



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marijana Pocrnić

**UTJECAJ β -CIKLODEKSTRINA I NJEGOVIH
DERIVATA NA TOPLJIVOST I STABILNOST
LORATADINA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marijana Pocnić

INFLUENCE OF β -CYCLODEXTRIN AND ITS DERIVATIVES ON THE SOLUBILITY AND STABILITY OF LORATADINE

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2026

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

Doktorski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom "Priprava, karakterizacija i biokompatibilnost novih supramolekulskih kompleksa lijek/ciklodekstrin i lijek/dekstrinske nanospužve s poboljšanim svojstvima (IP-2022-10-6033)

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Galić na pruženoj prilici, potpori i strpljenju tijekom izrade ovog doktorskog rada. Neizmjereno sam zahvalna na prenesenom znanju, vodstvu i dragocjenim savjetima, ne samo tijekom izrade doktorskog rada, već i u svakodnevnom radu na Zavodu za analitičku kemiju, koji su uvelike pridonijeli mom stručnom i osobnom razvoju.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. sc. Mariju Jugu na savjetima, pomoći i podršci tijekom izrade ovoga rada.

Također se zahvaljujem svojim kolegama sa Zavoda za analitičku kemiju na poticajnom i ugodnom radnom okruženju, a osobito Davidu Klariću na savjetima i lijepoj atmosferi u uredu.

Od srca hvala i svim mojim prijateljima, a posebno Ines, koji su uvijek bili uz mene, spremni saslušati i pružiti potporu u teškim trenucima.

Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji koja mi je bila neiscrpna podrška tijekom cijelog studiranja, a još veće hvala mojem Vjeki koji je svojom ljubavlju, strpljenjem i razumijevanjem bio moja stalna snaga i oslonac.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Slabo topljivi lijekovi	2
2.1.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije lijekova.....	3
2.1.2. Strategije poboljšanja topljivosti slabo topljivih lijekova.....	4
2.2. Ciklodekstrini	5
2.3. Inkluzijski kompleksi s ciklodekstrinima	8
2.3.1. Utjecaj ciklodekstrina na topljivost lijekova.....	9
2.3.2. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost lijekova	12
2.3.3. Načini pripreme inkluzijskih kompleksa	15
2.3.4. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa u otopini	18
2.3.5. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju	20
2.4. Validacija analitičkih postupaka	23
2.5. Loratadin	25
2.5.1. Inkluzijski kompleksi loratadina i ciklodekstrina.....	25
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. Kemikalije i materijali.....	29
3.1.1. Priprema simuliranih biorelevantnih medija.....	30
3.2. Metode karakterizacije.....	30
3.2.1. Solubilizacijska istraživanja	30
3.2.2. Spektrometrija masa visokog razlučivanja	33
3.2.3. Priprema binarnih sustava loratadina i ciklodekstrina u čvrstom stanju.....	34
3.2.4. Karakterizacija binarnih sustava u čvrstom stanju.....	35
3.2.5. Određivanje zasićene topljivosti loratadina i pripremljenih binarnih sustava.....	36
3.2.6. Određivanje brzine in vitro otapanja LOR u pripremljenim binarnim sustavima	36
3.2.7. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina	38
3.2.1.1. Razvoj i validacija metode analize LOR u prisutnosti razgradnih produkata.....	38
3.2.1.2. Prisilna razgradnja loratadina	40
3.2.1.3. Analiza razgradnih produkata spektrometrijom masa visokog razlučivanja	41

3.2.1.4. Fotostabilnost loratadina.....	41
3.2.1.5. Studije ubrzane razgradnje loratadina	42
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	43
4.1. Utjecaj ciklodekstrina na topljivost loratadina	43
4.2. Spektrometrija masa visokog razlučivanja.....	47
4.3. Priprema i karakterizacija binarnih sustava loratadina i ciklodekstrina u čvrstom stanju	56
4.3.1. Priprava binarnih sustava mljevenjem	56
4.3.1.1. Optimizacija mljevenja i priprava binarnih sustava LOR:HP- β -CD	56
4.3.1.2. Priprava binarnih sustava LOR: β -CD.....	61
4.3.1.3. Priprava binarnih sustava LOR:RM- β -CD.....	64
4.3.1.4. Priprava binarnih sustava LOR:SBE- β -CD	66
4.3.2. Priprava binarnih sustava sušenjem raspršivanjem	69
4.3.3. Profili in vitro otapanja loratadina i pripremljenih binarnih sustava s ciklodekstrinima.....	74
4.3.4. Zasićena topljivost loratadina i pripremljenih binarnih sustava.....	81
4.4. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina.....	82
4.4.1. Prisilna razgradnja loratadina bez i u prisutnosti ciklodekstrina	83
4.4.2. Analiza razgradnih produkata spektrometrijom masa visokog razlučivanja.....	87
4.4.3. Analiza razgradnih produkata tandemnom spektrometrijom masa visoko razlučivanja	93
4.4.4. Utjecaj ciklodekstrina na fotostabilnost loratadina.....	113
4.4.5. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina u uvjetima ubrzane razgradnje	116
§ 5. ZAKLJUČAK	118
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	120
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	122
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	LI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

UTJECAJ β -CIKLODEKSTRINA I NJEGOVIH DERIVATA NA TOPLJIVOST I STABILNOST LORATADINA

Marijana Pocrnić

Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000
Zagreb, Hrvatska

Loratadin (LOR) je antihistaminik druge generacije slabo topljiv u vodi. Istražen je utjecaj β -ciklodekstrina i njegovog hidroksipropiliranog, nasumično metiliranog i sulfoalkiliranog derivata na topljivost loratadina u vodi i simuliranim intestinalnim i duodenalnim uvjetima. Binarni sustavi loratadina i navedenih ciklodekstrina (CD) također su u otopini analizirani spektrometrijom masa. U čvrstom stanju pripremljeni su mljevenjem i sušenjem raspršivanjem u omjerima LOR:CD 1:1 i 1:2 i okarakterizirani različitim analitičkim tehnikama (DSC, PXRD, FT IR). Istraživanja *in vitro* otapanja provedena su u simuliranom intestinalnom mediju. U odabranim sustavima određena je stabilnost loratadina pri uvjetima prisilne i ubrzane razgradnje te fotostabilnost. Razgradnim produktima predložene su strukture na temelju MS/MS analize. Svi ciklodekstrini povećavaju topljivost loratadina i utječu na profil *in vitro* otapanja u simuliranom intestinalnom mediju. Ciklodekstrini ne utječu značajno na stabilnost loratadina te pokazuju potencijal za razvoj novih formulacija lijeka s poboljšanim svojstvima.

(128 + LVII stranica, 78 + D10 slika, 26 + D34 tablica, 148 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

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

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Rad prihvaćen: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Željka Soldin
2. prof. dr. sc. Sandra Babić
3. izv. prof. dr. sc. Jasna Jablan



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

INFLUENCE OF β -CYCLODEXTRIN AND ITS DERIVATIVES ON THE SOLUBILITY AND STABILITY OF LORATADINE

Marijana Pocrnić

Department of Chemistry, Faculty of Science of University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000
Zagreb, Croatia

Loratadine (LOR) is a second-generation antihistaminic with low solubility in water. The effect of β -cyclodextrin and its hydroxypropylated, randomly methylated, and sulfoalkylated derivatives on loratadine solubility in water and simulated intestinal and duodenal media was studied. Binary systems of loratadine and cyclodextrins (CDs) were also analysed in solution by mass spectrometry. Solid-state samples were prepared by grinding and spray-drying in ratio LOR:CD 1:1 and 1:2, and characterized by various analytical techniques (DSC, PXRD, FT IR). *In vitro* dissolution studies in simulated intestinal medium were performed. Loratadine stability under forced and accelerated conditions, as well as photostability, was studied on the selected systems. Structures of observed degradation products were proposed based on the MS/MS analysis. All cyclodextrins enhance the loratadine solubility and effect its *in vitro* dissolution profile. Cyclodextrins have no significant effect on loratadine stability, therefore they show potential for developing new drug formulations with enhanced properties.

(128 + LVII pages, 78 + D10 figures, 26 + D34 tables, 148 references, original in Croatian)

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

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

Supervisor: Dr. Nives Galić, Full Professor

Thesis accepted: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Reviewers:

Dr. Željka Soldin, Full Professor
Dr. Sandra Babić, Full Professor
Dr. Jasna Jablan, Associate Professor

§ 1. UVOD

Slaba topljivost farmaceutika jedan je od glavnih izazova pri razvoju novih lijekova, budući da je otprilike 70 % novih kandidata za lijekove te 40 % lijekova na tržištu klasificirano kao slabo topljivo. Slaba topljivost lijekova utječe na brzinu oslobađanja lijeka u organizmu što uzrokuje lošu bioraspoloživost i povećanje doze lijeka. Stoga je od velikog interesa razvijanje različitih strategija poboljšanja topljivosti lijekova, kao što su kristalne modifikacije, amorfizacija te korištenje raznih nosača, kao što su ciklodekstrini.¹

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji se sastoje od hidrofobne šupljine i hidrofilne vanjske površine. Zbog svoje strukture koja sliči krnjem stošcu, mogu graditi inkluzijske komplekse s različitim spojevima, čime mogu utjecati na fizikalno-kemijska svojstva tih spojeva, kao što su topljivost i stabilnost.² Zbog sposobnosti povećanja topljivosti lijekova, a time i njihove bioraspoloživosti, ciklodekstrini su od velikog interesa pri razvoju novih farmaceutskih formulacija.³

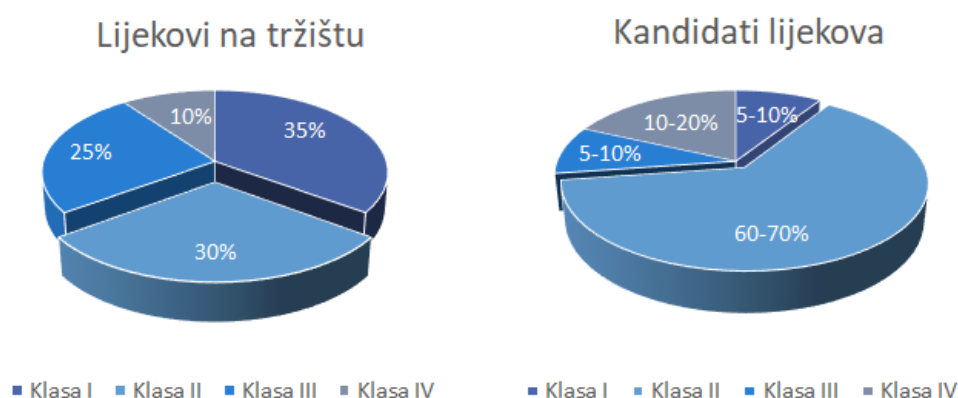
Loratadin je antihistaminik druge generacije koji se koristi za ublažavanje simptoma alergijskog rinitisa.⁴ Loratadin je slaba baza, čija je vrijednost pK_a u rasponu 4,85 – 6,00. Zbog slabe topljivosti, od velikog su interesa istraživanja poboljšanja topljivosti loratadina, uključujući i kompleksiranje s ciklodekstrinima.^{4,5}

U okviru ovog rada istražen je utjecaj β -ciklodekstrina i njegovih derivata (hidroksipropil- β -ciklodekstrin, nasumično metilirani β -ciklodekstrin te alkilsulfonirani β -ciklodekstrin) na topljivost loratadina u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima. Nadalje, pripremljeni su binarni sustavi loratadina i navedenih ciklodekstrina u čvrstom stanju mljevenjem i sušenjem raspršivanjem, te okarakterizirani raznim analitičkim tehnikama. Također je istražen i utjecaj ciklodekstrina na brzinu *in vitro* otapanja loratadina. Odabranim sustavima sa poboljšanim svojstvima istražen je utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina prilikom prisilne razgradnje i pri uvjetima ubrzane razgradnje, kao i fotostabilnost. Rezultati dobiveni u ovome radu daju detaljan uvid u mehanizam nastajanja inkluzijskih kompleksa loratadina i ciklodekstrina, te time omogućuju razvijanje novih formulacija poboljšanih svojstava.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Slabo topljivi lijekovi

Zadnjih nekoliko desetljeća u razvoju novih djelatnih tvari sve se više koriste inovativne računalne metode, kojima se na temelju podataka o jakim hidrofobnim interakcijama između lijeka i receptora predlažu novi kandidati za visokoučinkovite lijekove. Međutim, veliki nedostatak ovakvog pristupa je često loša topljivost novo razvijenih lijekova.⁶ U proteklom desetljeću je više od 70 % kandidata za nove lijekove, te 40 % lijekova na tržištu, klasificirano kao slabo topljivo (slika 1).⁷



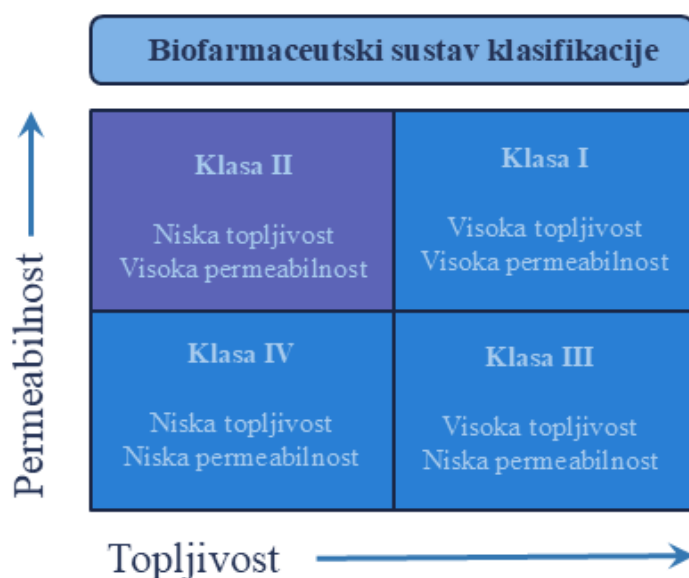
Slika 1. Podjela lijekova na tržištu i kandidata za nove lijekove prema skupinama biofarmaceutskog sustava klasifikacije, gdje slabo topljivi lijekovi pripadaju skupinama II i IV⁸

Niska topljivost farmaceutika predstavlja jedan od glavnih problema pri razvoju novih lijekova i formulacija. Razvoj formulacija za oralnu primjenu od velikog je interesa u farmaceutskoj industriji budući da je ovaj način primjene aktivne tvari ekonomski isplativ, prihvatljiv pacijentima zbog jednostavnosti primjene, te omogućuje fleksibilnost doziranja. Međutim, glavni nedostatak je moguća niska bioraspoloživost uzrokovana slabom topljivosti ili permeabilnosti djelatne tvari.⁸ U tom slučaju potrebno je povećati dozu aktivne tvari kako bi se osigurala dovoljna koncentracija u plazmi, što može uzrokovati toksičnost ili probleme pri proizvodnji, kao što su narušena svojstva formulacije ili povećanje troškova proizvodnje.¹

2.1.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije lijekova

Biofarmaceutski sustav klasifikacije lijekova (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS) je sustav koji se koristi za klasifikaciju lijekova na temelju njihove topljivosti i permeabilnosti. Visokom permeabilnošću smatra se kada je apsorbirano barem 90 % primijenjene doze, a dobrom topljivošću kada je najveća primijenjena doza aktivne tvari otopljena u 250 mL (ili manje) vodene otopine u rasponu pH-vrijednosti 1 – 7,5 pri 37 °C.^{1,9}

Prema sustavu BCS, lijekovi su podijeljeni u četiri skupine, gdje u prvu skupinu pripadaju lijekovi dobre topljivosti i visoke permeabilnosti, u drugu skupinu pripadaju lijekovi slabe topljivosti i visoke permeabilnosti, u treću lijekovi dobre topljivosti i niske permeabilnosti, a u četvrtu skupinu pripadaju lijekovi slabe topljivosti i niske permeabilnosti (slika 2).¹ Ove četiri skupine predstavljaju četiri mogućnosti *in vitro-in vivo* korelacije (engl. *in vitro-in vivo correlation*, IVIVC), te se stoga sustav BCS može koristiti za predviđanje *in vivo* farmakokinetičkih svojstava lijeka, na temelju njegove permeabilnosti i topljivosti.^{9,10}



Slika 2. Biofarmaceutski sustav klasifikacije lijekova

Biofarmaceutski sustav klasifikacije priznat je od strane regulatornih agencija poput Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA), Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) i Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), te omogućuje korištenje rezultata ispitivanja brzine *in vitro* otapanja kako bi se odredila bioekvivalencija lijeka, te izbjegli skupi i dugotrajni *in vivo* eksperimenti.^{1,10}

2.1.2. *Strategije poboljšanja topljivosti slabo topljivih lijekova*

Budući da niska topljivost potencijalnih lijekova može značajno utjecati na svojstva i pripremu farmaceutskih formulacija, od značajnog je interesa razvijanje strategija poboljšanja topljivosti potencijalnih lijekova. Postoje različiti načini na koje se može povećati topljivost lijekova, a mogu se podijeliti na kemijske i fizikalne modifikacije. Osim različitih modifikacija, moguće su i promjene u načinu primjene.^{7,8,11}

Kemijske modifikacije uključuju prevođenje aktivne tvari u sol te sintezu predliješkova. Budući da bazične ili kisele djelatne tvari imaju manju topljivost u vodi od njihovih soli, jedna od najčešćih strategija poboljšanja topljivosti je uvođenje protuiona te prevođenje djelatne tvari u sol.¹² Drugi način kemijskih modifikacija je sinteza predliješkova, neaktivnih spojeva koji se kemijski ili enzimski prevode u biološki aktivne spojeve. Strategije sinteze predliješkova uključuju uvođenje polarnih skupina, kao što su fosfati ili esteri, ili uvođenje promjena u kristalnu strukturu lijeka.¹³

Fizikalne modifikacije uključuju kristalne modifikacije, poput prevođenja aktivne tvari u metastabilne polimorfe ili kokristale te morfološke promjene poput smanjenja veličine čestica lijeka.^{1,14} Kokristali su višekomponentni sustavi koji se sastoje od aktivne djelatne tvari i farmaceutski prihvatljivih tvari koje su povezane nekovalentnim interakcijama. Od velikog su interesa u farmaceutskoj industriji budući da mogu poboljšati svojstva djelatne tvari, poput topljivosti.^{15,16} Budući da topljivost aktivne tvari ovisi i o morfološkim svojstvima čestica, smanjenje veličine čestica također može značajno povećati topljivost zbog povećanja površine u doticaju s otapalom. Stoga je usitnjavanje materijala, najčešće upotrebom mlina, jedna od često korištenih strategija za poboljšanje topljivosti. Međutim, zbog moguće aglomeracije čestica, nekad je nužna i upotreba surfaktanta za povećanje efektivne površine.¹ Uporabom homogenizatora pod visokim tlakom i kontrolirane precipitacije, moguće je dobivanje nanokristala koji se potom dispergiraju u inertne nosače te se time dobiju kristalne nanosuspenzije poboljšanih svojstava.¹

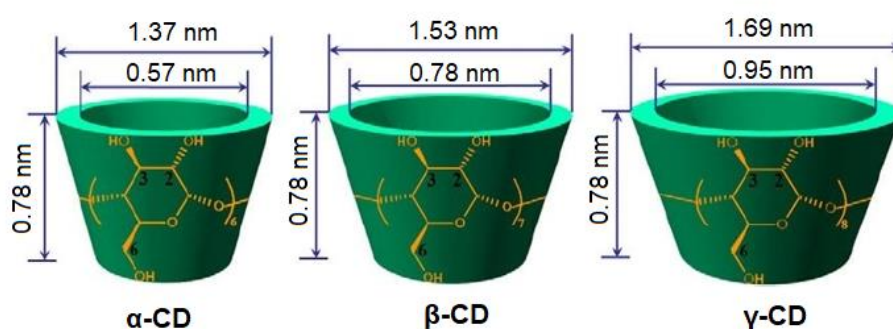
Osim kristalnih modifikacija i smanjenja veličine čestica, od velikog je interesa i korištenje različitih nosača. Primjerice, u čvrstim disperzijama aktivna tvar u čvrstom stanju dispergira se u hidrofilnom i neaktivnom nosaču ili matrici.¹⁷ Primjeri čvrstih disperzija su eutektične smjese, čvrste otopine i amorfni precipitati u kristalnom nosaču.¹⁸ Uporabom surfaktanta u vodenim otopinama nastaju micele koje mogu u svoju lipofilnu unutrašnjost uklopiti djelatnu tvar te joj na taj način povećati topljivost.¹⁹ Relativno nova metoda poboljšanja topljivosti zasniva se na

tehnologiji samo-emulzificirajućih sustava za isporuku lijekova (engl. *self-emulsifying drug delivery systems*, SEDDS), vrsti lipidnih sustava s aktivnom tvari koji se emulzificiraju u gastrointestinalnom traktu.¹⁹ Još jedan potencijalni nosač su ugljikove nanocijevi, koje mogu u svoju unutrašnjost uklopiti male molekule, ili mogu pomoću funkcijskih skupina na svojoj površini vezati različite molekule.^{20,21}

Metaloorganske mreže (engl. *metal-organic frameworks*, MOF) imaju potencijalnu primjenu pri razvoju novih formulacija s poboljšanim svojstvima. To su porozni sustavi koji se sastoje od organskih liganada i metalnih iona ili metalnih kompleksa povezanih u dvodimenzijske ili trodimenzijske mreže.^{20,22}

2.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi koji se dobivaju iz škroba pomoću enzima CD glikoziltransferaze. Prirodni ciklodekstrini sastoje se od šest (α -CD), sedam (β -CD), odnosno osam (γ -CD) D-glukoznih podjedinica, međusobno povezanih α -1,4-glikozidnom vezom. Strukturu nalikuju na krnji stožac gdje se na užem obodu nalaze primarne, a na širem obodu sekundarne hidroksilne skupine. Ovakva struktura uzrokuje hidrofilnu vanjsku površinu ciklodekstrina i hidrofobnu unutrašnjost šupljine, što omogućuje uklapanje različitih molekula u šupljinu i stvaranje inkluzijskih kompleksa.^{23–26} Na slici 3 prikazane su strukture prirodnih ciklodekstrina α -CD, β -CD i γ -CD.



Slika 3. Strukture i dimenzije prirodnih ciklodekstrina²⁵

Prirodni ciklodekstrini, osim u veličini centralne šupljine razlikuju se i u topljivosti (tablica 1). Iako svi prirodni ciklodekstrini imaju ograničenu topljivost, ovaj efekt je posebno izražen kod β -CD. Zbog intramolekulskih veza između susjednih C2 i C3 atoma dolazi do nastajanja tzv. sekundarnog pojasa što utječe na rigidnost strukture i smanjuje mogućnost nastajanja vodikovih

veza s molekulama otapala. Za razliku od β -CD, α -CD nema potpuni sekundarni pojas, a γ -CD nema koplanarnu strukturu, što objašnjava njihovu veću topljivost naspram β -CD.^{2,24}

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih ciklodekstrina^{2,23}

	α -CD	β -CD	γ -CD
Broj glukopiranoznih podjedinica	6	7	8
Promjer unutarnje šupljine / Å	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Broj donora vodikove veze	18	21	24
Broj akceptora vodikove veze	20	35	40
Topljivost pri 25 °C / mg mL ⁻¹	145	18,5	232
Molarna masa / g mol ⁻¹	972,84	1134,98	1297,12

Kako bi se povećao solubilizacijski potencijal ciklodekstrina, primjenjuju se i njihovi derivati, gdje su sekundarne i/ili primarne hidroksilne skupine zamijenjene raznim funkcijskih skupinama. Time se povećavaju interakcije s molekulama otapala te se posljedično povećava i topljivost više od 100 puta. U farmaceutskoj industriji od velikog su značaja nasumično metilirani, hidroksipropilirani te sulfobutileter ciklodekstrini.^{23,26} U tablici 2 prikazana su fizikalno-kemijska svojstva β -CD i njegovih derivata: nasumično metiliranog β -CD (engl. *randomly methylated β -CD*, RM- β -CD), 2-hidroksipropil β -CD (engl. *2-hydroxypropyl β -CD*, HP- β -CD) i natrijeve soli sulfobutil eter β -CD (engl. *sulfobutyl ether sodium salt β -CD*, SBE- β -CD) koji su korišteni u ovom radu.

Tablica 2. Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava β -CD i nekih njegovih derivata²

	β -CD	HP- β -CD	RM- β -CD	SBE- β -CD
Supstituent	-H	-CH ₂ CHOHCH ₃	-CH ₃	-(CH ₂) ₄ SO ₃ Na
Stupanj supstitucije	0	2,8 – 10,5	9,7 – 13,6	6,2 – 6,9
Promjer unutarnje šupljine / Å	6,0 – 6,5	6,0	-	-
Broj donora vodikove veze	21	25	9	21
Broj akceptora vodikove veze	35	39	35	35
Topljivost pri 25 °C / mg mL ⁻¹	18,5	>1200	>500	>1200

Derivati prirodnih ciklodekstrina su amorfne smjese s različitim stupnjevima supstitucije (engl. *degree of substitution*, DS) što znatno utječe na njihova svojstva i mogućnost nastajanja inkluzijskih kompleksa. Primjerice, RM- β -CD ima najveću topljivost kada mu je stupanj supstitucije 14.²⁷ Stupanj supstitucije također može utjecati na solubilizacijski potencijal derivata ciklodekstrina. Malaga i sur. istražili su utjecaj stupnja supstitucije HP- β -CD na topljivost nekoliko spojeva. Uočeno je da povećanje ili smanjenje topljivosti spojeva u prisutnosti različito supstituiranih HP- β -CD ovisi i o strukturama ispitivanih spojeva.

Primjerice, za tolfanat je uočeno povećanje topljivosti povećanjem stupnja supstitucije HP- β -CD, a na primjeru kolesterola uočeno je najveće povećanje topljivosti pri stupnju supstitucije 7, dok je za manje i veće stupnjeve supstitucije uočeno smanjenje topljivosti.²⁸

Prirodni ciklodekstrini i njihovi derivati su u otopini stabilni u neutralnim i bazičnim uvjetima, a u kiselim uvjetima su podložni hidrolizi pri čemu je glavni razgradni put otvaranje prstena. Prirodni ciklodekstrini su otporni na razgradnju β -amilazom, ali sporo hidroliziraju u prisutnosti α -amilaze, enzima koji se luči u žlijezdama slinovnicama i gušterači. Brzina hidrolize ovisi o veličini ciklodekstrina, te su α -CD i β -CD praktički stabilni, dok se γ -CD brzo razgrađuje u prisutnosti α -amilaze. Stoga se γ -CD potpuno razgrađuje u gastrointestinalnom traktu, dok su α -CD i β -CD te derivati ciklodekstrina podložni bakterijskoj razgradnji u debelom crijevu. U pravilu, slobodni ciklodekstrini se brže razgrađuju od ciklodekstrina vezanih u kompleks.²³

Zbog svoje hidrofilnosti i podložnosti bakterijskoj razgradnji, ciklodekstrini imaju veoma nisku oralnu bioraspoloživost (manju od 4 %). Budući da se ne apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu, većina ciklodekstrina nije toksična nakon oralne primjene. Jedini izuzetak je RM- β -CD, zbog veće lipofilnosti i manjeg broja donora vodikove veze, što povećava njegovu bioraspoloživost (do 12 %). Za parenteralnu primjenu nisu pogodni β -CD, zbog svoje niske topljivosti i potencijalne nefrotoksičnosti, te metilirani derivati β -CD.^{23,26}

Prirodni ciklodekstrini su početkom 2000-ih godina proglašeni sigurnima za primjenu (engl. *generally recognized as safe*, GRAS) od strane agencije FDA, a uključeni su i u različite farmakopeje, primjerice Europsku i Japansku farmakopeju. Osim prirodnih ciklodekstrina, u farmakopeje su uključeni i neki njihovi derivati, kao što su HP- β -CD i SBE- β -CD.^{2,3}

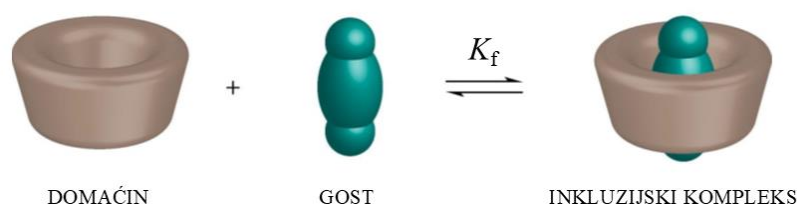
Zbog mogućnosti uklapanja različitih molekula u svoju šupljinu, ciklodekstrini imaju primjenu u različitim granama industrije. Budući da mogu značajno poboljšati topljivost, stabilnost i bioraspoloživost lijekova te zbog svoje niske toksičnosti, od velikog su interesa u farmaceutskoj industriji pri razvoju novih oralnih formulacija lijekova.²⁹⁻³¹ Formulacije s ciklodekstrinima kao pomoćnim tvarima postoje na tržištu još od 1976.g., kada se u Japanu na tržištu pojavio lijek Prostarmon ETM, formulacija koja se sastojala od prostaglandina E2 i β -ciklodekstrina. Broj formulacija s ciklodekstrinima kontinuirano raste, a trenutno je odobreno otprilike 130 formulacija s prirodnim ciklodekstrinima i njihovim derivatima.³² Osim njihove uloge kao pomoćna tvar, ciklodekstrini pokazuju i potencijal kao aktivna tvar u formulacijama. Budući da stvaraju komplekse s toksičnim tvarima, mogu se koristiti za njihovo uklanjanje te

sprečavanje njihove akumulacije u organizmu. Najpoznatiji primjer ovakvih formulacija je Sugammadex, poznatiji pod imenom Bridion®, koji kao aktivnu tvar sadrži derivat γ -ciklodekstrina, te se koristi kao selektivni blokator mišićnih relaksansa poput vekuronija.³³

Osim u farmaceutskoj industriji, ciklodekstrini se koriste i u kozmetičkoj industriji u formulacijama koje omogućuju odgođeno otpuštanje aktivnih sastojaka.²⁶ U zadnjih nekoliko godina ciklodekstrini pokazuju potencijalnu primjenu u uklanjanju zagađivala u vodi i tlu, kao što su teški metali i pesticidi.^{34,35} U prehrambenoj industriji koriste se za poboljšanje stabilnosti vitamina, boja i aroma.³⁶ U tekstilnoj industriji ciklodekstrini imaju potencijalnu primjenu u procesu bojanja tekstila budući da omogućuju bolju ujednačenost i intenzitet boje te smanjenje utroška boje. Također se koriste u razvoju medicinskih tekstila kao alternativni pristupi liječenju bakterijskih infekcija, s ciljem suzbijanja otpornosti bakterija na antibiotike.³⁷

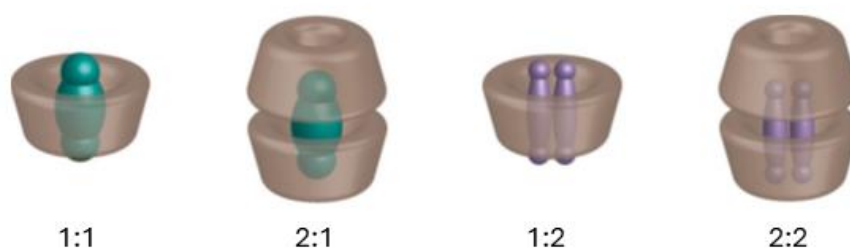
2.3. Inkluzijski kompleksi s ciklodekstrinima

Ciklodekstrini u otopini mogu tvoriti inkluzijske komplekse uklapanjem hidrofobnih molekula ili njihovih lipofilnih dijelova u centralnu hidrofobnu šupljinu. Ovaj proces ne uključuje kovalentne interakcije između molekula lijeka i ciklodekstrina, već dolazi do nastajanja vodikovih veza, te van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija. Stoga su uklopljene molekule u ravnoteži sa slobodnim molekulama u otopini (slika 4).^{2,3,26} U veoma razrijeđenim otopinama, inkluzijski kompleksi su jedina ili dominantna vrsta interakcija između lijeka i ciklodekstrina. Međutim, kada su prisutne veće koncentracije ciklodekstrina, dolazi do njihove agregacije, te su u otopini prisutne različite neinkluzijske vrste interakcija.^{2,38}



Slika 4. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa između ciklodekstrina (domaćin) i lijeka (gost)³⁹

Iako uglavnom nastaju inkluzijski kompleksi stehiometrijskog omjera 1:1, moguće je i uklapanje dvije molekule lijeka u jednu ili dvije molekule ciklodekstrina, ovisno o veličini šupljine i strukturi lijeka koji se uklapa (slika 5).^{26,39}



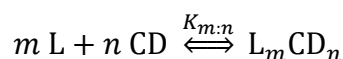
Slika 5. Prikaz inkluzijskih kompleksa različitih stehiometrijskih omjera CD:lijek³⁹

Mehanizam nastajanja inkluzijskih kompleksa temelji se na uklapanju hidrofobne molekule gosta u lipofilnu šupljinu ciklodekstrina, pri čemu dolazi do istiskivanja polarnih molekula vode iz nepolarne šupljine ciklodekstrina, i stvaranja povoljnijih hidrofobnih interakcija između molekule gosta i ciklodekstrina. Nastajanje inkluzijskih kompleksa ovisi o steričkom faktoru, odnosno podudaranju veličine molekule gosta i šupljine ciklodekstrina, te o termodinamičkom faktoru, odnosno, uklapanje molekule gosta u šupljinu ciklodekstrina mora biti energetski povoljno.^{40,41}

Na nastajanje inkluzijskih kompleksa utječu čimbenici poput koncentracije ciklodekstrina i lijeka, temperatura, vrsta i pH otapala. Iako veće koncentracije lijeka ili ciklodekstrina mogu pogodovati nastanku inkluzijskih kompleksa, mogu uzrokovati i nastajanje agregata te teže uklapanje molekula lijeka u centralnu šupljinu ciklodekstrina. Više temperature mogu povećati topljivost i kinetičku energiju lijeka, no previsoke temperature mogu dovesti do smanjenja međumolekulskih interakcija. Odabir otapala također može imati značajan utjecaj, budući da CD pokazuju bolju solubilizacijsku efikasnost u polarnim otapalima. Vrijednost pH otapala utječe na naboj lijeka što može povećati ili smanjiti afinitet lijeka prema hidrofobnoj šupljini ciklodekstrina.²⁶ Stoga su potrebna veoma opsežna istraživanja interakcije nekog lijeka s ciklodekstrinima.

2.3.1. Utjecaj ciklodekstrina na topljivost lijekova

Zbog sposobnosti tvorenja inkluzijskih spojeva, ciklodekstrini se u farmaceutskoj industriji često koriste za poboljšanje topljivosti slabo topljivih lijekova. Kao što je već spomenuto, u otopini je prisutna ravnoteža između uklopljenih molekula lijeka i slobodnih molekula u otopini. Ova ravnoteža je karakterizirana konstantom stabilnosti, odnosno konstantom nastajanja kompleksa, $K_{m:n}$. Ako m molekula lijeka (L) čini inkluzijske komplekse s n molekula ciklodekstrina (CD), ovaj se proces može prikazati ravnotežnom reakcijom:



gdje je $K_{m:n}$ konstanta stabilnosti inkluzijskog kompleksa, koja se može prikazati jednadžbom:

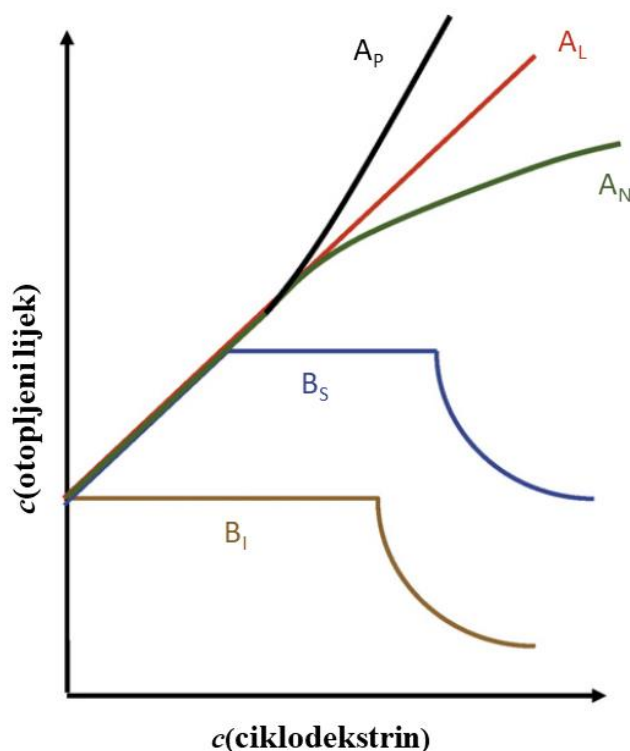
$$K_{m:n} = \frac{[L_m CD_n]}{[L]^m [CD]^n} \quad (1)$$

gdje $[L_m CD_n]$, $[L]$ i $[CD]$ označavaju ravnotežne koncentracije inkluzijskog kompleksa, ciklodekstrina i lijeka. Budući da većina lijekova tvori inkluzijske komplekse stehiometrijskog omjera 1:1, konstanta stabilnosti $K_{1:1}$ može se prikazati jednadžbom³⁸:

$$K_{1:1} = \frac{[L \cdot CD]}{[L] \times [CD]} \quad (2)$$

Postoje različite metode eksperimentalnog određivanja konstante stabilnosti. Najčešće korištene metode temelje se na titracijama gdje se prate promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka uslijed nastanka kompleksa s ciklodekstrinima, kao što su apsorbancija (UV-Vis spektroskopija), intenzitet fluorescencije (spektrofluorimetrija), kemijski pomaci (spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije) ili oslobađanje topline (izotermalna kalorimetrijska titracija).^{3,39} Konstante stabilnosti mogu se procijeniti metodom koja se temelji na praćenju povećanja topljivosti lijeka, tzv. solubilizacijskim istraživanjima (engl. *phase solubility analysis*), koju su 1965. godine razvili Takeru Higuchi i Kenneth A. Connors.⁴² Princip ove metode zasniva se na vaganju suviška lijeka u tikvice za miješanje, kojima se doda niz vodenih otopina ciklodekstrina u određenom koncentracijskom rasponu. Uzorci se potom miješaju do uspostavljanja ravnoteže te se odredi koncentracija otopljenog lijeka u svakom uzorku. Potom se konstruira graf ovisnosti koncentracije otopljenog lijeka o koncentraciji dodanog ciklodekstrina, tzv. dijagram topljivosti (engl. *phase solubility diagram*). Na temelju oblika krivulje mogu se dobiti informacije o vrsti inkluzijskih kompleksa. Postoje dva glavna tipa krivulja, tip A i tip B (Slika 6). Krivulje tipa A karakteristične su za sustave u kojima povećanjem koncentracije ciklodekstrina dolazi do nastanka topljivog inkluzijskog kompleksa i povećanja topljivosti lijeka. Postoje tri podtipa krivulja. Prvi podtip su krivulje tipa A_L gdje dolazi do linearnog povećanja topljivosti lijeka te je ovaj tip krivulje karakterističan za komplekse prvog ili višeg reda u odnosu na lijek (stehiometrija L:CD 1:1, 2:1, 3:1, itd.). Krivulje tipa A_P pokazuju pozitivno odstupanje od linearnosti i karakteristične su za komplekse višeg reda u odnosu na ciklodekstrin (stehiometrija L:CD 1:2, 1:3, itd.), a krivulje tipa A_N pokazuju negativno odstupanje od linearnosti te mogu biti uzrokovane promjenama u vodenom mediju. Krivulje tipa B ukazuju na nastanak netopivog kompleksa odmah po dodatku najmanje

količine ciklodekstrina (tip B_I) ili nakon što je postignuta najveća moguća topljivost (tip B_S).^{3,39,41,42}



Slika 6. Tipovi dijagrama topljivosti⁴¹

Iz linearnog dijela krivulje topljivosti moguće je izračunati konstantu stabilnosti nastalog kompleksa. Ako se pretpostavi nastajanje kompleksa 1:1, iz nagiba krivulje topljivosti i intrinzične topljivosti lijeka (S_0) može se izračunati konstanta stabilnosti ($K_{1:1}$) prema jednadžbi:

$$K_{1:1} = \frac{\text{nagib}}{S_0 (1 - \text{nagib})} \quad (3)$$

Važno je napomenuti da je ova metoda pogodna za istraživanje utjecaja ciklodekstrina na topljivost lijekova, ali nije veoma točna pri određivanju točne konstante stabilnosti inkluzijskih kompleksa. Razlog tomu može biti utjecaj tvari u otopini te istovremeni nastanak inkluzijskih i neinkluzijskih kompleksa.^{43,44} Stoga je $K_{1:1}$ određena ovom metodom zapravo skup konstanti stabilnosti različitih procesa koji se događaju u otopini. Također, netočno određena intrinzična topljivost značajno utječe na određivanje vrijednosti $K_{1:1}$. Naime, intrinzična topljivost lijeka (S_0) trebala bi odgovarati odsječku na osi y krivulje topljivosti (S_{int}). Međutim, moguća su značajna odstupanja S_{int} od eksperimentalno određene S_0 što može dovesti do velikih odstupanja u rezultatima. Primjerice, poznato je da lipofilne molekule agregiraju u vodenim otopinama.

Budući da se samo monomeri mogu uklopiti u šupljinu ciklodekstrina, S_{int} će biti manji od S_0 , koji predstavlja ukupnu koncentraciju monomera i agregiranog lijeka.⁴⁴ Također, kod nabijenih ciklodekstrina uočen je suprotan efekt, odnosno da je S_{int} veći od S_0 .^{44,45} Stoga se solubilizacijski potencijal ciklodekstrina češće izražava pomoću učinkovitosti kompleksiranja (engl. *complexation efficacy*, CE) budući da ona ovisi samo o nagibu krivulje topljivosti:

$$CE = \frac{\text{nagib}}{1 - \text{nagib}} \quad (4)$$

Vrijednost CE je uglavnom oko 0,3 što znači da na četiri molekule CD u otopini samo jedna tvori topljivi kompleks sa slabo topljivim lijekom, pod pretpostavkom da nastaje kompleks 1:1 omjera. Budući da je vrijednost CE neovisna o S_0 , moguće su manje diskrepancije u rezultatima u usporedbi s $K_{1:1}$ vrijednostima.⁴⁵

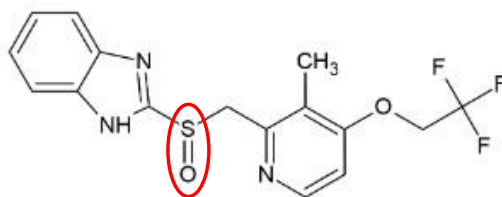
Vrijednost konstante stabilnosti može ukazivati na jako ili slabo vezanje lijeka i ciklodekstrina. Vrijednosti konstanti manje od 500 mol L^{-1} ukazuju na jako slabo vezanje, vrijednosti konstanti u rasponu $(500 - 1000) \text{ mol L}^{-1}$ ukazuju na slabo vezanje, dok raspon vrijednosti $(1000 - 5000) \text{ mol L}^{-1}$ ukazuje na srednje jako vezanje. Raspon vrijednosti konstanti stabilnosti $(5000 - 20\,000) \text{ mol L}^{-1}$ ukazuje na jako vezanje, a kada su vrijednosti konstanti stabilnosti veće od $20\,000 \text{ mol L}^{-1}$ radi se o veoma stabilnim kompleksima, odnosno veoma snažnom vezanju lijeka i ciklodekstrina.⁴⁶ Međutim, sustave s jako visokim vrijednostima konstanti stabilnosti potrebno je izbjegavati, budući da je tada smanjena bioraspoloživost lijeka, zbog slabe disocijacije lijeka iz kompleksa.^{46,47}

2.3.2. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost lijekova

Stabilnost farmaceutika definira se kao sposobnost lijeka da održi svoja svojstva kroz neki određeni vremenski period te je jedan od ključnih svojstava lijeka, budući da utječe na sigurnost i efikasnost, odabir formulacije, vrstu pakiranja te način skladištenja i prijevoza. Na stabilnost lijekova može se utjecati kemijskim putem (hidroliza, oksidacija, fotodegradacija) ili fizikalnim putem (prijelazi faza).

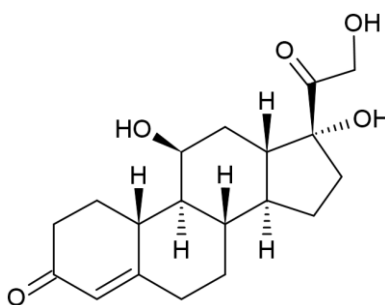
Nastajanje inkluzijskih kompleksa lijek-ciklodekstrin može utjecati na fizikalno-kemijska svojstva lijekova poput stabilnosti.^{48,49} Budući da način uklapanja lijeka u ciklodekstrin ovisi o strukturi lijeka, moguća je i destabilizacija lijeka. Stoga istraživanja kompleksiranja lijeka i ciklodekstrina uvijek moraju uključivati i studije stabilnosti. U nastavku će biti navedeno nekoliko zanimljivih primjera stabilizacije ili destabilizacije lijekova uslijed kompleksiranja s ciklodekstrinima.

Lanzoprazol (slika 7) je supstituirani benzoimidazol koji pripada skupini lijekova inhibitora protonске pumpe. Koristi se za liječenje ulkusa na dvanaesniku i želucu. Formulacije s lanzoprazolom sklone su razgradnji zbog njegove osjetljivosti na nizak pH i svjetlo. Međutim, kompleksi lanzoprazola pripremljeni s β -CD i HP- β -CD pokazali su značajno poboljšanje svojstava kao što su topljivost i stabilnost, pri čemu je HP- β -CD značajnije stabilizirao lijek, zbog boljeg uklapanja sulfonilne skupine, koja se pokazala ključna za stabilnost lanzoprazola.⁵⁰



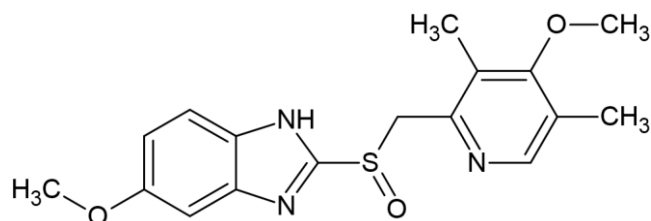
Slika 7. Struktura lanzoprazola s označenom sulfonilnom skupinom

Sterilizacija gama zračenjem je efikasna i jednostavna metoda koja omogućuje sterilizaciju gotovih farmaceutskih formulacija u njihovom konačnom pakiranju. Međutim, u tekućim formulacijama postoji mogućnost razgradnje aktivne tvari uslijed izlaganja zračenju. El Magraby i sur. su 2010. godine u svome radu istražili mogućnost primjene HP- β -CD za stabilizaciju hidrokortizona (slika 8) pri izlaganju gama zračenju. Pokazalo se da HP- β -CD značajno povećava stabilnost hidrokortizona te ima potencijalnu primjenu u razvoju novih formulacija koje zahtijevaju sterilizaciju.⁵¹



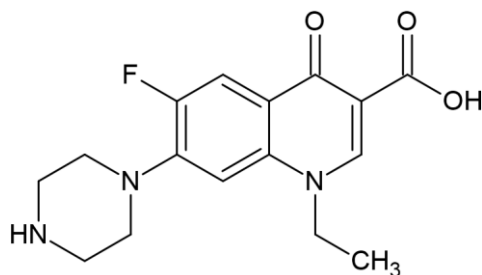
Slika 8. Struktura hidrokortizola

Iako postoji mnogo primjera povećanja stabilnosti lijekova u prisutnosti ciklodekstrina, moguć je i negativan utjecaj. Primjerice, omeprazol (slika 9), inhibitor protonске pumpe, je veoma nestabilan u kiselim uvjetima. Pokazalo se da ciklodekstrini povećavaju razgradnju, te da β -CD ima veći negativni utjecaj od njegovih derivata, vjerojatno zbog slobodnih hidroksilnih skupina koje potiču razgradnju.⁵²



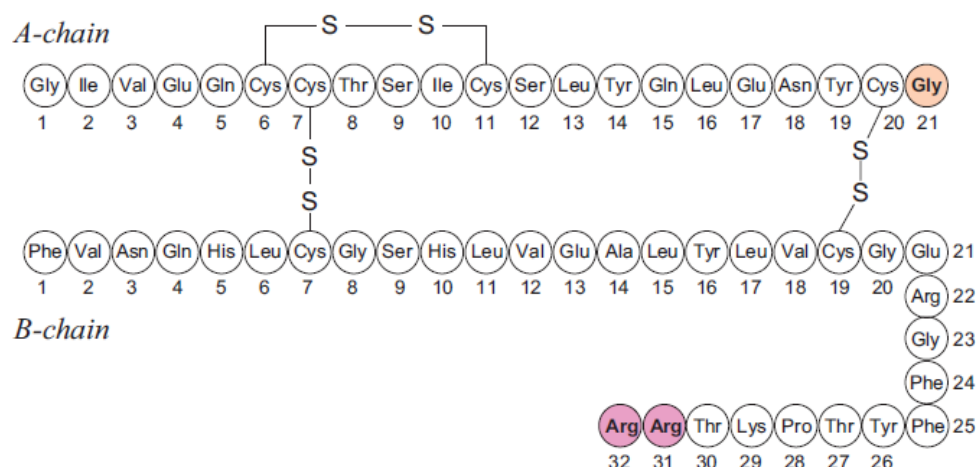
Slika 9. Struktura omeprazola

Utjecaj na stabilnost može se razlikovati ovisno i o formi lijeka, vidljivo iz primjera polimorfa norfloksacina. Norfloksacin (slika 10) je antibiotik koji se pojavljuje u tri polimorfne forme, forme A, B i C. Inkluzijski kompleksi β -CD i norfloksacina C te norfloksacin B hidrata pripremljeni su gnječenjem te se pokazalo da β -CD povećava stabilnosti norfloksacina C, dok povećava razgradnju norfloksacin B hidrata.^{53,54} Negativan efekt može se pripisati higroskopnosti sustava što ubrzava razgradnju ovog polimorfa.



Slika 10. Struktura norfloksacina

Ciklodekstrini osim na male molekule, mogu utjecati i na stabilnost makromolekula. Primjerice, SBE- β -CD ima pozitivan utjecaj na stabilnost inzulin glargina. Inzulin glargin (slika 11) je analog ljudskog inzulina s produljenim djelovanjem. Budući da je slabo topljiv pri neutralnoj vrijednosti pH, u formulaciji se nalazi u kiseloj otopini. Potkožnom primjenom dolazi do neutralizacije i nastanka mikroprecipitata koji postepeno oslobađaju inzulin glargin. Međutim, podložan je enzimskoj razgradnji proteinazama. Pokazalo se da kompleksiranje s SBE- β -CD smanjuje enzimsku razgradnju tripsinom te time povećava njegovu bioraspoloživost. Pretpostavlja se da SBE- β -CD tvori interakcije s pozitivno nabijenim bočnim ograncima što smanjuje interakcije s asparaginskom kiselinom u aktivnom mjestu tripsina.⁵⁵

Slika 11. Sekundarna struktura inzulin glargina⁵⁵

2.3.3. Načini priprave inkluzijskih kompleksa

Postoji širok raspon metoda za pripravu inkluzijskih kompleksa, koje se mogu podijeliti na metode u otopini, metode u čvrstom stanju i metode u polučvrstom stanju.⁵⁶

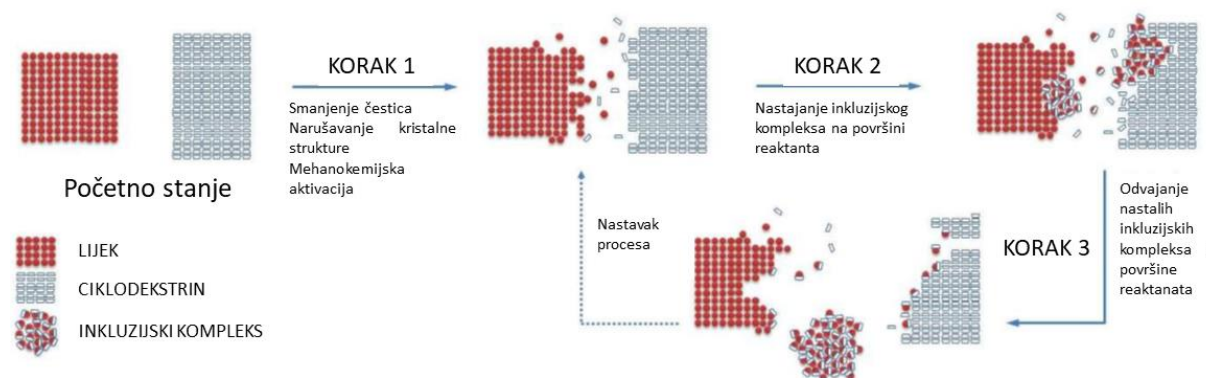
Metode u otopini temelje se na otapanju lijeka i ciklodekstrina u vodi, organskom otapalu ili smjesi vode i organskog otapala. U slučaju kompleksa B_s tipa, kompleks se izolira kristalizacijom, a u slučaju A tipa koriste se tehnike poput liofilizacije^{57,58} (engl. *freeze drying*), koevaporacije pod smanjenim tlakom^{59,60} (engl. *co-evaporation under reduced pressure*) ili sušenja raspršivanjem^{61,62} (engl. *spray drying*). Nedostatak ovih metoda je dugotrajnost te prisutnost organskih otapala u konačnom produktu. U ovu skupinu pripada i metoda superkritičnog fluida, koja je pogodnija budući da ne koristi organska otapala, no ograničena je dostupnošću opreme i cijenom.^{56,63,64}

Metodama u polučvrstom stanju pripada metoda gnječenja (engl. *kneading*) gdje se smjesa lijeka i ciklodekstrina miješa u maloj količini otapala kako bi se dobila homogena pasta. Produkt se potom suši kako bi se uklonilo otapalo. Glavni nedostatak ove metode je samo djelomično kompleksiranje.^{56,65,66}

Metode u čvrstom stanju uključuju mikrovalno ozračivanje^{67,68} (engl. *microwave irradiation*) i tzv. "sealed heating" metodu^{69,70}, odnosno blago zagrijavanje u zatvorenoj posudi na temperaturi nižoj od temperature taljenja. Glavni nedostatak obje metode je mogućnost razgradnje lijeka. Tijekom zadnjeg desetljeća od interesa je i tzv. "hot-melt extrusion" metoda koja omogućuje pripravu čvrstih disperzija u polimernom nosaču.^{71,72} Osim navedenih metoda, od velikog je interesa i mljevenje (engl. *grinding*), kao brza i efikasna metoda priprave

inkluzijskih kompleksa. Budući da ne zahtjeva uporabu organskih otapala, metoda je i ekonomski te ekološki isplativa.⁵⁶

Točan mehanizam nastajanja inkluzijskih kompleksa mljevenjem nije poznat, međutim predložen je mehanizam temeljen na općem mehanizmu mehanokemijske aktivacije koja se odvija u tri koraka i uzima u obzir sve procese koji se događaju tijekom mehanokemijske aktivacije lijeka (slika 12). Smjesa lijeka i CD mljevenjem prima pulseve mehaničke energije tijekom sudara s kuglicama za mljevenje ili stijenkama posudice. Veći dio ove energije pretvara se u toplinu što poboljšava interakcije lijeka i ciklodekstrina u čvrstom stanju. Također dolazi do narušavanja kristalne strukture, smanjenja veličine čestica i amorfizacije. Amorfizacija uzorka započinje na površini, a zatim se širi prema unutrašnjosti uzorka, pri čemu dolazi do aktivacije materijala. Do nastanka inkluzijskog kompleksa dolazi na aktiviranoj površini, uz međufazne korake kao što je nastajanje čvrstih disperzija. Daljnjim mljevenjem inkluzijski kompleksi se odvajaju s površine uzorka te se proces ponavlja. Mljevenje također omogućuje intenzivno miješanje i homogenizaciju reaktanata, što pospješuje nastanak inkluzijskog kompleksa.⁵⁶



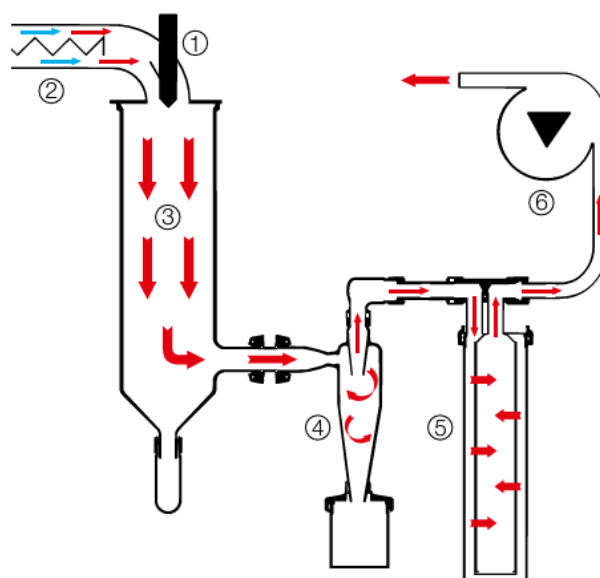
Slika 12. Predloženi mehanizam nastajanja inkluzijskih kompleksa mljevenjem⁵⁶

Navedena tehnika naziva se suho mljevenje (engl. *neat grinding*), ali moguć je i dodatak male, katalitičke količine otapala koja može pospješiti nastanak inkluzijskog kompleksa, tzv. mljevenje potpomognuto otapalom (engl. *liquid-assisted grinding*).⁵⁶

Mljevenje se uglavnom provodi u visokoenergijskom vibracijskom mlinu korištenjem posudica i kuglica za mljevenje. Parametri mljevenja koji mogu utjecati na efikasnost pripreme inkluzijskih kompleksa su materijal posudica i kuglica za mljevenje (npr. nehrđajući čelik, ZrO₂, teflon, itd.), frekvencija (15 – 25 Hz) i vrijeme mljevenja te količina uzorka. Smatra se

da bi posudice za mljevenje trebale biti napunjene najviše do 25 % njihovog volumena, a kao optimalno vrijeme mljevenja pokazao se raspon između 20 i 60 minuta.⁵⁶

U ovom radu osim mljevenja korištena je i metoda sušenja raspršivanjem kao konvencionalna metoda pripreme inkluzijskih kompleksa. Na slici 13 prikazana je shema uređaja za sušenje raspršivanjem. Princip ove metode sastoji se u otapanju lijeka i ciklodekstrina u nekom otapalu te uvođenja u uređaj za sušenje pri čemu se otopina prevodi u čvrsto stanje. Priprava uzorka odvija se u tri koraka. Prvi korak je uvođenje otopine uzorka u raspršivač gdje dolazi do raspršivanja u sitne kapljice. Budući da se time dobiva velika površina koja je izložena plinu za sušenje, manje kapljice se gotovo trenutno suše u kontaktu s plinom. Kao plin za sušenje najčešće se koristi zagrijani zrak, ali je moguće i korištenje inertnih plinova kao što je dušik. Nastale čestice uzorka u čvrstom stanju potom padaju na dno komore za sušenje te se nose strujom zraka u sakupljač uzorka. Ovdje se odvajaju od zraka ciklonom pomoću centrifugalne sile nastale vrtloženjem zraka.^{73,74}



Slika 13. Shema uređaja za sušenje raspršivanjem s označenim glavnim dijelovima: raspršivač (1), dovod i grijanje plina za sušenje (2), komora za sušenje (3), ciklon (4), vanjski filter (5), aspirator (6)⁷⁵

Kod procesa sušenja postoji nekoliko parametara koji se mogu mijenjati: ulazna temperatura i brzina strujanja zagrijanog zraka, protok uzorka i tlak raspršivača. Ulazna temperatura zagrijanog zraka određuje sposobnost sušenja, odnosno količinu otapala koja se može ukloniti u određenom vremenu, a protok zraka utječe na brzinu sušenja i odvajanje čestica u ciklonu. Protok uzorka ovisi o svojstvima uzorka i izvedbi instrumenta.^{73,74}

2.3.4. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa u otopini

Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina i lijeka ključan je korak u razumijevanju mehanizma uklapanja lijeka te odabira najpogodnijeg ciklodekstrina za konačnu formulaciju. Stoga su veoma bitna opsežna istraživanja fizikalno-kemijskih svojstva kompleksa te upotreba niza analitičkih tehnika, čiji se rezultati moraju zajedno proučavati. Ugrubo, ove metode se mogu podijeliti na metode analize u otopini i metode analize u čvrstom stanju.^{76,77}

Metode analize u otopini sastoje se od spektroskopskih, elektroanalitičkih i separacijskih metoda te izotermalne titracijske kalorimetrije. Ovim metodama može se dobiti uvid u način vezanja i stehiometriju inkluzijskih spojeva te vrijednosti konstanti stabilnosti.⁷⁶

UV-Vis spektroskopija je brza i jednostavna metoda analize inkluzijskih kompleksa. Dodatkom ciklodekstrina u otopinu lijeka može doći do značajnih promjena u spektru lijeka, uključujući promjene u apsorbanciji te hipsokromni i batokromni pomak apsorpcijskog maksimuma, što može biti indikativno nastanku inkluzijskog kompleksa. Glavni nedostatak ove metode je nespecifičnost te podložnost interferencijama drugih tvari u otopini. Također, ne pruža direktan dokaz nastanka inkluzijskih kompleksa, već je to moguće u kombinaciji s rezultatima drugih analitičkih tehnika.⁷⁶

Jedan od najčešćih načina određivanja konstanti stabilnosti UV-Vis spektroskopijom ili fluorescencijskom spektroskopijom je direktnom titracijom. Princip metode sastoji se od postepenog dodavanja jedne komponente (najčešće ciklodekstrin) drugoj komponenti čija je koncentracija konstantna. Očitavaju se promjene u apsorbanciji ili intenzitetu fluorescencije lijeka te se konstruiraju titracijske krivulje. Na temelju različitih modela određuje se konstanta stabilnosti. Iako se u literaturi često koriste modeli linearne regresije poput Benesi-Hildebrand modela, oni često mogu dati netočne rezultate, budući da se temelje na pretpostavkama da je došlo do potpunog kompleksiranja te da su promjene u apsorbanciji proporcionalne koncentraciji inkluzijskog kompleksa. Stoga se u novije vrijeme sve više koriste nelinearni regresijski modeli ili druge tehnike poput izotermalne titracijske kalorimetrije.³⁹

Izotermalna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) zasniva se na mjerenju topline koja se oslobađa ili apsorbira tijekom interakcija dviju molekula. To je veoma osjetljiva metoda koja daje informacije ne samo o stehiometriji i konstanti stabilnosti inkluzijskih kompleksa, već i o termodinamičkim parametrima poput promjene u entalpiji (ΔH), entropiji (ΔS) i Gibbsovoj energiji (ΔG). Tipičan ITC eksperiment temelji se na titraciji otopine lijeka otopinom ciklodekstrina, pri čemu dolazi do interakcije lijeka i ciklodekstrina te

otpuštanja ili apsorbiranja topline. Daljnjim dodatkom, otopina postaje zasićenija ciklodekstrinom te dolazi do postepenog smanjenja toplinskog signala. Dobiveni termogram se integrira kao funkcija molarnog omjera dva reaktanta uz korekciju za razrjeđivanje. Time se dobije titracijska krivulja te se primjenom različitih matematičkih modela iz nje mogu izračunati termodinamički parametri.^{78,79}

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) izuzetno je važna tehnika pri karakterizaciji inkluzijskih kompleksa budući da omogućuje direktan dokaz kompleksiranja te daje uvid u način inkluzije i stehiometriju nastalog kompleksa. Najjednostavniji su ^1H i ^{13}C NMR eksperimenti koji daju informacije o inkluziji na temelju promjena u kemijskim pomacima u ^1H i ^{13}C NMR spektrima lijeka kada je slobodan i kada je uklopljen u ciklodekstrin. Razlike u kemijskim pomacima mogu dati informacije o mehanizmu i geometriji inkluzijskog kompleksa, a titracijskim eksperimentima može se dobiti uvid u stehiometriju nastalog kompleksa te odrediti konstante stabilnosti. Izvedene tehnike poput NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) i ROESY (engl. *rotational Overhauser effect spectroscopy*) koje se zasnivaju na nuklearnom Overhauser efektu (engl. *nuclear Overhauser effect*, NOE) također se koriste pri karakterizaciji inkluzijskih kompleksa. Ovaj fenomen omogućuje određivanje prostorne udaljenosti između atoma, te time daje uvid u trodimenzijsku strukturu inkluzijskog kompleksa. Osim navedenih tehnika, NMR dOSY (engl. *diffusion ordered spectroscopy*) također pruža dokaz o vezanju ciklodekstrina i lijeka. Glavni nedostatak svih NMR tehnika je slaba osjetljivost te je zbog loše topljivosti lijeka u deuteriranoj vodi potrebno korištenje drugih otapala koja mogu utjecati na interakcije lijeka i ciklodekstrina. Također, moguće su i premale razlike u kemijskim pomacima te širenje signala.⁷⁶

Spektrometrija masa je veoma osjetljiva metoda koja se također može koristiti za određivanje stehiometrije inkluzijskih kompleksa, budući da postoji dobra korelacija između ponašanja lijeka i ciklodekstrina u otopini i u plinovitoj fazi.^{80,81} Budući da su inkluzijski kompleksi nekovalentne prirode, potrebno je koristiti "meke" ionizacijske tehnike poput elektroraspršenja.⁸² Međutim, uočeni signali u MS spektru ne moraju nužno biti posljedica nastanka inkluzijskih kompleksa, već nespecifičnih adukata nastalih tijekom procesa elektroraspršenja. Jedan od načina razlikovanja pravih inkluzijskih kompleksa od lažnog pozitivna je usporedba s linearnim oligosaharidima. Ako je u oba slučaja uočen jednak intenzitet signala kompleksa, vjerojatno se radi o nespecifičnom kompleksu. U suprotnom, ako je intenzivniji signal iona koji pripada kompleksu samo u slučaju ciklodekstrina, može se

zaključiti da se radi o inkluzijskom kompleksu. Drugi način razlikovanja inkluzijskih i nespecifičnih kompleksa je upotreba tzv. "breakdown" krivulja, odnosno krivulja ovisnosti intenziteta signala iona kompleksa o primijenjenoj kolizijskog energiji.⁸⁰

Ostale metode analize inkluzijskih kompleksa u otopini koje se ne koriste često uključuju spektroskopiju cirkularnog dikroizma^{83,84} (engl. *circular dichroism spectroscopy*), polarografiju^{85,86}, voltametriju^{86,87}, potencijometriju^{88,89} te separacijske tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti^{87,90} i kapilarne elektroforeze⁹¹.

