈ H ₁₄ O ₅
909,0	-	-	9,65	9,19	[(glc) ₅ (CH ₃) ₇] ⁺
761,2	-	1,00	2,92	10,81	[(glc) ₄ (CH ₃) ₈] ⁺
747,3	-	1,20	5,26	37,30	[(glc) ₄ (CH ₃) ₇] ⁺
733,6	-	1,60	7,60	32,43	[(glc) ₄ (CH ₃) ₆] ⁺
719,1	2,48	-	4,39	39,46	[(glc) ₄ (CH ₃) ₅] ⁺
571,3	-	-	2,05	13,51	[(glc) ₃ (CH ₃) ₆] ⁺
557,0	3,47	-	9,65	56,22	[(glc) ₃ (CH ₃) ₅] ⁺
543,5	2,97	-	4,09	89,73	[(glc) ₃ (CH ₃) ₄] ⁺
529,7	-	-	4,39	16,22	[(glc) ₃ (CH ₃) ₃] ⁺
381,5	3,46	-	/	48,65	[(glc) ₂ (CH ₃) ₄] ⁺
367,4	3,47	-	4,09	100	[(glc) ₂ (CH ₃) ₃] ⁺
353,0	-	-	-	23,78	[(glc) ₂ (CH ₃) ₂] ⁺
331,1	-	-	-	14,05	[(glc) ₂ +H] ⁺
205,3	-	-	-	8,65	[C ₉ H ₁₆ O ₅ +H] ⁺
191,3	-	-	-	21,08	[C ₈ H ₁₄ O ₅ +H] ⁺

*glc označava α-D-glukopiranoznu podjedinicu

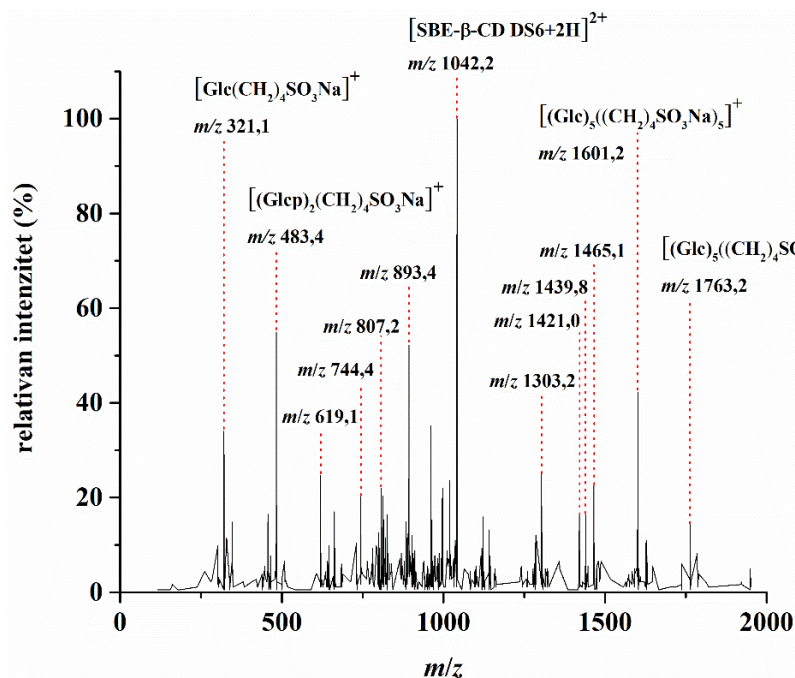
Tablica D17. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+\text{DS12}+\text{H}]^+$ (m/z 1531,5). Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
1531,7	100	52,67	4,86	-	$[\text{NAB}+\text{DS12}+\text{H}]^+$
1303,6	54,32	100	100	-	1531,7–NAB
1289,2	3,29	4,58	8,29	-	1303,6– CH_2
1275,6	4,94	3,62	6,97	-	1303,6–2· CH_2
1127,4	2,88	2,48	11,68	1,96	1303,6– $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5$
1113,2	-	3,05	20,72	1,96	1303,6– $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5$
1099,5	1,65	3,43	7,53	7,19	1303,6– $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5$
951,4	-	-	3,58	5,88	1303,6–(2· $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5$)
937,4	4,11	3,05	8,66	14,38	1303,6– $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5$ – $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5$
923,6	2,47	2,67	12,24	20,92	$[(\text{glc})_5(\text{CH}_3)_8]^+$
909,8	-	1,72	3,39	13,07	$[(\text{glc})_5(\text{CH}_3)_7]^+$
775,1	-	-	3,01	3,26	$[(\text{glc})_4(\text{CH}_3)_9]^+$
761,8	-	1,34	3,39	15,67	$[(\text{glc})_4(\text{CH}_3)_8]^+$
747	3,70	1,34	8,29	46,41	$[(\text{glc})_4(\text{CH}_3)_7]^+$
733,1	4,94	2,48	4,52	49,02	$[(\text{glc})_4(\text{CH}_3)_6]^+$
719	-	-	2,64	24,18	$[(\text{glc})_4(\text{CH}_3)_5]^+$
571,3	-	-	1,13	33,33	$[(\text{glc})_3(\text{CH}_3)_6]^+$
557,2	-	-	2,64	100	$[(\text{glc})_3(\text{CH}_3)_5]^+$
543,3	-	1,72	1,51	99,35	$[(\text{glc})_3(\text{CH}_3)_4]^+$
529,2	-	-	1,32	14,38	$[(\text{glc})_3(\text{CH}_3)_3]^+$
395,2	-	-	-	22,88	$[(\text{glc})_2(\text{CH}_3)_5]^+$
380,9	-	-	2,82	62,75	$[(\text{glc})_2(\text{CH}_3)_4]^+$
367,3	-	-	1,88	90,85	$[(\text{glc})_2(\text{CH}_3)_3]^+$
353,2	-	-	-	33,99	$[(\text{glc})_2(\text{CH}_3)_2]^+$
205,3	-	-	-	15,03	$[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5+\text{H}]^+$
191,4	-	-	-	16,99	$[\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5+\text{H}]^+$
177,0	-	-	-	4,58	$[\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5+\text{H}]^+$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

Tablica D18. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti te asignacija signala dvostruko nabijenih iona iz MS spektra otopine SBE- β -CD ($c = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 1:1. Ionizacija ESI+, potencijal fragmentora 50,0 V.

$[M+4H-2Na]^{2+}$		$[M+3H-Na]^{2+}$		$[M+2H]^{2+}$		$[M+H+Na]^{2+}$		$[M+2Na]^{2+}$		Asignacija signala
Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	Izmjeren m/z	Rel. int. / %	
/	/	715,1	2,34	726,2	7,35	737,3	19,68	748,2	33,41	$C_{50}H_{84}Na_2O_{41}S_2$, DS 2
782,2	6,40	794,2	11,64	805,2	25,99	816,2	54,05	827,2	78,17	$C_{54}H_{91}Na_3O_{44}S_3$, DS 3
862,2	17,98	873,2	30,52	884,2	50,40	895,2	81,52	906,2	100	$C_{58}H_{98}Na_4O_{47}S_4$, DS 4
941,2	23,87	952,2	30,51	963,2	50,95	974,2	77,36	985,2	87,87	$C_{62}H_{105}Na_5O_{50}S_5$, DS 5
1020,2	25,66	1031,2	33,74	1042,2	56,72	1053,2	80,42	1064,2	82,51	$C_{66}H_{112}Na_6O_{53}S_6$, DS 6
1099,2	30,67	1110,2	36,39	1121,2	55,69	1132,1	69,56	1143,1	68,36	$C_{70}H_{119}Na_7O_{56}S_7$, DS 7
1178,2	26,58	1189,2	28,01	1200,2	41,70	1211,2	36,76	1222,1	31,30	$C_{74}H_{126}Na_8O_{59}S_8$, DS 8



Slika D22. MS/MS spektar iona [SBE-β-CD DS6+2H]²⁺ (*m/z* 1042,2). Ionizacija ESI⁺, potencijal fragmentora 50,0 V, kolizijski potencijal 30 V.

Tablica D19. Izmjerene vrijednosti *m/z*, relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona [SBE-β-CD DS6+2H]²⁺ (*m/z* 1042,2). Ionizacija ESI⁺, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 30 V.

Izmjeren <i>m/z</i>	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	30 V	
1763,2	-	-	2,73	14,29	[(glc) ₆ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na) ₅] ⁺
1627,5	-	-	-	10,99	[1763,2-(CH ₂) ₄ SO ₃] ⁺
1601,2	-	-	2,23	42,31	[(glc) ₅ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na) ₅] ⁺
1465,1	-	-	1,36	22,53	[1601,2-(CH ₂) ₄ SO ₃] ⁺
1439,8	-	-	-	16,48	[(glc) ₄ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na) ₅] ⁺
1421,0	-	-	-	16,48	[(glc) ₅ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na) ₃ ((CH ₂) ₄ SO ₃) ⁺
1303,2	-	-	1,01	25,27	[1439,8-(CH ₂) ₄ SO ₃] ⁺
1141,0	-	-	-	13,19	[1303,0-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺
1122,8	-	-	-	15,93	[(glc) ₄ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na) ₃] ⁺
1042,2	100	100	100	100	[DS6+2H]²⁺
1019,1	-	-	-	23,63	[1042,2-2·Na] ²⁺
961,3	-	-	3,30	35,16	[1042,2-C ₆ H ₁₀ O ₅] ²⁺
893,4	-	-	3,45	52,20	[1042,2-C ₁₀ H ₁₇ O ₈ S] ²⁺
807,2	-	-	-	21,98	[(glc) ₄ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na)] ⁺
744,4	-	-	-	20,33	[893,4-C ₁₀ H ₁₇ O ₈ S] ²⁺
663,0	-	-	-	17,03	[744,4-C ₆ H ₁₀ O ₅] ²⁺
645,4	-	-	-	9,89	[(glc) ₃ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na)] ⁺
619,1	-	-	-	24,73	[(glc) ₂ ((CH ₂) ₄ SO ₃ Na)((CH ₂) ₄ SO ₃) ⁺
483,4	-	-	1,15	54,95	[(glc) ₂ (CH ₂) ₄ SO ₃ Na] ⁺
457,3	-	-	-	16,48	[619,2-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺
321,1	-	-	1,29	34,07	[C ₁₀ H ₁₈ O ₈ SNa] ⁺

*glc označava α-D-glukopiranoznu podjedinicu

Tablica D20. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+\text{DS6}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ (m/z 1167,2). Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 30 V.

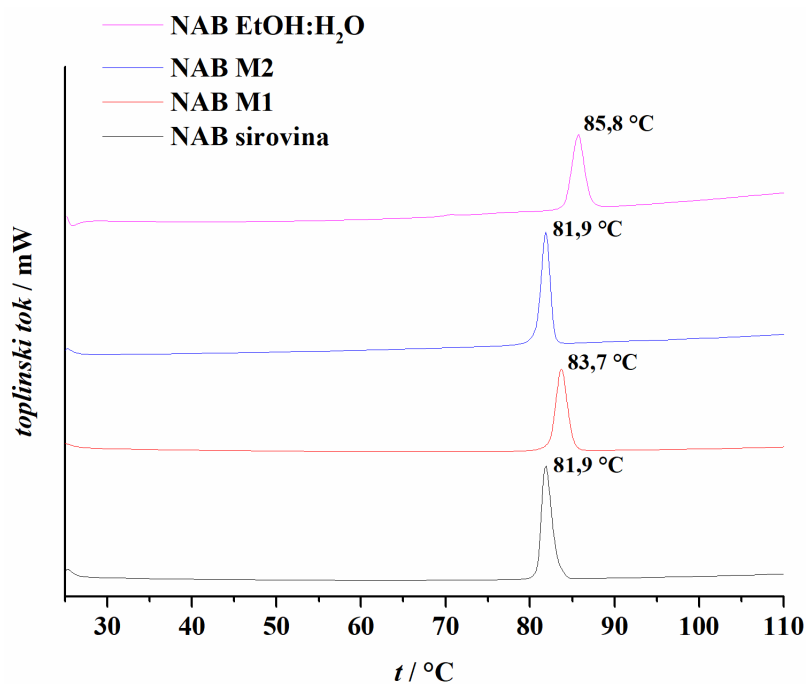
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	30 V	
1850,9	-	-	-	3,32	$[\text{1167,2}-(\text{glc})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})]^+$
1759,3	-	-	-	3,32	$[\text{1053,2}-\text{Na}-(2\cdot\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)]^+$
1715,3	-	-	-	3,32	$[\text{1167,2}-619,0]^+$
1622,6	-	-	2,23	3,32	$[\text{1850,9}-\text{NAB}]^+$
1532,3	-	-	-	4,98	$[\text{1167,2}-(\text{glc})_3((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})]^+$
1443,5	-	-	-	4,65	$[(\text{glc})_5((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})_4]^+$
1167,2	100	100	48,18	26,58	$[\text{NAB}+\text{DS6}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$
1143,9	-	-	8,30	21,93	$[\text{1167,2}-2\cdot\text{Na}]^{2+}$
1053,2	10,74	94,37	100	100	$[\text{1167,2}-\text{NAB}]^{2+}$
1030,2	-	-	-	9,63	$[\text{1053,2}-2\cdot\text{Na}]^{2+}$
939,5	-	-	-	7,31	$[(\text{glc})_3((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3)]^+$
904,4	-	-	-	7,97	$[\text{1053,2}-\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{S}]^{2+}$
619,0	-	-	-	8,31	$[(\text{glc})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3)]^+$
483,3	-	-	-	4,65	$[(\text{glc})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})]^+$
457,3	-	-	-	3,99	$[(\text{glc})((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3)]^+$
399,0	-	-	-	4,32	$[(\text{glc})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})_3]^{2+}$

*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu

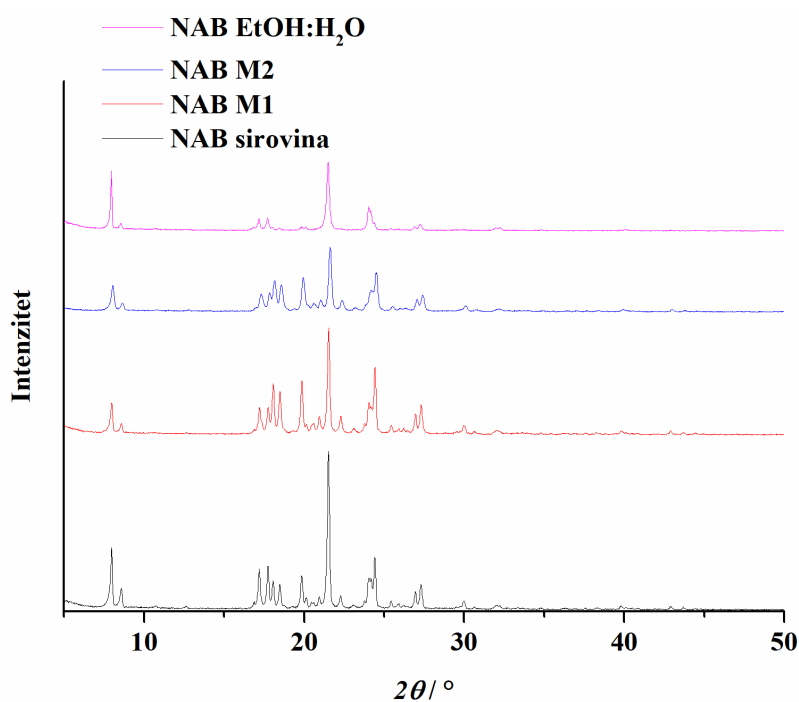
Tablica D21. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[\text{NAB}+\text{DS6}+2\text{Na}]^{2+}$ (m/z 1178,2). Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 30 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	30 V	
1737,5	-	-	2,10	$[\text{1178,2}-619,0]^+$
1178,2	100	66,97	26,90	$[\text{NAB}+\text{DS6}+2\text{Na}]^{2+}$
1155,2	-	6,24	16,27	$[\text{1178,2}-2\cdot\text{Na}]^{2+}$
1064,3	56,34	100	100	$[\text{1178,2}-\text{NAB}]^{2+}$
619,0	-	-	1,71	$[(\text{glc})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3)]^+$
484,1	-	-	1,84	$[(\text{glc})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})]^+$
400,2	-	-	2,62	$[(\text{glc})_2((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})_3+\text{H}]^{2+}$
321,4	-	-	1,57	$[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{SNa}]^+$

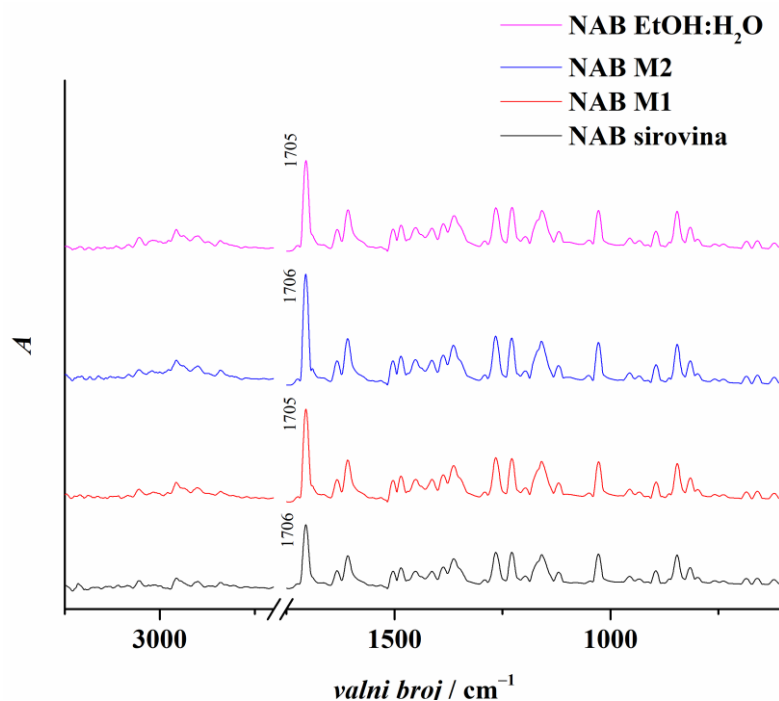
*glc označava α -D-glukopiranoznu podjedinicu



Slika D23. Usporedba DSC krivulja polazne sirovine NAB (—), uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO₂ (—), uzorka NAB mljevenog u posudici od čelika (—) i uzorka NAB koji je dobiven koevaporacijom iz smjese C₂H₅OH i H₂O (—).



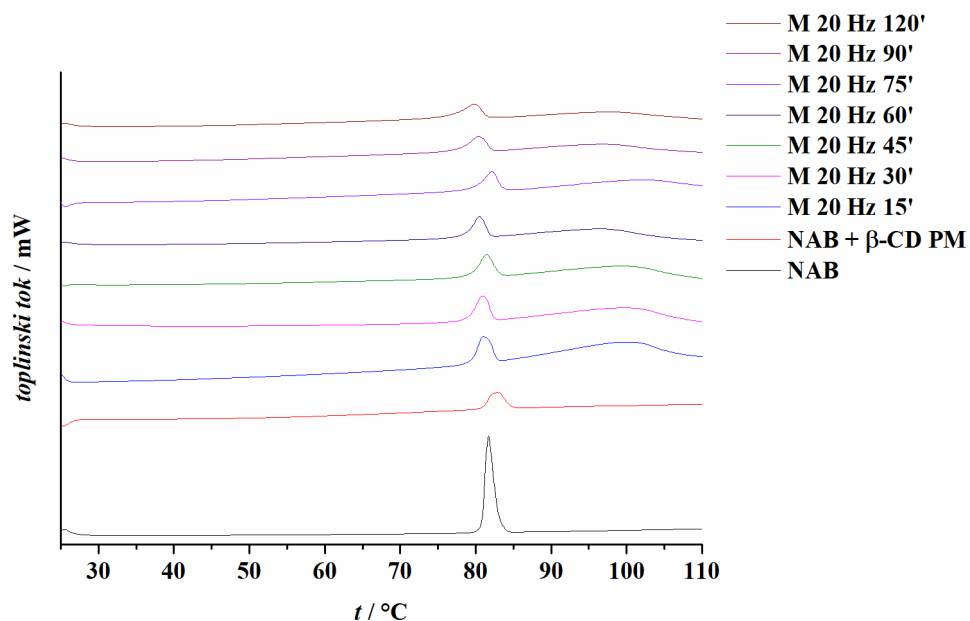
Slika D24. PXRD difraktogrami polazne sirovine NAB (—), uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO₂ (—), uzorka NAB mljevenog u posudici od čelika (—) i uzorka NAB koji je dobiven koevaporacijom iz smjese C₂H₅OH i H₂O (—).



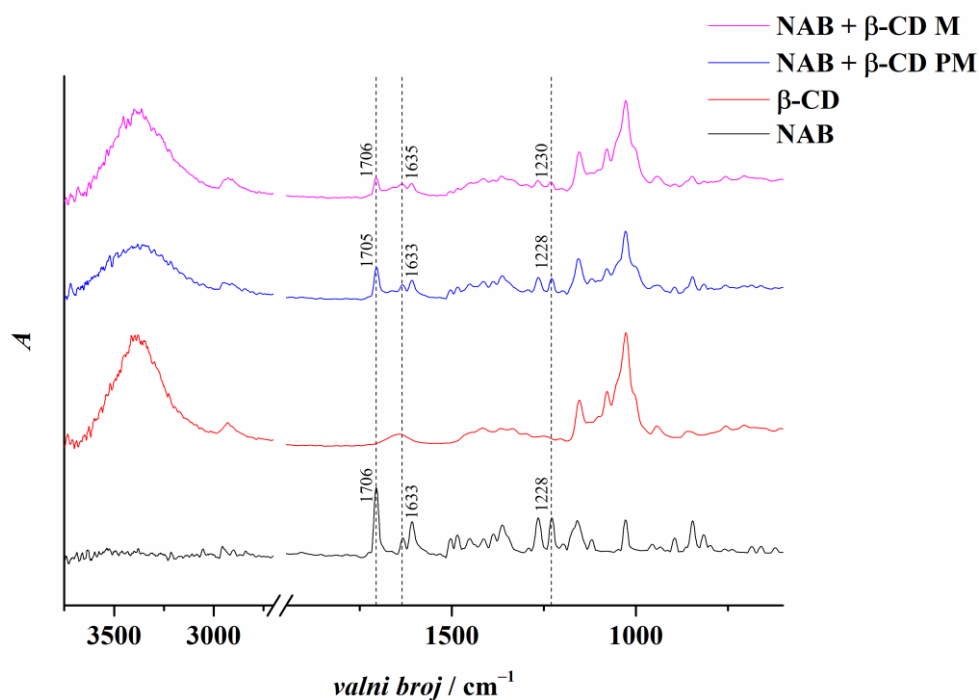
Slika D25. FT-IR ATR spektri polazne sirovine NAB (–), uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO_2 (–), uzorka NAB mljevenog u posudici od čelika (–) i uzorka NAB koji je dobiven koevaporacijom iz smjese C_2H_5OH i H_2O (–).

Tablica D22. Asignacija karakterističnih vrpca nabumetona iz FT-IR ATR spektara uzorka polazne sirovine (NAB), uzorka koji je mljeven u posudicama od ZrO_2 (M1), uzorka koji je mljeven u posudicama od čelika (M2) i uzorka koji je dobiven koevaporacijom iz smjese C_2H_5OH i H_2O (EtOH:H₂O).

Valni broj / cm^{-1}				Asignacija vrpce
NAB	NAB M1	NAB M2	EtOH:H ₂ O	
3055	3055	3055	3054	$\nu(CH)_{aromat}$
2956	2956	2956	2956	$\nu(CH_2)$
2900	2901	2900	2899	$\nu(CH_2)+\nu(CH_3)$
1706	1705	1706	1705	$\nu(C=O)$
1608	1608	1608	1607	$\nu(C=C)_{aromat}$
1485	1485	1485	1485	$\nu(C-C)_{aromat}$
1451	1450	1451	1451	$\delta(HCH)+\delta(HCC)$
1387	1387	1388	1387	$\delta(HCH)$
1362	1363	1363	1361	$\nu(CC)$
1265	1266	1266	1265	$\delta(HCC)+\tau(HCCC)$
1228	1228	1228	1227	$\nu(CC)+\tau(HCOC)$
1159	1159	1160	1159	$\tau(HCOC)$
1119	1119	1120	1119	$\nu(CC)+\delta(HCC)$
1028	1028	1028	1028	$\nu(C-O)$
895	894	895	895	$\tau(HCCC)$
846	846	846	846	$\tau(HCCC)$
816	815	815	815	$\nu(CC)$



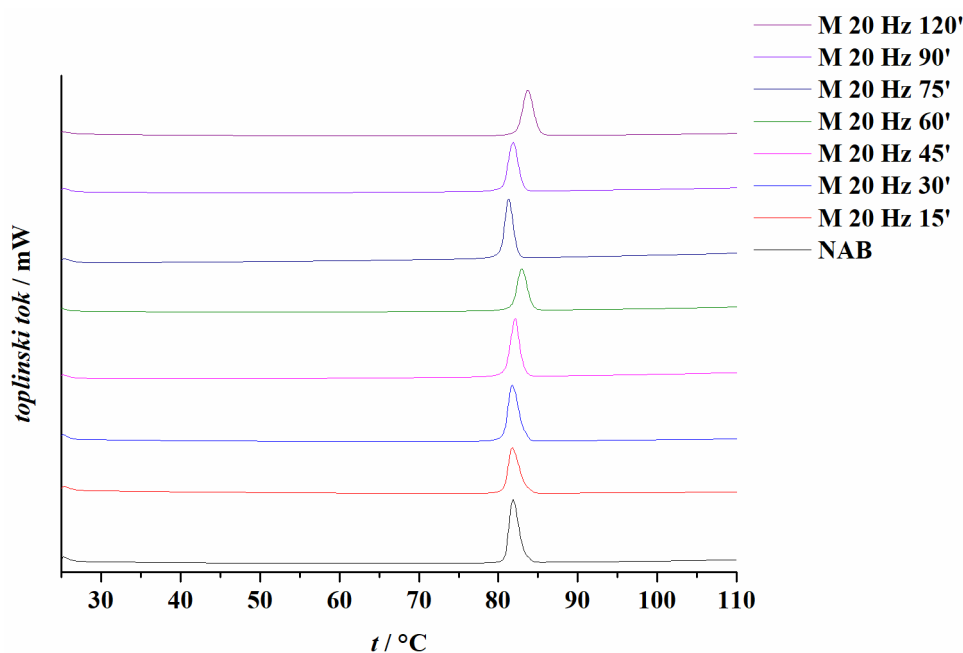
Slika D26. Usporedba DSC krivulja polazne sirovine NAB, njegove fizičke smjese s β-CD i uzoraka mljevene smjese nakon različitih perioda mljevenja.



