

Spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko određivanje prazikvantela

Matijević, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:032373>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Tena Matijević

SPEKTROFOTOMETRIJSKO I SPEKTROFLUORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE PRAZIKVANTELA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2020.

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

Zahvale

Veliku zahvalnost dugujem mentorici prof. dr. sc. Nives Galić što mi je dala priliku da svoj diplomski rad odradim pod njezinim vodstvom na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Hvala Vam na strpljenju i uloženom vremenu i trudu, kako za izradu ovog diplomskog rada, tako i za stečeno znanje iz područja analitičke kemije. Bili ste od velike pomoći.

Ogromno hvala i mom neposrednom voditelju magistru Davidu Klariću koji je tijekom izvođenja ovog diplomskog rada uvijek bio spreman pomoći i odgovoriti na sve moje upite i nejasnoće. Hvala na trudu, volji, vremenu, strpljenju i znanju koje mi je pomoglo da se snađem i odradim ovo najbolje što mogu. Žao mi je za svaki prekovremeni sat u labosu i svaku razbijenu tikvicu. Svu sreću u životu i daljnjem radu želim!

Mojim prijateljima i Mateju, osobama koje su bile uz mene i kad se trebalo skupa veseliti i kad mi je trebalo rame za plakanje. Osobe koje ne dobiješ rođenjem, a ipak ti kroz život postanu obitelj. Hvala što ste skupa sa mnom prolazili kroz moje trenutke školovanja, zbog Vas su mi bili predivni. Pišem Vam ovo da znate, uvijek ste bili i uvijek ćete biti neizostavan dio mog života.

Za kraj ostavljam zahvalu mojim roditeljima i bratu. Mojoj vječnoj podršci i osloncu kroz život. Nisam sigurna da imam dovoljno riječi kojima bih opisala svu ljubav i zahvalnost koju osjećam prema Vama zbog svega što ste mi u životu omogućili. Hvala Vam na svakom savjetu i lekciji, prije svega onim životnim. Hvala što ste bili uz mene kad je nedostajalo i volje i snage. Nije uvijek bilo lako, ali ste me svojim konstantnim ohrabivanjem i motivacijom natjerali da vjerujem u sebe da ipak sve na kraju izađe na dobro. Ovo je naša diploma.

Volim Vas puno!

Vaša Tena

Sadržaj

SAŽETAK	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije	3
2.1.1. <i>Lijekovi klase II.....</i>	<i>4</i>
2.2. Prazikvantel	5
2.2.1. <i>Kemijska i fizikalna svojstva.....</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>Farmakokinetička svojstva</i>	<i>6</i>
2.3. Ciklodekstrini.....	6
2.3.1. <i>Struktura i svojstva ciklodekstrina.....</i>	<i>7</i>
2.3.2. <i>Inkluzijski kompleksi</i>	<i>10</i>
2.4. Analiza poboljšanja topljivosti (solubilizacijska ispitivanja).....	12
2.4.1. <i>Dijagrami topljivosti.....</i>	<i>13</i>
2.4.2. <i>Konstanta stabilnosti i efikasnost kompleksiranja.....</i>	<i>15</i>
2.5. Spektroskopske metode analize	18
2.5.1. <i>UV/Vis apsorpcijska spektroskopija</i>	<i>18</i>
2.5.2. <i>Fluorescencijska spektroskopija.....</i>	<i>21</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	25
3.1. Kemikalije i materijali	25
3.2. Instrumentacija.....	25
3.3. Validacija metoda	26
3.3.1. <i>Priprema ishodnih otopina.....</i>	<i>26</i>
3.3.2. <i>Validacija UV/Vis spektrofotometrijske metode</i>	<i>27</i>
3.3.3. <i>Validacija spektrofluorimetrijske metode.....</i>	<i>30</i>
3.4. Probir	33
3.5. Određivanje topljivosti	33
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	39
4.1. Validacija metoda	39
4.1.1. <i>Validacija UV/Vis spektrofotometrijske metode</i>	<i>39</i>
4.1.2. <i>Validacija spektrofluorimetrijske metode.....</i>	<i>44</i>
4.2. Probir	48

4.3. Određivanje topljivosti	49
<i>4.3.1. Određivanje topljivosti UV/Vis spektrofotometrijskom metodom</i>	<i>49</i>
<i>4.3.2. Određivanje topljivosti spektrofluorimetrijskom metodom</i>	<i>51</i>
4.4. Određivanje konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja.....	54
§ 5. ZAKLJUČAK.....	59
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	61
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	62
§ 8. ŽIVOTOPIS	XIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

SPEKTROFOTOMETRIJSKO I SPEKTROFLUORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE PRAZIKVANTELA

Tena Matijević

Prazikvantel (PZQ) je antihelmintik koji prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije spada u klasu II (niska topljivost, visoka permeabilnost). Međutim, utvrđeno je da mu se topljivost u biorelevantnom mediju povećava ukoliko je u kompleksu s ciklodekstrinom. Utjecaj β -ciklodekstrina i tri njegova derivata (hidroksipropil- β -ciklodekstrin, sulfobutileter- β -ciklodekstrin te nasumično metiliran β -ciklodekstrin) na topljivost PZQ u vodi istražen je u sklopu ovog diplomskog rada. Prazikvantel je u vodi kvantitativno određen validiranim UV/Vis spektrofotometrijskim i spektrofluorimetrijskim metodama. Dobiveni rezultati su uspoređeni s onima iz diplomskog rada Petre Tagliaretti u kojem su analizirani identični sustavi, a količina PZQ je određena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

(63 + XIII stranica, 24 slike, 17 tablica, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: ciklodekstrini, inkluzijski kompleksi, prazikvantel, topljivost, fluorescencijska spektroskopija, UV/Vis apsorpcijska spektroskopija

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić, redoviti profesor

Neposredni voditelj: David Klarić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
 2. prof. dr. sc. Ines Primožič
 3. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
- Zamjena: prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 10. rujna 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SPECTROPHOTOMETRIC AND SPECTROFLUORIMETRIC DETERMINATION OF PRAZIQUANTEL

Tena Matijević

Praziquantel (PZQ) is an anthelmintic which is categorized as a class II compound (low solubility, high permeability) according to the Biopharmaceutical Classification System. However, its solubility in biorelevant media was found to increase if it was complexed by cyclodextrins. Effect of β -cyclodextrin and three of its derivatives (hydroxypropyl- β -cyclodextrin, sulfobutylether- β -cyclodextrin and randomly methylated β -cyclodextrin) on the solubility of PZQ in water was studied in this thesis. Praziquantel in water was quantitatively determined by validated UV/Vis spectrophotometric and spectrofluorimetric methods. The obtained results were compared with those presented in Petra Tagliaretti's thesis, in which identical systems were analyzed and the amount of PZQ was determined by high performance liquid chromatography.

(63 + XIII pages, 24 figures, 17 tables, 32 references, original in Croatian)

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

Keywords: cyclodextrins, inclusion complexes, praziquantel, solubility, fluorescence spectroscopy, UV/Vis absorption spectroscopy

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor

Assistant mentor: David Klarić, mag. chem.

Reviewers:

1. Professor Nives Galić
2. Professor Ines Primožič
3. Professor Dubravka Matković-Čalogović
4. Substitute: Professor Snežana Miljanić

Date of exam: 10th September 2020.

§ 1. UVOD

Lijekom se smatra svaki kemijski spoj koji utječe na organizam i na njegove procese u svrhu dijagnoze, suzbijanja, liječenja ili prevencije bolesti.¹ Dolaze u različitim oblicima, a prema mjestu primjene dijele se na lijekove za unutarnju i lijekove za vanjsku primjenu. Pod lijekove za unutarnju primjenu podrazumijevaju se oni lijekovi koji se uzimaju oralnim putem, inhaliranjem ili intravenski, a za vanjsku primjenu oni koje nanosimo na kožu, sluznicu ili se uvode u tjelesne otvore.²

Poznato je da su topljivost, permeabilnost i brzina otapanja osnovni parametri koji kontroliraju brzinu i opseg apsorpcije lijeka u organizmu te njegovu bioraspoloživost.³ Topljivost lijeka u vodi osnovno je svojstvo koje ima važnu ulogu u apsorpciji lijeka nakon oralne primjene, a isto tako je bitan parametar koji utječe na mogućnost parenteralnog unosa lijeka kao i na razvoj i dizajn farmaceutskih formulacija. Posljednjih se godina zahvaljujući razvoju novih lijekova povećao broj onih koji su slabo topljivi u vodi, a procjena je da čak 70 % njih pokazuje slabu topljivost u vodi. Za takve je lijekove slaba topljivost u vodi i loše otapanje u drugim gastrointestinalnim medijima ograničavajući faktor *in vivo* bioraspoloživosti lijeka nakon oralne primjene. Upravo zato je istraživanje *in vitro* otapanja prepoznato kao važan element u razvoju lijekova, a samim time je povećanje dosega otapanja slabo topljivih lijekova i povećanje njihove bioraspoloživosti postalo važan izazov u farmaceutskoj industriji.⁴

Jedan od primjera slabo topljivih lijekova je prazikvantel. Prazikvantel je antihelmintik koji djeluje cestoidno, a koristi se za liječenje shistosomijaze i drugih bolesti uzrokovanih nametnicima iz razreda metilja i trakavica u humanoj i veterinarskoj medicini. Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije (engl. *Biopharmaceutical classification system*, BCS) svrstava se u klasu II, što govori da je slabo topljiv u vodi, ali pokazuje dobru membransku permeabilnost. S obzirom da se lijek primjenjuje oralno, a sama topljivost utječe na apsorpciju lijeka u organizmu i na njegovu bioraspoloživost, potrebno mu je povećati topljivost kako bi se smanjile potrebne doze lijeka. Jedan od načina povećanja topljivosti prazikvantela je kompleksiranje s ciklodekstrinima.⁵ Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji zbog svoje specifične strukture mogu uklopiti molekulu lijeka u svoju središnju šupljinu te mu promjenom fizikalnih i kemijskih svojstava povećati topljivost.⁶

U ovom radu ispitan je utjecaj β -ciklodekstrina (β -CD) i njegovih derivata: hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD), sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE- β -CD) i nasumično metiliranog β -ciklodekstrina (RM- β -CD), kao i utjecaj organskih kiselina (limunska, vinska, jabučna i jantarna kiselina) na topljivost prazikvantela. Kvantitativno određivanje prazikvantela provedeno je metodom UV/Vis apsorpcijske spektroskopije i metodom fluorescencijske spektroskopije. Obje navedene metode prethodno su validirane prema utvrđenim smjernicama koje propisuje Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za ljudsku primjenu (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije

Biofarmaceutski sustav klasifikacije je sustav koji klasificira djelatne tvari (lijekove) na temelju njihove topljivosti u vodi i intestinalne permeabilnosti. BCS prilikom klasificiranja lijekova uzima doprinos tri glavna faktora: topljivosti, brzine otapanja i permeabilnosti. Ovi faktori određuju krajnju brzinu i opseg apsorpcije lijeka prilikom oralnog doziranja, a samim time i njegovu bioraspoloživost.⁴ BCS je kao sustav klasifikacije predložen 1995. godine, a danas je odobren od strane regulatornih organizacija i agencija te je inkorporiran u smjernice za odobravanje iznimki neprovođenja određenih *in vivo* ispitivanja (engl. *biowaiver*) prije plasmana farmaceutske formulacije na tržište.⁷

Bioraspoloživost se definira kao omjer koncentracije lijeka koji nakon primjene bilo kojim putem nepromijenjen dopijeva u krvotok i koncentracije lijeka u krvi nakon intravenske primjene. Najčešće je mjera bioraspoloživosti lijeka površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u krvnoj plazmi i vremena. Bioraspoloživost je najveća prilikom intravenske primjene i iznosi 1, odnosno 100 %, a za sve ostale načine primjene je većinom manja od 1.⁸

BCS služi kao smjernica prilikom razvoja novih oralnih farmaceutskih formulacija te pruža priliku za manipulacijom strukturom te fizikalnim i kemijskim svojstvima potencijalnih kandidata. Kako znanje o fiziologiji gastrointestinalnog sustava postaje sofisticiranije, testovi otapanja *in vitro* mogu simulirati uvjete u gastrointestinalnom traktu te tako dovesti do boljih *in vivo* predviđanja, što rezultira značajnim smanjenjem broja analiza na životinjama i ljudima. Lijekovi su prema ovoj klasifikaciji podijeljeni u četiri klase prema topljivosti i permeabilnosti (tablica 1).^{7,9}

Topljivost bilo koje tvari može se definirati kao količina tvari koja je prešla o otopinu nakon što je postignuta ravnoteža između otopine i suviška (neotopljene) tvari pri danom tlaku i temperaturi. Djelatna tvar, odnosno aktivni farmaceutski sastojak (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API), smatra se vrlo topljivim ukoliko je njegova najveća doza topljiva u ≤ 250 mL vodenog medija. Lijekovi se smatraju netopljivima ukoliko je njihova topljivost manja od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Procjena volumena od 250 mL izvedena je iz volumena vode koji se obično konzumira tijekom oralne administracije lijeka, što je otprilike ekvivalent volumenu jedne čaše. Utjecaj

pH na topljivost lijeka određuje se pri 37 ± 1 °C u vodenom mediju u rasponu pH vrijednosti 1,0 – 7,5, prema smjernicama Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *United States Food And Drug Administration*, USFDA). Prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), topljivost se određuje u rasponu pH vrijednosti 1,2 – 6,8, odnosno u rasponu 1,0 – 8,0 prema smjernicama Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMEA).^{7,9,10,11}

S druge strane, permeabilnost se direktno bazira na opsegu intestinalne apsorpcije lijeka kod ljudi ili indirektno na brzini prijenosa tvari kroz intestinalnu membranu. Alternativno se mogu koristiti i drugi sustavi koji mogu predvidjeti opseg apsorpcije lijeka kod ljudi, kao što su animalne stanice ili neki drugi *in vivo* modeli. Smatra se da je lijek dobro permeabilan kad je opseg apsorpcije lijeka kod ljudi ≥ 90 % primijenjene doze u usporedbi s intravenskom referentnom dozom.⁴

Tablica 1. Klasifikacija lijekova prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije⁵

KLASA I Dobra topljivost Dobra permeabilnost	KLASA II Slaba topljivost Dobra permeabilnost
KLASA III Dobra topljivost Slaba permeabilnost	KLASA IV Slaba topljivost Slaba permeabilnost

2.1.1. Lijekovi klase II

Prema BCS-u, klasu II karakteriziraju lijekovi slabe topljivosti i dobre permeabilnosti. Njihova je apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta stoga spora te je određena dosegom njihovog otapanja.⁶

Budući da je razina apsorpcije ovih lijekova ograničena brzinom i dosegom otapanja, razvijene su metode koje povećavaju topljivost i bioraspoloživost lijekova koji su slabo topljivi u vodi. Neke od njih su klasična mikronizacija (usitnjavanje), stabilizacija visokoenergetskih stanja, upotreba površinski aktivnih tvari, mikroemulzijskih i emulzijskih sustava, upotreba čvrstih disperzija te upotreba kompleksirajućih agenasa kao što su ciklodekstrini.⁹ Primjerice, ciklodekstrini mogu poboljšati oralnu bioraspoloživost lijekova klase II i IV, dok na lijekove klase III imaju neznatan utjecaj, a kod lijekova klase I mogu imati negativan utjecaj na bioraspoloživost.⁶

U ovom radu pratit ćemo upravo utjecaj ciklodekstrina i njegovih derivata na topljivost prazikvantela, lijeka koji prema BCS-u spada u klasu II, odnosno pokazuje slabu topljivost u vodi.

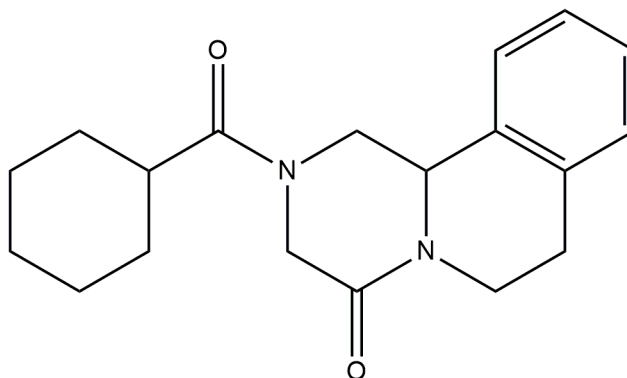
2.2. Prazikvantel

Prazikvantel (PZQ) je antihelmintik koji ima široki spektar djelovanja protiv nametnika iz razreda metilja i trakavica. Koristi se u humanoj i veterinarskoj medicini. Pretežno se koristi u liječenju shistosomijaze te je od strane Svjetske zdravstvene organizacije proglašen primarnim lijekom u liječenju te bolesti. Prazikvantel se primjenjuje oralno, učinkovit je i siguran.^{12,13,14}

Shistosomijazu uzrokuje pet vrsta metilja roda *Shistosoma*. U svom kroničnom stadiju, vodi do bolesti jetre i slezene, bolesti organa zdjelice i nekih drugih komplikacija poput plućne hipertenzije, krvarenja, neplodnosti itd.¹³

2.2.1. Kemijska i fizikalna svojstva

Prazikvantel, 2-(cikloheksilkarbonil)-1,2,3,6,7,11b-heksahidro-4H-pirazin[2,1a]izokinolin sintetski je pirazino-izokinolinski derivat (slika 1) molekulske mase 312,41 g mol⁻¹. Topljiv je u etanolu i u kloroformu, ali je samo djelomično topljiv u vodi. Kao lijek dolazi u obliku racemata, biološki aktivnog *R*-PZQ i neaktivnog enantiomera *S*-PZQ, zbog kojeg je zapravo polovica doze PZQ farmakološki neaktivna. Uz slabu topljivost lijeka u vodi, upravo je ova činjenica zaslužna za potrebe velikih doza lijeka prilikom njegove oralne administracije. Isto tako, *S*-PZQ enantiomer je zaslužan i za gorak okus samog lijeka, što je jedan od doprinosa neučinkovitom liječenju kod djece mlađe životne dobi koji izbjegavaju oralno uzimanje lijeka zbog neugodnog okusa.^{13,14}



Slika 1. Struktura prazikvantela

2.2.2. Farmakokinetička svojstva

Prazikvantel je prema BCS-u svrstan u klasu II, odnosno pokazuje visoku permeabilnost ali slabu topljivost u vodi ($0,40 \text{ mg mL}^{-1}$).⁵ Kao što je već ranije navedeno, brzina otapanja i doseg otapanja ograničavajući su koraci za apsorpciju samog lijeka, stoga je povećanje topljivosti nužno za povećanje bioraspoloživosti prazikvantela prilikom oralne primjene.