2.3.5. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju

Inkluzijski kompleksi u čvrstom stanju mogu se analizirati metodama termičke analize, difrakcijom rendgenskog zračenja, spektroskopskim tehnikama te pretražnom elektronskom mikroskopijom. Princip svih metoda sastoji se u usporedbi rezultata analize inkluzijskog kompleksa s početnim komponentama te fizičkom smjesom, odnosno smjesom nastalom blagim miješanjem lijeka i ciklodekstrina. Uočene razlike u spektrima mogu biti indikativne nastanku inkluzijskog kompleksa.^{77,82}

Termoanalitičke tehnike koje se često koriste su razlikovna pretražna kalorimetrija⁹² (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC), termogravimetrijska analiza⁹³ (engl. *termogravimetric analysis*, TGA) i "hot stage" mikroskopija⁹⁴. Razlikovna pretražna kalorimetrija jedna je od glavnih tehnika analize inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju. Ako je lijek u kristaliničnoj formi, njegova DSC krivulja imat će karakteristični endotermni signal pri temperaturi taljenja lijeka. DSC krivulja fizičke smjese trebala bi odgovarati superpoziciji krivulja pojedinih komponenti. U DSC krivulji inkluzijskog kompleksa mogu biti uočene različite promjene kao što su smanjenje intenziteta ili potpuni nestanak signala te širenje ili pomak endoternog signala lijeka prema nižim temperaturama, što ukazuje na gubitak kristalne strukture i može biti indikativno nastanku inkluzijskog kompleksa. Međutim, ovim rezultatima treba oprezno pristupiti, budući da nestanak endoternog signala lijeka može biti uzrokovan gubitkom kristalinične forme i prijelaza u amorfno stanje, što ne mora nužno biti posljedica nastanka inkluzijskog kompleksa.⁷⁷ Također su od velikog interesa i spregnuti sustavi poput simultane TGA i diferencijalne termičke analize spregnute s infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama i spektrometrijom masa (engl. *termogravimetry differential thermal analysis-Fourier transform infrared spectroscopy-mass spectrometry*, TGA/DTA-FTIR-MS).⁹⁵

Termogravimetrijska analiza često se koristi u kombinaciji s DSC analizom. Ovom metodom mogu se pratiti promjene u masi tvari prilikom zagrijavanja. Usporedbom TGA krivulje samog lijeka, ciklodekstrina, njihove fizičke smjese i uzorka koji potencijalno sadrži inkluzijski kompleks, može se zaključiti dolazi li uistinu do nastanka inkluzijskog kompleksa. TGA krivulja ciklodekstrina pokazuje dva gubitka mase, jedan pri otprilike 100 °C zbog gubitka vode, i drugi pri otprilike 300 °C zbog raspada molekule. Ako je lijek uklopljen u ciklodekstrin, TGA krivulja uzorka razlikovati će se od TGA krivulje samog lijeka, budući da je za pretpostaviti da nastanak kompleksa povećava temperaturnu stabilnost lijeka.⁷⁷

Tehnike koje se temelje na difrakciji rendgenskog zračenja su difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu (engl. *single crystal X-ray diffraction*, SCXRD) i difrakcija rendgenskog zračenja na praškastom uzorku (engl. *powder X-ray diffraction*, PXRD).⁷⁷ Budući da su za SCXRPD potrebni jedinični kristali, ova se tehnika ne koristi često u analizi inkluzijskih kompleksa. Međutim, u slučaju dobivanja jediničnih kristala, obično tehnikom sporog isparavanja otapala, rezultati SCXRPD analize mogu se koristiti u kombinaciji s NMR analizom i simulacijama molekulske dinamike (engl. *molecular dynamics*, MD) te dati detaljan uvid u stehiometriju i geometriju nastalih inkluzijskih kompleksa.^{96,97} Češća metoda koja se koristi u analizi inkluzijskih kompleksa je PXRD. Promjene u difraktogramu, poput pojave novih difrakcijskih maksimuma ili pomaci već postojećih, kao i promjene u intenzitetu difrakcijskih maksimuma, mogu poslužiti kao dokaz nastanka inkluzijskih kompleksa. Međutim, budući da metode poput liofilizacije, mljevenja i sušenja raspršivanjem daju amorfne produkte, razlike u difraktogramu ne moraju nužno značiti nastanak inkluzijskog kompleksa, već mogu biti posljedica prijelaza iz kristalinične u amorfnu formu.⁷⁷

Od spektroskopskih tehnika najviše se koristi infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier-transform infra-red spectroscopy*, FT-IR), iako se i Ramanova spektroskopija pokazala pogodnom tehnikom.^{77,98} Promjene u položajima ili intenzitetima IR vrpce te nestajanje i širenje vrpce karakterističnih za lijek mogu ukazivati na nastanak inkluzijskih kompleksa. Međutim, glavni nedostatak ove metode je način pripreme uzoraka za snimanje. Budući da je pripravom pastila uzorak pomiješan s KBr izložen dodatnom pritisku tijekom prešanja, može doći do fizikalno-kemijskih promjena te dodatnih interakcija između lijeka i ciklodekstrina. Također, moguća su preklapanja karakterističnih vrpca lijeka s vrpcama ciklodekstrina. Kako bi se izbjegao utjecaj načina pripreme uzorka na spektre, koristi se metoda prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) gdje se praškasti uzorak

nanosi na nosač s potpuno reflektirajućom površinom te se pritisne dijamantnim klipom. Budući da se na ovaj način ne unosi dodatna sila koja može utjecati na interakcije komponenti uzorka, dobiva se realnija slika uzorka nego u slučaju pripreme KBr pastile.⁷⁷

U zadnje vrijeme od velikog je interesa i tehnika spektroskopije NMR u čvrstom stanju (engl. *solid-state nuclear magnetic resonance*, ss-NMR), pogotovo tehnika ¹³C križne polarizacije uz vrtnju pri magičnom kutu (engl. *cross-polarization magic-angle spinning*, CP MAS) koja se temelji na heteronuklearnim dipolnim interakcijama, te je stoga osjetljiva na intramolekulske udaljenosti i mobilnost molekula. Ova metoda omogućuje dobivanje ¹³C NMR spektara visokog razlučivanja koji daju detaljan uvid u strukturu inkluzijskih kompleksa.⁹⁹

Također se mogu koristiti i mikroskopske tehnike poput pretražne elektronske mikroskopije (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) i mikroskopije atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM). Iako SEM nije pogodna tehnika za direktno dokazivanje nastanka inkluzijskih kompleksa, pruža informacije o veličini, obliku i homogenosti čestica, a promjene u morfološkim i topološkim karakteristikama mogu ukazivati na nastanak inkluzijskih kompleksa.^{82,100} Topografske promjene uočene AFM analizom također mogu ukazivati na nastanak inkluzijskih kompleksa, a ako se AFM koristi u tzv. "*tapping*" načinu rada, inkluzijski kompleksi se mogu razlikovati od topografski sličnih ciklodekstrina na temelju njihovih lokalnih mehaničkih svojstava.^{101,102}

Osim različitih eksperimentalnih metoda analize inkluzijskih kompleksa, od velikog je značaja i računalni pristup, poput Monte Carlo simulacija te simulacija molekulske mehanike (engl. *molecular mechanics*, MM) i molekulske dinamike. Ove *in silico* metode omogućuju detaljan uvid u nastajanje inkluzijskih kompleksa.^{103–105} Nadalje, zbog mogućnosti predviđanja stabilnosti inkluzijskih kompleksa, navedene *in silico* metode u kombinaciji sa strojnim učenjem (engl. *machine learning*) omogućuju brzi preliminarni pregled velikog broja mogućih inkluzijskih kompleksa i odabir najboljih kandidata za eksperimentalnu karakterizaciju. Ovaj pristup bi bio veoma pogodan u slučaju skupih aktivnih tvari koje su dostupne u malim količinama.¹⁰⁶

2.4. Validacija analitičkih postupaka

Validacija metode je postupak dokazivanja pogodnosti analitičke metode za određenu namjenu. Svrha validacije je dokazati da je neka analitička metoda pogodna za rutinsku analizu te da se njome dobivaju rezultati veoma bliski točnim vrijednostima.¹⁰⁷ Postoji mnogo priručnika koji opisuju validaciju metoda, međutim u ovom radu korištene su smjernice Međunarodne konferencije o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutika za ljudsku upotrebu (engl. *International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, ICH) koji su opisani u priručnicima Q2(R1) i Q2(R2). U priručniku su navedeni i opisani parametri validacije kao što su točnost, preciznost, specifičnost, granice detekcije i kvantifikacije, područje linearnosti i raspon metode. Također je za svaki parametar navedeno u kojim se slučajevima treba određivati. U nastavku će biti ukratko opisani svaki od navedenih parametara.^{108,109}

Specifičnost (engl. *specificity*) i selektivnost (engl. *selectivity*) metode je sposobnost nedvosmislene identifikacije i kvantifikacije analita u prisutnosti mogućih interferencija kao što su nečistoće, razgradni produkti, te ostali spojevi koji potječu iz matrice. Specifičnost metode opisuje sposobnost jednoznačne detekcije i kvantifikacije jednog analita, a selektivnost opisuje sposobnost detekcije i kvantifikacije više analita u smjesi ili u matrici bez interferencija drugih sastojaka sličnih svojstava.

Točnost (engl. *accuracy*) analitičkog postupka pokazuje koliko je dobiveni rezultat blizak vrijednosti za koju se smatra da je točna ili prihvaćena kao referentna vrijednost. Procjenjuje se na temelju najmanje devet određivanja unutar nekog određenog raspona metode (primjerice tri ponavljanja na tri koncentracije). Točnost se izražava kao analitički povrat poznate količine analita dodane u uzorak ili kao razlika između dobivene i referentne vrijednosti.

Preciznost (engl. *precision*) metode označava stupanj slaganja rezultata dobivenih ponavljanjem mjerenja istog uzorka pri istim uvjetima analize. Preciznost se izražava kao ponovljivost (engl. *repeatability*), međupreciznost (engl. *intermediate precision*) i reproducibilnost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost se odnosi na preciznost u kratkom vremenskom periodu, a međupreciznost uključuje mjerenja provedena u duljem vremenskom periodu, ali u istom laboratoriju, dok se reproducibilnost odnosi na preciznost između laboratorija. Preciznost se procjenjuje na temelju najmanje devet određivanja unutar nekog određenog raspona metode (primjerice tri ponavljanja na tri koncentracije) te se izražava pomoću relativne standardne devijacije rezultata.

Granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) predstavlja najnižu koncentraciju uzorka koju je određenom analitičkom metodom moguće detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) predstavlja najnižu koncentraciju analita koju je moguće kvantificirati sa zadovoljavajućom preciznošću i točnošću. Granice detekcije i kvantifikacije mogu se procijeniti na nekoliko načina:

- a) vizualnom evaluacijom
- b) na temelju omjera signala i šuma
- c) na temelju točnosti i preciznosti pri nižim koncentracijama
- d) regresijskom analizom, na temelju standardnog odstupanja mjerene vrijednosti (σ) i nagiba pravca (S) prema jednadžbama:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (5)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{S} \quad (6)$$

pri čemu se standardno odstupanje može odrediti na nekoliko načina: na temelju standardnog odstupanja slijepe probe i pomoću kalibracijske krivulje u području koncentracija bliskih granicama detekcije i kvantifikacije. U tom slučaju rezultate je potrebno potvrditi nezavisnom analizom uzoraka u kojima je koncentracija analita blizu ili jednaka procijenjenim vrijednostima granice detekcije i kvantifikacije.

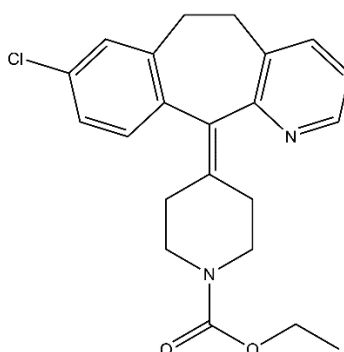
Linearnost (engl. *linearity*) predstavlja koncentracijski raspon metode unutar kojega postoji proporcionalni odnos mjerene vrijednosti i koncentracije analita u uzorku. Linearnost se procjenjuje vizualnim pregledom krivulje ovisnosti mjerene vrijednosti i koncentracije. U slučaju linearnog omjera, metoda se statistički evaluira regresijskom analizom pomoću metode najmanjih kvadrata. U validacijskom izvješću prikazuje se krivulja linearnosti, koeficijent korelacije, nagib te odsječak na y-os. Za procjenu linearnosti preporučeno je korištenje minimalno 5 koncentracijskih razina.

Raspon analitičke metode (engl. *range*) predstavlja koncentracijski raspon analita u uzorku unutar kojega analitička metoda ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost. Raspon se obično određuje na temelju linearnosti na uzorcima koji sadrže količinu analita unutar točno određenog raspona metode.

Robusnost metode (engl. *robustness*) predstavlja sposobnost metode da na nju ne utječu male promjene u parametrima te ukazuje na dugoročnu pouzdanost metode. Robusnost metode ispituje se unošenjem malih, namjernih promjena u parametrima koje se mogu očekivati tijekom rutinske primjene metode.

2.5. Loratadin

Loratadin (LOR), odnosno etil 4-(8-kloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]-ciklohepta[1,2-b]piridin-11-iliden)-1-piperidinkarboksilat, je antihistaminik druge generacije koji se koristi za liječenje simptoma alergije, kao što su alergijski rinitis i urtikarija. Slaba je baza s vrijednosti pK_a u rasponu 5,85 – 6,00, a njegova je struktura prikazana na slici 14.⁵ Topljivost loratadina je pH ovisna, te je dobro topljiv pri niskim pH-vrijednostima, a slabo topljiv pri višim pH-vrijednostima.¹¹⁰



Slika 14. Struktura loratadina

Prema svojim svojstvima, loratadin pripada BCS skupini II, koju karakteriziraju slaba topljivost i visoka permeabilnost.¹¹⁰ Stoga su od velikog interesa istraživanja poboljšanja njegove topljivosti, primjerice primjenom čvrstih disperzija^{111–115}, nanokristala¹¹⁶ te ciklodekstrina.

2.5.1. Inkluzijski kompleksi loratadina i ciklodekstrina

Poboljšanje topljivosti loratadina utjecajem ciklodekstrina opisano je u nekoliko radova. Provedena su istraživanja u prisutnosti prirodnih ciklodekstrina te derivata β -CD. Istraživanja u otopini uključivala su solubilizacijska ispitivanja te određivanje stehiometrije nastalog inkluzijskog kompleksa spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa. Inkluzijski kompleksi u čvrstom stanju pripremljeni su pretežito liofilizacijom i gnječenjem, iako postoje radovi u kojima su korištene i metode mljevenja i sušenja raspršivanjem. Pripremljeni kompleksi u čvrstom stanju karakterizirani su tehnikama poput DSC, PXRD, FTIR te eksperimentima *in vitro* otapanja.

U radu Omar i sur. iz 2007. godine istraženo je kompleksiranje loratadina s prirodnim ciklodekstrinima i HP- β -CD. Solubilizacijska istraživanja provedena su u fosfatnom puferu pri pH 7,0 i pri 25 °C. Pokazalo se da svi ciklodekstrini povećavaju topljivost, a dobivene krivulje topljivosti su A_L ili A_P tipa, što ukazuje na nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 i 1:2. Na

primjeru β -CD istražen je utjecaj pH otopine i koncentracije pufera na topljivost LOR. Uočeno je da je pri nižim pH-vrijednostima otopine favoriziran nastanak 1:1 kompleksa, budući da su uočene krivulje A_L tipa. Međutim, pri višim pH-vrijednostima uočene su krivulje A_P tipa, što ukazuje na nastanak 1:1 i 1:2 kompleksa. Budući da povećanjem pH-vrijednosti otopine vrijednosti konstanti stabilnosti rastu, može se zaključiti da loratadin ima veći afinitet prema ciklodekstrinima kada je u obliku neutralne molekule zbog veće hidrofobnosti. Sličan trend uočen je i pri različitim koncentracijama pufera, gdje pri višim koncentracijama dolazi do nastanka 1:1 kompleksa veće stabilnosti. Molekulskim modeliranjem 1:1 kompleksa pokazalo se da do inkluzije dolazi uklapanjem klorofenilnog dijela molekule, a dušik i karbonilna skupina piperidinskog prstena tvore vodikove veze s hidroksilnim skupinama šireg ruba ciklodekstrina. Nastajanje kompleksa 1:2 uključuje interakcije piridinskog dijela molekule s drugom molekulom β -CD.¹¹⁷

Kompleksiranje loratadina s dimetil β -CD (engl. *dimethyl β -cyclodextrin*, DIMEB) istraženo je u radu Nacs i sur (2008). Kompleksi stehiometrijskih omjera 1:1, 1:2 i 1:3 pripremljeni su mikrovalnim zračenjem i gnječenjem te karakterizirani DSC, TG i FT-IR tehnikama. Istraživanje *in vitro* otapanja pri pH 7,0 pokazalo je značajno povećanje topljivosti LOR u svim pripremljenim uzorcima, pogotovo u onima s većim udjelom ciklodekstrina. Način pripreme kompleksa nije imao značajan utjecaj na rezultate.¹¹⁸ Daljnjim istraživanjem ispitan je utjecaj prirodnih ciklodekstrina te metiliranih i hidroksialkiliranih derivata β -CD kao i alkilsulfoniranog β -CD na topljivost LOR u vodi, pri čemu je najveće povećanje uzrokovao DIMEB. Kompleks LOR:DIMEB 1:2 pripremljen je u čvrstom stanju metodom gnječenja te je ispitan utjecaj pH otopine na topljivost LOR u pripremljenim uzorcima. Poznato je da je topljivost LOR ovisna o pH otopine, te je znatno smanjena pri višim pH. Međutim, kompleksiranje s DIMEB uzrokuje topljivost neovisnu o pH otopine.¹¹⁹ U nastavku istraživanja inkluzijski kompleks LOR:DIMEB karakteriziran je spektroskopijom NMR tehnikom DOSY i spektrometrijom masa, čime se potvrdio nastanak kompleksa stehiometrije 1:1. Međutim, rezultati *in vitro* otapanja i *in vivo* eksperimenata ukazuju da je potrebna veća količina ciklodekstrina za poboljšanje svojstva loratadina. Stoga je kompleks pripremljen u omjeru 1:2 pogodniji.⁵

Poboljšanje topljivosti LOR u prisutnosti β -CD u vodi istraženo je u radu Singh i sur iz 2013. godine. Kruti kompleksi pripravljeni su metodom gnječenja i okarakterizirani tehnikama SEM, DSC, FT-IR i PXRD. Osim toga pripravljeni su i mukoadhezivni gelovi za nazalnu

upotrebu te su ispitana njihova svojstva. Rezultati ukazuju na potencijal ove formulacije s poboljšanim svojstvima, međutim potrebna su dodatna klinička istraživanja.¹²⁰

Pretragom literature pronađena su dva rada u kojima je korišteno mljevenje kao tehnika pripreme inkluzijskih kompleksa. U radu Lin i sur. iz 2010. godine pripremljeni su kompleksi s HP- β -CD u stehiometrijskim omjerima 1:1 i 1:2 te karakterizirani tehnikama DSC i FT-IR. Ovaj način pripreme uspoređen je s konvencionalnijim načinom koevaporacije, te se pokazalo da je mljevenje jednako efikasno.⁴ U nastavku istraživanja, detaljnim istraživanjem tijeka mljevenja LOR s β -CD i HP- β -CD predložen je mehanizam nastanak inkluzijskih kompleksa koji uključuje postepeno smanjenje kristaliničnosti i nastajanje amornog LOR što potiče uklapanje LOR u šupljinu CD uslijed daljnjeg mljevenja.¹²¹

Dosad spomenuti radovi istraživali su samo binarne smjese LOR i CD. Međutim, moguć je i sinergistički utjecaj treće komponente. Tako su Ramesh i sur. 2020. godine istraživali ternarne sustave LOR, SBE- β -CD i dva hidrofilna polimera, gelucir i soluplus. Uočen je sinergistički utjecaj SBE- β -CD i polimera na topljivost i profil *in vitro* otapanja, te ovakvi ternarni sustavi imaju potencijal pri razvoju novih formulacija s trenutnim oslobađanjem.¹²²

Stabilnost loratadina u prisutnosti ciklodekstrina nije detaljno istražena. Pretragom literature pronađen je samo jedan rad u kojem se istraživala fotostabilnost loratadina u prisutnosti prirodnih ciklodekstrina. Binarni sustavi prirodnih CD i LOR pripremljeni su metodom koevaporacije te je fotostabilnost dobivenih sustava istražena prema ICH smjernicama opisanim u priručniku Q1B pod opcijom 2. Uzorci nakon razgradnje analizirani su tekućinskom kromatografijom uz detektor s nizom dioda. Rezultati ukazuju na nastanak manjeg broja razgradnih produkata LOR u prisutnosti ciklodekstrina, u usporedbi sa samim LOR. Iako su uočena dva nova kromatografska pika u uzorcima binarnih sustava, nije provedena njihova strukturna karakterizacija te se ne može sa sigurnošću reći dolazi li do nastanka novih razgradnih produkata.¹²³

Pregledom postojećih radova može se zaključiti da postoji potreba za sistematičnim i detaljnim istraživanjem binarnih sustava loratadina i ciklodekstrina. Primjerice, uočena su velika odstupanja između određenih konstanti stabilnosti, što može biti posljedica pogrešno određene intrinzične topljivosti LOR. Također, mljevenjem su pripremljeni samo binarni sustavi s HP- β -CD, a utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina nije detaljno istražen. Stoga će cilj ovoga rada biti detaljna i sistematična karakterizacija binarnih sustava LOR i β -CD te njegovog hidroksipropil, nasumično metiliranog i sulfoalkiliranog derivata u otopini i čvrstom

stanju. Time se omogućuje uvid u svojstva nastalih inkluzijskih kompleksa te bolji odabir sustava koji imaju potencijal pri razvoju novih formulacija s poboljšanim svojstvima.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i materijali

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- Loratadin, $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$ (LOR); Carbosynth, Ujedinjeno kraljevstvo
- β -ciklodekstrin, $C_{42}H_{70}O_{35}$, (β -CD); Cyclolab, Mađarska
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_3H_7O)_n$, DS = 4,5 (HP- β -CD); Cyclolab, Mađarska
- nasumično metilirani β -ciklodekstrin, $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n$, DS = 12 (RM- β -CD); Cyclolab, Mađarska
- natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina, $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8O_3SNa)_n$, DS = 6,5 (SBE- β -CD); Cyclolab, Mađarska
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , stupnja čistoće *pro analysi*; Kemika, Hrvatska
- klorovodična kiselina, HCl (w = 37 %), stupnja čistoće *pro analysi*; GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
- natrijev hidroksid, NaOH, stupnja čistoće *pro analysi*; Carlo Erba Reagents, Francuska
- simulirani duodenalni medij, pH = 4,5; pripremljen prema uputama iz jedanaestog izdanja Europske farmakopeje¹²⁴
- simulirani crijevni medij, pH = 6,8; pripremljen prema uputama iz jedanaestog izdanja Europske farmakopeje¹²⁴
- vodikov peroksid, H_2O_2 (w = 30 %), stupnja čistoće *pro analysi*; VWR Chemicals BDH, Francuska
- acetonitril, CH_3CN (ACN), stupnja čistoće za HPLC; J. T. Baker, SAD
- metanol, CH_3OH (MeOH), stupnja čistoće za HPLC; J. T. Baker, SAD
- etanol, C_2H_5OH , stupnja čistoće *pro analysi*; GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
- metanol, CH_3OH , stupnja čistoće za LC-MS; Carlo Erba Reagents, Francuska
- amonijev formijat, NH_4HCOO (NH_4Fo), stupnja čistoće za LC-MS; Carlo Erba Reagents, Francuska
- mravlja kiselina, $HCOOH$ (FoA), stupnja čistoće za LC-MS; Carlo Erba Reagents, Francuska

- amonijev acetat, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (NH_4Ac), stupnja čistoće za LC-MS; Carlo Erba Reagents, Francuska
- octena kiselina, CH_3COOH (HAc), stupnja čistoće za LC-MS; Carlo Erba Reagents, Francuska
- ultračista voda dobivena korištenjem Mili-Q Advantage A10 sustava za pročišćavanje; Merck, Njemačka
- membranski filtri Chromafil Xtra H-PTFE 45/25, veličina pora 0,45 μm ; Macherey-Nagel, Njemačka
- membranski filtri Chromafil O-20/15 MS, veličina pora 0,20 μm ; Macherey-Nagel, Njemačka
- membranski filtri Chromafil Xtra PES-20/25, veličina pora 0,20 μm ; Macherey-Nagel, Njemačka

3.1.1. Priprema simuliranih biorelevantnih medija

Simulirani biorelevantni mediji pripremljeni su prema uputama iz jedanaestog izdanja Europske farmakopeje.¹²⁴ Za podešavanje pH pripremljenih otopina korišten je pH-metar *MP-220 Mettler Toledo*, kalibriran fosfatnim (pH 7,0) i acetatnim puferom (pH 4,0).

Otopina simuliranog duodenalnog medija (engl. *simulated duodenal medium*, SDM) pripremljena je otapanjem 13,61 g KH_2PO_4 u 750 mL ultračiste vode. Otopini je po potrebi pH podešen na 4,5 pomoću HCl ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) ili NaOH ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), te je tikvica od 1000 mL nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

Otopina simuliranog intestinalnog medija (engl. *simulated intestinal medium*, SIM) pripremljena je pipetiranjem 250,0 mL otopine KH_2PO_4 ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) i 112,0 mL otopine NaOH ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) u odmjernu tikvicu od 1000 mL, koja je potom nadopunjena ultračistom vodom do oznake.

3.2. Metode karakterizacije

3.2.1. Solubilizacijska istraživanja

Istražen je utjecaj β -CD i njegovih derivata na topljivost LOR u vodi, simuliranom duodenalnom i simuliranom intestinalnom mediju. Zbog dobre topljivosti loratadina pri niskim pH-vrijednostima, utjecaj ciklodekstrina na topljivost LOR u simuliranom želučanom mediju (pH 1,2) nije istražen.

Preliminarna istraživanja provedena su odvagom suviška LOR (10 mg za vodu i SIM, 40 mg za SDM) kojima je dodan određen volumen otapala (5 mL vode ili SIM, 20 mL SDM) i odvagana određena količina CD tako da je njihova konačna koncentracija iznosila $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Budući da β -CD ima značajno nižu topljivost od njegovih derivata, dodana je količina β -CD tako da je njegova konačna koncentracija iznosila $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Uzorci su miješani na tresilici pri sobnoj temperaturi, a alikvoti su uzimani svaka 24 sata. Alikvoti uzoraka su profiltrirani preko *Chromafil Xtra H-PTFE* filtra (veličina pora 0,45 μm) proizvođača Macherey-Nagel (Njemačka) te su potom razrijeđeni, tako da je alikvotu uzorka u određenom otapalu bio dodan metanol, te je konačni omjer metanola i alikvota uzorka bio 40:60 (v/v). Kao otapala uzorka korišteni su voda, SDM ili SIM. Uzorci su analizirani spektrofotometrijski ($\lambda_{\text{max}} = 247 \text{ nm}$) pomoću *Specord 200* spektrometra proizvođača Analytik Jena (Njemačka). Raspon valnih duljina bio je (190 – 500) nm, s postavljenom širinom pukotine od 2 nm i brzinom snimanja od 10 nm s^{-1} . Korištene su konvencionalne kvarcne kivete ($l = 1 \text{ cm}$).

Zbog veoma niske topljivosti LOR pri višem pH, uzorak samog LOR, bez dodanih ciklodekstrina, u vodi i u SIM nije bilo moguće analizirati spektrofotometrijski te je korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Analiza je provedena pomoću instrumenta *Agilent 1220 Infinity* opremljenog binarnom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatiranim pretincem za kolonu i detektorom varijabilne valne duljine. Kromatografsko razdvajanje provedeno je na koloni *Zorbax Eclipse XDB-C18* ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, 5 μm). Mobilna faza sastojala se od acetonitrila i vodene otopine amonijevog acetata ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH podešen na 4,0 pomoću octene kiseline) u omjeru 70:30 (v/v). Protok mobilne faze iznosio je $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura kolone $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Valna duljina detekcije iznosila je 250 nm, a volumen injektiranja 10 μL .

Solubilizacijska istraživanja LOR u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima provedena su tako da je odvagan LOR u suvišku i dodan u 5 mL otapala u koje je također odvagana određena količina CD tako da je konačni koncentracijski raspon za derivate β -CD iznosio $(0 - 40) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, odnosno $(0 - 12,5) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (za β -CD). Uzorci su potom miješani na tresilici na sobnoj temperaturi do uspostavljanja ravnoteže (72 sata), razrijeđeni metanolom tako da je konačni udio metanola iznosio 40 % i analizirani spektrofotometrijski ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti kako je prethodno opisano.

U svakom je uzorku izračunata koncentracija otopljenog LOR te je konstruiran graf ovisnosti koncentracije LOR o koncentraciji dodanog CD te je vrijednost topljivosti samog

LOR (S_0) fiksirana za svaki set podataka, ovisno o eksperimentalnim podacima. Iz nagiba dobivenog pravca i eksperimentalno dobivene topljivosti samog LOR izračunate su konstante stabilnosti kompleksa ($K_{1:1}$) i učinkovitost kompleksiranja (CE) prema jednadžbama:

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

$$CE = \frac{\text{nagib}}{1-\text{nagib}} \quad (8)$$

gdje S_0 označava topljivost loratadina.

Solubilizacijski potencijal ($S_{\max}/S_0$) računat je kao omjer koncentracije otopljenog LOR pri maksimalnoj koncentraciji CD ($S_{\max}$) i koncentracije otopljenog LOR bez prisutnosti CD (S_0).

Za sustave u kojima je uočen A_P tip krivulja, za izračun konstanti stabilnosti i učinkovitosti kompleksiranja uzet je samo linearan dio krivulje. Eksperimenti su ponovljeni tri puta za svaki ciklodekstrin.

Spektrofotometrijsku i kromatografsku metodu koje su korištene za kvantifikaciju loratadina u uzorcima bilo je potrebno validirati prema ICH smjernicama. U tu svrhu određeni su sljedeći parametri: područje linearnosti, granice detekcije i kvantifikacije, točnost, selektivnost, preciznost i robusnost.^{108,109} Budući da je uočen utjecaj otapala na spektar loratadina, spektrofotometrijske metode validirane su za svako otapalo (voda, simulirani duodenalni medij i simulirani intestinalni medij).

a) Područje linearnosti

Pripremljeni su standardi loratadina u području koncentracija ($2 - 25$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ za spektrofotometrijske metode i ($0,5 - 20$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ za kromatografsku metodu

b) Granice detekcije i kvantifikacije

Granice detekcije i kvantifikacije određene su pripremom niza otopina loratadina u području ($0,5 - 3,5$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ za spektrofotometrijske metode i ($0,04 - 0,16$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ za kromatografsku metodu. Očitane su apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma, odnosno površine kromatografskog pika loratadina, te je regresijskom analizom određen nagib pravca (S) i standardna devijacija (σ). Granice detekcije i kvantifikacije određene su prema formulama:

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (9)$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (10)$$

c) Točnost

Točnost spektrofotometrijskih metoda određena je pripremanjem po 3 otopine loratadina koncentracija 5 i 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a točnost kromatografske metode određena je pripremanjem po 3 otopine loratadina koncentracija 1 i 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koje su potom analizirane. Na temelju očitanih apsorbancija pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije, odnosno površina kromatografskih pikova loratadina izračunate su koncentracije i analitički povrat kao omjer izračunatih i očekivanih koncentracija.

d) Preciznost metode

Preciznost metode određena je na temelju tri parametra, ponovljivosti metode, ponovljivosti instrumenta i međupreciznosti. Ponovljivost metode određena je pripremom po 3 otopine loratadina koncentracija 5 i 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (za spektrofotometrijske metode), odnosno 1 i 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (za kromatografsku metodu) koje su potom analizirane. Ponovljivost instrumenta određena je snimanjem jedne otopine tri puta. Međupreciznost je određena pripremom po jedne otopine loratadina prethodno navedenih koncentracija koje su potom analizirane tri dana za redom. Očitane su apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma, odnosno površine kromatografskih pikova i izračunato je relativno standardno odstupanje.

e) Robusnost

Robusnost kromatografske metode određena je uvođenjem malih varijacija u protok mobilne faze, temperaturu kolone, početni sastav mobilne faze i valnu duljinu detekcije, a robusnost spektrofotometrijske metode određena je uvođenjem malih varijacija u sastavu otapala i valne duljine očitavanja apsorbancije, korištene za izračun koncentracije.

f) Specifičnost/selektivnost

Specifičnost/selektivnost metode provedena je tako da je otopina loratadina pripremljena u prisutnosti ciklodekstrina i spektrofotometrijski analizirana. Time je istražen utjecaj ciklodekstrina na UV-Vis spektar loratadina. Specifičnost/selektivnost kromatografske metode provedena je analizom kromatograma otopine loratadina, budući da su kromatografski analizirane otopine samog loratadina, bez prisutnosti ciklodekstrina.

3.2.2. Spektrometrija masa visokog razlučivanja

Analiza inkluzijskih kompleksa, loratadina, β -ciklodekstrina i njegovih derivata provedena je pomoću spektrometra masa visokog razlučivanja *Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-flight (QTOF)* uz direktno uvođenje uzoraka pomoću *Agilent 1290 Infinity*

II UHPLC sustava uz elektroraspršenje kao metodu ionizacije. Otopine uzoraka pripremljene su tako da je konačna koncentracija loratadina iznosila $4,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ili $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a konačni omjer LOR:CD iznosio je 1:1 (za β -CD), 1:2 (za RM- β -CD), odnosno 1:5 (za HP- β -CD i SBE- β -CD). Kao otapalo korištena je smjesa metanola i vode u omjeru 50:50 (v/v).

Otopine uzoraka uvedene su u instrument injektiranjem 5 μL uz protok mobilne faze 0,4 mL min^{-1} . Mobilna faza sastojala se od 0,1 % mravlje kiseline u vodi (A) i u metanolu (B), u omjeru A:B = 50:50 (v/v). Spektri su snimani u pozitivnom načinu snimanja u rasponu vrijednosti m/z (390 – 3200) pri rezoluciji od 2 GHz. Parametri ionskog izvora ugođeni su na temelju praćenja intenziteta signala protoniranog iona koji odgovara kompleksu LOR i β -CD u stehiometrijskom omjeru 1:1, $[\text{LOR}/\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$ (m/z 1517,5218). Konačni parametri navedeni su u tablici 3. Kao protočni plin i plin za desolvaciju korišten je dušik.

Tablica 3. Parametri ionskog izvora optimizirani za detekciju kompleksa LOR i CD

Temperatura protočnog plina / °C	200
Protok protočnog plina / L min^{-1}	11
Tlak raspršivača/ psi	25
Potencijal kapilare / V	4000
Potencijal mlaznice / V	500
Temperatura plina za desolvaciju / °C	200
Protok plina za desolvaciju / L min^{-1}	15

3.2.3. Priprema binarnih sustava loratadina i ciklodekstrina u čvrstom stanju

Binarni sustavi loratadina i β -ciklodekstrina i njegovih derivata pripremljeni su u stehiometrijskim omjerima LOR:CD 1:1 i 1:2 mehanokemijskom aktivacijom i sušenjem raspršivanjem.

Mljeveni uzorci pripremljeni su u kugličnom vibracijskom mlinu *Retsch Mixer Mill MM 500 CONTROL* (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) korištenjem posudica za mljevenje i kuglica od cirkonijevog oksida.

Budući da je solubilizacijskim istraživanjima pokazano da su vrijednosti konstante stabilnosti loratadina i HP- β -CD najmanje u odnosu na ostale ciklodekstrine, što ukazuje na najmanji afinitet loratadina prema interakciji s HP- β -CD, može se pretpostaviti da će priprava binarnih sustava s ovim ciklodekstrinom biti tehnološki najzahtjevnija. Stoga je optimizacija procesa mljevenja provedena na sustavu LOR:HP- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1. Uzorak je pripremljen tako da su odvagani LOR i HP- β -CD u ekvimolarnom omjeru. Istražen je utjecaj

ukupne mase uzorka (2,5 g i 1g), frekvencije mljevenja (15 Hz i 25 Hz) te broja (5, 10 i 15) i vrste kuglica za mljevenje (kuglice promjera 5 i 10 mm). Tijek mljevenja praćen je razlikovnom pretražnom kalorimetrijom tako da je svakih deset minuta uziman alikvot uzorka i analiziran. Vrijeme mljevenja određeno je kao vrijeme u kojemu je došlo do potpune amorfizacije loratadina u binarnom sustavu LOR:HP- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1.

Binarni sustavi LOR:CD pripremljeni su metodom sušenja raspršivanjem tako da su prvo pripremljene otopine loratadina u etanolu i ciklodekstrina u vodi. Odvagane su količine loratadina i ciklodekstrina tako da su nakon miješanja bili u stehiometrijskim omjerima 1:1 i 1:2. Nakon toga su otopine pomiješane i uvedene u uređaj *B-290 mini spray dryer* proizvođača Buchi (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Ulazna temperatura iznosila je 120 °C, a izlazna 67 °C. Kapacitet aspiratora, odnosno protoka zraka, bio je podešen na 100 %, a kapacitet pumpe na 5 %.

3.2.4. Karakterizacija binarnih sustava u čvrstom stanju

Uzorci binarnih sustava LOR:CD pripremljeni mljevenjem i sušenjem raspršivanjem analizirani su razlikovnom pretražnom kalorimetrijom, infracrvenom spektroskopijom i difrakcijom rendgenskog zračenja na praškastom uzorku.

Razlikovna pretražna kalorimetrija korištena je za praćenje tijeka mljevenja i za karakterizaciju produkata pripremljenih sušenjem raspršivanjem. Mjerenja su provedena pomoću uređaja *TA DSC 250* proizvođača TA Instruments, SAD (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) u struji dušika. U aluminijske posudice odvagano je otprilike 2 mg uzorka, te su DSC krivulje uzoraka snimljene pri brzini zagrijavanja 10 °C min⁻¹ u temperaturnom rasponu (20 – 160) °C. Za određivanje tališta loratadina korištena je temperatura maksimuma signala. Udio kristalne frakcije loratadina u uzorcima (engl. *relative degree of crystallinity*, RDC) izračunat je prema formuli

$$\text{RDC} = \frac{\Delta H_{\text{uzorak}}}{\Delta H_{\text{LOR}}} \times 100 \% \quad (11)$$

gdje je ΔH_{uzorak} entalpija taljenja LOR u pripremljenom uzorku, a ΔH_{LOR} entalpija taljenja netretiranog LOR, a obje entalpije normirane su obzirom na udio LOR u uzorku.

Analiza infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama provedena je tehnikom prigušene totalne refleksije. Infracrveni spektri snimljeni su pomoću IR spektrometra *Vector 22* tvrtke Bruker opremljenim *PIKE MIRacle ATR* nosačem s dijamant/ZnSe plohom. Spektri su snimani u području valnih brojeva (4000 – 600) cm⁻¹ pri rezoluciji od 4 cm⁻¹ i rezultat

su uprosječivanja 32 snimanja. Također su snimljeni i spektri samog LOR i CD te fizičkih smjesa.

Analiza difrakcije rendgenskih zraka na praškastom uzorku provedena je pri sobnoj temperaturi pomoću instrumenta *Panalytical Empyrean* Bragg-Brentano geometrije (Malvern Panalytical, Ujedinjeno Kraljevstvo) opremljenim bakrovom anodom ($\text{CuK}\alpha$; $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), Ni filterom i PIXcel3D-Medipix3 detektorom. Podaci su prikupljeni kontinuirano u rasponu vrijednosti kutova 2θ od 3° do 40° s brzinom pretraživanja $0,022^\circ \text{ s}^{-1}$ pri čemu se brojač u pojedinoj točki zadržavao 18,87 s.

3.2.5. Određivanje zasićene topljivosti loratadina i pripremljenih binarnih sustava

Istražena je zasićena topljivost loratadina i binarnih sustava LOR:CD pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem. Uzorci su odvagani tako da je masa LOR iznosila 20 mg, osim u slučaju uzorka LOR:RM- β -CD 1:2 gdje je masa LOR iznosila 30 mg (tablica 4). U uzorke je dodano 5 mL simuliranog intestinalnog medija. Uzorci su potom stavljeni na tresilicu na sobnoj temperaturi 72 sata. Nakon toga su profiltrirani i po potrebi razrijeđeni te analizirani spektrofotometrijski ($\lambda_{\text{max}} = 247 \text{ nm}$) prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1. Svi uzorci su pripremljeni u triplikatima.

Tablica 4. Odvage LOR i binarnih sustava LOR:CD pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem za određivanje zasićene topljivosti

Uzorak	$m(\text{uzorak}) / \text{mg}$
LOR	20,00
LOR: β -CD 1:1	80,00
LOR: β -CD 1:2	142,86
LOR:HP- β -CD 1:1	90,91
LOR:HP- β -CD 1:2	153,85
LOR:RM- β -CD 1:1	86,96
LOR:RM- β -CD 1:2	230,00
LOR:SBE- β -CD 1:1	133,00
LOR:SBE- β -CD 1:2	246,00

3.2.6. Određivanje brzine *in vitro* otapanja LOR u pripremljenim binarnim sustavima

Određivanje brzine *in vitro* otapanja istraženo je metodom s lopaticama pomoću instrumenta *Agilent 708-DS Dissolution Apparatus* (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) prema uputama europske farmakopeje.¹²⁴

Loratadin i binarni sustavi LOR:CD pripremljeni mljevenjem i sušenjem raspršivanjem dodani su u 900 mL medija za otapanje, termostetiranog na 37 °C. Odvage uzoraka prikazane su u tablici 5, a odvagane su tako da je masa LOR u svakom uzorku iznosila 10 mg, što odgovara standardnoj oralnoj terapijskoj dozi lijeka. Kao medij za otapanje korišten je simulirani crijevni medij. Brzina miješanja podešena je na 50 rpm. Alikvoti od 5 mL uzorkovani su u vremenskim intervalima od 5, 10, 15, 20, 30, 45 i 60 min od početka eksperimenta. Kako bi se osigurao konstantan volumen medija za oslobađanje tijekom cijelog eksperimenta, nakon svakog uzorkovanja dodan je jednak volumen termostetiranog medija za oslobađanje. Alikvoti su profiltrirani preko *Chromafil Xtra PES-20/25* filtera, te analizirani spektrofotometrijski pomoću *Agilent Cary 60* UV-Vis spektrofotometra (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Očitana je apsorbancija pri 248 nm. Sva mjerenja provedena su tri puta. Zbog veoma loše topljivosti loratadina pri ispitivanoj pH-vrijednosti, za kvantifikaciju uzoraka samog loratadina i mljevenog loratadina korištena je tekućinska kromatografija prema metodi razvijenoj za solubilizacijska istraživanja.

Tablica 5. Odvage LOR i binarnih sustava LOR:CD pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem za određivanje brzine *in vitro* otapanja LOR

Uzorak	<i>m</i> (uzorak) / mg
LOR	10,0
LOR:β-CD 1:1	40,0
LOR:β-CD 1:2	71,4
LOR:HP-β-CD 1:1	45,5
LOR:HP-β-CD 1:2	83,3
LOR:RM-β-CD 1:1	43,5
LOR:RM-β-CD 1:2	76,9
LOR:SBE-β-CD 1:1	66,7
LOR:SBE-β-CD 1:2	125,0

Na temelju dobivenih profila otapanja loratadina izračunata je učinkovitost *in vitro* otapanja (engl. *dissolution efficiency*, DE) prema formuli

$$DE = \frac{\int_0^t Q dt}{Q_{100\%} \times t} \times 100 \quad (12)$$

gdje je *Q* udio otopljenog loratadina, a *t* vrijeme.

Također je izračunat i faktor povećanja učinkovitosti *in vitro* otapanja (engl. *dissolution enhancement factor*, DEF) prema formuli

$$\text{DEF} = \frac{\text{DE(uzorak)}}{\text{DE(LOR)}} \quad (13)$$

gdje je učinkovitost otapanja LOR u uzorcima normirana u odnosu na učinkovitost otapanja samog loratadina.

Učinak ciklodekstrina i načina pripreme uzoraka na otapanje loratadina dodatno je vrednovan na temelju izračuna faktora sličnosti, f_2 , prema formuli

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

gdje je n ukupan broj vremenskih točaka uzorkovanja, a R_t i T_t su srednje postotne vrijednosti otopljene količine lijeka iz referentnog, odnosno testnog sustava u nekoj vremenskoj točki t ($1 \leq t \leq n$).¹²⁵ Budući da su za računanje vrijednosti f_2 u ovom radu korištene prosječne vrijednosti tri mjerenja, rezultati su izraženi kao prosječni faktori sličnosti.

3.2.7. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina

Istražen je utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina provođenjem eksperimenata prisilne razgradnje, ubrzane razgradnje te fotorazgradnje. Međutim, prije provođenja navedenih istraživanja bilo je potrebno razviti i validirati metodu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda (engl. *ultrahigh performance liquid chromatography diode array detector*, UHPLC-DAD).

3.2.1.1. Razvoj i validacija metode analize LOR u prisutnosti razgradnih produkata

Razgradnja loratadina praćena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (*Agilent 1290 Infinity II*) uz detektor s nizom dioda. Kromatografsko razdvajanje provedeno je na koloni *Zorbax Eclipse Plus C18* ($2,1 \times 50$ mm, $1,8 \mu\text{m}$) pri protoku $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ i temperaturi kolone 40°C . Kako bi se odredili optimalni uvjeti snimanja LOR, ispitane su različite mobilne faze (tablica 6) uz gradijentno eluiranje (tablica 7). Valna duljina detekcije bila je 278 nm , a volumen injektiranja $5 \mu\text{L}$.

Tablica 6. Ispitane mobilne faze pri razvoju metode određivanja LOR u prisutnosti razgradnih produkata

Metoda	Mobilna faza A	Mobilna faza B
A	0,1 % FoA u H ₂ O	0,1 % FoA u ACN
B	0,1 % FoA u H ₂ O	0,1 % FoA u MeOH
C	5 mmol L ⁻¹ NH ₄ Fo u H ₂ O	ACN
D	5 mmol L ⁻¹ NH ₄ Fo u H ₂ O	MeOH
E	5 mmol L ⁻¹ NH ₄ Ac u H ₂ O	ACN
F	5 mmol L ⁻¹ NH ₄ Ac u H ₂ O	MeOH

FoA – mravlja kiselina; NH₄Fo – amonijev formijat; NH₄Ac – amonijev acetat; ACN – acetonitril; MeOH – metanol

Tablica 7. Program gradijentnog eluiranja metode analize LOR u prisutnosti razgradnih produkata

Vrijeme / min	Sastav mobilne faze A / %
0	95
13	5
15	95

Nakon odabira optimalnih uvjeta, metoda je validirana prema ICH smjernicama, te su određeni sljedeći parametri: područje linearnosti, granice detekcije i kvantifikacije, točnost, preciznost i robusnost.^{108,109}

a) *Područje linearnosti*

Pripremljeni su standardi loratadina u metanolu u području koncentracija (5 – 50) µg mL⁻¹.

b) *Granice detekcije i kvantifikacije*

Granice detekcije i kvantifikacije određene su pripremom niza otopina loratadina u području (0,5 – 5) µg mL⁻¹. Svaki standard injektiran je tri puta te su očitane površine ispod kromatografskih pikova. Regresijskom analizom određen je nagib pravca (*S*) i standardna devijacija (*σ*). Granice detekcije i kvantifikacije određene su prema formulama:

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (15)$$

$$\text{LOQ} = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (16)$$

c) *Točnost*

Točnost metode određena je pripremanjem po 6 otopina loratadina koncentracija 10, 30 i 50 µg mL⁻¹ koje su potom analizirane. Na temelju očitanih površina kromatografskih pikova

loratadina izračunate su koncentracije i analitički povrat, kao omjer izračunatih i očekivanih koncentracija.

d) Preciznost metode

Preciznost metode određena je na temelju tri parametra, ponovljivosti metode, preciznosti injektiranja i međupreciznosti. Ponovljivost metode određena je pripremom po 6 otopina loratadina koncentracija 10, 30 i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koje su potom analizirane. Očitane su površine kromatografskih pikova i izračunato je relativno standardno odstupanje. Preciznost injektiranja određena je uzastopnim injektiranjem otopina loratadina koncentracija 10, 30 i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, očitanjem vremena zadržavanja i površine kromatografskih pikova loratadina te računanjem relativnog standardnog odstupanja. Međupreciznost je određena pripremom po jedne otopine loratadina koncentracije 10, 30 i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koje su potom analizirane kroz tri dana.

e) Robusnost

Robusnost je određena uvođenjem malih varijacija u protok mobilne faze, temperaturu kolone i početni sastav mobilne faze.

f) Specifičnost/selektivnost

Specifičnost/selektivnost metode provedena je tako da su snimljeni kromatogrami otopina loratadina izloženih razgradnji pri lužnatim i oksidativnim uvjetima. Nakon toga, određeno je dolazi li do preklapanja kromatografskog pika loratadina i kromatografskih pikova njegovih nastalih razgradnih produkata.

3.2.1.2. Prisilna razgradnja loratadina

Provedena je prisilna razgradnja loratadina prema ICH smjernicama.¹²⁶ Razgradnja je provedena u kiselim, bazičnim i oksidativnim uvjetima, pri sobnoj temperaturi te pri povišenoj temperaturi.

Otopina loratadina pripremljena je otapanjem u metanolu tako da je konačna koncentracija LOR iznosila 1,0026 mg mL^{-1} . Uzorci za prisilnu razgradnju pripremljeni su u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da je otpipetiran 1 mL otopine LOR te je dodan 1 mL stresora (1 mol L^{-1} HCl, 1 mol L^{-1} NaOH ili 3 % H_2O_2). Uzorci su potom ostavljeni na sobnoj temperaturi ili zagrijavani u vodenoj kupelji na 80 °C u različitim vremenskim periodima (0 h, 1 h, 2 h, 5 h i 8 h). Nakon određenog vremena, uzorci za razgradnju pri kiselim i bazičnim uvjetima neutralizirani su s 1 mL neutralizacijskog sredstva (1 mol L^{-1} NaOH ili 1 mol L^{-1} HCl), te nadopunjeni do oznake metanolom, profiltrirani i razrijeđeni po potrebi. Također su

pripremljeni i kontrolni uzorci gdje je u odmjernu tikvicu od 10 ml otpipetiran 1 mL otopine LOR i nadopunjeno do oznake metanolom, profiltrirano i razrijeđeno kao i uzorci nakon prisilne razgradnje. Pripremljeni su i uzorci slijepe probe gdje su dodani samo stresori. Uzorci su analizirani prethodno validiranom UHPLC-DAD metodom. Očitane su površine kromatografskog pika loratadina i izračunat je udio razgradnje.

Prisilna razgradnja mljevenih binarnih sustava LOR:CD stehiometrijskih omjera 1:1 i 1:2 provedena je pripremom uzoraka otapanjem 10 mg uzoraka u 10 mL 75 %-tnog metanola. Uzorci za prisilnu razgradnju pripremljeni su na isti način kao i u slučaju samog LOR, međutim dodatno razrjeđivanje nije bilo potrebno. Uzorci su analizirani nakon 8 sati razgradnje na sobnoj temperaturi i pri 80 °C.

3.2.1.3. Analiza razgradnih produkata spektrometrijom masa visokog razlučivanja

Uzorci loratadina i binarnih sustava LOR:CD nakon 8 sati razgradnje u kiselom i bazičnom mediju te pri oksidativnim uvjetima, analizirani su spregnutim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (*Agilent 1290 Infinity II*) i spektrometrije masa visokog razlučivanja (*Agilent 6550 QTOF*). Kromatografski uvjeti bili su isti kao i pri analizi metodom UHPLC-DAD, a parametri spektrometra masa navedeni su u tablici 8.

Tablica 8. Parametri ionskog izvora optimizirani za analizu razgradnih produkata LOR

Temperatura protočnog plina / °C	350
Protok protočnog plina / L min ⁻¹	11
Tlak raspršivača / psi	35
Potencijal kapilare / V	3500
Potencijal mlaznice / V	1000
Temperatura plina za desolvaciju / °C	200
Protok plina za desolvaciju / L min ⁻¹	14
Raspon <i>m/z</i>	100 – 1000
Ionizacija	ESI(+)

3.2.1.4. Fotostabilnost loratadina

Fotostabilnost loratadina ispitana je prema ICH smjernicama iz poglavlja Q1B.¹²⁷ Uzorci LOR i odabranih binarnih sustava LOR:CD u triplicatu nanieseni su u ravnomjernom sloju u kromatografske bočice. Kontrolni uzorci pripremljeni su na isti način i zamotani u aluminijsku foliju. Svi uzorci smješteni su u stabilitetne komore *Memmert ICH110L eco* (Zavod za

farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) i izloženi izvoru dnevnog svjetla (8,5 kLux) u trajanju od 141,2 sata te izvoru UV zračenja (5 W m^{-2}) u trajanju od 40 sati kako bi se osigurali standardni uvjeti osvjetljenosti od $1\,200\,000 \text{ Lux h}$ i 200 W h m^{-2} propisanih od strane ICH.¹²⁷ Uzorci su potom otopljeni, profiltrirani i analizirani prethodno validiranom metodom UHPLC-DAD. Međutim, korištena je kolona *Waters Acquity BEH C18* ($2,1 \times 100 \text{ mm}$, $1,7 \mu\text{m}$), budući da je prethodno korištena *Zorbax* kolona bila neupotrebljiva zbog veoma visokog tlaka u koloni, koji je vjerojatno uzrokovan zaostalim ciklodekstrinima vezanima na stacionarnu fazu.¹²⁸ Stoga je metoda ponovno revalidirana prema već navedenim parametrima.

3.2.1.5. Studije ubrzane razgradnje loratadina

Istražena je stabilnost loratadina i odabranih binarnih sustava LOR:CD provođenjem eksperimenata dugotrajne razgradnje prema ICH smjernicama.¹²⁶ Uzorci su odvagani u triplikatima tako da je konačna masa LOR iznosila 1 mg te pohranjeni u stabilitetne komore *Memmert ICH110L eco* (Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) termostatirane na temperaturu od $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uz relativnu vlažnost od 75 %. Ubrzana razgradnja provedena je šest mjeseci, uz periodičnu analizu tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti svakih mjesec dana.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj ciklodekstrina na topljivost loratadina

Istražen je utjecaj β -ciklodekstrina i njegovih derivata (HP- β -CD, RM- β -CD i SBE- β -CD) na topljivost loratadina u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima. Prvo je bilo potrebno razviti i validirati UV-Vis metode analize loratadina u prisutnosti ciklodekstrina u ispitivanim biorelevantnim medijima. Ciklodekstrini nemaju značajan utjecaj na UV spektar loratadina, a razvijene UV-Vis metode pokazale su se robusne i ponovljive, sa zadovoljavajućim granicama detekcije i kvantifikacije, te linearnim rasponom (tablica D1 i slike D1 i D3). Budući da je topljivost samog loratadina pri višim pH-vrijednostima veoma niska, za kvantifikaciju je razvijena i validirana metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (tablica D1 i slika D2).

4.1.1. Preliminarna istraživanja

Prije provođenja solubilizacijskih istraživanja provedena su preliminarna istraživanja, kako bi se utvrdilo koji ciklodekstrini imaju pozitivan utjecaj na topljivost loratadina u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima. Stoga je u otopinu pojedinih ciklodekstrina čija je konačna koncentracija iznosila $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (odnosno $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ za β -CD) dodan suvišak loratadina. Otopina je miješana do uspostavljanja ravnoteže (72 h) te je određena koncentracija otopljenog loratadina u svim uzorcima prethodno validiranim UV-Vis ili HPLC metodama.

Loratadin je pokazao trend povećanja topljivosti smanjenjem pH-vrijednosti, što je u skladu s literaturom.¹¹⁷ U simuliranom duodenalnom mediju topljivost loratadina iznosila je $9,14 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je u simuliranom intestinalnom mediju iznosila $0,93 \mu\text{g mL}^{-1}$. Budući da je loratadin topljiv pri niskim pH-vrijednostima, simulirani želučani medij nije istraživao u ovom radu.¹¹⁷ Uočeno je značajno povećanje topljivosti u prisutnosti svih ciklodekstrina. U svim medijima povećanje topljivosti loratadina prati isti slijed RM- β -CD > SBE- β -CD > HP- β -CD > β -CD, gdje je RM- β -CD uzrokovao najveće povećanje topljivosti, a β -CD najmanje. Najmanji utjecaj β -CD na topljivost može biti uzrokovan manjom koncentracijom CD. Također, topljivost LOR u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima u prisutnosti RM- β -CD je relativno slična, što

može ukazivati na pH neovisnu topljivost LOR u prisutnosti ovog CD. U tablici 9 navedeni su rezultati preliminarnih istraživanja utjecaja ciklodekstrina na topljivost loratadina u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima, te je povećanje topljivosti iskazano kao omjer koncentracije LOR u uzorcima s CD (γ_{CD}) i koncentracije samog LOR (γ_0).

Tablica 9. Topljivosti LOR i faktor povećanja njegove topljivosti u prisutnosti CD (5×10^{-3} mol L⁻¹ za β -CD, 1×10^{-2} mol L⁻¹ za derivate β -CD) u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima, pri sobnoj temperaturi

	voda		SDM (pH 4,5)		SIM (pH 6,8)	
	$\gamma(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	γ_{CD}/γ_0	$\gamma(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	γ_{CD}/γ_0	$\gamma(\text{LOR}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	γ_{CD}/γ_0
LOR	1,80	1	9,14	1	0,93	1
LOR+ β -CD	443,84	247	523,16	57	477,01	516
LOR+HP- β -CD	465,10	258	646,82	71	608,96	658
LOR+RM- β -CD	1110,39	617	1178,37	129	1140,39	1232
LOR+SBE- β -CD	931,16	517	1098,98	120	1026,75	1110

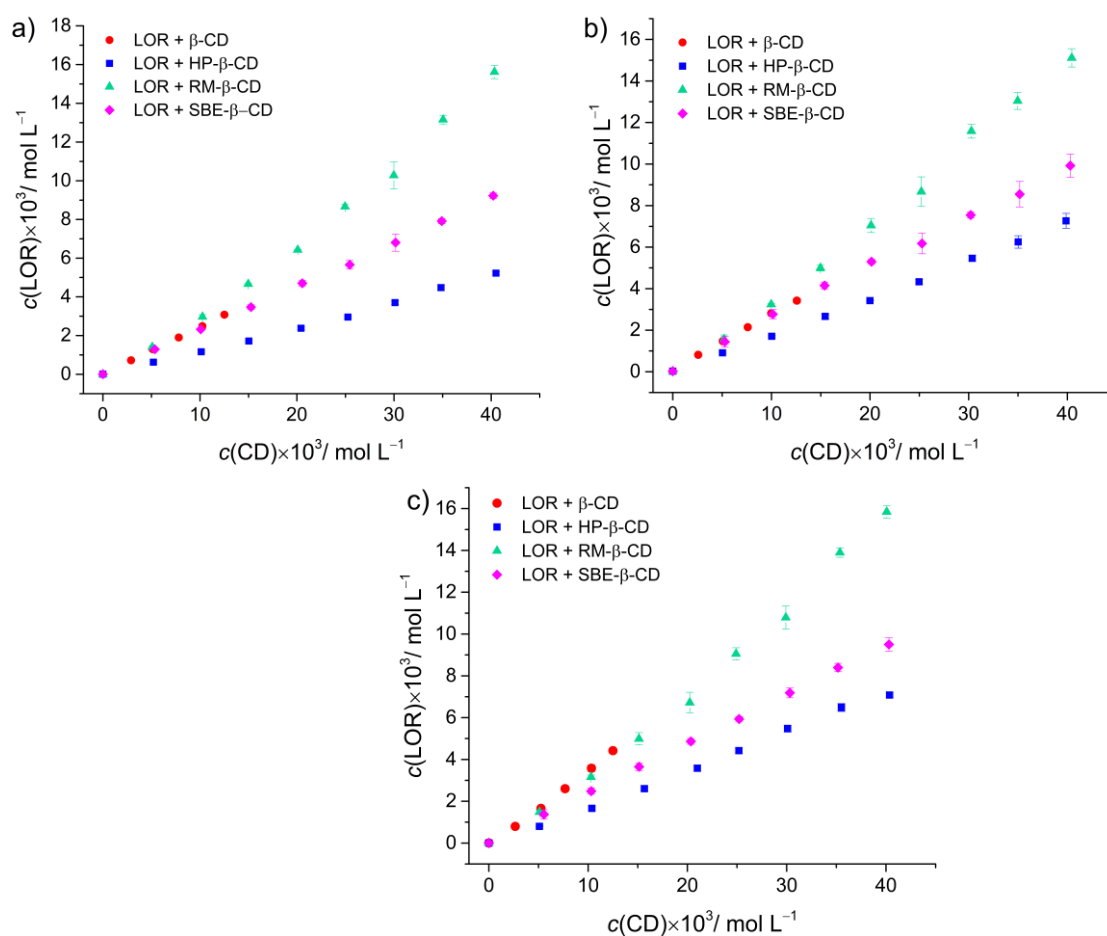
γ_{CD} – koncentracija LOR u prisutnosti CD; γ_0 – koncentracija LOR bez prisutnosti CD

4.1.2. Solubilizacijska istraživanja

Solubilizacijska istraživanja loratadina u prisutnosti β -CD i njegovih derivata (HP- β -CD, RM- β -CD i SBE- β -CD) provedena su u vodi i simuliranom intestinalnom i duodenalnom mediju. Budući da je loratadin dobro topljiv pri niskim pH-vrijednostima, utjecaj ciklodekstrina na topljivost loratadina u simuliranom želučanom mediju nije istraživao u ovom radu.¹¹⁷ Svi ciklodekstrini pokazali su pozitivan utjecaj na topljivost loratadina u svim ispitivanim medijima, te su stoga solubilizacijska istraživanja provedena sa svim ciklodekstrinima.