Slika D27. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (—).

Tablica D23. Vrijednosti valnih brojeva i asignacija karakterističnih vrpca u FT-IR ATR spektrima uzoraka zasebnih komponenti NAB i β -CD, njihove fizičke smjese (NAB+ β -CD PM) i smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (NAB+ β -CD M).

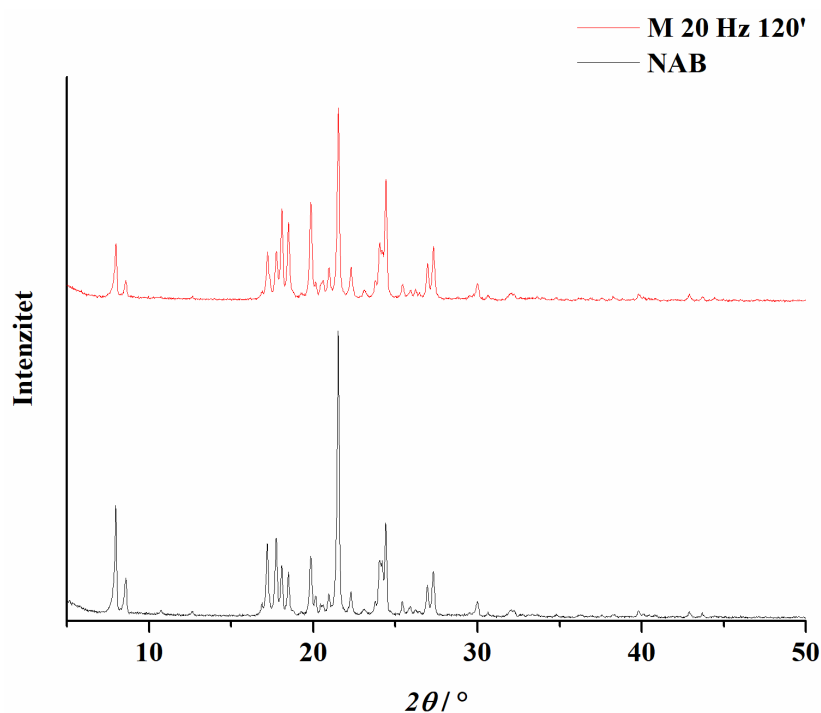
Valni broj / cm ⁻¹				Asignacija vrpce
NAB	β -CD	NAB+ β -CD PM	NAB+ β -CD M	
-	3680-3025	3691-3025	3699-3025	$\nu(\text{OH})$
-	2930	2952	2928	$\nu(\text{CH})$
1706	-	1705	1706	$\nu(\text{C=O})$
1608	-	1608	1609	$\nu(\text{C=C})_{\text{aromat}}$
1485	-	1484	1484	$\nu(\text{C-C})_{\text{aromat}}$
1451	-	1450	1447	$\delta(\text{HCH})+\delta(\text{HCC})$
1387	-	1388	1388	$\delta(\text{HCH})$
1362	-	1363	1364	$\nu(\text{CC})$
1265	-	1265	1266	$\delta(\text{HCC})+\tau(\text{HCCC})$
1228	-	1228	1230	$\nu(\text{CC})+\tau(\text{HCOC})$
1159	-	1156	1154	$\tau(\text{HCOC})$
-	1153	1156	1154	$\nu(\text{COC})+\nu(\text{CC})+\delta(\text{COH})$
1119	-	1119	1119	$\nu(\text{CC})+\delta(\text{HCC})$
-	1078	1079	1079	$\nu(\text{CO})+\nu(\text{CC})+\delta(\text{COH})$
1028	-	1028	1027	$\nu(\text{C-O})$
-	1027	1028	1027	$\nu(\text{CC})+\delta(\text{COH})+\delta(\text{CCH})+\delta(\text{CCO})$
895	-	895	894	$\tau(\text{HCCC})$
846	-	847	847	$\tau(\text{HCCC})$
816	-	815	814	$\nu(\text{CC})$



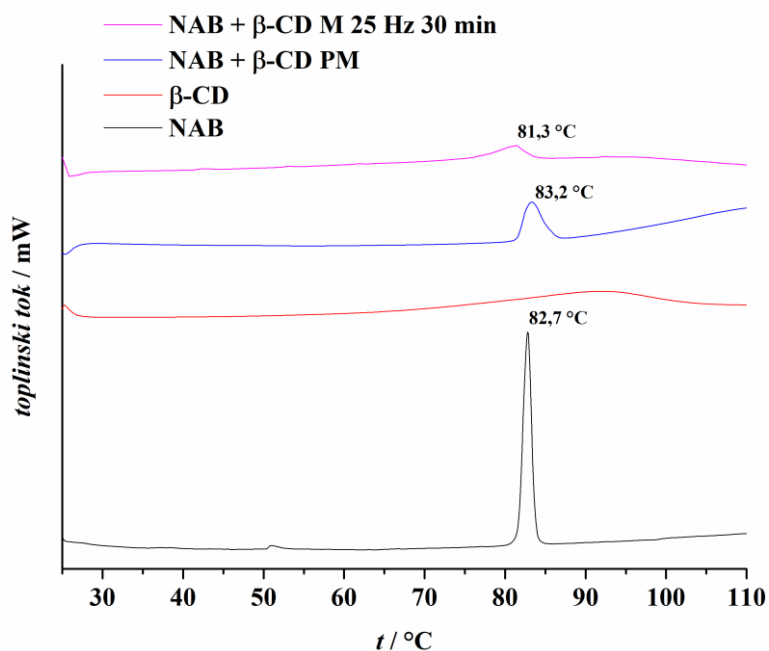
Slika D28. Usporedba DSC krivulja polazne sirovine NAB (–) i uzoraka NAB nakon različitih perioda mljevenja pri 20 Hz u posudicama od ZrO₂.

Tablica D24. Izmjerene vrijednosti temperature početka signala taljenja (t_1), maksimuma signala taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) te izračunata vrijednost udjela zaostale kristalne faze NAB (RDC %) nakon različitih perioda mljevenja.

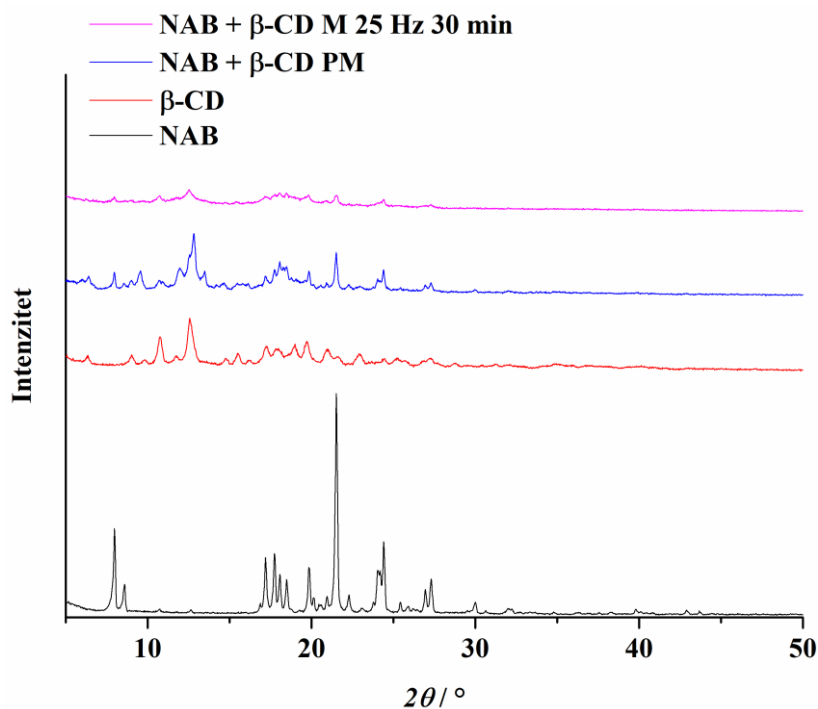
Uzorak	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	$RDC / \%$
NAB	80,9	81,9	139,0	100,0
UZORAK MLJEVEN 15 min	80,8	81,8	138,2	99,4
UZORAK MLJEVEN 30 min	80,7	81,7	137,3	98,8
UZORAK MLJEVEN 45 min	80,9	82,1	140,7	101,2
UZORAK MLJEVEN 60 min	81,8	82,9	132,6	95,4
UZORAK MLJEVEN 75 min	80,3	81,2	138,4	99,5
UZORAK MLJEVEN 90 min	80,6	81,9	141,6	101,8
UZORAK MLJEVEN 120 min	82,4	83,7	126,4	90,9



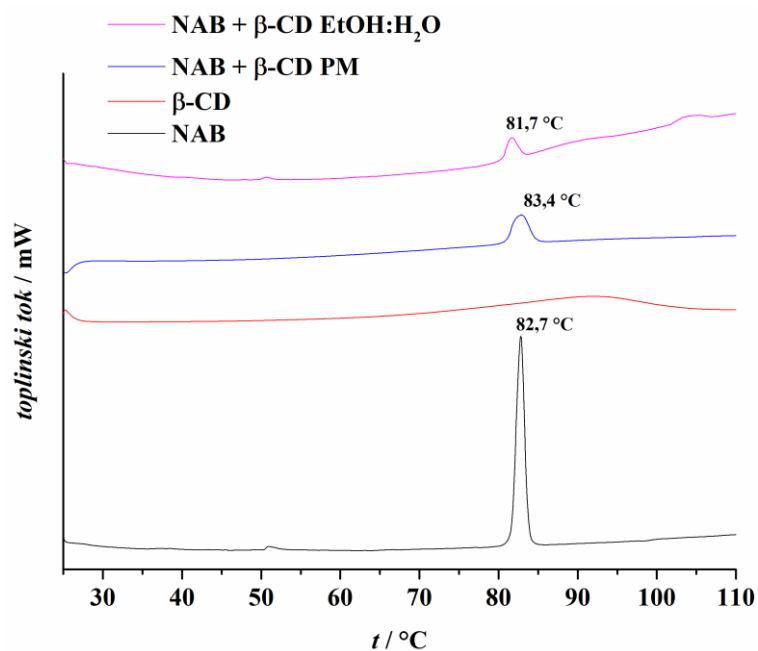
Slika D29. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—) i uzorka NAB nakon 120 min mljevenja pri frekvenciji od 20 Hz u posudicama od ZrO_2 (—).



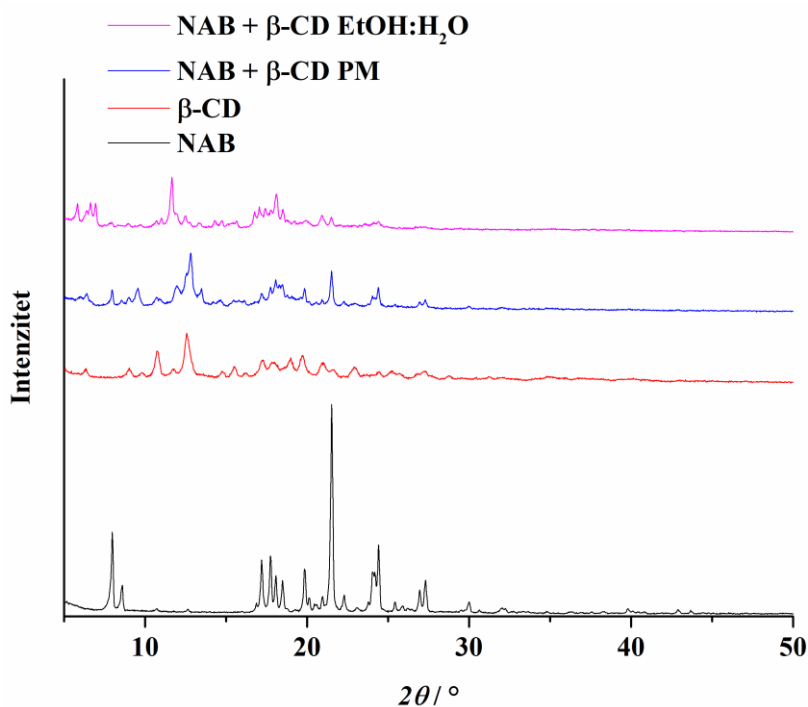
Slika D30. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



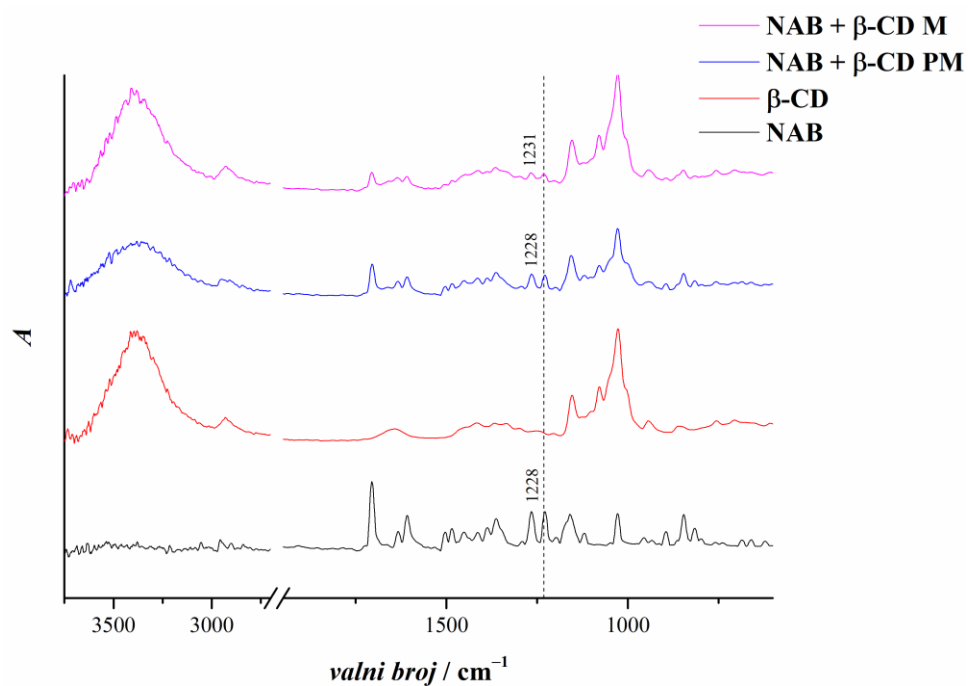
Slika D31. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



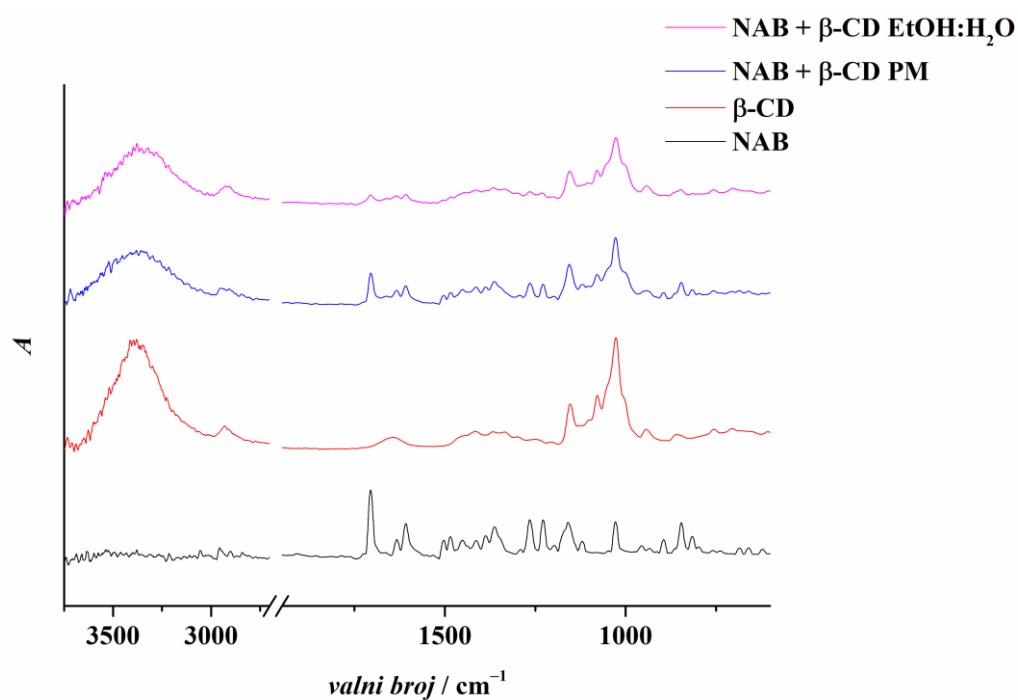
Slika D32. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



Slika D33. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



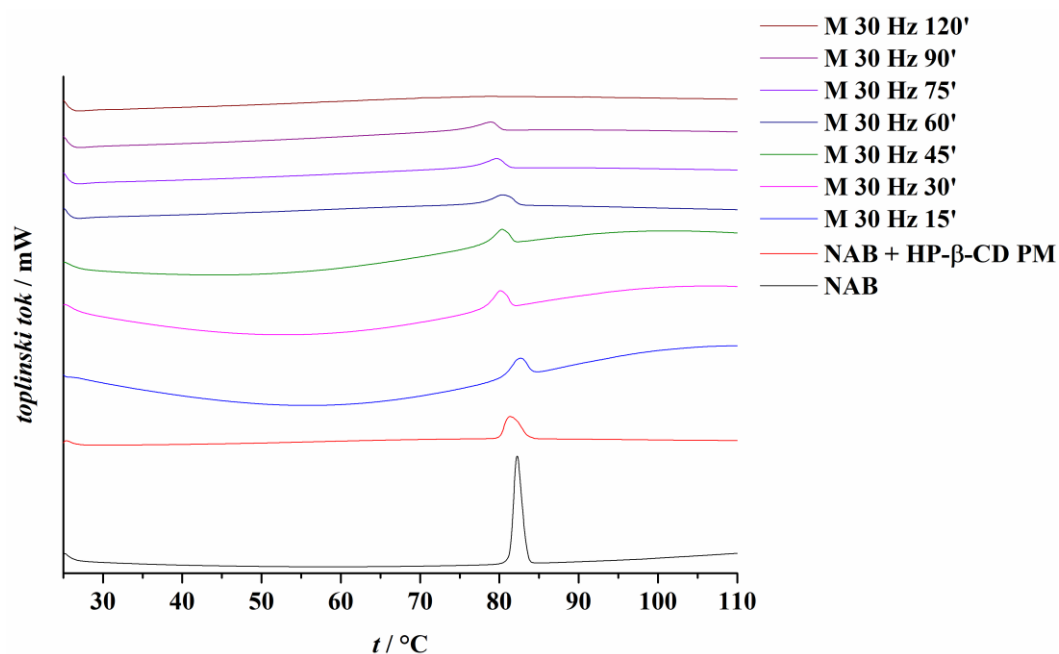
Slika D34. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



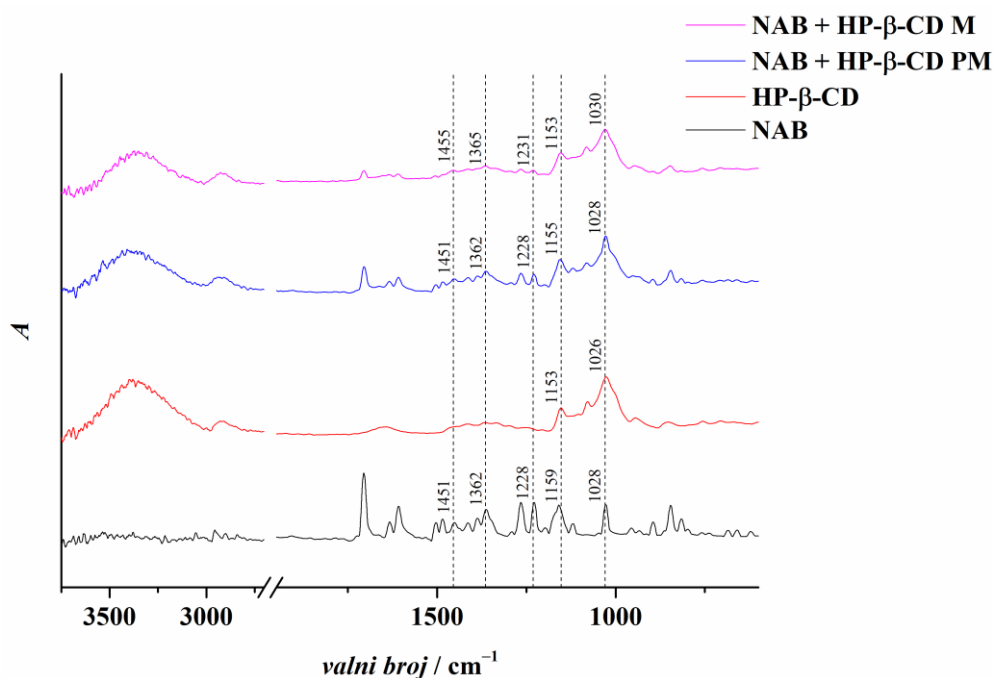
Slika D35. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).

Tablica D25. Izmjerene vrijednosti temperature početka signala taljenja (t_1), maksimuma signala taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) te izračunata vrijednost udjela zaostale kristalne faze NAB (RDC %) u čvrstom sustavu NAB:HP- β -CD nakon 120 min mljevenja u posudici od ZrO₂ pri 20 Hz.

Uzorak	t_1 / °C	t_2 / °C	ΔH / J g ⁻¹	RDC / %
NAB	83,2	84,3	136,0	100,0
FIZIČKA SMJESA	82,7	84,1	136,3	100,2
SMJESA MLJEVENA 15 min	79,5	80,9	126,5	93,0
SMJESA MLJEVENA 30 min	79,8	81,7	123,3	90,7
SMJESA MLJEVENA 45 min	78,6	80,8	125,1	91,9
SMJESA MLJEVENA 60 min	79,1	81,3	123,9	91,1
SMJESA MLJEVENA 75 min	78,5	80,9	124,5	91,5
SMJESA MLJEVENA 90 min	80,2	82,7	110,6	81,3
SMJESA MLJEVENA 120 min	77,1	80,0	102,2	75,1



Slika D36. Usporedba DSC krivulja polazne sirovine NAB (–), fizičke smjese NAB:HP- β -CD (–) i uzoraka smjese NAB:HP- β -CD nakon različitih perioda mljevenja pri 30 Hz u posudicama od ZrO₂.



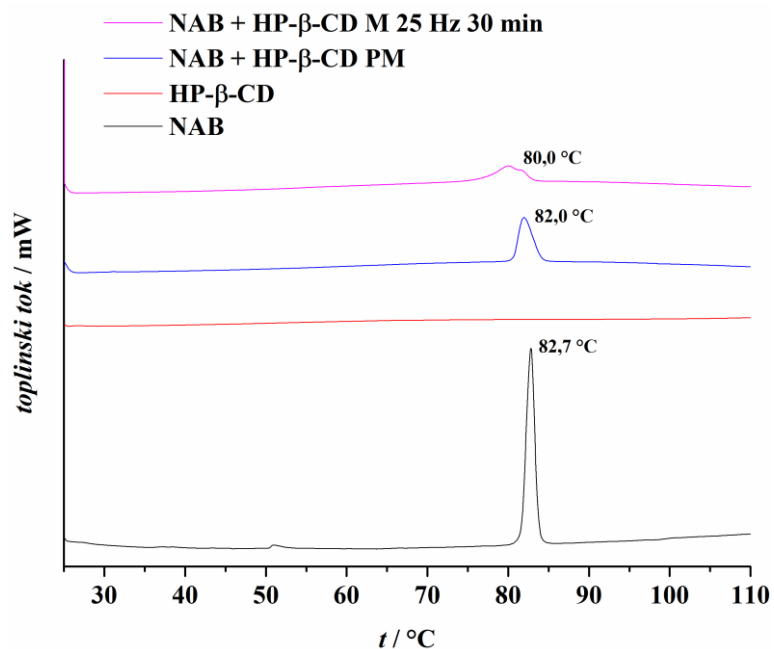
Slika D37. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (–), HP-β-CD (–), uzorka njihove fizičke smjese (–) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 90 min u posudicama od ZrO₂ (–).

Tablica D26. Vrijednosti valnih brojeva i asignacija karakterističnih vrpce u FT-IR ATR spektrima uzoraka zasebnih komponenti NAB i HP-β-CD, njihove fizičke smjese (NAB+HP-β-CD PM) i smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 90 min u posudicama od ZrO₂ (NAB+HP-β-CD M).