U organizmu se apsorbirani lijek metabolizira hidroksilacijom u neaktivne metabolite, tako da samo minimalne koncentracije zapravo djeluju na parazite u krvnom sustavu. Iako se prazikvantel upotrebljava desetljećima, mehanizam djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Provedena *in vitro* ispitivanja pokazuju kako su za antiparazitsku aktivnost ovog lijeka zaslužni *R*-PZQ enantiomer i njegovi metaboliti. Utvrđeno je da je njihova aktivnost 100 do 1000 puta veća u usporedbi s *S*-PZQ enantiomerom i njegovim metabolitima. Farmakokinetičke analize na zdravim dobrovoljcima su pokazale da je apsorpcija prazikvantela zapravo relativno brza, $T_{\max} = 2,0 - 2,6$ i skoro potpuna ($> 80 \%$). Većina apsorbiranog lijeka se veže za serumske proteine ($\approx 80 \%$ za albumin).¹³

Kako je već spomenuto, za postizanje dovoljnih koncentracija lijeka u krvotoku potrebna su velika doziranja lijeka prilikom njegove oralne primjene. Poboljšanjem njegove topljivosti mogli bi se koristiti alternativni oblici dostave lijeka, naprimjer parenteralno. Tako bi se izbjegao metabolizam prvog prolaza, a samim time bi se smanjila i potrebna doza lijeka.¹⁴

2.3. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi, građeni od molekula glukopiranoze povezanih u prsten. Prvi ih je opisao A. Villers 1891. godine nakon analize bakterijskog probavnog produkta škroba, a ubrzo nakon toga F. Schardinger identificirao je dva ciklodekstrina koja se javljaju u prirodi, α -CD i β -CD, pa se još nazivaju i "Schardingerovim šećerima".¹⁵ Dvadesetak godina kasnije, K. Freudenberg i R. Jacobi su identificirali i trećeg pripadnika prirodnih ciklodekstrina (γ -CD).¹⁶

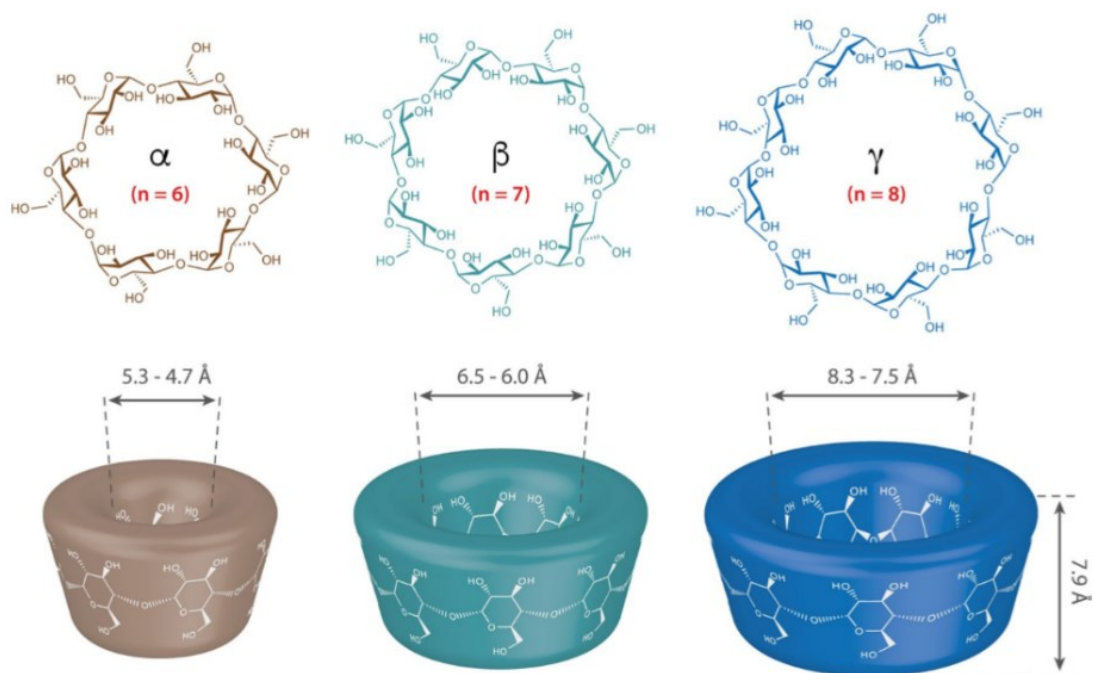
Nastanak prirodnih ciklodekstrina posljedica je bakterijske (*Bacillus macerans*) enzimatske razgradnje škroba pomoću ciklodekstrin gluzil transferaze, posebne vrste amilaze. Tretiranjem škroba ovim enzimom utvrđen je nastanak smjese α -CD (60 %), β -CD (20 %) i γ -CD (20 %). Danas je industrijska proizvodnja CD zasnovana na različitim varijantama spomenutog enzima koje su dobivene genetičkim inženjerstvom, a specifične su za proizvodnju određenih CD.¹⁶

Ciklodekstrini su od svog otkrića privukli pažnju mnogih znanstvenika zbog svoje strukture. Upravo je njihova jedinstvena struktura inspirirala kemičare, fizičare, biologe, inženjere i mnoge druge znanstvenike u pokušaju iskorištavanja njihovih svojstava.¹⁷ Svoju primjenu našli su u farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji, kemijskoj industriji, poljoprivrednoj industriji te u kozmetičkoj industriji, budući da su jeftini, dobro topljivi u vodi, netoksični, funkcionalni i komercijalno dostupni.¹⁶

2.3.1. Struktura i svojstva ciklodekstrina

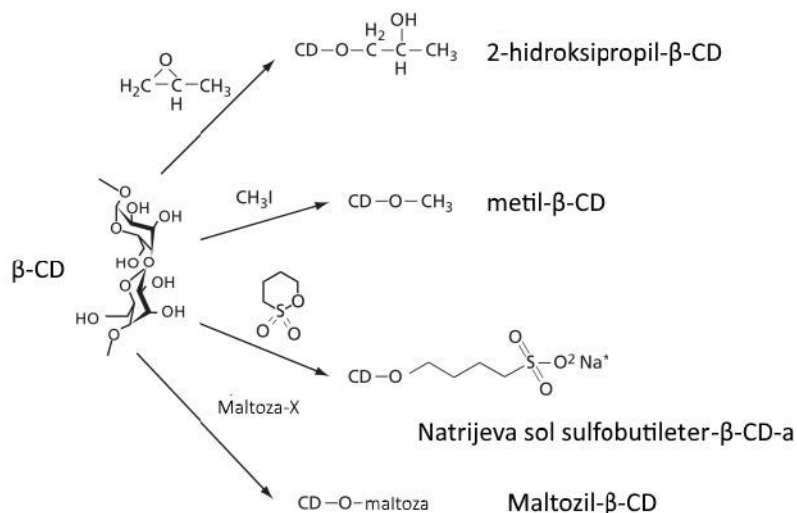
Ciklodekstrini se sastoje od 6 ili više D-glukopiranoznih jedinica povezanih α -(1,4) glikozidnim vezama u prsten. Tako razlikujemo α -CD koji se sastoji od 6 glukopiranoznih jedinica, β -CD od 7, te γ -CD od 8 glukopiranoznih jedinica.¹⁷ Poznati su i primjeri CD s većim brojem glukopiranoznih jedinica, no njihova sposobnost tvorbe inkluzijskih kompleksa je manja, pa samim time rijetko pronalaze upotrebu u farmaceutskoj industriji.¹⁸ Strukture prirodnih ciklodekstrina su prikazane na slici 2.

Kristalografijom rentgenskim i neutronske zrake utvrđeno je da α -, β - i γ -CD zauzimaju strukturu krnjeg stošca, što je posljedica konformacije stolca glukopiranoznih jedinica.¹⁹ Hidroksilne skupine na primarnim ugljikovim atomima (položaj 6 u glukopiranoznom prstenu) nalaze se na užem obodu krnjeg stošca, dok se hidroksilne skupine na sekundarnim ugljikovim atomima (položaj 2 i 3 u glukopiranoznom prstenu) nalaze na širem obodu krnjeg stošca te su manje sklone kemijskoj transformaciji. Zbog nemogućnosti rotacije oko α -(1,4) glikozidnih veza koje spajaju glukopiranozne prstenove, nije moguće postojanje konformacijskih izomera. Središnja šupljina je hidrofobnog karaktera, dok vanjska površina pokazuje hidrofilan karakter. Unutarnji promjer nemodificiranih molekula ciklodekstrina kreće se oko 4,7 do 8,3 Å, ovisno o ciklodekstrinu, dok visina iznosi približno 8 Å. Takva struktura im omogućuje inkluziju različitih molekula gosta odgovarajuće veličine kako bi nastali inkluzijski kompleksi, pri čemu može doći do promjene nekih fizikalno-kemijskih svojstava molekule gosta kao što su primjerice topljivost i reaktivnost. Upravo se zbog te sposobnosti većinom i primjenjuju u farmaceutske svrhe.¹⁷



Slika 2. Kemijske strukture i dimenzije prirodnih α -, β - i γ -ciklodekstrina¹⁹

Ciklodekstrini zbog svog generalno hidrofilnog karaktera i velikog broja akceptora i donora vodikovih veza imaju vrlo negativne logaritamske vrijednosti oktanol/voda koeficijenta razdjeljivanja ($\log P_{o/w}$). Unatoč tome, topljivost nekih CD u vodi je poprilično ograničena, a to se posebice odnosi na β -CD. Slabija topljivost je posljedica rigidnosti molekule ciklodekstrina te intermolekulskih vodikovih veza u kristalnom stanju. Formiranje vodikovih veza između susjednih hidroksilnih skupina na C2 i C3 atomima ugljika u molekuli β -CD pridonosi rigidnosti ciklodekstrina te smanjuje sposobnost molekule za formiranjem vodikovih veza s okolnim molekulama vode, što rezultira manjom topljivošću u odnosu na druga dva prirodna ciklodekstrina. Budući da je β -CD zbog optimalnih dimenzija svoje središnje šupljine najpogodniji za nastajanje inkluzijskih kompleksa s molekulama lijekova potrebno je poboljšati njegovu topljivost u vodi. U svrhu poboljšanja njegove topljivosti, sintetiziraju se različiti derivati β -ciklodekstrina (slika 3) modifikacijama sekundarnih i/ili primarnih hidroksilnih skupina u molekuli različitim supstituentima. Uvođenjem supstituenata ometaju se vodikove veze unutar native molekule ciklodekstrina i povećava njihova sposobnost interakcije s okolnim molekulama vode, a samim time i njihova topljivost.⁶

Slika 3. Shematski prikaz struktura najčešće korištenih sintetskih derivata β -CD¹⁸

Najčešće korišteni derivati β -CD u farmakološke svrhe jesu nasumično metiliran β -ciklodekstrin (RM- β -CD), sulfobutileter- β -ciklodekstrin (SBE- β -CD) te hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP- β -CD).²⁰ U tablici 2 navedena su neka od svojstava β -CD i njegovih sintetskih derivata.

Tablica 2. Svojstva β -CD i njegovih sintetskih derivata⁶

	β -CD	Sintetski derivati β -CD		
		HP- β -CD	SBE- β -CD	RM- β -CD
Molekulska masa/ g mol⁻¹	1135,0	1396,45	2163,3	1303,3
Broj glukopiranoznih jedinica	7	7	7	7
Supstituenti	/	-CH ₂ CHOHCH ₃	-(CH ₂) ₄ SO ₃ Na	-CH ₃
Topljivost u vodi pri 25°C/ mg mL⁻¹	18,4	> 1200	> 1200	> 500

Ciklodekstrini posjeduju malu oralnu biorasploživost (< 4%) te se osim manje količine bakterijske (debeli crijevo) i humane digestije (putem α -amilaze u slini ili soku gušterače) eliminiraju u intaktnom obliku putem izmeta ili urina. Utvrđeno je da su farmakološki korišteni CD praktički netoksični prilikom oralne administracije zbog niske apsorpcije u gastrointestinalnom traktu. Iznimku predstavlja RM- β -CD zbog svoje lipofilnije prirode, pa mu je biorasploživost nešto veća.¹⁸

Parenteralna primjena CD je nešto ograničena zbog hemolitičkog efekta na humane eritrocite (RM- β -CD > β -CD > HP- β -CD > SBE- β -CD). Također, β -CD ima potencijalno nefrotoksično djelovanje zbog svoje slabe topljivosti u vodi. Provedena *in vivo* istraživanja pokazuju nemogućnost korištenja β -CD i RM- β -CD u obliku parenteralnih formulacija, dok se ostali nabrojani derivati β -CD mogu pronaći u komercijalno dostupnim parenteralnim formulacijama.¹⁸

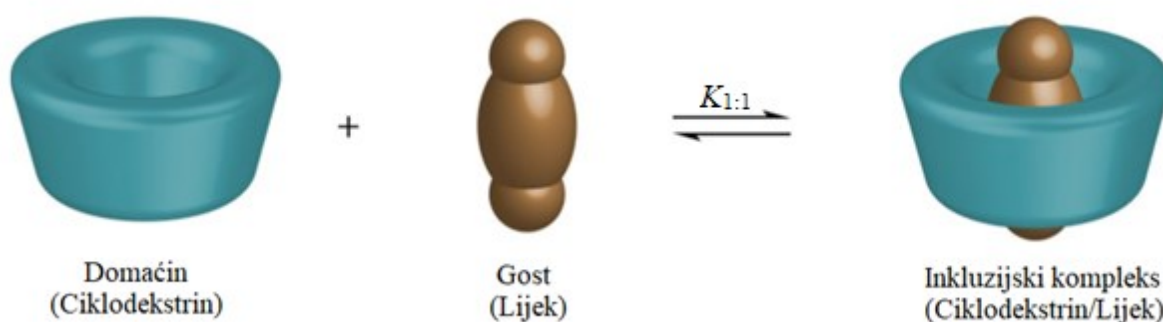
2.3.2. Inkluzijski kompleksi

Zbog sposobnosti mijenjanja fizikalnih i kemijskih svojstava lijekova i drugih spojeva, ciklodekstrini se često nazivaju i farmaceutskim pomoćnim tvarima, budući da omogućuju dostavu slabo topljivih lijekova ili kemijski nestabilnih lijekova na ciljna mjesta u organizmu.

Ciklodekstrini (molekule domaćina) s molekulama lijeka (molekule gosta) ili s njihovim lipofilnim dijelovima tvore inkluzijske komplekse pri čemu dolazi do promjene fizikalno-kemijskih svojstava molekule gosta, poput povećanja topljivosti, stabilizacije, poboljšanja sposobnosti permeacije kroz biološke membrane itd.⁶

Središnja je šupljina ciklodekstrina okružena H3 i H5 vodikovim atomima glukopiranoznih jedinica i glukozidnim atomima kisika, stoga su slobodni elektroni usmjereni prema unutrašnjosti šupljine. Ta velika elektronska gustoća s glukozidnih kisika, raspored vodikovih atoma i nedostatak slobodnih hidroksilnih skupina čine središnju šupljinu manje hidrofilnom u odnosu na okruženje (vodena otopina). Hidrofobne molekule se u vodenim otopinama smještaju u tu šupljinu, pri čemu može doći do povećanja kemijske stabilnosti molekule. Vanjska strana ciklodekstrina okružena je hidroksilnim skupinama koje su odgovorne za njegovu topljivost.²¹

Prilikom nastajanja kompleksa ne nastaju niti pucaju kovalentne veze, a sile koje pokreću nastajanje kompleksa uključuju istiskivanje molekula vode iz središnje šupljine ciklodekstrina, elektrostatske interakcije, van der Waalsove sile, hidrofobne interakcije, vodikove veze, interakcije prijenosa naboja te opuštanje konformacijskog naprezanja.^{21,22} Na slici 4 shematski je prikazan nastanak inkluzijskog kompleksa lijek/CD u stehiometrijskom omjeru 1:1.



Slika 4. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa između molekule ciklodekstrina (domaćin) i molekule lijeka (gost)¹⁹

Za nastajanje inkluzijskog kompleksa vrlo je važna geometrija molekule gosta, jer se ona mora uklopiti u središnju šupljinu ciklodekstrina. S termodinamičkog stajališta još uvijek postoje prijevori oko tvrdnje da je glavna pokretačka sila nastajanja inkluzijskog kompleksa istiskivanje visokoenergetskih molekula vode iz središnje šupljine CD. Iako su ove molekule bogate energijom (entalpijom), one posjeduju više konformacijske slobode (manje vodikovih veza). Iako je njihovo istiskivanje iz središnje šupljine praćeno negativnom promjenom entalpije, promjena slobodne energije ukupnog procesa ne mora nužno biti negativna.²²

Stehiometrijski omjer inkluzijskog kompleksa lijek/CD uglavnom je 1:1, odnosno samo jedna molekula gosta ulazi u šupljinu ciklodekstrina. Međutim, postoje slučajevi u kojima se više molekula gosta može smjestiti u šupljinu CD. To su većinom slučajevi u kojima molekule gosta imaju malu molekulsku masu. Također, u slučaju molekula gosta velikih molekulskih masa može doći do kompleksiranja s više molekula ciklodekstrina. U vodenim je otopinama molekula lijeka u kompleksu s ciklodekstrinom u dinamičkoj ravnoteži sa slobodnim molekulama lijeka, odnosno s onima koje nisu uključene u kompleks.²¹ Molekule lijeka se lako oslobađaju iz kompleksa razrijeđivanjem medija ili kompetitivnim kompleksiranjem s žučnim kiselinama ili lipidima iz gastrointestinalnog trakta.²³

Poznato je da ciklodekstrini mogu tvoriti i ne-inkluzijske komplekse u kojima hidroksilne skupine s vanjske strane molekule ciklodekstrina tvore vodikove veze s molekulom lijeka. Primjerice, α -CD može tvoriti inkluzijske i ne-inkluzijske komplekse s dikarboksilnim kiselinama, pa su u vodenoj otopini prisutne dvije vrste kompleksa. Također, akridin/dimetil- β -CD kompleks stehiometrijskog omjera 2:1 nastaje nakon što nastane inkluzijski kompleks akridin/dimetil- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 te se na njega veže još jedna molekula

akridina. Bez obzira na tu mogućnost, vjerojatniji je nastanak inkluzijskog kompleksa lijek/CD negoli ne-inkluzijskog kompleksa.²⁰

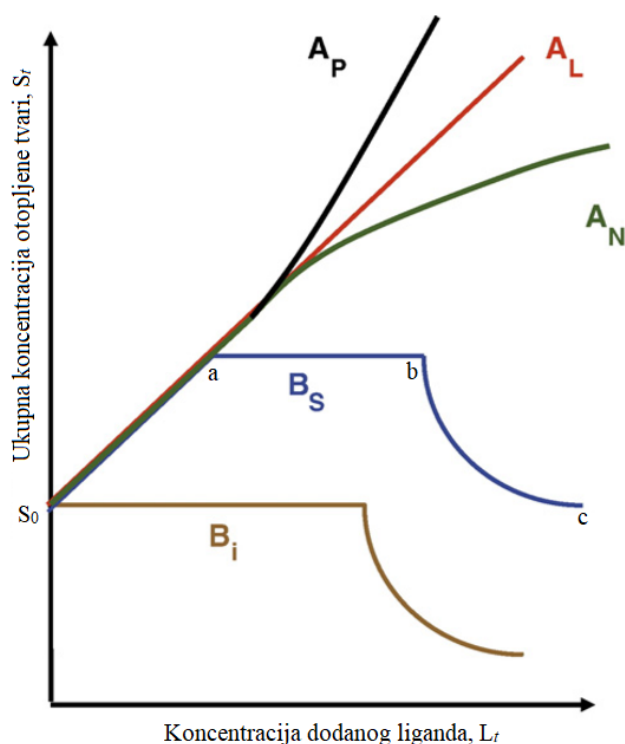
2.4. Analiza poboljšanja topljivosti (solubilizacijska ispitivanja)

U svim reakcijama kompleksiranja, uključujući i nastanak inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina, određivanje i poznavanje konstante stabilnosti od značajne je važnosti budući da te vrijednosti daju indeks promjene fizikalnih i kemijskih svojstava gosta do kojih dolazi vezanjem molekula gosta i molekula domaćina u kompleks. Većina metoda određivanja konstante stabilnosti za interakcije lijek/CD temelji se na titracijama i praćenju promjena određenog kemijskog ili fizikalnog svojstva molekule lijeka prilikom inkluzije u šupljinu CD te se zatim proučava njihova koncentracijska ovisnost.^{18,20}