Pripremljeni su uzorci suviška loratadina u otopinama β -CD i njegovih derivata tako da je konačna koncentracija CD bila u rasponu $(0 - 40) \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (derivati β -CD), odnosno $(0 - 12,5) \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (β -CD). Uzorci su miješani na sobnoj temperaturi 72 sata do uspostavljanja ravnoteže te je određena koncentracija otopljenog LOR u svakom uzorku i konstruirani su dijagrami topljivosti za svaki CD u svim medijima (slika 15). Topljivost LOR je linearno ovisna o koncentraciji β -CD (osim pri pH 6,8) i SBE- β -CD, što ukazuje na nastanak kompleksa stehiometrije 1:1. Međutim, krivulja topljivosti LOR u prisutnosti β -CD u simuliranom intestinalnom mediju pokazuje blago pozitivno odstupanje od linearnosti, što ukazuje na nastanak kompleksa stehiometrije 1:2 pri većim koncentracijama ciklodekstrina. Isti

tip krivulje uočen je i u prisutnosti HP- β -CD (osim pri pH 6,8) i RM- β -CD. Ovi rezultati su djelomično u skladu s prijašnjim istraživanjima. Naime, iako u radu Lin i sur. iz 2012. godine predlažu nastanak kompleksa LOR:HP- β -CD stehiometrije 1:1 u vodi, koncentracije dodanog CD bile su u rasponu $(0 - 20) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.¹²¹ U ovom radu korišten je značajno veći raspon koncentracija dodanog ciklodekstrina (do $40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), te je blago pozitivno odstupanje uočeno tek pri višim koncentracijama, čime se mogu objasniti razlike u dobivenim rezultatima. Nadalje, Omar i sur. su u svome radu iz 2007. godine dokazali nastajanje kompleksa stehiometrija 1:1 i 1:2 u prisutnosti β -CD i HP- β -CD u fosfatnom puferu pH 7,0, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu. U puferu pH 4,4 loratadin s β -CD tvori samo komplekse 1:1, što je također u skladu s rezultatima u ovom radu.¹¹⁷ Nastanak kompleksa LOR:CD 1:2 također je potvrđen izotermalnom titracijskom kalorimetrijom, eksperimentima koje je provela izv. prof. dr. sc. Ana Budimir (Zavod za opću i anorgansku kemiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu).¹²⁹



Slika 15. Dijagrami topljivosti LOR u prisutnosti β -CD i njegovih derivata u vodi (a), SDM (b) i SIM (c); sobna temperatura, 72 h miješanja, $n = 3$

Neovisno o dobivenom tipu krivulja topljivosti, računate su samo konstante stabilnosti kompleksa 1:1, budući da koncentracijsko područje nije bilo dovoljno široko za pouzdano određivanje konstante $K_{1:2}$. Stoga su samo linearna područja krivulja bila korištena za određivanje $K_{1:1}$ te eksperimentalno dobivene vrijednosti S_0 . Također je određena učinkovitost kompleksiranja (CE) i solubilizacijski potencijal ($S_{\max}/S_0$) kao omjer otopljenog LOR pri najvećoj dodanoj količini CD ($S_{\max}$) i bez dodanog CD (S_0). Rezultati solubilizacijskih istraživanja LOR u prisutnosti β -CD i njegovih derivata u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima pri sobnoj temperaturi prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Konstante stabilnosti ($\log K_{1:1}$), učinkovitost kompleksiranja (CE) i solubilizacijski potencijal ($S_{\max}/S_0$) izračunati na temelju solubilizacijskih istraživanja LOR i CD u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima pri sobnoj temperaturi ($n = 3$)

	medij	$\log K_{1:1}$	CE	$S_{\max}/S_0$	Tip krivulje
β -CD	Voda	$4,82 \pm 0,01$	$0,323 \pm 0,015$	619 ± 27	A_L
	pH 4,5	$4,19 \pm 0,01$	$0,381 \pm 0,011$	141 ± 4	A_L
	pH 6,8	$5,23 \pm 0,02^*$	$0,526 \pm 0,021^*$	1431 ± 43	A_P
HP- β -CD	Voda	$4,42 \pm 0,02^{**}$	$0,131 \pm 0,002^{**}$	1048 ± 22	A_P
	pH 4,5	$3,92 \pm 0,02^{**}$	$0,207 \pm 0,002^{**}$	298 ± 18	A_P
	pH 6,8	$4,84 \pm 0,02$	$0,222 \pm 0,006$	2288 ± 49	A_L
RM- β -CD	Voda	$5,14 \pm 0,01^{***}$	$0,462 \pm 0,013^{***}$	4690 ± 237	A_P
	pH 4,5	$4,40 \pm 0,02^{**}$	$0,506 \pm 0,002^{**}$	619 ± 21	A_P
	pH 6,8	$5,20 \pm 0,01^{**}$	$0,485 \pm 0,025^{**}$	5886 ± 446	A_P
SBE- β -CD	Voda	$4,95 \pm 0,01$	$0,294 \pm 0,009$	2770 ± 58	A_L
	pH 4,5	$4,20 \pm 0,04$	$0,331 \pm 0,025$	480 ± 39	A_L
	pH 6,8	$5,03 \pm 0,03$	$0,294 \pm 0,009$	3382 ± 192	A_L

linearni raspon CD: * 0 – 7,5 mM; ** 0 – 25 mM; *** 0 – 20 mM

U literaturi nema puno podataka o utjecaju CD na topljivost LOR. Većina rezultata odnosi se na utjecaj β -CD na topljivost LOR u vodi. Rezultati su uglavnom izraženi pomoću konstante stabilnosti, iako učinkovitost kompleksiranja pruža bolju usporedbu, budući da ne ovisi o načinu određivanja S_0 .³⁸ U ovom radu konstanta stabilnosti LOR: β -CD 1:1 kompleksa u vodi, izražena kao $\log K_{1:1}$, iznosi 4,82, što se značajno razlikuje od vrijednosti dobivenih u prijašnjim istraživanjima ($4,33^{120}$, $4,34^{121}$ i $5,06^{117}$). Kao što je već navedeno, dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti ovise o S_0 . Budući da za lijekove čija je topljivost manja od $0,1 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} intrinzična topljivost lijeka ne odgovara odsječku osi y dijagrama topljivosti, te će stoga na izračunatu vrijednost konstante značajno utjecati koristi li se eksperimentalno dobivena vrijednost S_0 ili se koristi odsječak na osi y. Nadalje, literaturnim pregledom uočen je velik

raspon vrijednosti eksperimentalno dobivenih S_0 , ovisno o metodi analize. U ovom radu topljivost LOR u vodi iznosila je $(4,14 \pm 0,85) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a u radovima su pronađene vrijednosti u rasponu $(2,68 - 59) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, što može objasniti velike diskrepancije u vrijednostima konstanti stabilnosti.^{116,119} Međutim, dobiveno je dobro slaganje u vrijednostima konstante stabilnosti kompleksa LOR:HP- β -CD 1:1 u vodi, budući da vrijednost dobivena u ovom radu ($\log K_{1:1} = 4,42$) odgovara vrijednosti dobivenoj u radu Lin i sur. iz 2012. godine ($\log K_{1:1} = 4,35$).¹²¹ Razlike u dobivenim vrijednostima konstanti stabilnosti kompleksa LOR:SBE- β -CD 1:1 također se mogu objasniti većim rasponom dodanog CD u ovom radu ($(0 - 40) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) naspram onog u radu Ramesh i sur. iz 2020. godine ($(0 - 12) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).¹²²

Još jedan faktor koji otežava usporedbu rezultata je stupanj supstitucije derivata β -CD, budući da može značajno utjecati na solubilizacijski potencijal.²⁸ U literaturi je veoma rijetko naveden prosječni stupanj supstitucije korištenih ciklodekstrina, tako da razlike u rezultatima mogu biti djelomično i posljedica korištenja smjese derivata ciklodekstrina različitog prosječnog stupnja supstitucije.

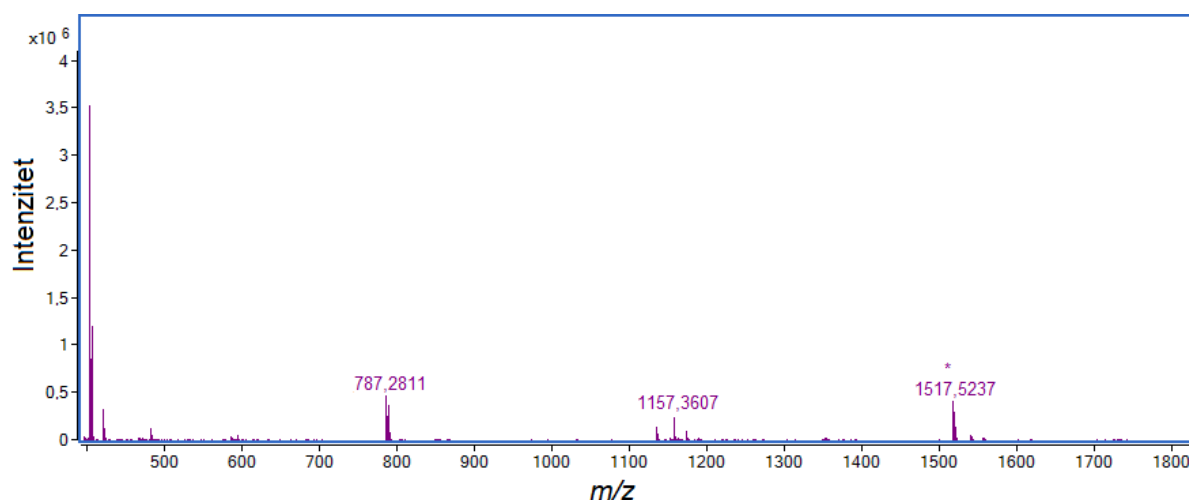
4.2. Spektrometrija masa visokog razlučivanja

Kako bi dobili bolji uvid u stehiometriju nastalih inkluzijskih kompleksa korištena je spektrometrija masa, budući da se stehiometrija inkluzijskih kompleksa određena u plinovitoj fazi može korelirati s ponašanjem u otopini.^{80,81}

Na slici 16 prikazan je MS spektar otopine loratadina i β -CD. U spektru je vidljiv signal pri m/z 1135 koji odgovara protoniranoj molekuli β -CD te signal pri m/z 1157 koji odgovara ionu adukta molekule β -CD s Na^+ . Također je uočen i signal pri m/z 1517 koji odgovara protoniranoj molekuli kompleksa LOR: β -CD 1:1. Signal pri m/z 787 odgovara natrijevom aduktu dimera loratadina. U tablici 11 navedene su vrijednosti izmjerenih i izračunatih točnih masa i odstupanja izračunata prema formuli

$$\text{pogreška} = \frac{m/z_{\text{eksp.}} - m/z_{\text{teor.}}}{m/z_{\text{teor.}}} \times 10^6 [\text{ppm}] \quad (17)$$

gdje $m/z_{\text{eksp.}}$ označava eksperimentalno izmjerenu masu, a $m/z_{\text{teor.}}$ označava izračunatu točnu masu.

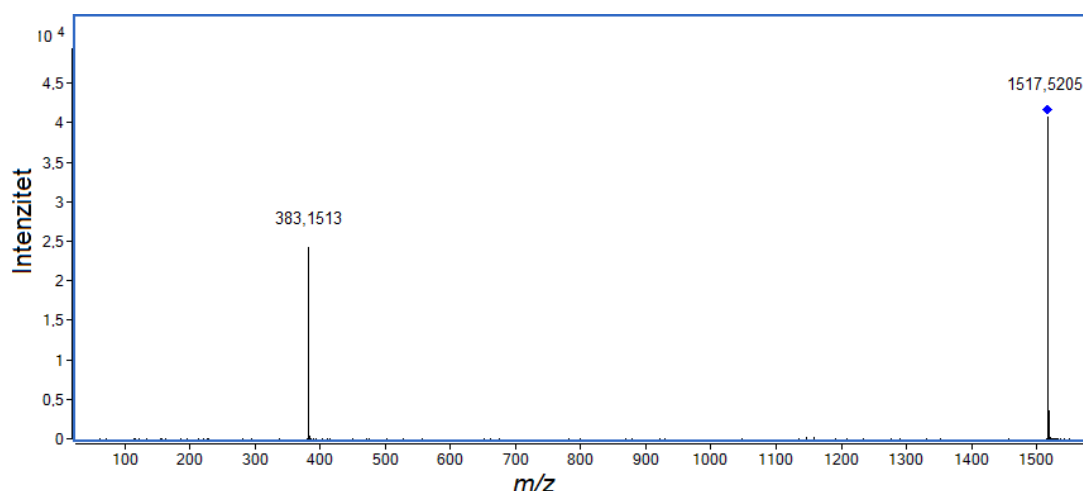


Slika 16. ESI(+) MS spektar otopine LOR:β-CD, otapalo MeOH:voda 1:1, $c(\text{LOR}) = c(\beta\text{-CD}) = 2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Signal inkluzijskog kompleksa označen je zvjezdicom

Tablica 11. Izračunate i izmjerene vrijednosti m/z uočene u MS spektru otopine LOR:β-CD, otapalo MeOH:voda 1:1, $c(\text{LOR}) = c(\beta\text{-CD}) = 2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ESI(+)

	Izračunati m/z	Izmjereni m/z	Pogreška / ppm
$[\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$	1135,3770	1135,3775	0,44
$[\beta\text{-CD} + \text{Na}]^+$	1157,3590	1157,3607	1,47
$[\text{LOR}:\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$	1517,5219	1517,5237	1,19

Fragmentacijom molekuskog iona inkluzijskog kompleksa LOR:β-CD (m/z 1517) pri kolizijskim energijama od 10 V, 20 V i 40 V, dobiveni su MS/MS spektri prikazani na slici 17 i u tablici 12. Vidljivo je da inkluzijski kompleks fragmentira disocijacijom molekule LOR iz kompleksa, pri čemu naboj ostaje na LOR, te dolazi do neutralnog gubitka molekule β-CD. Iako je pri 10 V bazni ion onaj koji pripada kompleksu, ion koji odgovara LOR je značajno visokog intenziteta. Povećanjem kolizijske energije, povećava se intenzitet iona LOR, a pri 40 V u MS/MS spektru je osim molekuskog iona LOR uočen i signal iona m/z 337 niskog intenziteta, koji odgovara fragmentnom ionu LOR.



Slika 17. ESI(+) MS/MS spektar iona $[\text{LOR}:\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$ (m/z 1517,5219), kolizijska energija 10 V

Tablica 12. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom iona $[\text{LOR}:\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$ (m/z 1517,5219), kolizijske energije 10 V, 20 V i 40 V, ESI(+)

Asignacija signala	Izračunati m/z	Kolizijska energija / V					
		10		20		40	
		Izmjereni m/z	R. I. / %	Izmjereni m/z	R. I. / %	Izmjereni m/z	R. I. / %
$[\text{LOR}:\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$	1517,5219	1517,5205	100	1517,5177	19,38	-	-
$[\text{LOR} + \text{H}]^+$	383,1521	383,1513	59,43	383,1517	100	383,1515	100
$[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}]^+$	337,1102	-	-	337,1117	0,53	337,1095	1,20

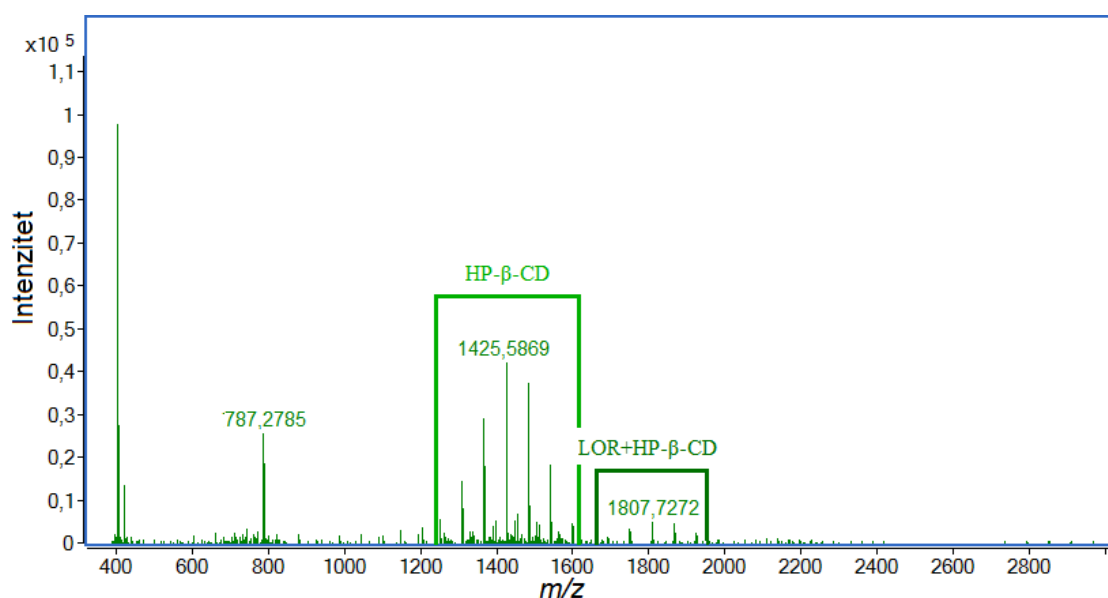
R. I. – relativni intenzitet

Budući da su derivati β -CD korišteni u ovom radu zapravo smjesa različito supstituiranih molekula β -CD s velikim rasponom stupnjeva supstitucije, njihovi MS spektri su značajno kompleksniji.^{3,130} Stoga se u MS spektru osim skupine signala koji odgovaraju CD pojedinih stupnjeva supstitucije (uključujući protonirane ione i adukte s Na^+), nalazi i analogan skup signala inkluzijskog kompleksa 1:1. Tako je u MS spektru otopine LOR:HP- β -CD uočen skup signala koji odgovaraju ionima $[\text{HP-}\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$ stupnjeva supstitucije u rasponu 2 – 8 (raspon m/z 1251 – 1600) te skup signala koji odgovara ionima $[\text{M} + \text{H}]^+$ kompleksa LOR:HP- β -CD 1:1 (raspon m/z 1750 – 1924). MS spektar otopine LOR:HP- β -CD prikazan je na slici 18, a u tablici 13 navedene su izmjerene i izračunate vrijednosti m/z iona koji odgovaraju protoniranim molekulama HP- β -CD i kompleksa LOR:HP- β -CD 1:1.

Tablica 13. Izračunate i izmjerene vrijednosti m/z uočene u MS spektru otopine LOR:HP- β -CD, otapalo MeOH:voda 1:1, $c(\text{LOR}) = 2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{HP-}\beta\text{-CD}) = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

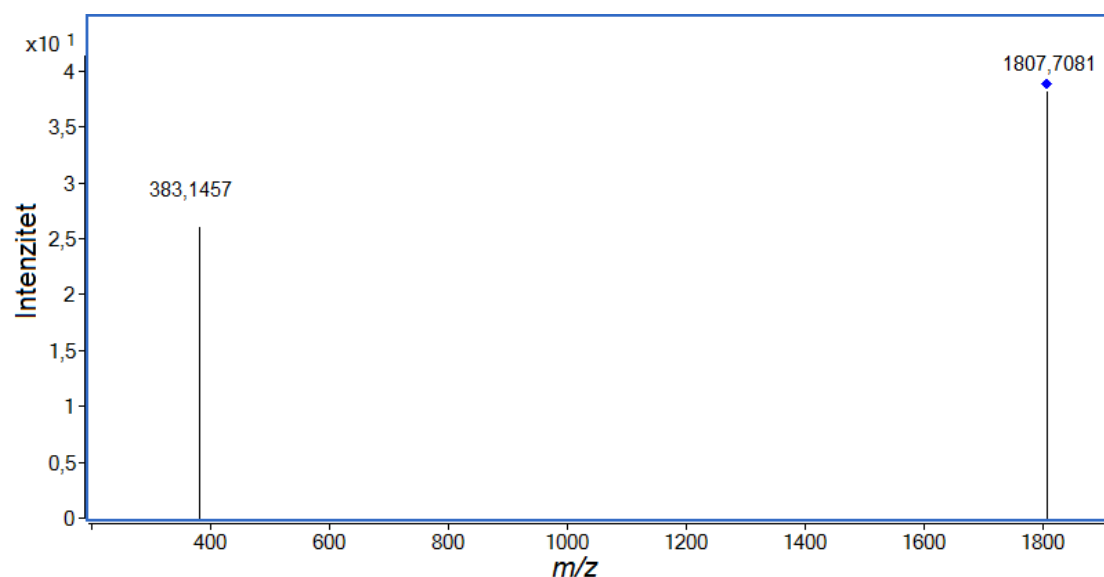
DS	HP- β -CD			LOR:HP- β -CD 1:1		
	[M + H] ⁺			[M + H] ⁺		
	Izračunati m/z	Izmjereni m/z	Pogreška / ppm	Izračunati m/z	Izmjereni m/z	Pogreška / ppm
2	1251,4608	1251,4582	-2,08	1633,6056	-	-
3	1309,5026	1309,5013	-0,99	1691,6474	-	-
4	1367,5445	1367,5448	0,22	1749,6893	1749,6843	-2,86
5	1425,5864	1425,5869	0,35	1807,7321	1807,7272	-2,71
6	1483,6282	1483,6284	0,13	1865,7730	1865,7658	-3,86
7	1541,6701	1541,6695	-0,39	1923,8149	1923,8115	-1,77
8	1599,7120	1599,7080	-2,50	1981,8568	-	-

DS – stupanj supstitucije



Slika 18. ESI(+) MS spektar otopine LOR:HP- β -CD, otapalo MeOH:voda 1:1, $c(\text{LOR}) = 2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{HP-}\beta\text{-CD}) = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Provedena je i MS/MS analiza iona m/z 1807,7321 budući da odgovara ionu protoniranog kompleksa, a signal je najvećeg intenziteta. Način fragmentacije kompleksa LOR:HP- β -CD odgovara načinu fragmentacije kompleksa LOR: β -CD, odnosno dolazi do disocijacije kompleksa pri čemu naboj ostaje na loratadinu (slika 19 i tablica 14).



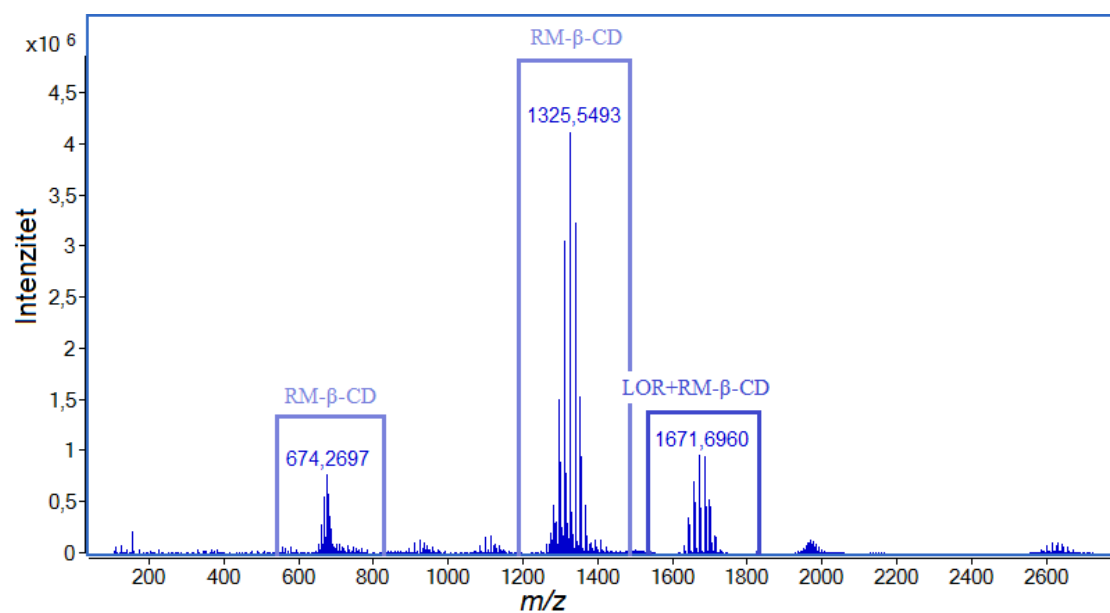
Slika 19. ESI(+) MS/MS spektar iona [LOR:HP- β -CD + H]⁺ (m/z 1807,7321), kolizijska energija 10 V

Tablica 14. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom iona [LOR:HP- β -CD + H]⁺ (m/z 1807,7321), kolizijske energije 10 V, 20 V i 40 V, ESI(+)

Asignacija signala	Izračunati m/z	Kolizijska energija / V					
		10		20		40	
		Izmjereni m/z	R. I. / %	Izmjereni m/z	R. I. / %	Izmjereni m/z	R. I. / %
[LOR:HP- β -CD + H] ⁺	1807,7321	1807,7081	100	1807,7353	54,45	-	-
[LOR + H] ⁺	383,1521	383,1457	68,37	383,1461	100	383,1494	100

R. I. – relativni intenzitet

Sličan trend kao i u MS spektru otopine LOR:HP- β -CD uočen je i u MS spektru otopine LOR:RM- β -CD. Uočeni su skupovi signala koji odgovaraju ciklodekstrinu različitih stupnjeva supstitucije i skupovi signala koji odgovaraju inkluzijskim kompleksima. Međutim, u spektru RM- β -CD nisu uočeni signali iona koji bi odgovarali protoniranim molekulama, već signali jednostruko i dvostruko nabijenih adukata s Na⁺ u rasponima vrijednosti m/z 1283 – 1367 (ion [M + Na]⁺) i 653 – 695 (ion [M + 2Na]²⁺) koji odgovaraju molekulama stupnja supstitucije u rasponu 9 – 15. Osim navedenih signala uočeni su i signali protoniranog kompleksa LOR:RM- β -CD 1:1 u rasponu m/z 1644 – 1714 (slika 20 i tablica 15).

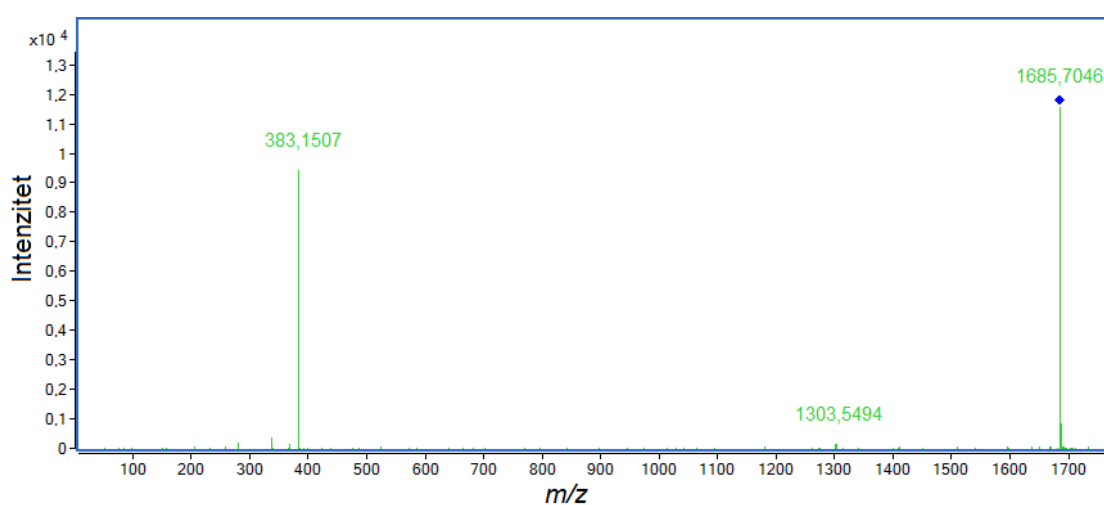


Slika 20. ESI(+) MS spektar otopine LOR:RM-β-CD, otapalo MeOH:voda 1:1, $c(\text{LOR}) = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{HP-}\beta\text{-CD}) = 8,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Tablica 15. Izračunate i izmjerene vrijednosti m/z uočene u MS spektru otopine LOR:RM- β -CD, otapalo MeOH:voda 1:1, $c(\text{LOR}) = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{HP-}\beta\text{-CD}) = 8,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ESI(+)

DS	RM- β -CD						LOR:RM- β -CD 1:1		
	[M + Na] ⁺			[M + 2Na] ²⁺			[M + H] ⁺		
	Izračunati m/z	Izmjereni m/z	Pogreška / ppm	Izračunati m/z	Izmjereni m/z	Pogreška / ppm	Izračunati m/z	Izmjereni m/z	Pogreška / ppm
9	1283,4998	1283,5025	2,10	653,2445	653,2460	2,30	1643,6627	1643,6640	0,79
10	1297,5155	1297,5172	1,31	660,2524	660,2543	2,88	1657,6783	1657,6814	1,87
11	1311,5311	1311,5335	1,83	667,2602	667,2627	3,75	1671,6940	1671,6960	1,20
12	1325,5468	1325,5496	2,11	674,2680	674,2697	2,52	1685,7096	1685,7114	1,07
13	1339,5624	1339,5643	1,42	681,2758	681,2777	2,79	1699,7253	1699,7282	1,71
14	1353,5781	1353,5791	0,74	688,2837	688,2851	2,03	1713,7409	1713,7409	0,00
15	1367,5937	1367,5948	0,80	695,2915	695,2889	-3,74	1727,7566	-	-

Signal pri m/z 1685,7117 odgovara protoniranom ionu inkluzijskog kompleksa LOR:RM- β -CD 1:1 uz stupanj supstitucije 12. Provedena je MS/MS analiza tog iona pri kolizijskim energijama 10 V, 20 V i 40 V. Fragmentacija inkluzijskog kompleksa odvija se uz disocijaciju, kao i u slučaju kompleksa LOR: β -CD i LOR:HP- β -CD (slika 21 i tablica 16). U MS/MS spektru ponovno je uočen intenzivan signal koji pripada protoniranoj molekuli LOR (m/z 383), te fragmentni ion LOR (m/z 337). Fragmentacijom molekule kompleksa dolazi do neutralnog gubitka molekule RM- β -CD. Jedino je pri kolizijskoj energiji od 20 V u MS/MS spektru uočen signal niskog intenziteta koji odgovara protoniranoj molekuli RM- β -CD (m/z 1303).



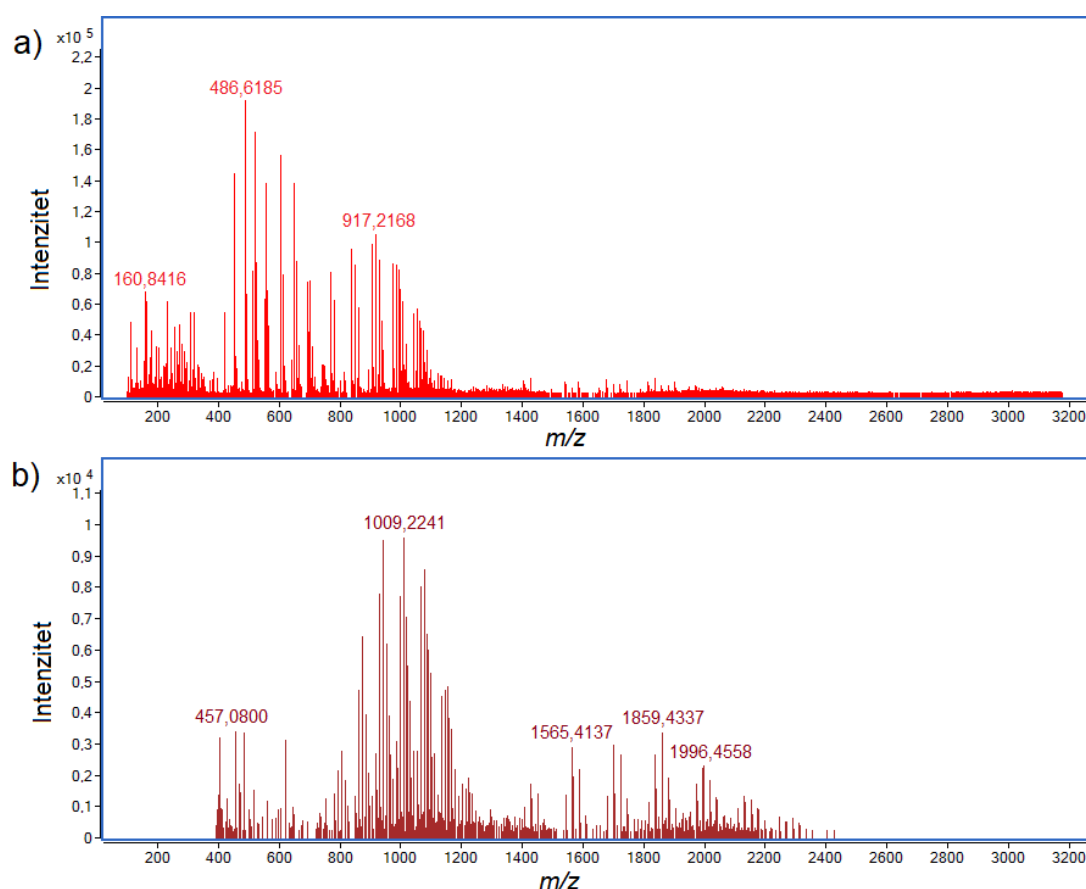
Slika 21. ESI(+) MS/MS spektar iona $[LOR:RM-\beta-CD + H]^+$ (m/z 1685), kolizijska energija 20 V

Tablica 16. Relativni intenziteti signala dobivenih MS/MS analizom iona $[LOR:RM-\beta-CD+H]^+$ pri m/z 1685,7117, kolizijske energije 10 V, 20 V i 40 V, ESI(+)

Asignacija signala	Izračunati m/z	Kolizijska energija / V					
		10		20		40	
		Izmjereni m/z	R. I. / %	Izmjereni m/z	R. I. / %	Izmjereni m/z	R. I. / %
$[LOR:RM-\beta-CD+H]^+$	1685,7097	1685,7029	100	1685,7046	100	1685,6912	1,97
$[RM-\beta-CD+H]^+$	1303,5648	-	-	1303,5494	1,06	-	-
$[LOR+H]^+$	383,1521	383,1504	27,65	383,1507	81,52	383,1522	100
$[C_{20}H_{18}ClN_2O]^+$	337,1102	337,1029	1,15	337,1097	3,03	337,1085	1,53

R. I. – relativni intenzitet

Budući da je SBE- β -CD anionski derivat β -CD, MS spektar je još kompleksniji te su u spektru uočeni signali različito nabijenih iona te različiti adukti s Na^+ .¹³¹ Međutim, uz negativnu ionizaciju u MS spektru vidljivi su samo višestruko nabijeni ioni samog SBE- β -CD (slika 22a i tablica D2). Stoga je analiza ponovljena uz pozitivnu ionizaciju. Iako su u spektru vidljivi jednostruko i dvostruko nabijeni ioni SBE- β -CD, ioni koji odgovaraju kompleksu LOR:SBE- β -CD nisu uočeni (slika 22b i tablica D3). Vjerojatan razlog tomu je kompleksnost MS spektra ciklodekstrina.



Slika 22. a) ESI(-) MS spektar otopine SBE- β -CD ($c = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); b) ESI(+) MS spektar otopine LOR:SBE- β -CD, $c(\text{LOR}) = 2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{SBE-}\beta\text{-CD}) = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; otapalo MeOH:voda 1:1

Iako rezultati istraživanja poboljšanja topljivosti i izotermalne titracijske kalorimetrije ukazuju na nastanak kompleksa stehiometrije LOR:CD 1:1 i 1:2, u MS spektrima uočeni su samo ioni koji odgovaraju kompleksima stehiometrije 1:1. Kompleksi stehiometrije 1:2 nisu uočeni u MS spektrima, vjerojatno jer nisu bili dovoljno stabilni te je prilikom procesa ionizacije elektroraspršenjem došlo do njihove disocijacije.

4.3. Priprema i karakterizacija binarnih sustava loratadina i ciklodekstrina u čvrstom stanju

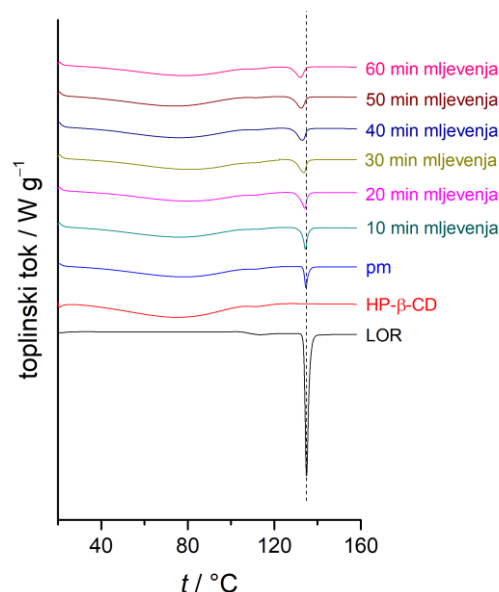
Binarni sustavi loratadina i β -ciklodekstrina i njegova tri derivata pripremljeni su u stehiometrijskim omjerima LOR:CD 1:1 i 1:2. Korištene su dvije metode pripreme, mljevenje i sušenje raspršivanjem. Dobiveni uzorci analizirani su razlikovnom pretražnom kalorimetrijom, infracrvenom spektroskopijom i difrakcijom rendgenskog zračenja na praškastom uzorku, a rezultati analize uspoređeni su sa fizičkim smjesama LOR:CD. Također je istražen utjecaj ciklodekstrina na topljivost i brzinu *in vitro* otapanja loratadina u pripremljenim uzorcima u simuliranom intestinalnom mediju.

4.3.1. Priprava binarnih sustava mljevenjem

4.3.1.1. Optimizacija mljevenja i priprava binarnih sustava LOR:HP- β -CD

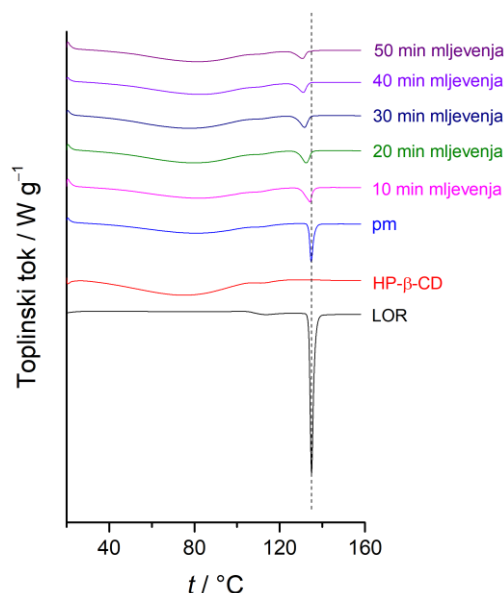
Uzorci binarnih sustava LOR:CD pripremljeni su mljevenjem u kugličnom vibracijskom mlinu korištenjem posudica za mljevenje i kuglica od cirkonijskog oksida. Budući da je na temelju solubilizacijskih ispitivanja pokazano da HP- β -CD ima najmanji afinitet prema interakciji s loratadinom, može se pretpostaviti da će priprema kompleksa loratadina i ovog ciklodekstrina u čvrstom stanju biti tehnološki najzahtjevnija. Stoga je postupak mljevenja optimiziran na uzorku LOR:HP- β -CD tako da je istražen utjecaj različitih parametara na efikasnost mljevenja, kao što su ukupna masa uzorka, broj kuglica i frekvencija mljevenja. Tijek mljevenja praćen je tehnikom DSC te je računat udio kristalne frakcije loratadina u uzorcima.

Uzorak LOR:HP- β -CD 1:1 pripremljen je vaganjem ekvimolarne količine LOR i HP- β -CD tako da je ukupna masa uzorka iznosila 2,5 g. Uzorak je mljeven u posudici s 15 kuglica promjera 10 mm i 15 kuglica promjera 5 mm, pri frekvenciji od 25 Hz. Međutim, već nakon 15 minuta mljevenja došlo je do potpunog sabijanja uzorka te ga nije bilo moguće analizirati. Postupak je stoga ponovljen s po 10 kuglica promjera 10 mm i 5 mm, međutim ponovno je došlo do sabijanja uzorka. Potom je uzorak mljeven s 5 kuglica promjera 10 mm, pri frekvenciji od 15 Hz. Uzorak je mljeven 60 minuta, a svakih 10 minuta pratila se uspješnost mljevenja DSC analizom. Uočeno je postepeno smanjenje karakterističnog endotermnog signala LOR u DSC krivulji te pomak signala taljenja prema nižim temperaturama (s 134,82 °C na 132,03 °C). Također je uočeno smanjenje udjela kristalne frakcije sa 100 % na 67 % (slika 23 i tablica D4).



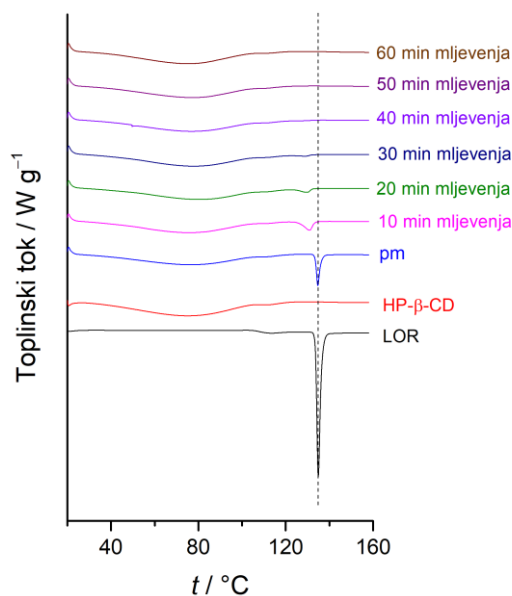
Slika 23. DSC krivulje LOR i HP-β-CD, njihove fizičke smjese (pm) te uzorka mljevenog pri 15 Hz; ukupna količina uzorka 2,5 g; 5 kuglica promjera 10 mm

Potom je istražen utjecaj mase uzorka na efikasnost mljevenja smjese LOR i HP-β-CD u ekvimolarnom omjeru, tako da je ukupna masa uzorka iznosila 1 g. Uzorak je mljeven na isti način kao i prethodni te je uočen značajniji pad udjela kristalne frakcije (39 %). Rezultati DSC mjerenja prikazani su na slici 24 i tablici D5.



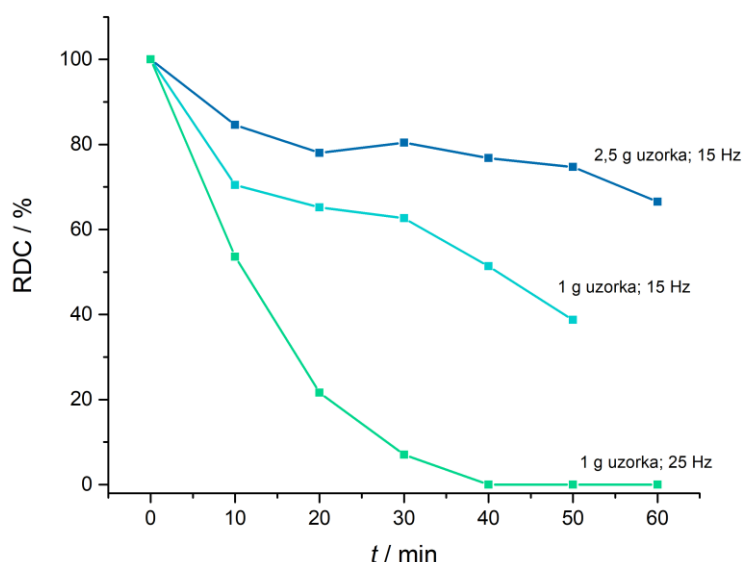
Slika 24. DSC krivulje LOR i HP-β-CD, njihove fizičke smjese (pm) te uzorka mljevenog pri 15 Hz; ukupna količina uzorka 1 g; 5 kuglica promjera 10 mm

Istražen je i utjecaj frekvencije mljevenja tako da je uzorak LOR:HP- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 i ukupne mase 1 g, mljeven na frekvenciji od 25 Hz pri čemu je već nakon 40 minuta uočen potpuni gubitak kristalnosti (slika 25 i tablica D6).



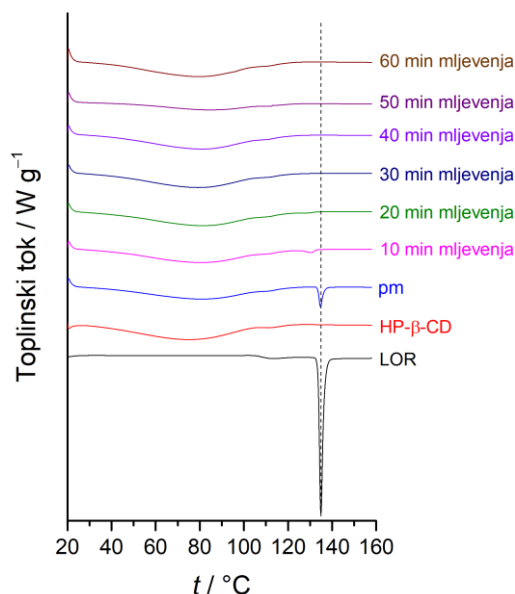
Slika 25. DSC krivulje LOR i HP- β -CD u omjeru 1:1, njihove fizičke smjese (pm) te uzorka mljevenog pri 25 Hz; ukupna količina uzorka 1 g; 5 kuglica promjera 10 mm

Na temelju ovih rezultata, za pripremu ostalih binarnih sustava provedeno je mljevenje 1 g uzorka uz pet kuglica promjera 10 mm pri frekvenciji mljevenja od 25 Hz, budući da se u tim uvjetima postigao potpuni gubitak kristalne frakcije loratadina (slika 26).



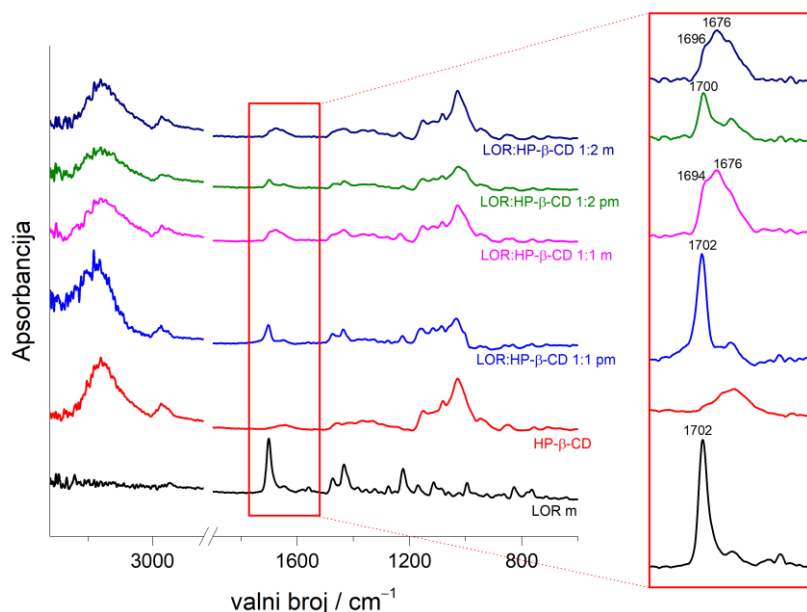
Slika 26. Udio kristalne frakcije LOR u uzorku LOR:HP- β -CD 1:1 pri različitim uvjetima mljevenja

Također je pripravljen uzorak LOR i HP- β -CD u stehiometrijskom omjeru 1:2 koristeći optimalne parametre mljevenja te je uočen gubitak kristalnosti već nakon 30 minuta mljevenja (slika 27 i tablica D7).



Slika 27. DSC krivulje LOR i HP- β -CD u omjeru 1:2, njihove fizičke smjese (pm) te uzorka mljevenog pri 25 Hz; ukupna količina uzorka 1 g; 5 kuglica promjera 10 mm

Kako bi dobili bolji uvid u procese koji se događaju mljevenjem, uzorci su analizirani FT-IR ATR tehnikom. U FT-IR ATR spektru LOR uočene su karakteristične vrpce pri 1701 cm^{-1} (vrpca istezanja C=O veze), 1474 cm^{-1} i 1434 cm^{-1} (vrpce istezanja veza u benzenskom prstenu) te 1227 cm^{-1} (vrpca istezanja C–O veze). U spektru HP- β -CD uočene su karakteristične vrpce pri 3400 cm^{-1} i 1648 cm^{-1} koje odgovaraju vrpama istezanja i deformacije hidroksilne skupine te vrpce u rasponu $2970 - 2876\text{ cm}^{-1}$ i $1456 - 1300\text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju istezanju i deformaciji $-\text{CH}_3$ i $-\text{CH}_2$ skupina. U spektrima fizičkih smjesa binarnih sustava LOR:HP- β -CD 1:1 i 1:2 nisu uočene značajne promjene u položajima karakterističnih vrpca LOR i HP- β -CD. Međutim, u uzorcima pripremljenim mljevenjem uočeno je smanjenje intenziteta vrpce pri 1701 cm^{-1} te pojava nove vibracijske vrpce pri 1676 cm^{-1} , što može ukazivati na djelomičan nastanak inkluzijskog kompleksa.¹²¹ Mali pomaci ostalih vrpca karakterističnih za LOR (1648 cm^{-1} , 1473 cm^{-1} , 1433 cm^{-1} i 1223 cm^{-1}) te smanjenje intenziteta vrpca također ukazuju na barem djelomičan nastanak inkluzijskog kompleksa (slika 28 i tablica 17).



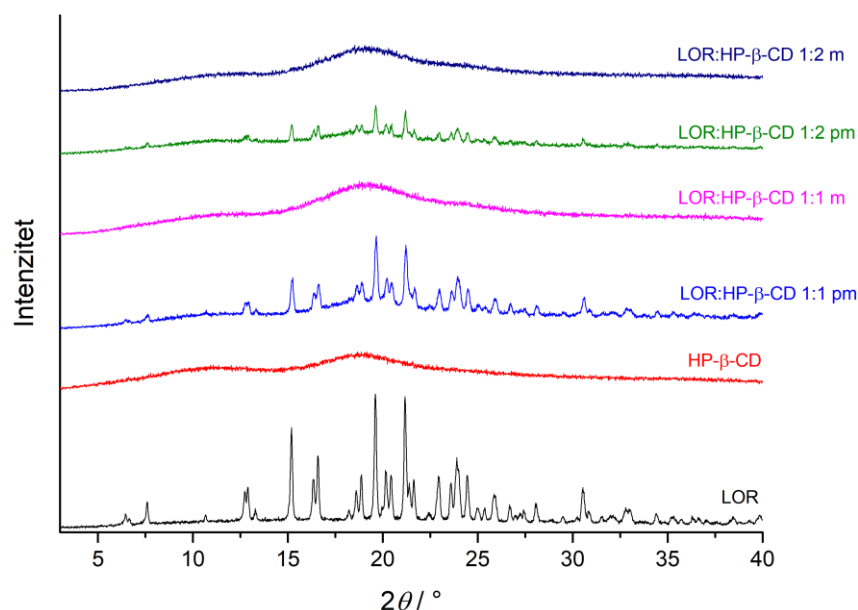
Slika 28. FT-IR ATR spektri LOR, HP- β -CD, binarnih sustava LOR:HP- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Tablica 17. Asignacija karakterističnih IR vrpca LOR u binarnim sustavima LOR:HP- β -CD stehiometrijskih omjera 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i u uzorcima fizičkih smjesa (pm)

Asignacija	LOR	LOR:HP- β -CD 1:1 pm	LOR:HP- β -CD 1:1 m	LOR:HP- β -CD 1:2 pm	LOR:HP- β -CD 1:2 m
$\nu(\text{C=O})$	1702	1702	1694	1700	1696
$\nu(\text{C=O})$	-	-	1676	-	1676
$\nu(\text{C=N})$	1648	1651	1652	1650	1654
$\nu(\text{C=C})$	1473	1473	1473	1470	1471
$\nu(\text{C=C})$	1433	1436	1435	1432	1437
$\nu(\text{C-O})$	1223	1224	1232	1223	1235

Također je provedena analiza krutina difrakcijom rendgenskog zračenja na praškastom uzorku. U difraktogramu samog LOR uočeni su karakteristični difrakcijski maksimumi pri 12,7 °, 12,9 °, 15,2 °, 16,3 °, 19,6 °, 21,2 °, 22,9 °, 23,9 °, 24,4 ° i 30,5 °.¹³² Analizom mljevenog loratadina uočeni su smanjeni intenziteti navedenih difrakcijskih maksimuma, što ukazuje na djelomičnu amorfizaciju loratadina mljevenjem. Djelomična amorfizacija loratadina potvrđena je rezultatima DSC analize, budući da je u mljevenom uzorku loratadina uočeno 79 % kristalne frakcije loratadina, te rezultatima FT-IR ATR analize (Slika D4). Budući da mljevenje ne utječe

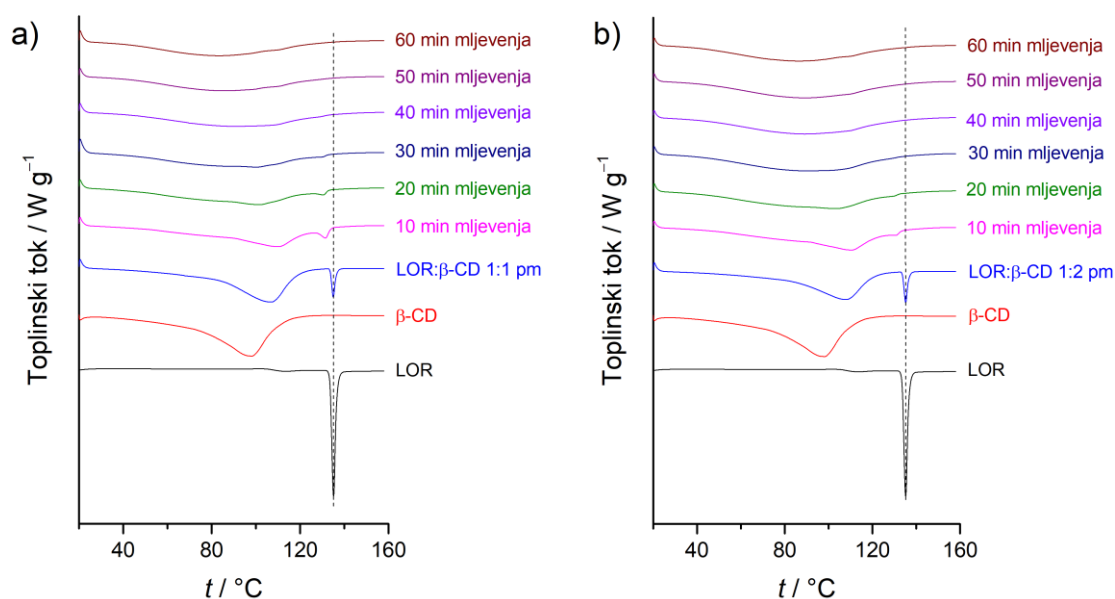
značajno na rezultate, sve promjene uočene u spektrima binarnih sustava LOR:CD posljedica su prisutnosti ciklodekstrina. U difraktogramu HP- β -CD nisu uočeni difrakcijski maksimumi, što je i očekivano, budući da se radi o amorfnom uzorku. U uzorcima fizičkih smjesa LOR i HP- β -CD uočeni su karakteristični difrakcijski maksimumi loratadina, a u mljevenim uzorcima navedeni difrakcijski maksimumi nisu uočeni što ukazuje na amorfizaciju i/ili nastanak inkluzijskog kompleksa (slika 29).



Slika 29. Difraktogrami LOR, HP- β -CD te binarnih sustava LOR:HP- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i njihovih fizičkih smjesa (pm)

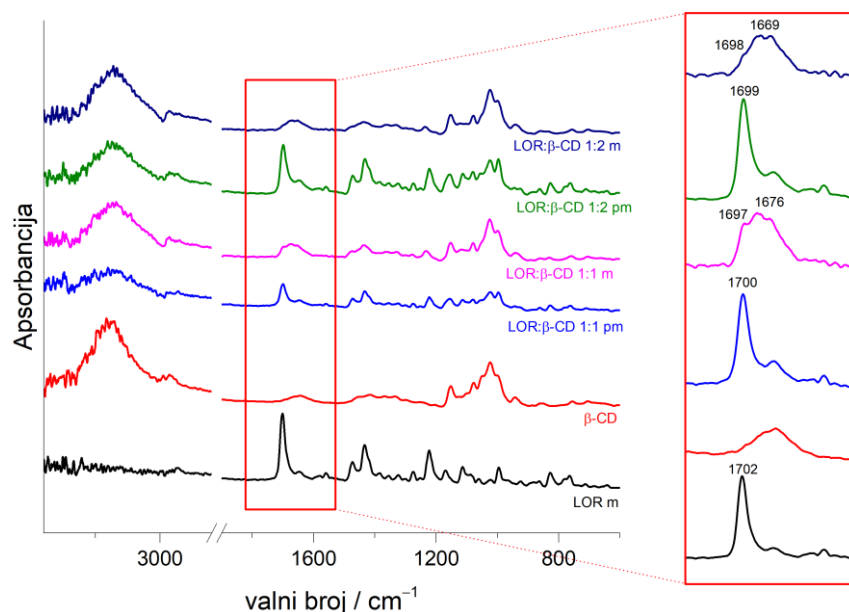
4.3.1.2. Priprava binarnih sustava LOR: β -CD

Analiza binarnih sustava LOR: β -CD pripremljenih mljevenjem u stehiometrijskim omjerima 1:1 i 1:2 pokazuje slične rezultate. Analiza DSC tehnikom ukazuje na potpuni gubitak kristalne frakcije LOR nakon 50 min (LOR: β -CD 1:1), odnosno nakon 40 min (LOR: β -CD 1:2) mljevenja (slika 30 i tablice D8 i D9).



Slika 30. DSC krivulje LOR i β -CD u omjeru 1:1 (a) i 1:2 (b), njihovih fizičkih smjesa (pm) te uzoraka mljevenih pri 25 Hz; ukupna količina uzorka 1 g; 5 kuglica promjera 10 mm

U FT-IR ATR spektru β -CD uočene su karakteristične vrpce pri 3412 cm^{-1} i 1642 cm^{-1} koje odgovaraju vrpcama istezanja i deformacije hidroksilne skupine te vrpce u rasponu $2972 - 2875\text{ cm}^{-1}$ i $1459 - 1302\text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju istezanju i deformaciji $-\text{CH}_3$ i $-\text{CH}_2$ skupina. Spektri fizičkih smjesa superpozicija su spektara LOR i β -CD, a u spektrima uzoraka pripremljenih mljevenjem uočeno je smanjenje intenziteta vrpce pri 1701 cm^{-1} , i pojava nove vibracijske vrpce pri 1676 cm^{-1} , što ukazuje na djelomičan nastanak inkluzijskog kompleksa (slika 31 i tablica 18).

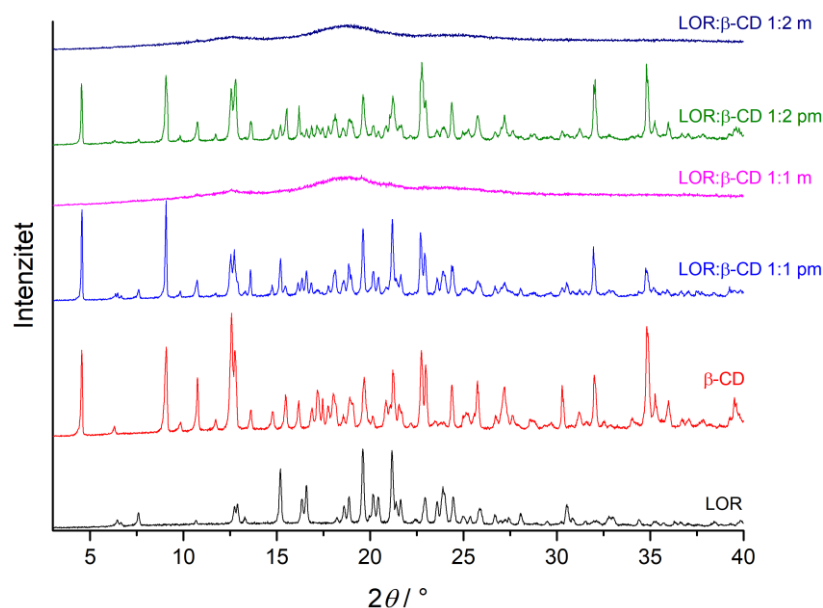


Slika 31. FT-IR ATR spektri LOR, β -CD, binarnih sustava LOR: β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Tablica 18. Asignacija karakterističnih IR vrpca LOR u binarnim sustavima LOR: β -CD stehiometrijskih omjera 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i u uzorcima fizičkih smjesa (pm)

Asignacija	LOR	LOR: β -CD 1:1 pm	LOR: β -CD 1:1 m	LOR: β -CD 1:2 pm	LOR: β -CD 1:2 m
$\nu(\text{C=O})$	1702	1700	1697	1699	1698
$\nu(\text{C=O})$	-	-	1676	-	1669
$\nu(\text{C=N})$	1648	1647	1654	1647	1653
$\nu(\text{C=C})$	1473	1472	1473	1472	1472
$\nu(\text{C=C})$	1433	1432	1436	1432	1434
$\nu(\text{C-O})$	1223	1222	1232	1223	1236

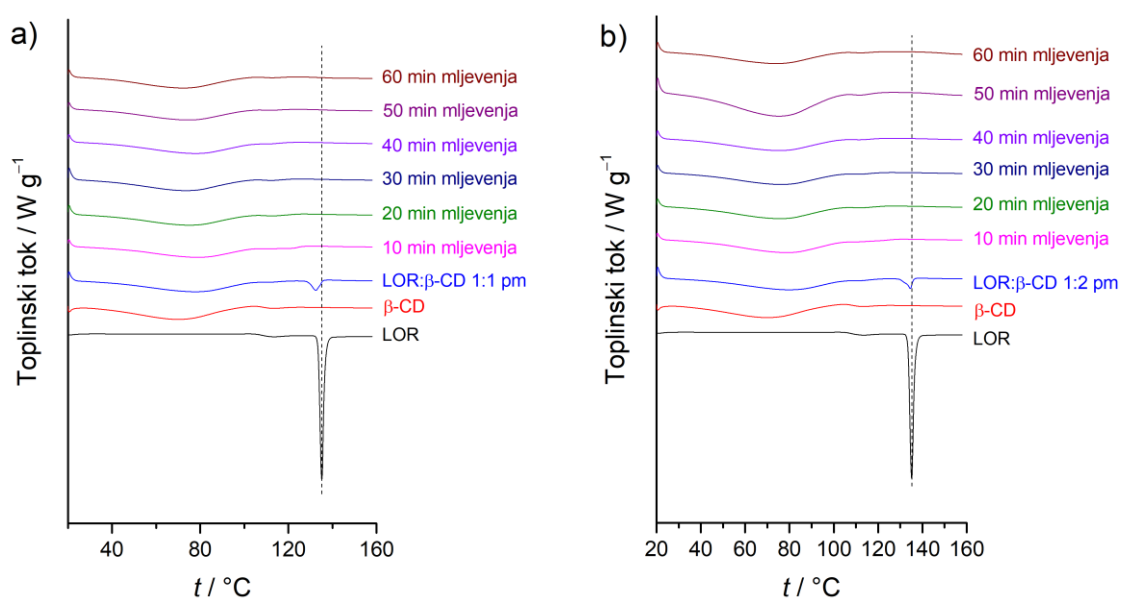
Za razliku od difraktograma HP- β -CD, u difraktogramu β -CD uočen je niz oštih difrakcijskih maksimuma, što je i očekivano budući da je β -CD kristalna tvar. Difraktogrami fizičkih smjesa superpozicija su difraktograma čistog LOR i β -CD, a u difraktogramima mljevenih uzoraka nisu uočeni difrakcijski maksimumi što upućuje na amorfizaciju uzorka (slika 32).



Slika 32. Difraktogrami LOR, β -CD te binarnih sustava LOR: β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i njihovih fizičkih smjesa (pm)

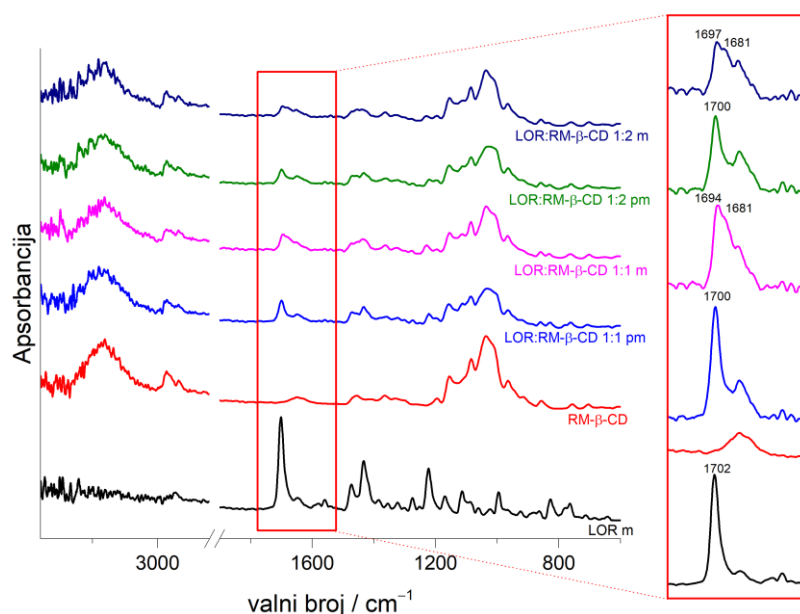
4.3.1.3. Priprava binarnih sustava LOR:RM- β -CD

Mljevenjem LOR i RM- β -CD u stehiometrijskim omjerima 1:1 i 1:2 brzo dolazi do amorfizacije uzorka. U DSC krivuljama LOR:RM- β -CD binarnih sustava uočeno je smanjenje signala taljenja loratadina i potpuni gubitak kristalne frakcije loratadina već nakon 20 min (LOR:RM- β -CD 1:1), odnosno 10 minuta (LOR:RM- β -CD 1:2) mljevenja (slika 33 i tablice D10 i D11).



Slika 33. DSC krivulje LOR i RM- β -CD u omjeru 1:1 (a) i 1:2 (b), njihovih fizičkih smjesa (pm) te uzoraka mljevenih pri 25 Hz; ukupna količina uzorka 1 g; 5 kuglica promjera 10 mm

Iako je do amorfizacije došlo u značajno kraćem vremenu u usporedbi s uzorcima s HP- β -CD i β -CD, u FT-IR ATR spektrima uočene promjene nisu toliko intenzivne. Primjerice, uočen je pomak vrpce koja odgovara istezanju karbonilne skupine pri 1700 cm^{-1} na 1694 cm^{-1} (LOR:RM- β -CD 1:1), odnosno 1697 cm^{-1} (LOR:RM- β -CD 1:2) te pojava nove vrpce pri 1681 cm^{-1} , što može ukazivati na djelomičan nastanak inkluzijskog kompleksa (slika 34). Međutim, na temelju intenziteta navedenih vrpca, može se zaključiti da je efikasnost kompleksiranja manja, budući da su vrpce pri 1694 cm^{-1} i 1697 cm^{-1} većeg intenziteta od vrpca pri 1681 cm^{-1} . U slučaju kompleksa s HP- β -CD i β -CD novonastala vrpca je bila većeg intenziteta, što može ukazivati na bolje kompleksiranje LOR s tim ciklodekstrinima. Također su uočeni manji pomaci ostalih vrpca što potvrđuje slabije kompleksiranje s RM- β -CD (tablica 19).

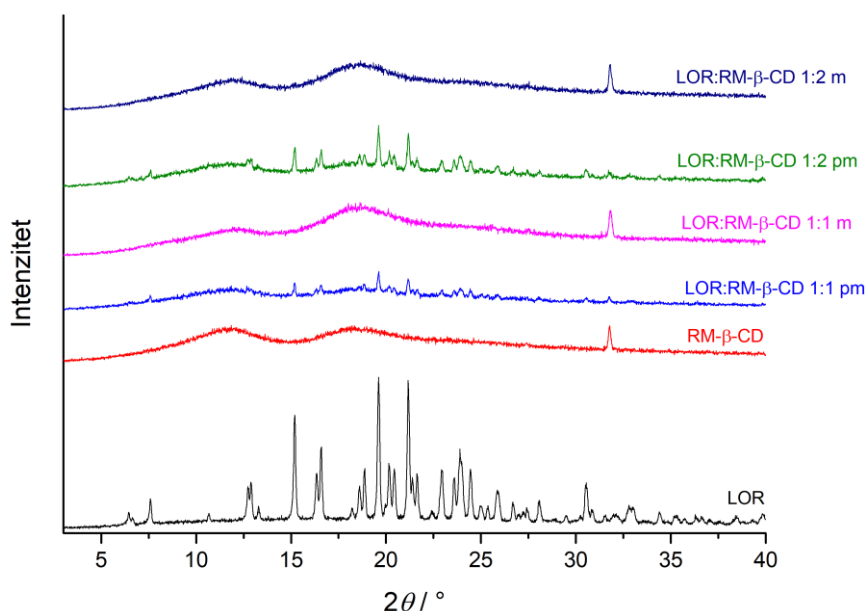


Slika 34. FT-IR ATR spektri LOR, RM- β -CD, binarnih sustava LOR:RM- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Tablica 19. Asignacija karakterističnih IR vrpca LOR u binarnim sustavima LOR:RM- β -CD stehiometrijskih omjera 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i u uzorcima fizičkih smjesa (pm)

Asignacija	LOR	LOR:RM- β -CD 1:1 pm	LOR:RM- β -CD 1:1 m	LOR:RM- β -CD 1:2 pm	LOR:RM- β -CD 1:2 m
$\nu(\text{C=O})$	1702	1700	1694	1700	1697
$\nu(\text{C=O})$	-	-	1681	-	1681
$\nu(\text{C=N})$	1648	1649	1653	1650	1652
$\nu(\text{C=C})$	1473	1471	1472	1470	1471
$\nu(\text{C=C})$	1433	1433	1435	1433	1440
$\nu(\text{C-O})$	1223	1222	1228	1221	1230

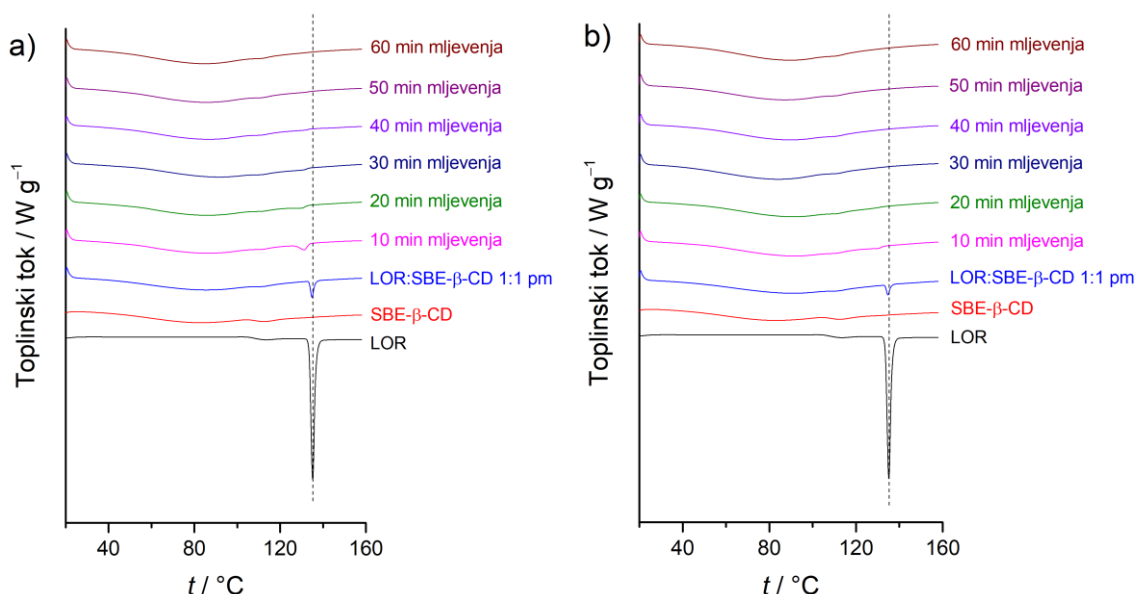
Rezultati PXRD analize potvrđuju potpunu amorfizaciju uzoraka pripremljenih mljevenjem budući da su uočena samo dva široka difrakcijska maksimuma karakteristična za RM- β -CD te nisu uočeni difrakcijski maksimumi karakteristični za LOR (slika 35).



Slika 35. Difraktogrami LOR, RM- β -CD te binarnih sustava LOR:RM- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i njihovih fizičkih smjesa (pm)

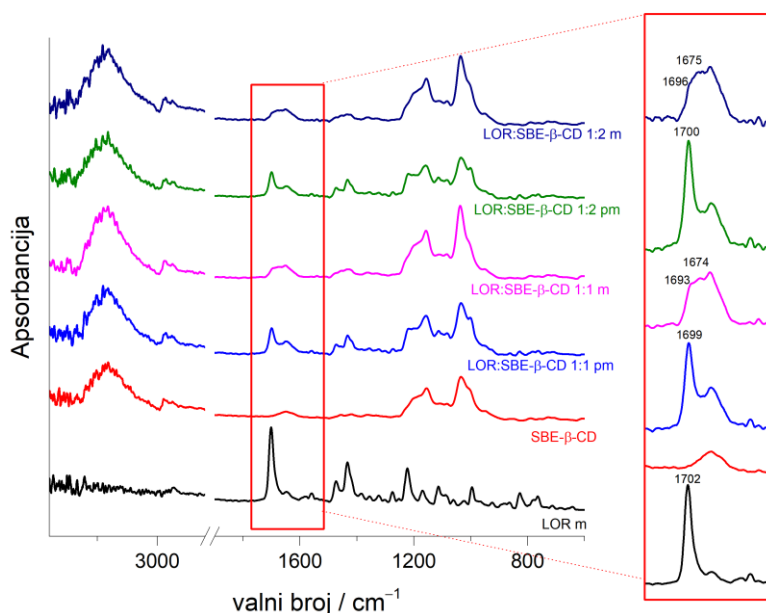
4.3.1.4. Priprava binarnih sustava LOR:SBE- β -CD

Mljevenjem uzoraka LOR i SBE- β -CD u stehiometrijskim omjerima 1:1 i 1:2 došlo je do potpune amorfizacije uzoraka nakon 50 min (LOR:SBE- β -CD 1:1), odnosno nakon 30 min (LOR:SBE- β -CD 1:2). Uzorci su analizirani svakih deset minuta mljevenja te je izračunat udio kristalne frakcije loratadina. Rezultati pokazuju nagli pad udjela kristalne frakcije na početku mljevenja (45 % za LOR:SBE- β -CD 1:1 i 26 % za LOR:SBE- β -CD 1:2 nakon 10 min mljevenja) te sporiju amorfizaciju ostatka kristalnog LOR tijekom ostatka mljevenja (slika 36 i tablice D12 i D13).



Slika 36. DSC krivulje LOR i SBE-β-CD u omjeru 1:1 (a) i 1:2 (b), njihovih fizičkih smjesa (pm) te uzoraka mljevenih pri 25 Hz; ukupna količina uzorka 1 g; 5 kuglica promjera 10 mm

Analiza FT-IR ATR tehnikom ponovno ukazuje na djelomično nastajanje kompleksa budući da je uočena nova vrpca pri 1674 cm⁻¹ (LOR:SBE-β-CD 1:1), odnosno 1675 cm⁻¹ (LOR:SBE-β-CD 1:2). Pomak ostalih vrpca karakterističnih za LOR također ukazuje na interakcije koje nisu prisutne u fizičkoj smjesi (slika 37 i tablica 20).

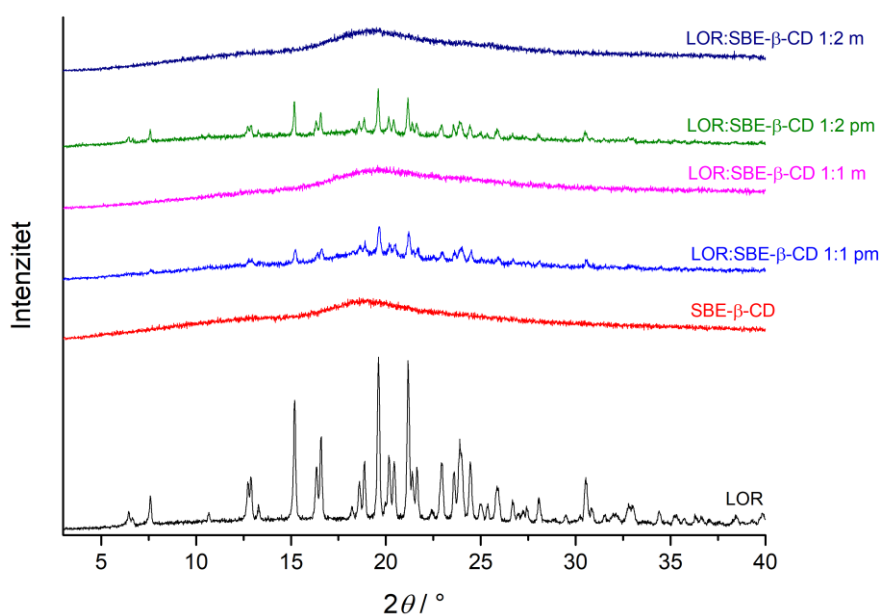


Slika 37. FT-IR ATR spektri LOR, SBE-β-CD, binarnih sustava LOR:SBE-β-CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Tablica 20. Assignacija karakterističnih IR vrpca LOR u binarnim sustavima LOR:SBE- β -CD stehiometrijskih omjera 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i u uzorcima fizičkih smjesa (pm)

Assignacija	LOR	LOR:SBE- β -CD 1:1 pm	LOR:SBE- β -CD 1:1 m	LOR:SBE- β -CD 1:2 pm	LOR:SBE- β -CD 1:2 m
$\nu(\text{C=O})$	1702	1699	1693	1700	1696
$\nu(\text{C=O})$	-	-	1674	-	1675
$\nu(\text{C=N})$	1648	1649	1652	1649	1652
$\nu(\text{C=C})$	1473	1472	1473	1473	1471
$\nu(\text{C=C})$	1433	1432	1432	1433	1432
$\nu(\text{C-O})$	1223	-	-	1220	-

Potpuna amorfizacija potvrđena je PXRD analizom budući da difraktogrami uzoraka pripremljenih mljevenjem ne sadrže oštre difrakcijske maksimume karakteristične za kristalinični LOR, već samo široke difrakcijske maksimume karakteristične za amorfne uzorke (slika 38).



Slika 38. Difraktogrami LOR, SBE- β -CD te binarnih sustava LOR:SBE- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (m) i njihovih fizičkih smjesa (pm)

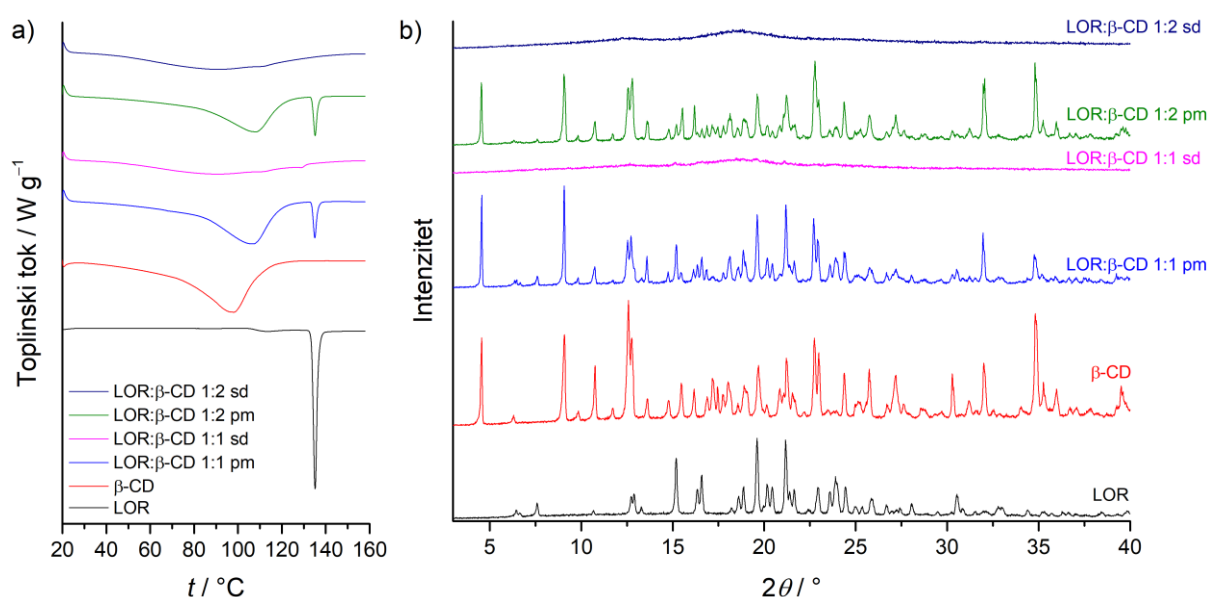
Rezultati analize uzoraka LOR:CD pripremljenih mljevenjem ukazuju da je došlo do potpune amorfizacije svih uzoraka što može biti uzrokovano samim mljevenjem, ali i barem djelomičnim nastankom inkluzijskih kompleksa, na što ukazuju rezultati FT-IR ATR analize. Od svih korištenih ciklodekstrina, RM- β -CD je uzrokovao najbržu amorfizaciju, a SBE- β -CD

najsporiju. Također, u svim slučajevima binarni sustavi LOR:CD 1:2 pokazali su bržu potpunu amorfizaciju naspram sustava LOR:CD 1:1.

4.3.2. Priprava binarnih sustava sušenjem raspršivanjem

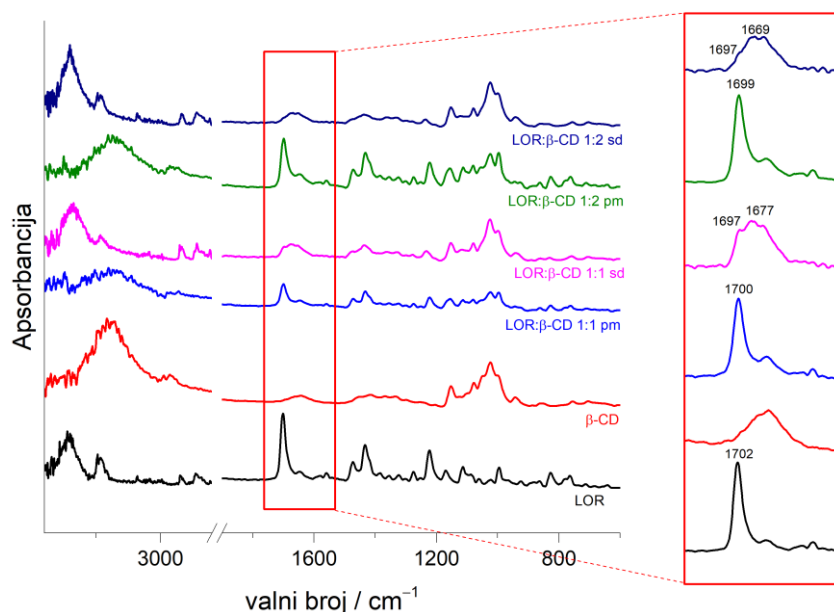
Uzorci binarnih sustava LOR:CD 1:1 i 1:2 također su pripremljeni konvencionalnim načinom pripreme, sušenjem raspršivanjem. Uzorci su okarakterizirani tehnikama DSC, FT-IR ATR i PXRD.

Za razliku od binarnih sustava LOR:β-CD pripremljenih mljevenjem, gdje je postignuta potpuna amorfizacija i gubitak kristalne frakcije LOR, uzorak LOR:β-CD 1:1 pripremljen sušenjem raspršivanjem sadrži mali udio kristalne frakcije (10,56 %), što je potvrđeno i PXRD analizom, budući da su vidljivi difrakcijski maksimumi veoma niskog intenziteta, karakteristični za LOR (slika 39 i tablica D14).



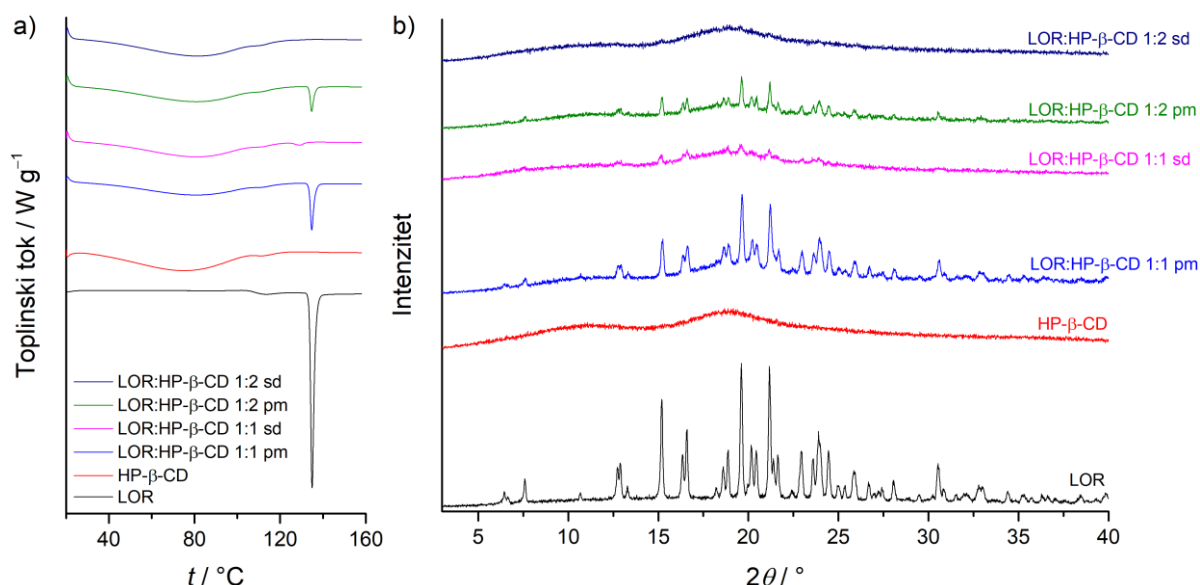
Slika 39. DSC krivulje (a) i difraktogrami (b) LOR, β-CD i binarnih sustava LOR:β-CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) i njihovih fizičkih smjesa (pm)

Analiza FT-IR ATR tehnikom pokazuje slične rezultate kao za uzorke pripremljene mljevenjem budući da je ponovno uočeno pojavljivanje nove vrpce pri 1677 cm⁻¹ (LOR:β-CD 1:1), odnosno 1669 cm⁻¹ (LOR:β-CD 1:2) te su uočeni pomaci drugih vrpce karakterističnih za LOR (slika 40 i tablica D15).

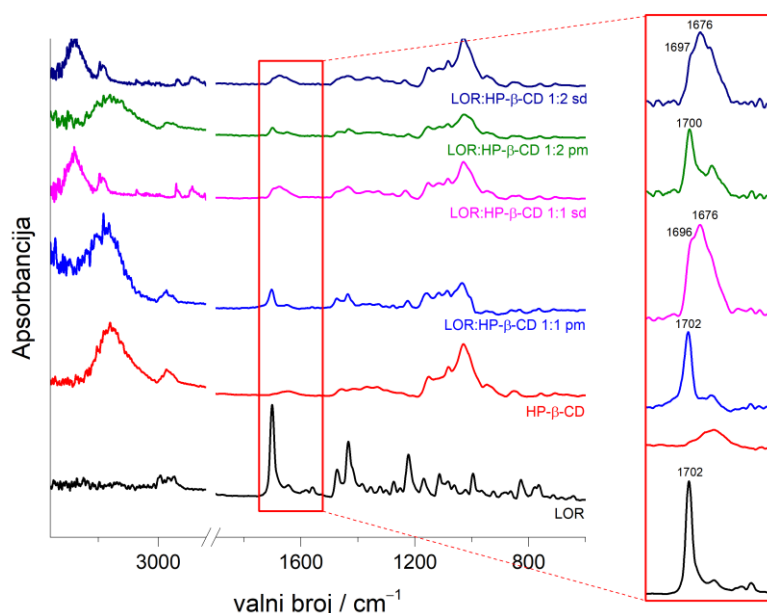


Slika 40. FT-IR ATR spektri LOR, β -CD, binarnih sustava LOR: β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Slični rezultati dobiveni su i za binarne sustave LOR:HP- β -CD pripremljene sušenjem raspršivanjem. Rezultati DSC analize ukazuju na mali zaostali udio kristalne frakcije u sustavu LOR:HP- β -CD 1:1 (10,78 %), dok je u uzorku LOR:HP- β -CD 1:2 došlo do potpune amorfizacije (slika 41 i tablica D14). Ovi rezultati se slažu s rezultatima PXRD analize, budući da su u difraktogramu uzorka LOR:HP- β -CD 1:1 uočeni difrakcijski maksimumi slabog intenziteta koji su karakteristični za kristalinični LOR. Difraktogram uzorka LOR:HP- β -CD 1:2 ukazuje na potpunu amorfizaciju (slika 41). U FT-IR ATR spektrima ponovno je uočen pomak vrpce istezanja karbonilne skupine prema nižim valnim brojevima (s 1702 cm^{-1} na 1696 cm^{-1} za LOR:HP- β -CD 1:1, odnosno na 1697 cm^{-1} za LOR:HP- β -CD 1:2) te nastajanje nove vrpce pri 1676 cm^{-1} , što može ukazivati na djelomičan nastanak inkluzijskog kompleksa u uzorku (slika 42 i tablica D15).

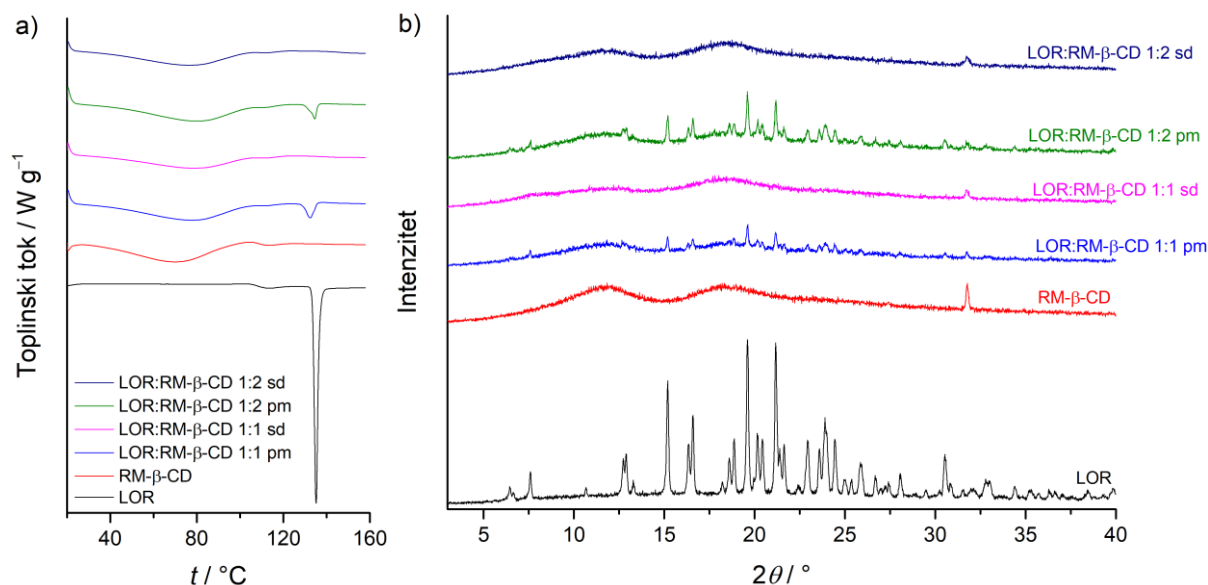


Slika 41. DSC krivulje (a) i difraktogrami (b) LOR, HP- β -CD i binarnih sustava LOR:HP- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) i njihovih fizičkih smjesa (pm)

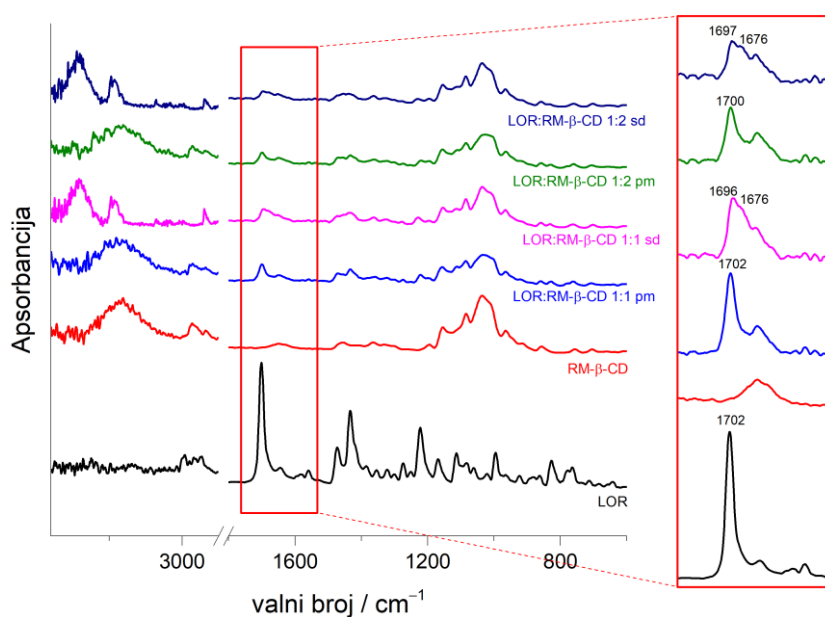


Slika 42. FT-IR ATR spektri LOR, HP- β -CD, binarnih sustava LOR:HP- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Za razliku od β -CD i HP- β -CD, uzorci pripremljeni s RM- β -CD sušenjem raspršivanjem ukazuju na potpunu amorfizaciju i gubitak kristalne frakcije LOR (slika 43 i tablica D14), a FT-IR ATR spektri ukazuju na djelomičan nastanak inkluzijskog kompleksa budući da dolazi do nastanka nove vrpce pri 1679 cm^{-1} (LOR:RM- β -CD 1:1), odnosno 1681 cm^{-1} (LOR:RM- β -CD 1:2) i pomaka postojećih vrpce karakterističnih za LOR (slika 44 i tablica D15).



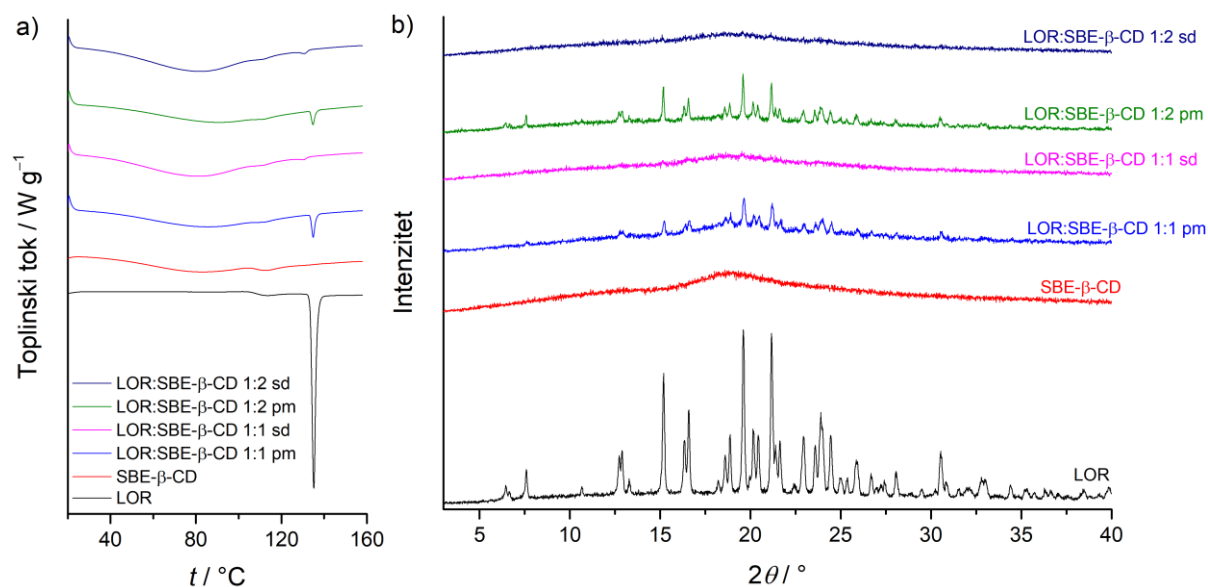
Slika 43. DSC krivulje (a) i difraktogrami (b) LOR, RM-β-CD i binarnih sustava LOR:RM-β-CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) i njihovih fizičkih smjesa (pm)



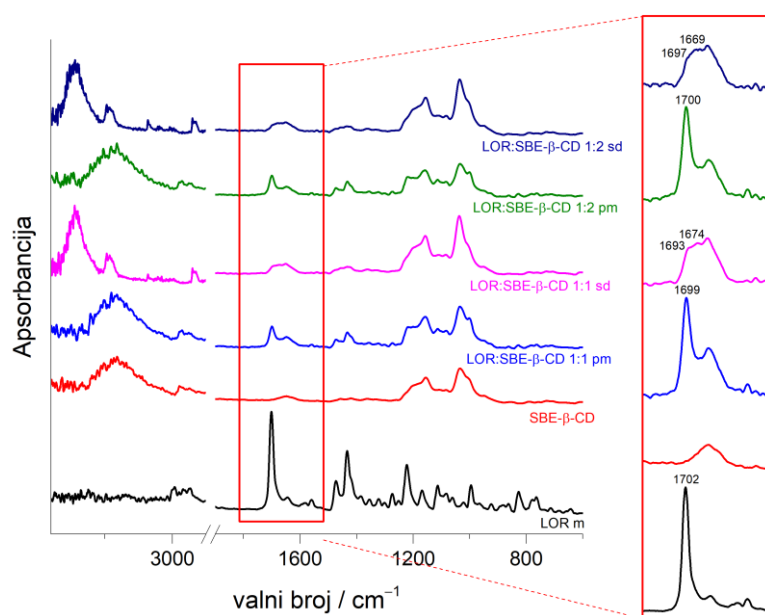
Slika 44. FT-IR ATR spektri LOR, RM-β-CD, binarnih sustava LOR:RM-β-CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Sušenje raspršivanjem se nije pokazalo kao podobna metoda za pripravu binarnih sustava LOR:SBE-β-CD, budući da rezultati DSC mjerenja pokazuju zaostalu kristalnu frakciju LOR u uzorcima LOR:SBE-β-CD 1:1 (8,87 %) i LOR:SBE-β-CD 1:2 (24,97 %), a na difraktogramima su uočeni veoma slabi intenziteti difrakcijskih maksimuma karakterističnih za

LOR (slika 45 i tablica D14). Međutim, rezultati FT-IR ATR analize ukazuju na djelomičan nastanak inkluzijskih kompleksa (slika 46 i tablica D15).



Slika 45. DSC krivulje (a) i difraktogrami (b) LOR, SBE- β -CD i binarnih sustava LOR:SBE- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) i njihovih fizičkih smjesa (pm)



Slika 46. FT-IR ATR spektri LOR, SBE- β -CD, binarnih sustava LOR:SBE- β -CD 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) te njihovih fizičkih smjesa (pm)

Budući da je tijekom raspršivanja otopine loratadina bez ciklodekstrina došlo do lijepljenja lijeka za zagrijane dijelove uređaja, nije bilo moguće sakupiti praškasti produkt. Stoga utjecaj

procesa sušenja raspršivanjem na fizikalno-kemijska svojstva loratadina nije bilo moguće ispitati

Usporedbom rezultata analize uzoraka dobivenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem, može se zaključiti da je mljevenje efikasniji način pripreme uzoraka budući da u svim uzorcima dolazi do potpune amorfizacije, dok u dijelu uzoraka pripremljenih sušenjem raspršivanjem zaostaje dio kristalne frakcije loratadina. Nadalje, u uzorcima pripremljenim mljevenjem do potpune amorfizacije dolazi u manje od sat vremena, te je ova metoda znatno brža ako se uzme u obzir čišćenje i priprema uređaja između dva uzorka. Dodatna prednost mljevenja je manji gubitak konačnog produkta, budući da je moguće gotovo cijeli uzorak prenijeti iz posudica za mljevenje, a jedini gubitak dolazi iz male količine uzorka koja zaostane u posudi za mljevenje i na kuglicama za mljevenje. Za razliku od toga, sušenjem raspršivanjem dolazi do velikog gubitka uzorka (otprilike 50 %; Tablica D16) budući da veliki dio zaostane na stijenkama komore za sušenje i ciklona, a dio uzorka prolazi kroz ciklon te ga nije moguće sakupiti. Osim toga, mljevenjem se izbjegava upotreba organskih otapala koji su potrebni za otapanje slabo topljivih lijekova.

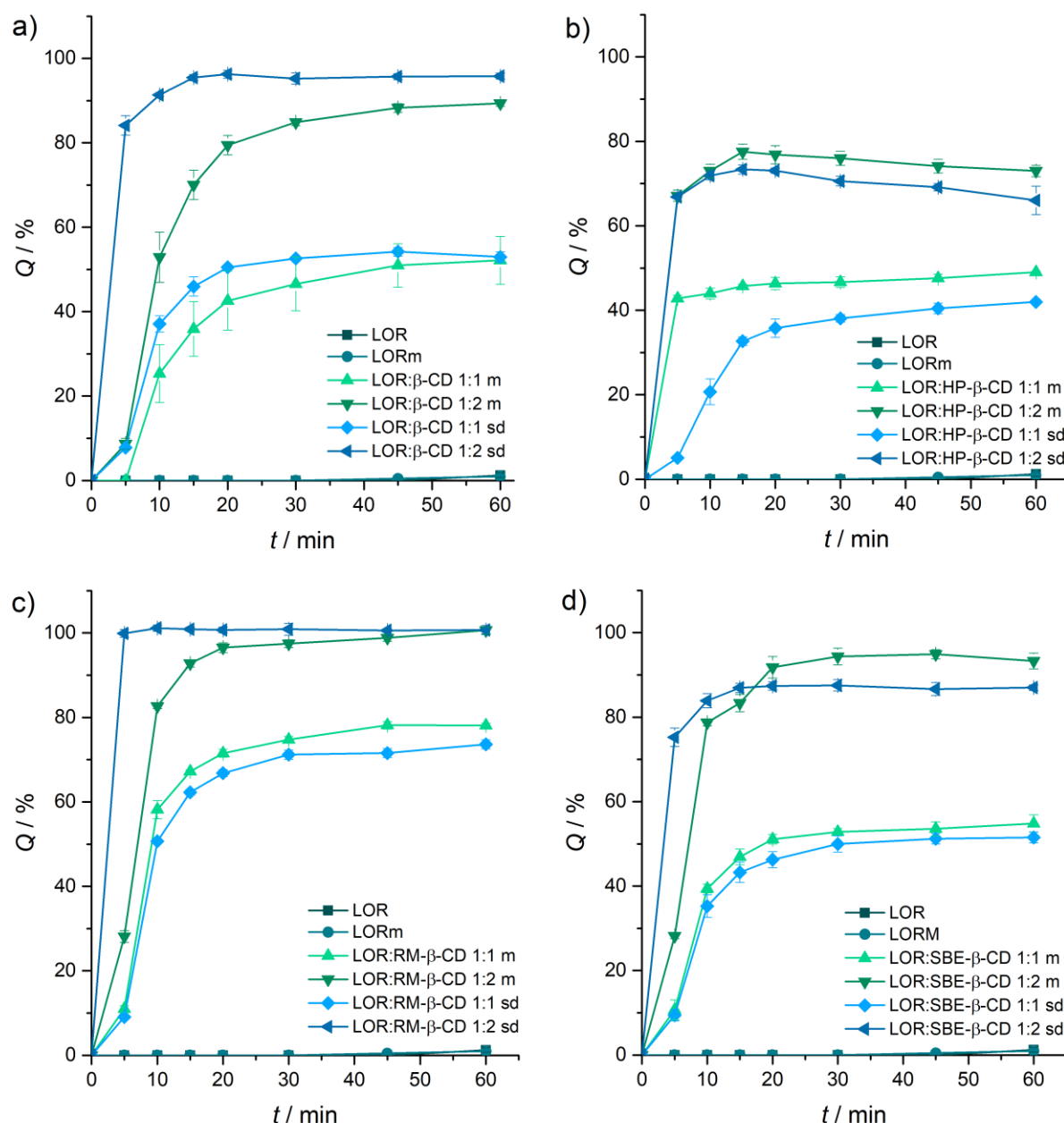
4.3.3. Profili *in vitro* otapanja loratadina i pripremljenih binarnih sustava s ciklodekstrinima

Istraživanja *in vitro* otapanja često se koriste za predviđanje *in vivo* svojstava oralnih farmaceutskih formulacija u gastrointestinalnom traktu. Stoga su izbor medija i uvjeti izvođenja eksperimenata veoma važni.¹³³ Metode istraživanja *in vitro* otapanja loratadina navedene u bazi podataka agencije FDA kao medij navode simulirani želučani medij (pH 1,0).¹³⁴ Međutim, loratadin pri niskom pH pokazuje trenutno otapanje. Nadalje, *in vivo* istraživanja pokazala su velike varijacije u bioraspoloživosti, zbog značajnih razlika u želučanom pH ispitivanih pojedinaca.¹¹⁰ Budući da je loratadin slaba baza, do apsorpcije dolazi u intestinalnom traktu kada je u neioniziranom obliku.¹²² Stoga će se istraživanja brzine *in vitro* otapanja u ovom radu provoditi u simuliranom intestinalnom mediju, kako bi se mogao uočiti pozitivan utjecaj ciklodekstrina.

Istražena je brzina *in vitro* otapanja samog loratadina i binarnih sustava LOR:CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem. Eksperimenti su provedeni u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) pri 37 °C u trajanju od 60 minuta, a uzorci su analizirani u određenim vremenskim intervalima, pazеći da se nadomjesti izvučeni medij.

Na slici 47 prikazani su dobiveni profili *in vitro* otapanja loratadina i binarnih sustava s ciklodekstrinima. Budući da je loratadin slabo topljiv pri višim pH-vrijednostima, otapanje čistog loratadina je sporo i nepotpuno, a slični rezultati dobiveni su i za loratadin podvrgnut mljevenju. To pokazuje da samo mljevenje ne mijenja značajno brzinu otapanja lijeka. Međutim, binarni sustavi s ciklodekstrinima pokazuju značajno povećanje opsega otapanja, te je za neke uzorke ono potpuno već nakon 10 minuta. Pri tome, na ukupnu brzinu i opseg otapanja lijeka utječu odabrani ciklodekstrin, omjer lijeka i ciklodekstrina u pripremljenom binarnom produktu te tehnologija korištena za pripremu kompleksa. U svim slučajevima otapanje je brže za binarne sustave pripremljene pri omjeru LOR:CD 1:2, što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja sustava LOR i dimetil β -CD.⁵

Kod sustava LOR:HP- β -CD 1:2 nakon 20 minuta uočeno je smanjenje koncentracije lijeka. To se može objasniti nastajanjem supersaturiranih otopina koje su nestabilne te se lijek taloži s vremenom, što je uzrokovalo smanjenje koncentracije LOR u otopini, a samim time i manji udio otopljenog LOR. Može se pretpostaviti kako će taj efekt biti još izraženiji u *in vivo* uvjetima nakon oralne primjene lijeka, zbog kompeticije žučnih soli za kompleksiranje s ciklodekstrinom.¹³⁵



Slika 47. Profili *in vitro* otapanja LOR i binarnih sustava LOR:CD stehiometrijskih omjera 1:1 i 1:2 pripremljenim mljevenjem (m) i sušenjem raspršivanjem (sd) u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) pri 37 °C ($n = 3$)

Učinkovitost otapanja izračunata je za sve sustave i prikazana u tablici 21. Mljevenje nema značajan utjecaj na učinkovitost otapanja samog loratadina, budući da nema velikih razlika u vrijednostima DE (0,15 % za sirovinu i 0,24 % za LOR pripremljen mljevenjem). Najveća učinkovitost otapanja mljevenih uzoraka bila je u slučaju sustava LOR:RM- β -CD 1:2 (87 %), a najmanja u slučaju sustava LOR: β -CD 1:1 (39 %). Uzorci dobiveni sušenjem raspršivanjem

prate sličan trend. Najveća učinkovitost otapanja je također u slučaju sustava LOR:RM- β -CD 1:2 (97 %), ali najmanja u slučaju sustava LOR:HP- β -CD 1:1 (33 %). Usporedbom sustava pripremljenih različitim metodama uočene su relativno slične vrijednosti učinkovitosti otapanja, osim u slučaju sustava LOR: β -CD 1:1 (72 % mljeveni uzorak, 90 % sušenje raspršivanjem), LOR:HP- β -CD 1:1 (45 % mljeveni uzorak, 33 % sušenje raspršivanjem) i LOR:RM- β -CD 1:2 (87 % mljeveni uzorak, 97 % sušenje raspršivanjem).

Tablica 21. Učinkovitost *in vitro* otapanja (DE) te faktori učinkovitosti *in vitro* otapanja (DEF) loratadina samog i u binarnim sustavima LOR:CD pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) pri 37 °C.

	Mljevenje		Sušenje raspršivanjem	
	DE / %	DEF / %	DE	DEF
LOR	0,24±0,07	1,54±0,43	-	-
LOR: β -CD 1:1	39,40±5,30	255,22±34,34	45,02±0,58	291,61±3,79
LOR: β -CD 1:2	71,82±1,21	465,21±7,83	90,33±0,55	585,16±3,56
LOR:HP- β -CD 1:1	44,61±0,81	288,94±5,22	32,65±1,00	211,50±6,48
LOR:HP- β -CD 1:2	71,23±1,49	461,43±9,67	67,06±1,04	434,40±6,71
LOR:RM- β -CD 1:1	65,19±0,24	422,28±1,53	60,44±0,62	391,54±4,04
LOR:RM- β -CD 1:2	86,63±0,57	561,15±3,72	96,50±0,54	625,10±3,51
LOR:SBE- β -CD 1:1	45,72±0,75	296,14±4,86	42,77±1,43	277,03±9,23
LOR:SBE- β -CD 1:2	82,38±0,97	533,62±6,30	82,21±1,12	532,54±7,26

učinkovitost otapanja sirovine: DE(LOR) = (0,15±0,06) %

Učinak nastajanja kompleksa loratadina s ispitivanim ciklodekstrinima na profil *in vitro* otapanja lijeka dodatno je vrednovan na temelju izračuna faktora sličnosti, f_2 . Faktor sličnosti predstavlja statistički parametar koji se koristi za kvantitativnu procjenu sličnosti između dvaju profila *in vitro* otapanja lijeka. Kada vrijednost f_2 iznosi 100, može se reći da su profili otapanja identični, a ako je vrijednost f_2 veća od 50, može se reći da su profili otapanja slični, s prosječnom razlikom u pojedinim točkama manjom od 10%. U tom smislu, brojne regulatorne agencije, kao što su EMEA i FDA, smatraju vrijednosti f_2 u rasponu od 50 do 100 dokazom sličnosti dva profila otapanja lijeka, što pretpostavlja istovjetnost učinka nakon primjene lijeka te je osnova za oslobađanje od regulatornog zahtjeva za ispitivanje bioekvivalencije. U

konačnici, vrijednost f_2 manja od 50 ukazuje na značajnu razliku u razmatranim profilima oslobađanja.^{125,136} Budući da su za računanje vrijednosti f_2 u ovom radu korištene prosječne vrijednosti tri mjerenja, rezultati su izraženi kao prosječni faktori sličnosti.

Mljevenje ne uzrokuje značajne promjene u kinetici otapanja samog loratadina, budući da vrijednost faktora sličnosti profila otapanja netretiranog loratadina (LORs) i mljevenog loratadina (LORm) iznosi 99,62. Dodatak svih ispitivanih ciklodekstrina znatno mijenja profil oslobađanja lijeka, budući da su vrijednosti faktora sličnosti profila LOR (i same sirovine i mljevenog) i binarnih sustava LOR:CD manji od 50, odnosno u rasponu 1 – 25, neovisno o korištenoj tehnologiji pripreme kompleksa (tablica 22).

Usporedbom vrijednosti faktora sličnosti binarnih sustava LOR:CD pripremljenih mljevenjem, možemo uočiti da su u većini slučajeva vrijednosti manje od 50, što ukazuje na različite profile *in vitro* otapanja. Izuzetak su profili otapanja sustava LOR: β -CD 1:1 i LOR:SBE- β -CD 1:1 ($f_2 = 53,71$), LOR: β -CD 1:2 i LOR:RM- β -CD 1:1 ($f_2 = 56,46$) te LOR:RM- β -CD 1:2 i LOR:SBE- β -CD 1:2 ($f_2 = 64,31$). Vrijednosti faktora sličnosti ovih parova sustava ukazuju na sličnost profila otapanja, odnosno da se primjenom ovih sustava može očekivati istovjetna učinkovitost lijeka.

Sustavi pripremljeni sušenjem raspršivanjem također u većini slučajeva imaju vrijednosti faktora sličnosti manje od 50, što ukazuje na različitost profila otapanja. Izuzetak su profili otapanja sustava LOR: β -CD 1:1 i LOR:SBE- β -CD 1:1 ($f_2 = 78,55$), LOR: β -CD 1:2 i LOR:SBE- β -CD 1:2 ($f_2 = 54,88$) te LOR: β -CD 1:2 i LOR:RM- β -CD 1:2 ($f_2 = 55,47$), gdje su vrijednosti faktora sličnosti veće od 50, što ukazuje na sličnost profila otapanja.

Usporedbom binarnih sustava LOR:CD pripremljenih različitim tehnološkim postupcima može se zaključiti da u većini slučajeva način pripreme utječe na profil otapanja osim u slučaju sustava LOR: β -CD 1:1 ($f_2 = 57,02$), LOR:HP- β -CD 1:2 ($f_2 = 68,64$), LOR:RM- β -CD 1:1 ($f_2 = 65,56$) i LOR:SBE- β -CD 1:1 ($f_2 = 73,9$). Na temelju rezultata vidljivo je da su dobiveni slični profili otapanja za binarne sustave LOR:CD 1:1 za sve CD osim HP- β -CD. Binarni sustavi LOR:CD 1:2 nemaju slične profile otapanja osim u slučaju HP- β -CD.

Osim navedenih binarnih sustava, slični profili otapanja uočeni su još i za sustave LOR: β -CD 1:1 m sa LOR:HP- β -CD 1:1 sd ($f_2 = 57,58$) i LOR:SBE- β -CD 1:1 sd ($f_2 = 61,57$) te LOR: β -CD 1:1 sd sa LOR:SBE- β -CD 1:1 m ($f_2 = 86,73$).

Iako većina produkata pripremljenih mehanokemijskom aktivacijom neće ostvariti istovjetni učinak nakon primjene kao i kompleksi pripremljeni tehnikom sušenja raspršivanjem,

u usporedbi sa samim loratadinom postignuta je značajnija učinkovitost otapanja. Obzirom da je mehanokemijska aktivacija mljevenjem ekološki značajno prihvatljiviji postupak budući da ne zahtijeva uporabu organskih otapala, prednost u daljnjim fazama istraživanja treba dati binarnim produktima koji su pripremljeni ovom tehnikom.⁵⁶

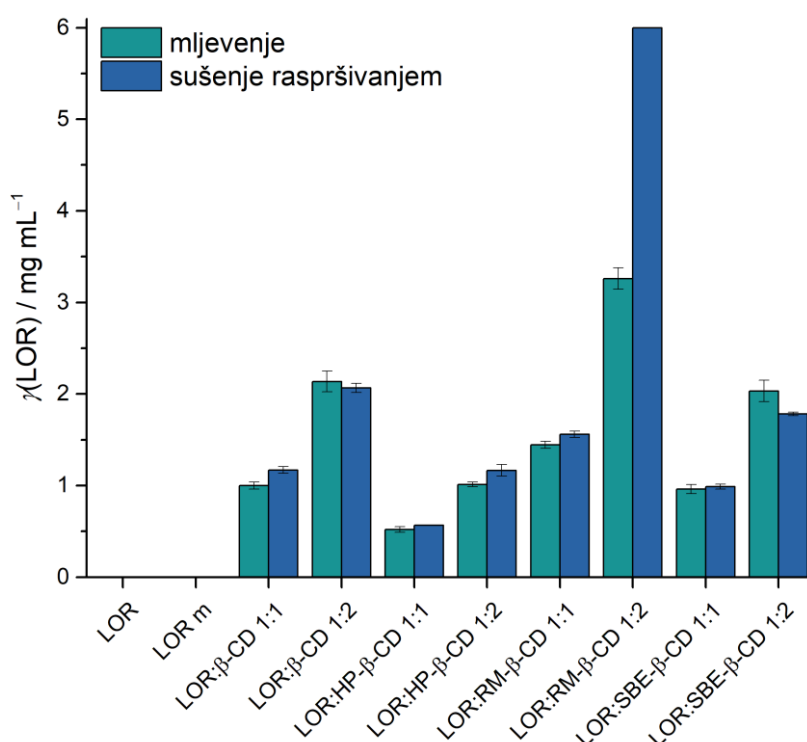
Tablica 22. Vrijednosti prosječnih faktora sličnosti f_2 za usporedbu sličnosti profila otapanja LOR i sustava LOR:CD pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem. Zelenom bojom označene su vrijednosti veće od 50 koje ukazuju na sličnost uspoređivanih profila

		LOR		LOR:β-CD				LOR:HP-β-CD				LOR:RM-β-CD				LOR:SBE-β-CD			
		s	m	1:1 m	1:2 m	1:1 sd	1:2 sd	1:1 m	1:2 m	1:1 sd	1:2 sd	1:1 m	1:2 m	1:1 sd	1:2 sd	1:1 m	1:2 m	1:1 sd	1:2 sd
LOR	s	x	99,62	21,43	8,42	18,55	2,95	18,36	8,03	25,61	9,19	10,38	4,13	12,03	1,34	18,16	5,37	19,73	5,01
	m	99,62	x	21,45	8,42	18,56	2,96	18,4	8,04	25,63	9,19	10,39	4,13	12,04	1,34	18,17	5,38	19,75	5,02
LOR:β-CD	1:1 m	21,43	21,45	x	25,55	57,02	13,01	38,44	21,03	57,58	22,49	29,61	16,52	33,96	10,26	53,71	18,74	61,57	16,27
	1:2 m	8,42	8,42	25,55	x	29,68	24,6	25,46	31,42	21,47	30,29	56,46	37,73	48,19	20,08	30,2	42,92	27,84	28,58
	1:1 sd	18,55	18,56	57,02	29,68	x	15,79	43,99	25,21	45,62	26,95	35,46	19,66	41,2	12,68	86,73	22,27	78,55	19,55
	1:2 sd	2,95	4,50	13,01	24,6	15,79	x	17,64	36,86	11,38	32,79	23,84	34,74	21,63	55,47	16,36	34,09	15,09	54,88
LOR:HP-β-CD	1:1 m	18,36	18,37	38,44	25,46	43,99	17,64	x	29,03	37,94	32,09	30,36	18,68	33,48	14,55	45,7	21,18	45,3	21,88
	1:2 m	8,03	8,04	21,03	31,42	25,21	36,86	29,03	x	19,07	68,64	33,8	32,31	31,89	29,94	26,13	35,67	24,3	48,98
	1:1 sd	25,61	25,63	57,58	21,47	45,62	11,38	37,94	19,07	x	20,65	25,02	13,99	28,45	8,87	44,08	15,97	49,91	14,45
	1:2 sd	9,19	9,19	22,49	30,29	27,0	32,79	32,09	68,64	20,65	x	33,65	29,35	32,45	27,11	27,98	32,6	26,1	42,17
LOR:RM-β-CD	1:1 m	10,38	10,39	29,61	56,46	35,46	23,84	30,36	33,8	25,02	33,65	x	33,57	65,56	19,37	36,33	38,56	33,09	28,58
	1:2 m	4,13	4,13	16,52	37,73	19,66	34,74	18,68	32,31	13,99	29,35	33,57	x	29,32	28,88	20,16	64,31	18,52	36,47
	1:1 sd	12,03	12,04	33,96	48,19	41,2	21,63	33,48	31,89	28,45	32,45	65,56	29,32	x	17,54	13,18	42,24	38,14	26,15
	1:2 sd	1,34	1,34	10,26	20,08	12,68	55,47	14,55	29,94	8,87	27,11	19,37	28,88	17,54	x	13,18	27,83	12,09	40,92
LOR:SBE-β-CD	1:1 m	18,16	18,17	53,71	30,2	86,73	16,36	45,7	26,13	44,08	27,98	36,33	20,16	42,24	13,18	x	22,84	73,9	20,24
	1:2 m	5,37	5,38	18,74	42,92	22,27	34,09	21,18	35,67	15,97	32,6	38,56	64,31	33,37	27,83	22,84	x	21	37,93
	1:1 sd	19,73	19,75	61,57	27,84	78,55	15,09	45,3	24,3	49,91	26,1	33,09	18,52	38,14	12,09	73,9	21	x	18,75
	1:2 sd	5,01	5,02	16,27	28,58	19,55	54,88	21,88	48,98	14,45	42,17	28,58	36,47	26,15	40,92	20,24	37,93	18,75	x

s – sama sirovina; m – uzorci pripremljeni mljevenjem; sd – uzorci pripremljeni sušenjem raspršivanjem

4.3.4. Zasićena topljivost loratadina i pripremljenih binarnih sustava

Istražena je zasićena topljivost LOR u binarnim sustavima LOR:CD pripremljenim mljevenjem i sušenjem raspršivanjem u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) pri sobnoj temperaturi. Rezultati ukazuju na značajno povećanje topljivosti LOR. Najveće povećanje topljivosti uočeno je u prisutnosti RM- β -CD pri stehiometrijskom omjeru LOR:RM- β -CD 1:2 (otprilike 2700 puta), a najmanje u prisutnosti HP- β -CD pri stehiometrijskom omjeru LOR:HP- β -CD 1:1 (otprilike 400 puta). Mljevenjem samog loratadina nije došlo do promjene u topljivosti, što ukazuje da samo mljevenje nema značajan utjecaj na topljivost, te je povećanje zasićene topljivosti u binarnim sustavima izričito posljedica prisutnosti ciklodekstrina. Također nisu uočene značajnije razlike u povećanju zasićene topljivosti uzoraka pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem. Jedina značajna razlika uočena je u slučaju uzorka LOR:RM- β -CD 1:2 gdje je uzorak pripremljen raspršivanjem potpuno otopljen, dok isti uzorak pripremljen mljevenjem nije potpuno otopljen. Također je uočeno značajnije povećanje zasićene topljivosti sustava LOR:CD stehiometrijskog omjera 1:2, što je i očekivano zbog većeg udjela ciklodekstrina (slika 48 i tablica 23).



Slika 48. Zasićena topljivost LOR i binarnih kompleksa LOR:CD 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem (●) i sušenjem raspršivanjem (●), simulirani intestinalni medij (pH 6,8), sobna temperatura ($n = 3$)

Tablica 23. Zasićena topljivost LOR i binarnih sustava LOR:CD u stehiometrijskim omjerima 1:1 i 1:2 pripremljenih mljevenjem i sušenjem raspršivanjem u simuliranom intestinalnom mediju (pH 6,8) pri sobnoj temperaturi ($n = 3$)

Uzorak	Mljevenje		Sušenje raspršivanjem	
	$\gamma(\text{LOR}) / \text{mg mL}^{-1}$	$\gamma(\text{LOR}) / \gamma_0(\text{LOR})$	$\gamma(\text{LOR}) / \text{mg mL}^{-1}$	$\gamma(\text{LOR}) / \gamma_0(\text{LOR})$
LOR	0,0014±0,0002	1,0±0,2	-	-
LOR:β-CD 1:1	1,00±0,04	821±42	1,17±0,04	960±57
LOR:β-CD 1:2	2,14±0,11	1751±59	2,07±0,05	1696±122
LOR:HP-β-CD 1:1	0,52±0,03	426±4	0,57±0,00	465±23
LOR:HP-β-CD 1:2	1,01±0,02	831±38	1,17±0,06	958±85
LOR:RM-β-CD 1:1	1,44±0,04	1184±30	1,56±0,03	1280±72
LOR:RM-β-CD 1:2	3,26±0,12	2673±59	p.o.	p.o.
LOR:SBE-β-CD 1:1	0,96±0,05	789±26	0,99±0,03	810±44
LOR:SBE-β-CD 1:2	2,03±0,12	1665±21	1,78±0,02	1464±84

p.o. – potpunu otopljeno; zasićena topljivost sirovine – $\gamma(\text{LOR}) = 0,0012 \pm 0,0001 \text{ mg mL}^{-1}$

4.4. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina

Kako bi se provelo istraživanje utjecaja ciklodekstrina na stabilnost loratadina, potrebno je razviti i validirati metodu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda. Tijekom razvoja metode ispitane su različite mobilne faze, uključujući vodene otopine mravlje kiseline, amonijevog acetata i amonijevog formijata, te metanol i acetonitril. Za svaku mobilnu fazu očitano je vrijeme zadržavanja i površina kromatografskog pika. Iako su u svim slučajevima uočeni oštri i simetrični kromatografski pikovi loratadina, značajne su razlike u vremenima zadržavanja. Najkraće vrijeme zadržavanja (8,5 min) postignuto je uz mobilne faze koje su se sastojale od vode i acetonitrila uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline. Najbolja osjetljivost, odnosno najveće vrijednosti površine kromatografskog pika loratadina postignuto je uz mobilne faze koje su sadržavale mravlju kiselinu (tablica 24). Stoga su za validaciju i analizu uzoraka korištene mobilne faze koje su se sastojale od otopine mravlje kiseline u vodi i u acetonitrilu.

Tablica 24. Utjecaj sastava mobilnih faza na vrijeme zadržavanja i površinu kromatografskog pika loratadina, $\gamma(\text{LOR}) = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Metoda	Mobilna faza A	Mobilna faza B	t_R / min	Površina $\lambda = 278 \text{ nm}$
A	0,1 % FoA u H ₂ O	0,1 % FoA u ACN	8,466	30,3
B	0,1 % FoA u H ₂ O	0,1 % FoA u MeOH	12,636	30,5
C	5 mM NH ₄ Fo u H ₂ O	ACN	11,55	20,1
D	5 mM NH ₄ Fo u H ₂ O	MeOH	14,125	20,7
E	5 mM NH ₄ Ac u H ₂ O	ACN	11,56	19,9
F	5 mM NH ₄ Ac u H ₂ O	MeOH	14,127	20,2

FoA – mravlja kiselina; NH₄Fo – amonijev formijat; NH₄Ac – amonijev acetat; ACN – acetonitril; MeOH – metanol

Metoda je validirana prema ICH smjernicama te su određene granice detekcije i kvantifikacije, raspon linearnosti, preciznost, specifičnost i robusnost metode.^{108,109} Metoda se pokazala pogodnom za kvantifikaciju loratadina u prisutnosti razgradnih produkata u linearnom rasponu koncentracije loratadina (5 – 50) $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa dovoljno niskim granicama detekcije ((0,061 ± 0,06) $\mu\text{g mL}^{-1}$) i kvantifikacije ((1,86 ± 0,19) $\mu\text{g mL}^{-1}$) te odgovarajućom preciznošću (tablica D17). Istražena je robusnost metode uvođenjem malih promjena protoka, početnog sastava mobilne faze te temperature kolone. Rezultati ukazuju da ove promjene nemaju značajan utjecaj na vrijeme zadržavanja i površinu kromatografskog pika loratadina (slika D5). Također je ispitana selektivnost metode provođenjem prisilne razgradnje loratadina u prisutnosti NaOH i H₂O₂. U kromatogramima razgrađenih uzoraka uočeni su dobro razdvojeni kromatografski pikovi loratadina i njegovih razgradnih produkata, što ukazuje na dobru selektivnost metode. (slika D6).

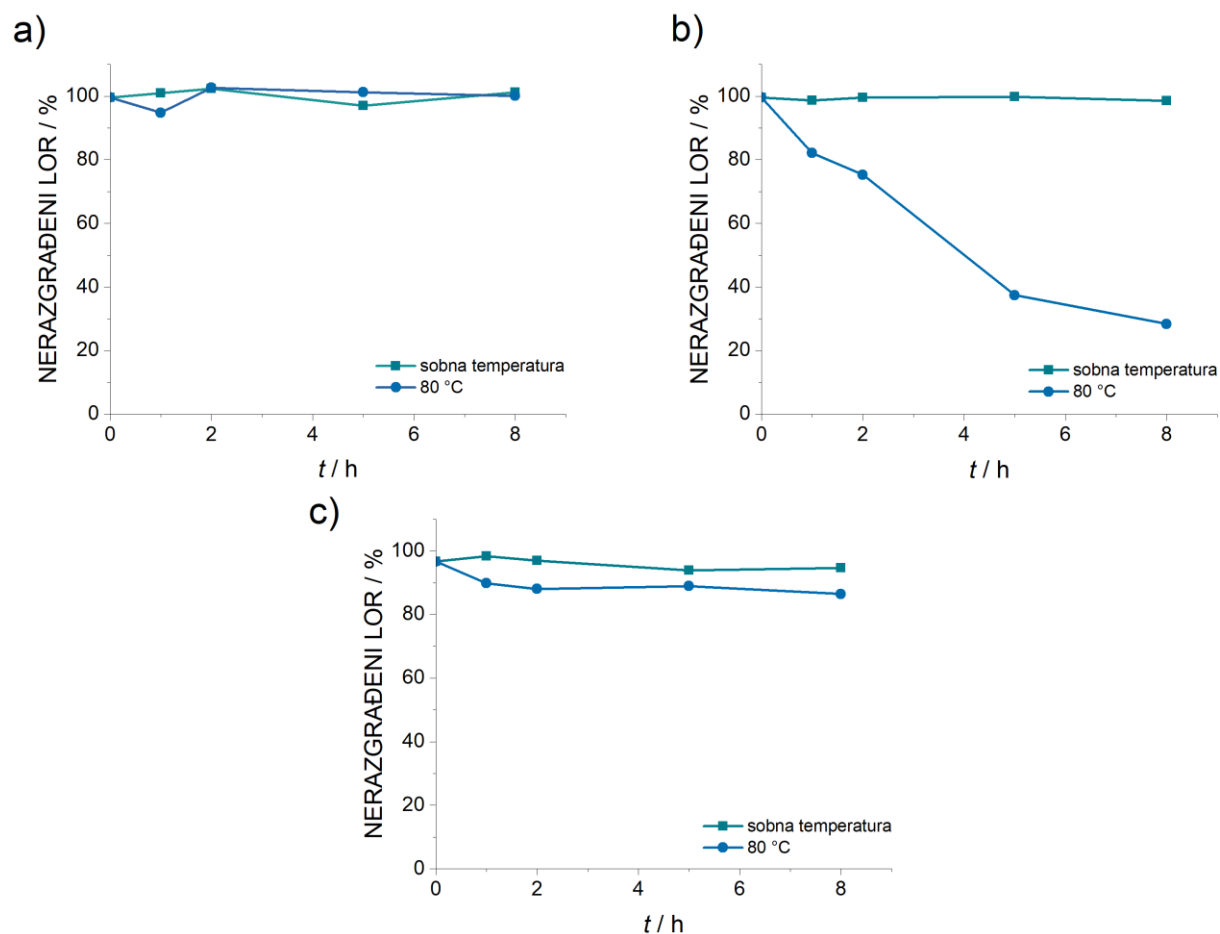
4.4.1. Prisilna razgradnja loratadina bez i u prisutnosti ciklodekstrina

Prisilna razgradnja je proces tijekom kojeg se aktivne tvari u obliku sirovine ili gotovog farmaceutskog oblika razgrađuju u uvjetima koji su ekstremniji u odnosu na uvjete korištene u studijama ubrzane razgradnje. Cilj ovih eksperimenata je dobivanje razgradnih produkata kako bi se utvrdio razgradni put farmaceutika, ali i razvile metode analize farmaceutika u prisutnosti njegovih razgradnih produkata koje će se koristiti i pri analizi nakon studija dugotrajne i ubrzane razgradnje. Eksperimenti se provode u kiselim, bazičnim i oksidativnim uvjetima, pri sobnoj temperaturi ili uz povišenu temperaturu.^{137,138} Za detekciju i karakterizaciju razgradnih produkata koriste se razni moderni spregnuti sustavi poput GC-MS, LC-MS, CE-MS, LC-

NMR, LC-FT-IR, itd. Spregnuti sustav LC-MS jedna je od najčešće korištenih tehnika zbog svoje osjetljivosti.^{139,140}

U ovom radu provedena je prisilna razgradnja loratadina u kiselim i bazičnim te oksidativnim uvjetima, uz zagrijavanje i pri sobnoj temperaturi. Razgradnja loratadina pratila se 8 sati te su uzorci analizirani u određenim vremenskim periodima (0 h, 1 h, 2 h, 5 h i 8 h). Uzorci su analizirani prethodno validiranom metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda. Očitane su vrijednosti površine kromatografskog pika loratadina i izračunat je udio nerazgrađenog loratadina.

Loratadin je stabilan u kiselom mediju pri sobnoj temperaturi, što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja.¹⁴¹ Međutim, uz zagrijavanje dolazi do slabe razgradnje te je u kromatogramu uočen pik razgradnog produkta pri vremenu zadržavanja 5,5 min. Oksidativnom razgradnjom na sobnoj temperaturi razgrađeno je 5,4 % loratadina, a pri 80 °C razgrađeno je 14 % loratadina. Pik razgradnog produkta uočen je pri vremenu zadržavanja 8,8 min. Najveći udio razgradnje uočen je pri bazičnim uvjetima, što je u skladu s prethodnim istraživanjima.^{141–143} Pri sobnoj temperaturi razgrađeno je 1,4 % loratadina, a pri povišenoj temperaturi 72 % loratadina. Vremena zadržavanja razgradnih produkata iznosila su 5,5 min i 7,8 min. Razgradnja loratadina pri hidrolitičkim i oksidativnim uvjetima prikazana je na slici 49, a u tablici D18 navedeni su razgradni produkti uočeni u uzorcima nakon osam sati razgradnje.



Slika 49. Prisilna razgradnja LOR u kiselim (a), bazičnim (b) i oksidativnim (c) uvjetima, pri sobnoj temperaturi i pri 80 °C

Također je istražen utjecaj ciklodekstrina na razgradnju loratadina u uvjetima prisilne razgradnje. Uzorci binarnih sustava loratadina i ciklodekstrina pripremljenih mljevenjem izloženi su jednakim uvjetima prisilne razgradnje kao i sam loratadin te su analizirani nakon 8 sati razgradnje.

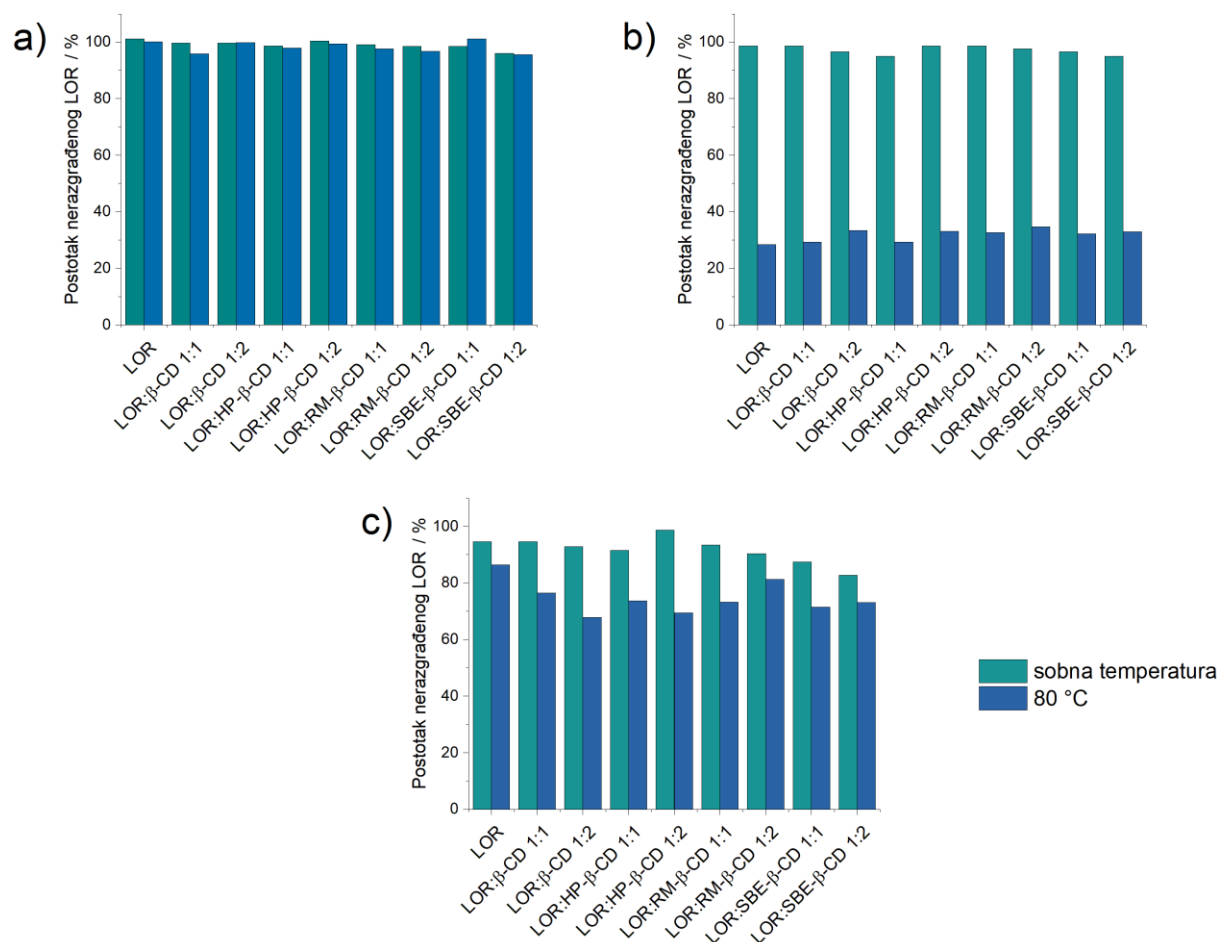
U uvjetima kisele razgradnje pri sobnoj i povišenoj temperaturi, ciklodekstrini ne utječu na razgradnju loratadina (slika 50a), budući da su za sve sustave određene usporedive vrijednosti nerazgrađenog loratadina.

U uvjetima bazične razgradnje pri sobnoj temperaturi nije uočen značajan utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina (slika 50b), čija je razgradnja iznosila oko 5 %. Neznatno veća razgradnja loratadina uočena je u uzorcima LOR:HP- β -CD 1:1 (12,5 %) i LOR:SBE- β -CD 1:2 (17,2 %). Na temelju grafičkog prikaza razgradnje loratadina pri 80 °C (slika 50b) može se uočiti neznatna stabilizacija loratadina ciklodekstrinima. Samo je u uzorcima LOR: β -CD 1:1

i LOR:HP- β -CD 1:1 razgrađeno 71 % loratadina što je usporedivo s razgradnjom samog lijeka koja iznosi 72 %. U ostalim uzorcima razgrađeno je oko 67 % loratadina.

Najveći utjecaj ciklodekstrina na razgradnju loratadina uočen je pri uvjetima oksidativne razgradnje (slika 50c). Veći stupanj razgradnje pri sobnoj temperaturi određen je u prisutnosti SBE- β -CD; 12,5 % u uzorku LOR:SBE- β -CD 1:1 te 17,23 % u uzorku LOR:SBE- β -CD 1:2. Veći negativan utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina određen je pri povišenoj temperaturi. Razgradnja je iznosila od 18,66 % do 32,14 %, dok je razgradnja loratadina bez prisutnosti ciklodekstrina iznosila 13,52 %. Najveća razlika uočena je za uzorak LOR: β -CD 1:2. Također, u uzorcima LOR:CD izloženih razgradnji pri povišenoj temperaturi uočeno je više kromatografskih pikova niskog intenziteta koji bi također mogli odgovarati razgradnim produktima loratadina.

Iako ciklodekstrini uglavnom nemaju utjecaj na stabilnost lijeka, ili ju povećavaju, moguć je i negativan utjecaj. Hong i sur. su pokazali da β -CD i njegovi hidroksipropilirani, metilirani, alkilsulfonirani i karboksietilirani derivati povećavaju oksidaciju ziprasidona uslijed izlaganja γ -zračenju. Predložili su da kompleksiranje ziprasidona s ciklodekstrinima potiče oksidaciju stabiliziranjem oksidativnog međuprodukta, a uspješnost razgradnje je ovisila o interakcijama sa supstitucijskim skupinama različitih derivata.¹⁴⁴ Moguće je da i u slučaju loratadina, ciklodekstrini, pogotovo SBE- β -CD, stabiliziraju neki od razgradnih produkata i time utječu na razgradnju loratadina.



Slika 50. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina u uvjetima prisilne razgradnje u kiselim (a), bazičnim (b) i oksidativnim (c) uvjetima, pri sobnoj temperaturi i pri 80 °C

4.4.2. Analiza razgradnih produkata spektrometrijom masa visokog razlučivanja

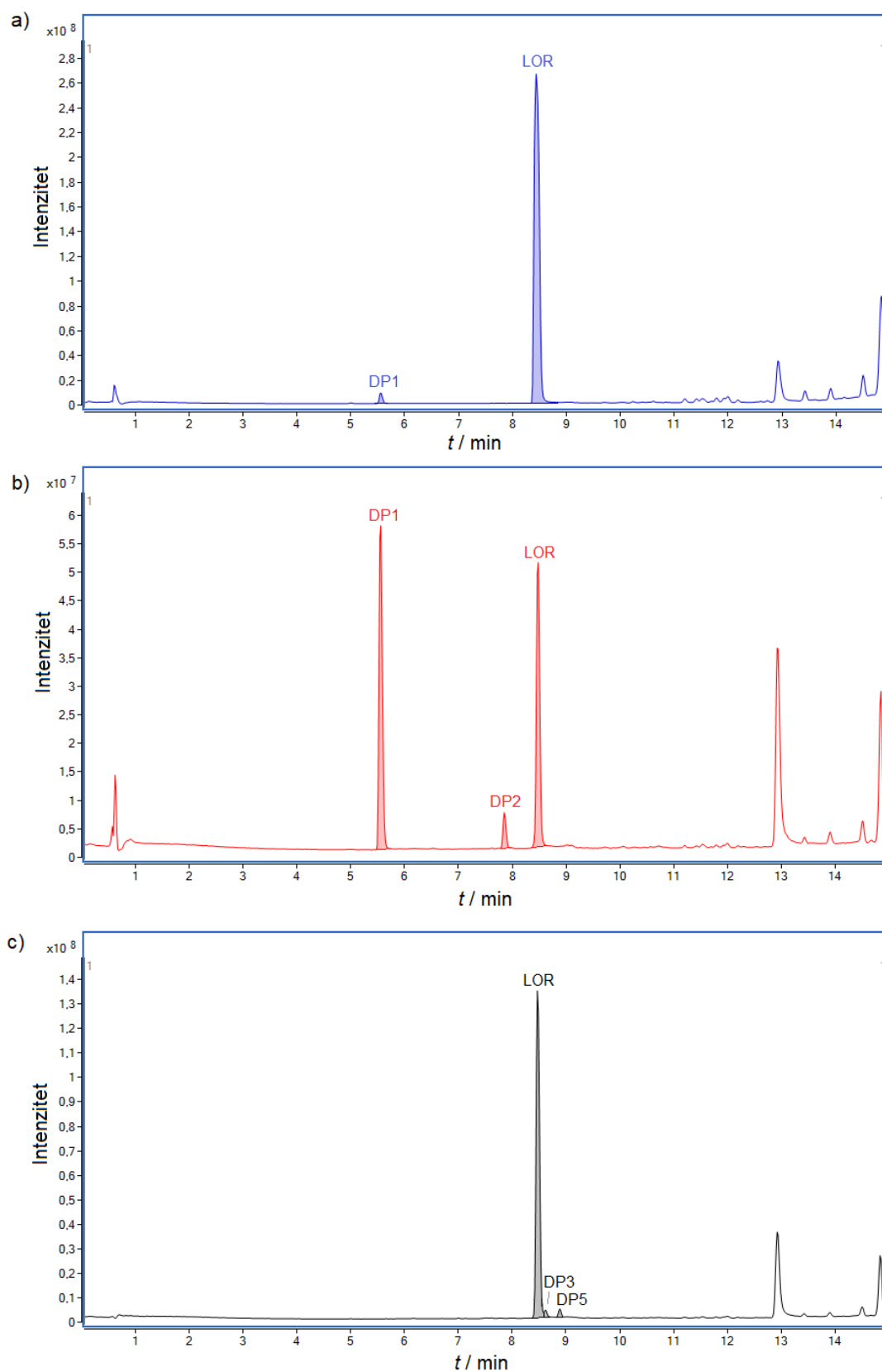
Kako bi odredili strukture nastalih razgradnih produkata, odabrani uzorci loratadina i binarnih sustava LOR:CD nakon 8 sati razgradnje analizirani su spregnutim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa visokog razlučivanja. Kromatografski uvjeti bili su isti kao i pri analizi metodom UHPLC-DAD, a parametri spektrometra masa navedeni su u tablici 7. Za analizu su odabrani uzorci loratadina nakon razgradnje u kiselim, bazičnim i oksidativnim uvjetima te uzorak LOR:HP-β-CD 1:1 nakon razgradnje u oksidativnim uvjetima, budući da je u njemu uočen najveći broj razgradnih produkata. Ostali uzorci nisu analizirani metodom UHPLC-MS jer su razgradni produkti uočeni za te uzorke prisutni i u uzorcima odabranim za UHPLC-MS analizu.

Kromatogrami ukupne ionske struje (engl. *total ion chromatogram*, TIC) uzoraka loratadina nakon 8 sati razgradnje pri kiselim, lužnatim i oksidativnim uvjetima pri povišenoj temperaturi

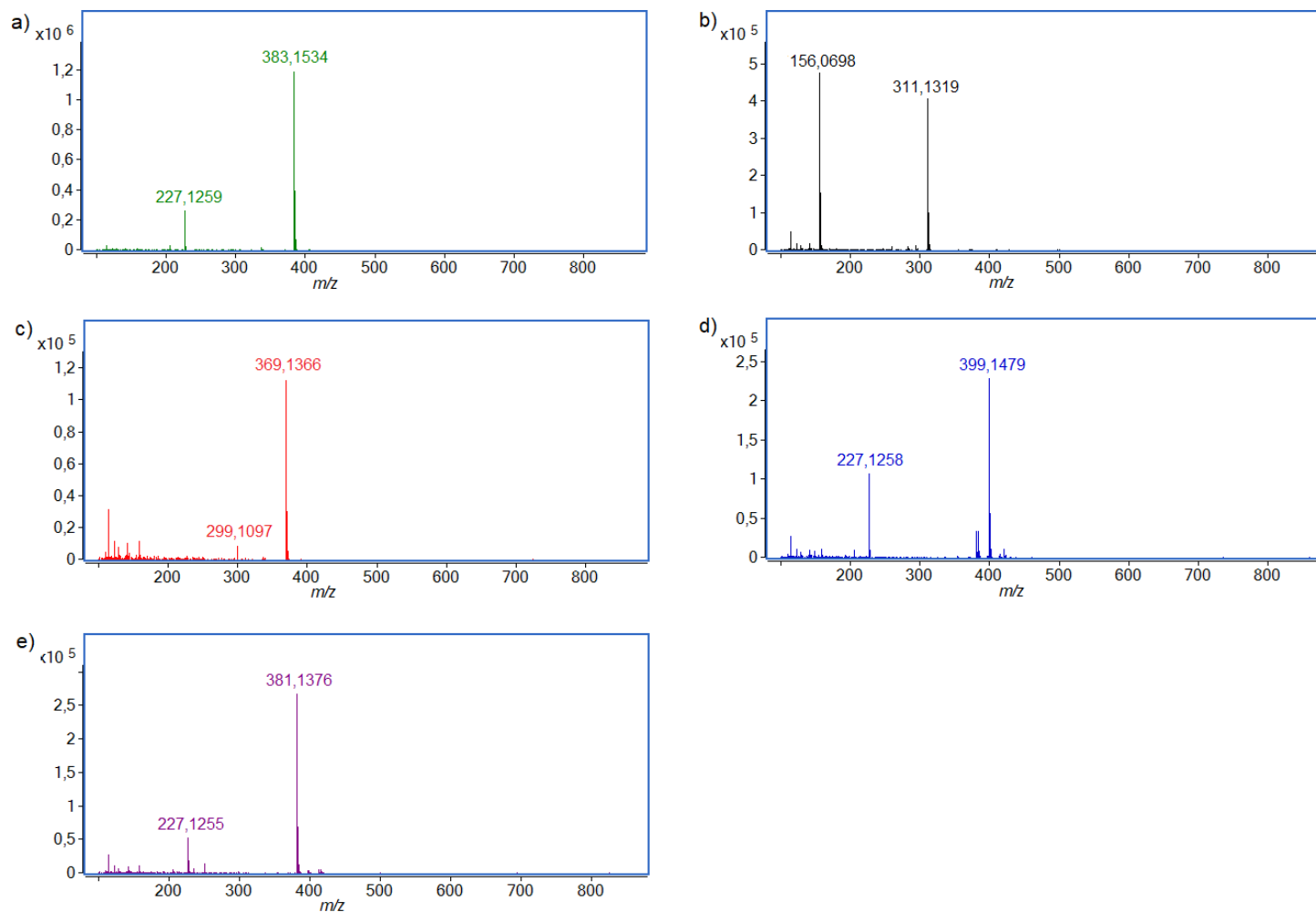
prikazani su na slici 51. U uzorku izloženom razgradnji u kiselim uvjetima osim kromatografskog pika pri 8,44 min koji odgovara loratadinu (m/z 383,1534), uočen je i kromatografski pik niskog intenziteta pri 5,56 min koji odgovara ionu m/z 311,1319 (DP1). U uzorku izloženom razgradnji u bazičnim uvjetima, uz prethodno navedene kromatografske pikove koji su uočeni i pri kiseloj razgradnji, uočen je i dodatni kromatografski pik pri 7,85 min koji odgovara ionu m/z 369,1366 (DP2). U oksidativnim uvjetima uz kromatografski pik koji odgovara loratadinu uočena su i dva kromatografska pika koji odgovaraju razgradnim produktima pri vremenima zadržavanja 8,62 min (m/z 399,1479; DP3) i 8,89 min (m/z 381,1376; DP5). U tablici 25 navedena su vremena zadržavanja i pripadajuće vrijednosti m/z za sve razgradne produkte uočene u uzorcima loratadina nakon osam sati razgradnje pri lužnatim, kiselim i oksidativnim uvjetima uz zagrijavanje na 80 °C. Na slici 52 prikazani su MS spektri loratadina i uočenih razgradnih produkata.

Tablica 25. Razgradni produkti uočeni nakon 8 sati razgradnje otopine LOR pri hidrolitičkim i oksidativnim uvjetima uz zagrijavanje

Asignacija	Vrijeme zadržavanja / min	m/z	Stresni uvjeti
LOR	8,48	383,1534	HCl, NaOH, H ₂ O ₂
DP1	5,56	311,1319	HCl, NaOH
DP2	7,85	369,1366	NaOH
DP3	8,62	399,1479	H ₂ O ₂
DP5	8,89	381,1376	H ₂ O ₂

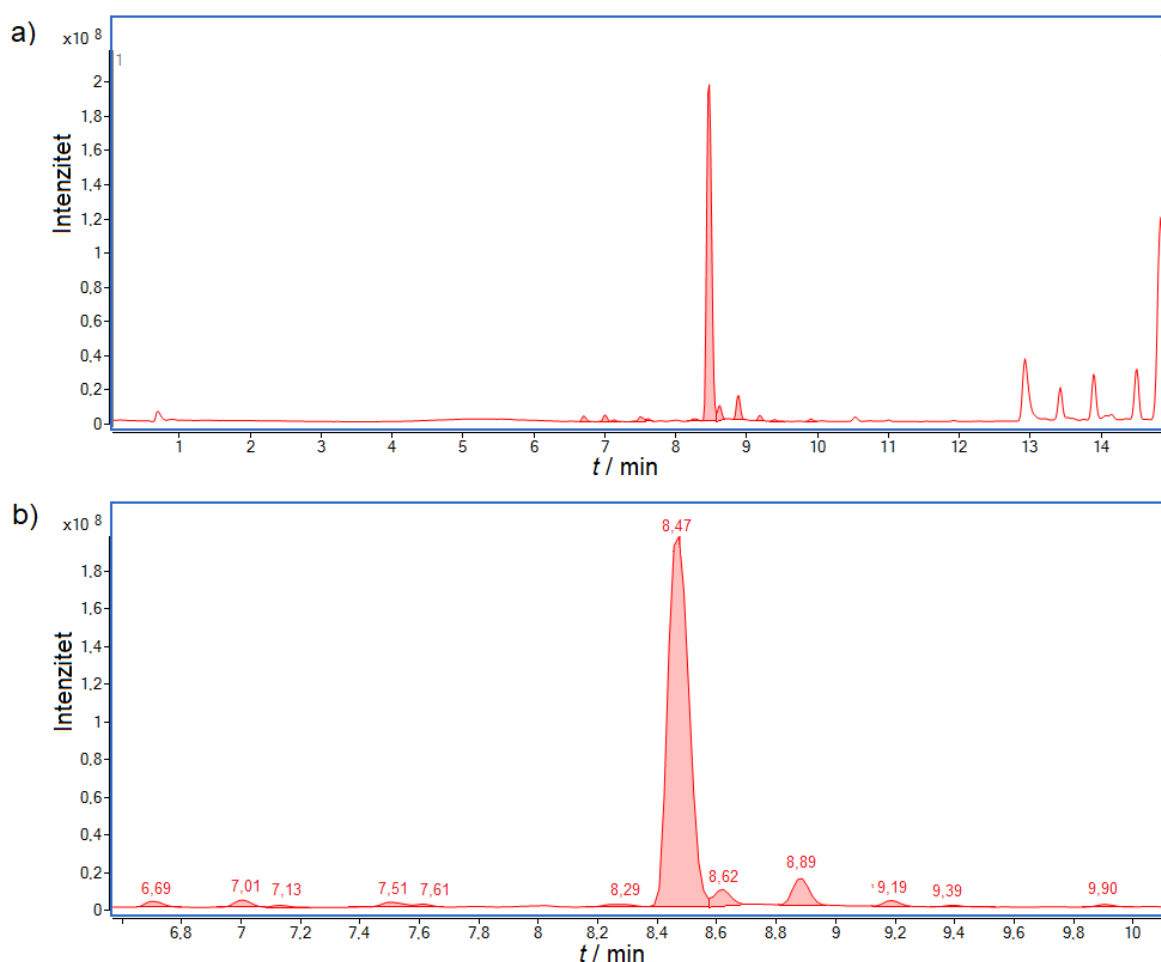


Slika 51. TIC kromatogrami uzorka loratadina nakon 8 sati razgradnje u kiselim (a), bazičnim (b) i oksidativnim (c) uvjetima, pri 80 °C, ESI(+)



Slika 52. ESI(+) MS spektri LOR (a) i razgradnih produkata DP1 (b), DP2 (c), DP3 (d) i DP5 (e) uočenih u uzorcima LOR nakon razgradnje u kiselim, bazičnim i oksidativnim uvjetima

Budući da je u uzorcima LOR:CD izloženima oksidativnoj razgradnji uočeno više kromatografskih pikova u usporedbi sa samim LOR, provedena je i MS analiza uzorka LOR:HP- β -CD 1:1 pripremljenog mljevenjem (slika 53). Uočen je niz kromatografskih pikova niskog intenziteta u rasponu vremena zadržavanja (6,7 – 9,9) min, koji odgovaraju razgradnim produktima loratadina. U tablici 26 navedeni su razgradni produkti koji su uočeni u uzorku LOR:HP- β -CD 1:1 nakon osam sati oksidativne razgradnje uz zagrijavanje te njihova vremena zadržavanja (t_R) i relativna vremena zadržavanja (r). Relativna vremena zadržavanja izračunata su kao omjer vremena zadržavanja kromatografskog pika razgradnog produkta i vremena zadržavanja kromatografskog pika loratadina. Na slici D7 prikazani su MS spektri uočenih razgradnih produkata.



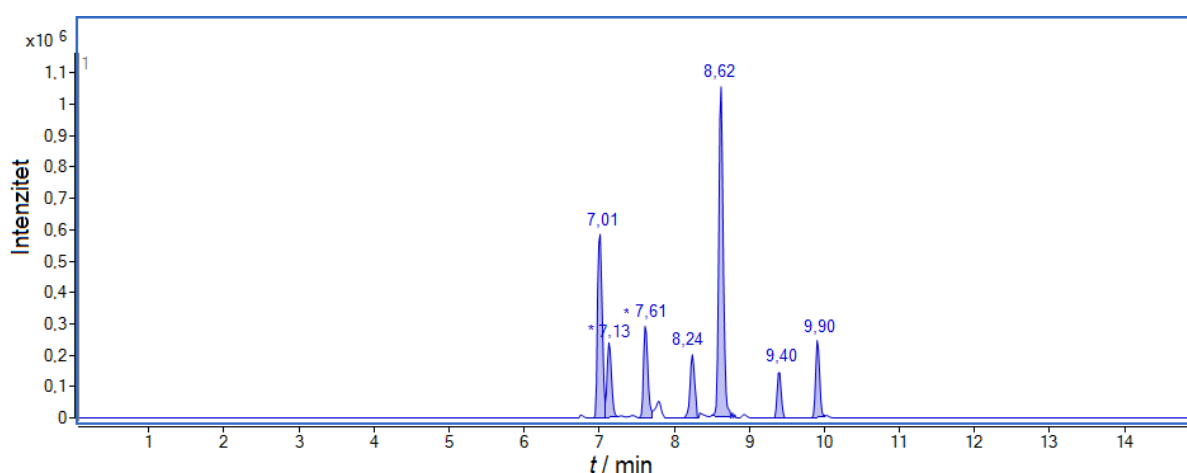
Slika 53. TIC kromatogram uzorka LOR:HP- β -CD 1:1 nakon 8 sati oksidativne razgradnje uz zagrijavanje (a), uvećani dio kromatograma (b), ESI(+)

Tablica 26. Razgradni produkti uočeni nakon 8 sati oksidativne razgradnje otopine uzorka LOR:HP- β -CD 1:1 uz zagrijavanje

Asignacija	t_R / min	r / min	m/z
LOR	8,48	1,00	383,1534
DP3	8,62	1,02	399,1485
DP4	7,01	0,83	399,1480
DP5	8,89	1,05	381,1379
DP6	9,19	1,08	381,1379
DP7	7,13	0,84	399,1480
DP8	7,61	0,90	399,1481
DP9	8,29	0,98	399,1477
DP10	9,90	1,17	399,1473
DP11	7,51	0,89	244,0531
DP12	9,39	1,11	399,1479
DP13	6,69	0,79	415,1428

t_R – vrijeme zadržavanja; r – relativno vrijeme zadržavanja

Osim razgradnih produkata DP3 i DP5 koji su uočeni i pri razgradnji samog LOR, uočeno je 9 dodatnih razgradnih produkata (DP4 i DP6 – DP13), od kojih sedam ima jednaku vrijednost m/z (m/z 399; DP3, DP4, DP7 – DP10 i DP12). Kromatogram izoliranog iona m/z 399 (engl. *extracted ion chromatogram*, EIC) prikazan je na slici 54. Također su uočena i dva izomera (m/z 381; DP5 i DP6) te razgradni produkti kojima odgovaraju signali iona m/z 244 (DP11) i m/z 415 (DP13).

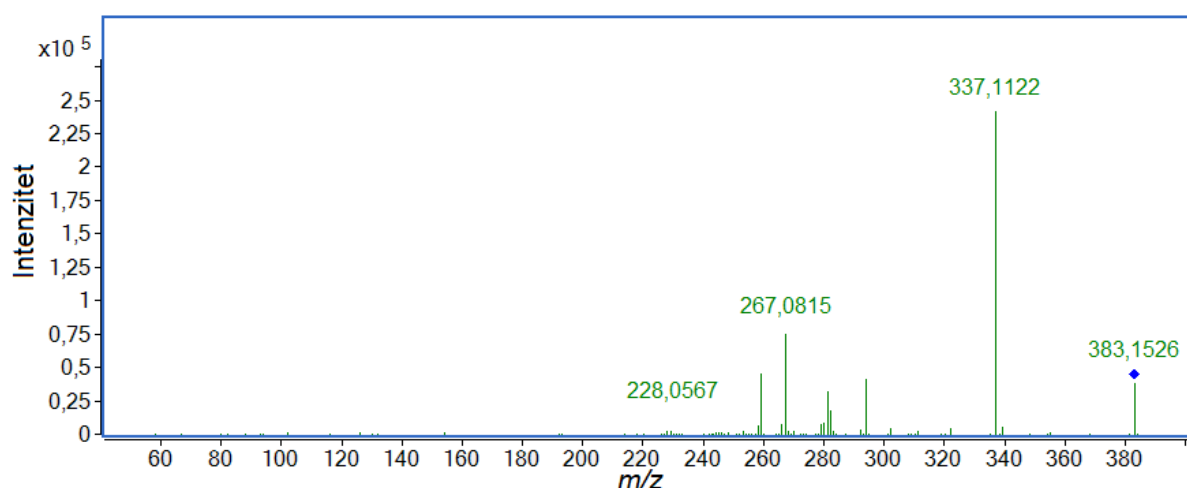


Slika 54. EIC kromatogram iona m/z 399,1470 u uzorku LOR:HP- β -CD 1:1 nakon 8 sati oksidativne razgradnje uz zagrijavanje, ESI(+)

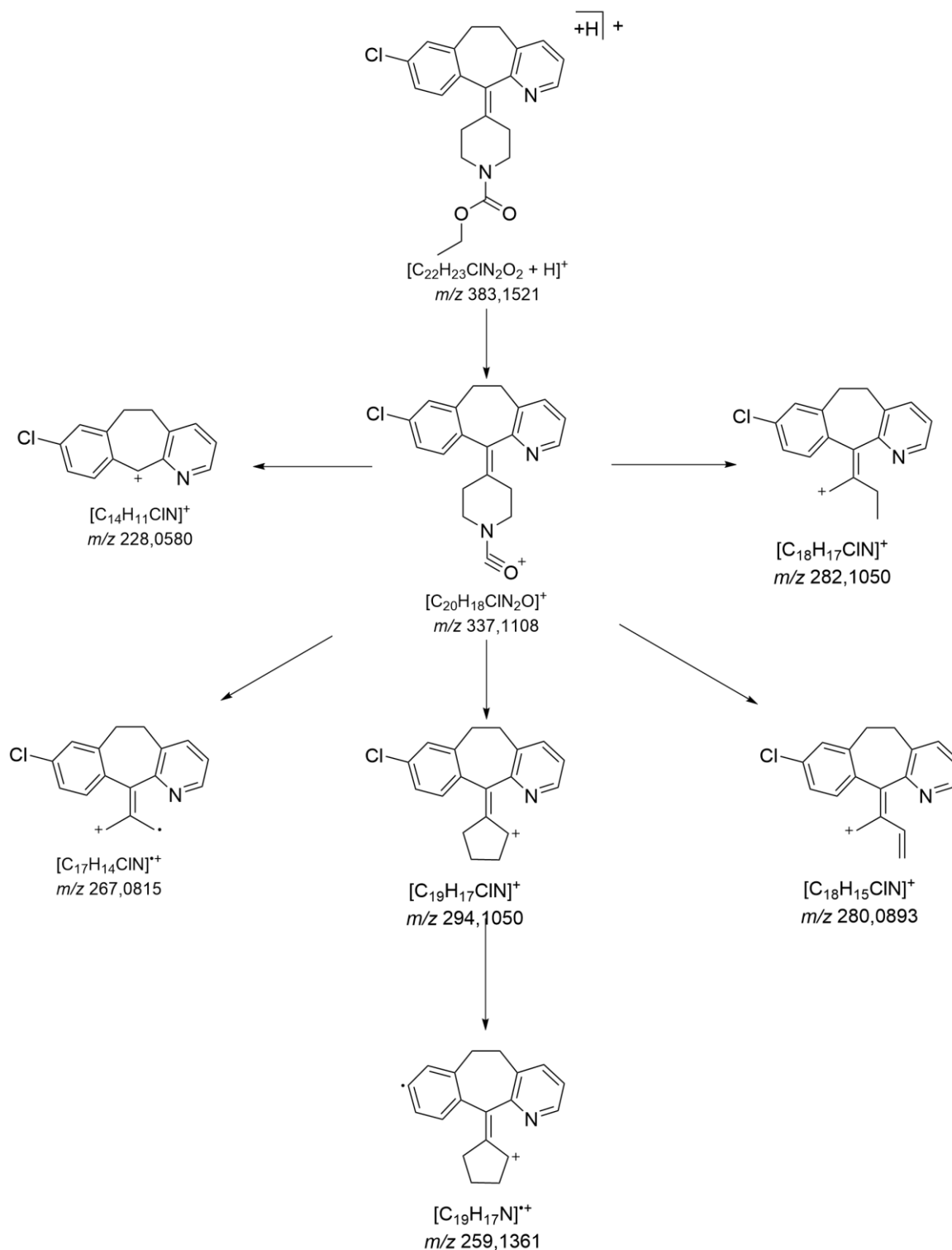
4.4.3. Analiza razgradnih produkata tandemnom spektrometrijom masa visoko razlučivanja

Kako bi dobili uvid u strukturu nastalih razgradnih produkata, provedena je njihova MS/MS analiza. Odabrani jednostruko nabijeni ioni loratadina i njegovih razgradnih produkata fragmentirani su pri tri različite kolizijske energije (10 V, 20 V i 30 V) te su na temelju njihovih MS/MS spektara predložene strukture i fragmentacijske sheme.

Glavni fragmentacijski put loratadina je nastajanje oksonijevog iona (m/z 337,1108) budući da je to najzastupljeniji ion pri najvećoj vrijednosti primijenjene kolizijske energije. Daljnja fragmentacija oksonijevog iona uključuje pucanje veza unutar piperidinskog prstena i nastajanja fragmentnih iona m/z 267,0815, m/z 294,1050, m/z 280,0893 i m/z 282,1050. Gubitkom klora iz fragmentnog iona m/z 294,1050 nastaje fragmenti ion m/z 259,1361.¹⁴⁵ Na slici 55 prikazan je MS/MS spektar iona $[LOR + H]^+$, na slici 56 fragmentacijska shema loratadina, a u tablici D19 tablični prikaz MS/MS spektara pri kolizijskim energijama od 10 V, 20 V i 30 V.

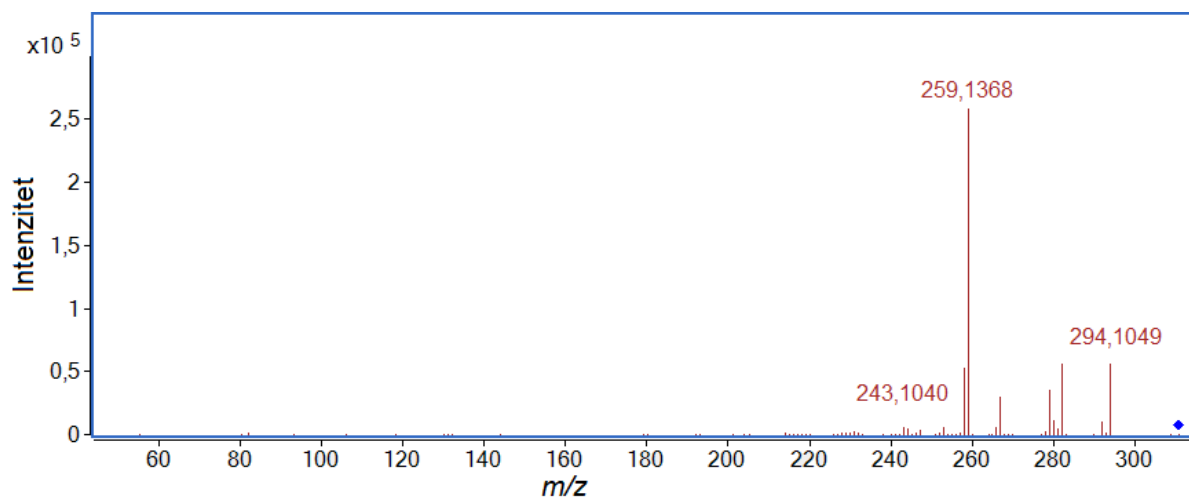


Slika 55. ESI(+) MS/MS spektar iona $[LOR + H]^+$ (m/z 383,1545), kolizijska energija od 30 V

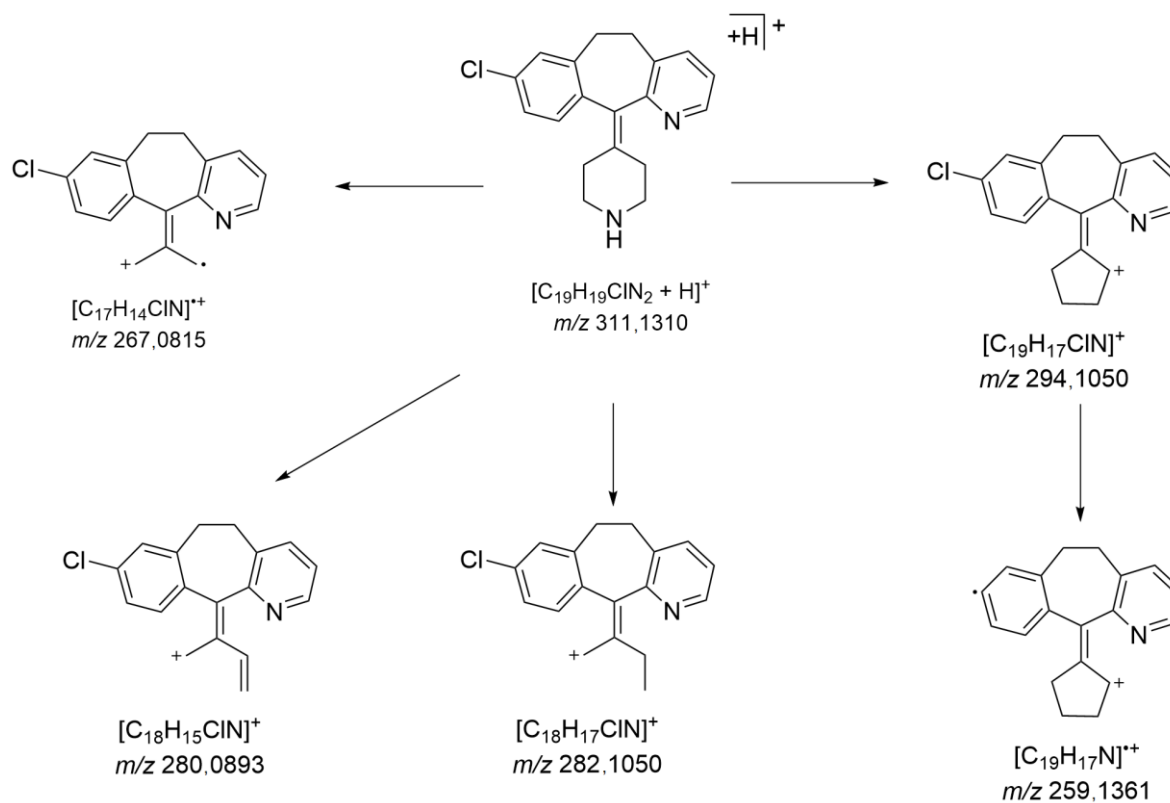
Slika 56. Predložena fragmentacijska shema loratadina (m/z 383,1521)

Razgradni produkt DP1, čiji je signal protoniranog iona uočen pri m/z 311,1310, fragmentira te nastaju ioni m/z 294, m/z 282, m/z 280, m/z 267 i m/z 259, karakteristični za loratadin (tablica D20 i slika 57). Na temelju toga može se zaključiti kako su triciklički i piperidinski dio

molekule loratadina sačuvani, te je do nastanka razgradnog produkta došlo hidrolizom esterske skupine. Fragmentacijom nastaje razgradni produkt koji je ujedno i metabolit loratadina, desloratadin.^{146,147} Na slici 58 prikazana je fragmentacijska shema razgradnog produkta DP1.

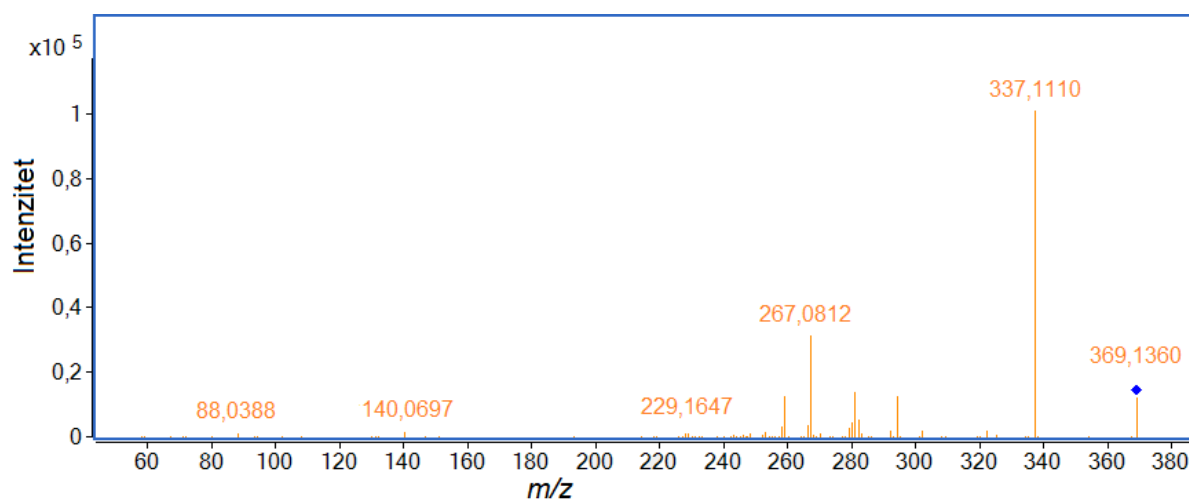


Slika 57. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP1 (m/z 311,1328), kolizijska energija od 30 V

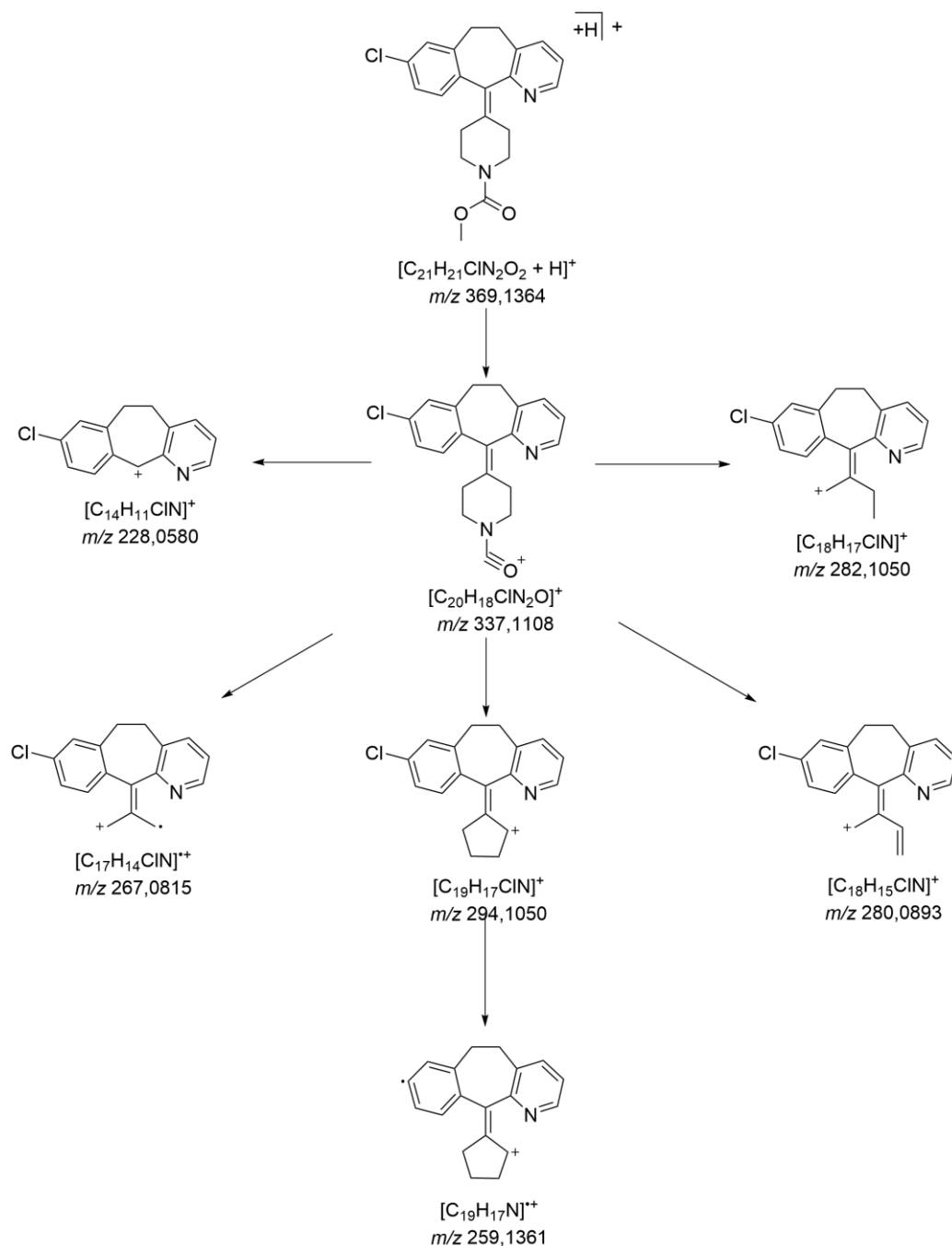


Slika 58. Predložena fragmentacijska shema razgradnog produkta DP1 (m/z 311,1310)

Vrijednost m/z protoniranog iona razgradnog produkta DP2 (369,1377) razlikuje se od vrijednosti m/z protoniranog iona loratadina za 14,0157 Da. Budući da su fragmentacijski putevi LOR i DP2 veoma slični do promjene u strukturi loratadina ne dolazi na tricikličkom ili piperidinskom dijelu molekule. Budući da razlika od 14,0157 Da odgovara gubitku $-CH_2$ skupine, može se zaključiti kako struktura razgradnog produkta DP2 umjesto etoksi sadrži metoksi skupinu (slike 59 i 60, tablica D21).



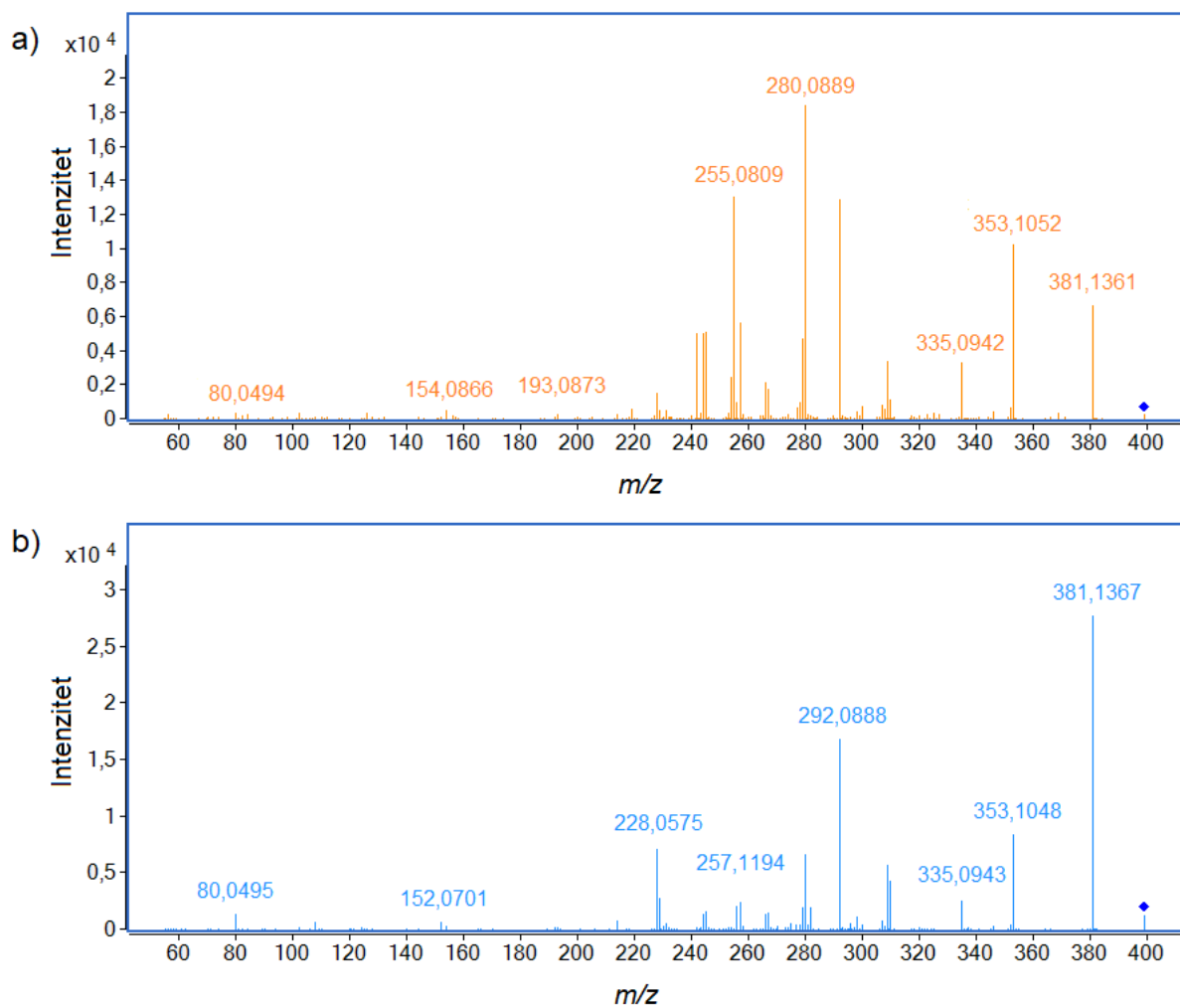
Slika 59. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP2 (m/z 369,1364), kolizijska energija od 30 V



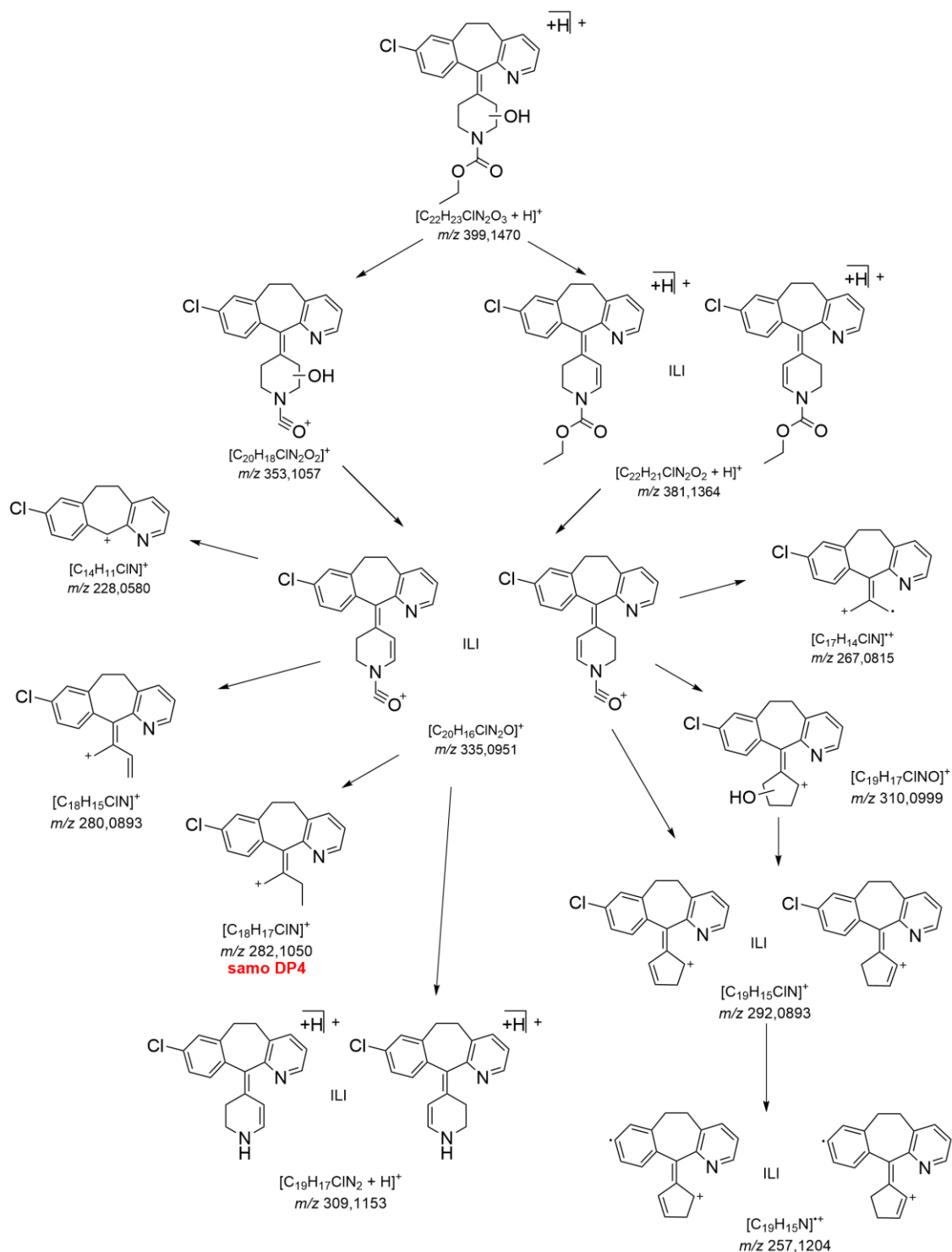
Slika 60. Predložena fragmentacijska shema razgradnog produkta DP2 (m/z 369, 1364)

Iako su kromatografski pikovi razgradnih produkata DP3 i DP4 uočeni pri različitim vremenima zadržavanja (8,6 min i 7,0 min), razgradni produkti imaju jednaku molekulsku formulu (m/z 399, 1470). Nadalje, njihov način fragmentacije veoma je sličan te se može zaključiti kako se radi o izomerima (tablice D22 i D23, slika 61). Budući da se vrijednosti m/z protoniranih iona ovih razgradnih produkata razlikuju od vrijednosti m/z protoniranog iona loratadina za 15,9949 Da, što odgovara točnoj masi hidroksilne skupine, može se zaključiti kako pri oksidativnim

uvjetima dolazi do adicije hidroksilne skupine na loratadin. U MS/MS spektrima uočeni su signali iona pri m/z 228, m/z 267 i m/z 282, što ukazuje na nepromijenjen triciklički dio molekule (slika 56). Budući da nisu uočeni ioni m/z 337, m/z 294 i m/z 259, može se zaključiti kako je do vezanja hidroksilne skupine došlo na piperidinskom prstenu. Ovaj način vezanja dodatno potvrđuje prisutnost signala iona pri m/z 353 koji odgovara hidroksiliranom analogu iona m/z 337. U MS/MS spektru razgradnih produkata DP3 i DP4 također su uočeni signali iona m/z 381 i m/z 335 koji nastaju iz iona m/z 399 i m/z 353 eliminacijom vode uz nastanak dvostruke veze na piperidinskom prstenu (slika 62). Iako fragmentacijom razgradnih produkata DP3 i DP4 nastaju isti ioni, njihovi relativni intenziteti se razlikuju, što se može pripisati različitom položaju hidroksilne skupine na prstenu. Fragmentacijom DP3 i DP4 dolazi do eliminacije vode i nastanka iona m/z 381. Signal tog iona zamjetnog je intenziteta u spektru molekule DP3 već pri kolizijskoj energiji od 10 V, te se može zaključiti kako je molekula DP3 manje stabilna od DP4, budući da lakše fragmentira čak i pri niskim kolizijskim energijama. Iako se na temelju MS/MS analize može zaključiti kako se hidroksilna skupina nalazi na piperidinskom prstenu, točan položaj nije moguće odrediti, te su za određivanje točne strukture razgradnih produkata DP3 i DP4 potrebne dodatne analize spektroskopijom NMR. Strukture ovih razgradnih produkata odgovaraju predloženim strukturama metabolita loratadina, u kojima također nije određen točan položaj hidroksilne skupine.^{146,148}



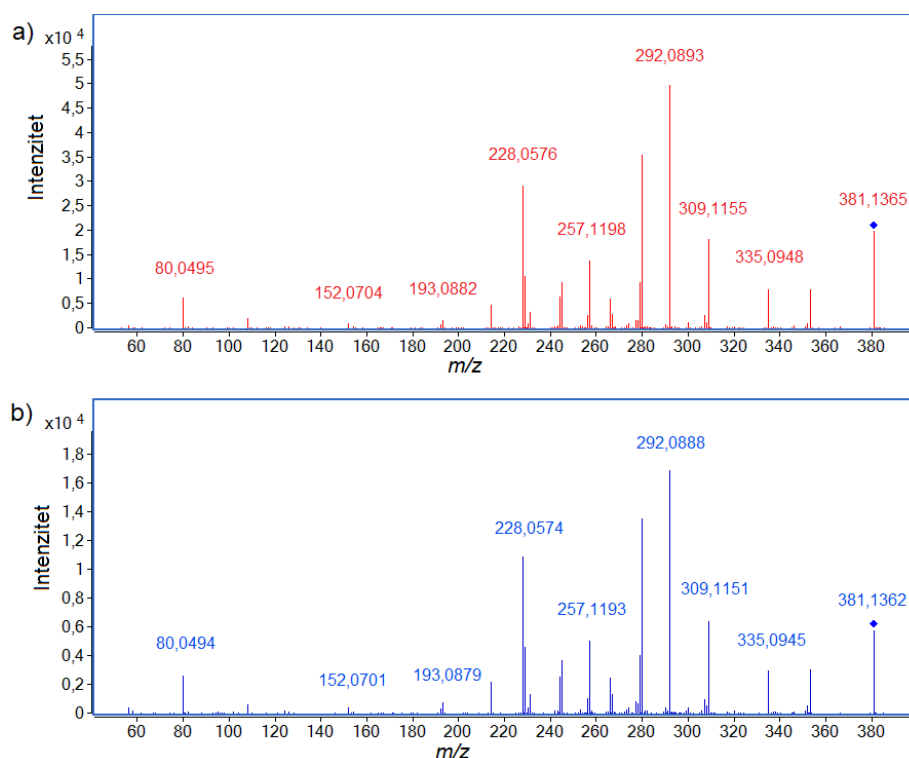
Slika 61. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnih produkata DP3 (a) i DP4 (b) (m/z 369,1364), kolizijska energija od 30 V



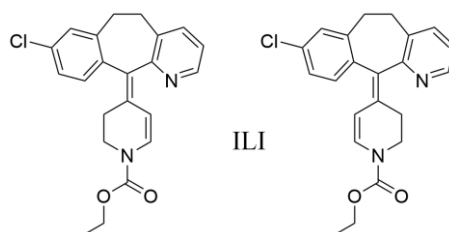
Slika 62. Predložena fragmentacijska shema razgradnih produkata DP3 i DP4 (m/z 399,1470)

Razgradni produkti DP5 i DP6 s vremenima zadržavanja 8,9 min i 9,2 min također imaju istu molekulsku formulu, te je signal njihovog protoniranog iona uočen pri m/z 381,1364. Razlika vrijednosti m/z iona protoniranih razgradnih produkata DP5 i DP6 od 2,0157 Da u usporedbi s vrijednošću m/z protoniranog iona LOR ukazuje na postojanje dvostruke veze u molekuli ovih

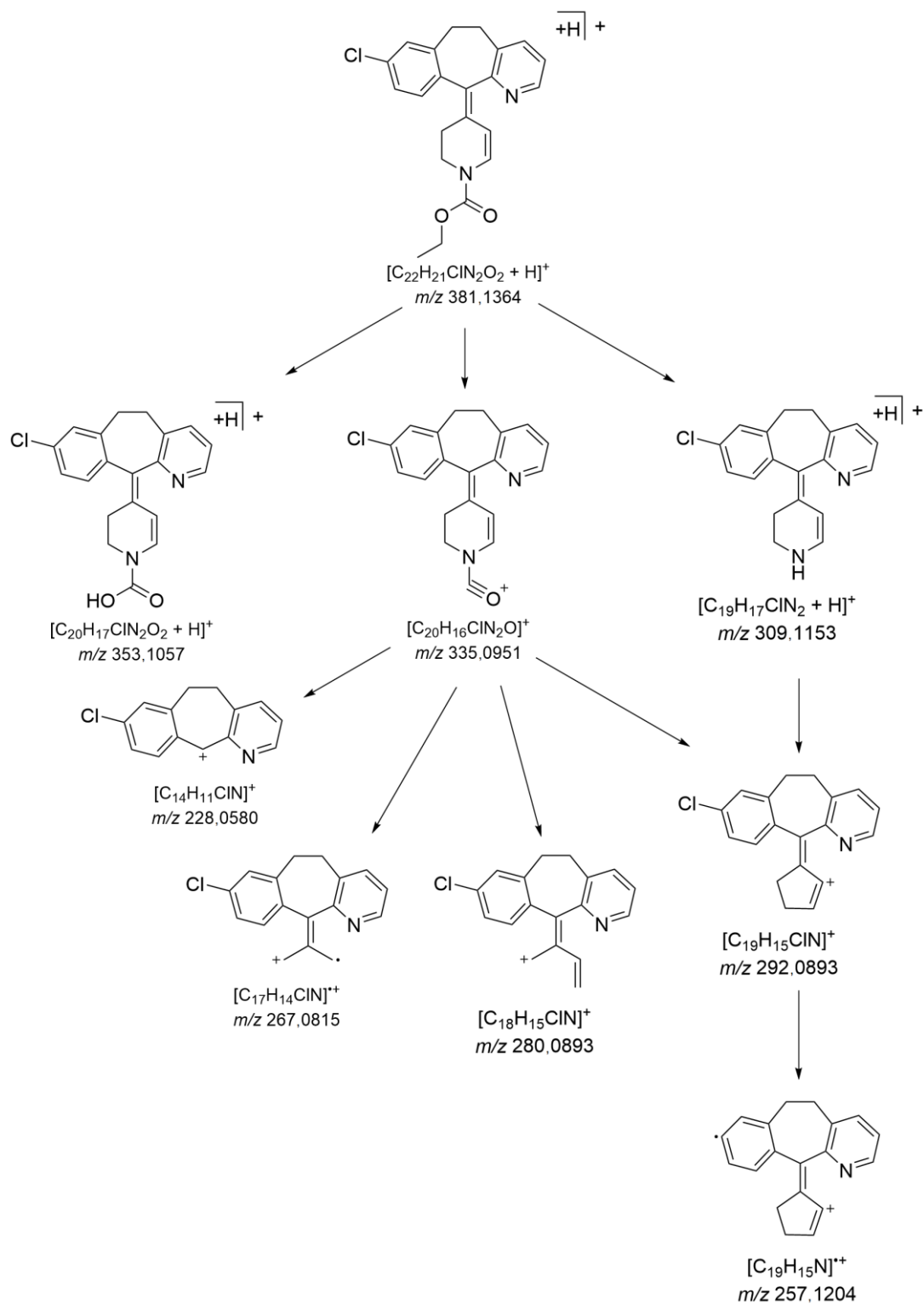
razgradnih produkata. Budući da su u MS/MS spektrima uočeni signali iona pri m/z 228 i m/z 267 do promjene u strukturi nije došlo na tricikličkom dijelu molekule. Ioni m/z 335, m/z 292 i m/z 257, koji su analozi fragmentiranog iona LOR (m/z 337, m/z 294 i m/z 259), ukazuju na postojanje dvostruke veze u piperidinskom prstenu (tablice D24 i D25, slika D63). Ovu strukturu također potvrđuju ioni m/z 353 i m/z 309. Razgradni produkti DP5 i DP6 mogli bi nastati iz hidroksiliranih razgradnih produkata DP3 i DP4 eliminacijom vode. Međutim, kao što nije bilo moguće odrediti točan položaj hidroksilne skupine u strukturi razgradnih produkata DP3 i DP4, također nije moguće odrediti točan položaj dvostruke veze u strukturi razgradnih produkata DP5 i DP6 (slika 64). Stoga su potrebne dodatne analize spektroskopijom NMR. Na slici 65 prikazana je fragmentacijska shema ovih razgradnih produkata.



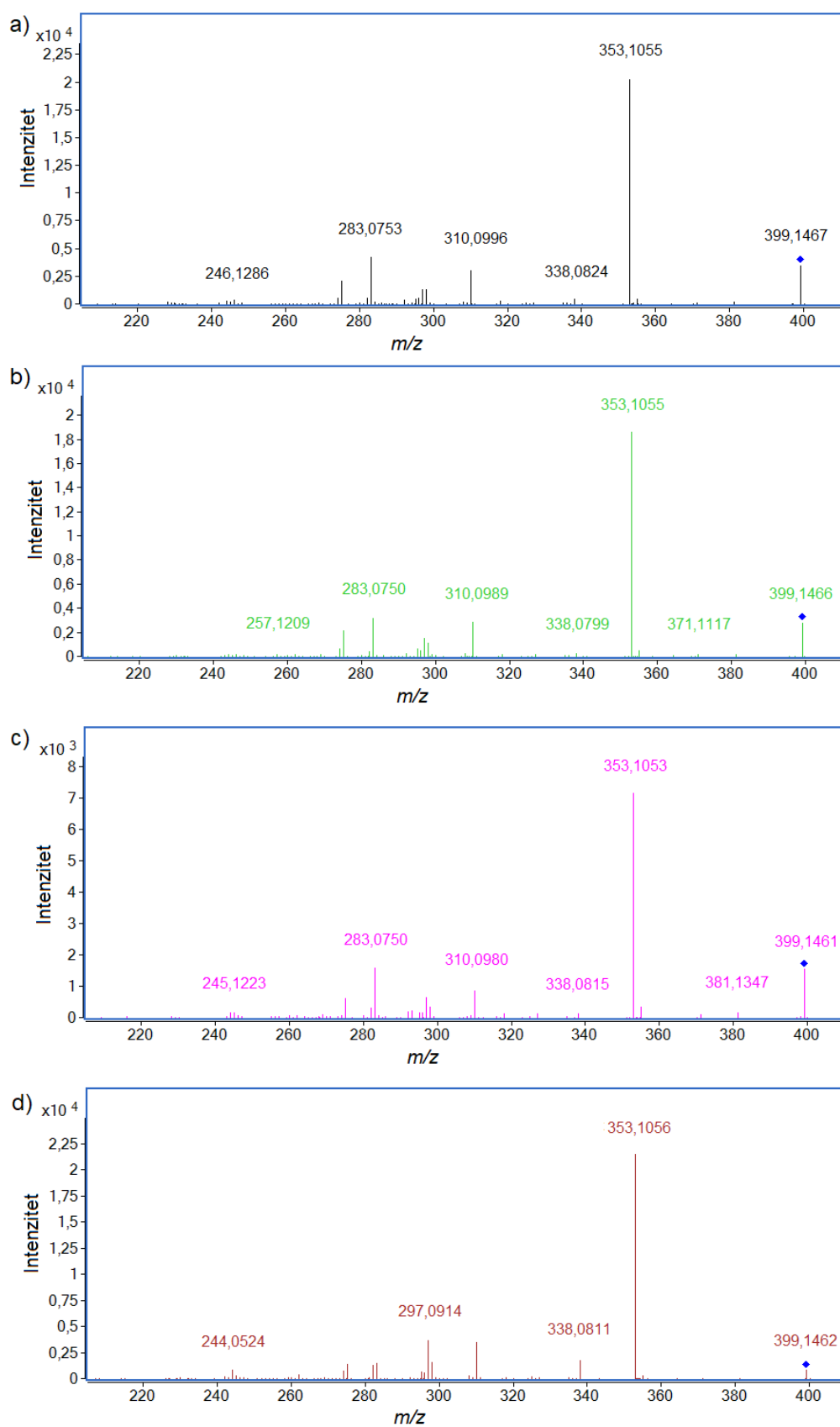
Slika 63. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnih produkata DP5 (a) i DP6 (b) (m/z 381,1364), kolizijska energija od 30 V



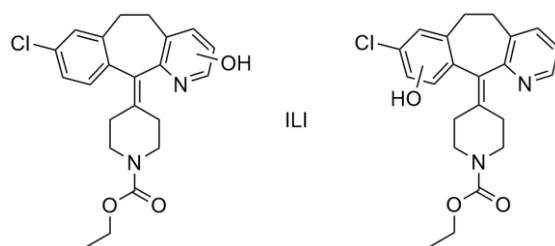
Slika 64. Predložene strukture razgradnih produkata DP5 i DP6

Slika 65. Predložena fragmentacijska shema razgradnih produkata DP5 i DP6 (m/z 381,1364)

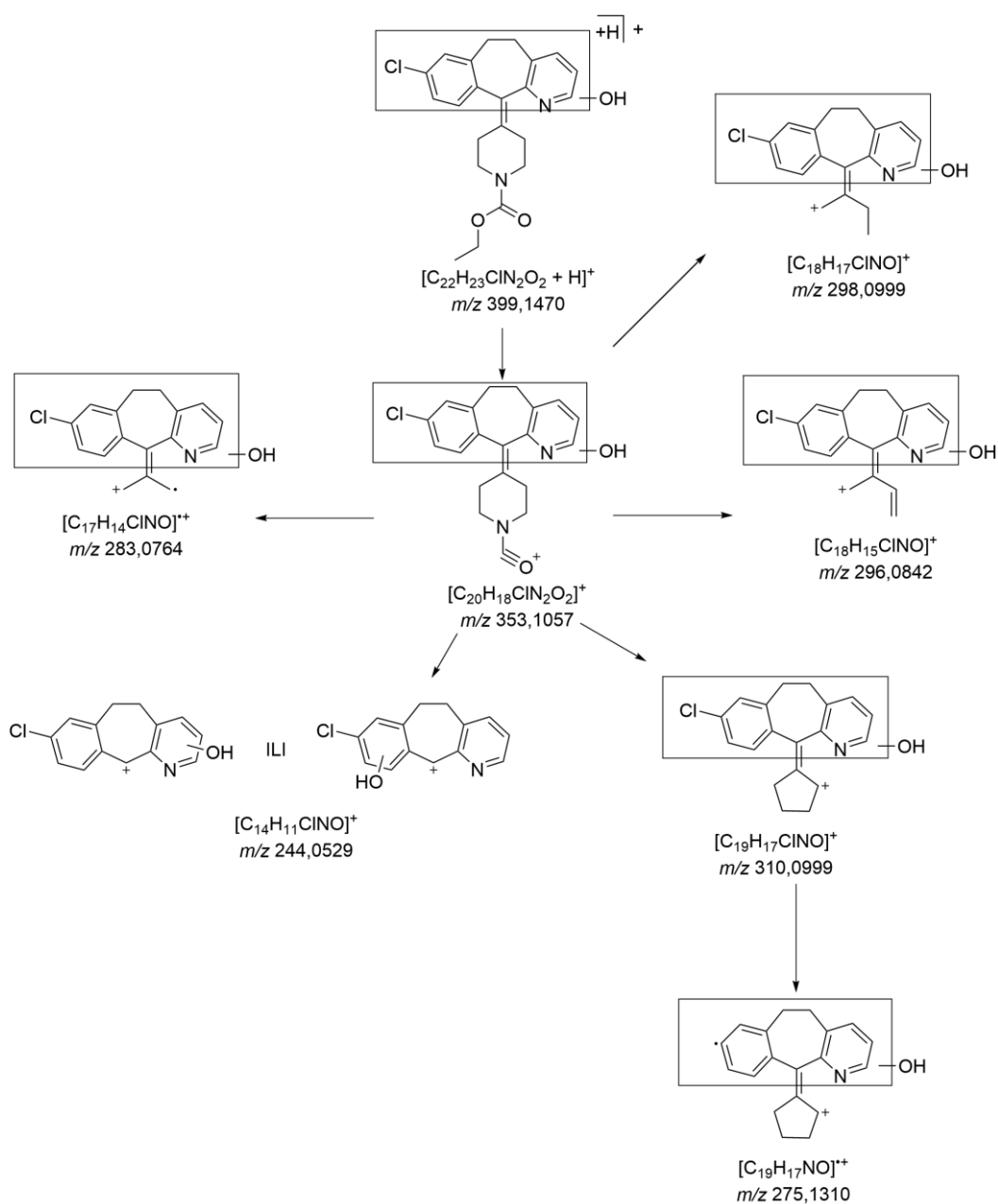
Razgradni produkti DP7, DP8, DP9 i DP10 (m/z 399,1471) imaju veoma slične MS/MS spektre što ukazuje na njihove slične strukture (tablice D26 – D29 i slika D66). Kao i u slučaju razgradnih produkata DP3 i DP4, radi se o hidroliziranom loratadinu. Međutim, budući da u njihovim MS/MS spektrima nije uočen signal iona pri m/z 228, može se zaključiti kako je do vezanja hidroksilne skupine došlo na tricikličkom dijelu molekule. Također, ioni m/z 353, m/z 310, m/z 298, m/z 296, m/z 283, m/z 275 i m/z 244 su analozi ionima loratadina (m/z 337, m/z 294, m/z 282, m/z 280, m/z 267, m/z 259 i m/z 282) uvećani za 15,9949 Da zbog vezane hidroksilne skupine. Točan položaj hidroksilne skupine nije moguće odrediti, međutim može se pretpostaviti da se nalazi na jednom od aromatskih prstenova, a ne na cikloheptanskom središnjem prstenu (slika 67). Kada bi hidroksilna skupina bila vezana na cikloheptanski prsten, prilikom fragmentacije moglo bi doći do njene eliminacije uz nastajanje dvostruke veze, te bi bazni signal u MS/MS spektru bio onaj pri m/z 381,1364.¹⁴⁶ Iako je u MS/MS spektrima razgradnih produkata DP7 – DP10 uočen signal iona pri m/z 381, njegov je intenzitet veoma nizak, što ukazuje da hidroksilna skupina nije vezana na triciklički prsten. Na slici 68 prikazana je fragmentacijska shema ovih razgradnih produkata.



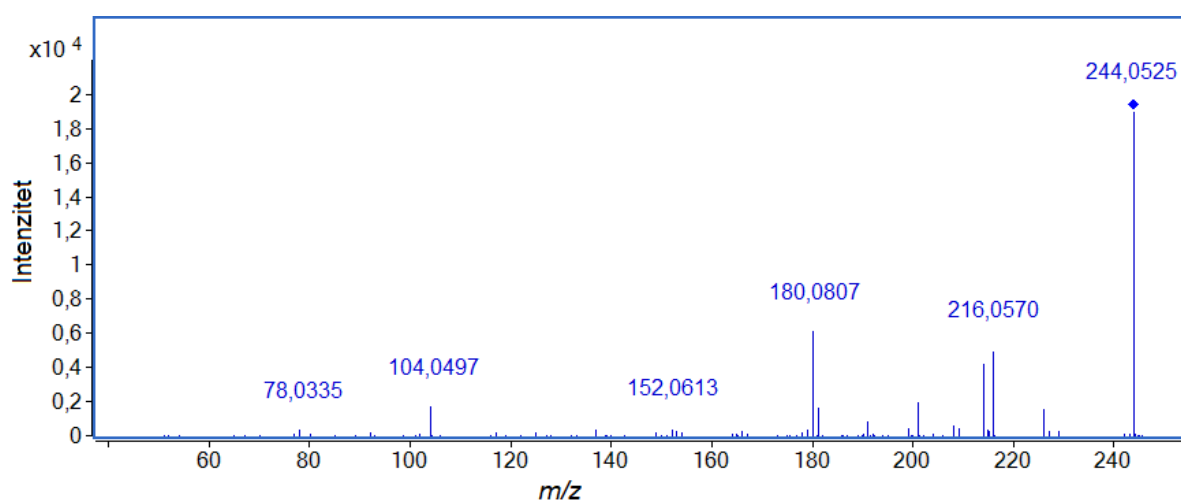
Slika 66. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnih produkata DP7 (a), DP8 (b), DP9 (c) i DP10 (d) (m/z 399,1470), kolizijska energija od 30 V



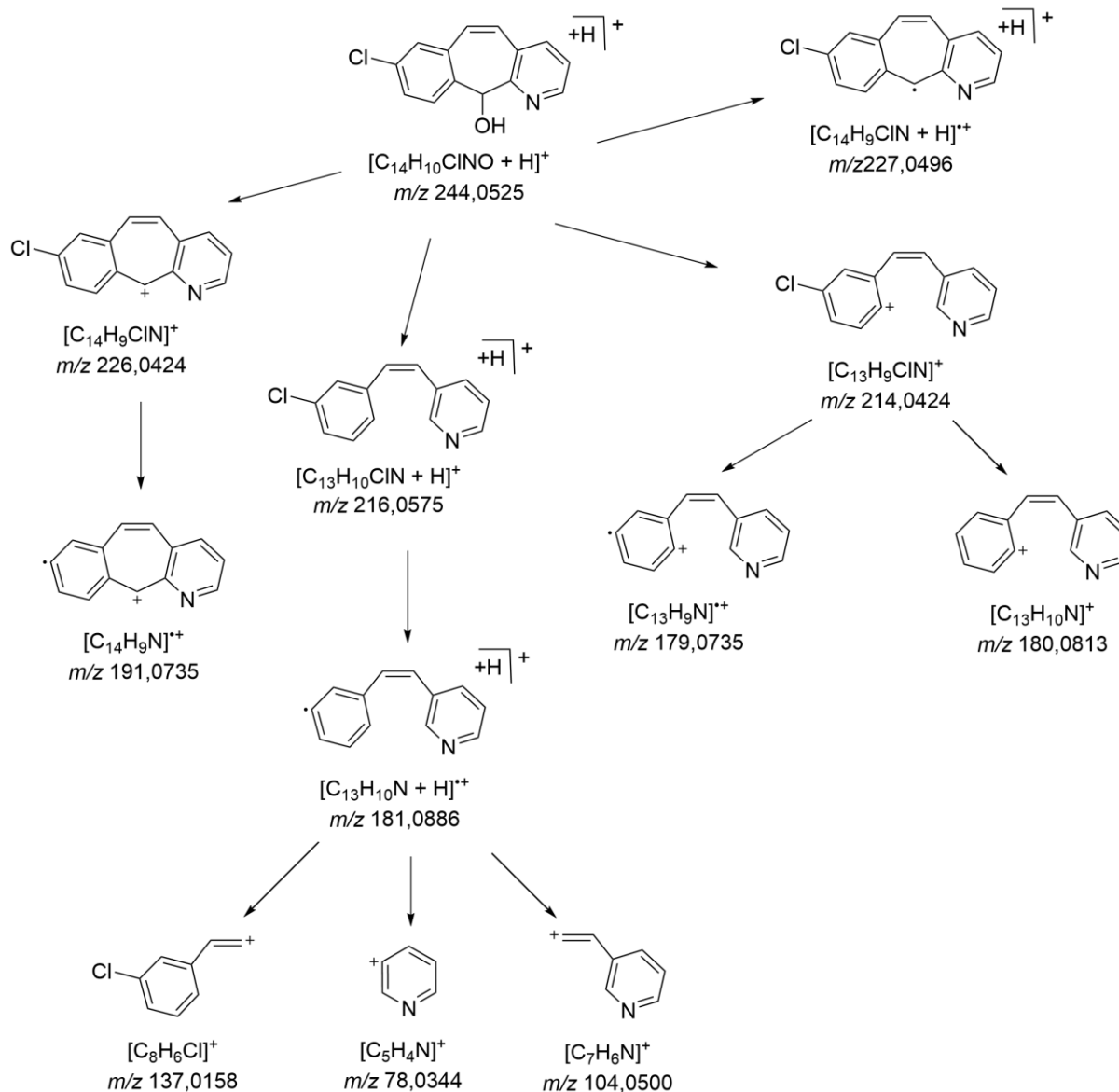
Slika 67. Moguće strukture razgradnih produkata DP7, DP8, DP9 i DP10

Slika 68. Predložena fragmentacijska shema razgradnih produkata DP7, DP8, DP9 i DP10 (m/z 399,1470)

Razgradni produkt DP11 (vrijeme zadržavanja 7,5 min) odgovara protoniranom ionu vrijednosti m/z 244,0524. Strukturom sliči tricikličkom dijelu molekule loratadina, uz dodatnu dvostruku vezu i hidroksilnu skupinu na cikloheptanskom prstenu. U prilog tomu govore ioni m/z 227 i m/z 226 koji nastaju homolitičkom, odnosno heterolitičkom eliminacijom hidroksilne skupine. Ostali ioni (m/z 214, m/z 179, m/z 216, m/z 180, m/z 181, m/z 137, m/z 78 i m/z 104) nastaju fragmentacijom cikloheptanskog prstena (tablica D30, slika 69). Fragmentacijska shema razgradnog produkta DP11 prikazana je na slici 70.

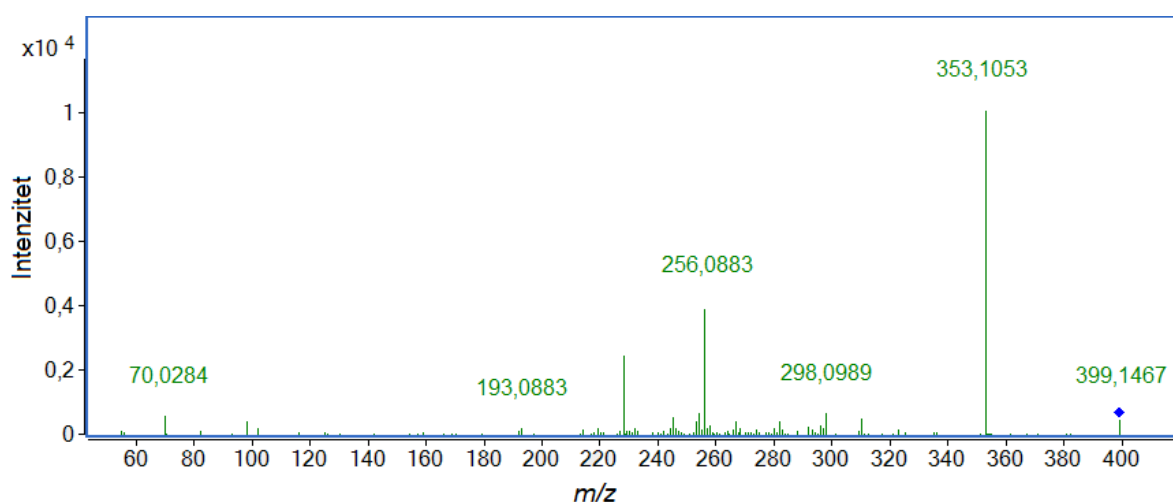


Slika 69. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP11 (m/z 244,0524), kolizijska energija od 30 V

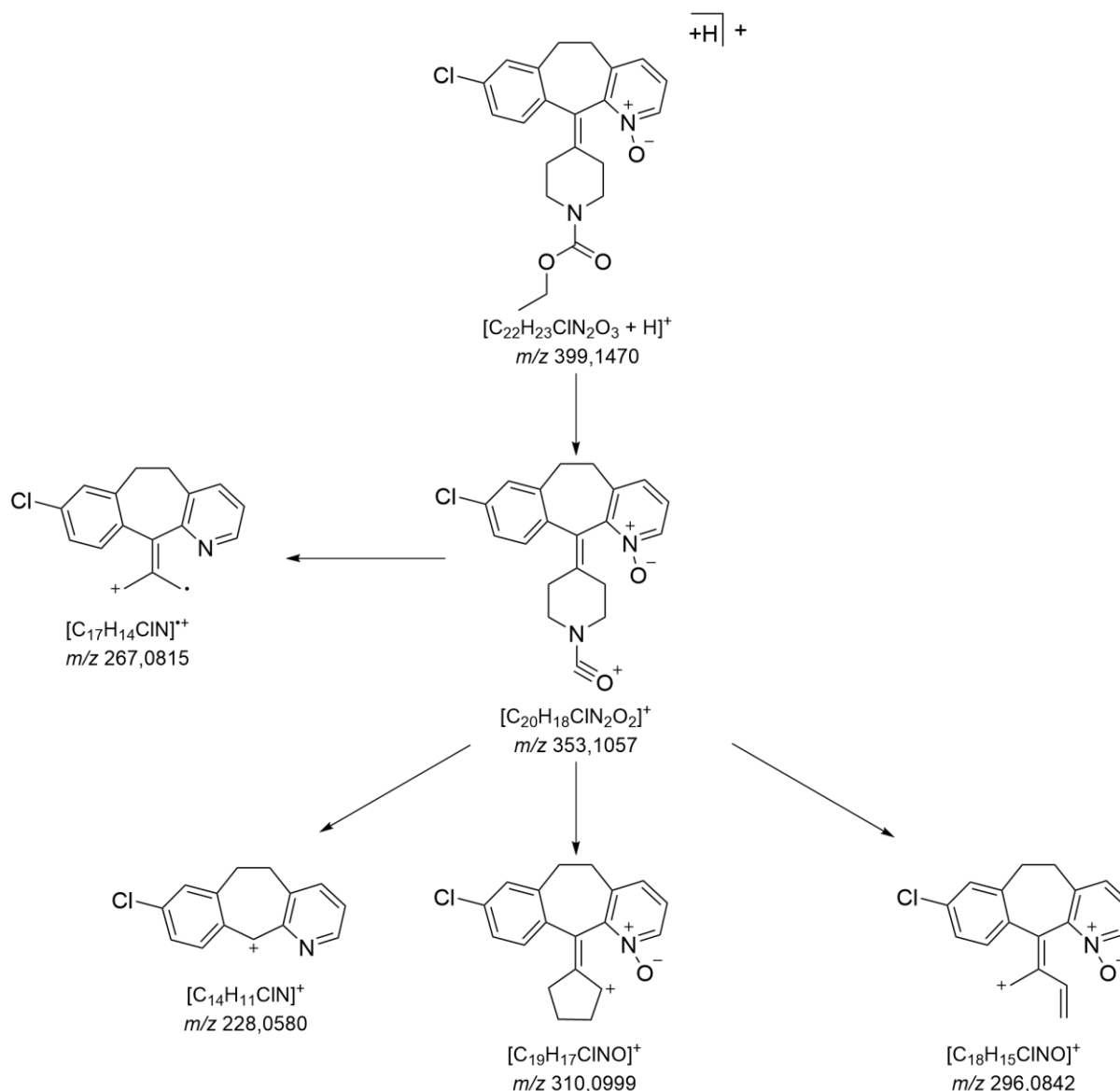
Slika 70. Predložena fragmentacijska shema razgradnog produkta DP11 (m/z 244,0524)

Razgradnom produktu DP12 uočenom pri vremenu zadržavanja 9,4 min također odgovara protonirani ion vrijednosti m/z 399,1470. Međutim, njegov MS/MS spektar razlikuje se od MS/MS spektara ostalih razgradnih produkta iste molekulske formule. Iako je u MS/MS spektru uočen signal iona pri m/z 228, što sugerira hidroksilnu skupinu vezana na piperidinski prsten, izostaje signal iona pri m/z 381 koji odgovara ionu nastalom eliminacijom vode (slike 71 i 72, tablica D31). Međutim, MS/MS spektar ovog razgradnog produkta veoma je sličan MS/MS spektru spoja SCH 38554 u radu Ramanathan i sur.¹⁴⁶ U tom radu provedena je MS i MS/MS analiza hidroksi- i *N*-oksid metabolita loratadina uz ionizaciju elektroraspršenjem i ionizaciju

pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Spoj SCH 38554 odgovara piperidin *N*-oksidu loratadina te je u ESI(+) MS/MS spektru bazni pik signal iona pri m/z 353 koji nastaje eliminacijom etoksi skupine. Značajna razlika uočena je u ESI(+) i APCI(+) MS spektrima, budući da je uz ionizaciju pri atmosferskom tlaku u MS spektru uočen i signal iona pri m/z 383, koji nastaje gubitkom kisika. Budući da je MS/MS spektar razgradnog produkta DP12 iz ovog rada veoma sličan MS/MS spektru spoja SCH 38554, može se zaključiti kako se radi o istim spojevima. Međutim strukture je potrebno potvrditi drugim eksperimentalnim tehnikama, primjerice spektrometrijom masa uz ionizaciju pri atmosferskom tlaku, ili spektroskopijom NMR.

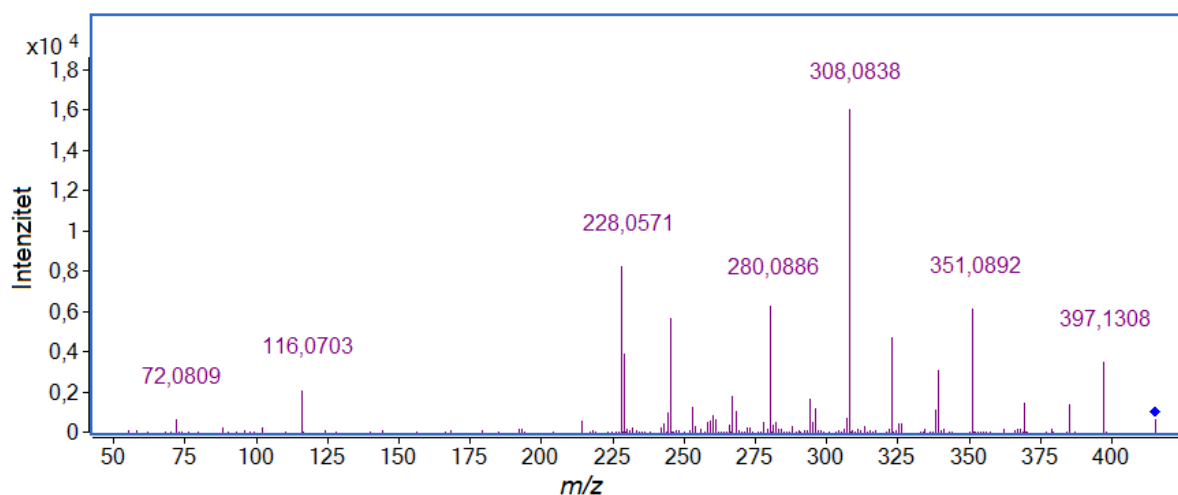


Slika 71. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP12 (m/z 399,1470), kolizijska energija od 30 V

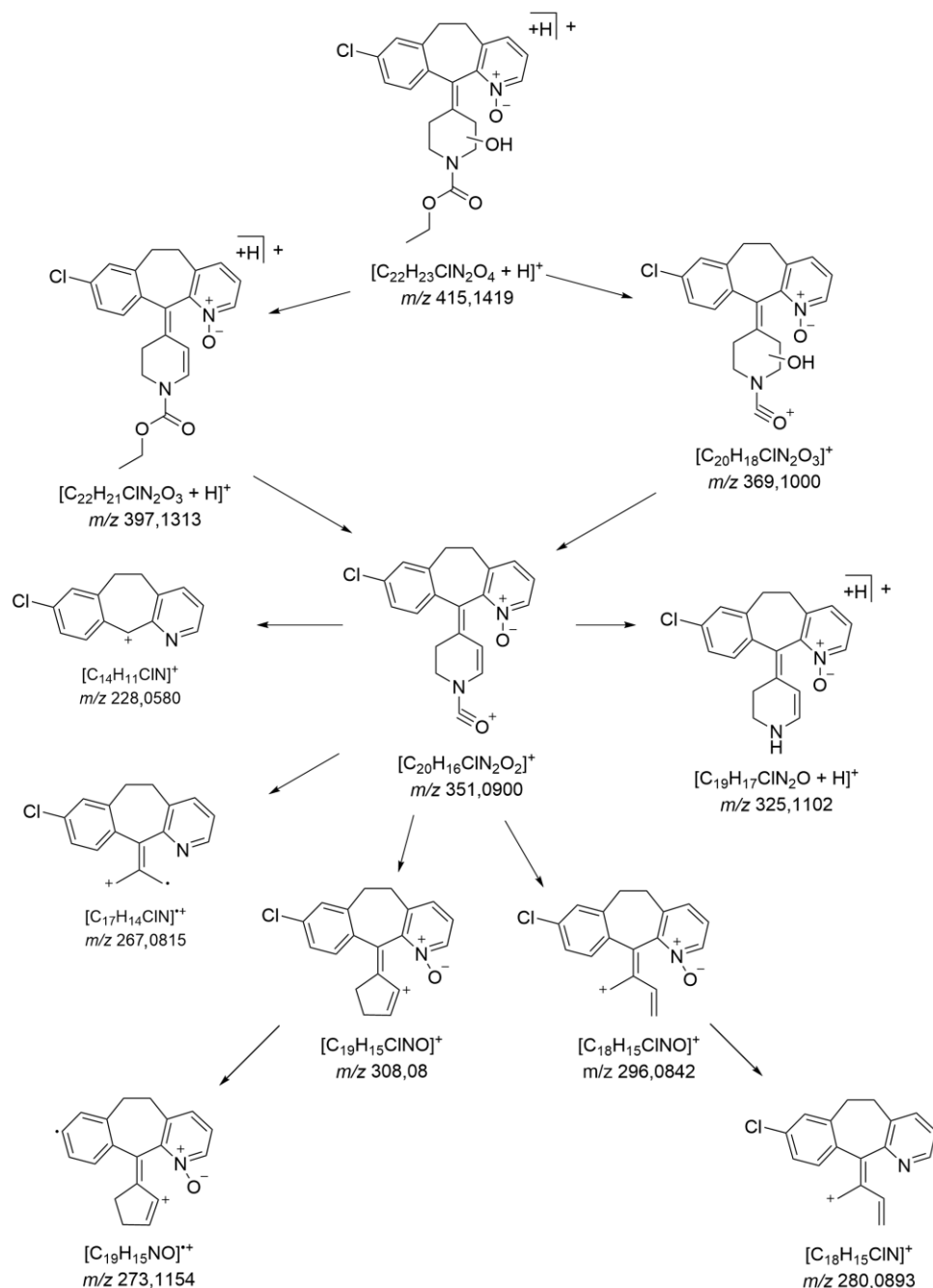
Slika 72. Predložena fragmentacijska shema razgradnog produkta DP12 (m/z 399,1470)

Razgradni produkt DP13 (vrijeme zadržavanja 7,4 min) odgovara protoniranom ionu vrijednosti m/z 415,1419. Razlika od 31,9898 Da naspram vrijednosti m/z protoniranog loratadina ukazuje na vezanje dvije hidroksilne skupine na molekulu loratadina. U MS/MS spektru uočen je signal iona pri m/z 397 koji odgovara eliminaciji jedne molekule vode, no budući da nije uočen signal iona pri m/z 379 koji bi odgovarao eliminaciji druge hidroksilne skupine na isti način, može se zaključiti da je samo jedna hidroksilna skupina pozicionirana tako da je moguća eliminacija vode (tablica D32 i slika 73). Budući da je u MS/MS spektru uočen i signal iona pri m/z 228, može se zaključiti da se jedna hidroksilna skupina nalazi na

piperidinskom prstenu, a da druga hidroksilna skupina nije vezana na aromatske prstenove u molekuli. Sličan trend uočen je i za razgradni produkt DP12, što ukazuje kako je razgradni produkt DP13 također *N*-oksidni spoj te da nastaje iz razgradnog produkta DP12 vezanjem hidroksilne skupine na piperidinski prsten. U MS/MS spektru DP13 također su uočeni signali iona pri m/z 351 i m/z 308. Navedeni ioni analogni su ionima razgradnog produkta DP12, što potvrđuje da je jedna hidroksilna skupina vezana na piperidinski prsten (slika 74).



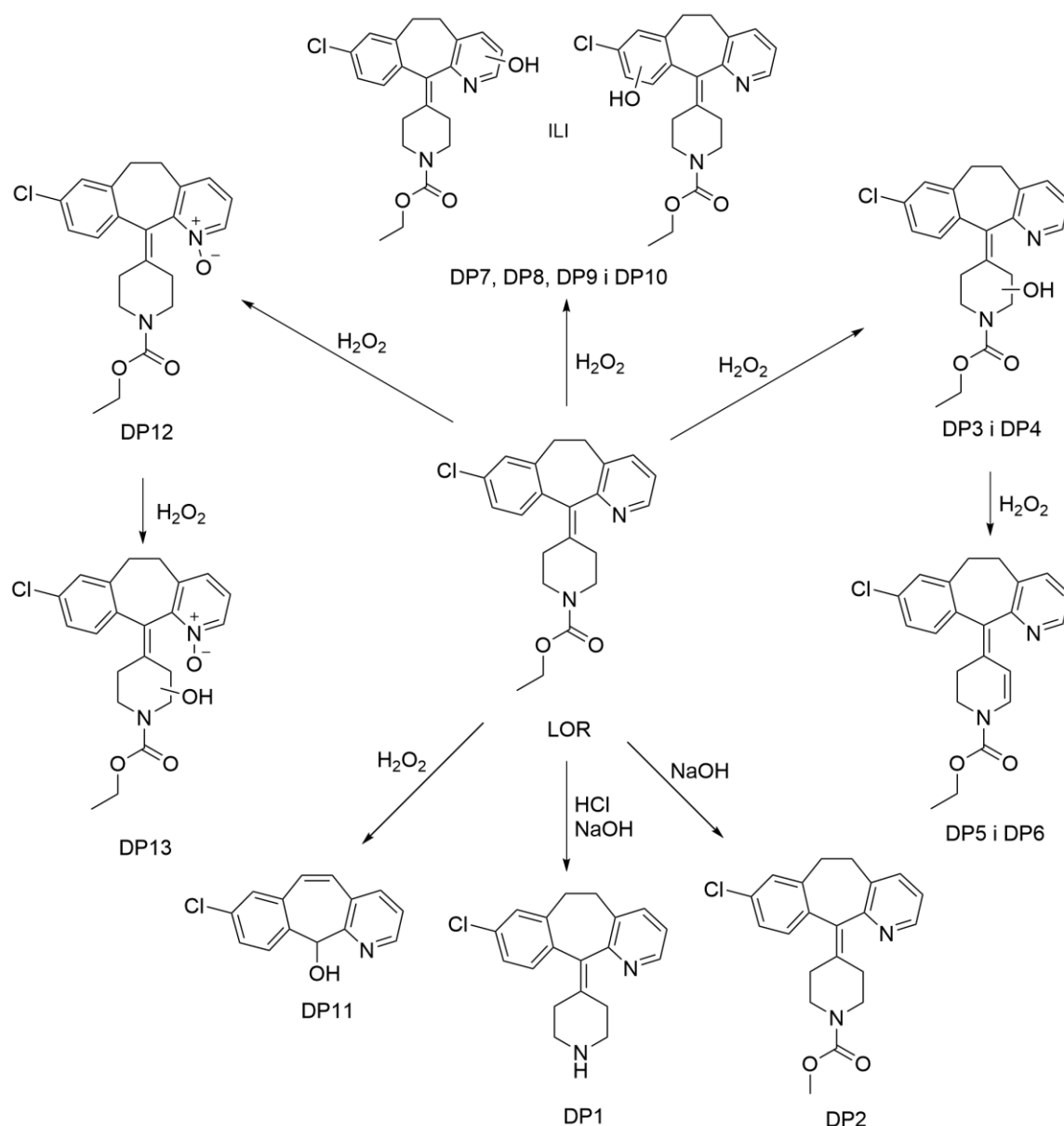
Slika 73. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP13 (m/z 415,1419), kolizijska energija od 30 V

Slika 74. Predložena fragmentacijska shema razgradnog produkta DP13 m/z (415,1419)

U sklopu ovog rada provedeni su eksperimenti prisilne razgradnje loratadina u kiselim, lužnatim i oksidativnim uvjetima, pri sobnoj temperaturi i prilikom zagrijavanja na 80 °C. Loratadin se pokazao stabilnim pri uvjetima kisele hidrolitičke razgradnje uz veoma mali nastanak razgradnog produkta DP1 uz zagrijavanje. U uvjetima lužnate hidrolitičke razgradnje značajna razgradnja loratadina uočena je pri 80 °C uz nastajanje razgradnih produkata DP1 i DP2. U uvjetima oksidativne razgradnje nije došlo do značajne razgradnje, ali nastaju razgradni

produkti DP3 i DP5. Također je ispitana razgradnja loratadina u binarnim sustavima LOR:CD. U uvjetima kisele i lužnate hidrolitičke razgradnje nije bilo značajnih promjena. Međutim, u uvjetima oksidativne razgradnje nastao je veći broj razgradnih produkata (DP3 – DP13).

Strukture uočenih razgradnih produkata određene su na temelju MS i MS/MS analize spektrometrijom masa visokog razlučivanja uz ionizaciju elektroraspršenjem. Od 13 uočenih razgradnih produkata, samo je jedan (DP1) već opisan u literaturi i strukturno odgovara desloratadinu.¹⁴² Nadalje, strukture razgradnih produkata DP3, DP4, DP12 te DP7 – DP10 odgovaraju predloženim strukturama metabolita loratadina.^{146–148} Ostali razgradni produkti su prvi put uočeni u ovom radu. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja, primjerice spektroskopijom NMR, kako bi se odredila njihova točna struktura. Na slici 75 prikazane su strukture svih razgradnih produkata loratadina određenih u ovom radu, a u tablici D33 navedena su i njihova vremena zadržavanja te izmjerene i izračunate vrijednosti m/z .



Slika 75. Predložene strukture opaženih razgradnih produkata loratadina

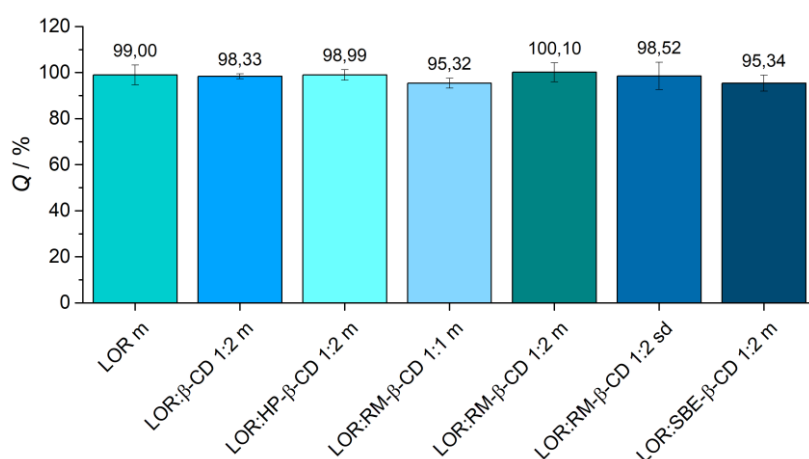
4.4.4. Utjecaj ciklodekstrina na fotostabilnost loratadina

Provedeno je istraživanje utjecaja ciklodekstrina na fotostabilnost loratadina. Pripremljeni su uzorci samog loratadina i odabranih binarnih sustava LOR:CD te su studije fotostabilnosti provedene prema ICH smjernicama. Budući da su uzorci LOR:CD 1:2 pokazali značajno bolja svojstva od binarnih sustava LOR:CD 1:1, samo su oni uzeti u obzir za istraživanja fotostabilnosti. Izuzetak je sustav LOR:RM- β -CD 1:1 koji je odabran kako bi se vidjelo ima li količina ciklodekstrina u uzorku utjecaj na stabilnost. Nadalje, budući da se mljevenje pokazalo kao efikasniji način pripreme uzoraka, samo su mljeveni uzorci uzeti u obzir, s izuzetkom

sustava LOR:RM- β -CD 1:2 pripremljenog sušenjem raspršivanjem, kako bi se uvjerali da način pripreme ne utječe na stabilnost loratadina.

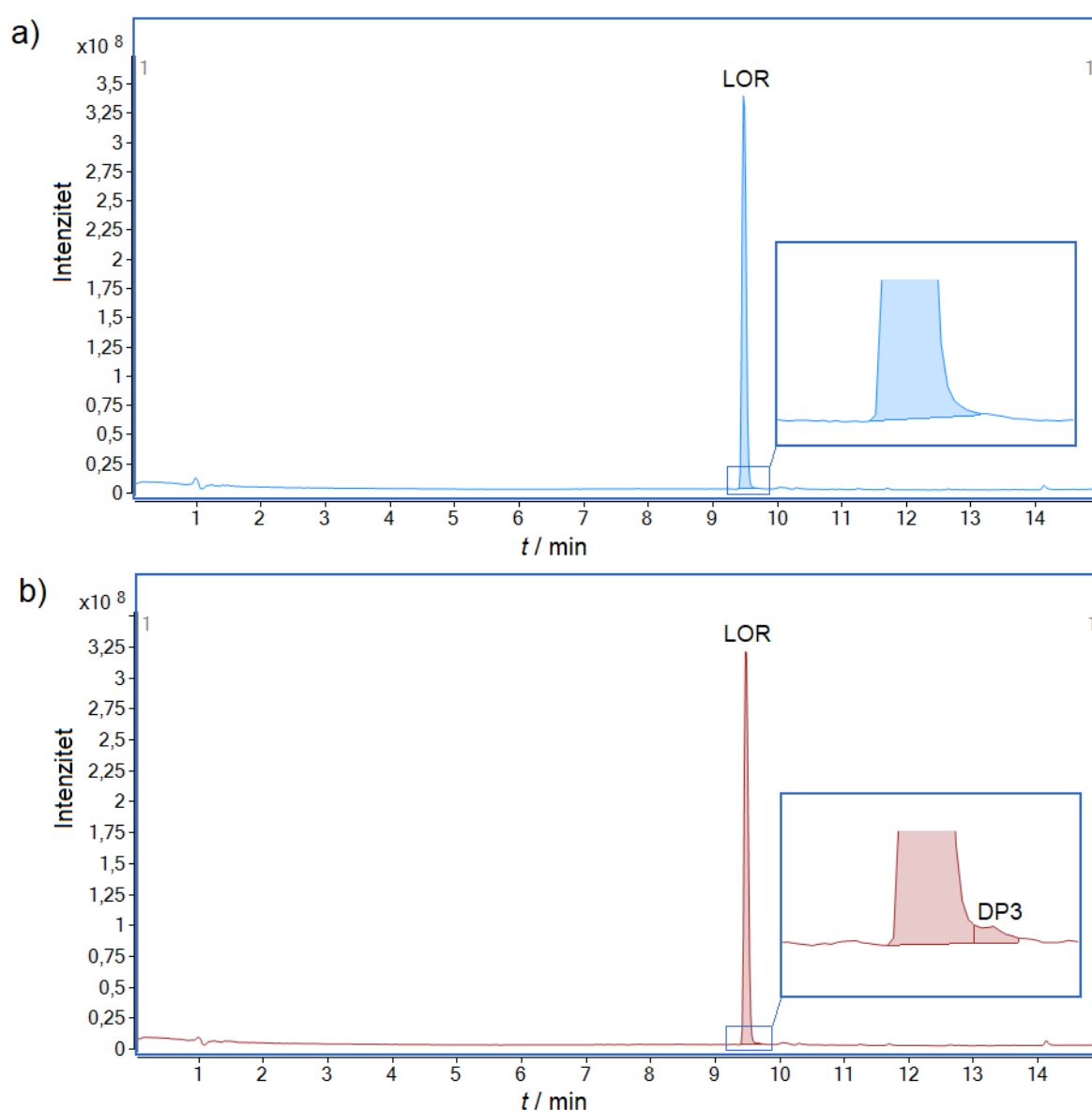
Uzorci su nakon izlaganja izvorima dnevnog i UV zračenja otopljeni i analizirani metodom LC-DAD te su izračunate koncentracije loratadina i analitički povrati. Korištena je prethodno razvijena metoda analize loratadina u prisutnosti razgradnih produkata, međutim zbog akumulacije ciklodekstrina na prethodno korištenoj koloni (*Zorbax Eclipse Plus C18*), bilo je potrebno zamijeniti kolonu (*Acquity BEH C18*) i revalidirati metodu (tablica D34).¹²⁸ Budući da je analiza uzoraka nakon fotorazgradnje provedena na koloni drugog proizvođača, vremena zadržavanja svih analita su pomaknuta prema većim vrijednostima. Međutim, relativna vremena zadržavanja su jednaka za obje kolone, te su stoga ona korištena pri identifikaciji uočenih razgradnih produkata.

Na slici 76 prikazani su rezultati studija fotostabilnosti loratadina u mljevenom uzorku i u binarnim sustavima LOR:CD 1:2 te LOR:RM- β -CD 1:1 pripremljenih mljevenjem, te uzorka LOR:RM- β -CD 1:2 pripremljenog sušenjem raspršivanjem. Rezultati su izraženi kao postotna vrijednost omjera analitičkih povrata loratadina u kontrolnim uzorcima i u uzorcima izloženima razgradnji. Dobivene vrijednosti su u rasponu (95,32 – 100,10) %, što ukazuje da loratadin nije podložan razgradnji. Ovi rezultati nisu u skladu s istraživanjem Rivas-Granizo i sur. gdje se pokazalo da nakon 12 sati dolazi do razgradnje samog loratadina, a prirodni ciklodekstrini poboljšavaju stabilnost loratadina. Međutim, u radu nije naveden postotak razgradnje samog loratadina, a eksperimenti su bili provedeni u otopini, dok su eksperimenti u ovom radu bili provedeni u čvrstom stanju.¹²³



Slika 76. Rezultati istraživanja fotostabilnosti za uzorke LOR (■), LOR:β-CD 1:2 m (■), LOR:HP-β-CD 1:2 m (■), LOR:RM-β-CD 1:1 m (■), LOR:RM-β-CD 1:2 m (■), LOR:RM-β-CD 1:2 sd (■) i LOR:SBE-β-CD 1:2 m (■)

Najmanje vrijednosti omjera analitičkih povrata dobivene su za sustave LOR:RM- β -CD 1:1 (95,32 %) i LOR:SBE- β -CD 1:2 (95,34 %) pripremljenih mljevenjem, stoga su ovi uzorci dodatno analizirani metodom UHPLC-MS. U uzorku LOR:RM- β -CD 1:1 nisu uočeni razgradni produkti, pa je smanjena vrijednost vjerojatno posljedica eksperimentalne pogreške pri određivanju analitičkog povrata (slika D8). Međutim u kromatogramu ukupne ionske struje uzorka LOR:SBE- β -CD 1:2 uočen je kromatografski pik veoma niskog intenziteta pri relativnom vremenu zadržavanja 1,02 koji odgovara razgradnom produktu DP3, što je potvrđeno MS/MS analizom (slike 77 i D9).

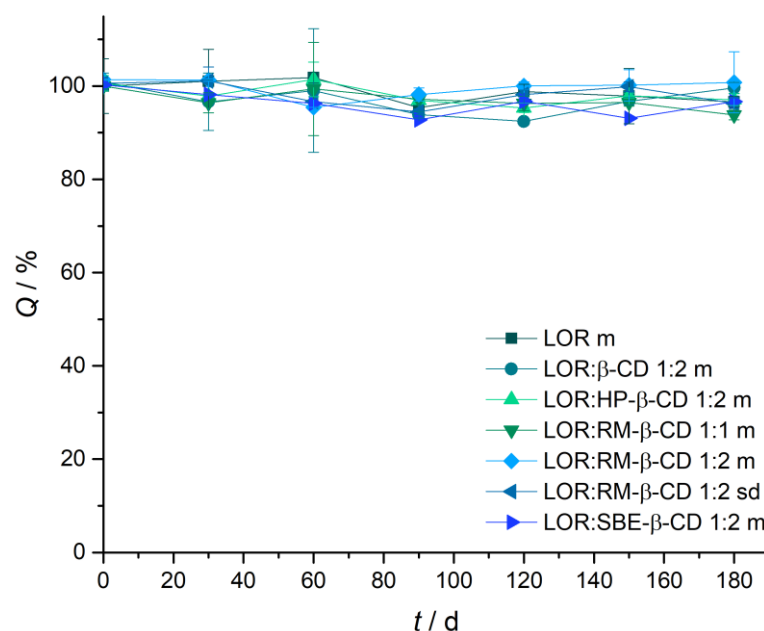


Slika 77. TIC kromatogrami uzorka LOR:SBE- β -CD 1:2: kontrolni uzorak (a) i uzorak nakon fotorazgradnje (b)

Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da je loratadin stabilan pri uvjetima fotolitičke razgradnje propisane ICH smjernicama, a ciklodekstrini ne utječu značajno na njegovu stabilnost. Iako je uočena razgradnja u uzorku LOR:SBE- β -CD 1:2, udio razgradnje je zanemariv. Iako ovi rezultati nisu u skladu s prethodnim istraživanjima, razlike se mogu pripisati načinu izvođenja eksperimenta, budući da su u prethodnim istraživanjima eksperimenti provedeni u otopini, a u ovom radu su provedeni u čvrstom stanju.

4.4.5. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost loratadina u uvjetima ubrzane razgradnje

Provedene su studije ubrzane razgradnje na uzorcima samog loratadina i binarnih sustava LOR:CD 1:2 i LOR:RM- β -CD 1:1 pripremljenih mljevenjem te LOR:RM- β -CD 1:2 pripremljenog sušenjem raspršivanjem. Uzorci su pohranjeni u stabilitetne komore pri 40 °C i 75 % relativne vlažnosti. Uzorci su analizirani svakih mjesec dana tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti te su rezultati prikazani kao postotni omjer analitičkog povrata uzorka izloženog uvjetima povišene temperature i relativne vlažnosti, te referentnog uzorka, odnosno onog koji nije izložen navedenim uvjetima. Sam loratadin je stabilan pri uvjetima ubrzane razgradnje, a ciklodekstrini ne utječu na njegovu stabilnost (slika 78).



Slika 78. Rezultati studija stabilnosti pri uvjetima ubrzane razgradnje (40 °C i 75 % RV) za uzorke LOR m (■), LOR:β-CD 1:2 m (●), LOR:HP-β-CD 1:2 m (▲), LOR:RM-β-CD 1:1 m (▼), LOR:RM-β-CD 1:2 m (◆), LOR:RMβ-CD 1:2 sd (◄) i LOR:SBE-β-CD 1:2 m (►)

Kako bi potvrdili da ne dolazi do razgradnje loratadina, uzorci su nakon šest mjeseci razgradnje analizirani i metodom UHPLC-MS. Budući da nisu uočeni dodatni pikovi koji bi odgovarali razgradnim produktima, stabilnost loratadina u uzorcima je potvrđena. Usporedbom kromatograma slijepe probe (otapala) i kromatograma uzoraka, može se zaključiti da dodatni pikovi uočeni u kromatogramima uzoraka su također prisutni i u kromatogramima otapala (slika D10).

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je detaljna analiza binarnih sustava loratadina i β -ciklodekstrina te njegovog hidroksipropiliranog, nasumično deriviranog i alkilsulfoniranog derivata, kako bi se istražila potencijalna primjena navedenih ciklodekstrina pri razvoju novih formulacija lijeka s poboljšanim svojstvima. Istraživanja su provedena u otopini i u čvrstom stanju, pri čemu su korištene različite analitičke tehnike.

Utjecaj ciklodekstrina na topljivost loratadina istražen je u vodi i simuliranim biorelevantnim medijima. Pokazalo se da ciklodekstrini značajno povećavaju topljivost loratadina u svim medijima, te da solubilizacijski efekt ciklodekstrina opada u nizu RM- β -CD > SBE- β -CD > β -CD > HP- β -CD. Rezultati također ukazuju na nastanak kompleksa stehiometrije LOR:CD 1:1, osim u slučaju RM- β -CD i HP- β -CD, gdje pri višim koncentracijama dodanih ciklodekstrina nastaju i kompleksi stehiometrije 1:2. Izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti su u rasponu vrijednosti $\log K_{1:1}$ od 3,92 do 5,23 što ukazuje na nastanak stabilnih kompleksa stehiometrije 1:1. Dobiveni rezultati su djelomično u skladu s prethodnim istraživanjima, a uočene diskrepancije u rezultatima mogu se objasniti razlikama u eksperimentalnim uvjetima.

Karakterizacija binarnih sustava LOR-CD u otopini provedena je i spektrometrijom masa za sve sustave osim za one sa SBE- β -CD. Uočeno je nastajanje kompleksa, a određena stehiometrija bila je LOR:CD 1:1. Kompleksi stehiometrije 1:2 nisu uočeni, vjerojatno zbog njihove niske stabilnosti.

Binarni sustavi u čvrstom stanju pripremljeni su u stehiometrijskim omjerima LOR:CD 1:1 i 1:2 mljevenjem i sušenjem raspršivanjem. Uspješnost pripreme uzoraka pratila se razlikovnom pretražnom kalorimetrijom te je u svim mljevenim uzorcima uočen potpuni nestanak kristalne frakcije loratadina. U uzorcima pripremljenim sušenjem raspršivanjem potpuni nestanak kristalne frakcije loratadina uočen je u binarnim sustavima LOR: β -CD 1:2, LOR:HP- β -CD 1:2 te LOR:RM- β -CD 1:1 i 1:2, dok je u ostalim uzorcima zaostao mali udio kristalne frakcije loratadina. Potpuna, odnosno djelomična amorfizacija uzoraka potvrđena je i rezultatima analize difrakcijom rendgenskog zračenja na praškastom uzorku. Amorfizacija uzoraka u kojima su prisutni ciklodekstrini ne mora nužno značiti da je došlo do nastanka inkluzijskog

kompleksa. Međutim, rezultati analize infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama mogu ukazivati na barem djelomičan nastanak inkluzijskog kompleksa.

Istraživanja *in vitro* otapanja loratadina u simuliranom intestinalnom mediju ukazuju da ciklodekstrini i način pripreve utječu na profil otapanja loratadina. Najbolji rezultati ponovno su dobiveni za sustave LOR:CD 1:2 u kojima dolazi do trenutnog i potpunog otapanja loratadina. Stoga su ovi sustavi uzeti za daljnja istraživanja stabilnosti.

Ispitivanjem topljivosti loratadina u pripremljenim binarnim sustavima vidljivo je da dolazi do značajnog povećanja topljivosti, te da način pripreve ne utječe značajno na rezultate, osim u slučaju LOR:RM- β -CD 1:2, gdje je više loratadina otopljeno u uzorku pripremljenim sušenjem raspršivanjem. Također je bolja topljivost loratadina određena u binarnim sustavima stehiometrije LOR:CD 1:2.

Stabilnost loratadina ispitana je eksperimentima u uvjetima prisilne i ubrzane razgradnje, te u uvjetima fotolitičke razgradnje. Pokazalo se da ciklodekstrini u oksidativnim uvjetima pri povišenoj temperaturi povećavaju razgradnju loratadina i uzrokuju nastanak većeg broja razgradnih produkata, a u uvjetima ubrzane razgradnje nemaju značajan utjecaj na stabilnost loratadina. Sam loratadin je fotostabilan, a jedino u prisutnosti RM- β -CD dolazi do veoma male razgradnje i nastanka jednog razgradnog produkta.

Strukture razgradnih produkata loratadina predložene su na temelju MS i MS/MS analize. Ukupno je uočeno trinaest razgradnih produkata, od kojih je jedan već poznat (DP1), a sedam strukturom odgovaraju predloženim strukturama poznatih metabolita loratadina (DP3, DP4, DP12, DP7 – DP10). Ostali razgradni produkti su prvi puta uočeni. Međutim za točnu identifikaciju njihovih struktura potrebna su daljnja istraživanja koja uključuju spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije.

Na temelju svih rezultata prikazanih u ovom radu može se zaključiti da ciklodekstrini povećavaju topljivost loratadina. Mljevenje je pogodan način pripreve binarnih sustava LOR:CD u čvrstom stanju. Ne samo da je brz, jednostavan, ekonomski isplativ i ekološki prihvatljiv, već je i efikasniji u odnosu na konvencionalniji način pripreve sušenjem raspršivanjem. Binarni sustavi stehiometrije 1:2 pokazali su bolja svojstva od sustava stehiometrije 1:1, a posebice sustav s RM- β -CD. Stoga pripravljeni i istraženi sustavi lijek-CD pokazuju potencijal za razvoj novih formulacija s poboljšanim svojstvima.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

ACN - acetonitril

ATR - prigušena totalna refleksija

BCS - biofarmaceutski sustav klasifikacije lijekova

CD - ciklodekstrin

CE - kompleksacijska efikasnost

DIMEB - dimetil β -ciklodekstrin

DS - stupanj supstitucije

DSC - razlikovna pretražna kalorimetrija

EIC - kromatogram izoliranog iona

EMA - Europska agencija za lijekove

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove

FT-IR - infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

FoA - mravlja kiselina

GRAS - sigurno za primjenu

HAc - octena kiselina

HP- β -CD - 2-hidroksipropil β -ciklodekstrin

ICH - Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutika za ljudsku upotrebu

ITC - izotermalna titracijska kalorimetrija

IVIVC - *in vitro-in vivo* korelacija

LOD - granica detekcije

LOQ - granica kvantifikacije

LOR - loratadin

M - mljevenje

MeOH - metanol

MOF - metaloorganske mreže

MS - spektrometrija masa

MS/MS - tandemna spektrometrija masa

NH₄Ac - amonijev acetat

NH₄Fo - amonijev formijat

NMR - spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije

PXRD - difrakcija rendgenskog zračenja na praškastom uzorku

pm - fizička smjesa

RDC - udio kristalne frakcije

R.I. - relativni intenzitet

RM-β-CD - nasumično metilirani β-ciklodekstrin

SBE-β-CD - natrijeva sol sulfobutil eter β-ciklodekstrina

SCXRD - difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu

sd - sušenje raspršivanjem

SDM - simulirani duodenalni medij

SEDDS - samoemulzificirajući sustavi za isporuku lijekova

SIM - simulirani crijevni medij

ss-NMR - spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije u čvrstom stanju

TIC - kromatogram ukupne ionske struje

TGA - termogravimetrijska analiza

UHPLC-DAD - tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija

α-CD - α- ciklodekstrin

β-CD - β-ciklodekstrin

γ-CD - γ-ciklodekstrin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 1 – 10.
2. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, T. Loftsson, *Molecules* **23** (2018) 1161.
3. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 272 – 284.
4. S.-Y. Lin, C.-H. Hsu, M.-T. Sheu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 799 – 803.
5. Á. Szabados-Nacsa, P. Sipos, T. Martinek, I. Mándity, G. Blazsó, Á. Balogh, P. Szabó-Révész, Z. Aigner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55** (2011) 294 – 300.
6. J. M. Ting, W. W. Porter III, J. M. Mecca, F. S. Bates, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.* **29** (2018) 939 – 952.
7. S. Kalepu, V. Nekkanti, *Acta Pharm. Sin. B* **5** (2015) 442 – 423.
8. D. V. Bhalani, B. Nutan, A. Kumar, A. K. Singh Chandel, *Biomedicines* **10** (2022) 2055.
9. L. Z. Benet, *J. Pharm. Sci.* **102** (2013) 34 – 42.
10. A. Charalabidis, M. Sfouni, C. Bergström, P. Macheras, *Int. J. Pharm.* **566** (2019) 264 – 281.
11. N. Fine-Shamir, A. Dahan, *Expert Opin. Drug Deliv.* **21** (2024) 13 – 29.
12. A. T. M. Serajuddin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **59** (2007) 603 – 616.
13. S. Jain, N. Patel, S. Lin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **41** (2015) 875 – 887.
14. M. Rodriguez-Aller, D. Guillarme, J.-L. Veuthey, R. Gurny, *J. Drug. Delivery Sci. Technol.* **30** (2015) 342 – 351.
15. N. Qiao, M. Li, W. Schlindwein, N. Malek, A. Davies, G. Trappitt, *Int. J. Pharm.* **419** (2011) 1 – 11.
16. M. Guo, X. Sun, J. Chen, T. Cai, *Acta Pharm. Sin. B* **11** (2021) 2537 – 2564.
17. D. N. Bikiaris, *Expert Opin. Drug Deliv.* **8** (2011) 1663 – 1680.
18. R. Malkawi, W. I. Malkawi, Y. Al-Mahmoud, J. Tawalbeh, *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* **2022** (2022) 5916013.
19. J. van der Merwe, J. Steenekamp, D. Steyn, J. Hamman, *Pharmaceutics* **12** (2020) 393.
20. L. Kumari, Y. Choudhari, P. Patel, G. D. Gupta, D. Singh, J. M. Rosenholm, K. K. Bansal, B. D. Kurmi, *Life* **13** (2023) 1099.
21. M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Acc. Chem. Res.* **41** (2008) 60 – 68.
22. D. S. Khafaga, M. T. El-Morsy, H. Faried, A. H. Diab, S. Shehab, A. M. Saleh, G. A. M. Ali, *RSC Adv.* **14** (2024) 30201 – 30229.
23. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607 – 1621.

24. G. Crini, S. Fourmentin, E. Fenyvesi, G. Torri, M. Fourmentin, N. Morin-Crini u S. Fourmentin, G. Crini, E. Lichtfouse (ur.), *Fundamentals and Applications of Cyclodextrin, Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis (Environmental Chemistry for a Sustainable World)*, Vol. 16, Springer International Publishing AG, Cham, 2018, str. 223.
25. J. Zhang, P. X. Ma, *Adv. Drug. Delivery Rev.* **65** (2013) 1215 – 1233.
26. A. M. Musuc, *Molecules* **29** (2024) 5319.
27. E. Fenyvesi, J. Szemán, K. Csabai, M. Malaga, L. Szente, *J. Pharm. Sci.* **103** (2014) 1443 – 1452
28. M. Malaga, J. Szemán, É. Fenyvesi, I. Puskás, K. Csabai, G. Gyémánt, F. Fenyvesi, L. Szente, *J. Pharm. Sci.* **105** (2016) 2921 – 2931.
29. J. Rincón-López, Y. C. Almanza-Arjona, A. P. Riascos, Y. Rojas-Aguirre, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **61** (2021) 102156.
30. J. Conceição, O. Adeoye, H. M. Cabral-Marques, J. M. Sousa Lobo, *Drug Discov. Today* **23** (2018) 1274 – 1284.
31. M. P. di Cagno, *Molecules* **22** (2017) 1.
32. I. Puskás, L. Szente, L. Szöcs, E. Fenyvesi, *Period. Polytech., Chem. Eng.* **67** (2023) 11 – 17.
33. M. Kfoury, E. Lichtfouse, S. Fourmentin, *Environ. Chem. Lett.* **23** (2025) 1 – 6.
34. B. G. Fouda-Mbanga, Z. Tywabi-Ngeva, W. M. Badawy, C. Ebite, O. P. Onotu, C. Abogidi, A. P. Uzordinma, S. Kaba, *J. Mol. Struct.* **1328** (2025) 141326.
35. S. E. Z. Seyda, D. Nowacka, M. S. Khan, A. M. Skwierawska, *Polymers* **14** (2022) 2341.
36. A. G. Pereira, M. Carpena, P. G. Oliveira, J. C. Mejuto, M. A. Prieto, J. S. Gandara, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 1339.
37. F. M. Bezerra, M. J. Lis, H. B. Firmino, J. G. Dias da Silva, R. d. C. S. Curto Valle, J. A. Borges Valle, F. A. P. Scacchetti, A. L. Tessaro, *Molecules* **25** (2020) 3624.
38. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.* **101** (2012) 3019 – 3032.
39. M. Kfoury, D. Landy, S. Fourmentin, *Molecules* **23** (2018) 1204.
40. E. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033 – 1046.
41. M. E. Brewster, T. Loftsson, *Adv. Drug. Delivery Rev.* **59** (2007) 645 – 666.
42. T. Higuchi i K. Connors, u C. N. Reilley (ur.), *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, Vol 4, Wiley Interscience, New York, 1964, str. 117.
43. T. Loftsson, A. Magnúsdóttir, M. Másson, J. F. Sigurjónsdóttir, *J. Pharm. Sci.* **91** (2002) 2307 – 2316.
44. T. Loftsson, H. H. Sigurdsson, P. Jansook, *Materials* **16** (2023) 2223.
45. T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, *Int. J. Pharm.* **302** (2005) 18 – 28.
46. R. L. Carrier, L. A. Miller, I. Ahmed, *J. Controlled Release* **123** (2007) 78 – 99.

47. T. Loftsson, M. D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *J. Pharm. Pharmacol.* **68** (2016) 544 – 555.
48. V. Aiassa, C. Garnero, A. Zoppi, M. R. Longhi, *Pharmaceuticals* **16** (2023) 1074.
49. A. Popielec, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **531** (2017) 532 – 542.
50. Y. Lu, T. Guo, J. Qi, J. Zhang, W. Wu, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **13** (2012) 1222 – 1229.
51. G. M. El Maghraby, A. H. Alomrani, *J. Drug Del. Sci. Tech.* **20** (2010) 385 – 389.
52. M. El-Badry, E. I. taha, F. K. Alanazi, I. A. Alsarra, *J. Drug Del. Sci. Tech.* **19** (2009) 347 – 351.
53. C. Garnero, A. K. Chattah, C. Aloisio, L. Fabietti, M. Longhi, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **19** (2018) 2255 – 2263.
54. M. S. Bueno, L. Chierentin, A. Bongioanni, H. R. Nunes Salgado, M. R. Longhi, C. Garnero, *Carbohydr. Res.* **485** (2019) 107818.
55. K. Uehata, T. Anno, K. Hayashida, K. Motoyama, F. Hirayama, N. Ono, J. D. Pipkin, K. Uekama, H. Arima, *Int. J. Pharm.* **419** (2011) 71 – 76.
56. M. Jug, P. A. Mura, *Pharmaceutics* **10** (2018) 189.
57. S. M. Badr-Eldin, S. A. Elkeshen, M. M. Ghorab, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70** (2008) 819 – 827.
58. F. De Gaetano, M. C. Cristiano, D. Paolino, C. Celesti, D. Iannazzo, V. Pistarà, N. Iraci, C. A. Ventura, *Biomolecules* **12** (2022) 1716.
59. A. Sakellaropoulou, A. Siamidi, M. Vlachou, *Molecules* **27** (2022) 445.
60. N. Liu, H.-P. Chen, Z.-M. Yang, M.-Y. Xia, D. Wang, L.-H. Zang, D.-C. Liu, *Molecules* **27** (2022) 3213.
61. R. Ivone, A. Fernando, B. DeBoef, S. A. Meenach, J. Shen, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **22** (2021) 193.
62. X. Yang, J. Shen, J. Liu, Y. Yang, A. Hu, N. Ren, Z. Cheng, W. Liu, *Crystals* **12** (2022) 596.
63. M. Banchero, L. Manna, *J. Supercrit. Fluids* **57** (2011) 259 – 266.
64. M. Banchero, L. Manna, *J. Supercrit. Fluids* **67** (2012) 76 – 83.
65. K. Vijaya Sri, A. Kondaiah, J. V. Ratna, A. Annapurna, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **33** (2007) 245 – 253 .
66. F. Semcheddine, N. E. I. Guissi, X. Y. Liu, Z.M. Wu, B. Wang, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **16** (2015) 704 – 715.
67. M. I. Rodriguez-López, M. T. Mercader-Ros, S. López-Miranda, J. A. Pellicer, A. Pérez-Garrido, H. Pérez-Sánchez, E. Núñez-Delicado, J. A. Gabaldón, *J. Sci. Food Agric.* **99** (2019) 1322 – 1333.
68. A. Ahad, Y. A. Bin Jardan, M. Z. Hassan, M. Raish, A. Ahmad, A. M. Al-Mohizea, F. I. Al-Jenoobi, *Drug. Deliv.* **29** (2022) 1512 – 1522.
69. K. Higashi, Y. Tozuka, K. Moribe, K. Yamamoto, *J. Pharm. Sci.* **99** (2010) 4192 – 4200.
70. J. He, W. Li, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **63** (2009) 61 – 68.

71. S. R. Munnangi, A. A. A. Youssef, N. Narala, P. Lakkala, S. K. Vemula, R. Alluri, F. Zhang, M. A. Repka, *Pharmaceutics* **15** (2023) 2203.
72. P. A. Granados, L. A. G. Pinho, L. L. Sa-Barreto, T. Gratieri, G. M. Gelfuso, M. Cunha-Filho, *Adv. Powder Technol.* **33** (2022) 103380.
73. K. Cal, K. Sollohub, *J. Pharm. Sci.* **99** (2010) 575 – 586.
74. J. M. Baumann, M. S. Adam, J. D. Wood, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **12** (2021) 217 – 240.
75. B-290 Mini spray dryer letak, Büchi labortechnik AG.
76. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 238 – 250.
77. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 226 – 238.
78. K. Bouchemal, S. Mazzaferro, *Drug Discovery Today* **17** (2012) 623 – 629.
79. A.C. Illapakurthy, C. M. Wyandt, S. P. Stodghill, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59** (2005) 325 – 332.
80. M. Silion, A. Fifere, A. L. Lungoci, N. L. Marangoci, S. A. Ibanescu, R. Zonda, A. Rotaru, M. Pinteală, u A. G. Woods, C. C. Darie (ur.), Mass Spectrometry as a Complementary Approach for Noncovalently Bound Complexes Based on Cyclodextrins, *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, Vol. 1140, Springer International Publishing AG, Cham, 2019, str. 685.
81. V. Gabelica, N. Galić, E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13** (2002) 946 – 953.
82. A. Sarabia-Vallejo, M. del Mar Caja, A. I. Olives, M. A. Martín, J. C. Menéndez, *Pharmaceutics* **15** (2023) 2345.
83. E. Kiss, V. A. Szabó, P. Horváth, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **95** (2019) 223 – 233.
84. H. Bakirci, X. Zhang, W. M. Nau, *J. Org. Chem.* **70** (2005) 39 – 46.
85. X.-P. Wang, J.-H. Pan, W.-H. Li, Y. Zhang, *Talanta* **54** (2001) 805 – 810.
86. Y.-J. Guo, J.-H. Pan, W.-J. Jing, *Dyes Pigm.* **63** (2004) 65 – 70.
87. C. Yañez, J. Basualdo, P. Jara-Ullo, J. A. Sequella, *J. Phys. Org. Chem.* **20** (2007) 499 – 505.
88. C. Kahle, U. Holzgrabe, *Chirality* **16** (2004) 509 – 515.
89. F. Kopecký, M. Vojteková, P. Kaclik, M. Demko, Z. Bieliková, *J. Pharm. Pharmacol.* **56** (2004) 581 – 587.
90. N. F. S. de Melo, R. Grillo, A. H. Rosa, L. F. Fraceto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47** (2008) 865 – 869.
91. K. L. Larsen, W. Zimmermann, *J. Chrom. A* **836** (1999) 3 – 14.
92. P. Mura, F. Maestrelli, M. Cirri, S. Furlanetto, S. Pinzauti, *J. Therm. Anal. Calorim.* **73** (2003) 635 – 646.
93. Z. Li, X. Jiang, L. Zhu, F. Chen, H. Liu, L. Ming, *J. Therm. Anal. Calorim.* **147** (2022) 11301 – 11312.
94. M. D. Veiga, F. Ahsan, *Eur. J. Pharm. Sci.* **9** (2000) 291 – 299.

95. C-D. Varganici, N. Marangoci, L. Rosu, C. Barbu-Mic, D. Rosu, M. Pinteala, B. C. Simionescu, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **115** (2015) 132 – 142.
96. G. Raffaini, F. Ganazzoli, L. Malpezzi, C. Fuganti, G. Fronza, W. Panzeri, A. Mele, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 9110 – 9122.
97. F. Castiglione, F. Ganazzoli, L. Malpezzi, A. Mele, W. Panzeri, G. Raffaini, *Beilstein J. Org. Chem.* **13** (2017) 714 – 719.
98. H. M. Heise, R. Kuckuk, A. Bereck, D. Riegel, *Vib. Spectrosc.* **53** (2010) 19 – 23.
99. A. H. Mazurek, L. Szeleszczuk, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 3648.
100. L. M. A. Pinto, L. Fernandes Fraceto, M. H. A. Santana, T. A. Pertinhez, S. Oyama Junior, E. de Paula, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005) 956 – 963.
101. D. Ke, W. Chen, W. Chen, Y.-H. Yun, Q. Zhong, X. Su, H. Chen, *Molecules* **25** (2020) 654.
102. S. Muñoz-Botella, M. A. Martín, B. del Castillo, L. Vázquez, *Biophys. J.* **71** (1996) 86 – 90.
103. M. T. Faucci, F. Mrlani, P. Mura, *Chem. Phys. Lett.* **358** (2002) 383 – 390.
104. M. Nagaraju, G. Narahari Sastry, *J. Phys. Chem. A* **113** (2009) 9533 – 9542.
105. A. H. Mazurek, L. Szeleszczuk, T. Gubica, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 9422.
106. Q. Zhao, Z. Ye, Y. Su, D. Ouyang, *Acta Pharm. Sin. B* **9** (2019) 1241 – 1252.
107. F. Raposo, C. Ibelli-Bianco, *Trends Anal. Chem.* **129** (2020) 115913.
108. ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology, 1994.
109. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures, 2023.
110. M. Z. I. Khan, D. Raušl, R. Zanoški, S. Zidar, J. Horvat Mikulčić, L. Krizmanić, M. Eškinja, B. Mildner, Z. Knežević, *Biol. Pharm. Bull.* **27** (2004) 1630 – 1635.
111. S. Bandari, S. Jadav, B. B. Eadara, R. Dhurke, R. Jukanti, *J. Pharm. Innov.* **9** (2014) 141 – 149.
112. K. Suknuntha, N. Khumpirapang, V. Tantishaiyakul, S. Okonogi, *Pharmaceutics* **15** (2023) 2558.
113. F. Frizon, J. de Oliveira Eloy, C. M. Donaduzzi, M. L. Mitsui, J. Maldonado Marchetti, *Powder Technol.* **235** (2013) 532 – 539.
114. E. M. Rédei, E. Sipos, R. A. Vlad, P. Antonoaea, N. Todoran, A. Ciurba, *Processes* **10** (2022) 2722.
115. J. Wang, R. Chang, Y. Zhao, J. Zhang, T. Zhang, Q. Fu, C. Chang, A. Zeng, *AAPS Pharm Sci. Tech.* **18** (2017) 2541 – 2550.
116. J. Li, Y. Zhou, M. Aisha, J. Wu, H. Wang, F. Huang, M. Sun, *J. Pharm. Pharmacol.* **73** (2021) 937 – 946.
117. L. Omar, M. I. El-Barghouthi, N. A. Masoud, A. A. Abdoh, M. M. Al Omari, M. B. Zughul, A. A. Badwan, *J. Solution, Chem.* **36** (2007) 605 – 616.
118. Á. Nacsá, R. Ambrus, O. Berkesi, P. Szabó-Révész, Z. Aigner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48** (2008) 1020 – 1023.

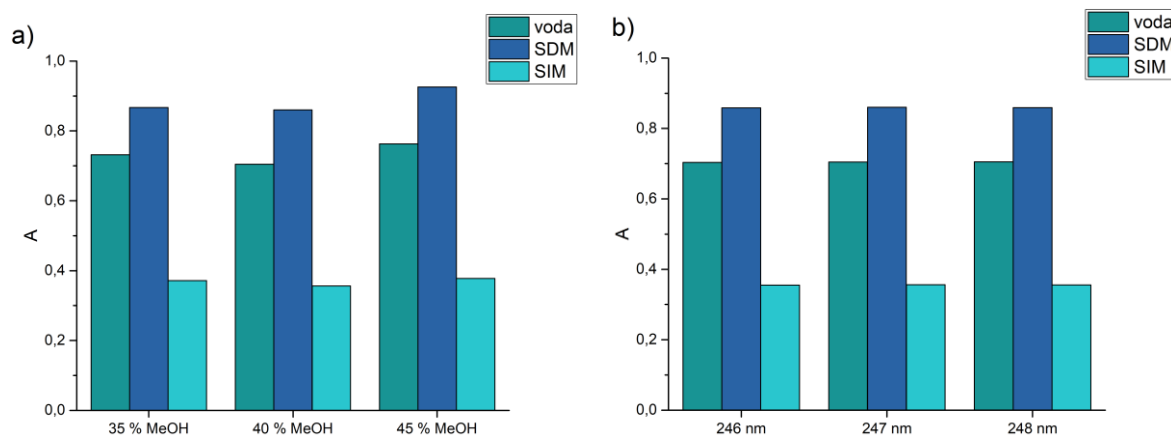
119. Á. Nacsá, O. Berkesi, P. Szabó-Révész, Z. Aigner, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **64** (2009) 249 – 254.
120. R. M. P. Singh, A. Kumar, K. Pathak, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **14** (2013) 412 – 424.
121. H.-L. Lin, S.-Y. Lin, C.-C. Lin, C.-H. Hsu, T.-K. Wu, Y.-T. Huang, *Carbohydr. Polym.* **87** (2012) 512 – 517.
122. K. V. R. N. S. Ramesh, H. K. Singh Yadav, O. Sarheed, T. S. Elmarsafawy, Q. Islam, *Asian J. Pharm.* **14** (2020) 634 – 644.
123. P. E. Rivas-Granizo, L. Giorgetti, H. G. Ferraz, *Int. J. Photoenergy* **2015** (2015) 583052.
124. European pharmacopoeia, Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (2023).
125. J. Muselik, A. Komersová, K. Kubová, K. Matzick, B. Skalická, *Pharmaceutics* **13** (2021) 1703.
126. ICH Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products, 2003.
127. ICH Q1B Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products, 1996.
128. K. K. Ngim, Z. Gu, T. Catalano, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49** (2009) 660 – 669.
129. M. Pocrnić, M. Hoelm, A. Ignaczak, A. Čikoš, A. Budimir, V. Tomišić, N. Galić, *J. Mol. Liq.* **410** (2024) 125515.
130. R. Jacquet, C. Elfakir, M. Lafosse, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** (2005) 3097 – 3102.
131. S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chrom. A* **925** (2001) 79 – 87.
132. R. Chang, Q. Fu, P. Yu, L. Wang, W. Du, C. Chang, A. Zheng, *RSC Adv.* **6** (2016) 85063.
133. T. R. Lex, J. D. Rodriguez, L. Zhang, W. Jiang, Z. Gao, *AAPS J.* **24** (2022) 40.
134. FDA baza metoda istraživanja *in vitro* otapanja lijekova <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/dissolution-methods-database> (pristupljeno 14.01.2026.).
135. J. Stappaerts, P. Augustijns, *Int. J. Pharm.* **511** (2016) 680 – 687.
136. D. A. Diaz, S. T. Colgan, C. S. Langer, N. T. Bandi, M. D. Likar, L. Van Alstine, *AAPS J.* **18** (2015) 15 – 22.
137. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, *J. Pharm. Anal.* **4** (2014) 159 – 165.
138. T. Zelesky, S. W. Baertschi, C. Foti, L. R. Allain, S. Hostyn, J. R. Franca, Y. Li, S. Marden, S. Mohan, M. Ultramari, Z. Huang, N. Adams, J. M. Campbell, P. J. Jansen, D. Kotoni, C. Laue, *J. Pharm. Sci.* **112** (2023) 2948 – 2964.
139. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 148 – 173.
140. M. Narayanam, T. Handa, P. Sharma, S. Jharja, P. K. Muthe, P. K. Dappili, R. P. Shah, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 191 – 217.
141. M. I. Walash, F. Belal, N. El-Enany, M. Eid, R. N. El-Shaheny, *Luminescence* **26** (2011) 670 – 679.

142. N. A. El Ragehy, A. M. Badawey, S. Z.-El Khateeb, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28** (2002) 1041 – 1053.
143. J. Gibbons, D. Sardella, D. Duncan, R. Pike, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2007) 1191 – 1192.
144. J. Hong, J. C. Shah, M. D. McGonagle, *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 2703 – 2716.
145. J.-A. Do, E. Noh, S.-B. Yoon, J. H. Lee, S.-K. Park, S. Mandava, S. Y. Baek, J. Lee, *Arch. Pharm. Res.* **40** (2017) 736 – 745.
146. A. Ghosal, S. Gupta, R. Ramanathan, Y. Yuan, X. Lu, A.-D. Su, N. Alvarez, S. Zbaida, S. K. Chowdhury, K. B. Alton, *Drug Metab. Lett.* **3** (2009) 162 – 170.
147. R. Ramanathan, A.-D. Su, N. Alvarez, N. Blumenkratz, S. K. Chowdhury, K. B. Alton, J. Patrick, *Anal. Chem.* **72** (2000) 1352 – 1359.
148. N. Picard, D. Dridi, F.-L. Sauvage, N. A. Boughattas, P. Marquet, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 2209 – 2217.

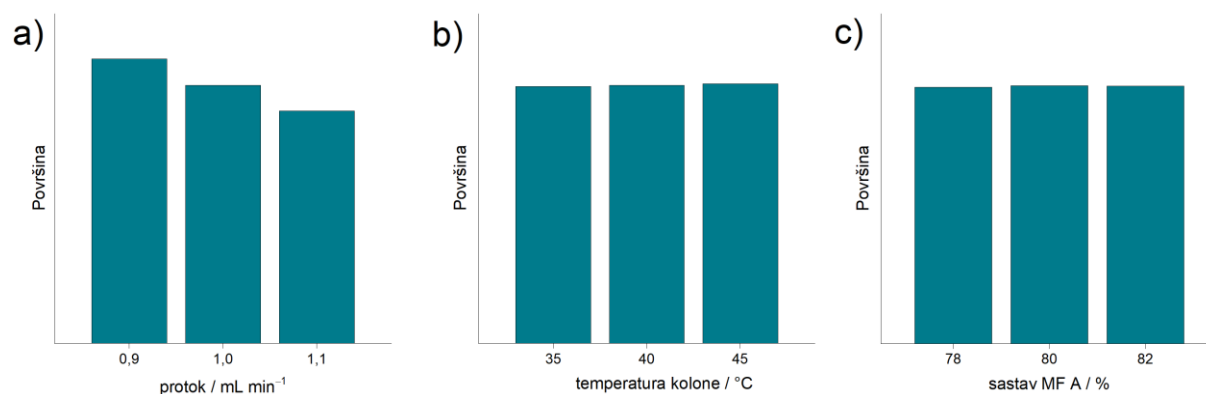
§ 8. DODATAK

Tablica D1. Validacijski parametri metoda UV-Vis i HPLC korištenih prilikom ispitivanja poboljšanja topljivosti LOR

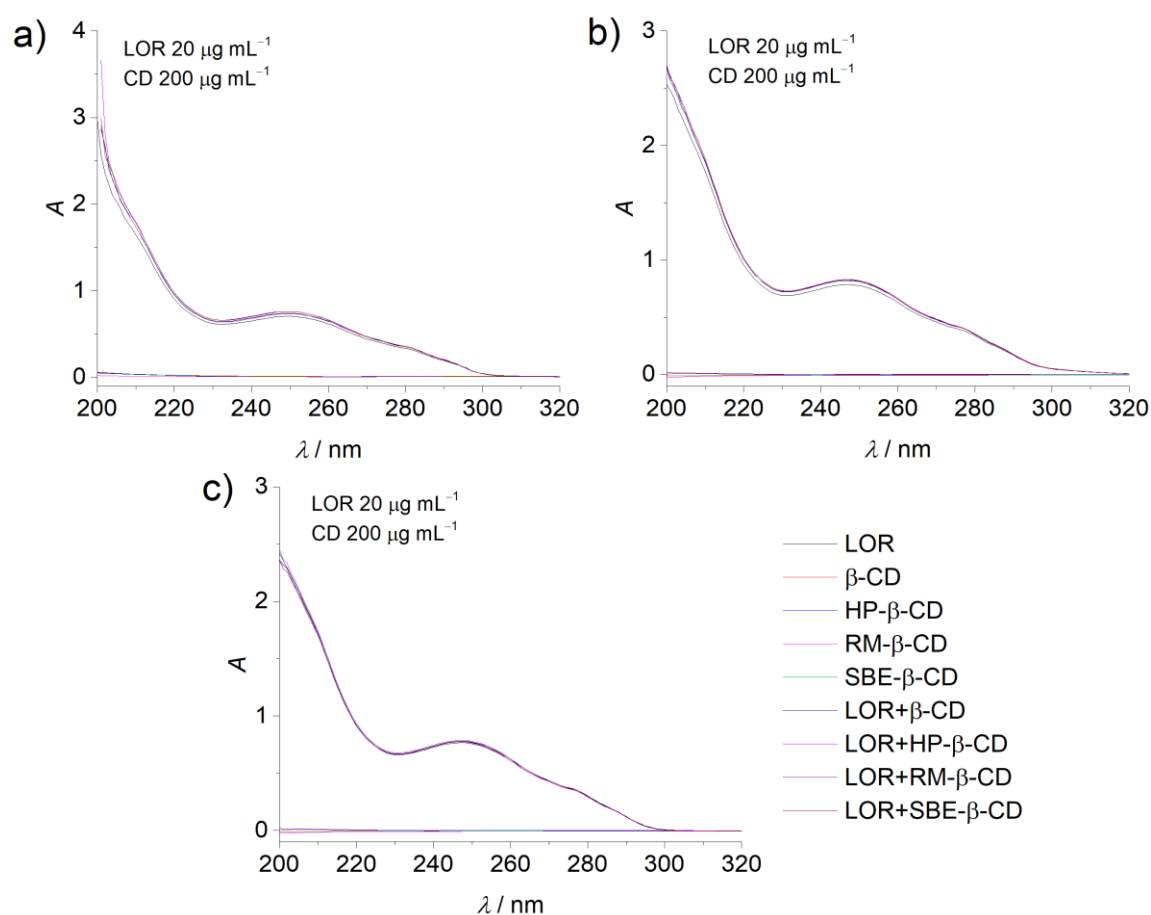
	UV-Vis			HPLC
	voda	SDM (pH 4,5)	SIM (pH 6,8)	
Linearnost	$y = 0,048x - 0,034$ $R^2 = 0,9993$	$y = 0,039x - 0,021$ $R^2 = 0,9991$	$y = 0,039x - 0,019$ $R^2 = 0,997$	$y = 43,27x - 6,05$ $R^2 = 0,9996$
Raspon / $\mu\text{g mL}^{-1}$	5 – 25	2 – 25	2 – 25	0,2 – 20
LOD / $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,67	0,45	0,55	0,019
LOQ / $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,02	1,36	1,67	0,057
Točnost / %	99,55 – 99,69	104,82 – 109,27	93,63 – 100,22	97,79 – 107,95
Preciznost	$\text{RSD} \leq 3,43$	$\text{RSD} \leq 0,99$	$\text{RSD} \leq 4,20$	$\text{RSD} \leq 0,8$
Preciznost instrumenta	$\text{RSD} \leq 1,45$	$\text{RSD} \leq 0,13$	$\text{RSD} \leq 0,26$	$\text{RSD} \leq 0,22$
Međupreciznost	$\text{RSD} \leq 1,39$	$\text{RSD} \leq 4,43$	$\text{RSD} \leq 3,91$	$\text{RSD} \leq 3,40$



Slika D1. Robusnost spektrofotometrijske metode određivanja loratadina: a) utjecaj sastava otapala; b) utjecaj valne duljine



Slika D2. Robusnost kromatografske metode određivanja loratadina: a) utjecaj protoka; b) utjecaj temperature kolone; c) utjecaj sastava mobilne faze



Slika D3. Utjecaj β -CD i njegovih derivata na UV-Vis spektar LOR u vodi (a), simuliranom duodenalnom mediju (b) i simuliranom intestinalnom mediju; $\gamma(\text{LOR}) = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\gamma(\text{CD}) = 200 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tablica D2. Izračunate i izmjerene vrijednosti m/z iz MS spektra otopine SBE- β -CD ($c = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), otapalo MeOH:voda 1:1

DS	Ion	Izmjereni m/z	Izračunati m/z	Pogreška / ppm
4	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	838,2173	838,2164	1,07
	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	558,4777	558,4752	4,48
	$[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$	418,6089	418,6046	10,27
	$[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^{2-}$	849,2063	849,2068	-0,59
	$[\text{M}-4\text{H}+\text{Na}]^{3-}$	565,8049	565,8020	5,13
	$[\text{M}-4\text{H}+2\text{Na}]^{2-}$	860,1977	860,1978	-0,12
5	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	906,2273	906,2261	1,32
	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	603,8177	603,815	4,47
	$[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$	452,6143	452,6094	10,83
	$[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^{2-}$	917,2168	917,2165	0,33
	$[\text{M}-4\text{H}+\text{Na}]^{3-}$	611,1440	611,1418	3,6
	$[\text{M}-4\text{H}+2\text{Na}]^{2-}$	928,2059	928,2075	-1,72
	$[\text{M}-5\text{H}+3\text{Na}]^{2-}$	939,1965	939,1985	-2,13
6	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	974,2351	974,2359	-0,82
	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	649,1572	649,1548	3,7
	$[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$	486,6185	486,6143	8,63
	$[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^{2-}$	985,2269	985,2262	0,71
	$[\text{M}-4\text{H}+\text{Na}]^{3-}$	656,4850	656,4816	5,18
	$[\text{M}-5\text{H}+\text{Na}]^{4-}$	492,1139	492,1092	9,55
	$[\text{M}-4\text{H}+2\text{Na}]^{2-}$	996,2164	996,2172	-0,80
	$[\text{M}-5\text{H}+3\text{Na}]^{2-}$	1007,2069	1007,2082	-1,29
	$[\text{M}-6\text{H}+4\text{Na}]^{2-}$	1018,1990	1018,1992	-0,20
7	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	1042,2465	1042,2456	0,86
	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	694,4962	694,4946	2,30
	$[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$	520,6237	520,6191	8,84
	$[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^{2-}$	1053,2349	1053,2360	-1,04
	$[\text{M}-5\text{H}+\text{Na}]^{4-}$	526,1187	526,1141	8,74
	$[\text{M}-4\text{H}+2\text{Na}]^{2-}$	1064,2288	1064,2269	1,79
	$[\text{M}-5\text{H}+3\text{Na}]^{2-}$	1075,2164	1075,2179	-1,40
	$[\text{M}-6\text{H}+4\text{Na}]^{2-}$	1086,2021	1086,2089	-6,26

Tablica D3. Izračunate i izmjerene vrijednosti m/z iz MS spektra otopine LOR:SBE- β -CD, $c(\text{LOR}) = 2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{SBE-}\beta\text{-CD}) = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, otapalo MeOH:voda 1:1

DS	Ion	Izmjereni m/z	Izračunati m/z	Error / ppm
3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1609,3764	1609,3811	-2,92
	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	1631,3562	1631,3631	-4,23
	$[\text{M}-\text{Na}+2\text{H}]^+$	1587,3980	1587,3992	-0,76
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^+$	1565,4137	1565,4172	-2,24
4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1767,3806	1767,3825	-1,08
	$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	884,1952	884,1949	0,34
	$[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$	906,1775	906,1768	0,77
	$[\text{M}-\text{Na}+2\text{H}]^+$	1745,3924	1745,4005	-4,64
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^+$	1723,4139	1723,4186	-2,73
	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^+$	1701,4324	1701,4366	-2,47
5	$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	963,1954	963,1956	-0,21
	$[\text{M}-\text{Na}+2\text{H}]^+$	1903,4025	1903,4019	0,32
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^+$	1881,4156	1881,4199	-2,29
	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^+$	1859,4337	1859,4380	-2,31
	$[\text{M}-4\text{Na}+5\text{H}]^+$	1837,4492	1837,4561	-3,76
	$[\text{M}-\text{Na}+2\text{H}]^{2+}$	952,2045	952,2046	-0,11
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^{2+}$	941,2135	941,2136	-0,11
	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^{2+}$	930,2235	930,2226	0,97
6	$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	1042,1932	1042,1962	-2,88
	$[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$	1064,1737	1064,1782	-4,23
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^+$	2039,4192	2039,4213	-1,03
	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^+$	2017,4388	2017,4394	-0,30
	$[\text{M}-4\text{Na}+5\text{H}]^+$	1995,4487	1995,4574	-4,36
	$[\text{M}-5\text{Na}+6\text{H}]^+$	1973,4670	1973,4755	-4,31
	$[\text{M}-\text{Na}+2\text{H}]^{2+}$	1031,2047	1031,2053	-0,58
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^{2+}$	1020,2143	1020,2143	0,00
	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^{2+}$	1009,2241	1009,2233	0,79
	$[\text{M}-4\text{Na}+5\text{H}]^{2+}$	998,2330	998,2323	0,70
7	$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	1121,1989	1121,1969	1,78
	$[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$	1143,1834	1143,1789	3,94
	$[\text{M}-\text{Na}+2\text{H}]^+$	2219,4079	2219,4046	1,49
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^+$	2197,4218	2197,4227	-0,41
	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^+$	2175,4353	2175,4407	-2,48
	$[\text{M}-4\text{Na}+5\text{H}]^+$	2153,4506	2153,4588	-3,81
	$[\text{M}-5\text{Na}+6\text{H}]^+$	2131,4712	2131,4768	-2,63
	$[\text{M}-\text{Na}+2\text{H}]^{2+}$	1110,2077	1110,2059	1,62
	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^{2+}$	1099,2159	1099,2150	0,82
	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^{2+}$	1088,2222	1088,2240	-1,65
	$[\text{M}-4\text{Na}+5\text{H}]^{2+}$	1077,2333	1077,2330	0,28

Tablica D4. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:HP- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 mljevenog 60 min pri 15 Hz, ukupna masa uzorka 2,5 g

	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,43	134,86	80,861	100,03
10 min	132,41	134,48	68,106	84,57
20 min	130,89	134,09	62,843	78,03
30 min	129,21	133,72	64,745	80,39
40 min	128,7	132,83	61,833	76,78
50 min	128,18	132,37	60,162	74,70
60 min	127,83	132,03	53,602	66,56

Tablica D5. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:HP- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 mljevenog 50 min pri 15 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

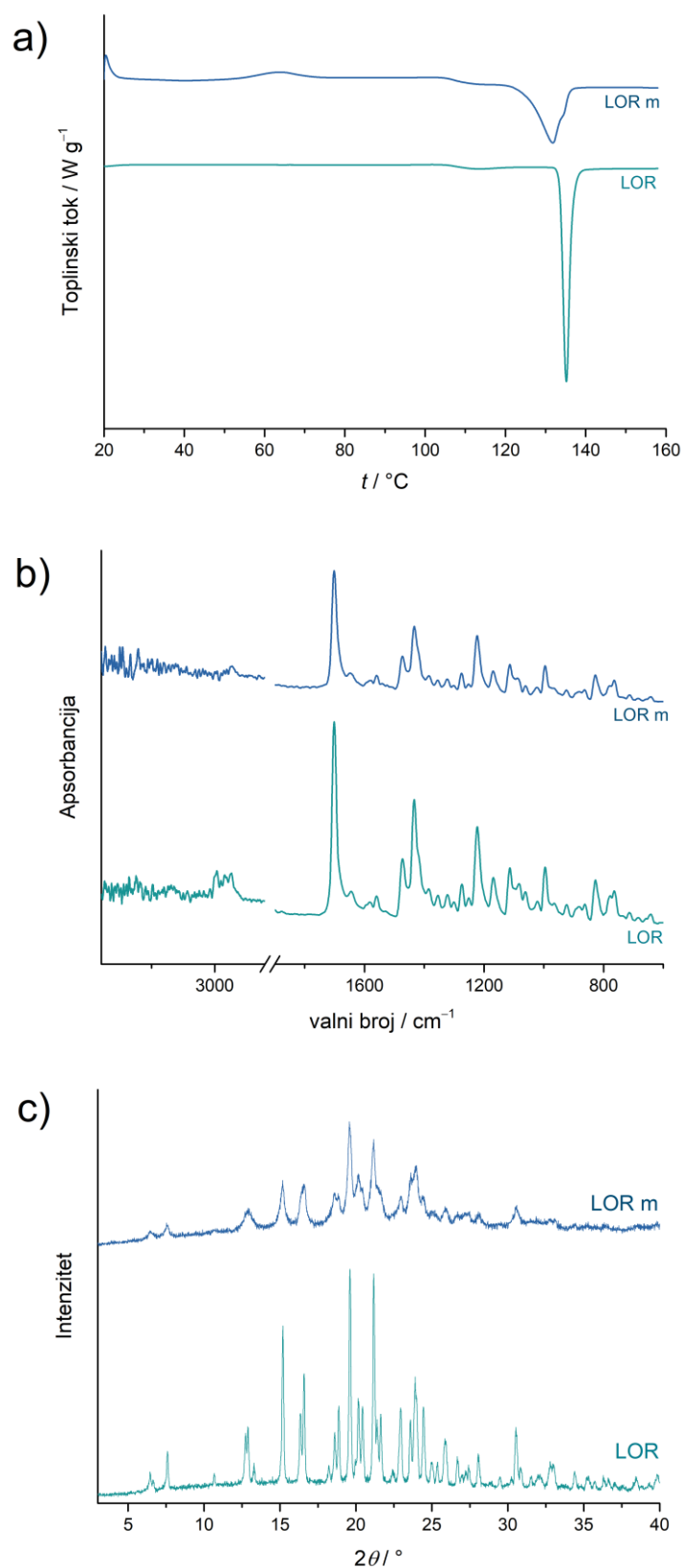
	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,43	134,86	80,861	100,03
10 min	129,55	134,17	56,753	70,47
20 min	128,44	132,25	52,525	65,22
30 min	127,33	131,65	50,463	62,66
40 min	126,38	131,03	41,382	51,38
50 min	125,63	130,74	31,192	38,73

Tablica D6. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:HP- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,43	134,86	80,861	100,03
10 min	125,97	130,92	43,186	53,62
20 min	124,54	129,96	17,437	21,65
30 min	123,32	129,38	5,685	7,06
40 min	0	0	0	0
50 min	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0

Tablica D7. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:HP- β -CD stehiometrijskog omjera 1:2 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	t_1 / °C	t_2 / °C	ΔH / J g ⁻¹	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,42	134,89	76,888	95,47
10 min	126,27	130,80	20,121	24,98
20 min	122,83	129,80	3,599	4,47
30 min	0	0	0	0
40 min	0	0	0	0
50 min	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0



Slika D4. DSC krivulje (a), ATR FT-IR spektri (b) i difraktogrami (c) netretiranog (LOR) i mljevenog (LOR m) loratadina

Tablica D8. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH_{norm}) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR: β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	t_1 / °C	t_2 / °C	ΔH_{norm} / J g ⁻¹	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,59	134,94	88,524	109,92
10 min	127,62	131,62	34,911	43,35
20 min	126,7	130,72	12,976	16,11
30 min	121,85	130,18	5,246	6,51
40 min	131,28	130,27	0,401	0,5
50 min	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0

Tablica D9. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH_{norm}) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR: β -CD stehiometrijskog omjera 1:2 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	t_1 / °C	t_2 / °C	ΔH_{norm} / J g ⁻¹	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,74	135,06	113,050	140,37
10 min	125,05	131,01	19,342	24,02
20 min	124,27	129,63	8,092	10,05
30 min	123,61	128,57	1,536	1,91
40 min	0	0	0	0
50 min	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0

Tablica D10. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH_{norm}) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:RM- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	t_1 / °C	t_2 / °C	ΔH_{norm} / J g ⁻¹	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	132,63	134,71	89,858	111,58
10 min	115,56	122,28	2,664	3,31
20 min	0	0	0	0
30 min	0	0	0	0
40 min	0	0	0	0
50 min	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0

Tablica D11. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH_{norm}) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:RM- β -CD stehiometrijskog omjera 1:2 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{norm}} / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	132,03	134,53	59,824	74,28
10 min	0	0	0	0
20 min	0	0	0	0
30 min	0	0	0	0
40 min	0	0	0	0
50 min	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0

Tablica D12. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH_{norm}) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:SBE- β -CD stehiometrijskog omjera 1:1 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{norm}} / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,5	134,83	67,613	83,96
10 min	127,07	131,48	36,389	45,18
20 min	120,89	130,21	17,166	21,31
30 min	119,5	130,82	12,648	15,70
40 min	124,49	131,61	4,149	5,15
50 min	126,28	131,45	1,855	2,30
60 min	0	0	0	0

Tablica D13. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH_{norm}) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u uzorku smjese LOR:SBE- β -CD stehiometrijskog omjera 1:2 mljevenog 60 min pri 25 Hz, ukupna masa uzorka 1 g

	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{norm}} / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
LOR	133,56	134,82	80,535	100
Fizička smjesa	133,46	134,73	54,575	67,77
10 min	121,76	130,23	20,763	25,78
20 min	127,89	127,91	2,660	3,30
30 min	0	0	0	0
40 min	0	0	0	0
50 min	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0

Tablica D14. Temperatura početka signala taljenja (t_1) i maksimuma taljenja (t_2), entalpije taljenja (ΔH_{norm}) i udjeli kristalne frakcije loratadina (RDC) u binarnim sustavima LOR:CD stehiometrijskih omjera 1:1 i 1:2 pripremljenih sušenjem raspršivanjem.

	$t_1 / ^\circ\text{C}$	$t_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{norm}} / \text{J g}^{-1}$	RDC / %
LOR: β -CD 1:1	121,64	129,26	8,501	10,56
LOR: β -CD 1:2	0	0	0	0
LOR:HP- β -CD 1:1	125,38	129,41	8,681	10,78
LOR:HP- β -CD 1:2	0	0	0	0
LOR:RM- β -CD 1:1	0	0	0	0
LOR:RM- β -CD 1:2	0	0	0	0
LOR:SBE- β -CD 1:1	127,14	130,66	7,141	8,87
LOR:SBE- β -CD 1:2	127,79	130,98	20,113	24,97

Tablica D15. Asignacija karakterističnih IR vrpca LOR u binarnim sustavima LOR:CD pripremljenih sušenjem raspršivanjem (sd) i u uzorcima fizičkih smjesa (pm) binarnih sustava LOR:CD u stehiometrijskim omjerima 1:1 i 1:2.

Asignacija	LOR	LOR:β-CD				LOR:HP-β-CD			
		1:1 pm	1:1 sd	1:2 pm	1:2 sd	1:1 pm	1:1 sd	1:2 pm	1:2 sd
v(C=O)	1702	1700	1697	1699	1697	1702	1696	1700	1697
v(C=O)	-	-	1677	-	1669	-	1676	-	1676
v(C=N)	1648	1647	1654	1647	1652	1651	1653	1650	1654
v(C=C)	1473	1472	1473	1472	1471	1473	1473	1470	1471
v(C=C)	1433	1432	1437	1432	1438	1436	1435	1432	1438
v(C-O)	1223	1222	1232	1223	1236	1224	1232	1223	1235
Asignacija	LOR	LOR:RM-β-CD				LOR:SBE-β-CD			
		1:1 pm	1:1 sd	1:2 pm	1:2 sd	1:1 pm	1:1 sd	1:2 pm	1:2 sd
v(C=O)	1702	1700	1694	1700	1697	1699	1693	1700	1697
v(C=O)	-	-	1679	-	1681	-	1674	-	1669
v(C=N)	1648	1649	1653	1650	1652	1649	1652	1649	1651
v(C=C)	1473	1471	1472	1470	1471	1472	1476	1473	1473
v(C=C)	1433	1433	1435	1433	1440	1432	1434	1433	1434
v(C-O)	1223	1222	1229	1221	1229	-	-	1220	-

Tablica D16. Analitički povrat za binarne sustave LOR:CD 1:1 i 1:2 pripremljene sušenjem raspršivanjem

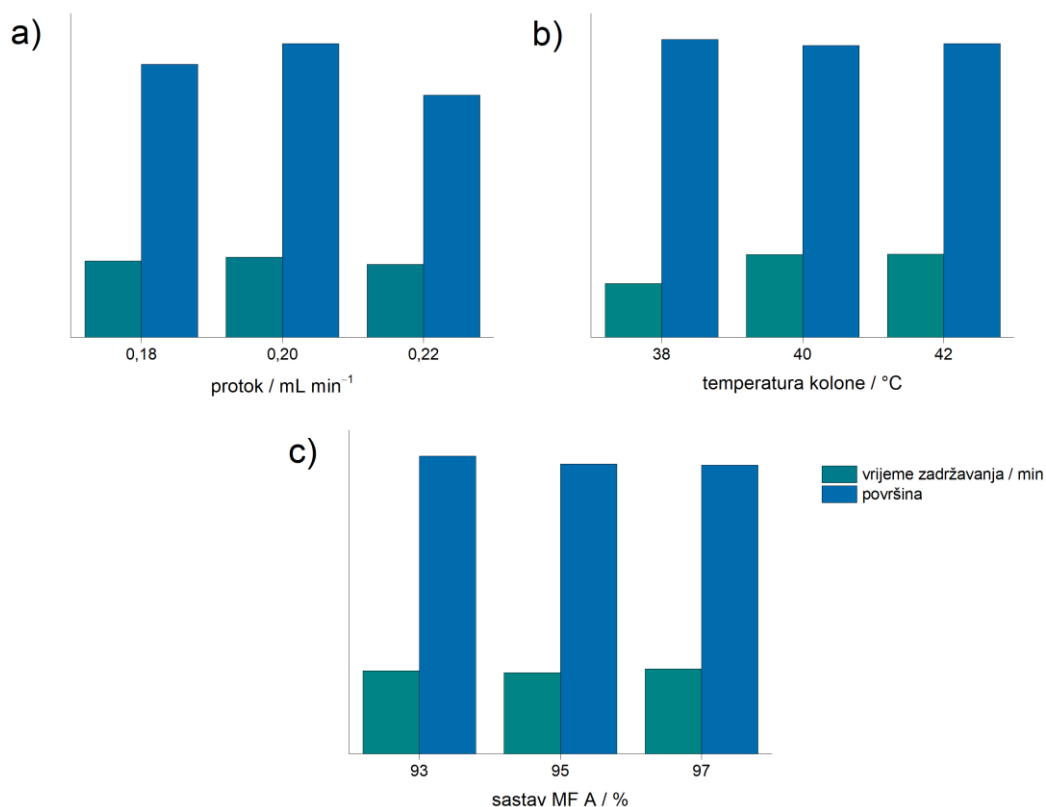
	$m(\text{LOR}+\text{CD}) / \text{g}$	$m(\text{prikupljeni uzorak}) / \text{g}$	Analitički povrat / %
LOR: β -CD 1:1	2,5	1,34	53,6
LOR: β -CD 1:2	2,5	1,44	57,6
LOR:HP- β -CD 1:1	2,5	1,42	56,8
LOR:HP- β -CD 1:2	2,5	1,48	59,2
LOR:RM- β -CD 1:1	2,5	1,34	53,6
LOR:RM- β -CD 1:2	2,5	1,22	48,8
LOR:SBE- β -CD 1:1	2,5	1,60	64
LOR:SBE- β -CD 1:2	2,50	1,55	62

Tablica D17. Validacija metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda za određivanje LOR u prisutnosti razgradnih produkata na koloni Zorbax Eclipse Plus C18

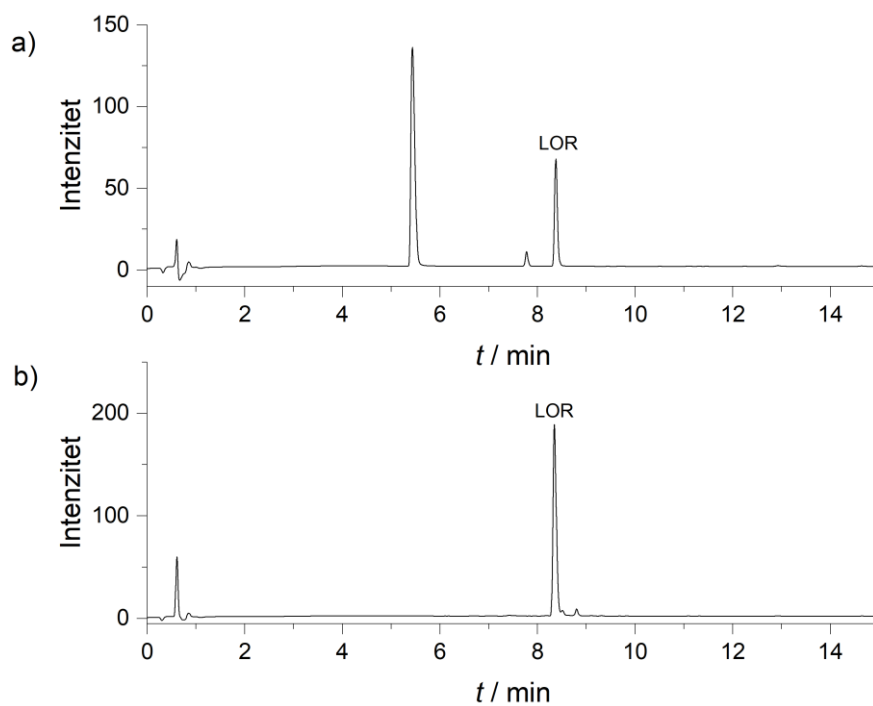
Parametri validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat	Zadovoljava kriterije DA/NE
Linearnost			
Koeficijent korelacije	$r \geq 0,995$	0,9988	DA
Preciznost			
Preciznost injektiranja (vrijeme zadržavanja)	$RSD \leq 5 \%$		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,07 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,8 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,05 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 50,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,04 %	DA
Preciznost injektiranja (površina)	$RSD \leq 5 \%$		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,36 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,8 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,20 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 50,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,56 %	DA
Ponovljivost metode	$RSD \leq 5 \%$		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	3,70 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,8 \mu\text{g mL}^{-1}$	4,20 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 50,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	3,96 %	DA
Međupreciznost	$RSD \leq 5 \%$		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	1,59 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,8 \mu\text{g mL}^{-1}$	4,54 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 50,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	3,33 %	DA

Tablica D17. (Nastavak)

Parametri validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat	Zadovoljava kriterije DA/NE
Točnost			
Iskorištenje	90 – 110 %		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$(103,01 \pm 2,50) \%$	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,8 \mu\text{g mL}^{-1}$	$(96,81 \pm 3,92) \%$	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 50,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	$(97,11 \pm 3,87) \%$	DA
Specifičnost/selektivnost	Metoda mora biti u stanju detektirati analit u prisutnosti razgradnih produkata		DA
Radno područje	informacija	$(5 - 50) \mu\text{g mL}^{-1}$	
Granica detekcije	informacija	$(0,61 \pm 0,06) \mu\text{g mL}^{-1}$	
Granica kvantifikacije	informacija	$(1,86 \pm 0,19) \mu\text{g mL}^{-1}$	



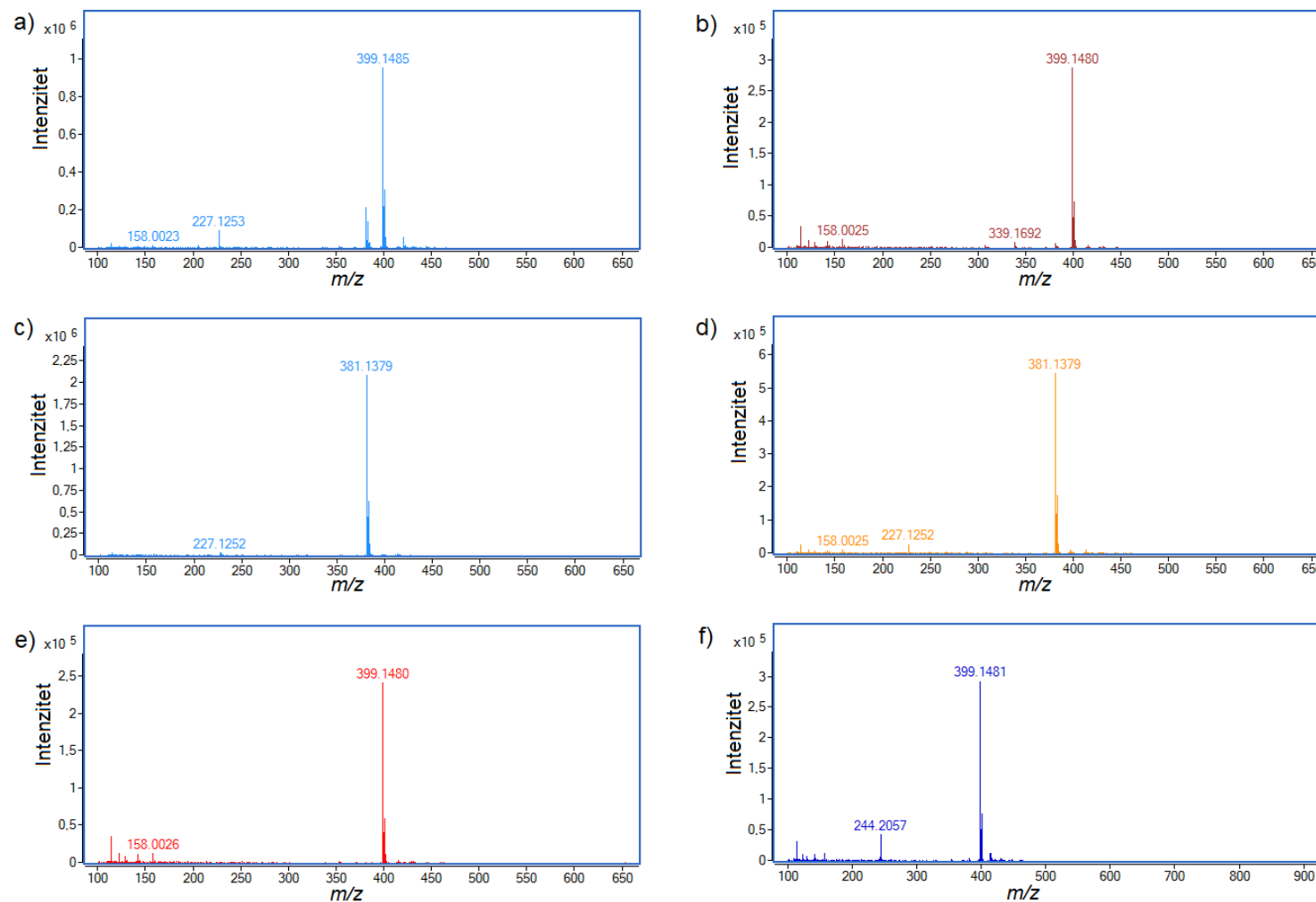
Slika D5. Ispitivanje robusnosti metode UHPLC-DAD za određivanje LOR u prisutnosti razgradnih produkata; utjecaj malih promjena protoka (a), temperature kolone (b) i početnog sastava mobilne faze (c) na vrijeme zadržavanja i površinu kromatografskog pika LOR



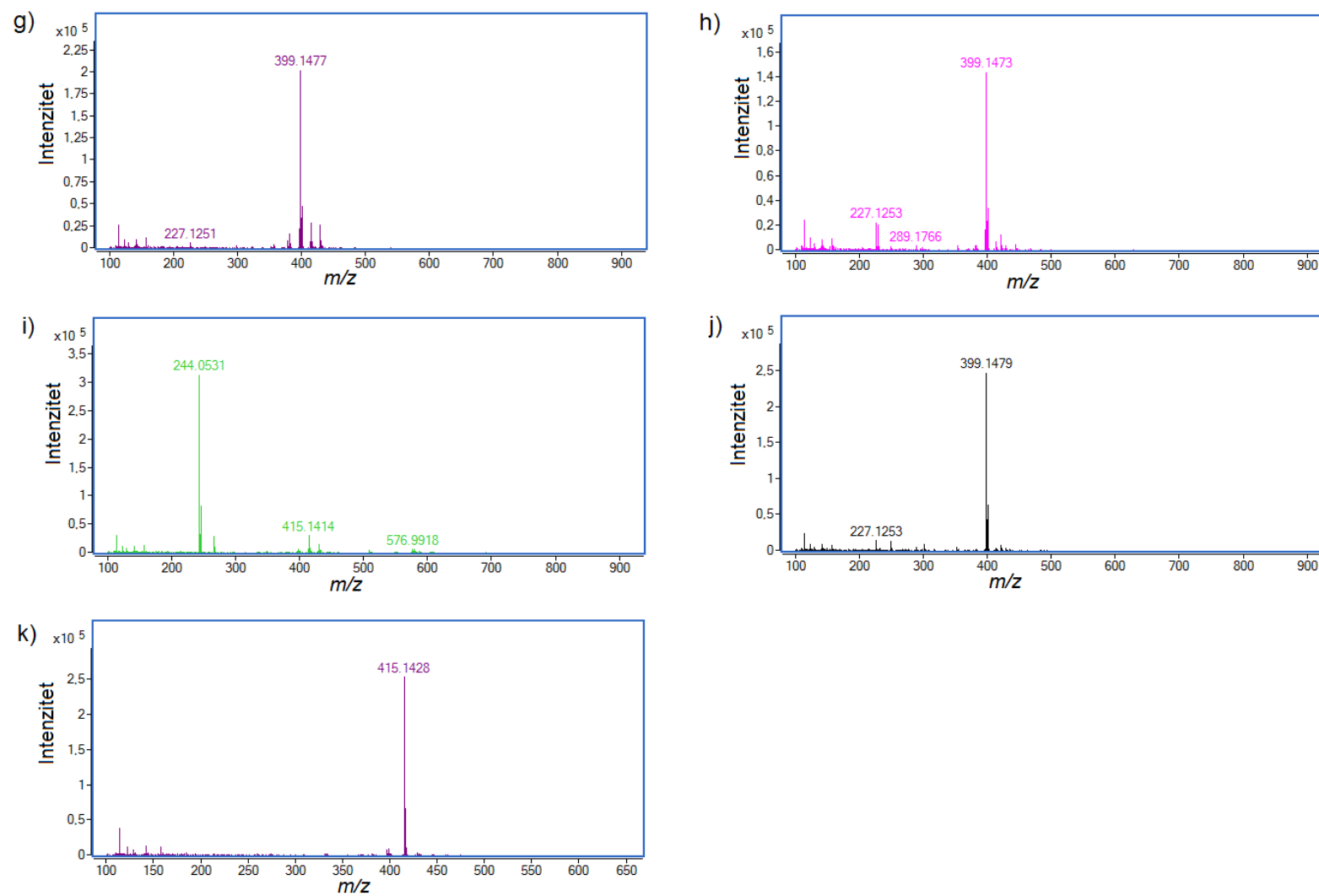
Slika D6. Selektivnost metode UHPLC-DAD za određivanje LOR u prisutnosti razgradnih produkata; razgradnja LOR u prisutnosti NaOH (a) i H_2O_2 (b) pri 80°C , nakon 8 h razgradnje

Tablica D18. Pikovi uočeni u kromatogramima uzoraka LOR i LOR:CD pripremljenih mljevenjem nakon 8 sati razgradnje pri hidrolitičkim i oksidativnim uvjetima, na sobnoj temperaturi i pri 80 °C

Uzorak	HCl		NaOH		H ₂ O ₂	
	sobna	80 °C	sobna	80 °C	sobna	80 °C
LOR	LOR	LOR, DP1		LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP5
LOR:β-CD 1:1	LOR	LOR, DP1	LOR, DP1	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP3–DP6, DP8, DP10, DP12, DP13
LOR:β-CD 1:2	LOR	LOR, DP1	LOR, DP1	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP3, DP8, DP10, DP12, DP13
LOR:HP-β-CD 1:1	LOR	LOR, DP1	LOR, DP1	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP3–DP6, DP8–DP13
LOR:HP-β-CD 1:2	LOR	LOR	LOR, DP1	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP5, DP9
LOR:RM-β-CD 1:1	LOR	LOR, DP1	LOR, DP1	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP3–DP5, DP8–DP10, DP13
LOR:RM-β-CD 1:2	LOR	LOR, DP1	LOR	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP3, DP5, DP13
LOR:SBE-β-CD 1:1	LOR	LOR	LOR	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP3, DP5
LOR:SBE-β-CD 1:2	LOR	LOR	LOR	LOR, DP1, DP2	LOR, DP5	LOR, DP8, DP9



Slika D7. ESI(+) MS spektri razgradnih produkata LOR nastalih nakon osam sati oksidativne razgradnje uzorka LOR:HP- β -CD 1:1 uz zagrijavanje: DP3 (a), DP4 (b), DP5 (c), DP6 (d), DP7 (e), DP8 (f), DP9 (g), DP10 (h), DP11 (i), DP12 (j) i DP13 (k)



Slika D7. (nastavak)

Tablica D19. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektra iona $[M + H]^+$ loratadina (m/z 383,1545). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

LOR m/z 383,1545 t_R 8,5 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
383,1543	100	383,1539	100	383,1526	15,70	383,1521	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_2 + H]^+$
-	-	-	-	339,1621	2,55	-	-
337,1107	2,40	337,1121	53,22	337,1122	100	337,1108	$[C_{20}H_{18}ClN_2O]^+$
-	-	-	-	322,0867	1,84	-	-
-	-	-	-	302,1408	1,57	-	-
-	-	294,1043	1,96	294,1047	17,41	294,1050	$[C_{19}H_{17}ClN]^+$
-	-	-	-	292,0885	1,41	-	-
-	-	282,1045	1	282,1045	7,318	282,1050	$[C_{18}H_{17}ClN]^+$
-	-	-	-	281,0969	12,89	-	-
-	-	-	-	280,0888	3,42	280,0893	$[C_{18}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	279,0806	2,78	-	-
-	-	267,0809	1,52	267,0815	29,92	267,0815	$[C_{17}H_{14}ClN]^{*+}$
-	-	-	-	266,0728	3,00	-	-
-	-	259,1357	1,37	259,136	18,63	259,1361	$[C_{19}H_{17}ClN]^{*+}$
-	-	-	-	258,1272	3,09	-	-
-	-	-	-	253,0649	1,02	-	-
-	-	-	-	229,0647	1,01	-	-
-	-	-	-	228,0567	1,07	228,0580	$[C_{14}H_{11}ClN]^+$

Tablica D20. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP1 (m/z 311,1328). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP1 m/z 311,1328 t_R 5,6 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
311,1324	100	311,1315	23,52	-	-	311,1310	$[C_{19}H_{19}ClN_2 + H]^+$
294,1046	6,07	294,1053	54,35	294,1049	21,78	294,1050	$[C_{19}H_{17}ClN]^+$
-	-	-	-	292,0888	4,07	-	-
282,1042	1,9	282,1050	29,27	282,105	21,77	282,1050	$[C_{18}H_{17}ClN]^+$
-	-	-	-	281,0965	1,92	-	-
-	-	280,0886	1,02	280,0888	4,19	280,0893	$[C_{18}H_{15}ClN]^+$
-	-	279,0809	3,62	279,0812	13,45	-	-
-	-	267,0807	1,5	267,0812	11,44	267,0815	$[C_{17}H_{14}ClN]^{*+}$
-	-	-	-	266,0729	2,15	-	-
259,1360	13,87	259,1374	100	259,1368	100	259,1361	$[C_{19}H_{17}ClN]^{*+}$
-	-	258,1278	5,57	258,1280	20,34	-	-
-	-	-	-	253,0651	2,07	-	-
-	-	-	-	247,1350	1,4	-	-
-	-	-	-	244,1118	1,76	-	-
-	-	-	-	243,1040	2,09	-	-

Tablica D21. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP2 (m/z 369,1364). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP2 m/z 369,1377 t_R 7,9 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
369,1388	100	369,1378	100	369,1360	11,95	369,1364	$[C_{21}H_{21}ClN_2O_2 + H]^+$
337,1100	1,73	337,1110	59,72	337,1110	100	337,1108	$[C_{20}H_{18}ClN_2O]^+$
-	-	-	-	322,0857	1,59	-	-
-	-	-	-	302,1408	1,75	-	-
-	-	294,1041	1,9	294,1041	12,31	294,1050	$[C_{19}H_{17}ClN]^+$
-	-	-	-	292,0880	1,61	-	-
-	-	-	-	282,1043	5,02	282,1050	$[C_{18}H_{17}ClN]^+$
-	-	-	-	281,0964	13,65	-	-
-	-	-	-	280,0885	4,16	280,0893	$[C_{18}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	279,0807	2,71	-	-
-	-	267,0808	1,54	267,0812	31,11	267,0815	$[C_{17}H_{14}ClN]^{*+}$
-	-	-	-	266,0729	3,42	-	-
-	-	-	-	259,1355	12,59	259,1361	$[C_{19}H_{17}ClN]^{*+}$
-	-	-	-	258,1274	2,84	-	-
-	-	-	-	253,0650	1,43	-	-
-	-	-	-	229,0647	1,26	-	-
-	-	-	-	228,0577	1,02	228,0580	$[C_{14}H_{11}ClN]^+$
-	-	-	-	140,0697	1,3	-	-
-	-	-	-	88,0388	1,13	-	-

Tablica D22. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP3 (m/z 399,1470). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP3 m/z 399,1484 t_R 8,6 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
399,1483	100	399,1473	9,41	399,1492	1,46	399,1470	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_3 + H]^+$
381,1376	70,93	381,1374	100	381,1361	35,96	381,1364	$[C_{22}H_{21}ClN_2O_2 + H]^+$
-	-	369,1360	1,81	369,1350	1,78	-	-
353,1051	5,77	353,1055	26,88	353,1052	55,57	353,1057	$[C_{20}H_{18}ClN_2O_2]^+$
-	-	-	-	352,0978	3,72	-	-
-	-	-	-	346,1663	2,25	-	-
-	-	335,0942	5,44	335,0942	17,86	335,0951	$[C_{20}H_{16}ClN_2O]^+$
-	-	310,0989	2,32	310,0989	6,03	310,0999	$[C_{19}H_{17}ClNO]^+$
-	-	309,1148	2,8	309,1150	18,43	309,1153	$[C_{19}H_{17}ClN_2 + H]^+$
-	-	-	-	308,1070	2,89	-	-
-	-	-	-	307,0990	4,24	-	-
-	-	-	-	300,1254	3,72	-	-
-	-	-	-	298,0985	2,3	-	-
-	-	292,0882	9,75	292,0887	69,96	292,0893	$[C_{19}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	281,0923	1,25	-	-
-	-	280,0887	7,78	280,0889	100	280,0893	$[C_{18}H_{15}ClN]^+$
-	-	279,0805	1,12	279,0805	25,48	-	-
-	-	-	-	278,0734	5,12	-	-
-	-	-	-	277,0659	3,77	-	-
-	-	-	-	267,0808	9,45	267,0815	$[C_{17}H_{14}ClN]^{*+}$
-	-	-	-	266,0728	11,65	-	-
-	-	257,1191	2,46	257,1194	30,53	257,1204	$[C_{19}H_{15}N]^{*+}$
-	-	-	-	256,1108	5,37	-	-
-	-	-	-	256,0880	4,86	-	-
255,0801	1,05	255,0809	12,55	255,0809	70,82	-	-
-	-	254,0732	1,44	254,0731	13,26	-	-
-	-	245,1198	1,17	245,1199	27,66	-	-
-	-	-	-	245,0590	1,94	-	-
-	-	244,1120	2,11	244,1119	27,42	-	-
-	-	-	-	244,0515	3,81	-	-
-	-	-	-	243,1047	1,98	-	-
-	-	242,0723	2,73	242,0730	27,21	-	-
-	-	-	-	231,1018	2,52	-	-
-	-	-	-	229,0652	2,87	-	-
-	-	-	-	228,0574	8,2	228,0580	$[C_{14}H_{11}ClN]^+$
-	-	-	-	219,1042	2,86	-	-
-	-	-	-	154,0866	2,52	-	-
-	-	-	-	126,0547	1,86	-	-
-	-	-	-	80,0494	1,82	-	-

Tablica D23. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP4 (m/z 399,1470). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP4 m/z 399,1482 t_R 7,02 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
399,1485	100	399,1475	47,89	399,1462	4,46	399,1470	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_3 + H]^+$
381,1366	9,19	381,1376	100	381,1367	100	381,1364	$[C_{22}H_{21}ClN_2O_2 + H]^+$
-	-	353,1047	4,4	353,1048	30,12	353,1057	$[C_{20}H_{18}ClN_2O_2]^+$
-	-	-	-	352,0975	1,25	-	-
-	-	-	-	335,0943	9,19	335,0951	$[C_{20}H_{16}ClN_2O]^+$
-	-	310,0983	1,95	310,0988	15,25	310,0999	$[C_{19}H_{17}ClNO]^+$
-	-	309,1146	1	309,1150	20,34	309,1153	$[C_{19}H_{17}ClN_2 + H]^+$
-	-	-	-	307,0987	2,4	-	-
-	-	-	-	300,1260	1,3	-	-
-	-	-	-	298,0983	4,08	-	-
-	-	-	-	296,0832	2,08	-	-
-	-	292,0879	3,79	292,0888	60,75	292,0893	$[C_{19}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	282,1044	7,07	282,1050	$[C_{18}H_{17}ClN]^+$
-	-	-	-	281,0981	1,19	-	-
-	-	280,0882	1,17	280,0891	23,62	280,0893	$[C_{18}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	279,0803	6,86	-	-
-	-	-	-	278,0710	1,3	-	-
-	-	-	-	277,0652	1,49	-	-
-	-	-	-	275,1287	2,03	-	-
-	-	-	-	267,0806	5,03	267,0815	$[C_{17}H_{14}ClN]^{*+}$
-	-	-	-	266,0727	4,68	-	-
-	-	-	-	257,1194	8,78	257,1204	$[C_{19}H_{15}N]^{*+}$
-	-	-	-	256,1116	1,41	-	-
-	-	-	-	256,0522	7,27	-	-
-	-	-	-	245,1192	5,65	-	-
-	-	-	-	244,1114	4,86	-	-
-	-	-	-	231,1035	1,8	-	-
-	-	-	-	230,0730	1,18	-	-
-	-	-	-	229,0646	10,03	-	-
-	-	228,0571	1,63	228,0575	25,37	228,0580	$[C_{14}H_{11}ClN]^+$
-	-	-	-	214,0397	2,56	-	-
-	-	-	-	154,0857	1,04	-	-
-	-	-	-	152,0701	1,96	-	-
-	-	-	-	108,0805	2,28	-	-
-	-	-	-	80,0495	4,64	-	-

Tablica D24. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP5 (m/z 381,1364). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP5 m/z 381,1374 t_R 8,9 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
381,1385	100	381,1385	100	381,1365	39,97	381,1364	$[C_{22}H_{21}ClN_2O_2 + H]^+$
-	-	353,1058	6,02	353,1053	15,69	353,1057	$[C_{20}H_{17}ClN_2O_2 + H]^+$
-	-	-	-	352,0983	1,95	-	-
-	-	-	-	346,1684	1,07	-	-
-	-	335,0944	2,6	335,0948	15,71	335,0951	$[C_{20}H_{16}ClN_2O]^+$
-	-	309,1153	3,62	309,1155	36,67	309,1153	$[C_{19}H_{17}ClN_2 + H]^+$
-	-	-	-	308,1079	2	-	-
-	-	-	-	307,0994	5,34	-	-
-	-	-	-	300,1259	2,42	-	-
-	-	292,0890	9,77	292,0893	100	292,0893	$[C_{19}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	290,0716	1,63	-	-
-	-	280,0886	3	280,0892	71,46	280,0893	$[C_{18}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	279,0804	18,85	-	-
-	-	-	-	278,0730	3,25	-	-
-	-	-	-	277,0655	3,25	-	-
-	-	-	-	274,1455	1,63	-	-
-	-	-	-	267,0807	5,65	267,0815	$[C_{17}H_{14}ClN]^+$
-	-	-	-	266,0730	11,95	-	-
-	-	-	-	258,1279	1,08	-	-
-	-	257,1193	1,3	257,1198	27,68	257,1204	$[C_{19}H_{15}N]^+$
-	-	-	-	256,1113	5,19	-	-
-	-	-	-	245,1197	18,92	-	-
-	-	-	-	244,1120	12,65	-	-
-	-	-	-	243,1045	1,14	-	-
-	-	-	-	231,1037	6,31	-	-
-	-	-	-	230,0726	1,91	-	-
-	-	229,0646	1,52	229,0650	21,14	-	-
-	-	228,0575	4,41	228,0576	58,47	228,0580	$[C_{14}H_{11}ClN]^+$
-	-	-	-	214,0415	9,24	-	-
-	-	-	-	193,0882	2,98	-	-
-	-	-	-	192,0800	1,51	-	-
-	-	-	-	152,0704	1,67	-	-
-	-	-	-	108,0805	3,76	-	-
-	-	-	-	80,0495	12,53	-	-
-	-	-	-	56,0495	1,25	-	-

Tablica D 25. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP6 (m/z 381,1364). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP6 <i>m/z</i> 381,1376 <i>t</i> _R 9,2 min							
10 V		20 V		30 V		<i>m/z</i> teor.	Asignacija
<i>m/z</i>	R.I.	<i>m/z</i>	R.I.	<i>m/z</i>	R.I.		
381,1379	100	381,1376	100	381,1362	34,11	381,1364	[C ₂₂ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ + H] ⁺
-	-	353,1052	4,58	353,1053	18,12	353,1057	[C ₂₀ H ₁₈ ClN ₂ O ₂ + H] ⁺
-	-	-	-	352,0973	3,07	-	-
-	-	335,0947	2,1	335,0945	17,37	335,0951	[C ₂₀ H ₁₆ ClN ₂ O] ⁺
-	-	309,1144	3,38	309,1151	38	309,1153	[C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ + H] ⁺
-	-	-	-	308,1075	3,04	-	-
-	-	-	-	307,0993	5,65	-	-
-	-	-	-	306,0696	1,12	-	-
-	-	-	-	300,1259	2,13	-	-
-	-	292,0890	8,95	292,0888	100	292,0893	[C ₁₉ H ₁₅ ClN] ⁺
-	-	-	-	290,0714	2,24	-	-
-	-	-	-	282,1028	1,07	-	-
-	-	-	-	281,0945	1,11	-	-
-	-	280,0883	3,52	280,0890	80,27	280,0893	[C ₁₈ H ₁₅ ClN] ⁺
-	-	-	-	279,0806	23,59	-	-
-	-	-	-	278,0732	3,8	-	-
-	-	-	-	277,0643	4,91	-	-
-	-	-	-	274,1453	2,05	-	-
-	-	-	-	273,1387	1,28	-	-
-	-	-	-	267,0809	7,84	267,0815	[C ₁₇ H ₁₄ ClN] ^{•+}
-	-	-	-	266,0731	14,26	-	-
-	-	-	-	258,1285	1,2	-	-
-	-	257,1192	1,59	257,1193	29,64	257,1204	[C ₁₉ H ₁₅ N] ^{•+}
-	-	-	-	256,1117	6,2	-	-
-	-	-	-	253,0647	1,35	-	-
-	-	-	-	245,1196	21,73	-	-
-	-	-	-	244,1118	14,7	-	-
-	-	-	-	243,1028	1,12	-	-
-	-	-	-	231,1037	7,84	-	-
-	-	-	-	230,0728	2,5	-	-
-	-	229,0643	1,65	229,0645	27,11	-	-
-	-	228,0573	4,47	228,0574	64,58	228,0580	[C ₁₄ H ₁₁ ClN] ⁺
-	-	-	-	214,0411	12,67	-	-
-	-	-	-	193,0879	4,09	-	-
-	-	-	-	192,0799	1,95	-	-
-	-	-	-	152,0701	2,14	-	-
-	-	-	-	124,0381	1,2	-	-
-	-	-	-	108,0803	3,45	-	-
-	-	-	-	80,0494	15,5	-	-

Tablica D 26. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP7 (m/z 399,1470). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP7 m/z 399,1478 t_R 7,2 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
399,1478	100	399,1476	100	399,1467	17,25	399,1470	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_3 + H]^+$
-	-	381,1344	2,41	381,1353	1,23	-	-
-	-	-	-	355,1568	2,32	-	-
353,1045	1,66	353,1049	33,06	353,1055	100	353,1057	$[C_{20}H_{18}ClN_2O_2]^+$
-	-	-	-	338,0824	2	-	-
-	-	310,0985	1,6	310,0996	14,88	310,0999	$[C_{19}H_{17}ClNO]^+$
-	-	-	-	298,0993	6,45	298,0999	$[C_{18}H_{17}ClNO]^+$
-	-	-	-	297,0914	6,51	-	-
-	-	-	-	296,0841	2,56	296,0842	$[C_{18}H_{15}ClNO]^+$
-	-	-	-	295,0759	2,14	-	-
-	-	-	-	292,0890	1,53	-	-
-	-	283,0763	1,25	283,0753	20,69	283,0764	$[C_{17}H_{14}ClNO]^{\bullet+}$
-	-	-	-	282,0677	2,45	-	-
-	-	-	-	275,1303	10,1	275,1310	$[C_{19}H_{17}NO]^{\bullet+}$
-	-	-	-	274,1214	2,52	-	-
-	-	-	-	246,1286	1,88	-	-
-	-	-	-	244,0522	1,29	244,0529	$[C_{14}H_{11}ClNO]^+$

Tablica D 27. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP8 (m/z 399,1470). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP8 m/z 399,1486 t_R 7,6 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
399,1477	100	399,1472	100	399,1466	15,08	399,1470	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_3 + H]^+$
381,1353	1,32	381,1367	4,22	-	-	-	-
-	-	-	-	355,1564	2,7	-	-
353,1052	1,48	353,1053	39,86	353,1055	100	353,1057	$[C_{20}H_{18}ClN_2O_2]^+$
-	-	-	-	338,0799	1,38	-	-
-	-	-	-	318,1351	1,22	-	-
-	-	310,0999	1,74	310,0989	15,48	310,0999	$[C_{19}H_{17}ClNO]^+$
-	-	-	-	308,1833	1,61	-	-
-	-	-	-	298,0991	5,97	298,0999	$[C_{18}H_{17}ClNO]^+$
-	-	-	-	297,0900	8,08	-	-
-	-	-	-	296,0824	2,74	296,0842	$[C_{18}H_{15}ClNO]^+$
-	-	-	-	295,0771	3,61	-	-
-	-	283,0759	1,44	283,0750	17,16	283,0764	$[C_{17}H_{14}ClNO]^{*+}$
-	-	-	-	282,0673	2,03	-	-
-	-	275,1292	1,03	275,1300	11,52	275,1310	$[C_{19}H_{17}NO]^{*+}$
-	-	-	-	274,1221	3,44	-	-
-	-	-	-	257,1209	1,08	257,1204	$[C_{19}H_{15}N]^{*+}$

Tablica D 28. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP9 (m/z 399,1470). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP9 m/z 399,1476 t_R 8,2 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
399,1443	100	399,1464	100	399,1461	21,65	399,1470	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_3 + H]^+$
381,1353	4,11	381,1360	6,92	381,1347	2,25	-	-
-	-	-	-	371,1149	1,33	-	-
-	-	-	-	355,1581	4,99	-	-
353,1046	5,03	353,1046	45	353,1053	100	353,1057	$[C_{20}H_{18}ClN_2O_2]^+$
-	-	-	-	338,0815	1,71	-	-
-	-	335,0959	1,25	-	-	-	-
-	-	-	-	327,1234	1,74	-	-
-	-	-	-	318,1355	1,78	-	-
-	-	310,0989	2,45	310,0980	12,08	310,0999	$[C_{19}H_{17}ClNO]^+$
-	-	298,0962	1,97	298,0993	5,02	298,0999	$[C_{18}H_{17}ClNO]^+$
-	-	-	-	297,0909	8,97	-	-
-	-	-	-	296,0829	2,39	296,0842	$[C_{18}H_{15}ClNO]^+$
-	-	-	-	295,0758	2,24	-	-
-	-	293,0960	1,24	293,0954	2,88	-	-
-	-	-	-	292,0893	2,54	-	-
-	-	283,0772	2,13	283,0750	21,93	283,0764	$[C_{17}H_{14}ClNO]^{++}$
-	-	-	-	282,0986	1,06	-	-
-	-	-	-	282,0675	4,24	-	-
-	-	-	-	275,1298	8,26	275,1310	$[C_{19}H_{17}NO]^{++}$
-	-	-	-	269,0549	1,39	-	-
-	-	-	-	262,1199	1,08	-	-
-	-	-	-	260,1048	1,06	-	-
-	-	-	-	245,1223	2,36	-	-
-	-	-	-	244,0520	1,93	244,0529	$[C_{14}H_{11}ClNO]^+$

Tablica D 29. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP10 (m/z 399,1470). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP10 m/z 399,1487 t_R 9,9 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
399,1479	100	399,1475	88,87	399,1462	3,9	399,1470	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_3 + H]^+$
-	-	-	-	355,1563	1,56	-	-
353,1050	3,43	353,1057	100	353,1056	100	353,1057	$[C_{20}H_{18}ClN_2O_2]^+$
-	-	-	-	338,0811	8,09	-	-
-	-	310,0978	4,53	310,0990	16,06	310,0999	$[C_{19}H_{17}ClNO]^+$
-	-	-	-	308,0838	1,32	-	-
-	-	298,1000	1,66	298,0986	7,45	298,0999	$[C_{18}H_{17}ClNO]^+$
-	-	297,0914	2,23	297,0914	17,07	-	-
-	-	-	-	296,0832	2,75	296,0842	$[C_{18}H_{15}ClNO]^+$
-	-	-	-	295,0761	3,24	-	-
-	-	-	-	283,0756	6,95	283,0764	$[C_{17}H_{14}ClNO]^{*+}$
-	-	-	-	282,0674	6,03	-	-
-	-	-	-	275,1300	6,24	275,1310	$[C_{19}H_{17}NO]^{*+}$
-	-	-	-	274,1219	3,43	-	-
-	-	-	-	262,1217	1,73	-	-
-	-	-	-	245,0617	1,48	-	-
-	-	-	-	244,0524	3,77	244,0529	$[C_{14}H_{11}ClNO]^+$

Tablica D30. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP11 (m/z 244,0524). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP11 m/z 244,0532 t_R 7,5 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
244,0529	100	244,0529	100	244,0525	100	244,0524	$[C_{14}H_{10}ClNO + H]^+$
-	-	-	-	229,0283	1,21	-	-
-	-	-	-	227,0484	1,53	227,0496	$[C_{14}H_9ClN + H]^+$
-	-	-	-	226,0417	8,28	226,0424	$[C_{14}H_9ClN]^+$
-	-	216,0574	3,6	216,0570	25,92	216,0575	$[C_{13}H_{10}ClN + H]^+$
-	-	-	-	215,0487	1,56	-	-
-	-	-	-	215,0247	1,84	-	-
-	-	214,0416	1,42	214,0417	22,28	214,0424	$[C_{13}H_9ClN]^+$
-	-	-	-	209,0838	2,44	-	-
-	-	-	-	208,0751	3,02	-	-
-	-	-	-	201,0337	10,04	-	-
-	-	-	-	199,0298	2,26	-	-
-	-	-	-	191,0716	4,28	191,0735	$[C_{14}H_9N]^+$
-	-	-	-	181,0877	8,85	181,0886	$[C_{13}H_{10}N + H]^+$
-	-	180,0802	1,35	180,0807	32,2	180,0813	$[C_{13}H_{10}N]^+$
-	-	-	-	179,0723	1,88	179,0735	$[C_{13}H_9N]^+$
-	-	-	-	178,0647	1,04	-	-
-	-	-	-	166,0649	1,22	-	-
-	-	-	-	153,0698	1,59	-	-
-	-	-	-	152,0613	1,86	-	-
-	-	-	-	149,0157	1,15	-	-
-	-	-	-	137,0149	1,65	137,0158	$[C_8H_6Cl]^+$
-	-	-	-	125,0151	1,02	-	-
-	-	-	-	117,0568	1,12	-	-
-	-	-	-	104,0497	9,13	104,0500	$[C_7H_6N]^+$
-	-	-	-	78,0335	1,93	78,0344	$[C_5H_4N]^+$

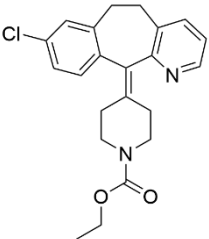
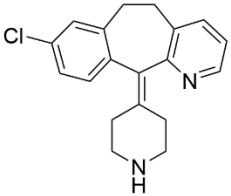
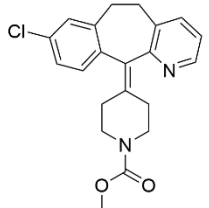
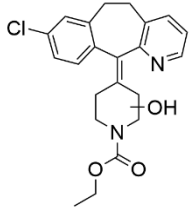
Tablica D31. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP12 (m/z 399,1479). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP12 m/z 399,1474 t_R 9,4 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
399,1472	100	399,1469	61,65	399,1467	4,32	399,1470	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_3 + H]^+$
353,1051	5,56	353,1054	100	353,1053	100	353,1057	$[C_{20}H_{18}ClN_2O_2]^+$
-	-	-	-	323,0969	1,46	-	-
-	-	310,0981	2,48	310,0998	4,92	310,0999	$[C_{19}H_{17}ClNO]^+$
-	-	-	-	310,0790	2,7	-	-
-	-	298,0983	2,29	298,0989	6,45	-	-
-	-	-	-	297,0894	1,98	-	-
-	-	-	-	296,0839	2,44	296,0842	$[C_{18}H_{15}ClNO]^+$
-	-	-	-	293,0948	1,3	-	-
-	-	-	-	292,0882	2,19	292,0893	$[C_{19}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	283,0739	1,62	-	-
-	-	-	-	282,0674	3,78	-	-
-	-	-	-	280,0882	1,74	-	-
-	-	-	-	274,1222	1,5	-	-
-	-	-	-	268,0890	1,8	-	-
-	-	-	-	267,0816	3,81	-	-
-	-	-	-	266,0720	1,54	-	-
-	-	-	-	258,1259	2,84	-	-
-	-	-	-	257,1211	1,79	-	-
-	-	256,0877	3,93	256,0883	38,76	-	-
-	-	-	-	255,0833	1,31	-	-
-	-	-	-	254,0721	6,49	-	-
-	-	-	-	253,0645	4,01	-	-
-	-	-	-	246,1266	1,92	-	-
-	-	-	-	245,1205	4,99	-	-
-	-	-	-	244,1126	1,74	-	-
-	-	-	-	242,0715	1,15	-	-
-	-	-	-	233,1190	1,14	-	-
-	-	-	-	232,1097	1,96	-	-
-	-	-	-	229,0626	1,07	-	-
-	-	228,0574	5,13	228,0568	24,11	228,0580	$[C_{14}H_{11}ClN]^+$
-	-	-	-	219,1024	1,97	-	-
-	-	-	-	214,0391	1,49	-	-
-	-	-	-	193,0883	1,73	-	-
-	-	-	-	192,0788	1,13	-	-
-	-	-	-	102,0543	1,68	-	-
-	-	-	-	98,0228	4	-	-
-	-	-	-	82,0644	1,17	-	-
-	-	-	-	70,0284	5,45	-	-

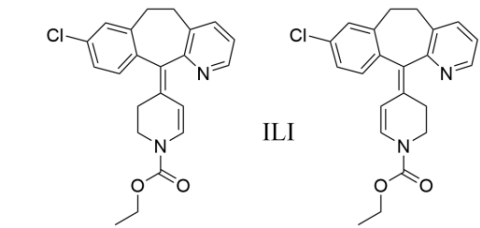
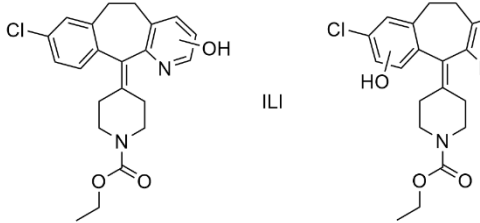
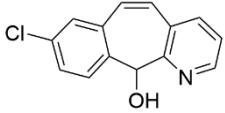
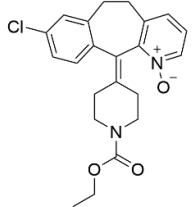
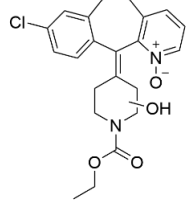
Tablica D32. Izmjerene vrijednosti m/z , relativni intenziteti (RI) i asignacija signala iz MS/MS spektara iona $[M + H]^+$ razgradnog produkta DP13 (m/z 415,1419). ESI(+) ionizacija, kolizijske energije 10 V, 20 V i 30 V

DP13 m/z 415,1431 t_R 6,7 min							
10 V		20 V		30 V		m/z teor.	Asignacija
m/z	R.I.	m/z	R.I.	m/z	R.I.		
415,1433	100	415,1422	87,21	415,1423	3,85	415,1419	$[C_{22}H_{23}ClN_2O_4 + H]^+$
397,1315	8,75	397,1316	100	397,1308	21,59	397,1313	$[C_{22}H_{21}ClN_2O_3 + H]^+$
-	-	385,1310	16,34	385,1307	8,43	-	-
-	-	369,1359	6,61	369,1348	8,99	-	-
-	-	369,1000	4,11	369,0998	8,64	369,1000	$[C_{20}H_{17}ClN_2O_3 + H]^+$
-	-	351,0893	23,41	351,0892	38,04	351,0900	$[C_{20}H_{16}ClN_2O_2]^+$
-	-	339,0886	3,57	339,0893	19,13	-	-
-	-	338,0820	1,31	338,0807	6,71	-	-
-	-	326,0915	1,14	326,0930	2,61	-	-
-	-	325,1079	1,25	325,1090	2,86	325,1102	$[C_{19}H_{17}ClN_2O + H]^+$
-	-	323,0936	5,92	323,0939	29,23	-	-
-	-	308,0832	14,54	308,0838	100	308,0842	$[C_{19}H_{15}ClNO]^+$
-	-	-	-	307,0991	4,3	-	-
-	-	296,0824	1,43	296,0836	7,32	296,0842	$[C_{18}H_{15}ClNO]^+$
-	-	-	-	295,0988	2,85	-	-
-	-	-	-	295,0747	2,85	-	-
-	-	294,0675	6,25	294,0677	10,25	-	-
-	-	-	-	282,0679	3,1	-	-
-	-	-	-	281,0585	2,16	-	-
-	-	280,0883	4,21	280,0886	39,1	280,0893	$[C_{18}H_{15}ClN]^+$
-	-	-	-	278,0716	2,99	-	-
-	-	-	-	273,1131	1,55	273,1154	$[C_{19}H_{15}NO]^+$
-	-	-	-	268,0878	2,94	-	-
-	-	-	-	268,0526	6,38	-	-
-	-	-	-	267,0810	11,05	267,0815	$[C_{17}H_{14}ClN]^+$
-	-	-	-	266,0730	2,54	-	-
-	-	-	-	261,1146	4,04	-	-
-	-	-	-	260,1066	5,3	-	-
-	-	-	-	259,0992	3,49	-	-
-	-	-	-	258,0918	3,04	-	-
-	-	-	-	253,0650	7,55	-	-
-	-	245,1188	2,17	245,1190	35,22	-	-
-	-	-	-	244,1123	6,27	-	-
-	-	-	-	243,1040	2,77	-	-
-	-	229,0650	3,58	229,0651	24,35	-	-
-	-	228,0565	6,45	228,0571	51,36	228,0580	$[C_{14}H_{11}ClN]^+$
-	-	-	-	214,0405	3,42	-	-
-	-	116,0702	4,36	116,0703	12,86	-	-
-	-	-	-	72,0809	3,99	-	-

Tablica D33. Razgradni produkti uočeni nakon prisilne razgradnje loratadina

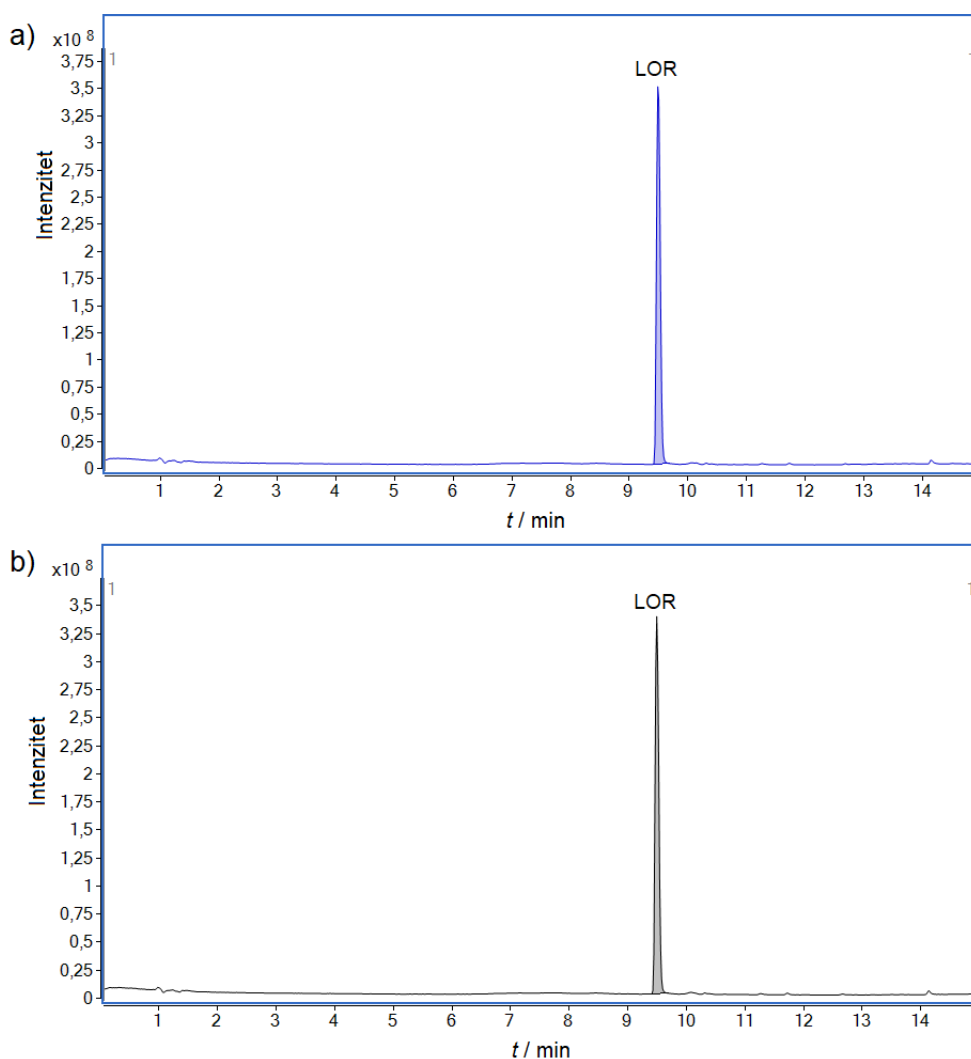
Analit	t_R / min	m/z izmjereni	m/z izračunati	Pogreška / ppm	Predložena struktura
LOR	8,48	383,1534	383,1521	3,39	
DP1	5,56	311,1319	311,1310	2,89	
DP2	7,85	369,1366	369,1364	0,54	
DP3	8,62	399,1485	399,1470	3,76	
DP4	7,01	399,1480		2,51	

Tablica D33. (nastavak)

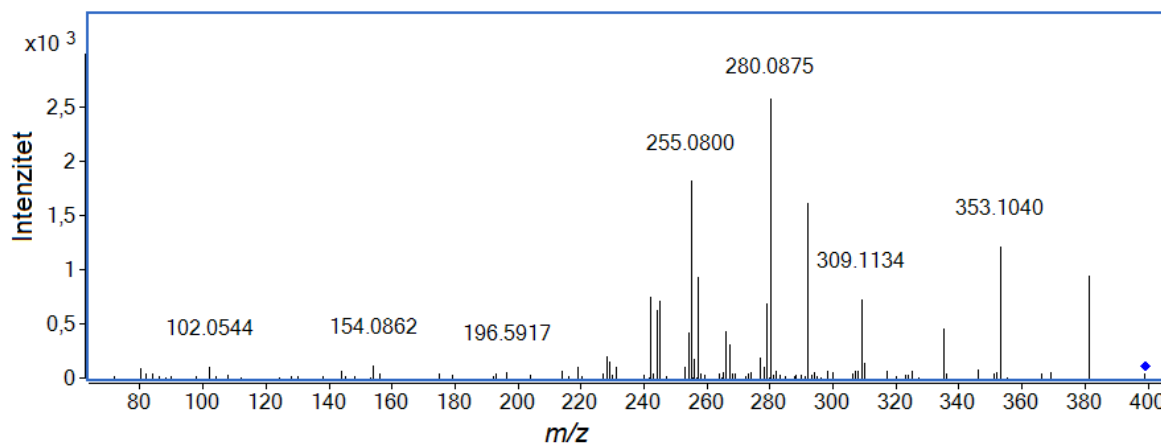
Analit	t_R / min	m/z izmjereni	m/z izračunati	Pogreška / ppm	Predložena struktura
DP5	8,89	381,1379	381,1364	3,94	
DP6	9,19	381,1379		3,94	
DP7	7,14	399,1480	399,1470	2,51	
DP8	7,64	399,1481		2,76	
DP9	8,26	399,1477		1,75	
DP10	9,90	399,1473		0,75	
DP11	7,52	244,0531	244,0524	2,87	
DP12	9,42	399,1479	399,1470	2,25	
DP13	6,72	415,1428	415,1419	2,17	

Tablica D34. Validacija metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda za određivanje LOR u prisutnosti razgradnih produkata na koloni Acquity BEH C18

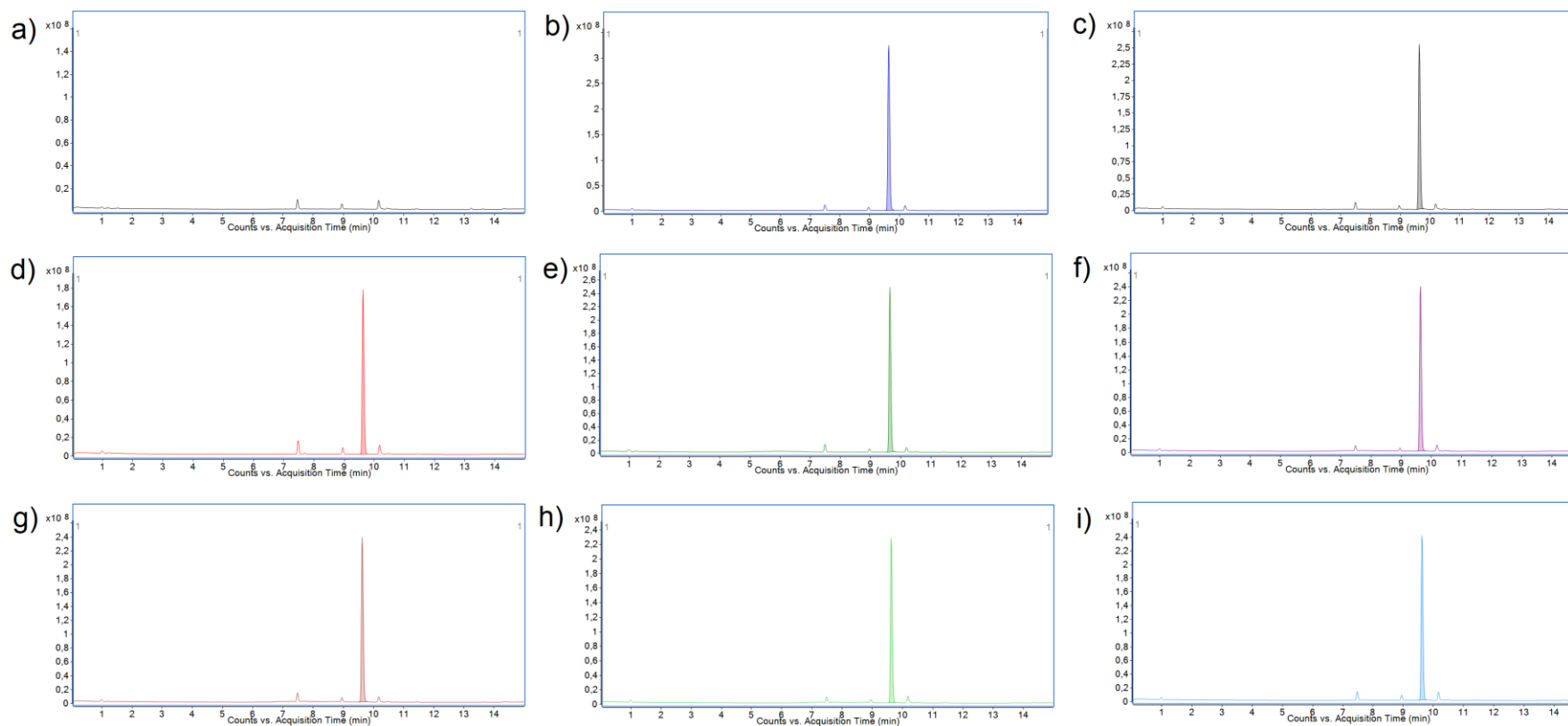
Parametri validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat	Zadovoljava kriterije DA/NE
Linearnost			
Koeficijent korelacije	$R^2 \geq 0,995$	$R^2 = 0,9999$	DA
Preciznost injektiranja (vrijeme zadržavanja)	RSD ≤ 5 %		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,02 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,02 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 49,9 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,01 %	DA
Preciznost injektiranja (površina)	RSD ≤ 5 %		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,35 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,28 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 49,9 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,30 %	DA
Ponovljivost metode	RSD ≤ 5 %		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	2,40 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	4,73 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 49,9 \mu\text{g mL}^{-1}$	1,49 %	DA
Međupreciznost	RSD ≤ 5 %		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,91 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,65 %	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 49,9 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,41 %	DA
Točnost			
Iskorištenje	90 – 110 %		
	$\gamma(\text{LOR}) = 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$(101,25 \pm 2,36) \%$	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$(97,32 \pm 3,72) \%$	DA
	$\gamma(\text{LOR}) = 49,9 \mu\text{g mL}^{-1}$	$(97,39 \pm 0,80) \%$	DA
Specifičnost/selektivnost	Metoda mora biti u stanju detektirati analit u prisutnosti razgradnih produkata		DA
Radno područje	informacija	$(5 - 50) \mu\text{g mL}^{-1}$	
Granica detekcije	informacija	$(0,13 \pm 0,03) \mu\text{g mL}^{-1}$	
Granica kvantifikacije	informacija	$(0,39 \pm 0,08) \mu\text{g mL}^{-1}$	



Slika D8. TIC kromatogrami uzoraka LOR:RM- β -CD 1:1: kontrolni uzorak (a) i uzorak nakon fotorazgradnje (b)



Slika D9. ESI(+) MS/MS spektar iona $[M+H]^+$ razgradnog produkta DP3 (m/z 399,1467). Kolizijska energija od 30 V, uzorak LOR:RM- β -CD 1:1 nakon fotorazgradnje



Slika D10. TIC kromatogrami otapala (a), kontrolnog uzorka LOR (b) te uzoraka nakon 6 mjeseci razgradnje pri ubrzanim uvjetima (40 °C, 75 % RV): LOR (c); LOR: β -CD 1:2 m (d); LOR:HP- β -CD 1:2 m (e); LOR:RM- β -CD 1:1 m (f); LOR:RM- β -CD 1:2 m (g); LOR:RM- β -CD 1:2 sd (h); LOR:SBE- β -CD 1:2 m (i)

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Marijana Pocrnić

Datum rođenja: 01. srpnja 1987.

Mjesto i država rođenja: Zagreb, Hrvatska

e-mail: mpocrnic@chem.pmf.hr

Obrazovanje

2018. – Poslijediplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
2012. – 2015. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
2006. – 2012. Prijediplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Zaposlenja

2017. – **Zavod za analitičku kemiju, Kemijskog odsjeka PMF-a**
2023. – Viši stručni suradnik
2017. – 2023. Stručni suradnik
2015. – 2016. **Nastavni zavod za javno zdravstvo "dr. Andrija Štampar"**
2015. – 2016. Kemičar pripravnik

Suradnik na projektima

2023. – 2027. Projekt Hrvatske zaklade za znanost: *Priprava, karakterizacija i biokompatibilnost novih supramolekulskih kompleksa lijek/ciklodekstrin i lijek/dekstrinske nanospužve s poboljšanim svojstvima* (nositelj: prof. dr. sc. N. Galić)
2021. – Stručni projekt: *Razvoj analitičkih metoda i analize realnih uzoraka* (nositelj: prof. dr. sc. N. Galić)

2018. – 2019. Projekt Hrvatske zaklade za znanost: *Aromatski hidrazoni: sinteza, strukturna analiza, biološka aktivnost i analitička primjena* (nositelj: prof. dr. sc. N. Galić)

Znanstvena i stručna usavršavanja:

- 2022./2023. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu u Grazu, Austrija
2022./2023. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu Semmelweis u Budimpešti, Mađarska
2020./2021. Jednomjesečni boravak na Sveučilištu u Pečuhu, Mađarska
2018./2019. Jednomjesečni boravak na Karlovom sveučilištu u Pragu, Republika Češka
2017./2018. Jednomjesečni boravak na Karlovom sveučilištu u Pragu, Republika Češka

Nastavna djelatnost

Asistent u *Višem praktikumu analitičke kemije 1*

Asistent u *Višem praktikumu analitičke kemije 2*

Asistent u *Općem praktikumu analitičke kemije* (za smjer: biologija i kemija; kemija i biologija i smjer: fizika i kemija; kemija i fizika)

Asistent u praktičnom dijelu kolegija *Analitička kemija* (za smjer: molekularna biologija)

Diplomski radovi

– neposredna voditeljica 11 diplomskih radova:

1. Nika Hošnjak, *Razvoj i validacija metode za analizu meloksikama u prisutnosti njegovih razgradnih produkata*, PMF, Zagreb, 2025.
2. Ivona Božić, *Određivanje razgradnih produkata meloksikama*, PMF, Zagreb, 2025.
3. Natalija Tunjko, *Gama-radiolitička razgradnja loratadina u vodi*, PMF, Zagreb, 2024.
4. Mateja Cader, *Mehanokemijska sinteza i karakterizacija inkluzijskog kompleksa loratadina i hidroksipropil- β -ciklodekstrina*, PMF, Zagreb, 2023.
5. Matea Rukavina, *Razvoj i validacija metode za određivanje loratadina u prisutnosti njegovih razgradnih produkata*, PMF, Zagreb, 2023.
6. Ivana Prkić, *Forsirana razgradnja loratadina i inkluzijskih kompleksa loratadina i ciklodekstrina*, PMF, Zagreb, 2022.
7. Ana-Emina Živko, *Analiza inkluzijskih kompleksa loratadina i ciklodekstrina spektrometrijom masa visokog razlučivanja*, PMF, Zagreb, 2021.
8. Nina Mamić, *Poboljšanje topljivosti loratadina uslijed kompleksiranja s odabranim ciklodekstrinima*, PMF, Zagreb, 2021.

9. Petra Tagliaretti, *Određivanje prazikvantela tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti*, PMF, Zagreb, 2019.
10. Tihana Njegovec, *Identifikacija kompleksnih spojeva galija i aromatskih hidrazona spektrometrijom masa*, PMF, Zagreb, 2019.
11. Snježana Šarić, *Identifikacija kompleksnih spojeva lantanoida i aromatskih hidrazona spektrometrijom masa*, PMF, Zagreb, 2019.

Dužnosti na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta:

- | | |
|---------------|--|
| 2025. | Član organizacijskog odbora međunarodne ljetne škole 23 rd International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Zagreb, Hrvatska |
| 2022. – 2025. | Član Akademskog odbora Prirodoslovne olimpijade Europske unije koja se održala u Hrvatskoj 2025. godine |
| 2021. – | Zamjenica voditeljice <i>Laboratorija za spektrometriju masa</i> osnovanog u sklopu infrastrukturnog projekta <i>Centar izvrsnosti u kemiji</i> (CIUK) |

Popularizacija znanosti

Sudjelovanje na Smotri Sveučilišta 2018. godine.

Sudjelovanje na Otvorenim danima Kemijskog odsjeka 2023. godine.

Suradnica u organizaciji i izvođenju laboratorijskih vježbi za pripremu učenika za Međunarodnu kemijsku olimpijadu 2023. godine.

Dodijeljene nagrade

2025. Godišnja nagrada Kemijskog odsjeka za izvrsnost u publiciranju za 2024. godinu

Znanstveni radovi

1. L. Vrban, I. A. Martinac, M. Hranjec, **M. Pocrnić**, N. Galić, R. Kobetić, R. Vianello, Proton and metal dication affinities of tetracyclic imidazol[4,5-b]pyridine-based molecules: Insights from mass spectrometry and DFT analysis, *Molecules* **30** (2025) 2684
2. L. Štefan, I. Sušan, J. Buljević, M. Roje, M. Jurin, A. Buljan, T. Rinkovec, R. Vianello, **M. Pocrnić**, N. Galić, A. Čikoš, Lifitegrast degradation: Products and pathways, *Pharmaceutics* **17** (2025) 1299
3. **M. Pocrnić**, M. Hoelm, A. Ignaczak, A. Čikoš, A. Budimir, V. Tomišić, N. Galić, Inclusion complexes of loratadine with β -cyclodextrin and its derivatives in solution. Integrated spectroscopic, thermodynamic and computational studies, *J. Mol. Liq.* **410** (2024) 125515
4. J. Kosić-Vukšić, A. Krivohlavek, I. Žuntar, **M. Pocrnić**, N. Galić, Undeclared phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE5Is) in food supplements on the Croatian market

- analyzed by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS), *Microchem. J.* **203** (2024) 110917
5. M. G. Dimitrijević, C. Roschger, K. Lang, A. Zierer, M. G. Paunović, A. D. Obradović, M. M. Matic, **M. Pocrnić**, N. Galić, A. Ćirić, M. D. Joksović, Discovery of a new class of potent pyrrolo [3,4]quinoline-1,3-diones based inhibitors of human dihydroorotate dehydrogenase: Synthesis, pharmacological and toxicological evaluation, *Bioorg. Chem.* **147** (2024) 107359
 6. M. Cvetanovska, **M. Pocrnić**, M. Stefova, N. Galić, J. Petreska Stanoeva, UHPLC-Q-TOF analysis of pyrrolizidine alkaloids in North-Macedonian honey, *Food Addit. Contam. Part B* **17** (2024) 5–15
 7. A. Mandura Jarić, A. Čikoš, **M. Pocrnić**, K. Aladić, S. Jokić, D. Šeremet, A. Vojvodić Cebin, D. Komes, *Teucrium montanum* L. - Unrecognized source of phenylethanoid glycosides: green extraction approach and elucidation of phenolic compounds via NMR and UHPLC-HR MS/MS, *Antioxidants* **12** (2023) 1903
 8. L. Mandić, **M. Pocrnić**, N. Galić, B. Mihaljević, I. Džeba, γ -radiolytic degradation of rosuvastatin in the air-saturated aqueous solution, *Radiat. Phys. Chem.* **208** (2023) 110885
 9. I. Tartaro Bujak, **M. Pocrnić**, K. Blažek, K. Bojanić, P. Trebše, A. T. Lebedev, N. Galić, Radiation-induced degradation of doxazosin: Role of reactive species, toxicity, mineralization and degradation pathways, *J. Water Process. Eng.* **51** (2023) 103401
 10. D. Klarić, **M. Pocrnić**, D. Lež, S. Polović, D. Kontrec, I. Kosalec, A. Budimir, N. Galić, Search for new antimicrobials: spectroscopic, spectrometric, and *in vitro* antimicrobial activity investigation of Ga(III) and Fe(III) complexes with aroylhydrazones, *J. Biol. Inorg. Chem.* **27** (2022) 715–729
 11. T. Kezele Špehar, **M. Pocrnić**, D. Klarić, B. Bertoša, A. Čikoš, M. Jug, J. Padovan, S. Dragojević, N. Galić, Investigation of praziquantel/cyclodextrin inclusion complexation by NMR and LC-HRMS/MS: Mechanism, solubility, chemical stability and degradation products, *Mol. Pharm.* **18** (2021) 4210
 12. **M. Pocrnić**, D. Kontrec, S. Miljanić, Ž. Soldin, A. Budimir, N. Galić, Gallium(III) complexes of aroylhydrazones derived from nicotinic acid hydrazide in solid state and in solution, *J. Mol. Struct.* **1227** (2021) 129564
 13. M. Malý, M. Boublík, **M. Pocrnić**, M. Ansorge, K. Lorinčíková, J. Svobodová, V. Hruška, P. Dubský, B. Gaš, Determination of thermodynamic acidity constants and limiting ionic mobilities of weak electrolytes by capillary electrophoresis using a new free software AnglerFish, *Electrophoresis* **41** (2020) 493–501
 14. **M. Pocrnić***, M. Ansorge, M. Dovhunová, I. Habinovec, E. Tesařová, N. Galić, Chiral separation of beta-blockers by high- performance liquid chromatography and determination of bisoprolol enantiomers in surface waters, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **71** (2020) 56–62

* Autor za korespondenciju

Pozvana predavanja

1. **M. Pocrnić**, N. Galić, *Mogućnosti i primjene LC-QTOF sustava*, Okupljanje korisnika spektrometrije masa u organizaciji tvrtke Alphachrom, Zagreb, Hrvatska, 13.09.2022.

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima i školama

1. A. Budimir, **M. Pocrnić**, N. Galić, *Thermodynamics of the complexation of meloxicam with β -cyclodextrins in aqueous solution*, Adriatic NMR conference, Vodice, Hrvatska, 17.–20.09.2025.
2. N. Galić, **M. Pocrnić**, D. Klarić, A. Čikoš, A. Budimir, M. Hoelm, M. Jug, *Characterization of cyclodextrins complexes with poorly soluble drugs in solution and solid state*, Adriatic NMR conference, Vodice, Hrvatska, 17.–20.09.2025.
3. S. El-Rahmani, **M. Pocrnić**, A. Matencio, F. Caldera, F. Trotta, N. Galić, *Optimization of the pharmaceutical efficacy of loratadine using cyclodextrin-based nanosponge encapsulation*, 8th European Cyclodextrin Conference, Milano, Italija, 09.–12.09.2025.
4. **M. Pocrnić**, M. Jug, N. Galić, *Influence of CDs on loratadine stability: accelerated and photostability studies*, 8th European Cyclodextrin Conference, Milano, Italija, 09.–12.09.2025.
5. L. Štefan, I. Sušanj, M. Roje, M. Jurin, A. Buljan, **M. Pocrnić**, N. Galić, A. Čikoš, *Degradation profiling and in silico toxicity assessment of lifitegrast*, 29th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 7th Symposium Vladimir Prelog, Split, Hrvatska, 02.–05.09.2025.
6. **M. Pocrnić**, M. Jug, N. Galić, *Dissolution rate of loratadine in the presence of β -cyclodextrin and its derivatives*, Euroanalysis 2025, Barcelona, Španjolska, 30.08.–04.09.2025.
7. N. Galić, M. Jug, **M. Pocrnić**, *Effect of β -cyclodextrin and its derivatives on loratadine stability*, Euroanalysis 2025, Barcelona, Španjolska, 30.08.–04.09.2025.
8. I. Tartaro Bujak, D. Klarić, **M. Pocrnić**, K. Bojanić, M. Bujak, B. Lučić, A. Pustak, I. Marić, M. Leskovšek, U. Vrabić Brodnjak et al., *The multifaceted role of ionizing radiation: challenges and perspectives in environmental protection*, 23rd International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Zagreb, Hrvatska, 06.–15.07.2025.
9. D. Klarić, **M. Pocrnić**, N. Galić, *Exploring host:guest interactions in drug-macrocyclic systems using mass spectrometry*, 23rd International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Zagreb, Hrvatska, 06.–15.07.2025.
10. **M. Pocrnić**, M. Jug, N. Galić, *Characterization of loratadine:cyclodextrin binary systems in the solid state*, VI International Summer School on Cyclodextrins, Genova, Italija, 09.–11.06.2025.
11. **M. Pocrnić**, M. Jug, N. Galić, *Preparation and characterization of binary systems of loratadine and β -cyclodextrin and its derivatives in solid state*, Innovation in Chemical Sciences, Zagreb, Hrvatska, 19.–21.11.2024.

12. D. Klarić, **M. Pocrnić**, N. Galić, *Application of mass spectrometry in characterization of drug:β-cyclodextrin systems*, Innovation in Chemical Sciences, Zagreb, Hrvatska, 19.–21.11.2024.
13. J. Košić-Vukšić, A. Krivohlavek, **M. Pocrnić**, N. Galić, I. Žuntar, *Analysis of phosphodiesterase type 5 inhibitors in food supplements using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry*, 5. Međunarodni kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane, Poreč, Hrvatska, 06.–09.11.2024.
14. **M. Pocrnić**, J. Košić-Vukšić, A. Krivohlavek, N. Galić, *Development and validation of liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry method for analysis of phosphodiesterase type 5 inhibitors in food supplements*, 5. Međunarodni kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane, Poreč, Hrvatska, 06.–09.11.2024.
15. K. Remar, **M. Pocrnić**, N. Galić, *Influence of maltodextrin on meloxicam solubility in water and biorelevant media*, 9th Symposium of Chemistry Students, Zagreb, Hrvatska, 11.–12.10.2024.
16. **M. Pocrnić**, D. Klarić, N. Galić, *Drug-cyclodextrin complexes analysed by HR MS*, 2nd International School on Mass spectrometry, Erice, Italija, 09.–14.09.2024.
17. **M. Pocrnić**, N. Galić, *Analysis of loratadine-cyclodextrin complexes by high resolution mass spectrometry*, 22nd International Summer School on Bioanalysis, Prag, Češka Republika, 07.–13.07.2024.
18. A. Čikoš, A. Mandura Jarić, **M. Pocrnić**, *Teucrium montanum L. - Unrecognized Source of Phenylethanoid Glycosides*, The 20th European Magnetic Resonance Congress, Bilbao, Španjolska, 30.06.–04.07.2024.
19. **M. Pocrnić**, N. Galić, *Solubility of loratadine in the presence of cyclodextrins*, 8th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska, 26.–27.04.2024.
20. M. Rukavina, **M. Pocrnić**, N. Galić, *Razvoj i validacija metode za određivanje loratadina u prisutnosti njegovih razgradnih produkata*, 8. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, Hrvatska, 21.10.2023.
21. M. Cader, L. Posavec, **M. Pocrnić**, D. Cinčić, N. Galić, *Mehanokemijska sinteza i karakterizacija inkluzijskog kompleksa loratadina i hidroksipropil-β-ciklodekstrina*, 8. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, Hrvatska, 21.10.2023.
22. I. Tartaro Bujak, **M. Pocrnić**, K. Blažek, K. Bojanić, P. Trebše, A. T. Lebedev, N. Galić, *How efficient is ionizing radiation in the degradation of pharmaceuticals? A doxazosin study*, 32nd Miller Conference on Radiation Chemistry, Korzika, Francuska, 03.–08.06.2023.
23. **M. Pocrnić**, N. Galić, *Effect of cyclodextrins on solubility enhancement of loratadine*, V. Simpozij Supramolekulske kemije, Zagreb, Hrvatska, 8.12.2022.
24. **M. Pocrnić**, I. Tartaro Bujak, N. Galić, *HRMS characterization of doxazosin degradation products generated by gamma irradiation*, 20th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Pečuh, Mađarska, 24.–30.06.2022.
25. **M. Pocrnić**, N. Galić, *Inclusion complexes of meloxicam and selected cyclodextrins in solution and in the solid state*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog, Veli Lošinj, Hrvatska, 05–08.10. 2021.

26. D. Mutavdžić Pavlović, K. Tolić, T. Gazivoda Kraljević, M. Hranjec, L. Racané, **M. Pocrnić**, N. Galić, M. Runje, *Stability of amidino substituted benzothiazole derivatives with antitumor activity*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog, Veli Lošinj, Hrvatska, 05–08.10. 2021.
27. **M. Pocrnić**, N. Galić, *Analiza inkluzijskih kompleksa meloksikama i ciklodekstrina spektroskopijom masa visokog razlučivanja*, 5. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska, 24.–25.04.2021.
28. D. Klarić, **M. Pocrnić**, M. Jug, N. Galić, *Inclusion complexes of praziquantel and β -cyclodextrin and its derivatives*, 19th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Cluj-Napoca, Rumunjska, 08–13. 07. 2019.
29. **M. Pocrnić**, D. Klarić, M. Jug, N. Galić, *Solubilization study of inclusion complexes of praziquantel with β -cyclodextrin and its derivatives by liquid chromatography*, 13th Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine (MSBM), Dubrovnik, Hrvatska, 07–13. 07. 2019.
30. N. Galić, **M. Pocrnić**, D. Kontrec, *Kompleksiranje lantanoida aroilhidrazonima izvedenim iz nikotinohidrazida: određivanje spektrometrijom masa*, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, Hrvatska, 09–12.04. 2019.
31. F. Grgić, H. Rimanić, **M. Pocrnić**, D. Kontrec, A. Budimir, N. Galić, *Kompleksiranja lantanoida aroilhidrazonima izvedenim iz nikotinohidrazida: spektrofotometrijsko određivanje*, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, Hrvatska, 09.–12.04.2019.
32. M. Ansorge, J. Šteflová, **M. Pocrnić**, A. Moldovan, G. Vigh, *Determination of isoelectric points for pI markers in capillary isoelectric focusing*, 18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Komarno, Slovačka, 25.–30.06.2018.
33. **M. Pocrnić**, D. Kontrec, A. Budimir, N. Galić, *Interaction of aromatic hydrazones and selected lanthanides*, 18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Komarno, Slovačka, 25.–30.06.2018.
34. **M. Pocrnić**, M. Dovhunova, M. Ansorge, E. Tesarova, N. Galić, *High performance liquid chromatography method for enantiomeric separation of beta-blockers*, 18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Komarno, Slovačka, 25.–30.06.2018.
35. M. Ivešić, **M. Pocrnić**, A. Krivohlavek, N. Galić, *Determination of ergot alkaloids in animal feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, Food Safety and Quality Congress with International Participation - New Achievements and Future Challenges, Opatija, Hrvatska, 21–24.11.2017.
36. V. Vujčić, A.-M. Domijan, M. Ivešić, **M. Pocrnić**, A. Krivohlavek, M. Peraica, S. Radić Brkanac, *Toxicity of mycotoxin fumonisin B1 to duckweed (*Lemna minor* L.)*, 5th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, Poreč, Hrvatska, 09.–12.10.2016.