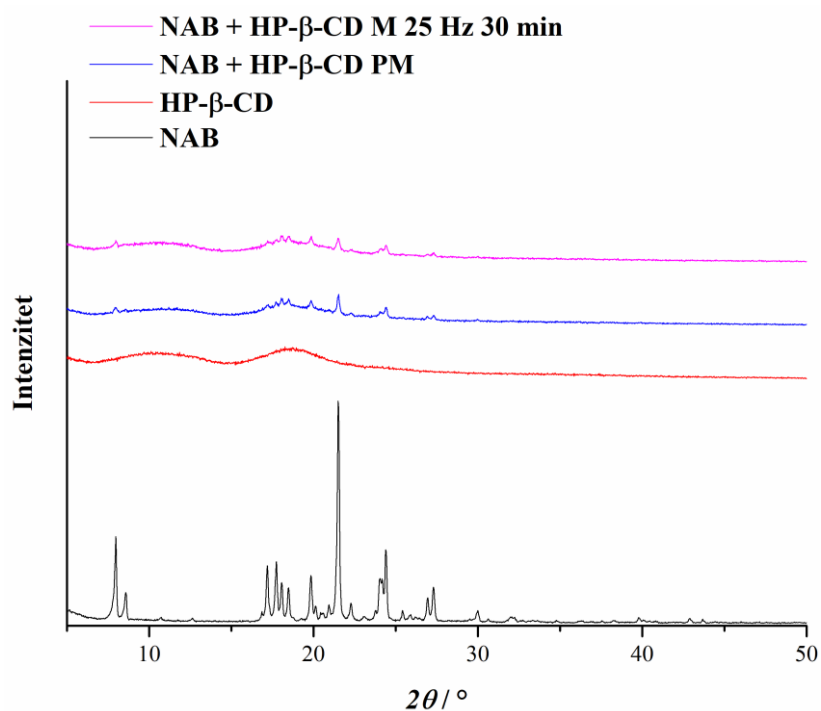
		Valni broj / cm ⁻¹		Asignacija vrpce
NAB	HP-β-CD	NAB+HP-β-CD PM	NAB+HP-β-CD M	
-	3676-3015	3676-3025	3683-3046	ν(OH)
-	2929	2934	2927	ν(CH)
1706	-	1705	1705	ν(C=O)
1608	-	1608	1609	ν(C=C) _{aromat}
1485	-	1484	1481sh	ν(C-C) _{aromat}
1451	-	1451	1455	δ(HCH)+δ(HCC)
1387	-	1388	1388sh	δ(HCH)
1362	-	1362	1365	ν(CC)
1265	-	1265	1266	δ(HCC)+τ(HCCC)
1228	-	1228	1231	ν(CC)+τ(HCOC)
1159	-	1155	1153	τ(HCOC)
-	1153	1155	1153	ν(COC)+ν(CC)+δ(COC)
1119	-	1119	1119	ν(CC)+δ(HCC)
-	1079	1081	1082	ν(CO)+ν(CC)+δ(OCH)
1028	-	1028	1030	ν(C-O)
-	1026	1028	1030	ν(CC)+ δ(OCH)+δ(CCH)+δ(CCO)

Tablica D26. (nastavak)

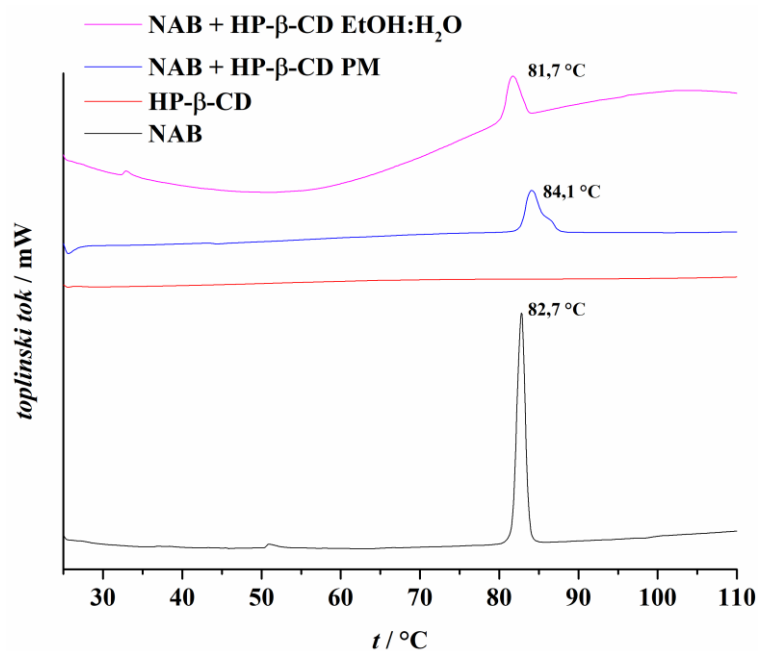
895	-	896	896	τ (HCCC)
846	-	846	847	τ (HCCC)
816	-	816	816	ν (CC)



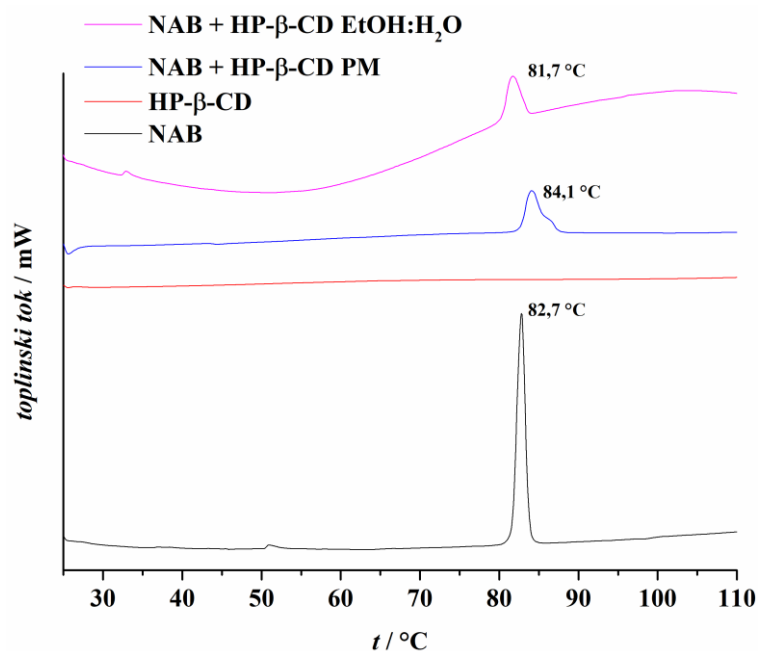
Slika D38. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), HP-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



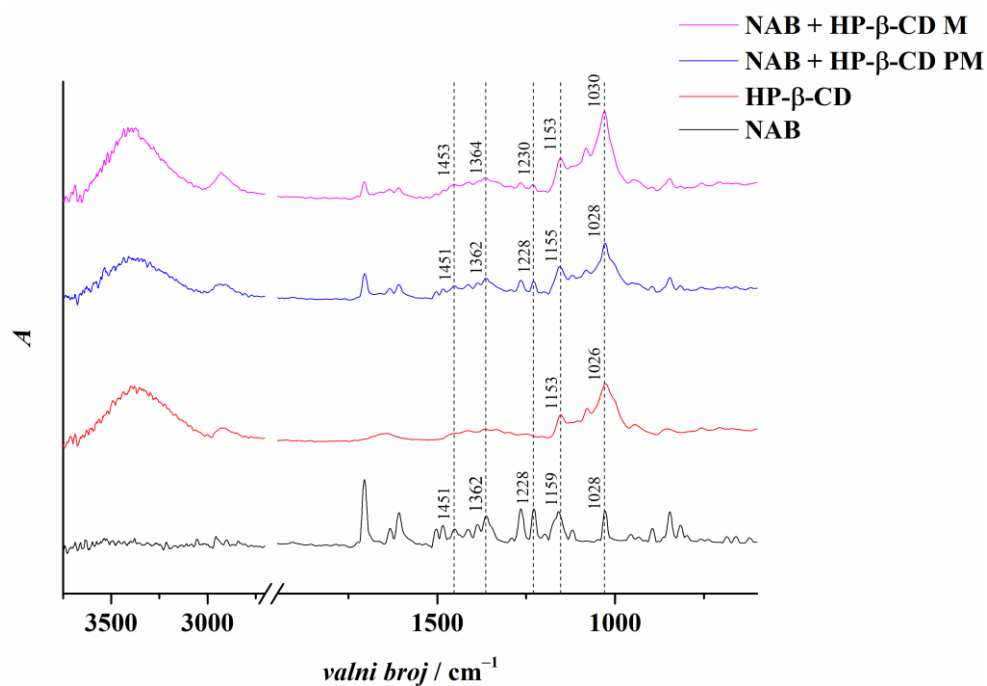
Slika D39. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), HP-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



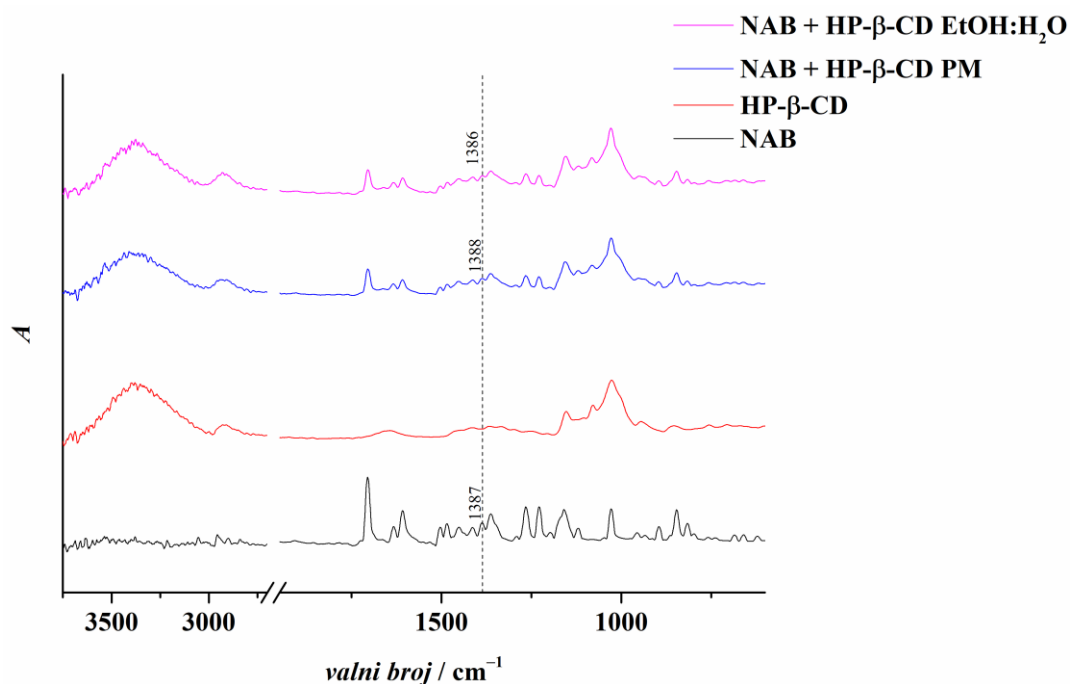
Slika D40. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), HP-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



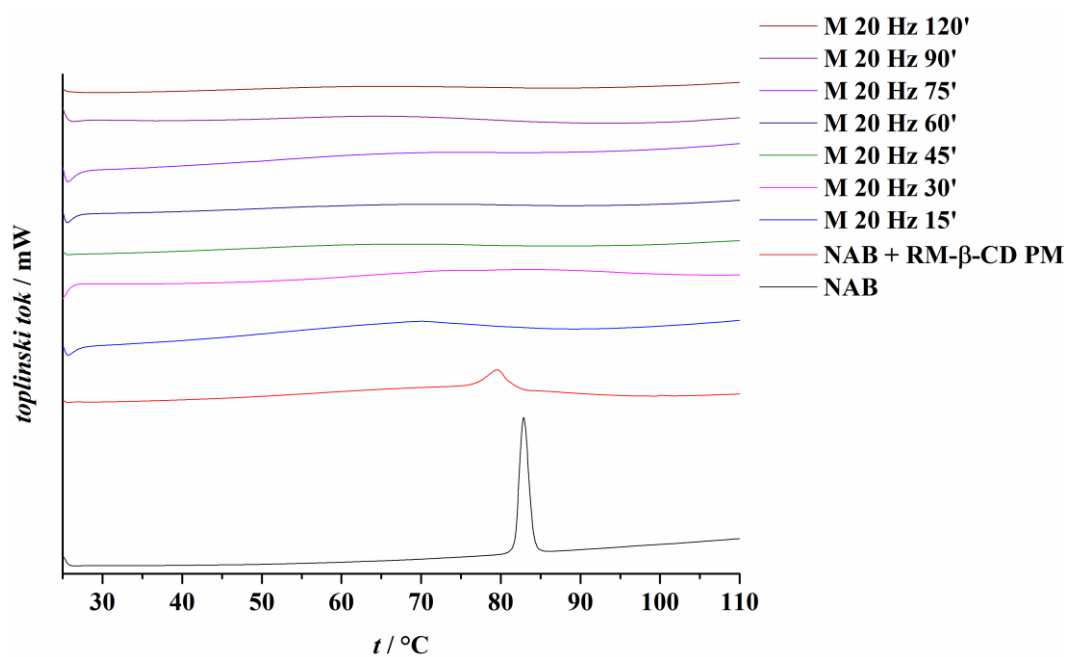
Slika D41. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), HP-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven ko-evaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



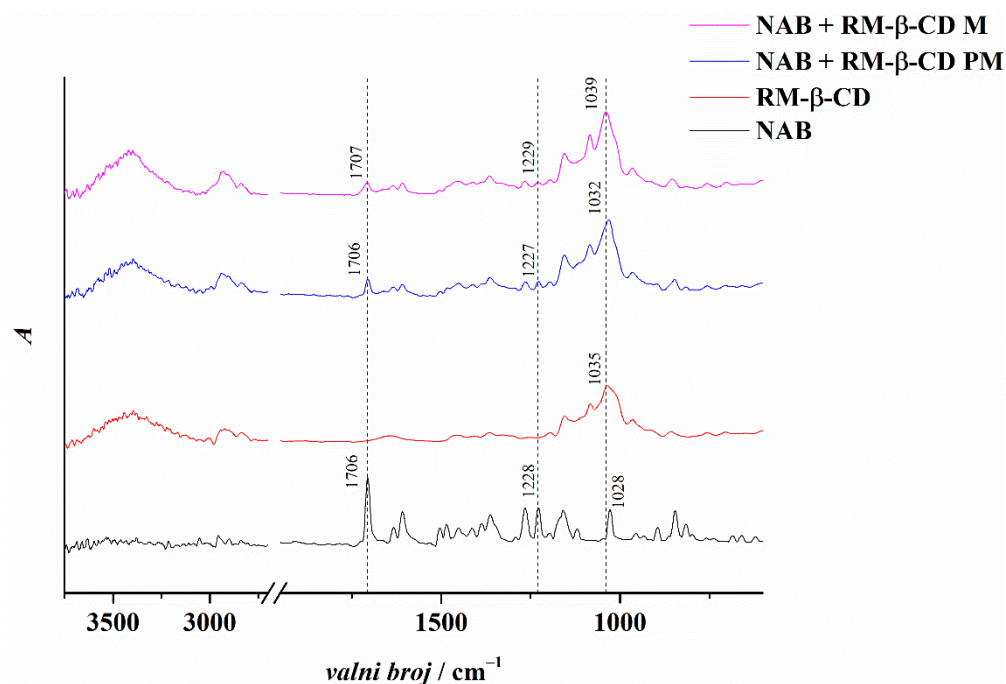
Slika D42. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), HP-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



Slika D43. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), HP- β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



Slika D44. Usporedba DSC krivulja polazne sirovine NAB (—), fizičke smjese NAB:RM- β -CD (—) i uzoraka smjese NAB:RM- β -CD nakon različitih perioda mljevenja pri 20 Hz u posudicama od ZrO₂.



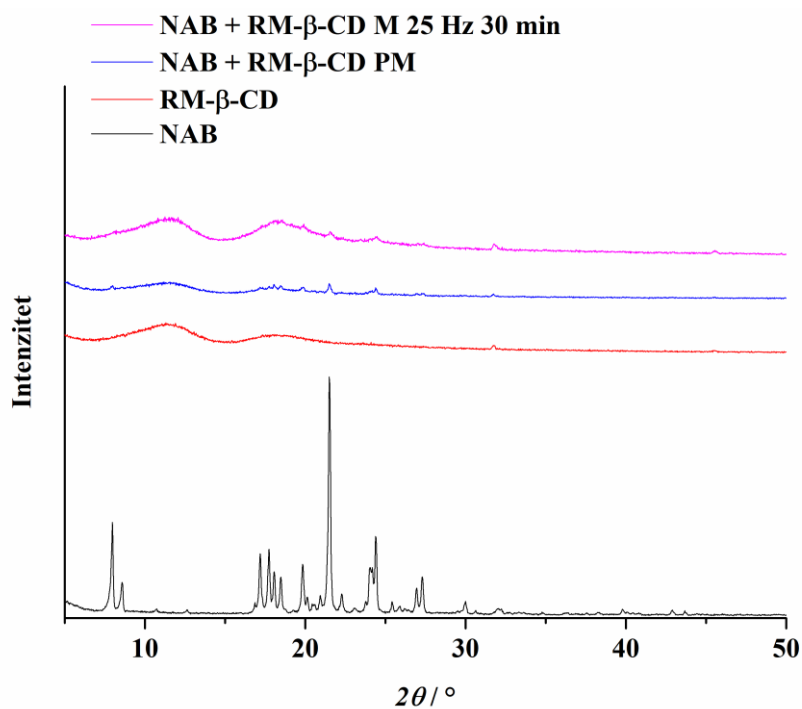
Slika D45. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (–), RM-β-CD (–), uzorka njihove fizičke smjese (–) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (–).

Tablica D27. Vrijednosti valnih brojeva i asignacija karakterističnih vrpce u FT-IR ATR spektrima uzoraka zasebnih komponenti NAB i RM-β-CD, njihove fizičke smjese (NAB+RM-β-CD PM) i smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 20 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (NAB+RM-β-CD M).

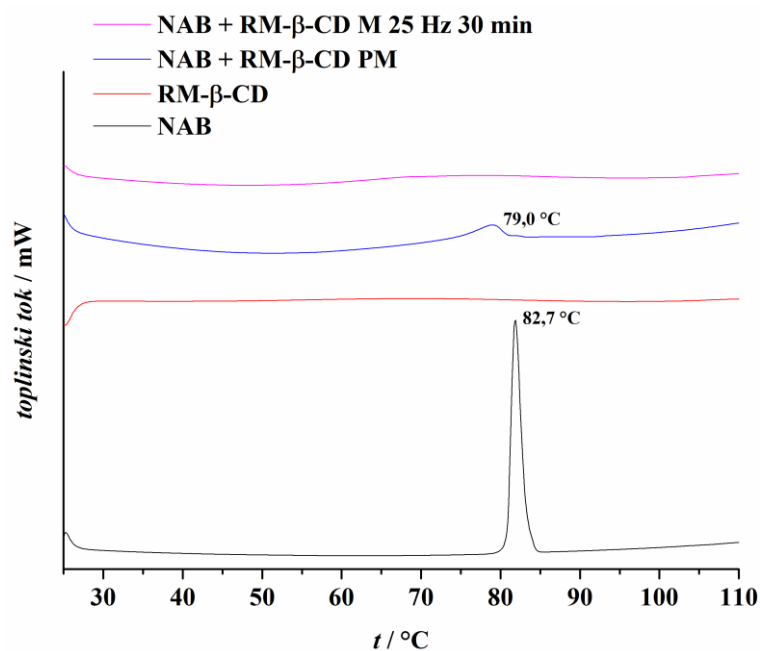
Valni broj / cm ⁻¹				Asignacija vrpce
NAB	RM-β-CD	NAB+RM-β-CD PM	NAB+RM-β-CD M	
-	3653-3071	3652-3071	3671-3072	ν(OH)
-	2924	2943	2929	ν(CH)
1706	-	1706	1707	ν(C=O)
1608	-	1608	1607	ν(C=C) _{aromat}
1485	-	1482	1482	ν(C–C) _{aromat}
1451	-	1451	1452	δ(HCH)+δ(HCC)
1387	-	1386	-	δ(HCH)
1362	-	1363	1364	ν(CC)
1265	-	1265	1266	δ(HCC)+τ(HCCC)
1228	-	1227	1229	ν(CC)+τ(HCOC)
1159	-	1156	1155	τ(HCOC)
-	1155	1156	1155	ν(COC)+ν(CC)+δ(COC)
1119	-	-	-	ν(CC)+δ(HCC)

Tablica D27 (nastavak)

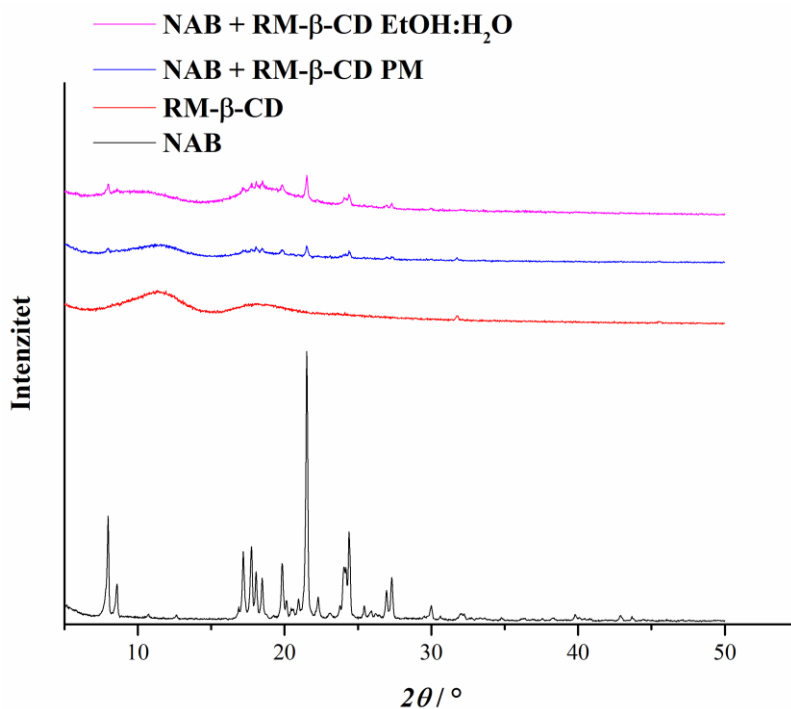
-	1083	1085	1085	$\nu(\text{CO})+\nu(\text{CC})+\delta(\text{OCH})$
1028	-	1032	1039	$\nu(\text{C-O})$
-	1035	1032	1039	$\nu(\text{CC})+$ $\delta(\text{OCH})+\delta(\text{CCH})+\delta(\text{CCO})$
895	-	898	-	$\tau(\text{HCCC})$
846	-	848	854	$\tau(\text{HCCC})$
816	-	816	815	$\nu(\text{CC})$



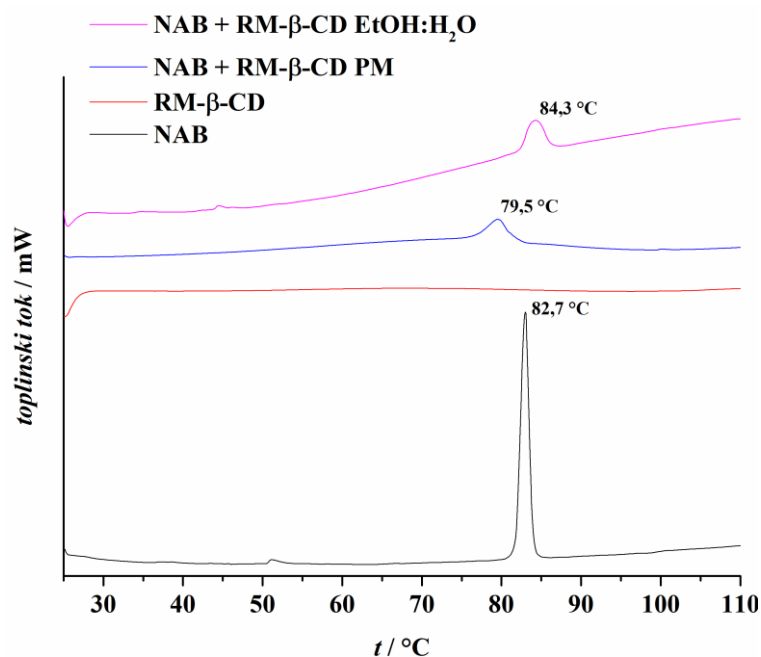
Slika D46. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (-), RM- β -CD (-), uzorka njihove fizičke smjese (-) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (-).