Jedan od takvih pristupa je analiza poboljšanja topljivosti tzv. solubilizacijskim ispitivanjima (engl. *phase-solubility analysis*), odnosno praćenje utjecaja kompleksirajuće tvari na promjene fizikalno-kemijskih svojstava spoja koji se otapa. Eksperimentalno se suvišak lijeka (supstrat) dodaje u niz tikvica koje sadrže konstantan volumen vodene otopine ciklodekstrina (ligand). Koncentracija ciklodekstrina se u navedenom nizu tikvica sukcesivno povećava. Suvišak lijeka (s obzirom na njegovu intrinzičnu topljivost) je potreban kako bi se održavala visoka termodinamička aktivnost lijeka. Tako dobivene suspenzije se zatim miješaju pri uvjetima konstantne temperature kako bi se postiglo stanje ravnoteže. Suspenzije se nakon uspostave ravnoteže profiltriraju te se lijek kvantitativno određuje odgovarajućom analitičkom tehnikom (UV/Vis apsorpcijska spektroskopija, fluorescencijska spektroskopija itd.). Zatim se konstruiraju dijagrami topljivosti prema kojima se prati topljivost supstrata kao funkcija ukupne koncentracije liganda u kompleksacijskom mediju. Metodu solubilizacijskih ispitivanja i njenu praktičnu primjenu razvili su Higuchi i Connors 1964. godine.²⁰

2.4.1. Dijagrami topljivosti

S obzirom na oblik krivulje ovisnosti koncentracije (topljivosti) supstrata S o koncentraciji liganda L, dijagrami topljivosti se dijele na dva tipa, dijagram tipa A i dijagram tipa B.²⁰



Slika 5. Grafički prikaz dijagrama topljivosti tipa A i tipa B sa krivuljama ovisnosti A_L , A_P , A_N , B_S i B_I ²⁰

Na slici 5 prikazana su dva tipa dijagrama topljivosti. S_t na osi ordinata označava ukupnu množinsku koncentraciju otopljene tvari S, a simbol L_t na osi apscisa ukupnu koncentraciju liganda, L. S_0 označava koncentraciju (topljivost) otopljene tvari S u odsustvu liganda L.²⁰

Prema dijagramima tipa A topljivost supstrata S se povećava kao funkcija koncentracije liganda L. Kao što je uočljivo na slici, postoje tri tipa krivulja ovisnosti. Krivulja A_L predstavlja linearnu ovisnost topljivosti kao funkciju koncentracije liganda. Krivulja A_P označava izotermu s pozitivnim odstupanjem od linearosti (primjerice ukoliko je utjecaj liganda na topljivost učinkovitiji pri višim koncentracijama), dok izoterma A_N predstavlja negativno odstupanje od linearosti (ukoliko je učinkovitost liganda pri višim koncentracijama manja). Sve tri vrste krivulja ukazuju na to da nastaju topljivi kompleksi koji imaju veću topljivost u mediju od topljivosti samih supstrata koji nisu u kompleksu. Ako nastaju kompleksi prvog reda s obzirom

na ligand L, odnosno kompleksi opće formule S_mL (SL , S_2L , $S_3L\dots$), promatra se krivulja A_L . Kad nastaju kompleksi višeg reda s obzirom na ligand L, opće formule SL_n (SL_1 , SL_2 , $SL_3\dots$) krivulja ovisnosti je tipa A_P . Ovisnost tipa A_N još uvijek nije u potpunosti definirana te postoji nekoliko mogućih objašnjenja. Jedno od njih govori da se solubilizator, odnosno ligand L ponaša kao kaotrop ili kozmotrop, mijenjajući neka od svojstava otapala kao što su viskoznost, napetost površine ili električna vodljivost. Drugo objašnjenje govori da pri višim koncentracijama postoji mogućnost samoudruživanja molekula liganda.^{20,24}

Na osnovu svih navedenih činjenica općenito se može reći da se dijagram tipa A promatra kad nastaju topljivi kompleksi. Točan stehiometrijski omjer kompleksa u slučaju dijagrama A nije moguće sa sigurnošću ustanoviti. Ukoliko je vrijednost nagiba dijagrama topljivosti $> 1,0$, tada u sustavu sigurno postoji barem jedna vrsta kompleksa višeg reda s obzirom na S. Također, vrijednost nagiba $< 1,0$ ne znači nužno postojanje kompleksa samo stehiometrijskog omjera 1:1, iako se u odsutnosti dodatnih informacija takva pretpostavka ipak postavlja.²⁴

S druge pak strane, krivulje ovisnosti u dijagramima tipa B se promatraju u slučaju nastanka netopljivih kompleksa. Promotrimo krivulju B_S . U području vrijednosti od S_0 do a sustav se ponaša jednako onome u dijagramima tipa A, odnosno topljivost supstrata S se povećava, budući da nastaje topljivi kompleks između supstrata S i liganda L. U točki a je dostignuta granična topljivost kompleksa, pri čemu je ukupna topljivost supstrata jednaka sumi S_0 i koncentraciji otopljenog supstrata u obliku kompleksa. Daljnji dodatak liganda L rezultira dodatnim nastajanjem kompleksa koji onda precipitira, a koncentracija supstrata S koji nije u kompleksu ostaje konstantna zbog otapanja supstrata u čvrstom stanju. U točki b je sav supstrat S u čvrstom stanju otopljen (potrošen), a daljnji dodatak liganda u otopinu rezultira dodatnim nastankom netopljivog kompleksa i njegovom precipitacijom.^{20,24}

Krivulja B_I se opisuje na isti način kao i prethodna, a razlika je jedino u tome što je nastali kompleks toliko netopljiv da ne dolazi do inicijalnog linearnog porasta topljivosti supstrata u ovisnosti o dodanom ligandu.²⁰

Za razliku od dijagrama topljivosti tipa A kod kojih ne možemo sa sigurnošću utvrditi stehiometrijski omjer kompleksa, to nije slučaj kod dijagrama tipa B. Primjerice, u slučaju krivulje B_S , izračun stehiometrijskog omjera je moguć jer je količina L u području platoa krivulje jednaka onoj koja sudjeluje u kompleksiranju, a odgovarajuća količina S koja je iskompleksirana jednaka je količini slobodnog, neotopljenog S u točki a . Prema tome, količina

iskompleksiranog S u području platoa krivulje je razlika ukupnog S dodanog u sustav i količine S u otopini u točki a .²⁴

Ako je kompleks koji je odgovoran za početni porast topljivosti u dijagramu tipa B_S isti onaj kompleks koji se taloži na dijelu krivulje $b-c$, također i porast koncentracije supstrata S od vrijednosti S_0 do a mora biti jednak konačnoj koncentraciji supstrata S u točki c . Međutim, ovakvi slučajevi se rijetko razmatraju, jer sustav obično uključuje nastajanje dva ili više različitih kompleksa od kojih je jedan odgovoran za početni porast topljivosti, a drugi se taloži u kasnijim fazama.²⁴

Važno je naglasiti da se ovakva ispitivanja provode u sustavima koji su zasićeni lijekom, a takve otopine nisu idealne (suspenzije). Često se inkluzijski kompleksi lijekova i CD karakteriziraju NMR spektroskopijom ili spektrofotometrijskim analizama pri „idealnijim“ uvjetima ili u razrijeđenim vodenim otopinama. Tako dobiveni rezultati ne mogu biti iskorišteni za objašnjavanje rezultata dobivenih u sustavima koji se ne smatraju idealnima, pa valja biti oprezan prilikom usporedbe rezultata!¹⁸

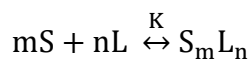
2.4.2. *Konstanta stabilnosti i efikasnost kompleksiranja*

Konstanta stabilnosti je ravnotežna konstanta nastajanja kompleksa u nekoj otopini, odnosno mjera jakosti interakcija između tvari koje reagiraju dajući kompleks. Te interakcije između supstrata i liganda je potrebno opisati jer one utječu na fizikalne i kemijske promjene koje se događaju tijekom nastajanja kompleksa, a jedna od njih je i topljivost supstrata.

Međutim, određivanje konstante stabilnosti prilikom nastanka kompleksa kod ovakvih sustava je nemoguće ukoliko nisu poznati točni stehiometrijski omjeri supstrata i liganda, a već ranije je naglašena komplicirana priroda ovakvih sustava. Zato se u većini slučajeva stehiometrijski omjer razumno pretpostavi, a konstanta stabilnosti koja se dobije na taj način se može koristiti za opisivanje opsega interakcija.²⁴

Uzimajući u obzir prethodna istraživanja koja se temelje na promatranju utjecaja ciklodekstrina na topljivost lijekova, usredotočit ćemo se na dijagram tipa A prema Higuchiju i Connorsu te na temelju njega definirati konstantu stabilnosti kompleksa.

Promotrimo dijagram tipa A i početno područje krivulje tipa B_s. Pod pretpostavkom da nastaje samo jedan kompleks opće formule S_mL_n odgovoran za povećanje topljivosti supstrata S, konstanta nastanka kompleksa, odnosno konstanta stabilnosti se tada definira kao:



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

pri čemu je množinska koncentracija kompleksa definirana kao [S_mL_n], množinska koncentracija supstrata kao [S] te množinska koncentracija liganda kao [L].²⁴

Pod pretpostavkom da stehiometrijski omjer supstrata i liganda u kompleksu iznosi 1:1, konstanta stabilnosti kompleksa može se definirati i preko nagiba pravca A_L u dijagramu tipa A prema izvedenom matematičkom izrazu:

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

u kojem vrijednost S₀ označava intrinzičnu topljivost, odnosno topljivost supstrata S u odsustvu liganda L, a nagib predstavlja nagib linearnog supstrat/ligand dijagrama topljivosti (A_L tip dijagrama). Kao što je već spomenuto, ukoliko je vrijednost nagiba > 1, ne može se pretpostaviti nastajanje isključivo kompleksa stehiometrijskog omjera 1:1 pa se navedeni izraz u tom slučaju ne može upotrijebiti.²⁴

Konstanta stabilnosti K_{1:1} se koristi za usporedbu afiniteta lijeka prema različitim ciklodekstrinima ili derivatima ciklodekstrina. Ona opisuje tendenciju nastajanja kompleksa, a izražava se u M⁻¹, odnosno mol⁻¹ L. Konstanta stabilnosti uglavnom iznosi od 0 do 10000 M⁻¹, odnosno vrijednost 0 označava da molekula gosta nema afinitet prema molekuli ciklodekstrina.²⁵ Vrijednosti konstanti stabilnosti prihvatljive za farmaceutske svrhe su u rasponu od 50 do 5000 mol⁻¹ L. Vrijednost niža od 50 ukazuje na nedovoljan afinitet molekula lijeka prema ciklodekstrinu, a vrijednosti iznad 5000 mogu značajno ograničiti bioraspoloživost lijeka budući da se radi o izuzetno stabilnim kompleksima.²⁶ Drugim riječima, konstanta stabilnosti je osnovno svojstvo koje opisuje jakost interakcije između lijeka i ciklodekstrina. Za bilo koji slučaj koji zahtijeva potpuno otapanje, praktična upotreba ciklodekstrina kao

učinkovitih solubilizatora ovisi o konstanti vezanja ($K_{1:1}$) između lijeka i ciklodekstrina i intrinzičnoj topljivosti lijeka (S_0).²⁷

Vrijednost $K_{1:1}$ je vrlo osjetljiva na male promjene u S_0 , a za slabo topljive lijekove može biti komplicirano odrediti točne vrijednosti S_0 . Na vrijednost S_0 utječu i najčešće korištene farmaceutske pomoćne tvari poput puferskih soli, polimera i konzervansa. Intrinzična topljivost lijeka ponekad može biti ispod granice detekcije korištene analitičke metode. Također, samoudruživanje lipofilnih molekula lijeka u vodenom mediju može dovesti do pogrešaka prilikom izračuna konstanti stabilnosti, stoga je u takvim uvjetima bolje definirati vrijednost efikasnosti kompleksiranja.^{6,27}

Efikasnost kompleksiranja (CE) se definira preko nagiba dijagrama topljivosti. Za kompleks stehiometrijskog omjera 1:1, efikasnost kompleksiranja se izražava preko nagiba dijagrama topljivosti prema izrazu:

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

Korištenjem gore navedenog izraza, Loftsson i suradnici su odredili efikasnost kompleksiranja hidroksipropil- β -ciklodekstrina i metiliranog β -ciklodekstrina za 28 različitih lijekova. Rezultati istraživanja otkrili su da je u prosjeku efikasnost kompleksiranja iznosila približno 0,3, što bi značilo da samo jedna od četiri molekule ciklodekstrina u otopini tvori kompleks sa slabo topljivim lijekom, uz pretpostavku nastajanja inkluzijskog kompleksa stehiometrijskog omjera 1:1.²⁷

Pri odabiru ciklodekstrina ili uvjeta kompleksiranja prilikom razvoja farmaceutskih formulacija, efikasnost kompleksiranja može biti prikladnija vrijednost za izražavanje afiniteta lijeka prema ciklodekstrinu nego vrijednost konstante stabilnosti (konstante vezanja između lijeka i ciklodekstrina), budući da je vrijednost efikasnosti kompleksiranja ovisna samo o nagibu pravca dijagrama topljivosti.²⁷

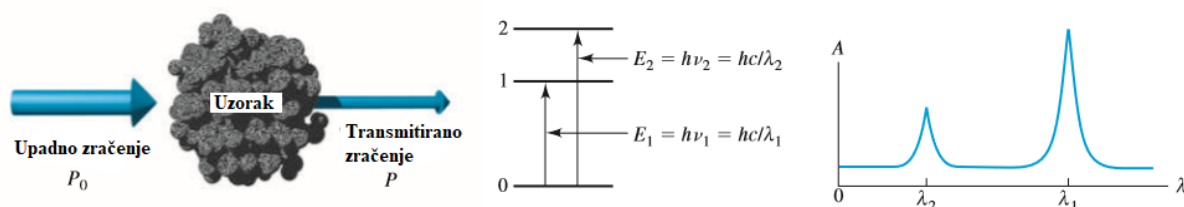
2.5. Spektroskopske metode analize

Mjerenja koja se temelje na svjetlosti i drugim oblicima elektromagnetskog zračenja u velikoj se mjeri koriste u analitičkoj kemiji, a znanost koja se temelji na interakciji zračenja i tvari naziva se spektroskopija. Spektroskopske analitičke metode temelje se na mjerenju količine apsorbiranog ili emitiranog zračenja atoma ili molekula od interesa. Uzorak se obično pobudi primjenom vanjske energije u obliku svjetlosti, električne energije, topline, čestica ili kemijske reakcije. Prije pobude analit se uglavnom nalazi u svom najnižem energetske stanju (osnovnom stanju), a nakon pobude prelazi u stanje više energije, odnosno pobuđeno stanje. Informacije o analitu se dobiju mjerenjem elektromagnetskog zračenja koje se emitira u povratku u osnovno stanje ili mjerenjem količine apsorbiranog elektromagnetskog zračenja. U apsorpcijskoj se spektroskopiji mjeri količina apsorbirane svjetlosti kao funkcija valne duljine, što može dati kvalitativne i kvantitativne informacije o uzorku. U fotoluminiscencijskoj spektroskopiji mjeri se emisija fotona nakon apsorpcije, a najvažniji oblici fotoluminiscencije u analitičke svrhe jesu fluorescencijska i fosforescencijska spektroskopija.

Spektroskopske metode se koriste za razjašnjavanje molekulskih struktura jednako kao i za kvantitativno i kvalitativno određivanje organskih i anorganskih spojeva.²⁸

2.5.1. UV/Vis apsorpcijska spektroskopija

Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija temelji se na apsorpciji zračenja ultraljubičastog (engl. *ultraviolet*, UV; 200 – 350 nm) i vidljivog (engl. *visible*, Vis; 350 – 800 nm) dijela spektra. Apsorpcijom upadnog UV ili Vis zračenja pobuđuju se prijelazi između elektronskih stanja u molekuli, pri čemu intenzitet propuštenog zračenja slabi i nastaju apsorpcijski spektri. Funkcionalne skupine u molekulskoj strukturi odgovorne za apsorpciju zračenja nazivaju se kromofori.²⁹



Slika 6. Prikaz apsorpcijskog procesa molekule analita, energetskih razina u molekuli i rezultirajućeg apsorpcijskog spektra²⁸

Da bi došlo do apsorpcije zračenja, energija upadnog zračenja mora odgovarati jednoj od razlika u energetske razine molekule analita. Zakon apsorpcije, odnosno Beer-Lambertov zakon, kvantitativno opisuje kako smanjenje intenziteta upadnog zračenja ovisi o koncentraciji apsorberajuće molekule i duljini puta zrake kroz apsorberajući medij (debljini kivete). Kako svjetlost prolazi kroz medij koji sadrži apsorberajući analit, intenzitet upadnog zračenja opada, a analit prelazi u pobuđeno stanje. Za otopinu analita određene koncentracije, veća duljina puta kroz medij kroz koji svjetlost prolazi znači i veći broj apsorberajućih molekula, a samim time je veće i smanjenje intenziteta upadnog zračenja. Također, što je veća koncentracija analita, veće je smanjenje intenziteta zračenja. Zbog interakcije fotona i apsorberajućih molekula analita, intenzitet upadnog zračenja se smanjuje s P_0 na P , a udio upadnog zračenja koji prođe kroz otopinu analita naziva se transmitancija i označava se s T . Transmitancija se često izražava kao postotak, a računa se prema izrazu:²⁸

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Količinu apsorberanog zračenja opisuje apsorbanca. Apсорbanca je direktno povezana s transmitancijom prema izrazu: $A = -\log T$. Drugim riječima, ako se apсорbanca otopine povećava, transmitancija se smanjuje. Prema Beer-Lambertovom zakonu, apсорbanca je proporcionalna koncentraciji c apсорberajuće vrste te duljini puta b kroz apсорberajući medij:²⁸

$$A = a \cdot b \cdot c$$

U navedenoj formuli, a je konstanta proporcionalnosti koja se naziva apсорptivnost. Ako se koncentracija otopine izražava u mol L^{-1} , a b u cm^{-1} , konstanta proporcionalnosti se naziva molarna apсорptivnost, a označava se s ε te ima mjernu jedinicu $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Prema tome, Beer-Lambertov zakon se definira kao:²⁸

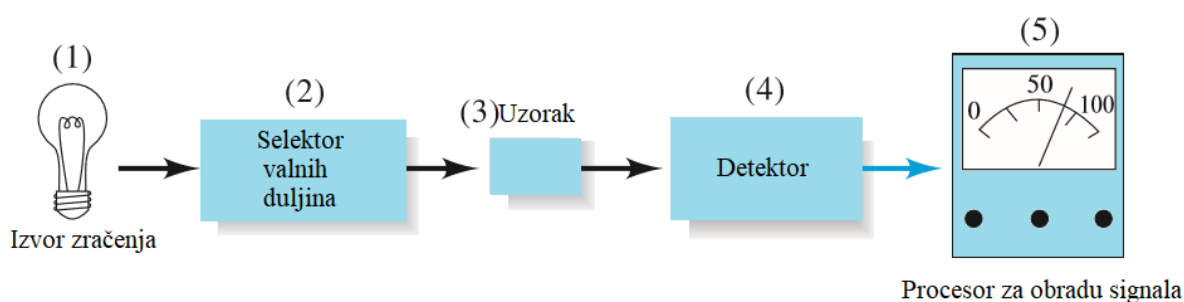
$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Zahvaljujući linearnom odnosu apсорbanca i koncentracije apсорberajuće tvari, te velikom broju organskih, anorganskih i biokemijskih vrsta koje apсорberaju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje, UV/Vis apсорpcijska spektroskopija široko se primjenjuje u kemijskim i

kliničkim laboratorijima za kvantitativnu analizu, s niskim granicama detekcije od oko 10^{-6} mol dm⁻³.²⁹

2.5.1.1. Instrumentacija

Većina instrumenata koji se koriste za UV/Vis apsorpcijsku spektroskopiju sastoji se od pet glavnih komponenti: izvora zračenja, selektora valnih duljina za izoliranje određenog dijela spektra valnih duljina, jednog ili više spremnika za uzorke, detektora zračenja za pretvaranje zračenja u mjerljivi električni signal te procesora za obradu i čitanje signala. Na slici 7 shematski je prikazan način na koji su ove komponentne uklopljene u instrument (spektrofotometar ili fotometar) za obavljanje spektroskopskih mjerenja.



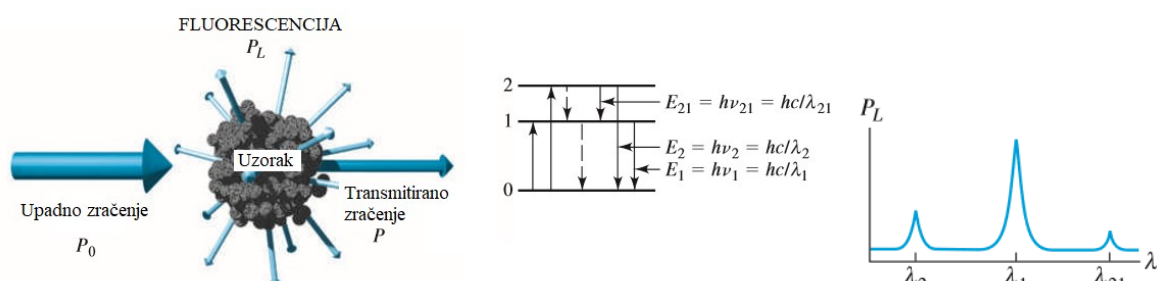
Slika 7. Shematski prikaz dijelova spektrofotometra

Kao izvor zračenja koriste se žarulje, odnosno lampe. U spektrofotometru se uobičajno nalaze dvije kako bi se pokrilo područje UV i Vis dijela spektra tj. vodikova, odnosno deuterijeva lampa za UV, te volframova lampa za Vis područje. Obje lampe rade istovremeno ali se na 350 nm nalazi optički element koji usmjerava zračenje ovisno u kojem se mjernom području radi. Selektor valnih duljina u određenom vremenskom intervalu pusti samo jednu valnu duljinu. To su najčešće monokromatori ili filtri, a ovisno na kojem principu rade, monokromatori mogu biti prizme (lom svjetlosti), optičke rešetke (difrakcija) ili filtri (interferencija). Spremnici za uzorak su kivete. Budući da staklene i plastične kivete apsorbiraju u UV području, najčešće se koriste kvarcne kivete debljine 10 mm. Detektori pretvaraju svjetlosni u električni signal, a najčešće korišteni su fotonski detektori, odnosno fotocijevi i fotomultipikatori koji rade na principu fotoelektričnog efekta. Računala se često koriste za kontrolu različitih instrumentalnih parametara, za obradu i pohranu podataka, ispis rezultata i spektara, za usporedbu rezultata s različitim bazama podataka i za komunikaciju s drugim računalima i mrežnim uređajima.^{28,29}

Spektrofotometri mogu biti jednosnopni ili dvosnopni. Jednosnopni spektrofotometri konstruirani su za analizu samo jednog uzorka, odnosno samo jedan snop zračenja prolazi kroz uzorak. Referentni uzorak se mora snimiti posebno, a dobiveni spektri se moraju naknadno obraditi. S druge strane, dvosnopni spektrofotometri mogu primiti dva uzorka, jedan referentni i jedan mjerni uzorak. U takvim instrumentima dva snopa zračenja se generiraju pomoću zrcala u obliku slova V. Jedan snop prolazi kroz referentni uzorak do fotodetektora, a drugi istodobno prolazi kroz uzorak koji se mjeri i odlazi do drugog fotodetektora. Dva izlazna signala se amplificiraju, a logaritam njihovih omjera se elektronički izračunava i prikazuje na izlaznom uređaju. To je primjer dvosnopnog instrumenta koji mjeri u prostoru. Postoje i dvosnopni instrumenti koji mjere u vremenu. U takvim instrumentima rotacijsko sektorsko zrcalo usmjerava cijeli snop zračenja prvo kroz referentnu otopinu, a potom kroz mjerni uzorak. Zračenje se tada rekombinira drugim zrcalom koje transmitira referentni snop i reflektira snop mjerenog uzorka prema detektoru. Spektri dobiveni ovakvim instrumentima ne moraju se naknadno obrađivati.²⁸

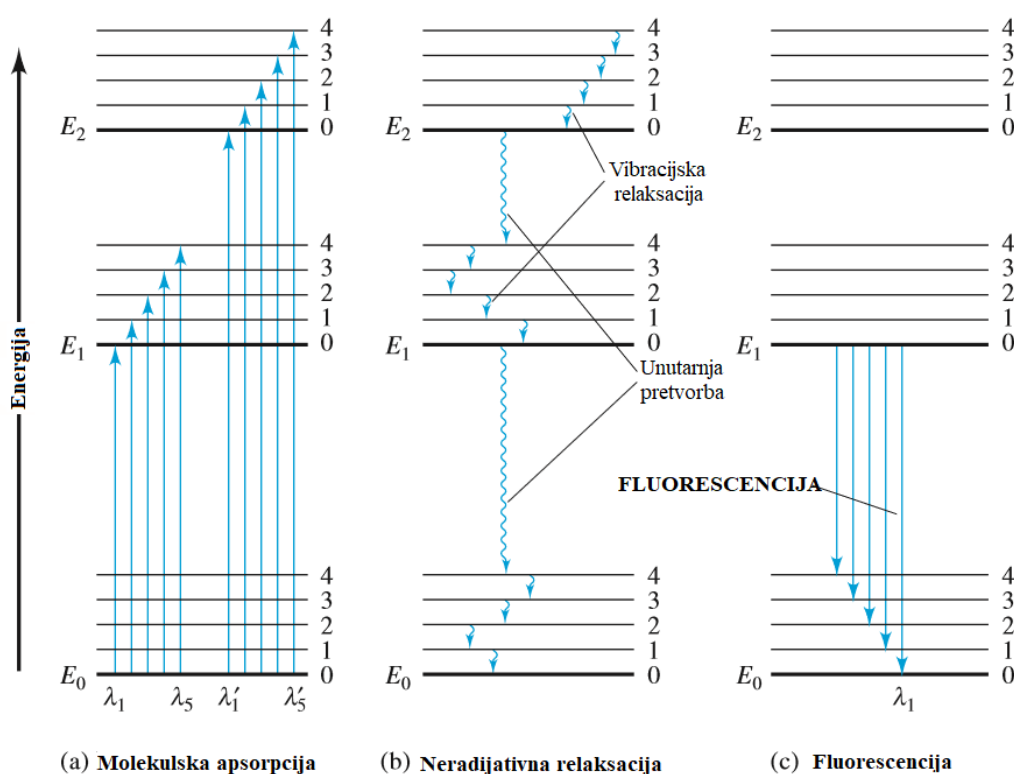
2.5.2. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija, odnosno spektrofluorimetrija, je tehnika molekulske spektroskopije koja se temelji na emisiji zračenja. Nakon što se molekula analita pobudi UV ili Vis zračenjem u više elektronsko stanje, procesom otpuštanja energije molekula se vraća u osnovno elektronsko stanje. Na slici 8 prikazan je deaktivacijski proces koji se događa nakon pobude analita u više energetske stanje primjenom vanjske energije, energetske razine u molekuli analita, pri čemu isprekidane linije simboliziraju neradijativne procese, a pune linije simboliziraju gubitak energije uz emisiju fotona te pripadajući emisijski spektar intenziteta emitiranog zračenja kao funkciju valne duljine.²⁸



Slika 8. Prikaz emisijskog procesa molekule analita, energetske razine u molekuli i rezultirajućeg emisijskog spektra²⁸

Struktura većine molekula omogućava vibracijsku relaksaciju i unutarnju pretvorbu, procese u kojima pobuđene molekule prilikom povratka o osnovno stanje gube energiju ali bez emisije zračenja. To su primjeri neradijativnih procesa. Fluorescencija je primjer radijativnog procesa u kojem molekula prilikom povratka u osnovno stanje emitira zračenje. Do fluorescentne emisije dolazi vraćanjem molekule iz prvog pobuđenog u osnovno elektronsko stanje, neovisno o valnoj duljini pobude.²⁸



Slika 9. Dijagram energetske razine i prijelaza u molekuli s procesima koji se događaju prilikom (a) apsorpcije zračenja, (b) neradijativne deaktivacije i (c) fluorescencije²⁸

Relativno mali broj tvari ima sposobnost fluorescentne emisije, budući da strukturalna obilježja molekula većine tvari dopuštaju bržu deaktivaciju u obliku neradijativnih procesa. Apsorpcija tipično traje 10^{-15} s, a vibracijska relaksacija od 10^{-11} do 10^{-10} s. Unutarnja pretvorba između različitih elektronskih stanja je također vrlo brza (10^{-12} s), dok je trajanje fluorescencije obično od 10^{-10} do 10^{-5} s.²⁸

Prednost fluorescencijske spektroskopije u odnosu na UV/Vis apsorpcijsku spektroskopiju je u tome što određuje fluorescentnu vrstu na osnovu dva parametra, valne duljine pobude i valne duljine emisije. Prema tome, moguće je snimanje dvije vrste spektara,

pobudnih i emisijskih spektara. Pobudni spektar odgovara apsorpcijskom spektru molekule, a snima se pri definiranoj valnoj duljini emisije. Emisijski spektar prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije uzorka o valnoj duljini, a snima se pri definiranoj valnoj duljini pobude. Pobudni i emisijski spektri karakteristični su za molekule koje posjeduju sposobnost fluorescentne emisije, što čini ovu metodu selektivnom. Pri definiranim valnim duljinama pobude i emisije, intenzitet emitiranog zračenja, I_f , proporcionalan je koncentraciji fluorescentne vrste, c , prema izrazu:

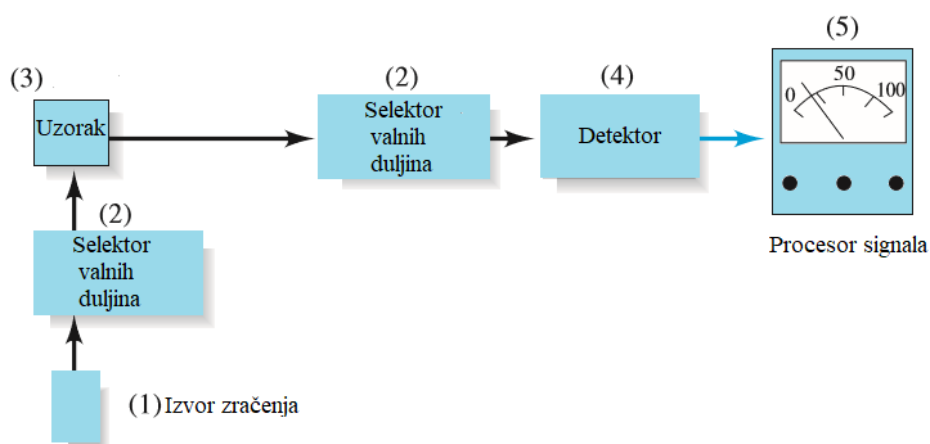
$$I_f = Kc$$

u kojem K predstavlja konstantu proporcionalnosti za odgovarajuću fluorescentnu vrstu i mjerni sustav, a c je množinska koncentracija otopine uzorka.^{28,29}

Budući da intenzitet fluorescencije izravno ovisi o snazi pobudnog zračenja i jačini detektorskog signala, fluorescencijska spektroskopija je osjetljivija od apsorpcijske spektroskopije i omogućuje kvantitativno određivanje analita pri vrlo niskim koncentracijama ($10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$).²⁹

2.5.2.1. Instrumentacija

Uređaji za mjerenje fluorescentne emisije su spektrofluorimetri i fluorimetri. Razlikuju se prema izvedbama upotrijebljenih selektora valnih duljina. Ako su oba selektora valnih duljina filtri, radi se o fluorimetru, a u slučaju spektrofluorimetra oba selektora su monokromatori.²⁸ Na slici 10 su shematski prikazani dijelovi spektrofluorimetra.



Slika 10. Shematski prikaz dijelova spektrofluorimetra

Izvori zračenja u fluorimetrima i spektrofluorimetrima obično su snažniji od onih tipičnih za apsorpcijsku spektroskopiju, budući da je intenzitet fluorescentne emisije izravno proporcionalan intenzitetu izvora. Kao rezultat različitih ovisnosti o intenzitetu izvora, tehnike koje se temelje na mjerenju fluorescentne emisije su općenito jedan do tri reda veličine osjetljivije od tehnika koje se temelje na apsorpciji. Kao izvori elektromagnetskog zračenja u spektrofluorimetru mogu se koristiti lampa ksenonovog luka, lampa živinog luka ili laseri. Pri snimanju emisijskog spektra, snop prvo prolazi kroz primarni selektor valnih duljina, pri čemu se propušta samo ono zračenje koje uzrokuje fluorescentnu emisiju, a isključuje ono koje odgovara fluorescentnoj emisiji. Razlika u odnosu na spektrofotometar je u tome što se u slučaju spektrofluorimetra zračenje detektira pod kutom od 90° u odnosu na upadno, kako bi se izbjegao utjecaj izvora na detektor, ali i utjecaji raspršenja u otopini i na stijenkama kivete budući da mogu izazvati pogreške prilikom mjerenja fluorescentne emisije. Osim toga, nakon kivete s uzorkom nalazi se još jedan monokromator koji služi za izoliranje samo određene valne duljine emisije, te se tako sprječava i detekcija ekscitacijskog snopa zračenja. Budući da se emitirano zračenje detektira pod kutom od 90° , koriste se kvarcne kivete kod kojih su sve četiri stijenske transparentne, za razliku od onih predviđenih za UV/Vis spektrofotometrijska mjerenja. Kao detektori se najčešće koriste fotomultiplikatori, a u posljednje vrijeme koriste se i CCD detektori i fotodiodni nizovi.^{28,29}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i materijali

U eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije i materijali:

- Prazikvantel ($C_{19}H_{24}N_2O_2$), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska
- β -ciklodekstrin, β -CD ($C_{42}H_{70}O_{35}$), CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, HP- β -CD ($C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_3H_7O)_n$), CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- Natrijeva sol sulfobutyleter- β -ciklodekstrina, SBE- β -CD ($C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8O_3SNa)_n$), CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- Nasumično metilirani β -ciklodekstrin, RM- β -CD ($C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n$), CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- Jabučna kiselina ($C_4H_6O_5$), analitički stupanj čistoće, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Njemačka
- Vinska kiselina ($C_4H_6O_6$), analitički stupanj čistoće, Merck-Alkaloid, Skopje, Sjeverna Makedonija
- Jantarna kiselina ($C_4H_6O_4$), analitički stupanj čistoće, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Limunska kiselina ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), analitički stupanj čistoće, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Metanol (CH_3OH), HPLC stupanj čistoće, J. T. Baker, Phillipsburg, SAD
- Ultračista voda dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sistema za pročišćavanje, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Filteri *Chromafil Xtra* H-PTFE, veličina pora 0,45 μm , Macherey-Nagel, Düren, Njemačka

3.2. Instrumentacija

Suspenzije binarnih (prazikvantel i ciklodekstrini ili prazikvantel i organske kiseline) te ternarnih sustava (prazikvantel, ciklodekstrini i organske kiseline) su miješane (250 – 300 RPM)

do postizanja ravnoteže korištenjem orbitalnih tresilica Tehtnica EV-402 i Tehtnica Vibromix 403 EVT.

Analiza UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom provedena je spektrofotometrom Specord 200 (Analytik Jena AG, Jena, Njemačka). Apsorpcijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina 190 – 400 nm s postavljenom širinom pukotine od 2 nm i brzinom snimanja od 10 nm s⁻¹. Apsorpcijski maksimum (λ_{MAX}) korišten za kvantitativno određivanje prazikvantela se nalazio pri 267 nm. Prije svakog mjerenja provedena je referentna korekcija instrumenta otopinom slijepe probe koja po svom sastavu odgovarala sustavu otapala koji je korišten za pripremu uzoraka (metanol:voda = 20:80). Korištene su standardne kvarcne kivete dimenzija 10 · 10 mm.

Analiza fluorescencijskom spektroskopijom provedena je spektrofluorimetrom LS55 (PerkinElmer Inc., Waltham, SAD). Emisijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina 240 – 350 nm, pri čemu je valna duljina pobude (λ_{EX}) iznosila 260 nm, dok je maksimum fluorescentne emisije prazikvantela (λ_{EM}) identificiran pri 286 nm. Širina ulazne i izlazne pukotine iznosila je 5 nm. Korištene su standardne kvarcne kivete dimenzija 10 · 10 mm.

3.3. Validacija metoda

Validacija analitičke metode definira se kao postupak koji pruža objektivne dokaze da je određena analitička metoda prikladna za predviđenu svrhu. Validacija je potrebna kako bi se potvrdila prikladnost analitičke metode u svrhu dobivanja kvantitativnih ili kvalitativnih rezultata s prihvatljivom točnošću, preciznošću i reproducibilnošću. Parametri koje smo proučavali prilikom validacije metoda UV/Vis apsorpcijske spektroskopije i fluorescencijske spektroskopije prema dostupnim ICH smjernicama bili su specifičnost (engl. *specificity*), linearnost (engl. *linearity*), granice detekcije (engl. *detection limit*) i granice kvantifikacije (engl. *quantitation limit*), te preciznost (engl. *precision*), koja uključuje preciznost metode, preciznost instrumenta i intermedijarnu preciznost tj. međupreciznost.³⁰

3.3.1. Priprema ishodnih otopina

Prije početka validacije metoda bilo je potrebno pripremiti ishodne otopine prazikvantela, β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD. Ishodna otopina prazikvantela korištena za validaciju

UV/Vis spektrofotometrijske metode, masene koncentracije $\gamma(\text{PZQ}) = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$, pripravljena je otapanjem vagane mase prazikvantela u odmjernoj tikvici od 25 mL u metanolu. Ishodna otopina prazikvantela za validaciju spektrofluorimetrijske metode, masene koncentracije $\gamma(\text{PZQ}) = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, pripravljena je otapanjem vagane mase prazikvantela u odmjernoj tikvici od 10 mL u metanolu. Ishodne otopine korištenih ciklodekstrina pripravljene su u odmjernim tikvicama volumena 10 mL otapanjem vaganih masa u deioniziranoj vodi. Masena koncentracija ishodne otopine $\beta\text{-CD}$ iznosila je $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$, dok su masene koncentracije ishodnih otopina njegovih derivata iznosile $15,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Navedene ishodne otopine koristile su se za pripremu radnih otopina različitih koncentracija prilikom validacije metoda.

3.3.2. Validacija UV/Vis spektrofotometrijske metode

3.3.2.1. Specifičnost

Specifičnost se definira kao sposobnost nedvosmislene procjene analita u prisustvu neke komponente za koju se očekuje da je prisutna. To su većinom nečistoće, razgradne tvari, otapalo ili neke druge tvari.³⁰ U svrhu ovog istraživanja bilo je potrebno odrediti utječe li prisutnost ciklodekstrina na određivanje prazikvantela, analita od interesa.