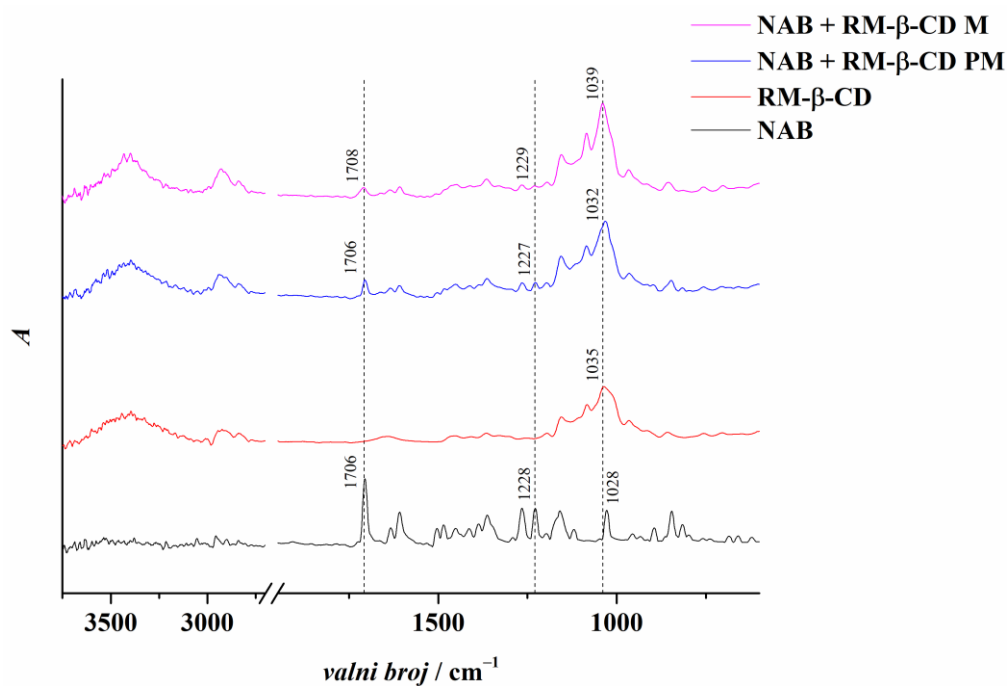
Slika D47. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), RM-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



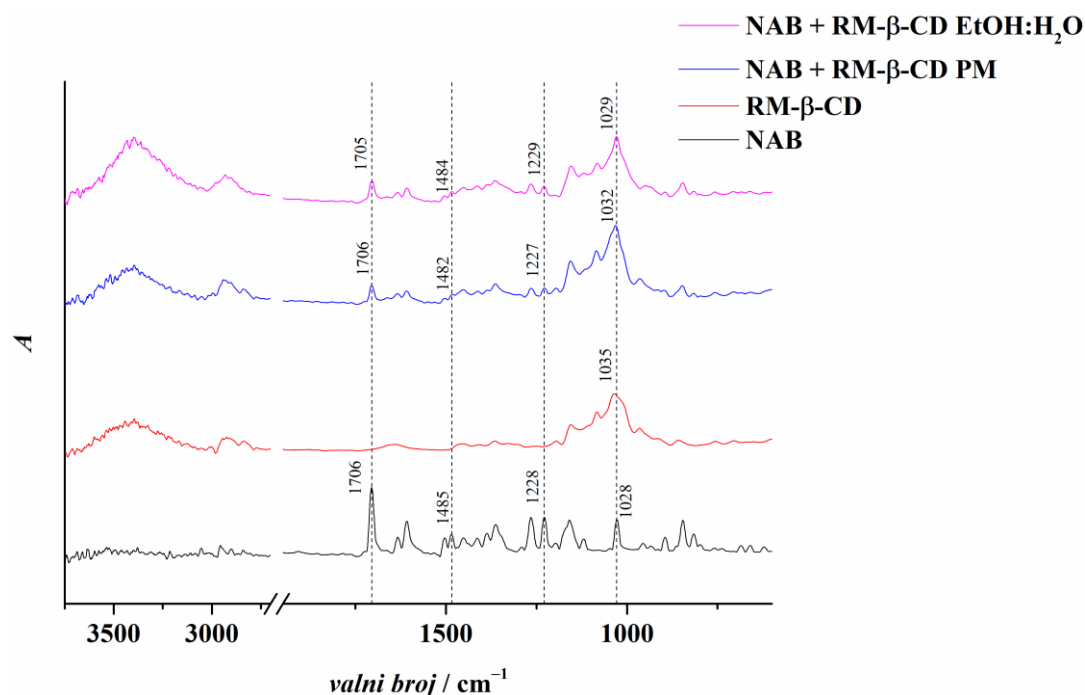
Slika D48. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), RM-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



Slika D49. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), RM-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



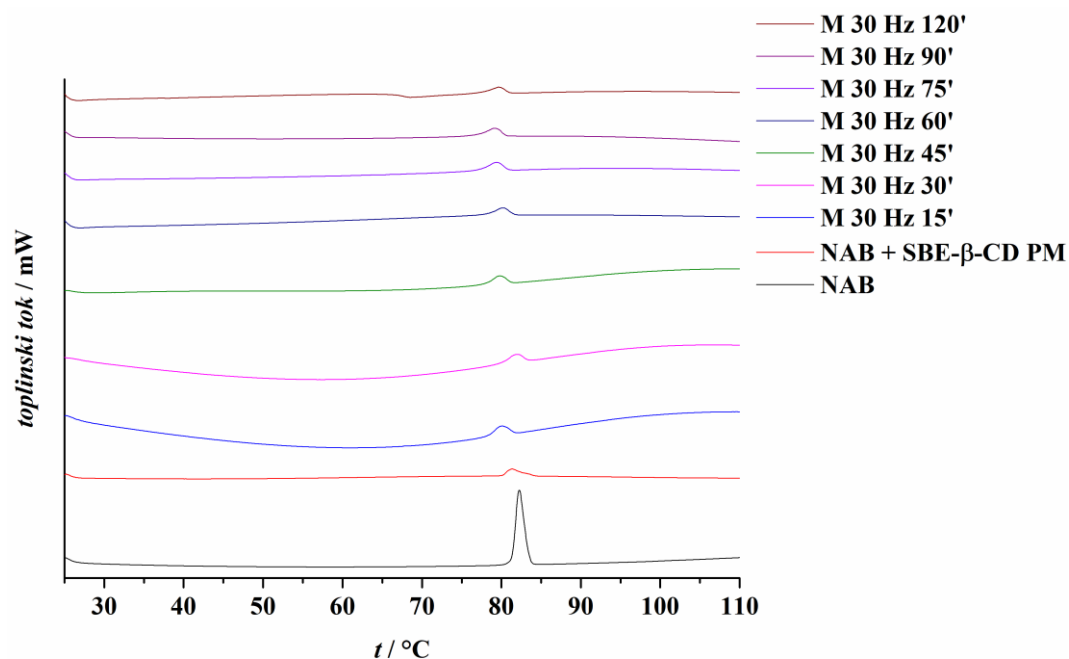
Slika D50. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), RM-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



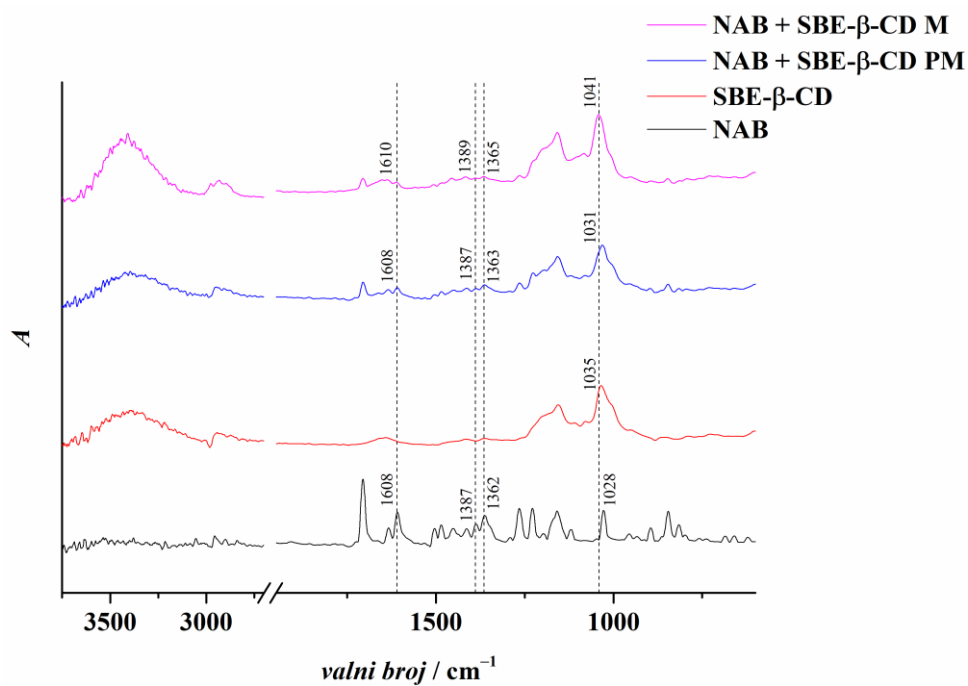
Slika D51. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), RM- β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).

Tablica D28. Izmjerene vrijednosti temperature početka signal taljenja (t_1), maksimuma signal taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) te izračunata vrijednost udjela zaostale kristalne faze NAB (RDC %) u čvrstom sustavu NAB:SBE- β -CD nakon 120 min mljevenja u posudici od ZrO₂ pri 20 Hz.

Uzorak	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	$RDC / \%$
NAB	80,8	81,8	136,1	100,0
FIZIČKA SMJESA	80,0	81,2	123,1	91,6
SMJESA MLJEVENA 15 min	79,7	81,2	125,1	91,9
SMJESA MLJEVENA 30 min	79,5	81,1	131,4	96,6
SMJESA MLJEVENA 45 min	78,9	80,7	121,0	88,9
SMJESA MLJEVENA 60 min	79,7	81,7	124,0	91,1
SMJESA MLJEVENA 75 min	78,3	80,0	127,4	93,6
SMJESA MLJEVENA 90 min	80,4	82,6	122,6	90,1
SMJESA MLJEVENA 120 min	77,6	79,4	114,8	84,3



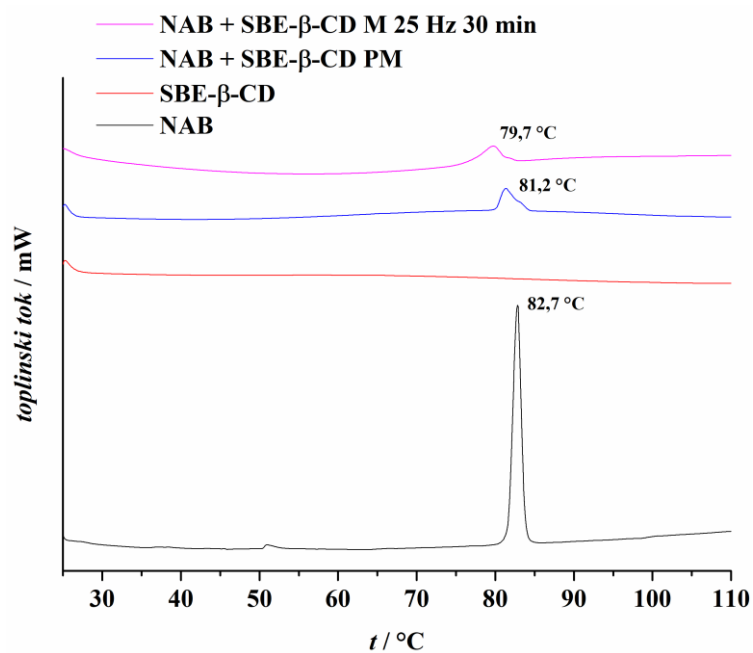
Slika D52. Usporedba DSC krivulja polazne sirovine NAB (—), fizičke smjese NAB:SBE- β -CD (—) i uzoraka smjese NAB:SBE- β -CD nakon različitih perioda mljevenja pri 30 Hz u posudicama od ZrO₂.



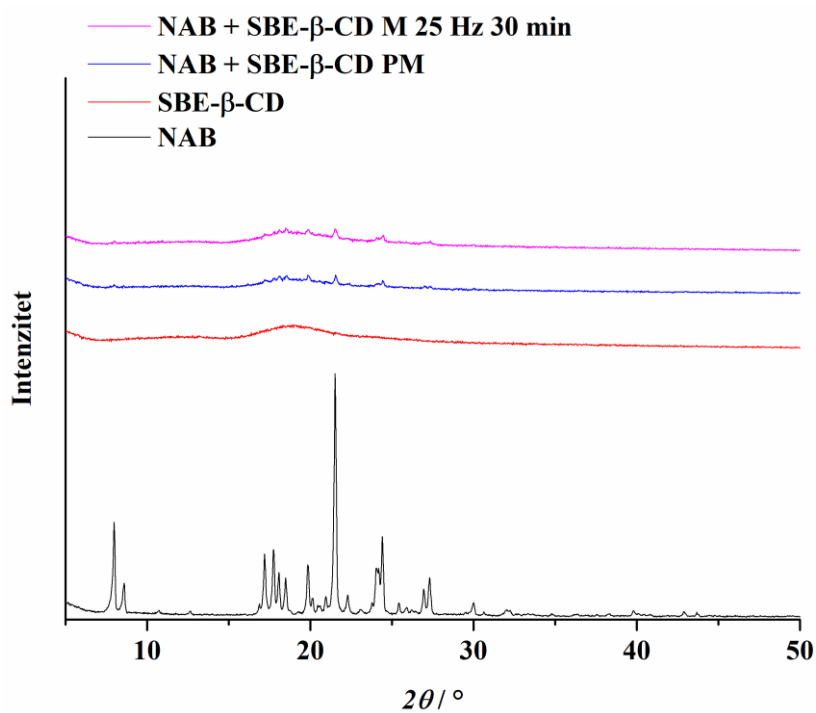
Slika D53. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), SBE- β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (—).

Tablica D29. Vrijednosti valnih brojeva i asignacija karakterističnih vrpce u FT-IR ATR spektrima uzoraka zasebnih komponenti NAB i SBE- β -CD, njihove fizičke smjese (NAB+SBE- β -CD PM) i smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 120 min u posudicama od ZrO₂ (NAB+SBE- β -CD M).

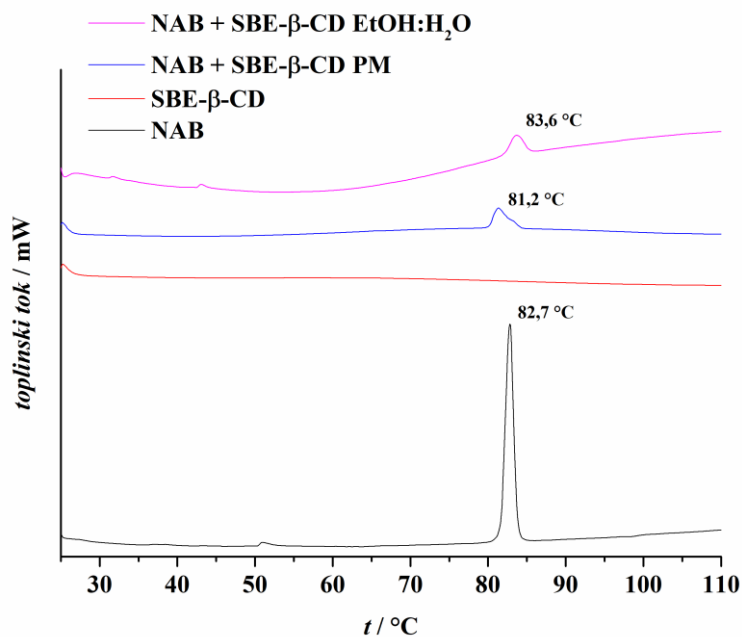
Valni broj / cm ⁻¹				Asignacija vrpce
NAB	SBE- β -CD	NAB+SBE- β -CD PM	NAB+SBE- β -CD M	
-	3724-2982	3709-2987	3694-3012	$\nu(\text{OH})$
-	2943	2949	2933	$\nu(\text{CH})$
1706	-	1706	1705	$\nu(\text{C=O})$
1608	-	1608	1610	$\nu(\text{C=C})_{\text{aromat}}$
1485	-	1484	1484sh	$\nu(\text{C-C})_{\text{aromat}}$
1451	-	1448	1455	$\delta(\text{HCH})+\delta(\text{HCC})$
1387	-	1387	1389	$\delta(\text{HCH})$
1362	-	1363	1365	$\nu(\text{CC})$
1265	-	1265	1265	$\delta(\text{HCC})+\tau(\text{HCCC})$
1228	-	1227	1227sh	$\nu(\text{CC})+\tau(\text{HCOC})$
1159	-	1157	1158	$\tau(\text{HCOC})$
-	1155	1157	1158	$\nu(\text{COC})+\nu(\text{CC})+\delta(\text{COC})$
1119	-	-	-	$\nu(\text{CC})+\delta(\text{HCC})$
-	1078	1079	1084	$\nu(\text{CO})+\nu(\text{CC})+\delta(\text{OCH})$
1028	-	1031	1041	$\nu(\text{C-O})$
-	1035	1031	1041	$\nu(\text{CC})+\nu(\text{SO})+\delta(\text{OCH})+\delta(\text{CCH})+\delta(\text{CCO})$
895	-	897	894	$\tau(\text{HCCC})$
846	-	847	847	$\tau(\text{HCCC})$
816	-	816	814	$\nu(\text{CC})$



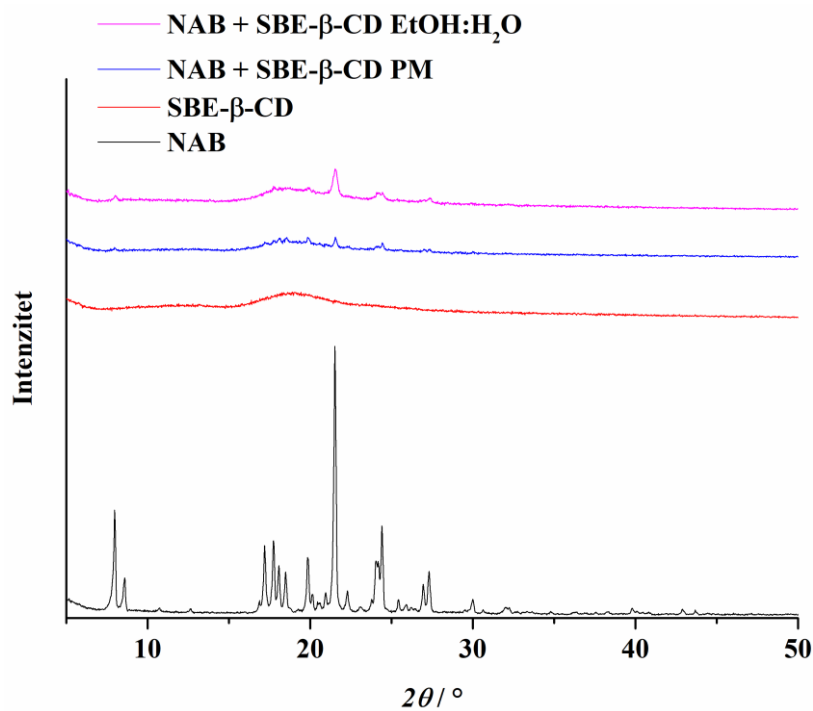
Slika D54. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), SBE-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



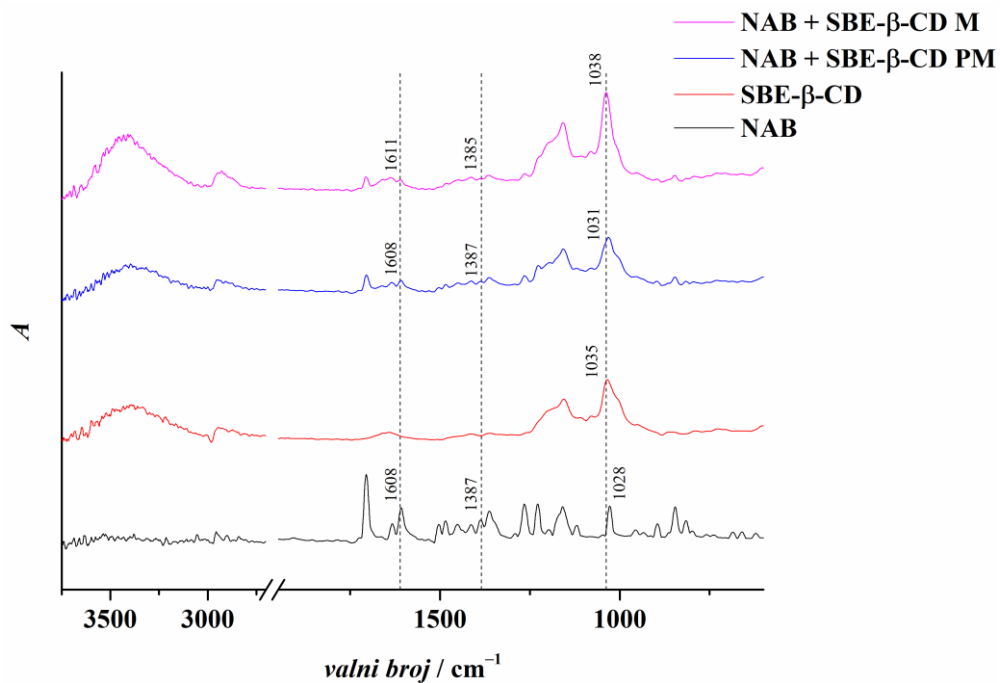
Slika D55. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), SBE-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



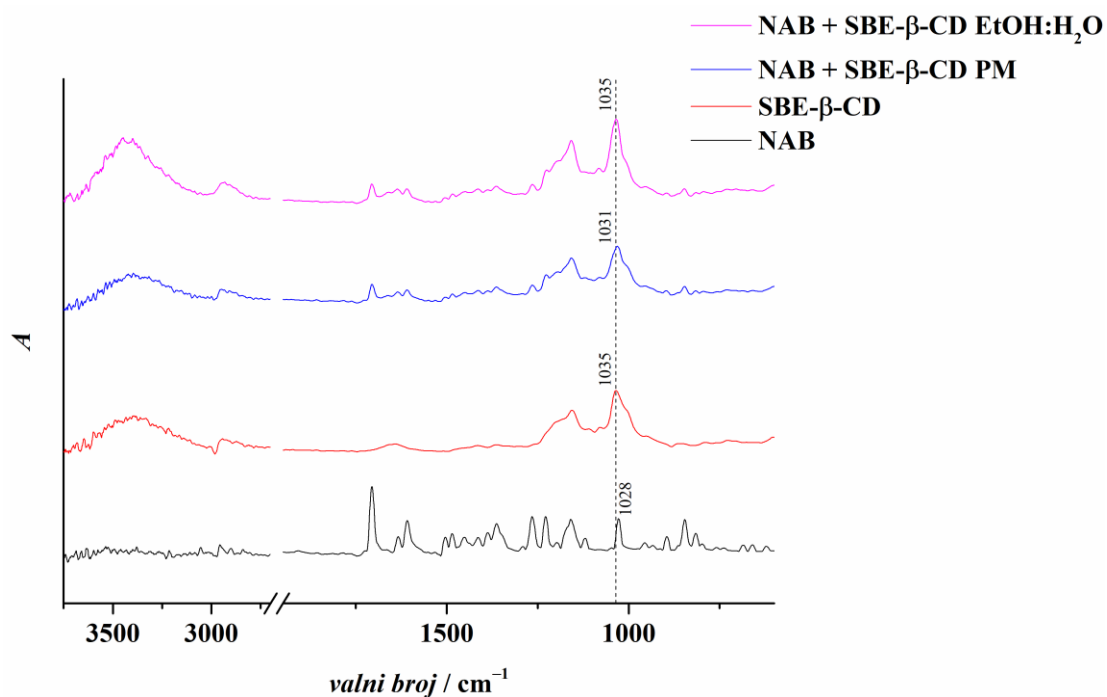
Slika D56. Usporedba DSC krivulja početne sirovine NAB (—), SBE-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



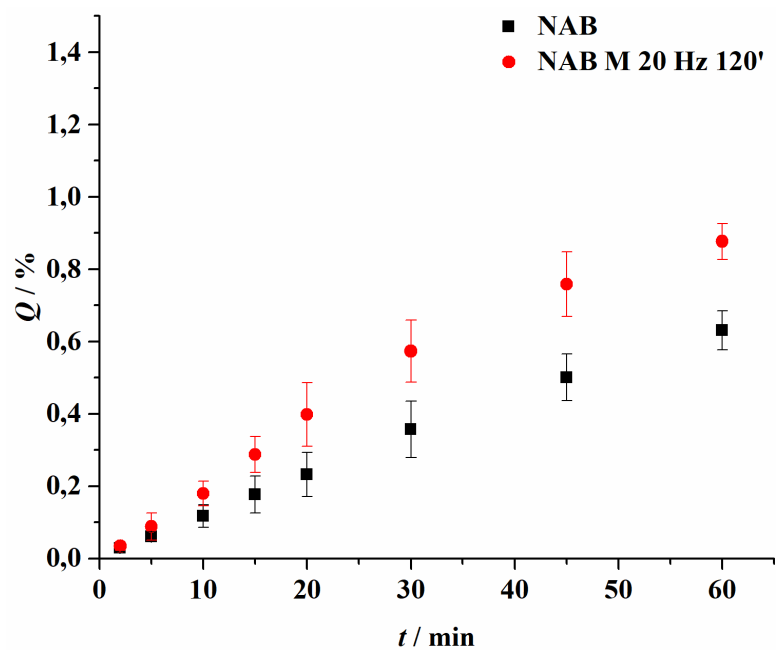
Slika D57. PXRD difraktogrami početne sirovine NAB (—), SBE-β-CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



Slika D58. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), SBE- β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka njihove smjese koja je mljevena pri frekvenciji od 25 Hz u trajanju od 30 min u posudicama od čelika (—).