Iz ishodnih otopina gore navedenih koncentracija pripravljene su otopine prazikvantela masene koncentracije $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$ bez prisutnosti ciklodekstrina, otopine samih ciklodekstrina masenih koncentracija $6,0 \text{ mg mL}^{-1}$, te otopine prazikvantela ($0,30 \text{ mg mL}^{-1}$) u prisutnosti $\beta\text{-CD}$, HP- $\beta\text{-CD}$, SBE- $\beta\text{-CD}$ i RM- $\beta\text{-CD}$ ciklodekstrina ($6,0 \text{ mg mL}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 20:80.

Snimljeni su apsorpcijski spektri pripremljenih otopina te se njihovom usporedbom provjerilo ima li prisutnost ciklodekstrina utjecaj na određivanje prazikvantela.

3.3.2.2. Linearnost

Linearnost analitičkog postupka definira se kao njegova sposobnost da unutar određenog područja daje rezultate izravno proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Na dijagram se ucrtava analitički signal na os ordinata (y) kao funkcija odgovarajuće koncentracije na osi apscisa (x). Njihova ovisnost bi trebala biti linearna (provjerena prikladnom statističkom metodom, npr. regresijskom analizom metodom najmanjih kvadrata), a pravac dobiven na taj

način naziva se baždarni pravac koji se koristi za određivanje preciznosti, te granice detekcije i granice kvantifikacije. Njemu se pridružuju odgovarajuće vrijednosti nagiba (a), odsječka na ordinatnoj osi (b) te vrijednost analize odstupanja (devijacije) dobivenih točki od konstruiranog pravca (koeficijent determinacije, R^2).³⁰

Iz ishodne otopine prazikvantela, masene koncentracije $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$, pripravljene su standardne otopine prazikvantela u koncentracijskom rasponu navedenom u tablici 3.

Tablica 3. Koncentracijske razine otopina prazikvantela u svrhu određivanja linearnosti analitičke metode

Otopina	$\gamma(\text{PZQ})/\text{mg mL}^{-1}$
1	0,01
2	0,02
3	0,04
4	0,05
5	0,10
6	0,20
7	0,30
8	0,50
9	0,75
10	1,0
11	1,20
12	1,40
13	1,60

Za svaku navedenu koncentracijsku razinu pripravljene su po tri otopine te snimljeni njihovi apsorpcijski spektri. Očitane su vrijednosti apsorpcije pri maksimumu apsorpcije prazikvantela pri valnoj duljini od 267 nm, izračunate srednje vrijednosti rezultata te je konstruiran baždarni pravac.

3.3.2.3. Granice detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije analitičkog postupka definira se kao najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i nužno kvantificirati, dok se granica kvantifikacije definira kao najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prikladnom točnošću i preciznošću.³⁰

Granica detekcije i granica kvantifikacije u ovom slučaju određene su na temelju baždarnog pravca dobivenog na osnovu podataka za određivanje linearnosti iz kojeg su regresijskom analizom dobivene vrijednosti nagiba pravca i rezidualne standardne devijacije. Na osnovu tih podataka, granica detekcije (LOD) računa se prema izrazu:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

u kojem vrijednost σ predstavlja rezidualnu standardnu devijaciju regresijske krivulje, a vrijednost S predstavlja nagib baždarnog pravca.

Granica kvantifikacije (LOQ) računa se prema izrazu:

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

u kojem su vrijednosti σ i S također vrijednosti rezidualne standardne devijacije regresijske krivulje i nagiba baždarnog pravca.³⁰

3.3.2.4. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka izražava slaganje između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima.³⁰ Prilikom određivanja preciznosti, određene su preciznost metode, preciznost instrumenta i intermedijarna preciznost (međupreciznost).

a) Preciznost metode

U svrhu određivanja preciznosti metode iz ishodne otopine prazikvantela pripremljene su otopine tri koncentracijske razine ($\gamma = 0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, $\gamma = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ i $\gamma = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Svaka koncentracijska razina pripremljena je trostruko, a točne koncentracije na temelju odziva izračunate su pomoću baždarnog pravca. Za svaku ispitanu koncentracijsku razinu izračunata je srednja vrijednost koncentracije, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (% RSD).

b) Preciznost instrumenta

Pripremljene su otopine tri koncentracijske razine ($\gamma = 0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, $\gamma = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ i $\gamma = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Otopina svake koncentracijske razine pripremljena je po jednom. Provedeno je trostruko snimanje apsorpcijskih spektara svake od otopina, a točne koncentracije izračunate su pomoću baždarnog pravca. Za svaku koncentracijsku razinu izračunata je srednja vrijednost koncentracije, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (% RSD).

c) Intermedijarna preciznost (međupreciznost)

Standardna otopina prazikvantela koncentracije $\gamma = 0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ pripremljena je i snimana tri dana za redom, a točne koncentracije izračunate su pomoću baždarnog pravca. Intermedijarna preciznost izražena je pomoću standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (% RSD) tri mjerenja.

3.3.3. Validacija spektrofotometrijske metode

3.3.3.1. Specifičnost

Analogno UV/Vis spektrofotometrijskoj metodi bilo je potrebno provjeriti utječe li prisutnost ciklodekstrina u otopini na određivanje prazikvantela spektrofotometrijskom metodom.

Za određivanje specifičnosti bilo je potrebno pripremiti otopine prazikvantela masene koncentracije $6,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ bez prisutnosti ciklodekstrina, otopine samih β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD ciklodekstrina masenih koncentracija $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ te otopine prazikvantela ($\gamma = 6,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) u prisutnosti β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD ($\gamma = 0,12 \text{ mg mL}^{-1}$) u sustavu otapala metanol:voda = 20:80. Sve navedene otopine pripremljene su iz ishodne otopine prazikvantela masene koncentracije $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ i ishodnih otopina ciklodekstrina, od kojih je

masena koncentracija β -CD $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$, a masene koncentracije svih ostalih ciklodekstrina $15,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Snimljeni su emisijski spektri pripremljenih otopina, a usporedbom dobivenih emisijskih spektara provjerilo se ima li prisutnost ciklodekstrina utjecaj na određivanje prazikvantela.

3.3.3.2. Linearnost

U svrhu određivanja linearnosti, analogno postupku validacije UV/Vis spektrofotometrijske metode, iz ishodne otopine prazikvantela masene koncentracije $\gamma = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ pripremljene su standardne otopine u koncentracijskom rasponu navedenom u tablici 4. Za svaku navedenu koncentracijsku razinu pripremljene su po tri otopine te snimljeni njihovi emisijski spektri. Očitane su vrijednosti intenziteta pri maksimumu emisije prazikvantela, izračunate su srednje vrijednosti intenziteta i konstruiran je baždarni pravac ovisnosti intenziteta emisije o masenoj koncentraciji prazikvantela.

Tablica 4. Koncentracijske razine otopina prazikvantela u svrhu određivanja linearnosti analitičke metode

Otopina	$\gamma(\text{PZQ}) / \mu\text{g mL}^{-1}$
1	2,50
2	5,0
3	10,0
4	15,0
5	25,0

3.3.3.3. Granice detekcije i kvantifikacije

Iz baždarnog pravca dobivenog na osnovu podataka za određivanje linearnosti metode, regresijskom analizom dobiveni su podaci za rezidualnu standardnu devijaciju regresijske krivulje te nagib baždarnog pravca analogno postupku validacije UV/Vis spektrofotometrijske metode. Na osnovu tih podataka izračunate su granica detekcije (LOD) prema izrazu:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

te granica kvantifikacije (LOQ) prema izrazu:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

u kojima vrijednost σ predstavlja rezidualnu standardnu devijaciju regresijske krivulje, a vrijednost S nagib baždarnog pravca.

3.3.3.4. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka kao jedan od parametara validacije određena je na temelju preciznosti metode, preciznosti instrumenta te intermedijarna preciznosti (međupreciznosti).

a) Preciznost metode

U svrhu određivanja preciznosti metode iz ishodne otopine prazikvantela pipremljene su otopine tri koncentracijske razine ($\gamma = 2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\gamma = 5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $\gamma = 15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Svaka koncentracijska razina pripremljena je trostruko, a točne koncentracije na temelju odziva izračunate su pomoću baždarnog pravca. Za svaku ispitanu koncentracijsku razinu izračunata je srednja vrijednost koncentracije, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (% RSD).

b) Preciznost instrumenta

Pripremljena su otopine tri koncentracijske razine ($\gamma = 2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\gamma = 5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $\gamma = 15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Otopina svake koncentracijske razine pripremljena je po jednom. Provedeno je trostruko snimanje emisijskih spektara svake od otopina. Na osnovu baždarnog pravca izračunate su točne koncentracije, a preciznost instrumenta izražena je preko standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (% RSD) izračunatih koncentracija.

c) Intermedijarna preciznost (međupreciznost)

Standardna otopina prazikvantela masene koncentracije $\gamma = 2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljena je tri dana za redom, točne koncentracije izračunate su pomoću baždarnog pravca, a intermedijarna

preciznost izražena je preko standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (% RSD) tri mjerenja.

3.4. Probir

Pripremljene su suspenzije čistog prazikvantela, binarnih sustava prazikvantela s ciklodekstrinima ili s organskim kiselinama i ternarnih sustava prazikvantela s ciklodekstrinima i organskim kiselinama.

Prazikvantel je u suspenzijama bio prisutan u suvišku (40 mg) s obzirom na svoju intrinzičnu topljivost, a količine organskih kiselina i ciklodekstrina bile su ekvimolarne količini prazikvantela. U svaku od tikvica za miješanje je dodan volumen od po 10,0 mL deionizirane vode te su smještene na orbitalne tresilice. Alikvoti suspenzija su uzimani nakon 24, 48 i 72 sata te su profiltrirani uz pomoć filtera *Chromafil Xtra* H-PTFE s veličinom pora 0,45 μm . Mjerne otopine za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela su pripremane nakon filtriranja uzetih alikvota tako da konačan sustav otapala u svakoj od njih bude metanol:voda = 20:80.

3.5. Određivanje topljivosti

Prilikom određivanja topljivosti prazikvantela u prisutnosti ciklodekstrina bilo je potrebno pripremiti suspenzije prazikvantela sa svakim od ciklodekstrina, β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD. Otopine su pripremljene na način da se u svaku od tikvica dodala jednaka količina prazikvantela u velikom suvišku (s obzirom na njegovu intrinzičnu topljivost), mase 40 mg, a pojedini ciklodekstrini dodavani su u različitim koncentracijskim rasponima sa sukcesivnim porastom koncentracije. Za pripremu suspenzija prazikvantela s β -CD koncentracijski raspon ciklodekstrina iznosio je $0 - 12,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Za pripremu svih ostalih suspenzija prazikvantela s HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD, koncentracijski raspon ciklodekstrina iznosio je $0 - 40,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. U svaku od tikvica dodano je po 10,0 mL vode, a tikvice su potom smještene na orbitalne tresilice. Od svake suspenzije uzimani su alikvoti (3,0 mL) u vremenskim periodima 24, 48 i 72 sata od pripreme suspenzija i profiltrirani su uz pomoć filtera *Chromafil Xtra* H-PTFE s veličinom pora 0,45 μm . Mjerne otopine za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela pripremane su nakon filtriranja alikvota suspenzija prazikvantela i ciklodekstrina.

Mjerne otopine za UV/Vis spektrofotometrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela pripremane su u odmjernim tikvicama volumena 5,0 mL pipetiranjem određenog volumena profiltriranog alikvota suspenzije (tablice 5, 6, 7 i 8) i razrjeđivanjem odgovarajućim volumenom metanola i vode tako da konačan sustav otapala bude metanol:voda = 20:80.

Mjerne otopine za spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela pripremane su analogno prethodno opisanom postupku (tablice 5, 6, 7 i 8) u odmjernim tikvicama volumena 10,0 mL. Sustav otapala je također bio metanol:voda = 20:80.

Tablica 5. Priprava mjernih otopina za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela u suspenzijama s β -CD

Otopina	UV/Vis spektrofotometrija		Fluorescencijska spektroskopija	
	$V_{\text{ALIKVOT}} / \text{mL}$	Faktor razrjeđenja	$V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$	Faktor razrjeđenja
1	2,50	2,0	200,0	50,0
2	2,50	2,0	200,0	50,0
3	2,50	2,0	200,0	50,0
4	2,50	2,0	200,0	50,0
5	2,50	2,0	200,0	50,0
6	2,50	2,0	200,0	50,0

Tablica 6. Priprava mjernih otopina za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela u suspenzijama s HP- β -CD

Otopina	UV/Vis spektrofotometrija		Fluorescencijska spektroskopija	
	$V_{\text{ALIKVOT}} / \text{mL}$	Faktor razrjeđenja	$V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$	Faktor razrjeđenja
1	2,50	2,0	200,0	50,0
2	2,50	2,0	200,0	50,0
3	2,50	2,0	200,0	50,0
4	2,50	2,0	200,0	50,0
5	2,50	2,0	200,0	50,0
6	2,50	2,0	100,0	100,0
7	2,50	2,0	100,0	100,0
8	2,50	2,0	100,0	100,0
9	2,50	2,0	100,0	100,0

Tablica 7. Priprava mjernih otopina za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela u suspenzijama s SBE- β -CD

Otopina	UV/Vis spektrofotometrija		Fluorescencijska spektroskopija	
	$V_{\text{ALIKVOT}} / \text{mL}$	Faktor razrjeđenja	$V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$	Faktor razrjeđenja
1	2,50	2,0	200,0	50,0
2	2,50	2,0	200,0	50,0
3	2,50	2,0	200,0	50,0
4	2,50	2,0	100,0	100,0
5	2,50	2,0	100,0	100,0
6	2,50	2,0	100,0	100,0
7	2,50	2,0	50,0	200,0
8	2,50	2,0	50,0	200,0
9	2,50	2,0	50,0	200,0

Tablica 8. Priprava mjernih otopina za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje prazikvantela u suspenzijama s RM- β -CD

Otopina	UV/Vis spektrofotometrija		Fluorescencijska spektroskopija	
	$V_{\text{ALIKVOT}} / \text{mL}$	Faktor razrjeđenja	$V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$	Faktor razrjeđenja
1	2,50	2,0	200,0	50,0
2	2,50	2,0	200,0	50,0
3	2,50	2,0	200,0	50,0
4	2,50	2,0	100,0	100,0
5	1,50	3,33	100,0	100,0
6	1,50	3,33	100,0	100,0
7	1,50	3,33	50,0	200,0
8	1,50	3,33	50,0	200,0
9	1,50	3,33	50,0	200,0

Na temelju mjerenja apsorbancije pri apsorpcijskom maksimumu prazikvantela i uz pomoć baždarnog pravca određene su koncentracije prazikvantela u suspenzijama korištenjem validirane UV/Vis spektrofotometrijske metode. Mjerenjem intenziteta fluorescencije uzoraka pri maksimumu emisije prazikvantela također su na osnovu baždarnog pravca određene koncentracije prazikvantela u svakoj od suspenzija korištenjem validirane spektrofluorimetrijske metode. Konstruirani su pripadajući dijagrami topljivosti i izračunate su konstante stabilnosti, $K_{1:1}$, prema izrazu:

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

i efikasnosti kompleksiranja, CE , prema izrazu:

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

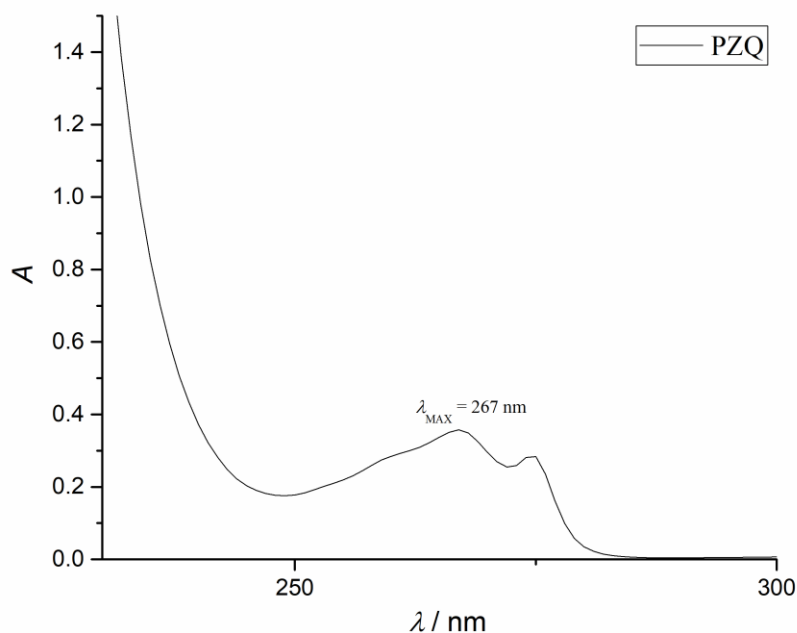
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija metoda

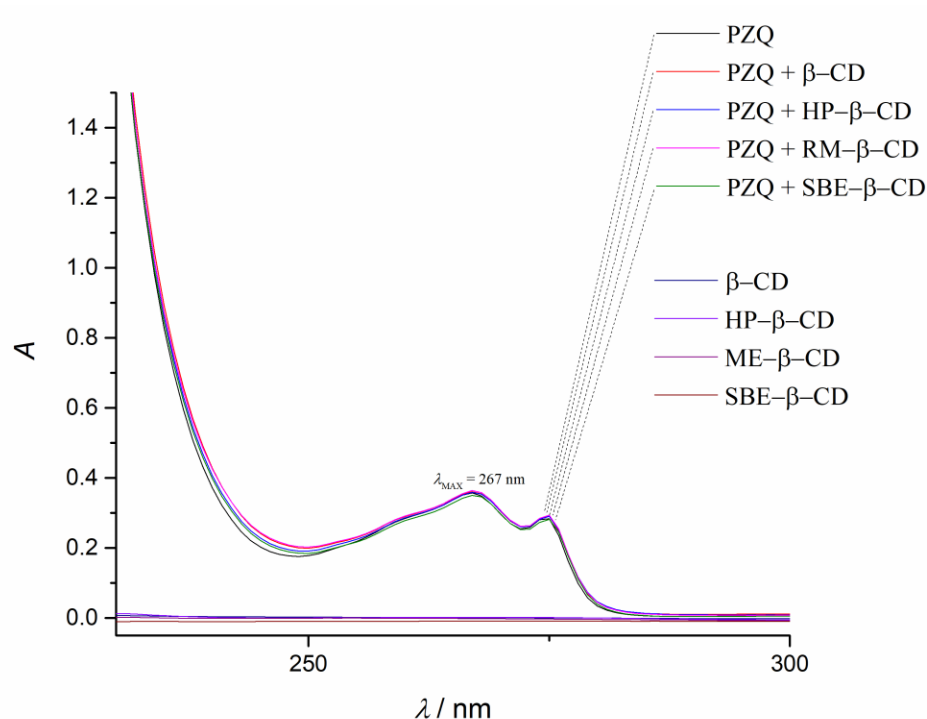
4.1.1. Validacija UV/Vis spektrofotometrijske metode

4.1.1.1. Specifičnost

Analizom podataka dobivenih u svrhu ispitivanja specifičnosti analitičkog postupka utvrđeno je da prisutnost ciklodekstrina u otopinama prazikvantela s β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD ne utječe na apsorpciju prazikvantela. Snimanjem apsorpcijskih spektara otopina samih ciklodekstrina masenih koncentracija $6,0 \text{ mg mL}^{-1}$ nisu uočeni apsorpcijski maksimumi na valnoj duljini od 267 nm . Na slici 11 prikazan je apsorpcijski spektar otopine prazikvantela bez prisutnosti ciklodekstrina masene koncentracije $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$, a na slici 12 apsorpcijski spektri otopine prazikvantela ($\gamma = 0,30 \text{ mg mL}^{-1}$), otopina β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD ($\gamma = 6,0 \text{ mg mL}^{-1}$) kao i kombinacija prazikvantela sa svim ciklodekstrinima.



Slika 11. Apсорpcijski spektar otopine prazikvantela ($\gamma = 0,30 \text{ mg mL}^{-1}$) s apсорpcijskim maksimumom pri valnoj duljini od 267 nm

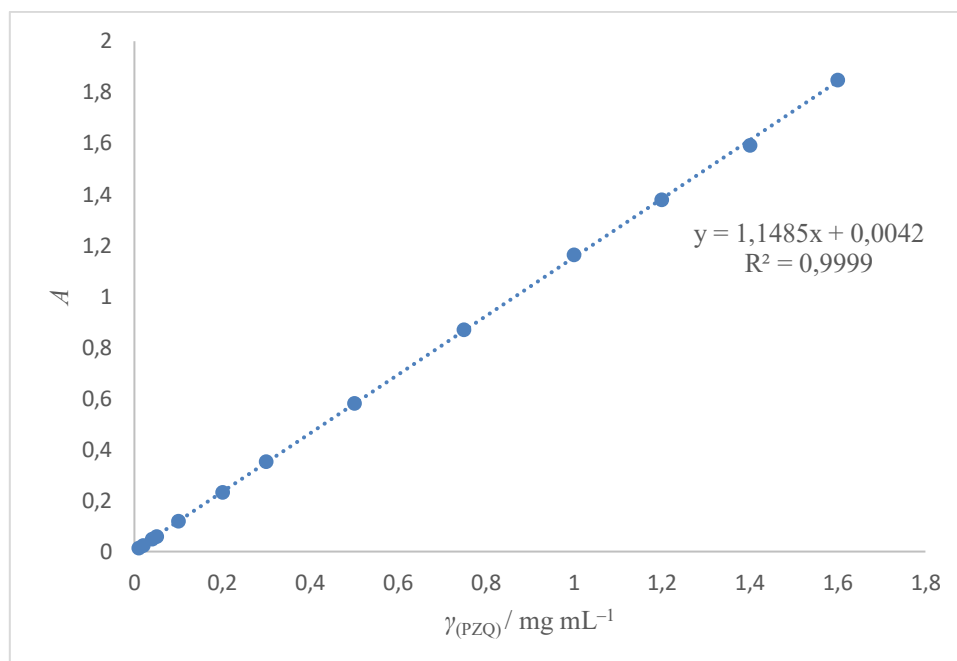


Slika 12. Apsorpcijski spektri otopina prazikvantela ($\gamma = 0,30 \text{ mg mL}^{-1}$), ciklodekstrina ($\gamma = 6,0 \text{ mg mL}^{-1}$) i kombinacija prazikvantela i ciklodekstrina

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je metoda specifična za UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje prazikvantela u otopinama prazikvantela s β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD.

4.1.1.2. Linearnost

Na osnovu mjerenja provedenih u svrhu određivanja linearnosti metode utvrđena je linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji prazikvantela u koncentracijskom rasponu $0,10 - 16,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Konstruiran je baždarni pravac koji se kasnije koristio za određivanje preciznosti, granica detekcije i kvantifikacije i za kvantitativno određivanje prazikvantela UV/Vis spektrofotometrijskom metodom prilikom ispitivanja njegove topljivosti u prisutnosti ciklodekstrina. Prikaz baždarnog pravca nalazi se na slici 13.



Slika 13. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji prazikvantela

Jednadžba baždarnog pravca glasi $y = 1,1485x + 0,0042$, a koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9999 što je još jedan od pokazatelja da je ovisnost linearna i da se dobiveni baždarni pravac može dalje koristiti u svrhu određivanja koncentracije prazikvantela prilikom ispitivanja njegove topljivosti.

4.1.1.3. Granice detekcije i kvantifikacije

Regresijskom analizom podataka za određivanje linearnosti metode i konstruiranog baždarnog pravca utvrđene su vrijednosti rezidualne standardne devijacije regresijske krivulje i nagiba baždarnog pravca. Na osnovu njih određene su granica detekcije i granica kvantifikacije.

Granica detekcije (LOD) iznosi $0,0082 \text{ mg mL}^{-1}$, a granica kvantifikacije (LOQ) iznosi $0,0249 \text{ mg mL}^{-1}$.

4.1.1.4. Preciznost

Prilikom određivanja ovog parametra validacije analitičkog postupka određene su preciznost metode, preciznost instrumenta i intermedijarna preciznost (međupreciznost).

a) Preciznost metode

Otopine tri koncentracijske razine pripremljene su po tri puta. Pomoću konstruiranog baždarnog pravca izračunate su točne koncentracije (analitički povrat), a za svaku koncentracijsku razinu izračunata je srednja vrijednost koncentracija, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (% RSD). Svi navedeni podaci nalaze se u tablici 9.

Tablica 9. Rezultati mjerenja dobiveni u svrhu određivanja preciznosti metode

	$\gamma(\text{PZQ}) / \text{mg mL}^{-1}$	Apsorbancija	Analitički povrat	Prosječna vrijednost	SD	% RSD
1	0,10	0,1162	0,0976	0,0976	0,0006	0,60
		0,1169	0,0982			
		0,1156	0,0970			
2	0,50	0,5796	0,5010	0,4933	0,0066	1,34
		0,5668	0,4898			
		0,5660	0,4892			
3	1,0	1,1657	1,0113	1,0115	0,0010	0,10
		1,1672	1,0126			
		1,1650	1,0107			

b) Preciznost instrumenta

Pripremljene su otopine tri koncentracijske razine. Provedeno je trostruko snimanje apsorpcijskih spektara svake od njih, a točne koncentracije (analitički povrat) izračunate su pomoću konstruiranog baždarnog pravca. Preciznost instrumenta izražena je pomoću standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (% RSD) izračunatih koncentracija. Svi podaci nalaze se u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati dobiveni u svrhu određivanja preciznosti instrumenta

	$\gamma(\text{PZQ}) / \text{mg mL}^{-1}$	Apsorbancija	Analitički povrat	Prosječna vrijednost	SD	% RSD
1	0,10	0,1165	0,0978	0,0981	0,0002	0,20
		0,1169	0,0982			
		0,1169	0,0982			
2	0,50	0,5853	0,5060	0,5061	0,0001	0,02
		0,5856	0,5062			
		0,5854	0,5060			
3	1,0	1,1664	1,0119	1,0123	0,0003	0,03
		1,1670	1,0124			
		1,1670	1,0124			

c) Intermedijarna preciznost (međupreciznost)

Standardne otopine prazikvantela jedne koncentracijske razine pripremljene su tri dana za redom te su snimljeni njihovi apsorpcijski spektri, a točne koncentracije (analitički povrat) izračunate su pomoću baždarnog pravca. Intermedijarna preciznost izražena je pomoću standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (% RSD) tri mjerenja.

Tablica 11. Rezultati mjerenja dobiveni u svrhu određivanja intermedijarne preciznosti

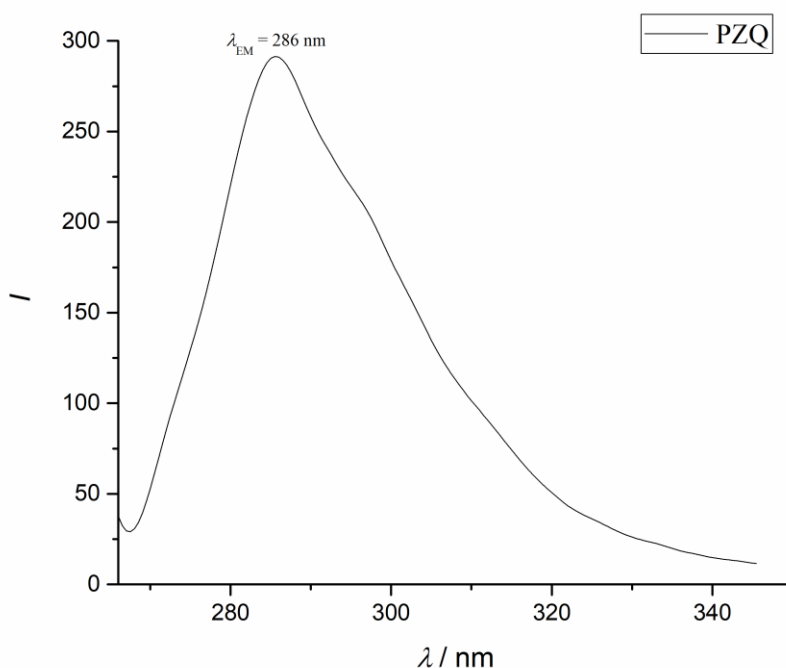
	$\gamma(\text{PZQ}) / \text{mg mL}^{-1}$	Apsorbancija	Analitički povrat	Prosječna vrijednost	SD	% RSD
1	0,10	0,1160	0,0974	0,0981	0,0020	2,01
		0,1151	0,0966			
		0,1194	0,1003			

Na temelju utvrđenih vrijednosti relativnih standardnih devijacija, koje su se kretale u rasponu vrijednosti od 0,02 do 2,01 % možemo ustanoviti kako je validirana metoda precizna i prihvatljiva za korištenje u svrhu kvantitativnog određivanja prazikvantela. Dozvoljena gornja granica vrijednosti relativne standardne devijacije iznosi 5 %.

4.1.2. Validacija spektrofotometrijske metode

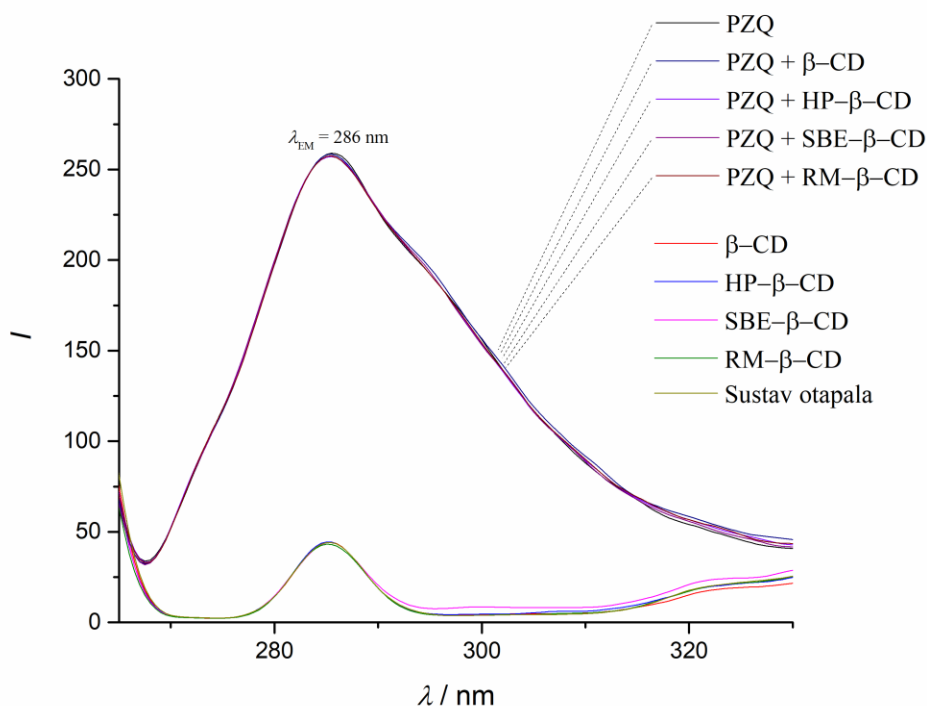
4.1.2.1. Specifičnost

Analizom podataka dobivenih u svrhu ispitivanja specifičnosti analitičkog postupka utvrđeno je da prisutnost ciklodekstrina u otopinama prazikvantela s β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD ne utječe na intenzitet fluorescencije prazikvantela. Snimanjem emisijskih spektara otopina samih ciklodekstrina nisu uočeni maksimumi intenziteta na valnoj duljini od 286 nm. Pri valnoj duljini od 285 nm unutar emisijskih spektara koji potječu od ciklodekstrina i sustava otapala (metanol:voda = 20:80) vidljiv je signal koji ne potječe od fluorescentne emisije, već je posljedica Ramanovog raspršenja otapala. Na slici 14 prikazan je emisijski spektar otopine prazikvantela masene koncentracije $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na slici 15 prikazani su emisijski spektri otopine prazikvantela ($\gamma = 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), otopina β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD ($\gamma = 0,12 \text{ mg mL}^{-1}$) kao i kombinacija prazikvantela sa svim ciklodekstrinima.



Slika 14. Emisijski spektar otopine prazikvantela ($\gamma = 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

$\lambda_{\text{EX}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 286 \text{ nm}$, širine pukotina 5 nm



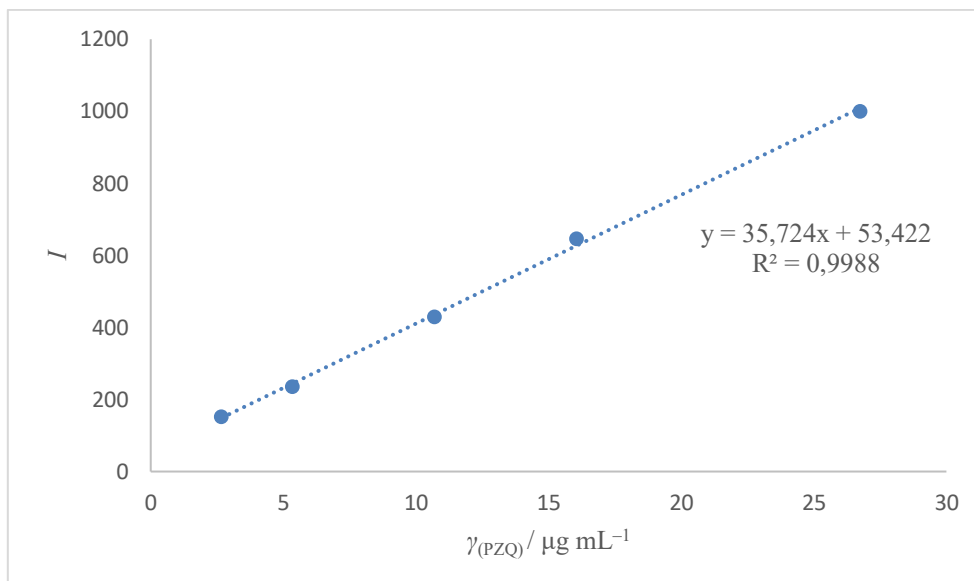
Slika 15. Emisijski spektri otopina prazikvantela ($\gamma = 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), ciklodekstrina ($\gamma = 0,12 \text{ mg mL}^{-1}$), kombinacija prazikvantela i ciklodekstrina te korištenog sustava otapala.

$\lambda_{\text{EX}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 286 \text{ nm}$, širine pukotina 5 nm

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je metoda specifična za spektrofluorimetrijsko određivanje prazikvantela u prisutnosti β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD.

4.1.2.2. Linearnost

Uočena je linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji prazikvantela u koncentracijskom rasponu $2,50 - 25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, pri valnoj duljini maksimuma emisije od 286 nm nakon pobude pri valnoj duljini od 260 nm . Na slici 16 prikazan je baždarni pravac konstruiran na osnovu mjerenja fluorescentne emisije pripremljenih standardnih otopina.



Slika 16. Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji prazikvantela

Jednadžba baždarnog pravca glasi $y = 35,724x + 53,422$, a koeficijent determinacije iznosi 0,9988. Konstruirani se baždarni pravac koristio za kvantitativno određivanje prazikvantela prilikom ispitivanja njegove topljivosti u prisutnosti ciklodekstrina.

4.1.2.3. Granice detekcije i kvantifikacije

Regresijskom analizom podataka za određivanje linearnosti metode i konstruiranog baždarnog pravca određene su granica detekcije i granica kvantifikacije. Granica detekcije, LOD, iznosi $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, a granica kvantifikacije, LOQ, iznosi $3,03 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Granice detekcije i kvantifikacije za spektrofluorimetrijsku metodu su niže od vrijednosti granica detekcije i kvantifikacije za UV/Vis spektrofotometrijsku metodu, što je pokazatelj da je ova metoda osjetljivija. Takvi rezultati su u skladu s očekivanjima.

4.1.2.4. Preciznost

a) Preciznost metode

Otopine tri koncentracijske razine pripremljene su po tri puta. Pomoću konstruiranog baždarnog dijagrama izračunate su točne koncentracije (analitički povrat) te je za svaku koncentracijsku razinu izračunata srednja vrijednost koncentracija, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (% RSD).

Tablica 12. Rezultati mjerenja dobiveni u svrhu određivanja preciznosti metode

	$\gamma(\text{PZQ}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	Intenzitet emisije	Analitički povrat	Prosječna vrijednost	SD	% RSD
1	2,50	142,62	2,4968	2,5581	0,0598	2,34
		146,89	2,6163			
		144,92	2,5612			
2	5,0	243,00	5,3068	5,3497	0,0746	1,39
		242,99	5,3065			
		247,62	5,4359			
3	15,0	636,35	16,3175	16,5434	0,1130	0,69
		640,22	16,4257			
		644,43	16,5434			

b) Preciznost instrumenta

Pripremljena su otopine tri koncentracijske razine. Provedeno je trostruko snimanje emisijskih spektara svake od njih. Na osnovu baždarnog pravca izračunate su točne koncentracije (analitički povrat), a preciznost instrumenta izražena je pomoću standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (% RSD) izračunatih koncentracija.

Tablica 13. Rezultati mjerenja dobiveni u svrhu određivanja preciznosti instrumenta

	$\gamma(\text{PZQ}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	Intenzitet emisije	Analitički povrat	Prosječna vrijednost	SD	% RSD
1	2,50	128,50	2,1015	2,1456	0,0385	1,79
		131,02	2,1722			
		130,70	2,1632			
2	5,0	214,82	4,5178	4,5544	0,0373	0,82
		216,07	4,5530			
		217,48	4,5924			
3	15,0	556,25	14,0753	14,1624	0,0790	0,56
		561,75	14,2292			
		560,09	14,1827			

c) Intermedijarna preciznost (međupreciznost)

Standardna otopine prazikvantela jedne koncentracijske razine pripremljena je tri dana za redom, te su snimljeni njihovi emisijski spektri. Točne koncentracije (analitički povrati) izračunate su pomoću baždarnog pravca, a intermedijarna preciznost izražena je preko standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (% RSD) tri mjerenja.

Tablica 14. Rezultati mjerenja dobiveni u svrhu određivanja intermedijarne preciznosti

	$\gamma(\text{PZQ}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	Intenzitet emisije	Analitički povrat	Prosječna vrijednost	SD	% RSD
1	2,50	140,33	2,4327	2,3494	0,0728	3,10
		135,53	2,2983			
		136,20	2,3172			

Na temelju utvrđenih vrijednosti relativnih standardnih devijacija, koje su se kretale u rasponu vrijednosti od 0,56 do 3,10 % možemo ustanoviti kako je validirana metoda precizna i prihvatljiva za korištenje u svrhu kvantitativnog određivanja prazikvantela. Dozvoljena gornja granica vrijednosti relativne standardne devijacije iznosi 5 %.

4.2. Probir

Prije ispitivanja utjecaja ciklodekstrina i organskih kiselina na topljivost prazikvantela u vodi provedeno je probiranje kako bi se dobio uvid u utjecaj pojedine komponente (binarni sustavi) ili kombinacija komponenti (ternarni sustavi) na topljivost prazikvantela .

Korištenjem validirane UV/Vis spektrofotometrijske i spektrofluorimetrijske metode utvrđeno je da svi ciklodekstrini višestruko poboljšavaju topljivost prazikvantela u vodi pri čemu je najveće poboljšanje topljivosti utvrđeno u slučaju korištenja RM- β -CD i SBE- β -CD, a najmanje u slučaju korištenja HP- β -CD.