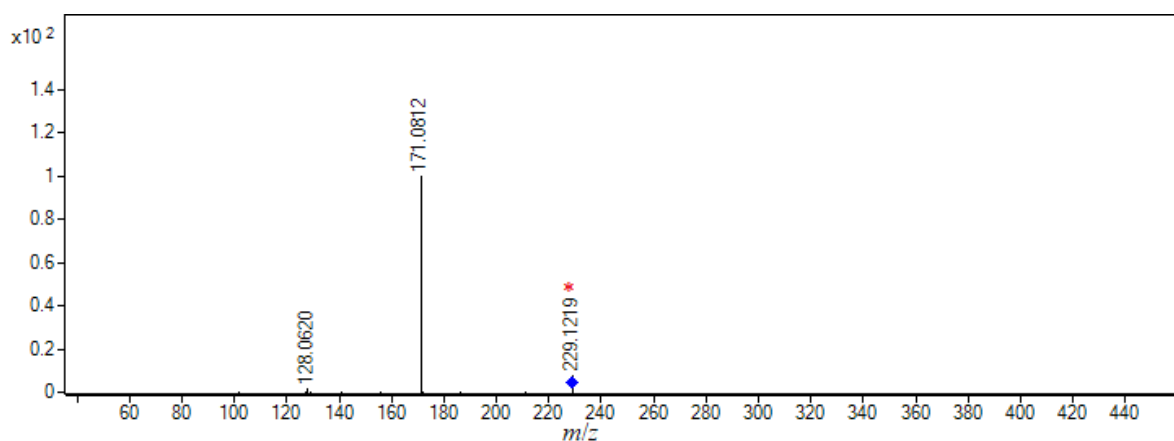
Slika D59. FT-IR ATR spektar početne sirovine NAB (—), SBE- β -CD (—), uzorka njihove fizičke smjese (—) i uzorka produkta koji je dobiven koevaporacijom iz smjese EtOH:H₂O (—).



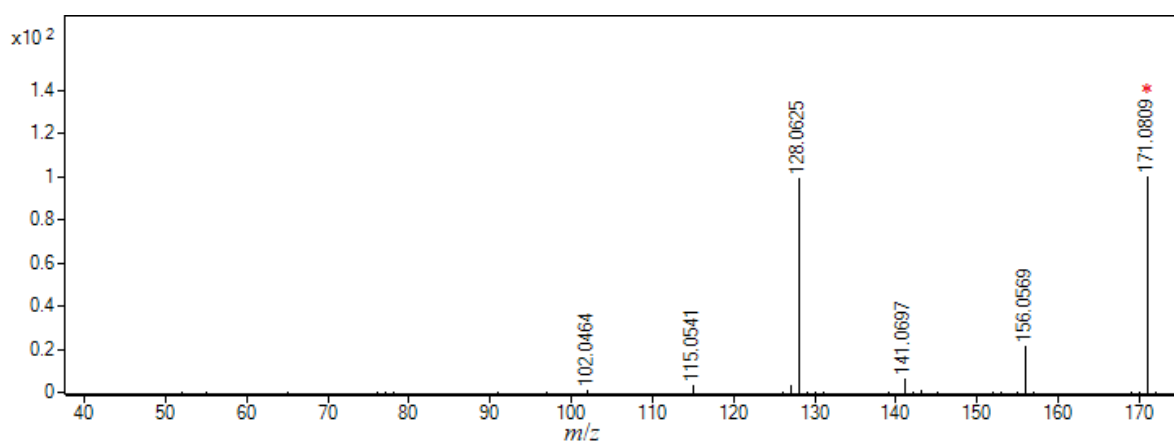
Slika D60. *In vitro* profili otapanja polazne sirovine NAB (■) te uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO_2 (●).

Tablica D30. Validacijski parametri razvijene kromatografske UHPLC-DAD metode za kvantitativno određivanje NAB u prisutnosti različitih β -CD.

Validacijski parametar	
Linearnost	$y = 164,1551x - 6,1181$ $R^2 = 0,9996$
Raspon - $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,5 – 6,0
LOD - $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,01
LOQ - $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,04
Ponovljivost	$\text{RSD} \leq 1,70 \%$
Međupreciznost	$\text{RSD} \leq 4,75 \%$
Preciznost instrumenta	$\text{RSD} \leq 0,52 \%$



Slika D61. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona NAB $[M+H]^+$ (m/z 229,1229), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.



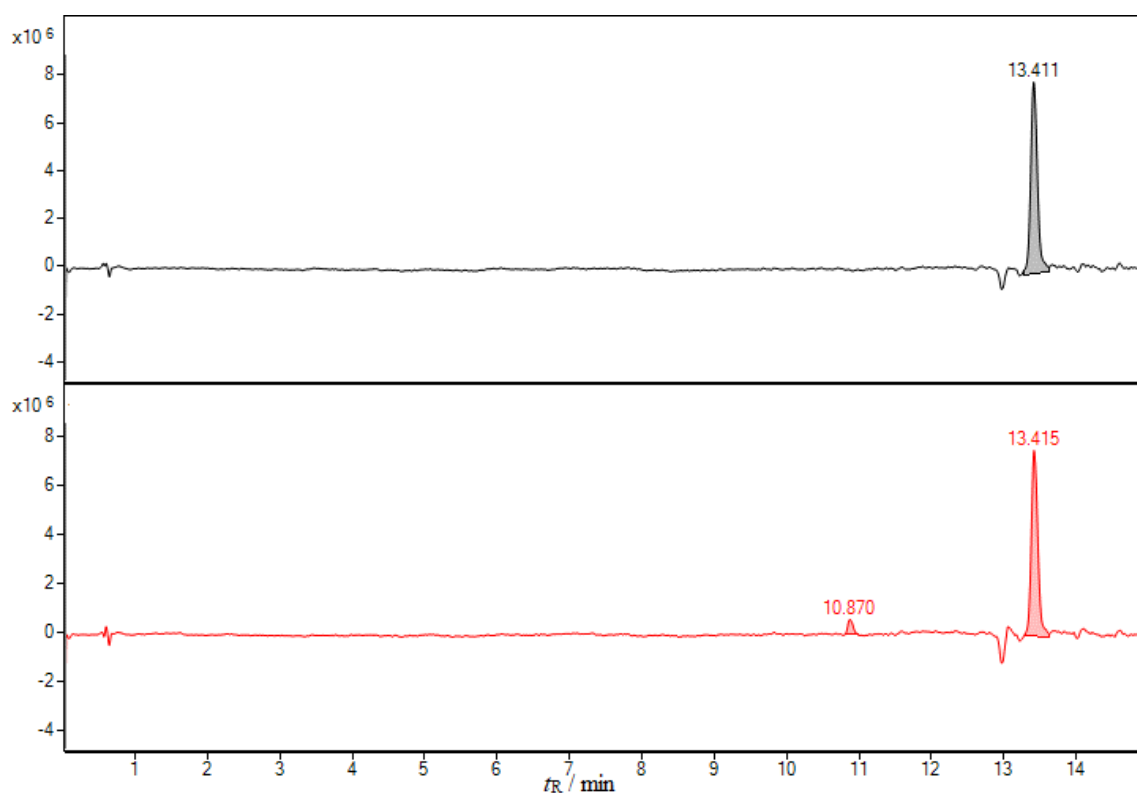
Slika D62. MS/MS spektar iona m/z 171,0808, pri kolizijskom potencijalu od 20 V.

Tablica D31. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara jednostruko protoniranog iona NAB $[M+H]^+$ (m/z 229,1229). Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 40 V.

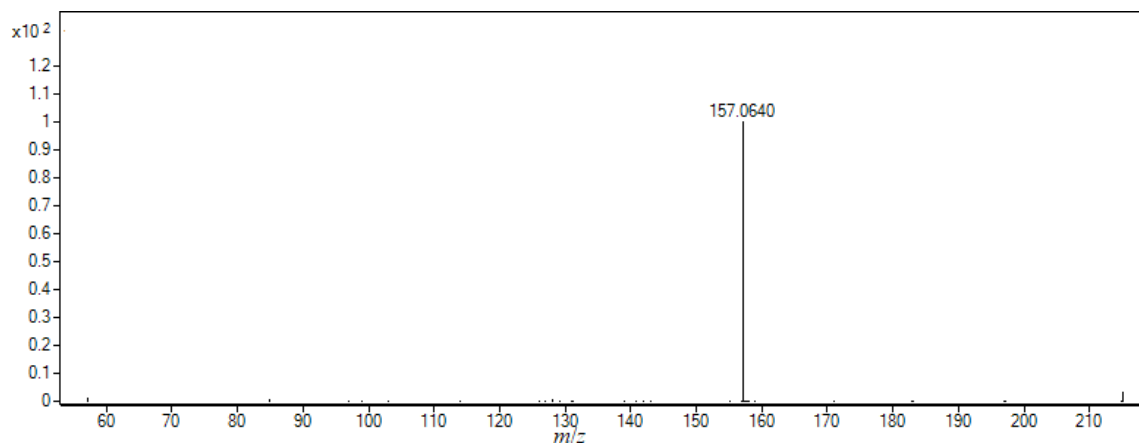
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
229,1219	70,96	7,42	-	-	$[M+H]^+$
171,0812	100	100	100	24,99	$[C_{12}H_{11}O]^+$
156,0567	0,23	0,29	1,53	9,00	$[C_{11}H_8O]^{*+}$
128,0620	1,65	1,84	5,78	100	$[C_{10}H_8]^{*+}$

Tablica D32. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 171,0808. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 5, 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %				Asignacija signala
	5 V	10 V	20 V	40 V	
171,0809	100	100	100	0,20	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}]^+$
156,0569	0,39	1,73	21,15	0,25	$[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}]^{\bullet+}$
141,0697	0,15	0,51	6,54	0,59	$[\text{C}_{11}\text{H}_9]^+$
128,0625	2,26	5,57	98,86	100	$[\text{C}_{10}\text{H}_8]^{\bullet+}$
127,0542	0,13	0,19	2,83	15,47	$[\text{C}_{10}\text{H}_7]^+$
102,0464	-	0,16	1,04	20,05	$[\text{C}_8\text{H}_6]^{\bullet+}$
78,0467	-	-	0,51	9,65	$[\text{C}_6\text{H}_6]^{\bullet+}$



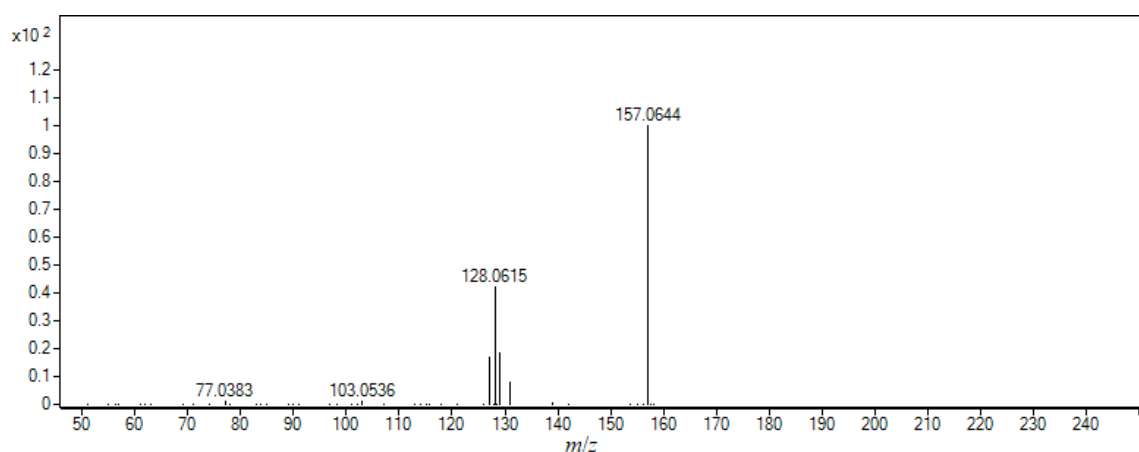
Slika D63. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO_2 (-) i uzorka podvrgnutog kiseljoj hidrolitičkoj razgradnji (-).



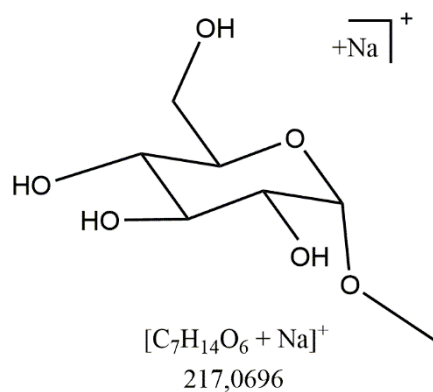
Slika D64. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona DP1 $[M+H]^+$ (m/z 215,1062), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.

Tablica D33. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 215,1062. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 30 V.

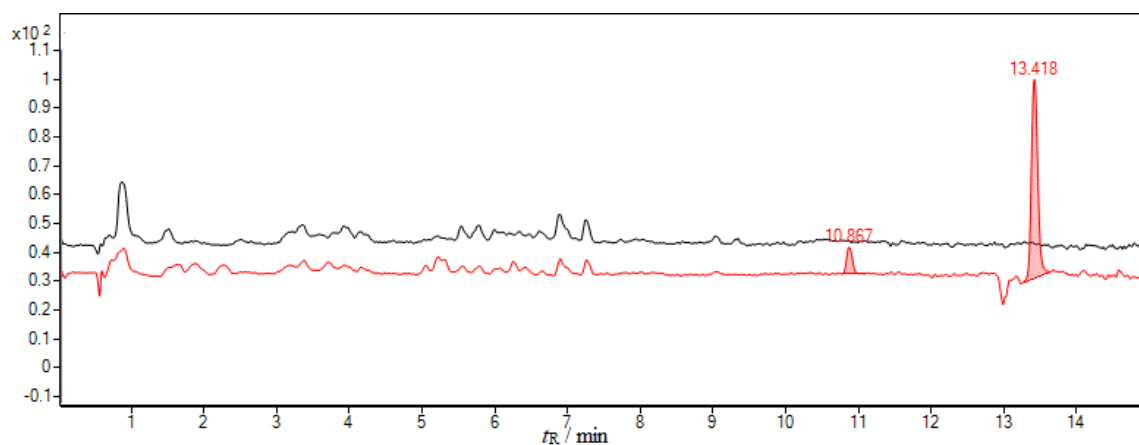
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	30 V	
215,1065	3,27	-	-	$[M+H]^+$
157,0640	100	100	100	$[C_{11}H_9O]^+$
131,0485	-	-	3,08	$[C_9H_7O]^+$
129,0688	-	-	9,57	$[C_{10}H_9]^+$
128,0614	-	1,84	13,73	$[C_{10}H_8]^{\bullet+}$
127,0529	-	1,36	7,52	$[C_{10}H_7]^+$



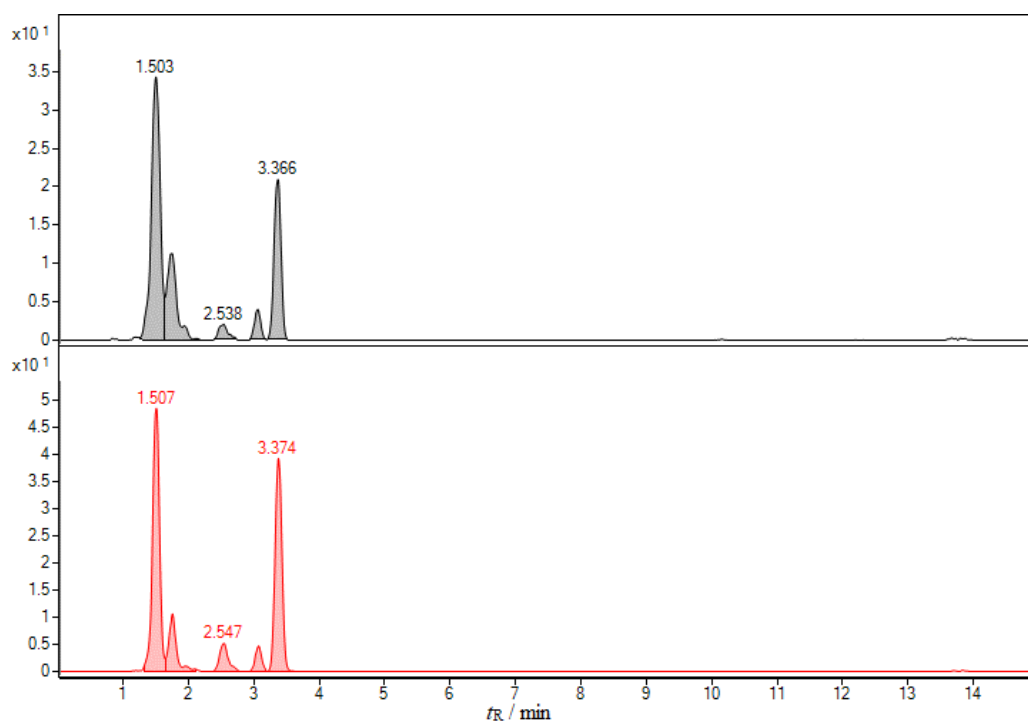
Slika D65. MS/MS spektar iona m/z 157,0644, pri kolizijskom potencijalu od 20 V.



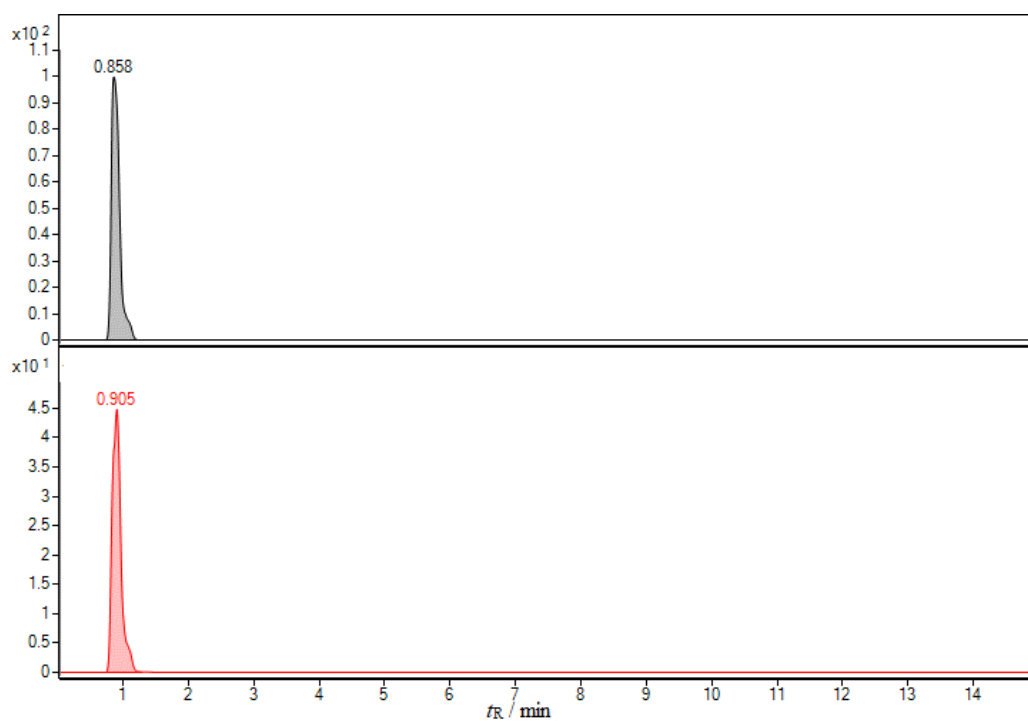
Slika D66. Struktura razgradnog produkta β -CD nastalog u kiselim hidrolitičkim uvjetima.



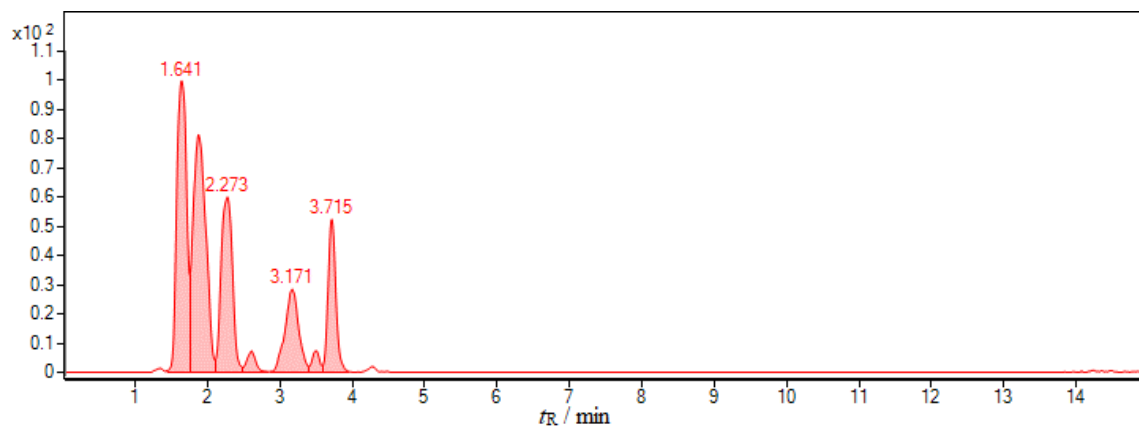
Slika D67. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje uzorka čistog HP- β -CD podvrgnutog kiselj hidrolitičkoj razgradnji (-) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiselj hidrolitičkoj razgradnji (-).



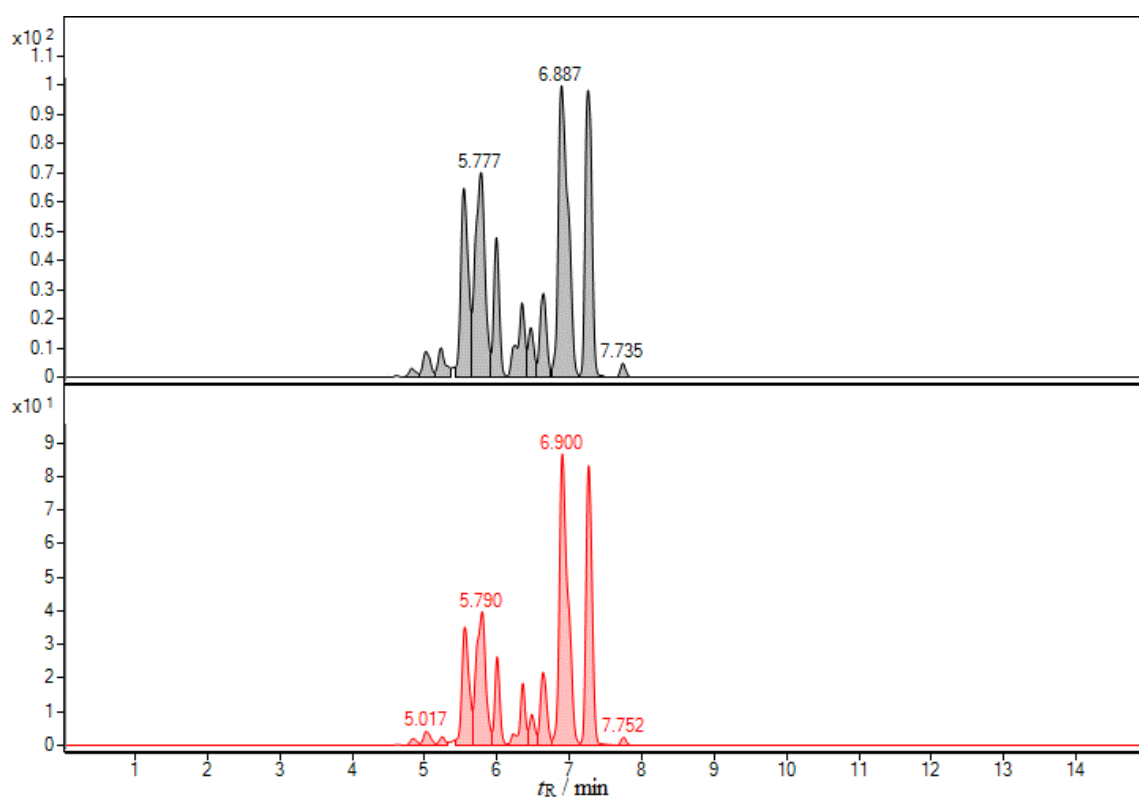
Slika D68. Usporedba kromatograma iona m/z 243,0831 uzorka čistog HP- β -CD podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (-) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (-).



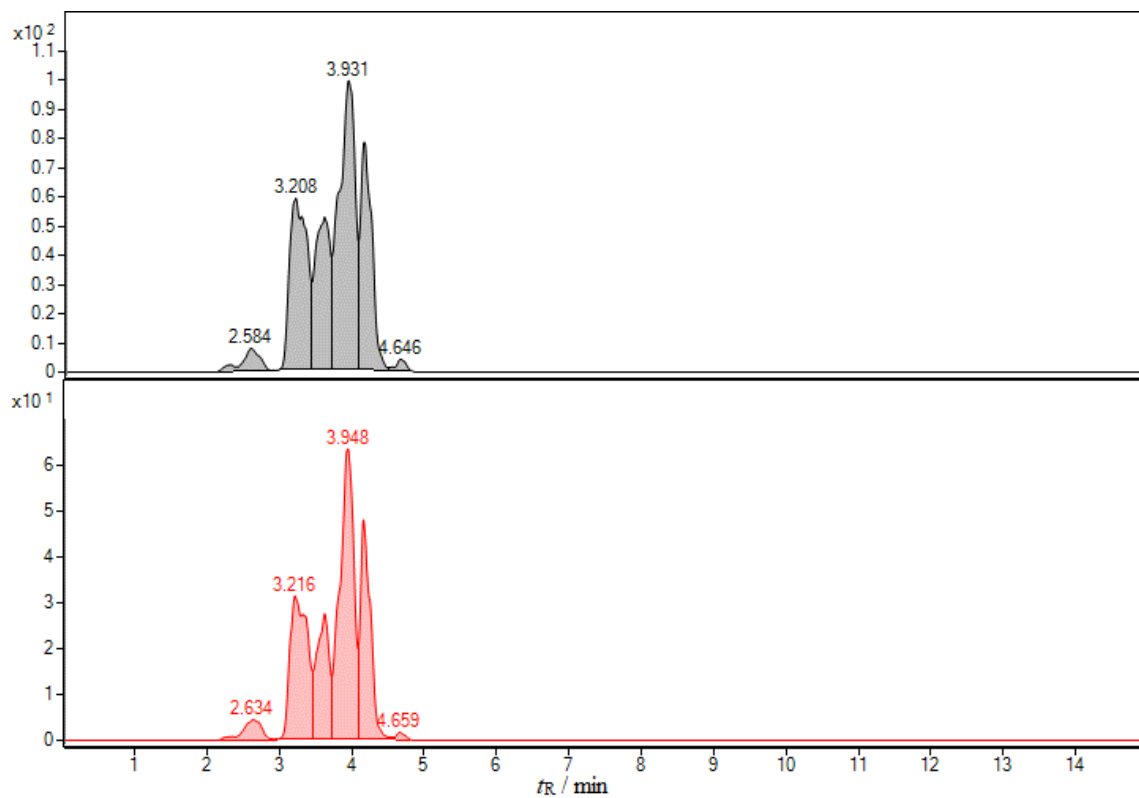
Slika D69. Usporedba kromatograma iona m/z 261,0956 uzorka čistog HP- β -CD podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (-) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (-).