Organske kiseline nisu pokazale pozitivan utjecaj na topljivost prazikvantela u vodi (binarni sustavi), a isto tako nisu dodatno poboljšale topljivost prazikvantela u prisutnosti ciklodekstrina (ternarni sustavi). Topljivost prazikvantela je u slučaju korištenja organskih kiselina u svim ispitanim kombinacijama bila slična ili čak nešto slabija.

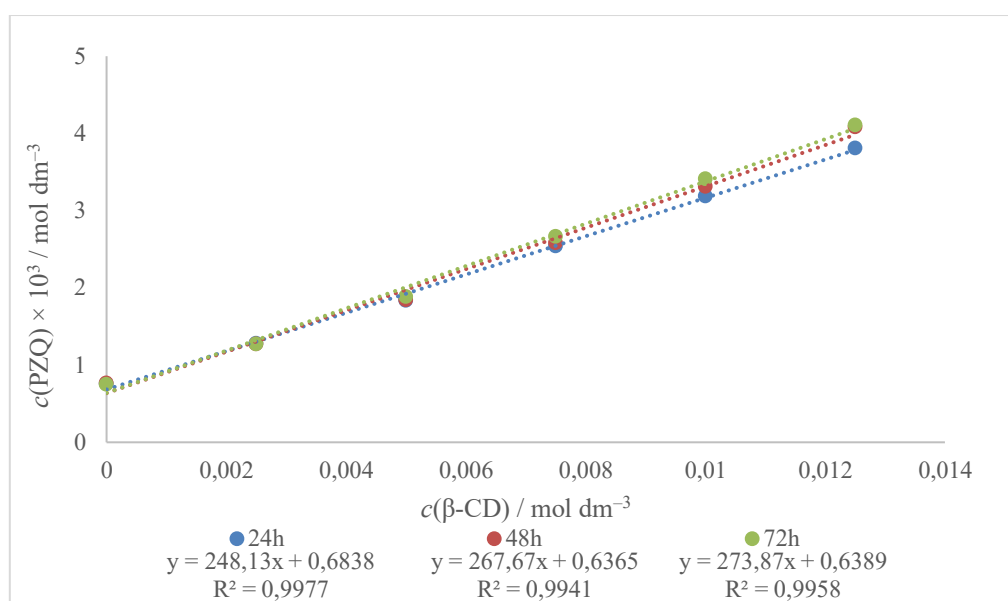
Na temelju utvrđenih rezultata odlučeno je da će se daljnja ispitivanja topljivosti prazikvantela u vodi provesti samo na binarnim sustavima prazikvantela i ciklodekstrina.

4.3. Određivanje topljivosti

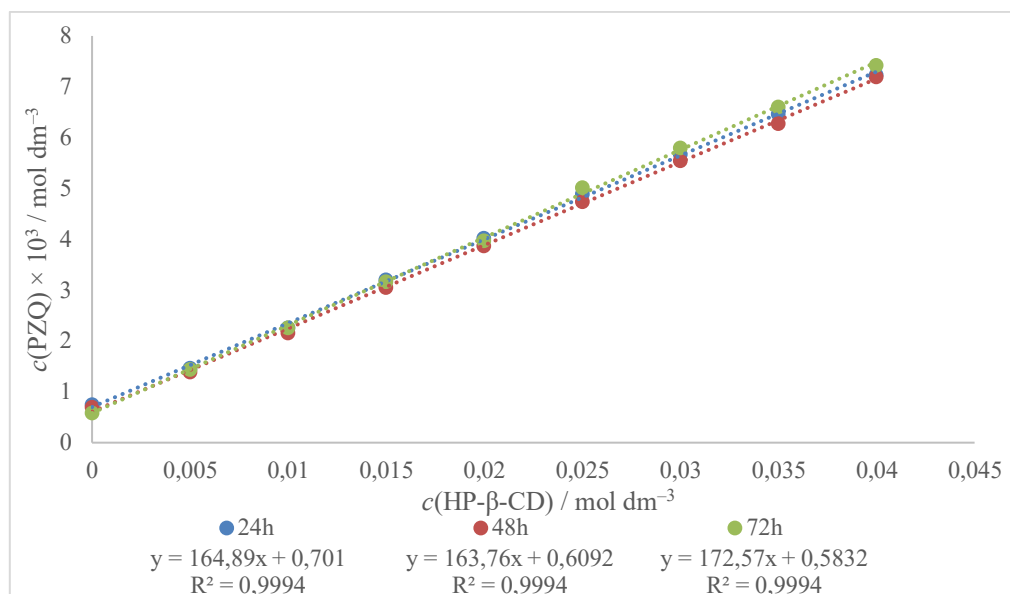
4.3.1. Određivanje topljivosti UV/Vis spektrofotometrijskom metodom

Prilikom ispitivanja topljivosti prazikvantela u prisutnosti β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD, na osnovu podataka dobivenih mjerenjem apsorbancije uzoraka pri utvrđenom apsorpcijskom maksimumu prazikvantela, izračunate su točne koncentracije prazikvantela u uzorcima. Konstruirani su dijagrami topljivosti prema Higuchiju i Connorsu i okarakterizirani su kao dijagrami tipa A s krivuljom ovisnosti A_L .

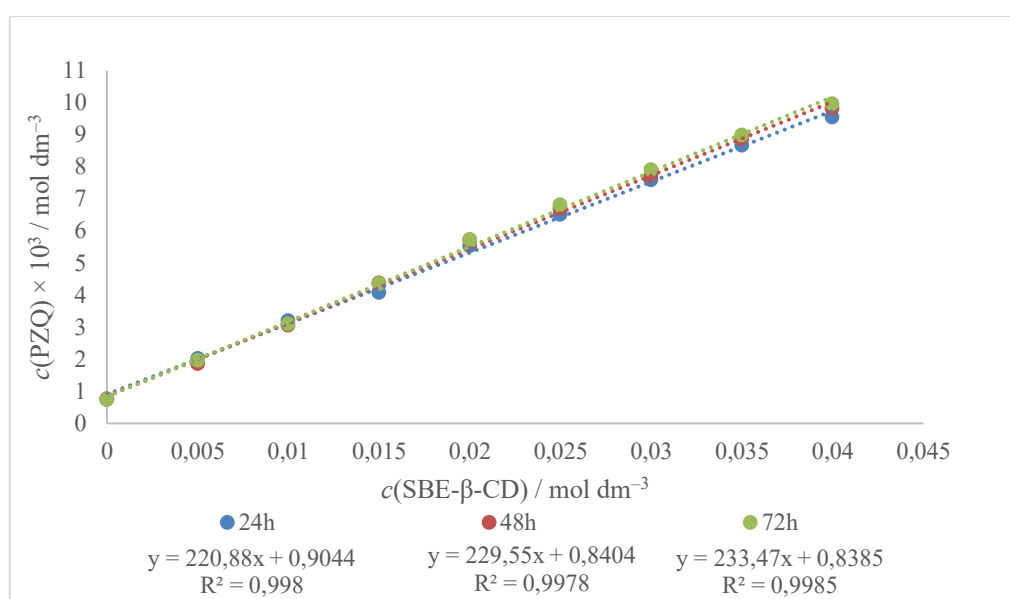
Na slikama 17, 18, 19 i 20 prikazani su dijagrami topljivosti ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji ciklodekstrina za svaki pojedini ciklodekstrin, konstruirani na osnovu kvantitativnog određivanja PZQ UV/Vis spektrofotometrijskom metodom 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija, s pripadajućim jednažbama pravaca i koeficijentima determinacije.



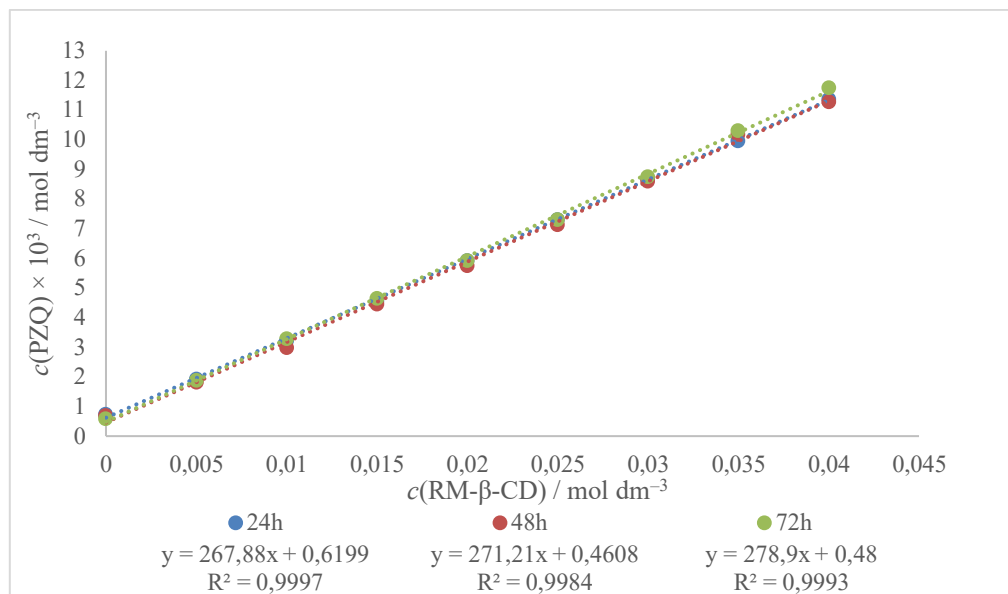
Slika 17. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija



Slika 18. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji HP- β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija



Slika 19. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji SBE- β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija



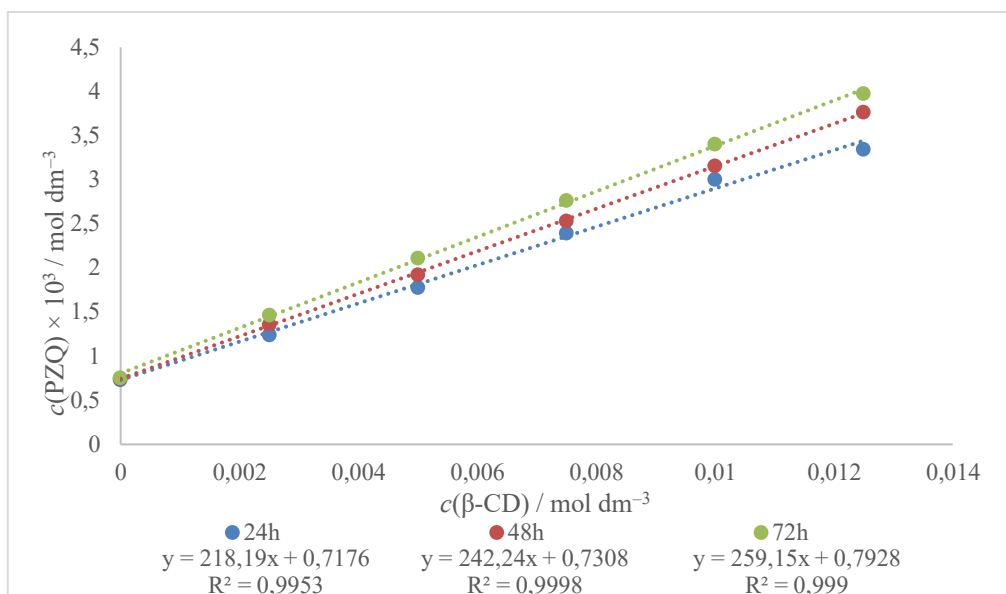
Slika 20. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji RM- β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija

Na osnovu konstruiranih dijagrama topljivosti može se zaključiti da je ravnoteža uspostavljena 24 h od pripreme suspenzija prazikvantela i ciklodekstrina u svim slučajevima, budući da se ovisnost koncentracije prazikvantela o koncentraciji ciklodekstrina bitno ne mijenja nakon 48 h, odnosno 72 h. Za izračun konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za svaki pojedini ciklodekstrin korišteni su podaci dobiveni mjerenjem 24 h od pripreme suspenzija.

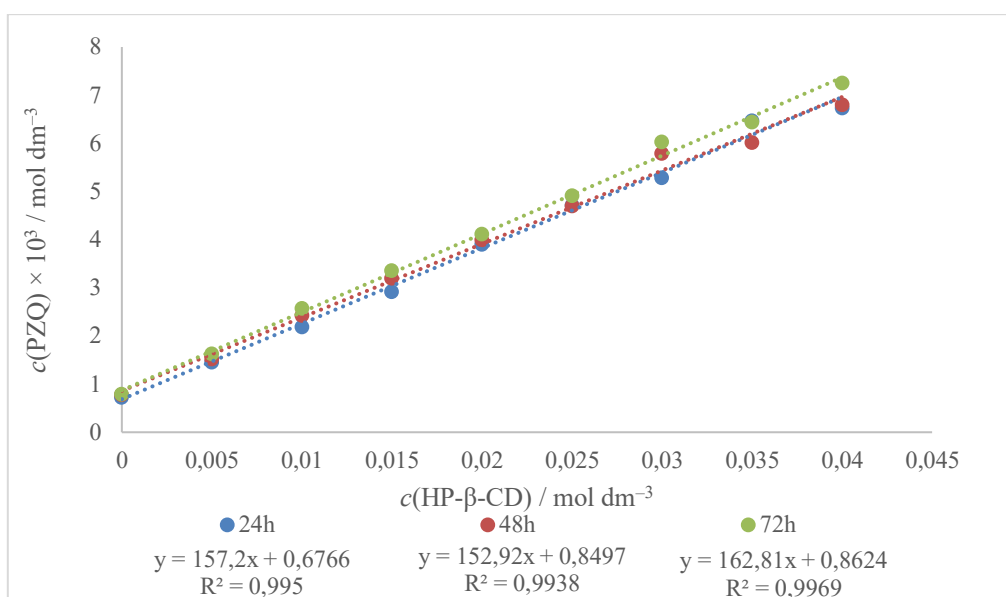
4.3.2. Određivanje topljivosti spektrofotometrijskom metodom

Na osnovu mjerenja intenziteta fluorescentne emisije uzoraka pri utvrđenom emisijskom maksimumu prazikvantela izračunate su točne koncentracije prazikvantela u otopinama u prisutnosti β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD. Jednako kao u slučaju određivanja topljivosti UV/Vis spektrofotometrijskom metodom, konstruirani su dijagrami topljivosti prema Higuchiju i Connorsu te su također okarakterizirani kao dijagrami tipa A s krivuljom ovisnosti A_L .

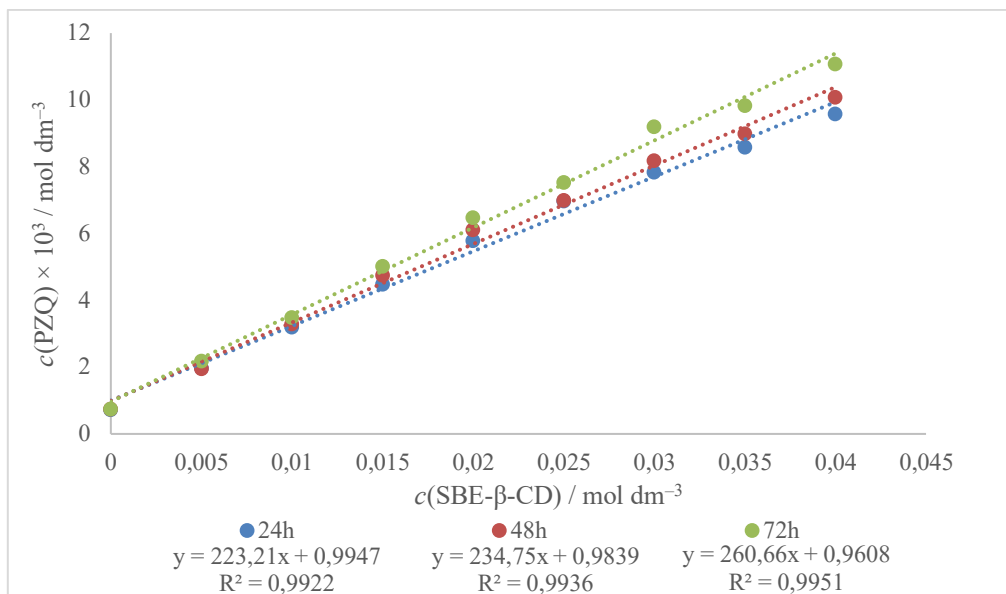
Na slikama 21, 22, 23 i 24 prikazani su dijagrami topljivosti ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji ciklodekstrina za svaki pojedini ciklodekstrin, konstruirani na temelju kvantitativnog određivanja PZQ spektrofotometrijskom metodom 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija. Za svaki od njih prikazana je jednadžba pravca i koeficijent determinacije.



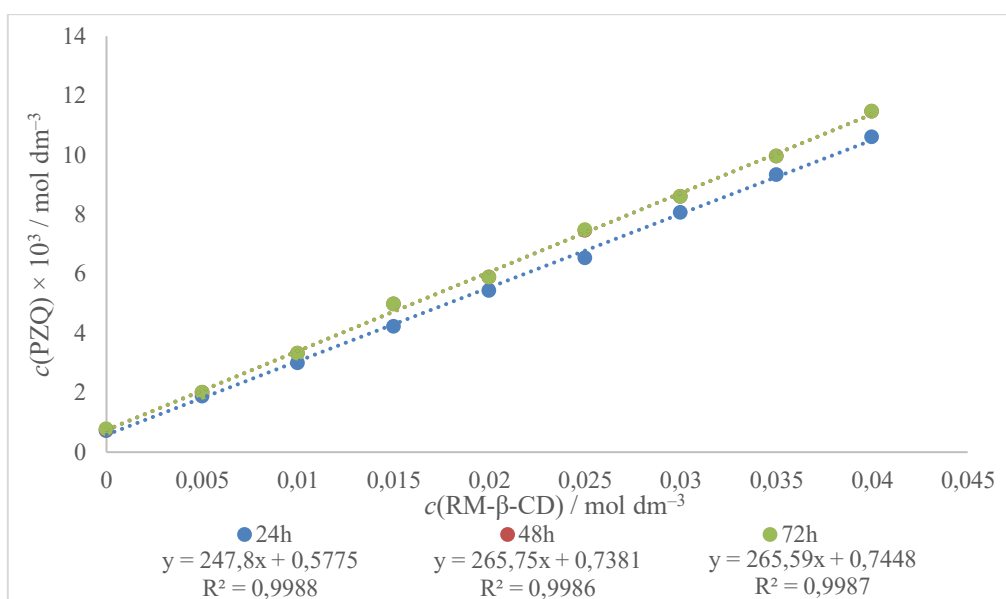
Slika 21. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija



Slika 22. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji HP- β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija



Slika 23. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji SBE- β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija



Slika 24. Dijagram ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji RM- β -CD, mjereno 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija

Usporedbom dijagrama topljivosti konstruiranih nakon spektrofluorimetrijskog kvantitativnog određivanja prazikvantela 24 h, 48 h i 72 h od pripreme suspenzija, ustanovljeno je da je ravnoteža postignuta 24 h od pripreme suspenzija uglavnom u svim ispitanim binarnim sustavima. Jedine značajnije razlike između mjerenja u različitim periodima od priprave

suspencija su primjetne za binarne sustave prazikvantela i β -CD te prazikvantela i SBE- β -CD. U svrhu određivanja konstante stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za svaki pojedini ciklodekstrin korišteni su podaci dobiveni 24 h od pripreme suspenzija kako bi se mogla napraviti usporedba s podacima dobivenim UV/Vis spektrofotometrijskom metodom.