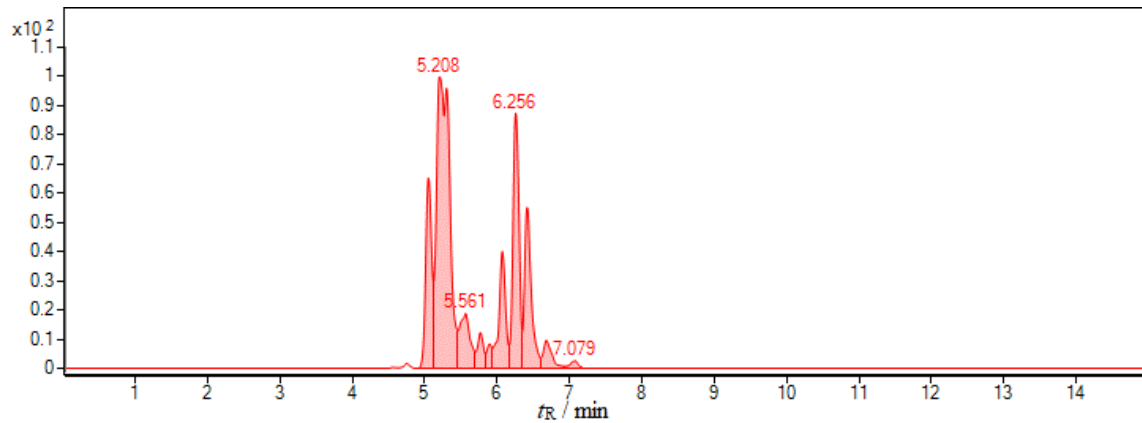
Slika D70. Kromatogram iona m/z 275,1100 uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiseljoj hidrolitičkoj razgradnji (-).



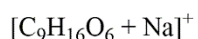
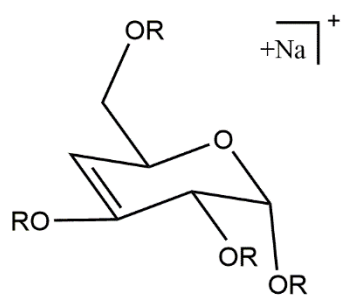
Slika D71. Usporedba kromatograma iona m/z 301,1255 uzorka čistog HP- β -CD podvrgnutog kiseljoj hidrolitičkoj razgradnji (-) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiseljoj hidrolitičkoj razgradnji (-).



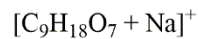
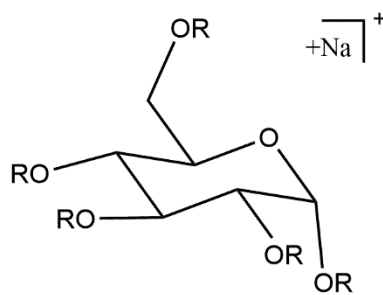
Slika D72. Usporedba kromatograma iona m/z 319,1360 uzorka čistog HP- β -CD podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (-) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (-).



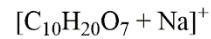
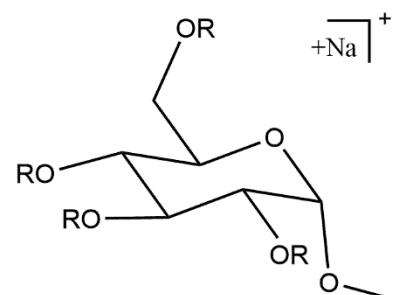
Slika D73. Kromatogram iona m/z 333,1513 uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog kiseloj hidrolitičkoj razgradnji (-).



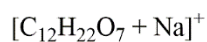
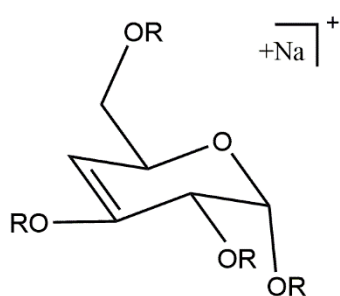
243,0831



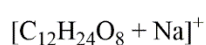
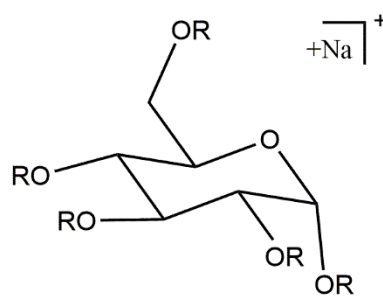
261,0956



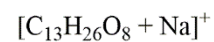
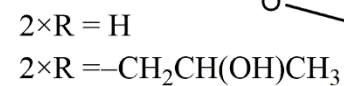
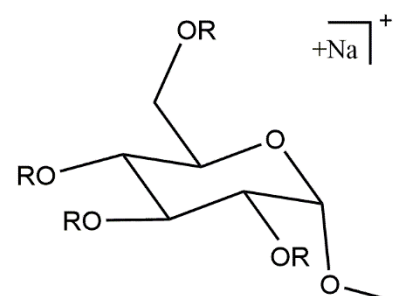
275,1100



301,1255

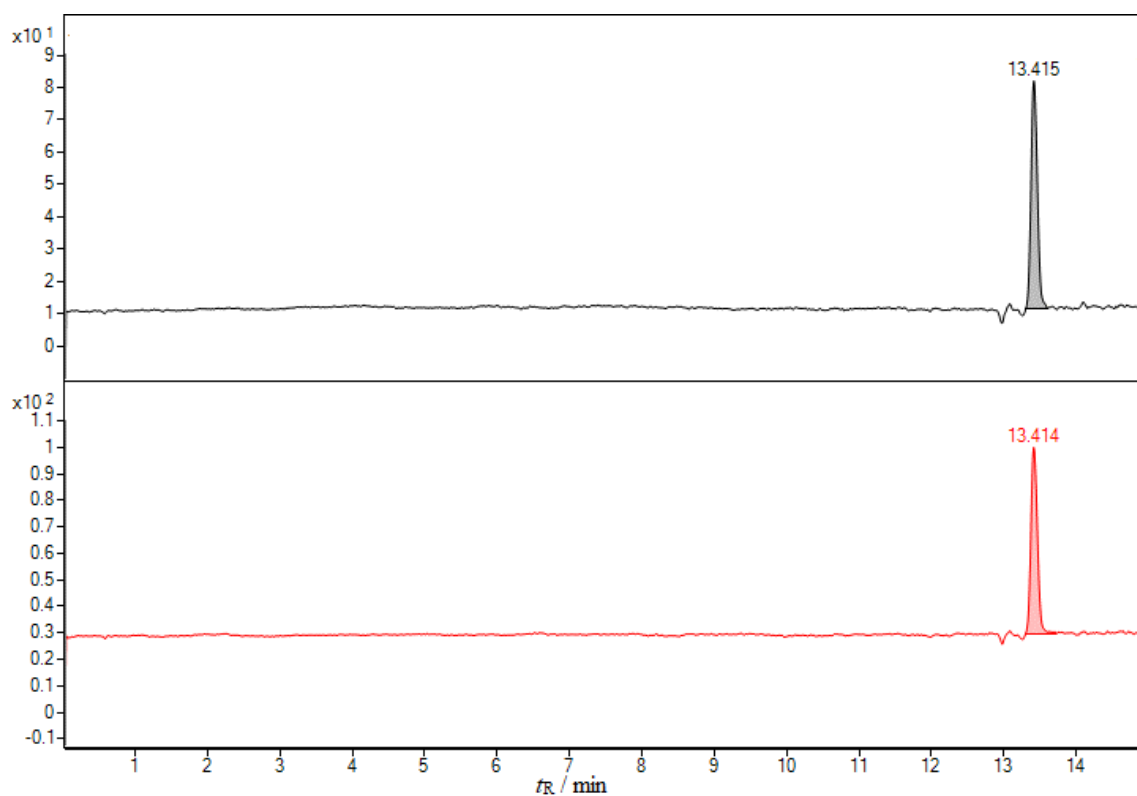


319,1360

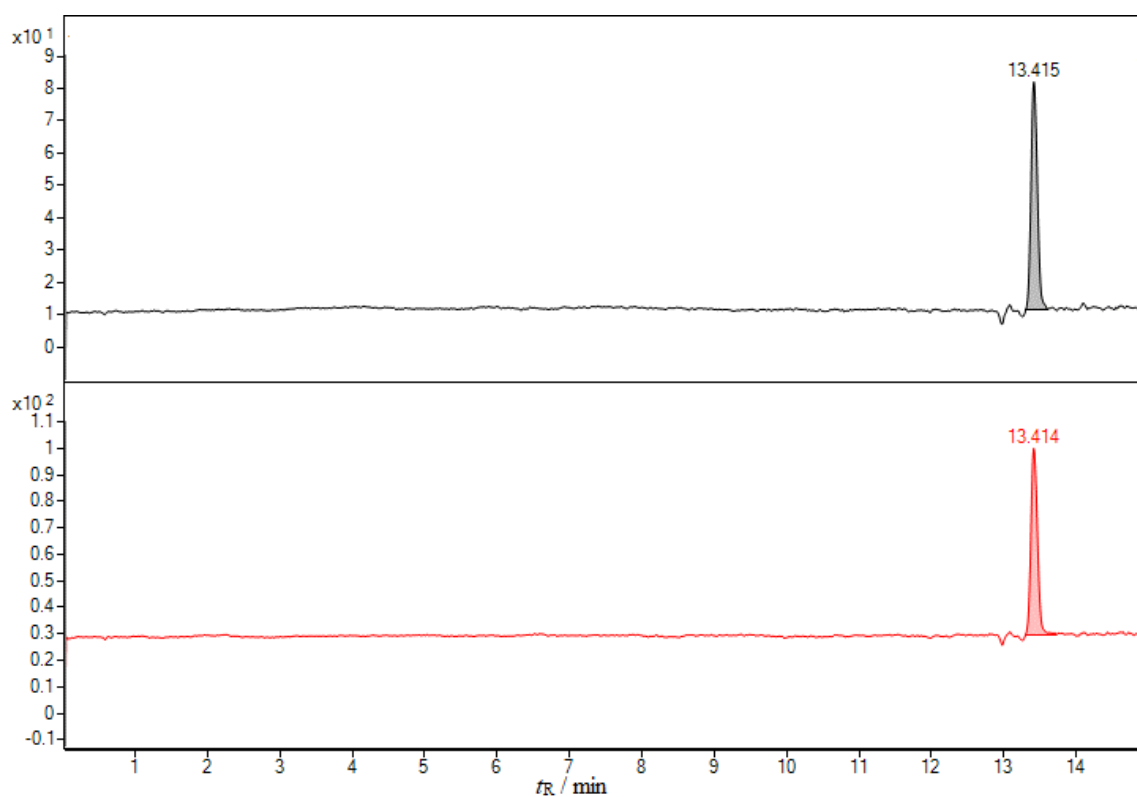


333,1513

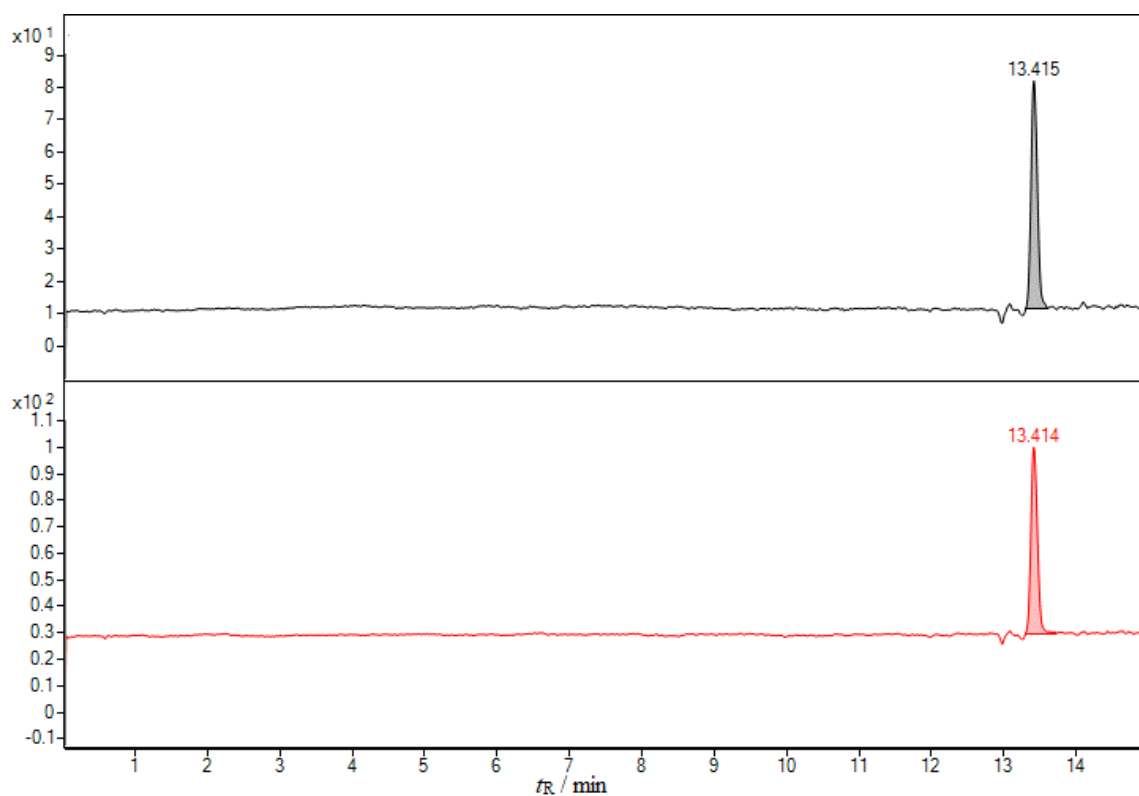
Slika D74. Predložene strukture razgradnih produkata HP-β-CD nastalih u kiselim hidrolitičkim uvjetima.



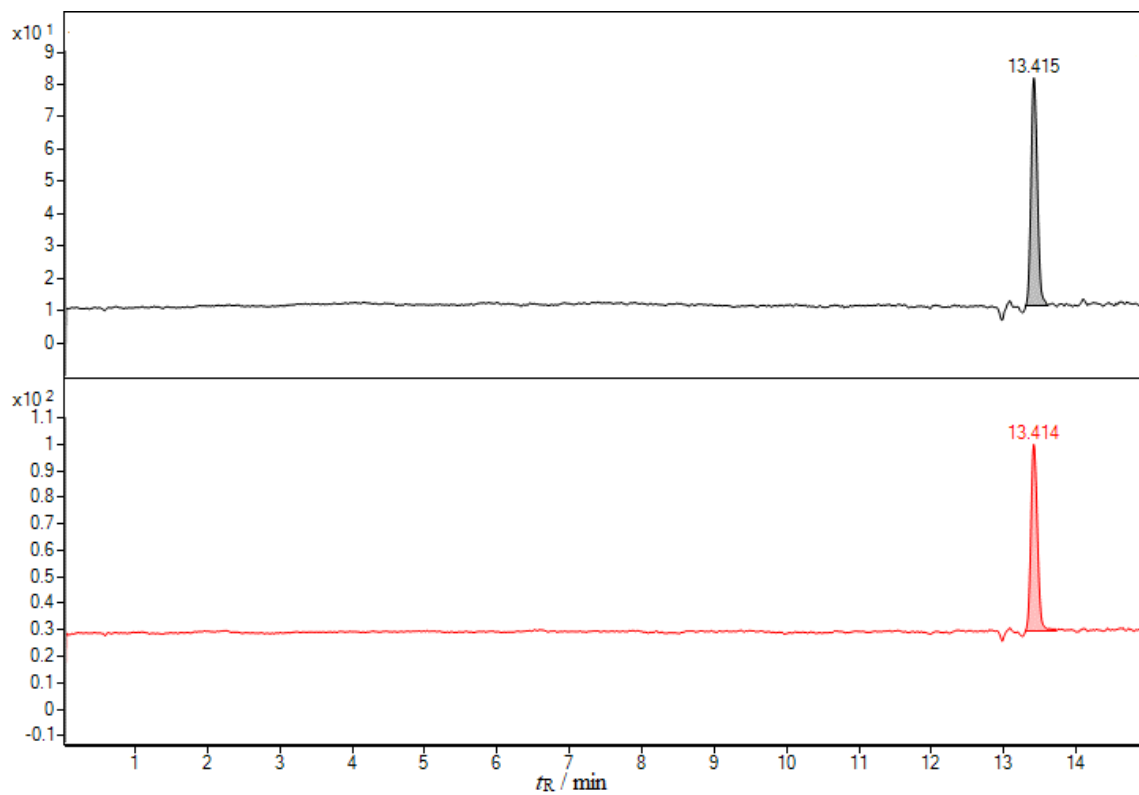
Slika D75. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO_2 (–) i uzorka podvrgnutog neutralnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).



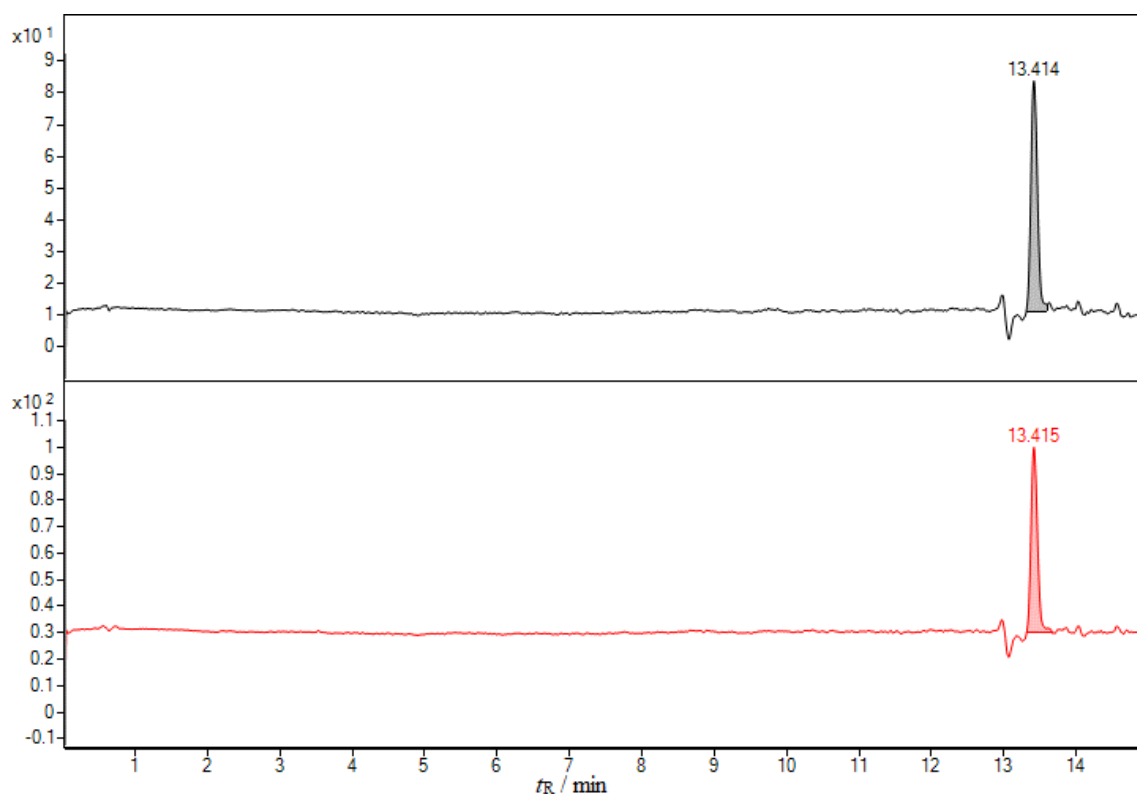
Slika D76. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:β-CD (–) i uzorka NAB:β-CD podvrgnutog neutralnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).



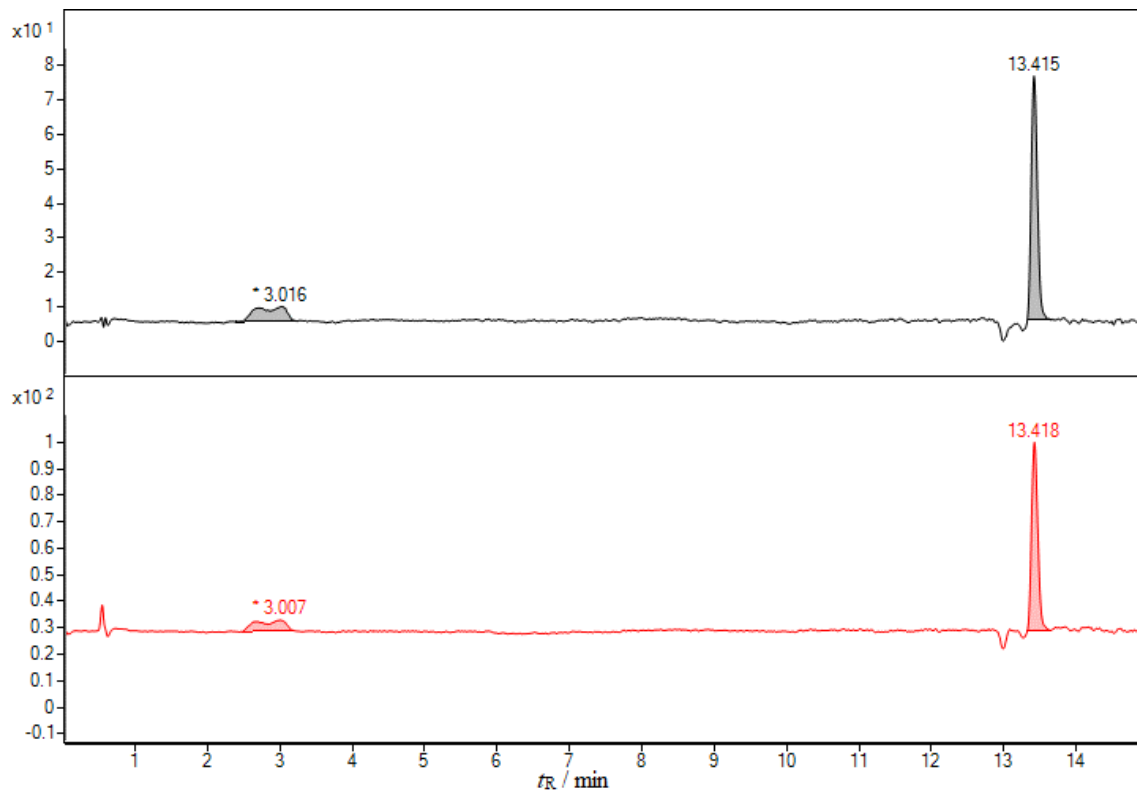
Slika D77. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:HP- β -CD (-) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog neutralnoj hidrolitičkoj razgradnji (-).



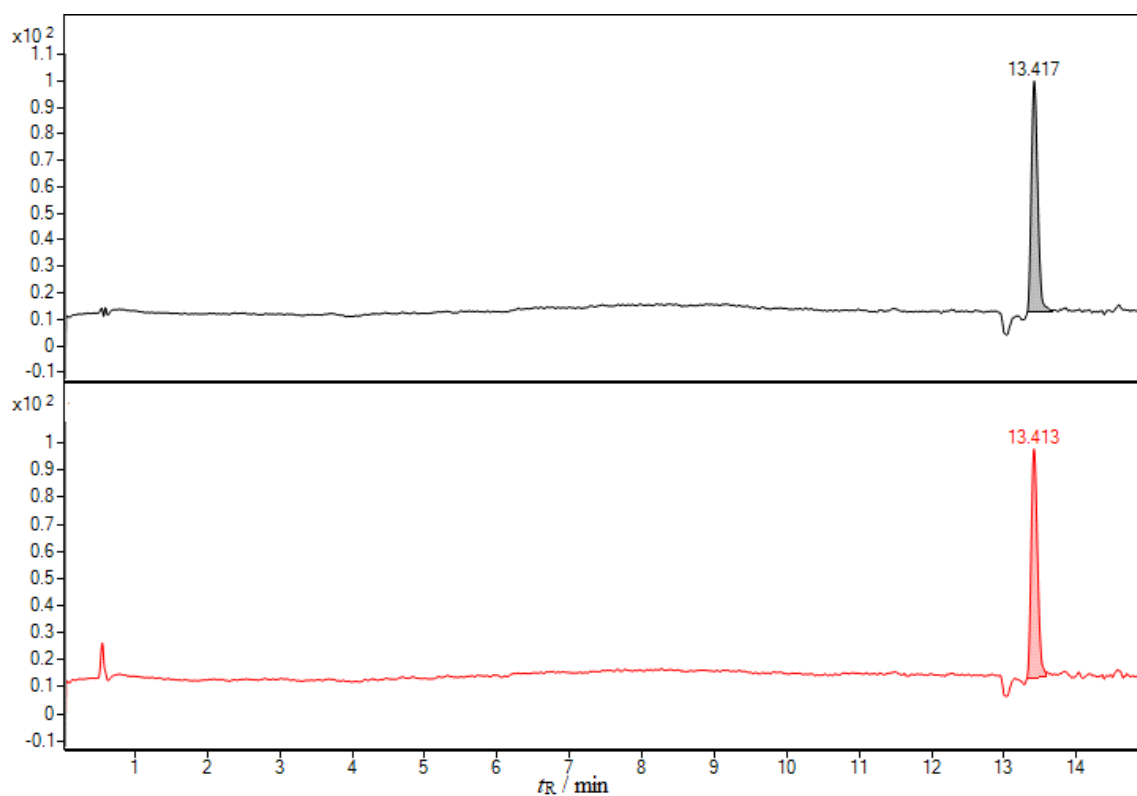
Slika D78. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:SBE- β -CD (-) i uzorka NAB:SBE- β -CD podvrgnutog neutralnoj hidrolitičkoj razgradnji (-).



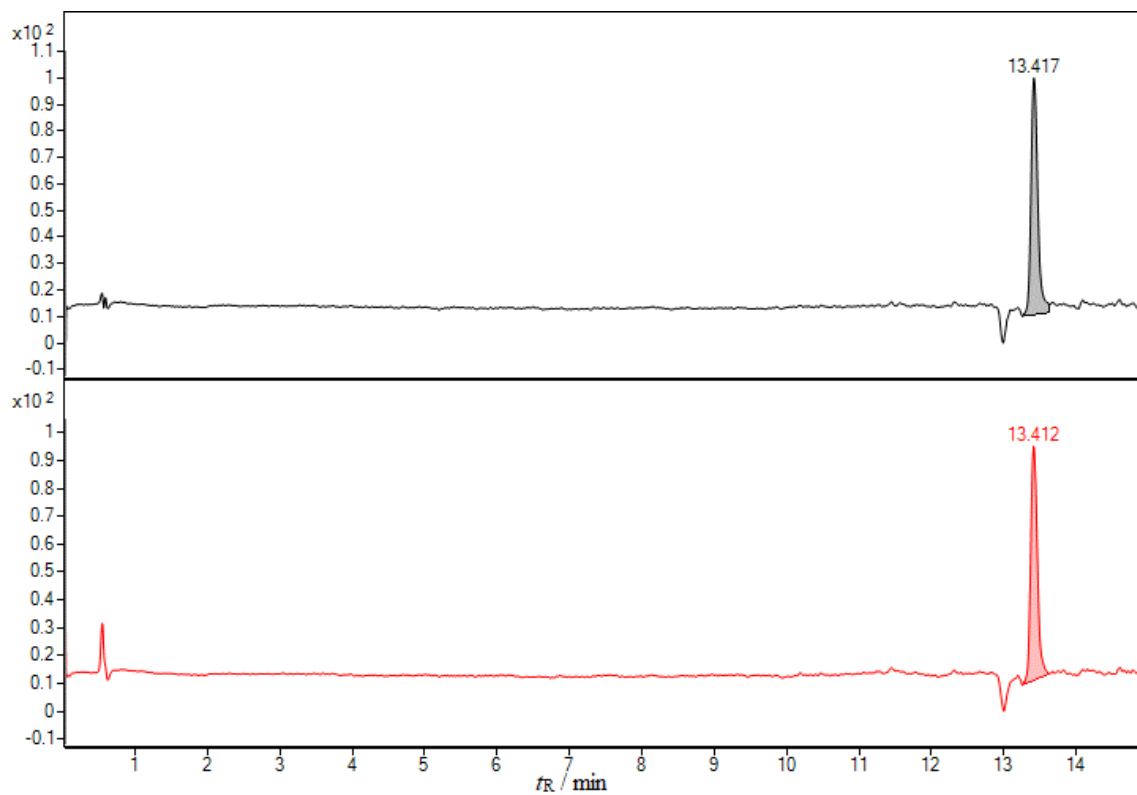
Slika D79. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO_2 (–) i uzorka podvrgnutog alkalnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).



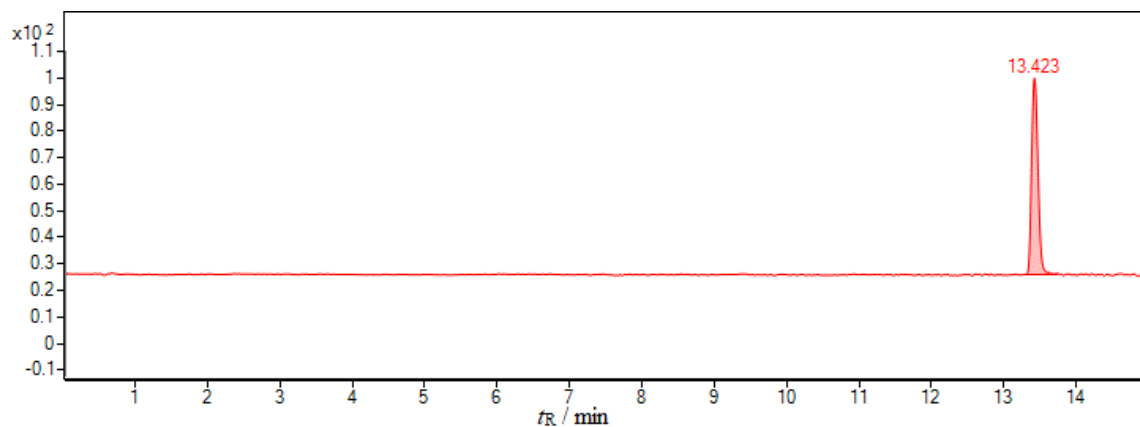
Slika D80. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB: β -CD (–) i uzorka NAB: β -CD podvrgnutog alkalnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).



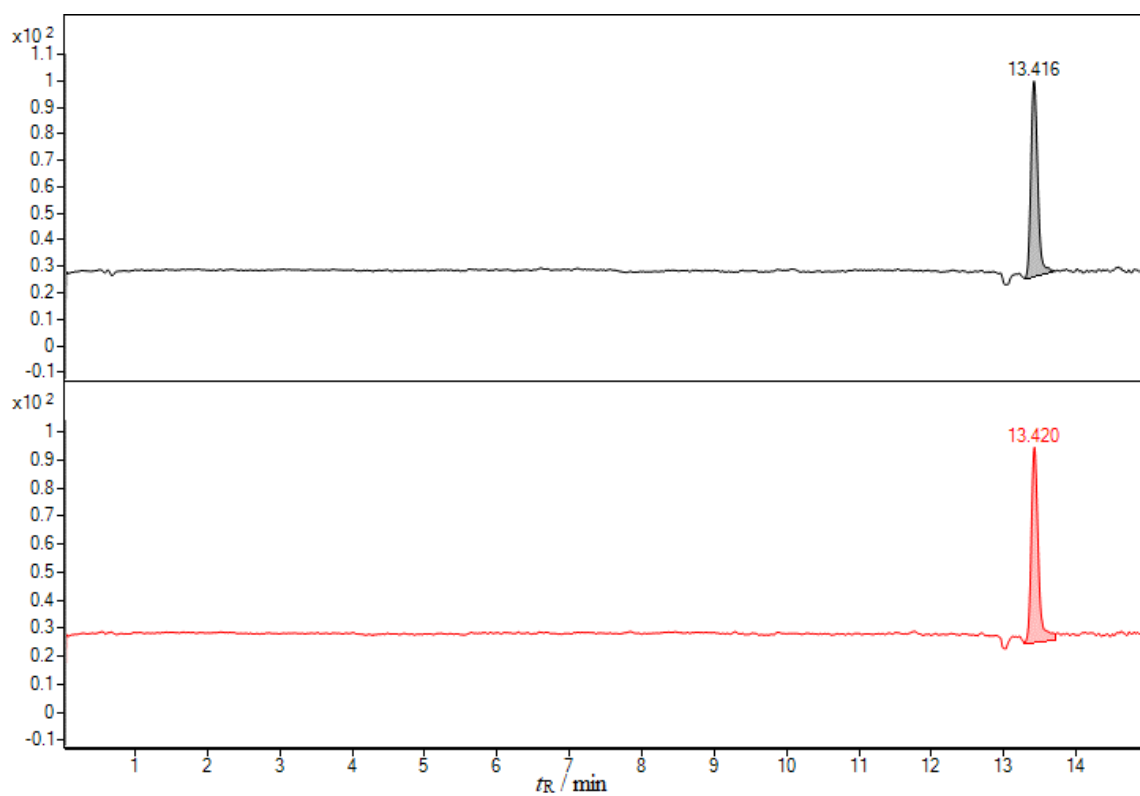
Slika D81. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:HP- β -CD (–) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog alkalnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).



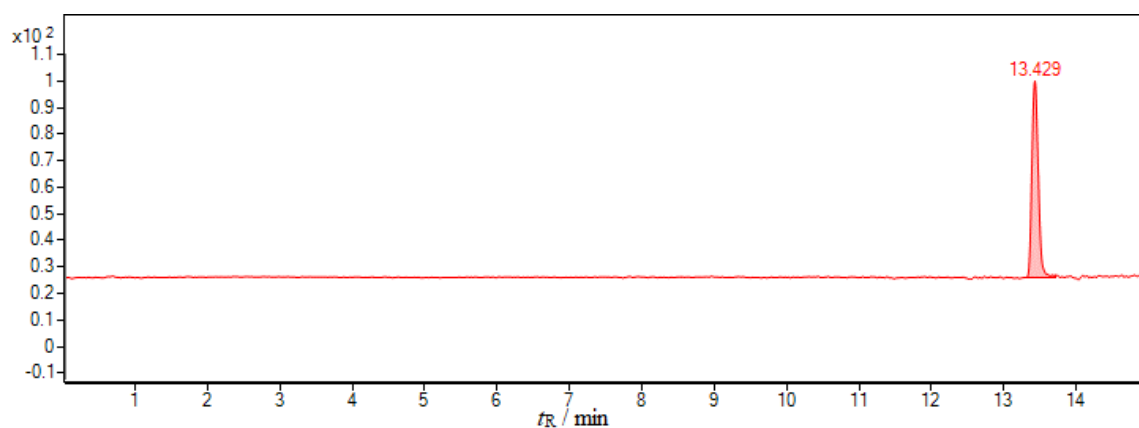
Slika D82. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:SBE- β -CD (–) i uzorka NAB:SBE- β -CD podvrgnutog alkalnoj hidrolitičkoj razgradnji (–).



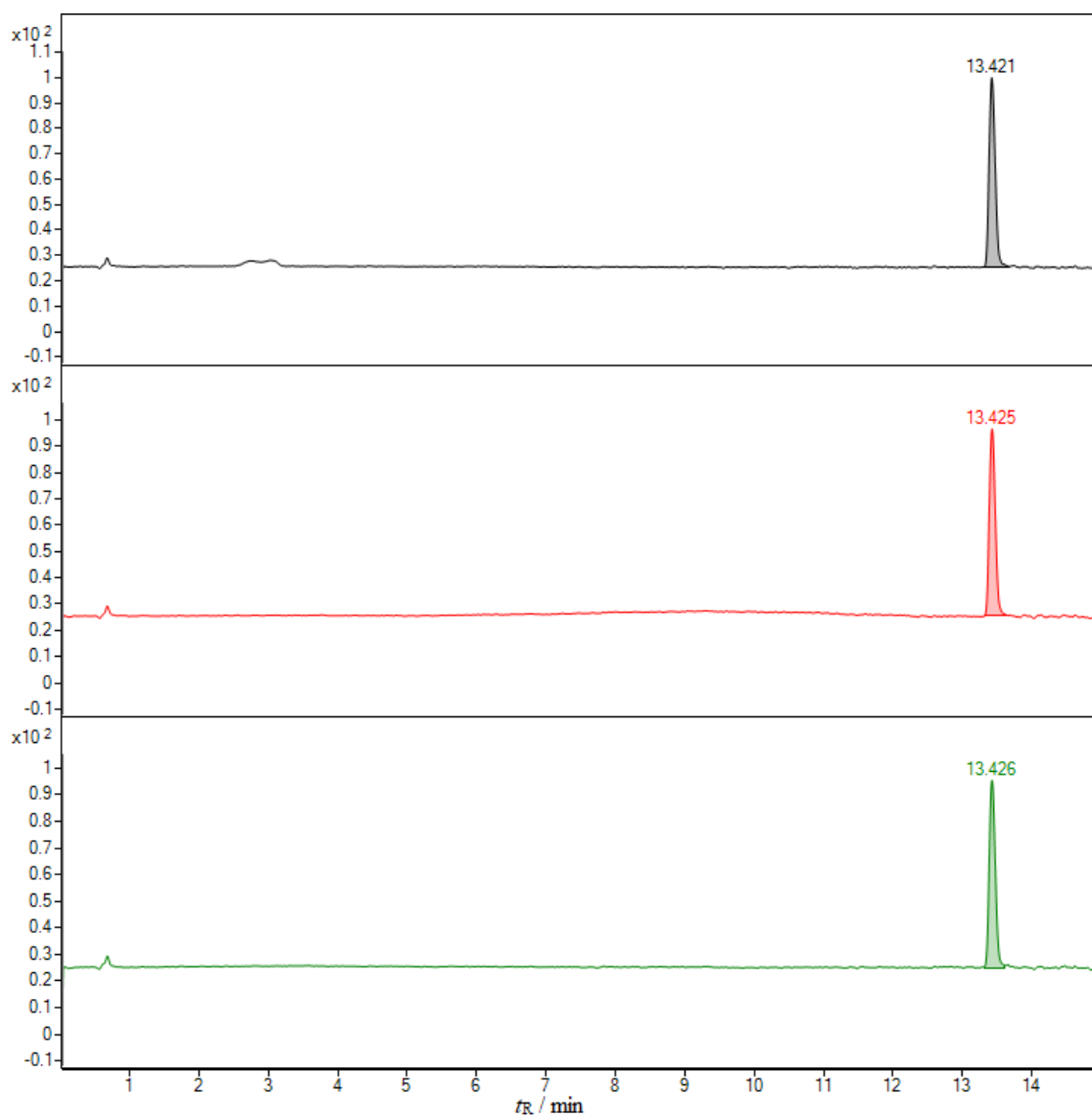
Slika D83. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB podvrgnutog oksidativnoj razgradnji pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana (-).



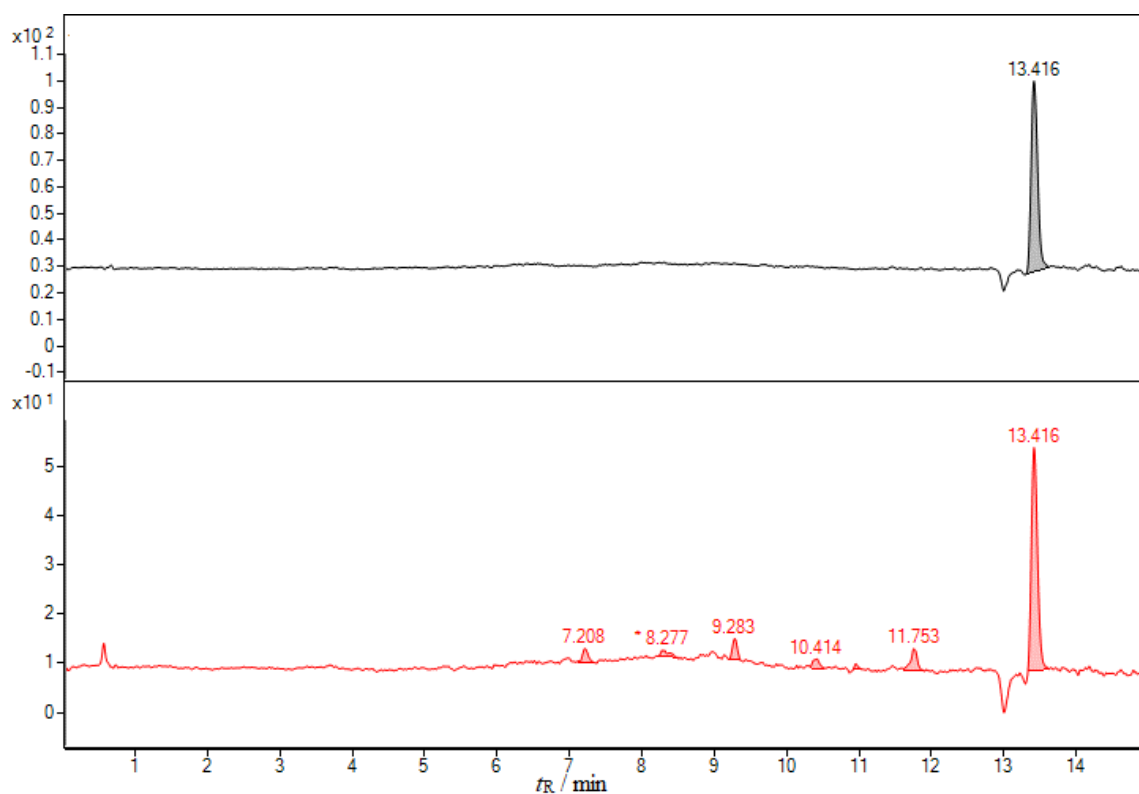
Slika D84. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO₂ (-) i uzorka podvrgnutog oksidativnoj razgradnji pri 80 °C u trajanju od 10 h (-).



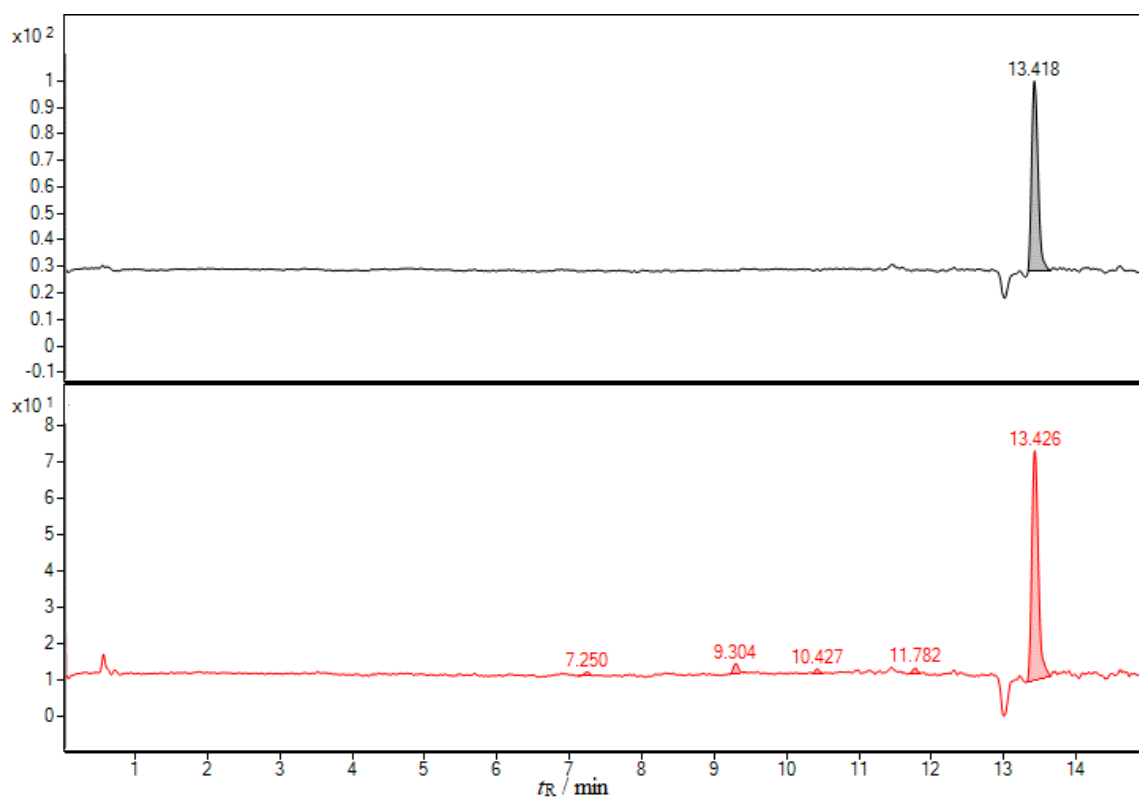
Slika D85. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka NAB mljevenog u posudici od ZrO_2 podvrgnutog oksidativnoj razgradnji pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana (-).



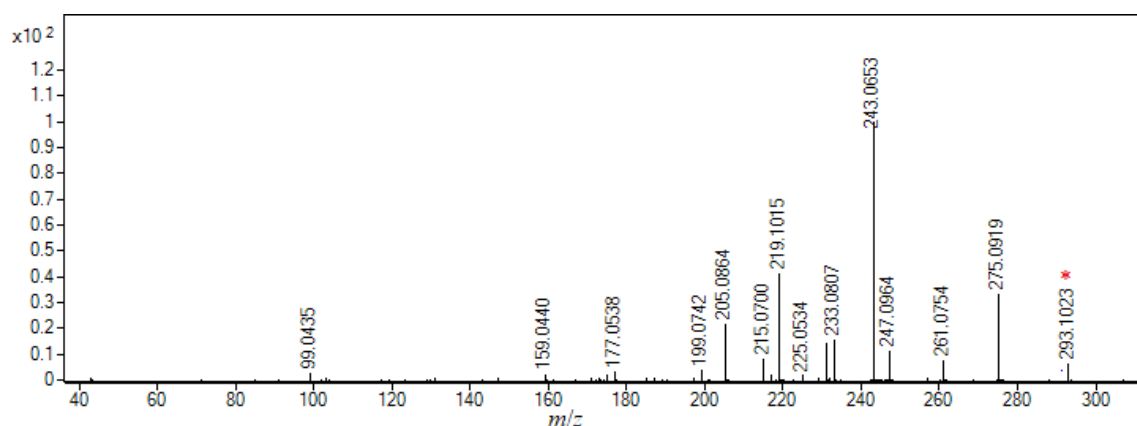
Slika D86. Kromatogrami ukupne ionske struje uzoraka NAB: β -CD (-), NAB:HP- β -CD (-) i NAB:SBE- β -CD (-) podvrgnutih oksidativnoj razgradnji pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana.



Slika D87. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:HP- β -CD (–) i uzorka NAB:HP- β -CD podvrgnutog oksidativnoj razgradnji pri 80 °C u trajanju od 10 h (–).



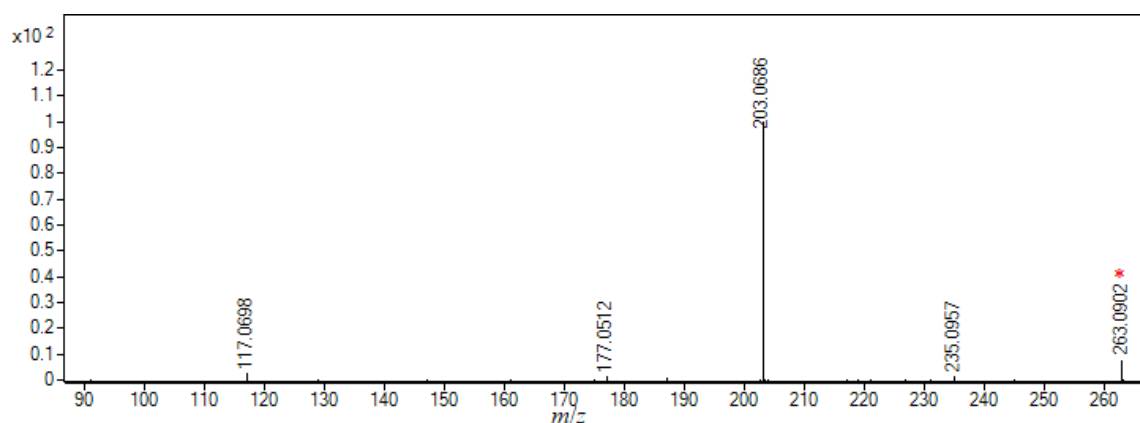
Slika D88. Usporedba kromatograma ukupne ionske struje kontrolnog uzorka NAB:SBE- β -CD (–) i uzorka NAB:SBE- β -CD podvrgnutog oksidativnoj razgradnji pri 80 °C u trajanju od 10 h (–).



Slika D89. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona DP3 $[M+H]^+$ (m/z 293,1031), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.

Tablica D34. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 293,1031. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 40 V.

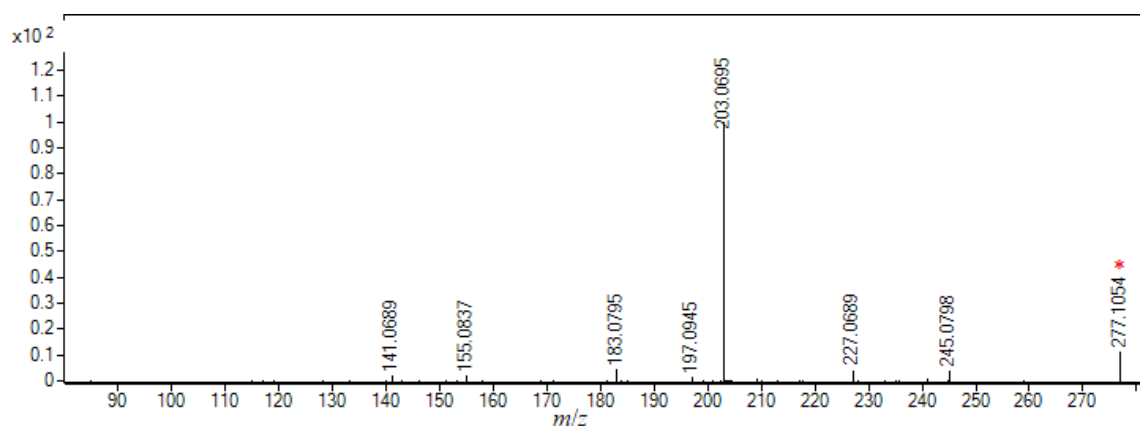
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	40 V	
293,1023	6,22	0,33	-	$[M+H]^+$
275,0919	33,26	0,15	-	$[C_{15}H_{15}O_5]^+$
261,0754	7,33	-	-	$[C_{14}H_{13}O_5]^+$
247,0964	11,30	2,81	-	$[C_{14}H_{15}O_4]^+$
243,0653	100	100	9,85	$[C_{14}H_{11}O_4]^+$
233,0807	15,22	6,47	-	$[C_{13}H_{13}O_4]^+$
231,1016	14,07	11,95	-	$[C_{14}H_{15}O_3]^+$
219,1015	40,98	44,88	0,77	$[C_{13}H_{15}O_3]^+$
215,0700	8,14	11,79	1,20	$[C_{13}H_{11}O_3]^+$
205,0864	21,58	33,90	2,82	-
189,0878	0,17	5,57	10,13	-
186,0295	-	-	13,08	-
175,0378	1,70	5,19	10,81	-
162,0669	-	0,88	18,28	-
159,0799	0,70	9,24	82,05	-
159,0440	2,28	1,15	11,79	-
157,0279	-	-	13,06	-
147,0434	0,90	4,84	76,00	-
145,0648	-	2,18	12,27	-
141,0697	-	0,32	10,46	$[C_{11}H_9]^+$
131,0486	0,99	6,64	15,35	-
130,0404	-	-	12,05	-
128,0624	-	0,21	11,24	$[C_{10}H_8]^{\bullet+}$
119,0458	0,52	2,62	100	-
117,0726	0,20	1,68	17,64	-
115,0540	-	1,04	13,16	$[C_9H_7]^+$
105,0696	-	-	12,26	-
102,0440	0,29	-	12,91	-
91,0543	0,12	1,85	25,62	-
43,0188	0,92	3,57	51,03	$[C_2H_3O]^+$



Slika D90. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona DP4 $[M+H]^+$ (m/z 263,0909), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.

Tablica D35. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 263,0909. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 30 V.

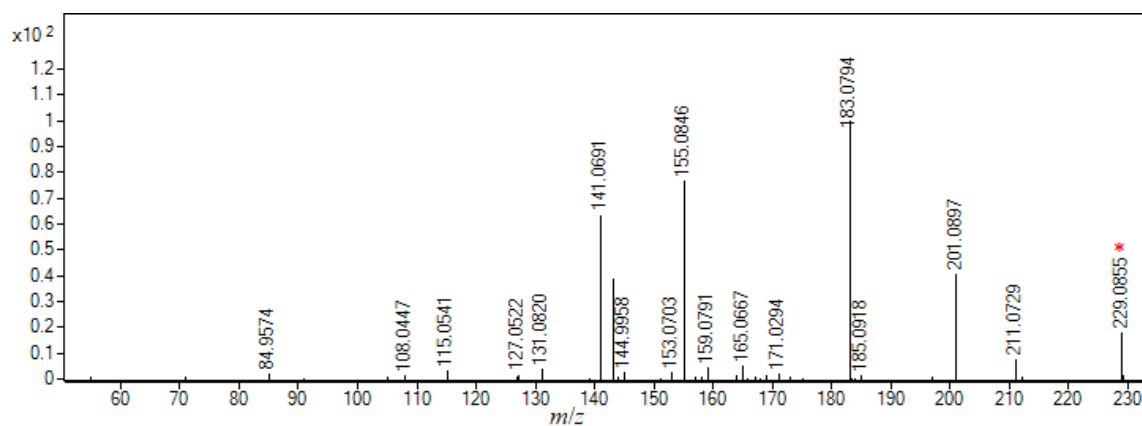
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	30 V	
263,0902	7,78	-	-	$[M+H]^+$
235,0957	1,59	-	-	$[C_{14}H_{12}O_5]^+$
203,0686	100	100	100	$[C_{12}H_{11}O_3]^+$
185,0590	-	-	7,48	-
177,0512	1,51	-	-	-
161,0581	-	8,59	36,71	$[C_{10}H_9O_2]^+$
146,0352	-	-	33,07	-
143,0483	-	1,05	12,35	$[C_{10}H_7O]^+$
117,0698	2,51	7,09	36,98	-
105,0680	-	1,87	27,37	-
77,0370	-	-	5,30	$[C_6H_5]^+$



Slika D91. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona DP5 $[M+H]^+$ (m/z 277,1076), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.

Tablica D36. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 277,1076. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 30 V.

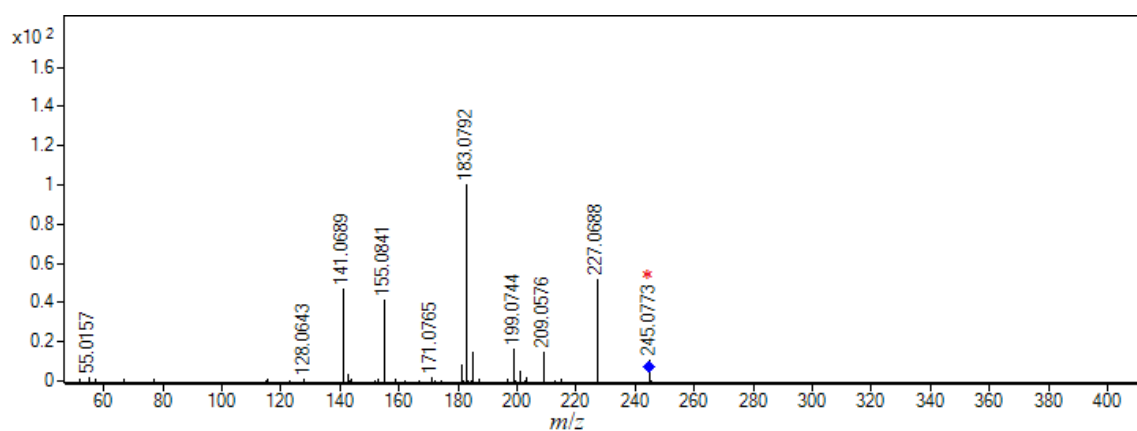
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	30 V	
277,1054	11,30	-	-	$[M+H]^+$
245,0798	3,53	-	-	$[C_{14}H_{13}O_4]^+$
227,0689	4,09	1,04	-	$[C_{14}H_{11}O_3]^+$
203,0695	100	100	100	$[C_{12}H_{11}O_3]^+$
183,0795	4,34	3,36	2,91	-
161,0602	0,27	1,17	7,53	-
157,0640	-	-	3,60	-
153,0695	-	-	3,01	-
146,0355	-	-	3,55	-
141,0689	1,73	3,00	6,50	$[C_{11}H_9]^+$
129,0693	0,11	-	2,29	-
128,0617	-	-	1,00	$[C_{10}H_8]^{\bullet+}$
117,0708	0,12	1,58	10,87	-
115,0537	0,16	-	4,28	$[C_9H_7]^+$
105,0712	-	-	2,23	-
91,0530	0,11	-	1,44	-
43,0181	0,39	-	-	$[C_2H_3O]^+$



Slika D92. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona DP6 $[M+H]^+$ (m/z 229,0852), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.

Tablica D37. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 229,0852. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 30 V.

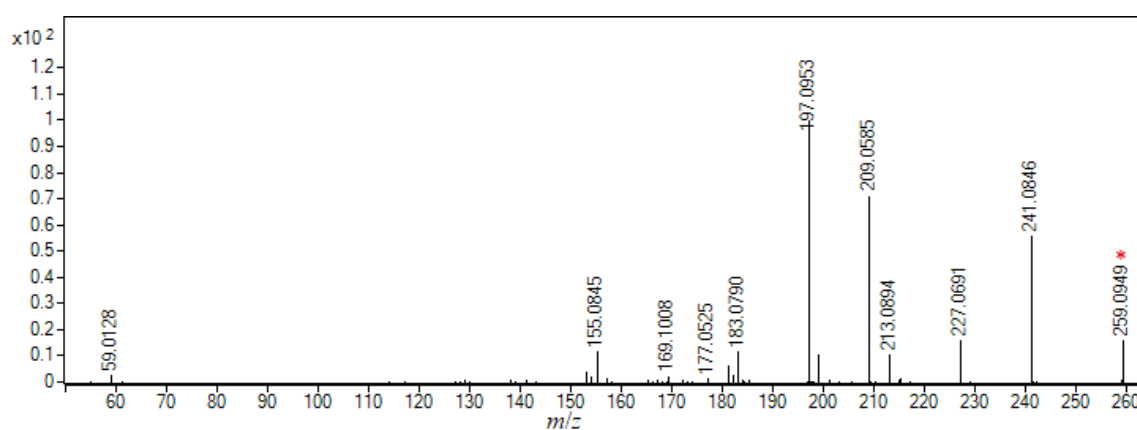
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	30 V	
229,0855	18,05	1,60	-	$[M+H]^+$
211,0729	7,50	-	-	$[C_{14}H_{11}O_2]^+$
201,0897	40,69	24,49	3,22	$[C_{13}H_{13}O_2]^+$
183,0794	100	26,92	3,09	$[C_{13}H_{11}O]^+$
173,0946	-	3,08	1,09	-
165,0667	4,79	10,40	4,16	-
159,0791	4,19	9,18	2,00	-
155,0846	76,46	61,79	15,03	$[C_{12}H_{11}]^+$
153,0703	2,68	3,38	14,72	$[C_{12}H_9]^+$
143,0478	38,77	89,19	100	$[C_{10}H_7O]^+$
141,0691	63,50	100	54,70	$[C_{11}H_9]^+$
131,0820	3,86	12,05	4,26	-
129,0689	-	5,61	16,36	-
128,0614	-	-	9,00	$[C_{10}H_8]^{\bullet+}$
127,0522	1,73	4,36	5,12	$[C_{10}H_7]^+$
115,0559	3,15	17,66	96,50	$[C_9H_7]^+$
43,0178	-	-	12,30	$[C_2H_3O]^+$



Slika D93. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona DP7 $[M+H]^+$ (m/z 245,0806), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.

Tablica D38. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 245,0806. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 30 V.

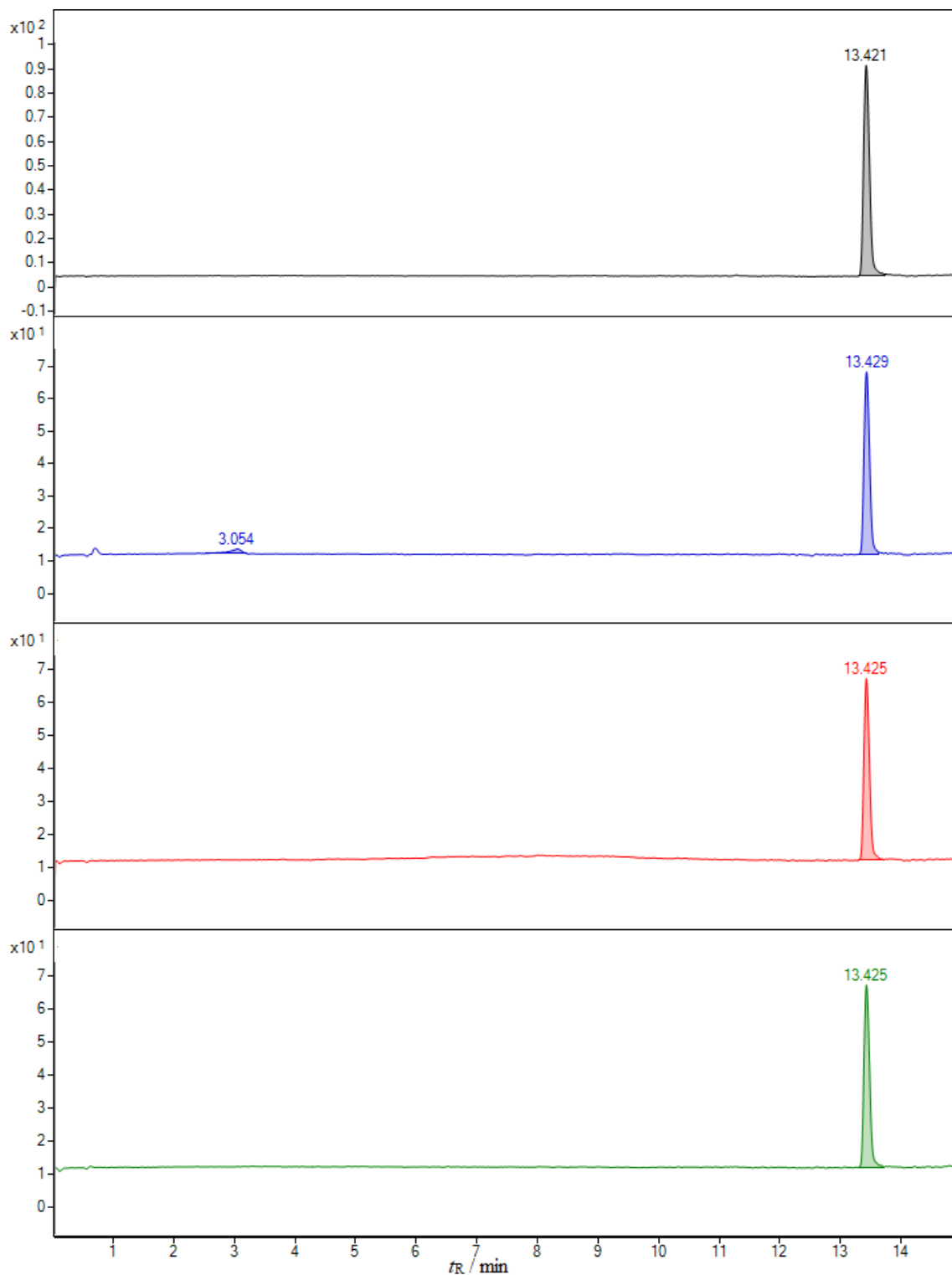
Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	30 V	
245,0773	10,40	-	-	$[M+H]^+$
227,0688	51,69	3,91	-	$[C_{14}H_{11}O_3]^+$
209,0576	14,94	11,59	-	-
201,0897	4,83	10,39	4,02	$[C_{13}H_{13}O_2]^+$
199,0744	19,76	25,24	3,60	$[C_{13}H_{11}O_2]^+$
185,0601	16,02	32,23	15,38	$[C_{12}H_9O_2]^+$
183,0792	100	65,55	15,09	$[C_{13}H_{11}O]^+$
181,0626	8,24	41,17	25,74	-
159,0422	1,21	1,03	6,52	-
155,0841	41,09	43,91	33,76	$[C_{12}H_{11}]^+$
153,0689	1,18	22,90	48,25	-
152,0623	-	-	8,19	-
144,0578	-	2,37	9,70	-
141,0689	46,99	100	100	$[C_{11}H_9]^+$
139,0532	0,66	-	5,15	-
131,0468	0,31	-	4,77	-
129,0711	1,20	3,57	19,91	-
128,0622	1,25	1,75	17,15	$[C_{10}H_8]^{\bullet+}$
127,0503	0,26	1,43	10,52	$[C_{10}H_7]^+$
115,0553	1,72	8,21	36,55	$[C_9H_7]^+$
103,0549	-	-	5,82	-
77,0387	-	-	4,59	$[C_6H_5]^+$
55,0157	1,81	1,24	11,94	-
43,0171	-	-	10,94	$[C_2H_3O]^+$



Slika D94. MS/MS spektar jednostruko protoniranog iona DP8 $[M+H]^+$ (m/z 259,0967), pri kolizijskom potencijalu od 10 V.

Tablica D39. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti i asignacija signala iz MS/MS spektara m/z 259,0967. Ionizacija ESI+, kolizijski potencijali 10, 20 i 40 V.

Izmjeren m/z	Relativni intenzitet / %			Asignacija signala
	10 V	20 V	40 V	
259,0949	15,79	-	-	$[M+H]^+$
241,0846	55,49	5,77	-	$[C_{14}H_{11}O_3]^+$
227,0691	15,87	15,38	-	$[C_{14}H_{11}O_2]^+$
213,0894	10,31	14,97	-	-
209,0585	71,28	63,21	1,15	$[C_{13}H_{11}O_2]^+$
199,0741	10,48	34,37	2,48	$[C_{14}H_{13}O]^+$
197,0953	100	100	1,19	$[C_{13}H_{11}O]^+$
183,0790	11,58	21,85	1,44	-
182,0709	2,45	33,51	2,51	-
181,0639	6,34	67,08	18,76	-
173,0604	-	1,73	17,44	-
157,0626	1,25	7,35	13,80	$[C_{12}H_{11}]^+$
155,0845	11,88	52,94	9,69	-
154,0750	2,34	18,78	16,28	-
153,0695	3,32	33,09	100	-
152,0622	-	6,61	49,35	-
143,0499	-	5,91	40,35	$[C_{11}H_9]^+$
141,0693	-	6,74	13,86	-
139,0527	-	2,29	14,08	$[C_{14}H_{11}O_3]^+$
129,0688	-	2,29	30,43	-
128,0622	-	3,11	35,03	$[C_{10}H_8]^{\bullet+}$
127,0540	-	1,42	19,54	$[C_{10}H_7]^+$
115,0547	-	4,55	43,87	$[C_9H_7]^+$
102,0463	-	-	6,95	$[C_8H_6]^{\bullet+}$
59,0128	2,35	18,27	15,63	$[C_2H_3O_2]^+$
43,0191	-	-	13,67	$[C_2H_3O]^+$



Slika D95. Kromatogrami ukupne ionske struje uzoraka NAB (-), NAB: β -CD (-), NAB:HP- β -CD (-) i NAB:SBE- β -CD (-) podvrgnutih fotolitičkoj razgradnji.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: David Klarić

Datum rođenja: 20. kolovoza 1991.

Mjesto rođenja: Mostar, Bosna i Hercegovina

E-adresa: dklaric@chem.pmf.hr

Obrazovanje:

- | | |
|-------------|---|
| 2010 – 2014 | Preddiplomski studij biologije i kemije, Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanost, Sveučilište u Mostaru, Mostar, Bosna i Hercegovina |
| 2015 – 2018 | Diplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |
| 2019 – | Poslijediplomski sveučilišni studij kemije (smjer Analitička kemija), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |

Radno iskustvo:

- | | |
|-------------|---|
| 2019 – | Zavod za analitičku kemiju, Kemijskog odsjeka PMF-a, Zagreb, Hrvatska <ul style="list-style-type: none">Asistent iz područja prirodnih znanosti, polje kemija, grana analitička kemija |
| 2014 – 2015 | GenTech Propagation Ltd, Dundee, Ujedinjeno Kraljevstvo Velike Britanije i Sjeverne Irske <ul style="list-style-type: none">Asistent u proizvodnji i laboratoriju za mikropropagaciju biljaka u aseptičnim uvjetima |

Projekti:

- | | |
|--------|---|
| 2023 – | Suradnik na HRZZ projektu (IP-2022-10-6033), Priprava, karakterizacija i biokompatibilnost novih supramolekulskih kompleksa lijek/ciklodekstrin i lijek/dekstrinske nanospužve s poboljšanim svojstvima |
|--------|---|

Znanstvena i stručna usavršavanja:

- 2023./2024. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu Semmelweis University u Budimpešti, Mađarska
- 2022./2023. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu u Grazu, Austrija
- 2022./2023. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu Semmelweis University u Budimpešti, Mađarska
- 2021./2022. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu u Varšavi, Poljska
- 2020./2021. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu u Pečuhu, Mađarska

Nastava i voditeljstvo:

- 2018./2019. – Viši praktikum analitičke kemije 2
- 2019./2020. – Viši praktikum analitičke kemije 1
2020. Neposredni voditelj diplomskog rada, Tena Matijević
2021. Neposredni voditelj diplomskog rada, Nino Jukić
2021. Neposredni voditelj diplomskog rada, Suzana Inkret
2023. Neposredni voditelj diplomskog rada, Franjo Sakoman
2023. Neposredni voditelj diplomskog rada, Morena Mikulec
2024. Neposredni voditelj diplomskog rada, Lucija Lasić
2024. Neposredni voditelj diplomskog rada, Ivana Bećir

Popularizacija znanosti:

2024. Dan i noć na PMF-u, Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2019. Smotra Sveučilišta u Zagrebu, PMF, Kemijski odsjek

Znanstveni radovi:

1. **D. Klarić**, M. Kelrajter, A. Čikoš, A. Budimir, N. Galić, Inclusion complexes of nabumetone with β -cyclodextrins: Spectroscopic, spectrometric and calorimetric studies in solution, *J. Mol. Liq.* **397** (2024) 124152.
2. **D. Klarić**, V. Pilepić, D. Kontrec, A. Budimir, N. Galić, Aluminum(III) complexes of aroylhydrazones derived from nicotinic acid hydrazide: MS, UV-Vis and DFT study, *J. Coord. Chem.* **77** (2024) 805–815.
3. J. Jablan, E. Marguí, L. Posavec, **D. Klarić**, D. Cinčić, N. Galić, M. Jug, Product contamination during mechanochemical synthesis of praziquantel co-crystal, polymeric dispersion and cyclodextrin complex, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **238** (2024) 115855.
4. **D. Klarić**, M. Pocrnić, D. Lež, S. Polović, D. Kontrec, I. Kosalec, A. Budimir, N. Galić, Search for new antimicrobials: spectroscopic, spectrometric, and in vitro antimicrobial activity investigation of Ga(III) and Fe(III) complexes with aroylhydrazones, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **27** (2022) 715–729.

5. T. Kezele Špehar, M. Pocrnić, **D. Klarić**, B. Bertoša, A. Čikoš, M. Jug, J. Padovan, S. Dragojević, N. Galić, Investigation of praziquantel/cyclodextrin inclusion complexation by NMR and LC-HRMS/MS: mechanism, solubility, chemical stability and degradation products, *Mol. Pharm.* **18** (2021) 4210.
6. M. Tranfić Bakić, **D. Klarić**, M. S. Espinosa, S. Kazazić, L. Frkanec, P. A. Babay, N. Galić, Synthesis of ester and amide derivatives of calix[6]arene and their complexation affinities towards La^{3+} , Eu^{3+} , Yb^{3+} , *Supramol. Chem.* **31** (2019) 723–731.

Sudjelovanja na skupovima:

1. **D. Klarić**, M. Jug, Ž. Soldin, N. Galić, *Preparation, characterization and stability of NAB: β -CD systems in solid state*, 22nd International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Prag, Češka Republika 2024.
2. **D. Klarić**, M. Kelrajter, A. Čikoš, A. Budimir, N. Galić, *Elucidating the complexation of nabumetone by β -cyclodextrins in solution*, 8th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska 2024. (usmeno izlaganje)
3. L. Lasić, **D. Klarić**, N. Galić, *Stability-indicating method and LC-MS characterization of cinnarizine degradation products*, 8. Simpozij Studenata Kemičara, Zagreb, Hrvatska, 2023.
4. **D. Klarić**, A. Čikoš, A. Budimir, N. Galić, *Spectroscopic and thermodynamic studies of nabumetone complexation by β -cyclodextrins*, 21st International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Târgu Mureș, Rumunjska 2023.
5. J. Jablan, E. Marguá, L. Posavec, **D. Klarić**, D. Cinčić, N. Galić, M. Jug, *Exploring contamination during ball milling of praziquantel with malic acid, poloxamer F-127 and hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, 12th Bologna's Convention on Crystal Forms, Bologna, Italija 2023.
6. J. Jablan, E. Marguá, L. Posavec, **D. Klarić**, D. Cinčić, N. Galić, M. Jug, *Transfer of metal impurities during the mechanochemical synthesis of praziquantel cocrystals, polymeric dispersion and cyclodextrin complex*, Genetics and Applications, Sarajevo, BiH 2023.
7. **D. Klarić**, A. Budimir, N. Galić, *Characterization of host-guest interaction between nabumetone and selected β -cyclodextrins in aqueous solutions*, V. Simpozij Supramolekulske Kemije, Zagreb, Hrvatska 2022.
8. A. Budimir, **D. Klarić**, *Host-guest interaction between nabumetone and cucurbit[7]uril in aqueous solutions*, V. Simpozij Supramolekulske Kemije, Zagreb, Hrvatska 2022.
9. **D. Klarić**, N. Galić, *Influence of β -cyclodextrin and its various derivatives on cinnarizine solubility in water*, 20th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Pécs, Mađarska 2022.
10. **D. Klarić**, N. Galić, *High-resolution mass spectrometry characterization of cinnarizine – β -cyclodextrin inclusion complexes*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog, Veli Lošinj, Zagreb, 2021.
11. **D. Klarić**, N. Galić, *Inclusion complexes of nabumetone with β -cyclodextrin and its selected derivatives*, Simpozij Studenata Doktorskih Studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska, 2021.

12. **D. Klarić**, M. Pocrnić, M. Jug, N. Galić, *Inclusion complexes of praziquantel and β -cyclodextrin and its derivatives*, 19th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Șuor, Rumunjska, 08-13. 07. 2019.
13. M. Pocrnić, **D. Klarić**, M. Jug, N. Galić, *Solubilization study of inclusion complexes of praziquantel with β -cyclodextrin and its derivatives by liquid chromatography*, 13th Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine (MSBM), Dubrovnik, Hrvatska, 07-13. 07. 2019.
14. M. T. Bakić, M. S. Espinosa, **D. Klarić**, L. Frkanec, P. A. Babay, N. Galić, *UV-Vis and ESI MS/MS study of ester and amide derivatives of calix[4]arene and their lanthanide complexes*, II. Simpozij Supramolekulske Kemije, Zagreb, Hrvatska, 2018.