4.4. Određivanje konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja

Korištenjem podataka izvedenih iz rezultata određivanja topljivosti prazikvantela UV/Vis spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom određene su konstante stabilnosti prema izrazu:

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

u kojem vrijednost S_0 označava eksperimentalno dobivenu intrinzičnu topljivost prazikvantela, a nagib predstavlja nagib linearnog dijagrama topljivosti (A_L tip dijagrama prema Higuchiju i Connorsu).

Efikasnost kompleksiranja računa se prema izrazu:

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

u kojoj nagib također predstavlja nagib linearnog dijagrama topljivosti.

U tablicama 15 i 16 prikazani su podaci eksperimentalno određenih intrinzičnih topljivosti S_0 , koja označava topljivost prazikvantela u odsutnosti ciklodekstrina, koncentracije prazikvantela pri najvećoj korištenoj koncentraciji ciklodekstrina, odnosno S_{\max} te izračunatih konstanti stabilnosti ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (CE).

Tablica 15. Eksperimentalne vrijednosti intrinzične topljivosti PZQ (S_0), maksimalne topljivosti PZQ (S_{max}), konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (CE), određene UV/Vis spektrofotometrijskom metodom

	β-CD	HP-β-CD	SBE-β-CD	RM-β-CD
$S_0 / \text{mmol L}^{-1}$	0,76	0,75	0,76	0,75
$S_{max} / \text{mmol L}^{-1}$	3,81	7,24	9,54	11,39
$K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{ L}$	436,92	264,64	375,34	491,14
CE	0,33	0,20	0,28	0,37

Tablica 16. Eksperimentalne vrijednosti intrinzične topljivosti PZQ (S_0), maksimalne topljivosti PZQ (S_{max}), konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (CE), određene spektrofluorimetrijskom metodom

	β-CD	HP-β-CD	SBE-β-CD	RM-β-CD
$S_0 / \text{mmol L}^{-1}$	0,72	0,71	0,72	0,71
$S_{max} / \text{mmol L}^{-1}$	3,35	6,74	9,57	10,61
$K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{ L}$	387,81	260,89	399,29	460,79
CE	0,28	0,19	0,29	0,33

Na osnovu rezultata dobivenih UV/Vis spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom, utvrđeno je da pretpostavljeni kompleks prazikvantela s RM- β -CD ima najveću vrijednost konstante stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja, što znači da je taj ciklodekstrin najviše povećao topljivost prazikvantela. Vrijednosti S_{max} , koje označavaju topljivost prazikvantela pri najvišoj koncentraciji ciklodekstrina, također ukazuju na to da je pretpostavljeno nastajanja kompleksa prazikvantela s RM- β -CD imalo najveći utjecaj na topljivost prazikvantela. Najmanji utjecaj na topljivost prazikvantela, odnosno najmanju konstantu stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja pokazao je pretpostavljeni kompleks prazikvantela s HP- β -CD.

Vrijednosti konstanti stabilnosti koje su određene UV/Vis spektrofotometrijskom metodom razlikuju se od onih određenih spektrofluorimetrijskom metodom, što se može pripisati različitim vrijednostima intrinzičnih topljivosti preko kojih se konstante definiraju. Intrinzična topljivost označava topljivost prazikvantela u odsutnosti ciklodekstrina, stoga bi one u pravilu trebale biti slične, bez obzira kojom se analitičkom metodom određuju. Te razlike u vrijednostima mogu biti posljedica razrjeđivanja i pripreme mjernih otopina za analizu te činjenicom da je spektrofluorimetrija kao analitička tehnika mnogo osjetljivija u usporedbi s UV/Vis spektrofotometrijom. Male eksperimentalne pogreške prilikom pripreme otopina mogu

uvelike utjecati na dobivene rezultate. Također, lipofilne molekule lijeka imaju tendenciju samoudruživanja, što također može utjecati na vrijednost S_0 .

Budući da su konstante stabilnosti osjetljive na male promjene S_0 , određene su i efikasnosti kompleksiranja za svaki od ciklodekstrina jer su te vrijednosti potpuno neovisne o vrijednosti S_0 . U tablicama 15 i 16 prikazane su vrijednosti efikasnosti kompleksiranja za svaki binarni sustav prazikvantela i ciklodekstrina te je vidljivo da ne postoje znatne razlike s obzirom na metodu kojom su određivane, osim onih za kompleks prazikvantela s β -CD, što može biti rezultat eksperimentalne pogreške prilikom pripreme mjernih otopina i snimanja uzoraka. Prema istraživanju koje su proveli Loftsson i suradnici, utvrđeno je da je u prosjeku efikasnost kompleksiranja za ciklodekstrine iznosila približno 0,30, pa se pretpostavlja da ciklodekstrini tvore kompleks s molekulama lijeka u omjeru 1:1. Na osnovu rezultata dobivenih ovim istraživanjem, efikasnosti kompleksiranja većinom su iznosile oko 0,30, osim za kompleks prazikvantela s HP- β -CD.

Prilikom pripreme suspenzija prazikvantela u prisutnosti ciklodekstrina, koncentracijski raspon β -CD iznosio je $0,0 - 12,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, što je mnogo manje u usporedbi s koncentracijskim rasponima za sve ostale ciklodekstrine, budući da je i topljivost β -CD u vodi ograničena i iznosi otprilike $0,016 \text{ mol dm}^{-3}$. Pri višim koncentracija ovaj ciklodekstrin nije topljiv, pa stoga ni vrijednost S_{\max} ne može biti veća od vrijednosti dobivenih ovim metodama. Za sve ostale ispitane ciklodekstrine, vrijednost S_{\max} višestruko je veća od vrijednosti S_0 , što je također pokazatelj da ciklodekstrini povećavaju topljivost prazikvantela u vodi.

U tablici 17 prikazane su vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja koje su određene UV/Vis spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom te su uspoređene s rezultatima iz diplomskog rada Petre Tagliaretti u kojem su analizirani identični sustavi, a količina prazikvantela određena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.²⁵

Tablica 17. Vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za svaki ciklodekstrin

	UV/Vis spektrofotometrija		Spektrofluorimetrija		HPLC	
	$K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{ L}$	CE	$K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{ L}$	CE	$K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{ L}$	CE
β-CD	436,92	0,33	387,71	0,28	442,22	0,32
HP-β-CD	264,64	0,20	260,89	0,19	251,01	0,18
SBE-β-CD	375,34	0,28	399,29	0,29	448,72	0,30
RM-β-CD	491,14	0,37	460,79	0,33	512,64	0,34

Prema podacima prikazanim u tablici 17 vidljivo je da su vrijednosti konstante stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za RM- β -CD, određene na osnovu mjerenja tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, također najveće, što je potvrda da je kompleks prazikvantela s tim ciklodekstrinom najstabilniji te pokazuje najveći utjecaj na topljivost prazikvantela. Najveća razlika između konstanti stabilnosti određenih ovim trima metodama jest ona za kompleks prazikvantela s β -CD i SBE- β -CD. Te razlike također se mogu pripisati različitim vrijednostima intrinzične topljivosti prazikvantela preko koje se konstanta definira, što može biti posljedica eksperimentalne pogreške prilikom mjerenja. Također, na vrijednost S_0 utječe i način pripreme mjernih otopina, budući da se one razlikuju za UV/Vis spektrofotometrijsko, spektrofluorimetrijsko i za određivanje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Na temelju toga, efikasnost kompleksiranja je eksperimentalna vrijednost koja je bolja mjera afiniteta prazikvantela za određeni ciklodekstrin, a iz dobivenih rezultata vidljivo je da se vrijednosti efikasnosti kompleksiranja podudaraju za kompleks prazikvantela s SBE- β -CD za sve tri metode. Slično vrijedi i za vrijednost efikasnosti kompleksiranja u slučaju β -CD i prazikvantela gdje se vrijednosti određene UV/Vis spektrofotometrijskom metodom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u velikoj mjeri podudaraju. Iznimka je vrijednost određene spektrofluorimetrijskom metodom koja je najvjerojatnije rezultat eksperimentalne pogreške. Sve ostale vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja se znatno ne razlikuju bez obzira na metodu kojom su određene. Vrijednosti konstante stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za HP- β -CD određene tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti također su niže u odnosu na ostale, što dodatno potvrđuje tvrdnju da je taj ciklodekstrin pokazao najmanji utjecaj na topljivost prazikvantela.

Dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti možemo usporediti s rezultatima iz dostupne literature kako bi se ispitalo njihovo međusobno slaganje. Objavljeno je nekoliko istraživanja na temu inkluzijskih kompleksa prazikvantela s β -CD i njegovim derivatima.

Becket i suradnici proučavali su interakcije prazikvantela s α -, β -, i γ -ciklodekstrinima i ustanovili su da je pretpostavljeni inkluzijski kompleks prazikvantela s β -CD najstabilniji.¹⁴ Međutim, dijagram topljivosti za prazikvantel i β -CD opisan je kao dijagram tipa B prema Higuchiju i Connorsu, s krivuljom ovisnosti B_s , što je uzrokovano širokim koncentracijskim rasponom β -CD u njihovom istraživanju ($3,0 - 40,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Vrijednost konstante stabilnosti za taj kompleks iznosila je $396,91 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, što je u slaganju s vrijednostima koje su dobivene u ovom istraživanju.

Konstanta stabilnosti za kompleks prazikvantela s β -CD, koju su eksperimentalno odredili Moura i suradnici, iznosila je $275,56 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ i ona se znatno razlikuje u odnosu na konstante stabilnosti za isti kompleks koje smo odredili UV/Vis spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom. U istom se radu ispitaio utjecaj ternarne komponente u obliku hidroksipropil metil celuloze (HPMC) na topljivost prazikvantela. Ona je dodatno poboljšala topljivost prazikvantela, a određena konstanta stabilnosti iznosila je $323,30 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Navodi se kako polimeri topljivi u vodi u obliku ternarnih komponenti mogu utjecati na hidrataciju i strukturu molekule CD u vodi, što vodi ka poboljšanju inkluzije molekule lijeka u centralnu šupljinu CD uslijed konformacijskih promjena molekula CD, kao i promjena u energijama van der Waalsovih interakcija, vodikovih veza i hidrofobnih interakcija.³¹

Također, Münster i suradnici proučavali su komplekse prazikvantela s HP- β -CD i SBE- β -CD te su odredili konstante stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za svaki od njih. Vrijednost konstante stabilnosti za kompleks prazikvantela s HP- β -CD iznosila je $228,71 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, odnosno $365,11 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ za kompleks prazikvantela s SBE- β -CD.³² Vrijednosti konstanti stabilnosti koje su odredili Münster i suradnici u dobrom su slaganju s konstantama stabilnosti određenim u ovom istraživanju. Efikasnost kompleksiranja za HP- β -CD iznosila je 0,16, odnosno 0,26 za SBE- β -CD, što je neznatna razlika u odnosu na vrijednosti dobivene u ovom istraživanju.

§ 5. ZAKLJUČAK

Svrha ovog istraživanja bila je odrediti utjecaj β -CD i njegovih derivata, HP- β -CD, SBE- β -CD i RM- β -CD, na topljivost prazikvantela u vodi. Prazikvantel se kvantitativno u uzorcima određivao UV/Vis spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom. Obje metode validirane su prema važećim ICH smjernicama. Ustanovljeno je da su metode specifične za određivanje prazikvantela u prisutnosti ciklodekstrina i da su dovoljno precizne, s postotcima relativne standardne devijacije manjim od 3. Metode su također pokazale linearnu ovisnost koncentracije prazikvantela o apsorbanciji, odnosno intenzitetu fluorescencije u velikim koncentracijskim rasponima, s dovoljno niskim granicama detekcije i kvantifikacije.

Utjecaj ciklodekstrina na topljivost prazikvantela proučavao se metodom analize poboljšanja topljivosti (solubilizacijskim ispitivanjima) koju su razvili Higuchi i Connors 1964. godine. Dobiveni dijagrami topljivosti ovisnosti koncentracije prazikvantela o koncentraciji ciklodekstrina bili su linearni, odnosno okarakterizirani su kao dijagrami tipa A prema Higuchiu i Connorsu, s krivuljom ovisnosti A_L . Na temelju njih određene su vrijednosti konstante stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za svaki pretpostavljeni kompleks prazikvantela s ciklodekstrinima. S obzirom na to da konstanta stabilnosti izravno ovisi o vrijednosti intrinzične topljivosti (S_0), čija je vrijednost varirala prilikom mjerenja, zaključeno je da je kao mjeru afiniteta prazikvantela za svaki od ciklodekstrina bolje koristiti vrijednost efikasnosti kompleksiranja, budući da ona ovisi samo o nagibu pravca dijagrama topljivosti.

Na osnovu dobivenih vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja, zaključeno je da je najveći utjecaj na topljivost prazikvantela pokazao kompleks prazikvantela s RM- β -CD, koji ima najveće vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja. Najmanje vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja pokazao je kompleks prazikvantela s HP- β -CD, što znači da je taj ciklodekstrin najmanje povećao topljivost prazikvantela. Prisutnost organskih kiselina u binarnim (s prazikvantelom) ili ternarnim sustavima (s prazikvantelom i ciklodekstrinima) nije pokazala povoljan utjecaj na topljivost prazikvantela.

Sve navedene vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja, određene na temelju mjerenja UV/Vis spektrofotometrijskom i spektrofluorimetrijskom metodom,

uspoređene su s vrijednostima iz diplomskog rada Petre Tagliaretti te je ustanovljeno da se u nekim slučajevima konstante stabilnosti razlikuju. Te razlike mogu se pripisati različitim vrijednostima intrinzičnih topljivosti na osnovu kojih se one računaju, odnosno različitoj pripremi mjernih otopina i upotrijebljenoj analitičkoj tehnici. Za razliku od konstanti stabilnosti, vrijednosti efikasnosti kompleksiranja dobivene ovim trima metodama pokazuju dobro slaganje.

Važno je naglasiti kako rezultati dobiveni analizom topljivosti u ovom radu nikako ne mogu biti definitivni dokaz o nastanku inkluzijskih kompleksa prazikvantela i navedenih ciklodekstrina. Budući da se NMR spektroskopija smatra jednom od najkorisnijih i najkompletnijih analitičkih tehnika za izučavanje ciklodekstrina s molekulama „gosta“ u otopini, provođenje takve analize bi bila izvrsna nadopuna rezultata prezentiranih u ovom diplomskom radu. Na taj način bismo dobili vrijedne informacije o strukturi pretpostavljenih inkluzijskih kompleksa u otopini, kao i o orijentaciji molekule prazikvantela u središnjoj šupljini ciklodekstrina.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

API – Aktivni farmaceutski sastojak (engl. *active pharmaceutical ingredient*)

β -CD – β -ciklodekstrin

BCS – Biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. *Biopharmaceutical classification system*)

CCD – engl. *charged-coupled device*

CD – Ciklodekstrin

CE – Efikasnost kompleksiranja

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

HP- β -CD – Hidroksipropil- β -ciklodekstrin

ICH – Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za ljudsku primjenu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)

$K_{1:1}$ – Konstanta stabilnosti

L – Ligand

LOD – Granica detekcije (engl. *detection limit*)

LOQ – Granica kvantifikacije (engl. *quantitation limit*)

PZQ – Prazikvantel

RM- β -CD – Nasumično metiliran- β -ciklodekstrin

RSD – Relativna standardna devijacija

S – Supstrat

SBE- β -CD – Sulfobutileter- β -ciklodekstrin

SD – Standardna devijacija

USFDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *United States Food And Drug Administration*)

UV/Vis – Ultraljubičasto/Vidljivo zračenje elektromagnetnog spektra

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/lijekovi> (datum pristupa 12. siječnja 2020.)
2. <https://www.adiva.hr/zdravlje/zanimljivosti-i-savjeti/pravila-ispravne-primjene-lijekova-koje-morate-znati/> (datum pristupa 12. siječnja 2020.)
3. G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, J. R. Crison, *Pharm Res.* **12** (1995) 413–420.
4. P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun J. Lee, *Asian J. Pharm. Sci.* **9** (2014) 304–316.
5. M. Cugovčan, J. Jablan, J. Lovrić, D. Cinčić, N. Galić, M. Jug, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137** (2017) 42–53.
6. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, T. Loftsson, *Molecules* **23** (2018) 1161.
7. A. Charalabidis, M. Sfouni, C. Bergström, P. Macheras, *Int. J. Pharm.* **566** (2019) 264–281.
8. <http://struna.ihjj.hr/naziv/biorasplozivost/35628/> (datum pristupa 21. siječnja 2020.)
9. H. V. Chavda, C. N. Patel, I. S. Anand, *Syst. Rev. Pharm.* **1** (2010) 62–69.
10. A. K. Shukla, R. S. Bishnoi, S. K. Dev, M. Kumar, V. Fenin, *Adv. Pharm. J.* **2** (2017) 204–209.
11. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 1–10.
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4891> (datum pristupa 21. siječnja 2020.)
13. N. Vale, M. J. Gouveia, G. Rinaldi, P. J. Brindley, F. Gärtner, J. M. Correia da Costa, *Antimicrob. Agents Chemother.* **61** (2017) 1–16.
14. G. Becket, L. J. Schep, M. Y. Tan, *Int. J. Pharm.* **179** (1999) 65–71.
15. A. A. Akasha, M. A. Elwahedi, A. M. Eldeeb, *PharmaTutor* **2** (2014) 40–46.
16. T. Loftsson, D. Duchêne, *Int. J. Pharm.* **329** (2007) 1–11.
17. J. Zhou, H. Ritter, *Polym. Chem.* **1** (2010) 1552–1559.
18. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607–1621.
19. G. Crini, S. Fourmentin, É. Fenyvesi, G. Torri, M. Fourmentin, N. Morin-Crini, *Environ. Chem. Lett.* **16** (2018) 1361–1375.
20. M. E. Brewster, T. Loftsson, *Adv. Drug Delivery Rev.* **59** (2007) 645–666.

21. V. R. Preedy, R. R. Watson, C. R. Martin (ur.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*, Vol. 1, Springer, New York, 2011, str. 99–118.
22. S. V. Kurkov, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **453** (2013) 167–180.
23. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 272–284.
24. C. N. Reilley (ur.), *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, Vol. 4, Interscience publishers, New York, 1965, str. 117–212.
25. M. Jug, *Ciklodekstrini u mukoadhezivnim mikročesticama lorazepam i risperidona*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 21.
26. J. Jablan, *Oblikovanje i vrednovanje ciklodekstrinskih terapijskih sustava za oralnu primjenu Zaleplona*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 28.
27. S. S. Jambhekar, P. Breen, *Drug discovery today* **21** (2016) 363–368.
28. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, 2014, str. 649–770.
29. S. Miljanić, N. Galić, *Viši praktikum analitičke kemije 1, Interna skripta za studente Diplomskog sveučilšnog studija Kemija, smjer: istraživački*, Zagreb, 2018, str. 17–19.
30. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology Q2 (R1)* (2005)
31. L. C. da Silva Mourão, D. R. M. Ribeiro Batista, S. B. Honorato, A. P. Ayala, W. de Alencar Morais, E. G. Barbosa, F. N. Raffin, T. F. A. de Lima e Moura, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **85** (2016) 151–160.
32. M. Münster, A. H. A. Mohamed-Ahmed, L. I. Immohr, C. Schoch, C. Schmidt, C. Tuleu, J. Breitkreutz, *Int. J. Pharm.* **529** (2017) 310–318.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Tena Matijević

Datum rođenja: 30.12.1994.

Mjesto rođenja: Vinkovci

Obrazovanje

- | | |
|-----------|---|
| 2001–2009 | Osnovna škola August Cesarec, Ivankovo |
| 2009–2013 | Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci |
| 2013–2017 | Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Odjel za Kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek |
| 2017–2020 | Diplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |