

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Olivera S. Marković

**PROUČAVANJE RAVNOTEŽA U
HETEROGENIM SISTEMIMA TRICIKLIČNIH
ANTIDEPRESIVA: UTICAJ AGREGACIJE I
SASTAVA ČVRSTE FAZE NA
RASTVORLJIVOST**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Olivera S. Marković

**STUDY OF EQUILIBRIA IN TRICYCLIC
ANTIDEPRESSANT HETEROGENEOUS
SYSTEMS: INFLUENCE OF AGGREGATION
AND THE SOLID PHASE COMPOSITION ON
SOLUBILITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor:

Dr Tatjana Ž. Verbić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi komisije:

Dr Igor M. Opsenica, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Dr Gordana Popović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane:

Zahvalnica

Veliko hvala Katedri za Analitičku hemiju Hemijskog fakulteta (Univerzitet u Beogradu) i Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (Univerzitet u Beogradu).

Veliku zahvalnost dugujem Dr Tatjani Verbić (Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet) koja me je još kao studenta druge godine pozvala da volontiram u njenoj laboratoriji i od tada bila moj mentor. Njena pomoć, pažnja, znanje i strpljenje omogućili su da danas budem ovde gde jesam.

Zahvaljujem se Dr Igoru Opsenici (Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet) i Dr Gordani Popović (Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet) na svim savetima i sugestijama pruženim tokom izrade i pisanja ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem Dr Alex-u Avdeef-u (*in-ADME* Research, NY, USA) i Dr Abu-u Serajuddin-u (St. John's University, NY, USA) na nepresušnom entuzijazmu, odličnim diskusijama i pomoći koja je doprinela kvalitetu ove doktorske disertacije. Osim toga, Dr Tatjana Verbić i Dr Alex Avdeef osmislili su temu ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem Nemanji Marjanoviću i Brankici Gajić na trudu, zalaganju i vrednom radu tokom izrade svojih završnih radova na osnovnim i master akademskim studijama, koji su deo ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem Milošu Pešiću (Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet) na velikoj pomoći i nesebičnom deljenju svog znanja i iskustva sa mnom.

Zahvaljujem se Dr Iliji Cvijetiću (Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet), Mladenu Đurđeviću (Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet) i ostalim članovima laboratorije 529 na pomoći i podršci tokom svih ovih godina.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici: tati Slobodanu – Bančetu, mami Snežani i seki Mileni. Njihova ljubav i svakodnevna podrška omogućili su da danas budem osoba kakva jesam.

Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima tricikličnih antidepresiva: uticaj agregacije i sastava čvrste faze na rastvorljivost

Sažetak:

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj metode koja će omogućiti tačno i precizno određivanje termodinamičke rastvorljivosti i definisanje ravnoteža u heterogenim sistemima nekih tricikličnih antidepresiva (desipramin, nortriptilin, imipramin i amitriptilin) u prisustvu fosfata i/ili hlorida. Rastvorljivost tricikličnih antidepresiva u zavisnosti od pH vrednosti na 25 ± 1 °C određena je primenom pH-Ramp shake-flask metode, razvijene tokom izrade ove teze. Koncentracije jedinjenja u rastvoru određene su pomoću HPLC-UV/VIS metode. Čvrsta faza analizirana je primenom elementalne analize, termogravimetrijske analize, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i difrakcije X-zraka praha. Kritične micelarne koncentracije imipramina i amitriptilina određene su primenom konduktometrijskih titracija. Degradacija imipramina i amitriptilina u baznoj sredini analizirana je pomoću UV/VIS spektrofotometrije i HPLC-UV/VIS metode. Koncentracione ravnotežne konstante (I_{ref} 0,15 M, 25 °C) – sopstvene rastvorljivosti, proizvodi rastvorljivosti soli, konstante građenja kompleksa i konstante agregacije, izračunate su pomoću programa *pDISOL-X*TM. Primećeno je da desipramin i nortriptilin grade katjonske i anjonske komplekse sa komponentama fosfatnog pufera, dok imipramin i amitriptilin formiraju agregate, što dovodi do povećanja rastvorljivosti tricikličnih antidepresiva. U zavisnosti od sastava suspenzije i dizajna eksperimenta triciklični antidepresivi talože se u obliku hloridnih ili fosfatnih soli ili u molekulskom obliku. Rezultati pokazuju da pH-Ramp shake-flask metoda ima veliki potencijal u proučavanju pH-zavisne rastvorljivosti i da u kombinaciji sa metodama za karakterizaciju čvrste faze može biti veoma korisna u različitim fazama dizajna i razvoja lekova.

Ključne reči: rastvorljivost, pH-Ramp shake-flask metoda, desipramin, nortriptilin, imipramin, amitriptilin, fosfatne soli, hloridne soli, fosfatni kompleksi, agregacija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

Study of equilibria in tricyclic antidepressant heterogeneous systems: influence of aggregation and the solid phase composition on solubility

Abstract:

The aim of this doctoral dissertation was development of the new method for thermodynamic solubility determination which can provide accurate and precise data and description of equilibria in tricyclic antidepressant (desipramine, nortriptyline, imipramine and amitriptyline) heterogeneous systems containing phosphate and/or chloride ions. The solubility of tricyclic antidepressant at 25 ± 1 °C as a function of pH was determined using pH-*Ramp shake-flask* method, developed as a results of this dissertation. Concentration was measured by HPLC-UV/VIS method. The solid phases were characterized using elemental, thermogravimetric, differential scanning calorimetric, and powder X-ray diffraction analyses. Conductivity measurements were used for critical micelle concentration determination. Degradation of imipramine and amitriptyline in alkaline media was investigated by UV/VIS spectrophotometry and HPLC-UV/VIS method. Concentration thermodynamic constants (I_{ref} 0,15 M, 25 °C) – intrinsic solubilities, solubility products, complexation and aggregation constants, were refined using the computer program *pDISOL-XTM*. Cationic and anionic phosphate complex formation was observed in heterogeneous systems of desipramine and nortriptyline, but self-aggregation was observed in heterogeneous systems of imipramine and amitriptyline, leading to increased solubility of tricyclic antidepressant. Depending on suspension composition and experimental design, tricyclic antidepressant can precipitate as chloride and phosphate salts or free base. pH-*Ramp shake-flask* method in combination with solid state characterization methods can be powerful technique in pH-dependent solubility investigation and can provide high-quality data that can be useful in drug research.

Key words: solubility, pH-*Ramp shake-flask* method, desipramine, nortriptyline, imipramine, amitriptyline, phosphate salts, chloride salts, phosphate complexes, aggregation

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Analytical Chemistry

SADRŽAJ

I UVOD	1
II OPŠTI DEO	3
II.1 Ispitivana jedinjenja	3
II.2 Definicije i izražavanje rastvorljivosti	6
II.3 Značaj određivanja rastvorljivosti u ranoj fazi dizajna i razvoja lekova	8
II.4 Uticaj različitih faktora na eksperimentalno određivanje rastvorljivosti	10
II.4.1. Zavisnost rastvorljivosti od pH vrednosti (profili rastvorljivosti)	10
II.4.2 Temperatura	15
II.4.3 Jonska sila	16
II.4.4 Pufferi	17
II.4.5 Sastav čvrste faze	17
II.4.6 Količina čvrste supstance u višku	19
II.4.7 Vreme uspostavljanja ravnoteže	20
II.4.8 Razdvajanje faza	20
II.5 Metode za određivanje rastvorljivosti	21
II.5.1 Turbidimetrija	21
II.5.2 <i>Shake–flask</i> metoda	21
II.5.3 Modifikacije <i>shake–flask</i> metode	22
II.5.4 <i>Dissolution template</i> titracija (DTT)	22
II.5.5 <i>Chasing equilibrium Solubility</i> (CheqSol) metoda	23
II.5.6 <i>Micro dissolution</i> metoda (μ DISS metoda)	24
II.5.7 <i>Facilitated Dissolution</i> metoda	24
II.5.8 Program <i>pDISOL–X</i> TM	25
II.6 Kritična micelarna koncentracija	26
II.7 Metode za karakterizaciju taloga	28
II.7.1 Termogravimetrija	28
II.7.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	29
II.7.3 Difrakcija X-zraka praha (Powder X-ray diffraction, PXRD)	30
III NAŠI RADOVI	31
III.1 pH– <i>Ramp shake–flask</i> metoda	31
III.2 Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima desipramin-hidrohlorida	32
III.2.1 Proučavanje rastvorljivosti desipramina u zavisnosti od pH vrednosti	32
III.2.2 Određivanje ravnotežnih konstanti u heterogenim sistemima desipramina pomoću programa <i>pDISOL–X</i> TM	35
III.2.3 Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama desipramina	39
III.3 Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima nortriptilin-hidrohlorida	46
III.3.1 Proučavanje rastvorljivosti nortriptilina u zavisnosti od pH vrednosti	46
III.3.2 Određivanje ravnotežnih konstanti u heterogenim sistemima nortriptilina pomoću programa <i>pDISOL–X</i> TM	48
III.3.3 Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama nortriptilina	53
III.4 Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima imipramin-hidrohlorida	58
III.4.1 Proučavanje rastvorljivosti imipramina u zavisnosti od pH vrednosti	58
III.4.2 Određivanje kritične micelarne koncentracije imipramin-hidrohlorida	60
III.4.3 Određivanje konstanti ravnoteža u heterogenim sistemima imipramina pomoću programa <i>pDISOL–X</i> TM	62

III.4.4	Određivanje rastvorljivosti imipramina u uslovima povećane jonske sile	64
III.4.5	Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama imipramina	69
III.4.6	Praćenje degradacije imipramina u baznoj suspenziji	73
III.5	Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima amitriptilin-hidrohlorida	79
III.5.1	Proučavanje rastvorljivosti amitriptilina u zavisnosti od pH vrednosti	79
III.5.2	Određivanje kritične micelarne koncentracije amitriptilin-hidrohlorida	81
III.5.3	Određivanje rastvorljivosti amitriptilina u uslovima povećane jonske sile	83
III.5.4	Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama amitriptilina	86
III.5.5	Praćenje degradacije u suspenzijama amitriptilin-hidrohlorida	87
IV	EKSPERIMENTALNI DEO	94
IV.1	Reagensi	94
IV.2	Merenje pH vrednosti, kalibracija i standardizacija elektrode	94
IV.3	Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti desipramina	95
IV.3.1	Setovi 1 i 2 (titracije od visoke ka niskoj pH vrednosti)	95
IV.3.2	Set 3 (titracije od niske ka visokoj pH vrednosti)	96
IV.3.3	Set 4	97
IV.3.4	Set 5	97
IV.4	Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrstog stanja u suspenzijama desipramina	98
IV.4.1.	Set 6	98
IV.4.2.	Set 7	98
IV.5	Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti nortriptilina	99
IV.5.1	Setovi 1 – 4 (titracije iz kisele ka baznoj sredini)	99
IV.5.2	Setovi 5 – 7 (titracije iz bazne ka kiseloj sredini)	101
IV.5.3	Setovi 8 i 9 (suspenzije nortriptilina koje sadrže hloride, a ne sadrže fosfate)	102
IV.5.4	Setovi 10 i 11 (suspenzije nortriptilina koje sadrže fosfate, a ne sadrže hloride)	103
IV.6	Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrstog stanja u suspenzijama nortriptilina	105
IV.7	Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti imipramina	106
IV.7.1	Setovi 1 i 2 (titracije od niske ka visokoj pH vrednosti)	106
IV.7.2	Set 3	107
IV.7.3	Set 4 (titracija od više ka nižoj pH vrednosti)	108
IV.7.4	Set 5	108
IV.7.5	Set 6	109
IV.8	Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrste faze u suspenzijama imipramina	110
IV.9	Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti amitriptilina	110
IV.9.1	Set 1 (titracija od niže ka višoj pH)	111
IV.9.2	Set 2 (titracija od više ka nižoj pH)	111
IV.9.3	Set 3	111
IV.9.4	Set 4	112
IV.9.5	Set 5	112
IV.9.6	Set 6	113
IV.10	Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrste faze u suspenzijama amitriptilina	113
IV.11	Određivanje koncentracije HPLC–UV/VIS metodom	114
IV.12	Određivanje kritične micelarne koncentracije	115
IV.13	Elementalna analiza	123
IV.14	Termogravimetrijska analiza	124
IV.15	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	124
IV.16	Difrakcija X-zraka praha	124
IV.17	Praćenje degradacije u suspenzijama imipramina i amitriptilina	125
IV.17.1	Praćenje degradacije imipramina i amitriptilina pomoću UV/VIS spektrofotometrije	125

IV.17.2. Praćenje degradacije imipramina u rastvoru pomoću HPLC–UV/VIS metode	125
IV.17.3 Praćenje degradacije amitriptilina u suspenziji pomoću HPLC–UV/VIS metode	126
V ZAKLJUČAK	127
VI LITERATURA	130
VII PRILOG 1 Desipramin – pomoćni materijal	139
VIII PRILOG 2 Nortriptilin – pomoćni materijal	143
IX PRILOG 3 Imipramin – pomoćni materijal	149
X PRILOG 4 Amitriptilin – pomoćni materijal	154
BIOGRAFIJA	156

I UVOD

Dizajn i razvoj lekova veoma je važan proces koji omogućava lečenje različitih bolesti i poboljšanje zdravstvenog stanja pacijenata [1]. Potrebno je mnogo vremena, finansijskih sredstava i znanja iz različitih oblasti nauke i tehnike kako bi se proizveli efikasni i bezbedni lekovi. Isplativo ulaganje resursa farmaceutskih kompanija u istraživanje i razvoj postiže se pravilnim izborom potencijalno biološki aktivnih supstanci u što ranijoj fazi procesa dizajna i razvoja lekova [2]. Primećeno je da su neodgovarajuća ADME svojstva (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija), niska efikasnost i toksičnost glavni razlozi odbacivanja potencijalnih lekova u pretkliničkim ispitivanjima [3]. U skladu sa tim, definisanje farmakokinetičkog profila supstanci (ADME svojstva) postalo je obavezno u početnoj fazi istraživanja. Kako ADME svojstva potencijalno biološki aktivnih supstanci zavise od fizičko-hemijskog profila, fizičko-hemijska karakterizacija supstanci postala je značajan deo istraživanja u procesu dizajna i razvoja novih lekova [1]. Fizičko-hemijski profil supstanci obuhvata određivanje kiselnih konstanti, rastvorljivosti, lipofilnosti i permeabilnosti.

Rastvorljivost je jedan od najvažnijih fizičko-hemijskih parametara, koji osim uticaja na ADME svojstva supstanci, određuje tok procesa formulacije lekova i optimizacije proizvodnje lekova [1, 4, 5]. Pored permeabilnosti, rastvorljivost se koristi za biofarmaceutsku klasifikaciju supstanci. Zbog velikog značaja rastvorljivosti u procesu dizajna i razvoja lekova, neophodni su tačni i precizni podaci o rastvorljivosti aktivnih farmaceutskih komponenti (AFK).

Eksperimentalno određivanje rastvorljivosti podrazumeva izračunavanje koncentracije ispitivanog jedinjenja u zasićenom rastvoru na osnovu analitičkog signala dobijenog različitim metodama [3]. Iako ova procedura izgleda jednostavno, postoji mnogo faktora koji utiču na rastvorljivost i o kojima se mora voditi računa tokom eksperimentalnog rada i tumačenja rezultata. Međutim, u literaturi postoji mnogo nepouzdanih podataka o rastvorljivosti bez jasno definisanih eksperimentalnih uslova određivanja. To otežava poređenje rezultata i onemogućava formiranje pouzdanih baza podataka koje se mogu koristiti u programima za predviđanje rastvorljivosti.

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj metode koja će omogućiti tačno i precizno određivanje termodinamičke rastvorljivosti i definisanje postojećih ravnoteža u heterogenim sistemima nekih tricikličnih antidepresiva (TCA): desipramina (Ds), nortriptilina (Nor), imipramina (Im) i amitriptilina (Am). Tokom izrade ove doktorske disertacije, osmišljena je pH–*Ramp shake–flask* metoda [6 – 13], koja je korišćena za određivanje termodinamičke rastvorljivosti tricikličnih antidepresiva u zavisnosti od pH vrednosti, na 25 ± 1 °C u suspenzijama TCA koje sadrže fosfate i hloride. Takođe, termodinamička rastvorljivost određena je u heterogenim sistemima TCA koji sadrže fosfate i heterogenim sistemima TCA koji sadrže hloride.

Koncentracije jedinjenja u rastvoru određene su pomoću visoko-efikasne tečne hromatografije (HPLC) sa UV/VIS detekcijom. Čvrsta faza (talog) analizirana je upotrebom elementalne analize, termogravimetrijske analize (eng. *thermogravimetric analysis*, TGA), diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (eng. *differential scanning calorimetry*, DSC) i difrakcije X-zraka praha (eng. *powder X-ray diffraction*, PXRD). Nastajanje agregata u kiseloj sredini proučavano je primenom konduktometrijskih titracija. Degradacija imipramina i amitriptilina u baznoj sredini analizirana je pomoću UV/VIS spektrofotometrije i HPLC–UV/VIS metode. Ravnotežne konstante u heterogenim sistemima tricikličnih antidepresiva dobijene su obradom eksperimentalnih podataka u programu *pDISOL–XTM* (*in-ADME Research*).

Eksperimentalne procedure primenjene u ovoj doktorskoj disertaciji, osmišljene su u skladu sa detaljnim preporukama za određivanje rastvorljivosti, opisanim u literaturi [14], zbog čega se

očekuje visok kvalitet dobijenih eksperimentalnih rezultata. Korišćenje pH-*Ramp shake-flask* metode u kombinaciji sa ostalim navedenim metodama, može olakšati proučavanje složenih ravnoteža u heterogenim sistemima aktivnih farmaceutskih komponenti i pokazati uticaj različitih vrsta agregacije (nastajanje agregata i kompleksa) i sastava čvrste faze na rastvorljivost.

II OPŠTI DEO

Većina biološki aktivnih i potencijalno biološki aktivnih supstanci su u vodi slabo rastvorljiva jedinjenja koja sadrže jonizujuće funkcionalne grupe [3]. Takve supstance su često površinski aktivne, odnosno mogu da formiraju različite vrste agregata, što povećava njihovu rastvorljivost [15 – 31]. Prezasićeni rastvori obično nastaju blizu faznog prelaza soli u kiselinu/bazu (ili obrnuto) u čvrstoj fazi. Osim toga, rastvorljivost površinski aktivnih jedinjenja vrlo je osetljiva na promene u temperaturi [3, 5]. Ukoliko su površinski aktivne supstance baze, u baznoj sredini može se očekivati izdvajanje ovih jedinjenja u obliku ulja, koja imaju veću rastvorljivost u odnosu na kristalni talog [17, 30]. Merenje pH vrednosti može biti oteženo ako se izdvojeno ulje adsorbuje na elektrodu [9]. Isto tako, adsorpcija ulja na magnet mešalice, potencijalno čini mešanje suspenzije nepouzdanim i usporava postizanje ravnoteže.

Triciklični antidepresivi su slabo rastvorljiva, jonizujuća i površinski aktivna jedinjenja [3]. Eksperimentalno određivanje rastvorljivosti TCA i tumačenje dobijenih rezultata otežano je gore navedenim problemima. Iako u literaturi postoje podaci o rastvorljivosti TCA, nema podataka o čvrstoj fazi izdvojenoj u suspenzijama TCA. Kako bi se dobila kompletna slika o ravnotežama u nekom heterogenom sistemu, potrebno je analizirati i tečnu i čvrstu fazu. Kao model jedinjenja izabrani su sledeći triciklični antidepresivi: desipramin, nortriptilin, imipramin i amitriptilin. Rastvorljivost navedenih TCA određena je primenom pH–*Ramp shake–flask* metode, koja je osmišljena tokom izrade ove doktorske disertacije [6 – 13].

U Opštem delu doktorske disertacije prvo je dat pregled objavljenih podataka o rastvorljivosti i kritičnim micelarnim koncentracijama izabranih tricikličnih antidepresiva. Nakon toga, date su definicije rastvorljivosti i istaknut je značaj određivanja rastvorljivosti. Zatim, opisan je uticaj različitih faktora na određivanje rastvorljivosti: pH vrednost, temperatura, jonska sila, rastvarač, sastav čvrste faze, količina čvrste faze u višku, vreme uspostavljanja ravnoteže (faza mešanja i faza sedimentacije), način razdvajanja faza [1 – 3, 5, 14, 30, 32]. Posle toga, dat je pregled metoda za određivanje rastvorljivosti: *shake–flask* [4, 5, 33 – 37], minijaturizovana *shake–flask* [38], *small–scale shake–flask* [39], *Dissolution template* titracija (DTT) [40 – 42], *Chasing equilibrium Solubility* (CheqSol) [4, 33, 36, 43, 44], *Facilitated Dissolution* [45 – 47], *Micro Dissolution* (μ DISS metoda) [48 – 50]. Onda, dati su osnovni podaci o kritičnoj micelarnoj koncentraciji (KMK) – definicija, uticaj različitih faktora na vrednosti KMK i metode za određivanje KMK. Na kraju, opisane su metode za karakterizaciju čvrste faze: termogravimetrijska analiza, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i difrakcija X-zraka praha.

II.1 Ispitivana jedinjenja

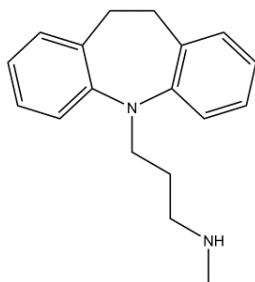
Depresija je afektivni poremećaj, koji prema monoaminskoj teoriji iz 1965. godine nastaje kao posledica funkcionalnog deficita monoaminskih transmitera (noradrenalin i/ili 5-hidroksitriptamin) u određenim delovima centralnog nervnog sistema [51]. Status monoaminske teorije se menjao tokom godina prema otkrićima dobijenim u različitim farmakološkim, biohemijским i neuroendokrinim studijama. Otkriveno je više dokaza koji podržavaju ovu teoriju, ali i više nepravilnosti. Teškoće u razumevanju depresije na nivou neurohemijških mehanizama uzrokovane su nedostatkom odgovarajućeg modela na životinjama, koji potpuno opisuje kliničko stanje depresije kod ljudi.

Kod pacijenata, depresija se može prepoznati po sledećim simptomima: usporenost misli i delovanja, poremećaj sna, gubitak apetita, gubitak libida, nedostatak samopouzdanja (osećaj krivice, neadekvatnosti i ružnoće), gubitak motivacije, neodlučnost, pesimizam, ojađenost i apatija [51]. Poboljšanje navedenih emocionalnih i bioloških simptoma postiže se upotrebom različitih tipova antidepresiva:

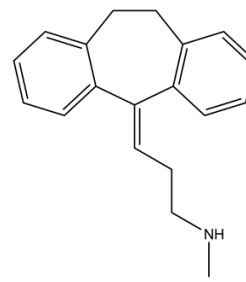
- inhibitori preuzimanja monoamina [triciklični antidepresivi (neselektivni ili noradrenalin-selektivni inhibitori preuzimanja monoamina), selektivni inhibitori preuzimanja serotonina i ostali inhibitori],
- inhibitori monoaminooksidaze,
- razni antidepresivi (neselektivno blokiraju receptore, nedovoljno objašnjeno dejstvo).

Triciklični antidepresivi (TCA) imaju široku primenu u terapiji depresije, uprkos tome što spadaju u prvu generaciju antidepresiva i imaju više neželjenih efekata od novih lekova [51]. Njihovo dejstvo zasniva se na inhibiciji preuzimanja noradrenalina i/ili 5-hidroksitriptamina u nervne završetke, čime omogućavaju monoaminsku transmisiju. Ovaj efekat je bio jedan od osnova za razvoj monoaminske teorije.

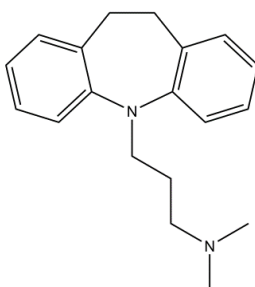
U ovoj doktorskoj disertaciji, ispitivane su ravnoteže u heterogenim sistemima sledećih tricikličnih antidepresiva: desipramina, nortriptilina, imipramina i amitriptilina (**Slika 1**).

**desipramin**

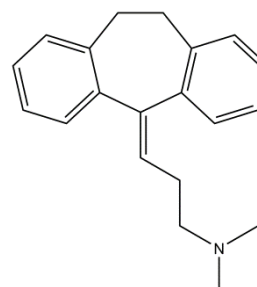
(3-(5,6-dihidrobenzo[b][1]benzazepin-11-il)-*N*-metilpropan-1-amin)

**nortriptilin**

(*N*-metil-3-(2-triciklo[9.4.0.0^{3,8}]pentadeka-1(15),3,5,7,11,13-heksaenilidien)propan-1-amin)

**imipramin**

(3-(5,6-dihidrobenzo[b][1]benzazepin-11-il)-*N,N*-dimetilpropan-1-amin)

**amitriptilin**

(*N,N*-dimetil-3-(2-triciklo[9.4.0.0^{3,8}]pentadeka-1(15),3,5,7,11,13-heksaeniliden)propan-1-amin)

Slika 1. Strukture ispitivanih tricikličnih antidepresiva

Prema kiselinsko-baznim karakteristikama, proučavani TCA su slabe baze. Osnovni fizičko-hemijski parametri (kiselinska konstanta, pK_a , sopstvena rastvorljivost, $-\log S_0$, i particioni koeficijent (oktanol – voda), $\log P$ i $\log D$), prikazani su u **Tabeli 1** [3].

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri proučavanih TCA (kiselinska konstanta, pK_a , sopstvena rastvorljivost^a, $-\log S_0$, i particioni koeficijent (oktanol – voda), $\log P$ i $\log D$) [3].

jedinjenje	$pK_a \pm SD$	uslovi određivanja pK_a	$-\log S_0$	$\log P$	$\log D$
desipramin	10,28±0,03	26 ° C, $I=0,15$ M, H ₂ O	3,81	3,79	0,34
nortriptilin	10,13±0,06	26 ° C, $I=0,15$ M, MeOH/H ₂ O ^b	4,18	4,39	1,17
imipramin	9,52±0,03	25 ° C, $I=0,15$ M, MeOH/H ₂ O ^b	/	4,39	0,47
amitriptilin	9,49 ^c	25 ° C, $I=0,15$ M ^d	5,19	4,61	0,16

^a *Dissolution Template Titration* metoda: 25 ° C, $I=0,15$ M (KCl). S_0 je izražena u jedinicama mol/L.

^b Konstanta je dobijena ekstrapolacijom iz smeše metanol – voda.

^c Nema podataka od standardnoj devijaciji.

^d Nema podataka o tipu određivanja.

Sopstvene rastvorljivosti TCA, prikazane u **Tabeli 1**, određene su potencimetrijski pomoću *Dissolution Template Titration* metode. U literaturi postoje podaci o rastvorljivosti ovih jedinjenja, dobijeni pomoću različitih metoda [4, 19, 39, 52, 53], ali čvrsta faza nije analizirana ni u jednoj od ovih studija.

Green je odredio sopstvenu rastvorljivost desipramina ($\log S_0=-3,66$), imipramina ($\log S_0=-4,19$) i amitriptilina ($\log S_0=-4,46$) na 24 ° C, pomoću *shake-flask* metode i turbidimetrije [19]. Rezultate je izrazio kao srednju vrednost rastvorljivosti, dobijenih pomoću navedenih metoda, iako je vrednost dobijena *shake-flask* metodom uvek bila niža od vrednosti dobijene turbidimetrijski (vrednost dobijena turbidimetrijom predstavlja kinetičku rastvorljivost, ne termodinamičku [3]).

Bergström i saradnici primenili su *small-scale shake-flask* metodu za određivanje profila rastvorljivosti desipramin-hidrohlorida (u pH intervalu 1,4 – 11,2) na 22,5 ° C u 0,15 M fosfatnom puferu [39]. Eksperimentalno dobijene vrednosti rastvorljivosti ne odgovaraju teorijskom profilu izračunatom na osnovu Henderson – Hasselbalch-ove (HH) jednačine. Nagib pravolinijskog dela dijagrama iznosi -0,6 (nagib pravolinijskog dela profila rastvorljivosti baze je -1 prema HH jednačini) a tačka infleksije oko 7,5 (niža vrednost od stvarne pK_a određene nezavisnom metodom). Rastvorljivost na pH 11,2 uzeta je kao vrednost sopstvene rastvorljivosti ($\log S_0=-3,90$). Avdeef je analizirao podatke iz ovog rada 2014. godine pomoću programa *pDISOL-X*TM [54]. Predložio je model prema kome dolazi do građenja neutralnih agregata u baznoj sredini, taloženja fosfatne soli desipramina (DsH)H₂PO_{4(s)} na pH<5, taloženja desipramina (baze) na pH>5 i izračunao vrednost sopstvene rastvorljivosti $\log S_0=-6,40$. Veća rastvorljivost na pH~10 od očekivane, kao i značajna razlika u vrednostima $\log S_0$ dobijenih eksperimentalno i pomoću programa *pDISOL-X*TM, bile su jedan od razloga detaljnijeg proučavanja heterogenih sistema desipramin-hidrohlorida u fosfatnom puferu u okviru naše istraživačke grupe.

Box i saradnici odredili su sopstvene rastvorljivosti imipramina ($\log S_0=-4,21\pm 0,01$) i nortriptilina ($\log S_0=-3,99\pm 0,02$) u 0,15 M KCl na 25 ° C pomoću *CheqSol* metode [4]. Radi poređenja, vrednosti $\log S_0$ određene su i *shake-flask* metodom na pH 11,50 u Britton–Robinson puferu: imipramin ($\log S_0=-4,11\pm 0,06$) i nortriptilin ($\log S_0=-3,73\pm 0,01$).

Llinàs i saradnici objavili su vrednosti sopstvene rastvorljivosti desipramina ($\log S_0=-3,63$), nortriptilina ($\log S_0=-4,02$) i amitriptilina ($\log S_0=-4,55$), dobijene *CheqSol* metodom u 0,15 M KCl

na 25 °C, kao deo *on-line* izazova u predviđanju rastvorljivosti, koji su autori organizovali u časopisu *Journal of Chemical Information and Modeling* [52].

U okviru istraživanja o permeabilnosti nortriptilina, Melero i saradnici koristili su *shake-flask* metodu za određivanje rastvorljivosti nortriptilina na 32 °C u fosfatnom puferu (nema podataka o totalnoj koncentraciji) pH 5,5 ($\log S = -0,98$) i 7,4 ($\log S = -2,56$) [53].

Ispitivani triciklični antidepresivi (desipramin, nortriptilin, imipramin i amitriptilin) opisani su kao CheqSol *non-chaser* molekuli [4, 44]. Za CheqSol *non-chaser* molekule karakteristična su sledeća svojstva: ne grade prezasićene rastvore; brzo se talože, a sporo rastvaraju; najčešće su baze; imaju niske tačke topljenja, na 25 °C obično su tečni ili amorfni; rastvorljivost se ne menja ili opada sa porastom temperature; često su površinski aktivni.

Površinska aktivnost proučavanih TCA potiče od njihove strukture (**Slika 1**), koja sadrži triciklični sistem sa ugljovodoničnim nizom (nepolarni deo), na čijem kraju se nalazi sekundarna ili tercijarna amino grupa (polarni deo) [55 – 65]. Fleksibilnost nepolarnog dela ovih molekula vrlo je važna za proces formiranja micela u rastvoru, kao i činjenica da triciklični sistem nije planaran [55]. Planarne aromatične strukture sa kratkim ugljovodoničnim lancem (rigidne strukture) ne pokazuju micelarno ponašanje u rastvoru, odnosno agregati nastaju slaganjem jednog monomera na drugi ili na grupu povezanih monomera (*stacking-type association*). Pokazano je da ugao između dve fenilne grupe u tricikličnom sistemu ne utiče samo na micelarno ponašanje jedinjenja, već je od značaja i za biološku aktivnost [56]. Antidepresivno dejstvo jedinjenja dominantno je ukoliko je ugao koji zaklapaju fenilne grupe (prstenovi) manji od 180°. Međutim, triciklični planarni sistem uslovljava neuroleptičku aktivnost.

Attwood i Gibson su 1978. godine konduktometrijski odredili kritične micelarne koncentracije DsHCl (0,057 mol/kg), ImHCl (0,048 mol/kg) i AmHCl (0,044 mol/kg) u vodenom rastvoru na 30 °C (navedene vrednosti se slažu sa vrednostima dobijenim *light-scattering* metodom), dok je KMK nortriptilina određena samo *light-scattering* metodom (0,023 mol/kg) [55]. Junquera i saradnici su 2001. objavili kritične micelarne koncentracije u vodenom rastvoru na 25 °C, određene takođe konduktometrijski: DsHCl (56,3±0,2 mM), ImHCl (56,7±0,2 mM) i AmHCl (43,7±0,2 mM) [56]. Veće KMK vrednosti DsHCl i ImHCl u odnosu na AmHCl, objašnjene su većom polarnošću desipramina i imipramina, koji sadrže azot u alifatičnom prstenu. Prisustvo sekundarne (Ds) ili tercijarne (Im i Am) amino grupe uticalo je na stepen disocijacije agregata u rastvoru: desipramin (63%), imipramin i amitriptilin (56% i 58%). Osim navedenih, u literaturi su prikazane KMK vrednosti tricikličnih antidepresiva određene pod različitim eksperimentalnim uslovima [57 – 59, 63 – 65].

II.2 Definicije i izražavanje rastvorljivosti

Rastvorljivost je fizičko-hemijsko svojstvo, koje određuje maksimalnu koncentraciju rastvorene supstance u nekom rastvaraču [1]. Uprkos jednostavnoj osnovnoj definiciji, u literaturi postoji nekoliko specifičnih definicija i načina izražavanja rastvorljivosti.

Termodinamička (ravnotežna) rastvorljivost predstavlja koncentraciju supstance u zasićenom rastvoru u uslovima kada je u sistemu postignuta ravnoteža između rastvora i taloga [1]. Zasićeni rastvori, u kojima je postignuto ravnotežno stanje između rastvora i kristalnog taloga su termodinamički stabilni sistemi [2]. Kada je u rastvoru rastvoreno više supstance nego što je očekivano na osnovu termodinamičke rastvorljivosti, nastaje prezasićen rastvor. Prezasićeni rastvori

su termodinamički nestabilni sistemi, koji imaju tendenciju da kristališu, kako bi se uspostavilo ravnotežno stanje. Rastvori mogu biti i nezasićeni. To su rastvori u kojima je rastvoreno manje supstance nego što je definisano termodinamičkom rastvorljivošću, odnosno, koncentracija rastvorene supstance je manja nego u zasićenom rastvoru.

Ukoliko rastvorena supstanca sadrži funkcionalne grupe koje mogu da jonizuju u rastvoru, termodinamička rastvorljivost se može definisati na dva načina, kao sopstvena i kao ukupna rastvorljivost [1]. Sopstvena rastvorljivost (S_0) predstavlja termodinamičku rastvorljivost molekulskog oblika kiseline (HA), baze (B) ili amfolita (HX) na pH vrednostima na kojima je stepen jonizacije supstance zanemarljiv. Sopstvena rastvorljivost je najniža rastvorljivost jonizujućeg jedinjenja. Ukupna rastvorljivost (S) je termodinamička rastvorljivost jonizujućeg jedinjenja koja predstavlja zbir koncentracija svih rastvorenih oblika (jonizovanih i molekulskog) u kojima se jedinjenje nalazi na određenoj pH vrednosti.

Kinetička rastvorljivost predstavlja koncentraciju supstance u trenutku pojave taloga, prilikom dodavanja malih zapremina 10 – 20 $\mu\text{g/mL}$ rastvora jedinjenja (rastvorenog u dimetil-sulfoksidu (DMSO)) u rastvor pufera [1]. Razlog ovakvoj definiciji je uobičajen način čuvanja novih supstanci u ranoj fazi otkrića lekova – supstance se čuvaju kao rastvori u DMSO-u. Dimetil-sulfoksid je praktičan za upotrebu zbog nekoliko važnih svojstava: dobro rastvara i polarna i nepolarna jedinjenja, ima visoku tačku ključanja (189 °C) koja sprečava lako isparavanje tokom odmeravanja mikrolitarskih zapremina rastvora, meša se sa vodom u svim proporcijama [66]. Vrednost kinetičke rastvorljivosti obično je veća od vrednosti termodinamičke rastvorljivosti [1]. U uslovima određivanja kinetičke rastvorljivosti u ispitivanom sistemu nije postignuto termodinamičko ravnotežno stanje. Talog izdvojen na početku eksperimenta obično je u amorfnom ili metastabilnom kristalnom obliku i ima veću rastvorljivost u odnosu na termodinamički najstabilniji kristalni oblik [2].

Na osnovu navedenih definicija, može se zaključiti da je ravnotežna rastvorljivost termodinamička konstanta, koja se može smatrati karakteristikom jedinjenja na određenoj temperaturi i pritisku; kinetička rastvorljivost ne predstavlja termodinamičku konstantu jer u uslovima u kojima se određuje, u sistemu nije postignuto ravnotežno stanje [1].

Rastvorljivost se može izraziti na nekoliko načina: u jedinicama molariteta (mol/L), molaliteta (mol/kg), kao molski ili maseni udeo, kroz odnos masa/zapremina (mg/mL , $\mu\text{g/mL}$) i slično [14]. Kada se rastvorljivost određuje na različitim temperaturama ili u vrlo viskoznim rastvorima, obično se koristi molalitet, molski udeo ili maseni udeo [14, 32]. U nekim granama industrije, praktično je koristiti jedinice mg/mL , $\mu\text{g/mL}$ i slično, zbog brze pripreme željenih rastvora ili suspenzija (bez dodatnih proračuna).

U ovoj disertaciji rastvorljivost je izražena u jedinicama mol/L . Rezultati su grafički prikazani kao funkcija logaritma koncentracije ($\log S$) od pH vrednosti rastvora. Nije bilo praktično prikazati rezultate u obliku S -pH dijagrama, jer su ispitivana jedinjenja jonizujuća pa se vrednost rastvorljivosti menja sa promenom pH vrednosti rastvora za nekoliko redova veličine [14].

II.3 Značaj određivanja rastvorljivosti u ranoj fazi dizajna i razvoja lekova

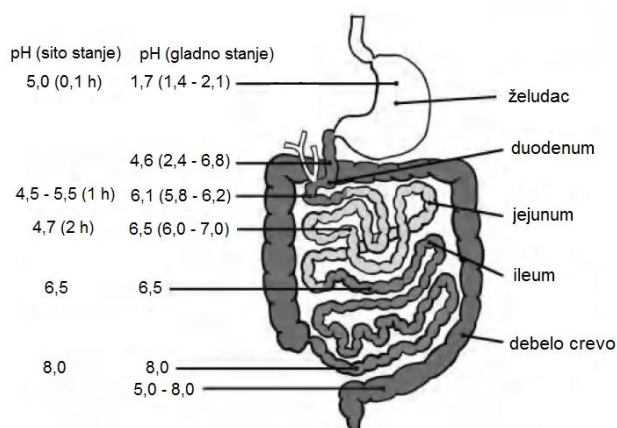
Rastvorljivost je jedan od najvažnijih fizičko-hemijskih parametara, koji se koristi u procesu dizajna i razvoja lekova [1]. Na osnovu fizičko-hemijske karakterizacije, koja obuhvata određivanje rastvorljivosti, kiselinskih konstanti, lipofilnosti i permeabilnosti, mogu se predvideti farmakokinetičke osobine potencijalno biološki aktivnih molekula (apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija). Farmakokinetički profil supstance, zajedno sa farmakodinamičkim profilom, u velikoj meri određuje uspešnost primene određenog leka u terapijske svrhe. Podaci o rastvorljivosti važni su i u procesu formulacije leka i optimizacije proizvodnje leka [4, 5].

Stepen i brzinu apsorpcije oralno unetih lekova u digestivnom traktu određuju rastvorljivost i permeabilnost [67, 68]. Da bi oralno uzet lek pokazao farmaceutsko dejstvo, prvo mora da se rastvori u gastrointestinalnoj tečnosti, zatim treba da prođe kroz intestinalni zid i dospe u cirkulaciju [68]. Nakon toga, transportuje se do mesta delovanja, gde izaziva određeni farmakološki odgovor. Poznavanjem rastvorljivosti i permeabilnosti, moguće je predvideti da li je neki lek pogodan za oralnu upotrebu, što je osnovna ideja Biofarmaceutskog klasifikacionog sistema (*Biopharmaceutical Classification System* (BCS)) [1]. Prema BCS sistemu, lekovi se dele u 4 klase prema rastvorljivosti i permeabilnosti:

klasa 1 visoka rastvorljivost visoka permeabilnost	klasa 2 niska rastvorljivost visoka permeabilnost
klasa 3 visoka rastvorljivost niska permeabilnost	klasa 4 niska rastvorljivost niska permeabilnost

Posmatranjem četiri BCS klase lekova, jasno je da brzinu apsorpcije u digestivnom traktu ograničavaju sledeći faktori: brzina rastvaranja (lekovi iz klase 1), niska rastvorljivost (lekovi iz klase 2) i niska permeabilnost (lekovi iz klase 3) [1]. Lekovi iz klase 4 imaju nepovoljnu i rastvorljivost i permeabilnost. Većina lekova (približno 85%) koji se danas nalaze u upotrebi ima vrednosti rastvorljivosti $\log S$ u opsegu (-1) – (-5) (S u mol/L), što se može smatrati kompromisom između polarnosti supstance potrebne za odgovarajuću rastvorljivost i hidrofobnosti supstance potrebne za odgovarajuću permeabilnost [69].

Prilikom predviđanja brzine i stepena apsorpcije supstanci u digestivnom traktu, ne treba zaboraviti uticaj sastava digestivnog trakta na rastvorljivost, brzinu rastvaranja, lipofilnost i permeabilnost [34, 68]. Priprema različitih biorelevantnih rastvora, koji u većoj ili manjoj meri odgovaraju sastavu digestivnog trakta u gladnom ili sitom stanju, opisana je u literaturi [34, 66, 70]. Nekada se povećanje rastvorljivosti u digestivnom traktu prikazuje kao odnos rastvorljivosti u biorelevantnom rastvoru i rastvorljivosti u nekom puferu, a efekat hrane kao odnos rastvorljivosti u biorelevantnim rastvorima koji opisuju gladno i sito stanje [34]. Važno je naglasiti da različiti delovi digestivnog trakta imaju drugačije pH vrednosti [3], kao što je prikazano na **Slici 2**.



Slika 2. Vrednosti pH različitih delova digestivnog trakta. Adaptirano iz Avdeef, 2012 [3].

Proces dizajna i razvoja lekova je prilično skup i dugotrajan [3]. Ogromni finansijski gubici farmaceutskih kompanija nastaju zbog odbacivanja potencijalno biološki aktivnih molekula u pretkliničkim studijama. Neprihvatljive farmakokinetičke osobine, nedovoljna efikasnost i toksičnost glavni su razlozi odbacivanja potencijalnih lekova. Jedan od načina da se smanje troškovi farmaceutskih kompanija je razvoj kompjuterskih modela koji obezbeđuju tačno predviđanje željenih osobina molekula [68].

Baze podataka većine modela za predviđanje rastvorljivosti sadrže vrednosti sopstvenih rastvorljivosti jedinjenja [39]. Modeli najčešće koriste HH jednačinu i "sdiff 3-4" aproksimaciju [3] za procenu rastvorljivosti na različitim pH vrednostima, kao i za konstrukciju teorijskog logS-pH dijagrama. Međutim, nije jednostavno predvideti ceo dijagram samo na osnovu tih parametara, zato što je logS-pH dijagram specifičan za svako jedinjenje u smislu opsega rastvorljivosti i nagiba linearnog dela dijagrama [3, 39, 48]. Jedna od najvećih baza podataka, koja se koristi kao osnova u mnogim programima, je knjiga *Handbook of aqueous solubility data*, u kojoj je navedeno preko 18000 podataka o rastvorljivosti 4661 molekula [32, 71]. Međutim, prilikom navođenja rastvorljivosti jonizujućih jedinjenja, nije data pH vrednost određivanja u većini slučajeva. Temperature određivanja su u opsegu 20 – 40 ° C. Generalno, u literaturi postoji dosta nepouzdanih podataka o rastvorljivosti različitih supstanci, bez jasno naglašenih eksperimentalnih uslova [14].

Najčešći problemi koji uzrokuju lošu predikciju su nedostatak eksperimentalnih podataka zadovoljavajuće tačnosti, kao i nedovoljno podataka koji adekvatno pokrivaju strukturnu različitost da bi predviđanje rastvorljivosti molekula specifične strukture bilo uspešno [32]. Ulaganje finansijskih sredstava u istraživanje neće povećati kvalitet podataka ukoliko se ne uzimaju u obzir ključni eksperimentalni detalji (ili ako preciznost merenja nije zadovoljavajuća): pH vrednost kod određivanja rastvorljivosti jonizujućih jedinjenja ili temperatura. Uspešnost predviđanja rastvorljivosti potencijalno biološki aktivnih supstanci može biti značajno poboljšana, formiranjem pouzdane baze podataka koja je sačinjena od tačnih i preciznih eksperimentalno dobijenih podataka o rastvorljivosti različitih molekula [52, 69, 72].

Greške u predviđanju rastvorljivosti lekova obično su reda veličine 0,7 – 1,0 log jedinica, ali mogu biti i mnogo veće u slučaju slabo rastvornih jedinjenja [32, 69, 73]. *On-line* izazov u predviđanju rastvorljivosti (*the Solubility Challenge*) [52, 72] ukazao je da problem predviđanja rastvorljivosti ne potiče samo od nepostojanja odgovarajuće baze podataka, već i od nedostatka odgovarajućih modela koji se koriste u predviđanju [72, 73]. Glavni ciljevi izazova bili su razvoj metoda za predviđanje rastvorljivosti i isticanje važnosti uticaja različitih faktora na eksperimentalno određivanje rastvorljivosti.

The biopharmaceutics risk assessment roadmap (BioRAM) i *BioRAM Scoring Grid* su strategije za optimizaciju i razvoj lekova koje ukazuju da potrebe pacijenta treba uzeti u obzir u ranim fazama istraživanja [74, 75]. Na taj način, optimizacija farmakodinamičkog i farmakokinetičnog profila u skladu sa terapijskim ciljevima i načinima doziranja leka, može imati velike prednosti u smislu ubrzavanja postupka istraživanja, sakupljanja potrebnih informacija i prepoznavanje potencijalnih problema terapije, koji se uglavnom otkriju tek tokom kliničkih studija, kada je već dosta vremena i finansija utrošeno na istraživanje i razvoj.

Sve istaknute informacije ukazuju na značaj eksperimentalnog određivanja rastvorljivosti u procesu dizajna i razvoja lekova. Kvalitetni eksperimentalni podaci i pravilno tumačenje rezultata ključni su za formiranje pouzdanih baza podataka i donošenje odgovarajućih odluka u svim fazama procesa dizajna i razvoja lekova [14, 30, 76].

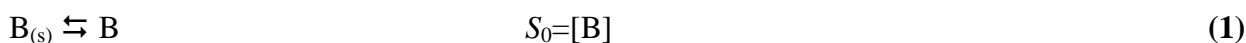
II.4 Uticaj različitih faktora na eksperimentalno određivanje rastvorljivosti

Prilikom eksperimentalnog određivanja rastvorljivosti i tumačenja dobijenih rezultata potrebno je voditi računa o različitim faktorima od kojih rastvorljivost zavisi: pH vrednost, temperatura, jonska sila, rastvarač, sastav čvrste faze, količina čvrste faze u višku, vreme uspostavljanja ravnoteže (faza mešanja i faza sedimentacije), način razdvajanja faza [1 – 3, 5, 14, 30, 32].

II.4.1. Zavisnost rastvorljivosti od pH vrednosti (profili rastvorljivosti)

Rastvorljivost molekula koji sadrži funkcionalne grupe koje mogu da jonizuju u vodenom rastvoru, zavisi od pH vrednosti [1]. Naelektrisani oblik jedinjenja (A^- za kiseline, BH^+ za baze) ima veću rastvorljivost u odnosu na nenaelektrisani oblik (HA za kiseline, B za baze). U zavisnosti od pH vrednosti rastvora i pK_a vrednosti molekula, menjaće se odnos količine naelektrisanog i nenaelektrisanog oblika supstance u rastvoru. Zbog toga, upotrebom Henderson–Hasselbalch-ove jednačine, može se izračunati funkcionalna zavisnost između rastvorljivosti i pH vrednosti.

Izvođenje funkcionalne zavisnosti između rastvorljivosti i pH vrednosti biće prikazano na primeru zasićenog rastvora slabe monoprotične baze B [3]. Heterogeni sistem u kome se nalazi supstanca B koja se u vodenom rastvoru ponaša kao monoprotična baza, može se opisati sledećim ravnotežnim reakcijama i njima odgovarajućim konstantama ravnoteža (1) i (2):



Na bilo kojoj pH vrednosti, ukupna rastvorljivost može se prikazati sledećom jednačinom:



Ukoliko se u sistemu odigravaju samo ravnoteže prikazane jednačinama (1) i (2), onda se u talogu nalazi samo baza $B_{(s)}$. Koncentracija molekulskog oblika baze u rastvoru biće konstantna, kao što se vidi iz jednačine (1), dok koncentracija naelektrisanog oblika mora biti promenljiva

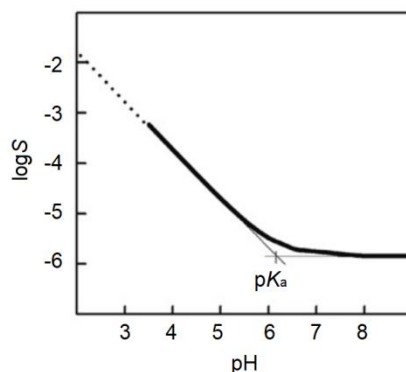
veličina. Zamenom jednačina (1) i (2) u jednačinu (3), dobija se praktičan izraz, u kome je pH jedina promenljiva:

$$S=[B]+[B][H^+]/K_a=[B](1+[H^+]/K_a) \quad (4)$$

$$S=S_0(1+10^{-pH+pK_a}) \quad (5)$$

$$\log S=\log S_0+\log(1+10^{-pH+pK_a}) \quad (6)$$

Grafički prikaz zavisnosti $\log S$ od pH vrednosti za monoprotičnu bazu (pK_a 6,1; $\log S_0$ -5,9) [48], dobijen pomoću jednačine (6), predstavljen je na **Slici 3**.



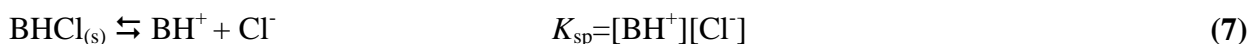
Slika 3. Dijagram zavisnosti $\log S$ –pH za monoprotičnu bazu (pK_a 6,1; $\log S_0$ -5,9) izračunat na osnovu HH jednačine. Adaptirano iz Avdeef, 2007 [48].

Na osnovu jednačine (6) i **Slike 3**, može se zaključiti sledeće:

- Kada je pH vrednost mnogo manja od pK_a , vrednost izraza 10^{-pH+pK_a} je veća od 1, jednačina (6) prelazi u jednostavniji oblik $\log S=\log S_0+pK_a-pH$. Drugim rečima, zavisnost $\log S$ od pH je linearna funkcija sa nagibom -1.
- Kada su vrednosti pH veće od pK_a , vrednost izraza 10^{-pH+pK_a} postaje dosta manja od 1, jednačina (6) prelazi u još jednostavniji oblik $\log S=\log S_0$. Odnosno, zavisnost $\log S$ od pH postaje horizontalna linija.
- Presek navedenih linearnih delova dijagrama odgovara pK_a vrednosti jedinjenja.

Zavisnost prikazana na **Slici 3** je teorijska. Međutim, u praksi najčešće nije moguće napraviti zasićene rastvore nekog jedinjenja u opsegu koncentracija koje se razlikuju za više od četiri reda veličine [3]. Kada se dostigne proizvod rastvorljivosti soli, koja se formira između katjona baze (BH^+) i anjona pozadinskog elektrolita (A^-), na dijagramu se može očekivati još jedan plato. Početak taloženja soli u 0,15 M NaCl grubo se može proceniti na osnovu "sdiff 3–4" aproksimacije, koja glasi: kada logaritam rastvorljivosti postane 4 puta veći od $\log S_0$ slabe kiseline (HA) ili 3 puta veći od $\log S_0$ slabe baze (B), počinje taloženje natrijumove soli slabe kiseline (NaA) ili hloridne soli slabe baze (BHCl).

Izvođenje zavisnosti $\log S$ od pH, kada se uzima u obzir taloženje baze i/ili soli, biće prikazano na već opisanom primeru [3]. Ravnoteže u ovom sistemu predstavljaju se jednačinama (1), (2) i (7). Ukupna rastvorljivost S se uobičajeno izražava prethodno navedenom jednačinom (3).



U zavisnosti od vrste taloga, jednačina (3) može se rešiti na više načina [3]. Ukoliko je u čvrstoj fazi prisutna samo baza $B_{(s)}$ (proizvod rastvorljivosti soli $BHCl_{(s)}$ nije dostignut) jednačina (3) se rešava na već opisan način. Zavisnost $\log S$ od pH opisuje se jednačinom (6). Međutim, kada se dostigne proizvod rastvorljivosti soli i kada je talogu prisutna samo so $BHCl_{(s)}$, konstantna veličina u jednačini (3) više nije koncentracija molekulskog oblika baze, već koncentracija jonizovanog oblika $[BH^+]$. U skladu sa tim, izvođenje se menja (jednačine (8 – 11)):

$$S=[BH^+](K_a/[H^+]+1) \quad (8)$$

$$S=K_{sp}/[Cl^-](10^{-pK_a+pH}+1) \quad (9)$$

$$S=S_i(10^{-pK_a+pH}+1) \quad (10)$$

$$\log S=\log S_i+\log(10^{-pK_a+pH}+1) \quad (11)$$

Taloženje hidrohloridne soli dešava se na niskim pH vrednostima, koje su mnogo manje od pK_a , što znači da je je izraz 10^{-pK_a+pH} mnogo manji od 1, pa jednačina (11) prelazi u jednostavan oblik $\log S=\log S_i$ [3]. Drugim rečima, zavisnost $\log S$ od pH postaje horizontalna linija. Oznaka S_i predstavlja rastvorljivost konjugovane kiseline BH^+ , odnosno rastvorljivost soli ($S_i=K_{sp}^{1/2}$, K_{sp} predstavlja proizvod rastvorljivosti soli). Rastvorljivost S_i je uslovna konstanta, zato što zavisi od koncentracije hlorida (kontra jona). U ovim uslovima koncentracija hloridnih jona je približno konstantna.

U prisustvu viška kontra jona, rastvorljivost počinje da opada, kao posledica efekta zajedničkog jona $S_i=K_{sp}/[X^-]$ [2, 23, 24, 29, 33, 35, 77 – 81]. Odnosno, $\log S$ –pH zavisnost prestaje da bude horizontalna linija. Količina dodatog kontra jona u višku određuje za koliko će se smanjiti vrednost rastvorljivosti [23]. Ukoliko je smanjenje rastvorljivosti veće od očekivanog (na osnovu koncentracije dodatog kontra jona), velika je verovatnoća da se u ispitivanom sistemu dešava neka sporedna reakcija. Na rastvorljivost soli, osim koncentracije kontra jona, utiče i vrednost proizvoda rastvorljivosti soli [80]. Na primer, ukoliko je promena koncentracije kontra jona jednaka, efekat zajedničkog jona biće manje izražen kod soli koje imaju višu vrednost K_{sp} nego u slučaju soli koje imaju nižu K_{sp} .

Za razliku od rastvorljivosti soli, koja je uslovna konstanta, proizvod rastvorljivosti soli je prava termodinamička konstanta [35, 82]. Uprkos tome, u literaturi se retko navode proizvodi rastvorljivosti soli. Najčešće se određuju i navode rastvorljivosti soli. Međutim, postoji dosta faktora koji otežavaju tumačenje ovakvih eksperimenata i poređenje rezultata između različitih laboratorija. Zasićeni rastvori soli koncentrovani su od zasićenih rastvora odgovarajućih kiselina ili baza, zbog veće rastvorljivosti supstance u obliku soli. U uslovima povećane jonske sile, teže je kontrolisati i predvideti koeficijente aktiviteta. Osim toga, kalibracija elektrode puferima, čija je jonska sila 0,15 M (ili 0,10 M kod standardnih „NIST-traceable“ pufera pH 4,00 (ftalatni) ili pH 7,00 (fosfatni) [14]) često nije validna pri velikim jonskim silama (>1 M), posebno kada je $pH < 1$ ili $pH > 12$. Složenost ispitivanog sistema povećava se kod površinski aktivnih jedinjenja, koja pri visokim koncentracijama grade različite agregate ili micelle.

Na osnovu do sada izvedenih jednačina, jasno je da se profil rastvorljivosti slabih monoprotičnih baza može opisati pomoću dve zavisnosti [80]: jedna izvedena u uslovima kada se u sistemu taloži samo baza (6), druga izvedena u uslovima kada se u sistemu taloži samo so (11). Dve navedene krive seku se u jednoj tački, koja se naziva pH_{max} ili pK_a^{GIBBS} . Kada je $pH=pH_{max}$, u

talogu se istovremeno nalaze baza i so. U tom slučaju, oba člana u jednačini (3) postaju konstantna, pa je $S=S_0+S_i$ [3].

Prema Gibbs-ovom faznom pravilu (Gibbs Phase rule), rastvorljivost i pH ostaju konstantni sve dok su u talogu prisutni i baza i so [23]:

a) ako se u ovaj sistem doda mala količina hlorovodonične kiseline, dolazi do reakcije sa rastvorenom bazom $B_{(aq)}$, pri čemu nastaje $BH^+_{(aq)}$. Smanjenje koncentracije $B_{(aq)}$, dovodi do rastvaranja nove količine baze, dok povećanje koncentracije $BH^+_{(aq)}$ dovodi do taloženja nove količine hidrohloridne soli, kako bi se ponovo uspostavilo ravnotežno stanje. Osim toga, trenutno snižena pH vrednost suspenzije, ponovo dostiže pH_{max} . Ukupan rezultat je da u čvrstoj fazi, dolazi do prelaza baze u so. Dodatkom nove količine HCl pH suspenzije se neće promeniti, sve dok se celokupna količina baze u talogu ne prevede u so.

b) Ako se u sistem doda mala količina natrijum-hidroksida, dolazi do reakcije sa rastvorenim $BH^+_{(aq)}$, pri čemu nastaje $B_{(aq)}$. Smanjenje koncentracije $BH^+_{(aq)}$ dovodi do rastvaranja nove količine soli, dok povećanje koncentracije $B_{(aq)}$, dovodi do taloženja nove količine baze. Ponovnim uspostavljanjem ravnoteže, trenutno povećana pH vrednost, ponovo dostiže pH_{max} . Ukupan rezultat je da u čvrstoj fazi dolazi do prelaza soli u bazu. Dodavanjem nove količine NaOH, neće doći do promene pH vrednosti suspenzije, sve dok cela količina soli ne pređe u bazu.

Bogardus i Blackwood su 1979. godine predložili da se izjednačavanjem $\log S$ dobijenih iz dve zavisnosti, može izvesti izraz za pH_{max} (jednačina (12)):

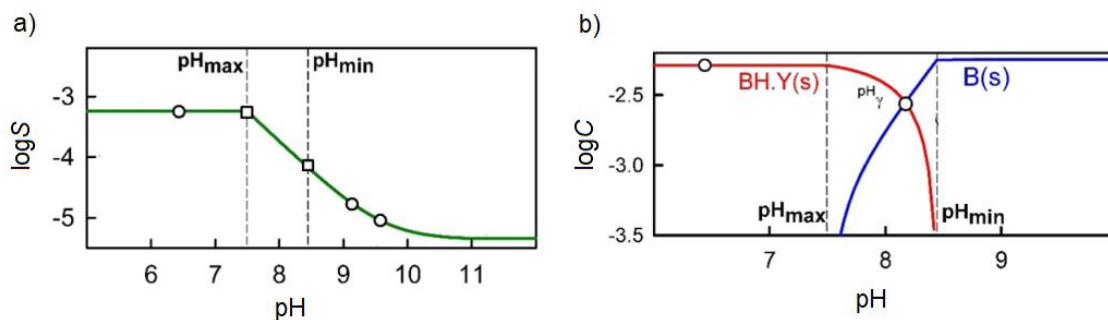
$$pH_{max}=pK_a + \log([S_0]/[S_i]) \quad (12)$$

Na osnovu ovog izraza, moguće je definisati od čega sve zavisi vrednost pH_{max} [80]:

- povećanje pK_a vrednosti za 1, povećava vrednost pH_{max} za 1,
- povećanje sopstvene rastvorljivosti baze S_0 za jedan red veličine ($10\times$), povećava vrednost pH_{max} za 1,
- smanjenje rastvorljivosti konjugovane kiseline S_i za jedan red veličine ($10\times$), povećava vrednost pH_{max} za 1.

Naveden opis sistema u pH_{max} oblasti [23] može se primeniti samo ukoliko je eksperiment dizajniran tako da se pH vrednost suspenzije slabe baze smanjuje dodavanjem kiseline koja daje kontra jon za nastajanje taloga u obliku soli u pH_{max} oblasti [82, 83]. Međutim, dolazi do odstupanja kada se pH vrednost suspenzije soli slabe baze, povećava pomoću jake baze (NaOH). Odnosno, tokom transformacije u talogu (iz soli u bazu) dolazi do promene i pH vrednosti i rastvorljivosti. Dok se u talogu nalaze i so i baza, rastvorljivost se smanjuje a pH povećava za vreme prelaza soli u bazu u pH oblasti koja je definisana granicama $pH_{max} - pH_{min}$. Oznake max i min, označavaju maksimalnu i minimalnu rastvorljivost suspenzije koja sadrži i bazu i so u talogu (ne maksimalnu i minimalnu pH vrednost). Kada talog sadrži jednaku količinu baze i njene soli, pH vrednost suspenzije se obeležava sa pH_{γ} . Ova vrednost se nalazi u pH opsegu $pH_{max} - pH_{min}$.

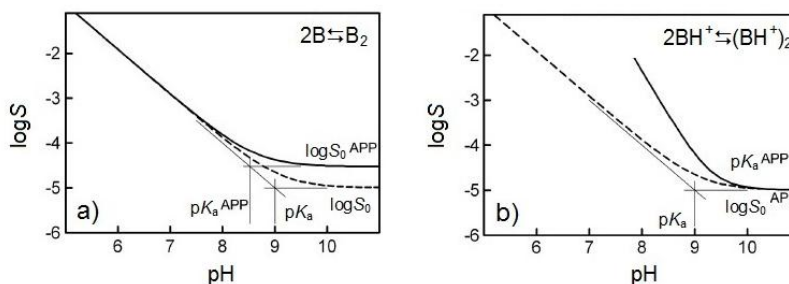
Na **Slici 4.** dati su primeri profila rastvorljivosti monoprotične baze B i dijagrama raspodele u čvrstoj fazi. Kada je $pH < pH_{max}$ u čvrstoj fazi nalazi se so $BHY_{(s)}$, a kada je $pH > pH_{min}$ u čvrstoj fazi nalazi se baza $B_{(s)}$. U opsegu pH vrednosti definisanim granicama pH_{max} i pH_{min} dolazi do faznog prelaza $BHY_{(s)}$ u $B_{(s)}$.



Slika 4. a) Profil rastvorljivosti monoprotične baze sa obeleženim opsegom $pH_{max} - pH_{min}$. Rastvorljivost izražena je u jedinicama mol/L, b) Dijagram raspodele u čvrstoj fazi. Koncentracija taloga izražena je kao broj molova čvrste faze u 1 L suspenzije. Adaptirano iz Avdeef, 2021 [82].

Avdeef je primetio da širina opsega $pH_{max} - pH_{min}$, u kome se u talogu nalaze i baza i so, zavisi od količine soli dodate na početku eksperimenta za određivanje rastvorljivosti [82, 83]. Ponavljanjem eksperimenta sa većom količinom dodate soli, formira se širi pH opseg, pri čemu vrednost pH_{max} ostaje nepromenjena, a vrednosti pH_{min} i pH_{γ} rastu proporcionalno. Ukoliko se eksperiment ponovi sa vrlo malim viškom dodate soli, pH_{max} ostaje konstantna, dok se vrednosti pH_{min} i pH_{γ} praktično izjednačavaju sa pH_{max} .

Ukoliko u heterogenom sistemu dolazi do sporednih reakcija (agregacija, građenje kompleksa i slično), profil rastvorljivosti će odstupati od teorijskog profila, izračunatog na osnovu HH jednačine [3, 48, 54]. U nekim slučajevima, moguće je pretpostaviti vrstu sporedne reakcije agregacije, na osnovu karakterističnog odstupanja na $\log S - pH$ dijagramu. Na **Slici 5.** prikazana su karakteristična odstupanja od teorijskog profila rastvorljivosti monoprotične slabe baze ukoliko u sistemu dolazi do građenja neutralnog i katjenskog dimera.



Slika 5. Karakteristična odstupanja profila rastvorljivosti od teorijskog (izračunatog na osnovu HH jednačine) u slučaju nastajanja: a) neutralnog dimera baze (B_2) i b) katjenskog dimera baze ($(BH^+)_2$). Rastvorljivost izražena je u jedinicama mol/L. Adaptirano iz Avdeef, 2012 [3].

U **Tabeli 2.** prikazan je pregled karakterističnih odstupanja profila rastvorljivosti od teorijskog profila slabih monoprotičnih kiselina i baza ukoliko u sistemu nastaju neutralni (H_2A_2 i B_2), anjonski/katjonski (A_2^{2-} i $(BH^+)_2$) ili mešani (AHA^- i BHB^+) agregati.

Tabela 2. Karakteristična odstupanja profila rastvorljivosti od teorijskog (izračunatog na osnovu HH jednačine) u slučaju reakcija agregacije^a [3, 48, 54]

reakcija	primer	pK_a^{APP} i pK_a	S_0^{APP} i S_0	nagib
Nastajanje neutralnog agregata	$2HA \rightleftharpoons H_2A_2$	$pK_a^{APP} > pK_a$	$S_0^{APP} > S_0$	1
Nastajanje neutralnog agregata	$2B \rightleftharpoons B_2$	$pK_a^{APP} < pK_a$	$S_0^{APP} > S_0$	-1
Nastajanje anjonskog agregata	$2A^- \rightleftharpoons A_2^{2-}$	$pK_a^{APP} < pK_a$	$S_0^{APP} = S_0$	$\neq 1$
Nastajanje katjonskog agregata	$2BH^+ \rightleftharpoons (BH^+)_2$	$pK_a^{APP} > pK_a$	$S_0^{APP} = S_0$	$\neq -1$
Nastajanje mešanih agregata	$A^- + HA \rightleftharpoons AHA^-$	$pK_a^{APP} < pK_a$	$S_0^{APP} = S_0$	1
Nastajanje mešanih agregata	$BH^+ + B \rightleftharpoons BHB^+$	$pK_a^{APP} > pK_a$	$S_0^{APP} = S_0$	-1

^aOznake pK_a^{APP} i S_0^{APP} su vrednosti kiselinske konstante i sopstvene rastvorljivosti u uslovima kada dolazi do sporednih reakcija (APP – apparent).

Stepen agregacije nije moguće proceniti iz $\log S$ –pH dijagrama u slučaju građenja neutralnih agregata [54]. U slučaju građenja katjonskih/anjonskih agregata stepen agregacije odgovara nagibu linearnog dela $\log S$ –pH dijagrama. Karakteristična odstupanja prikazana u **Tabeli 2.** mogu biti prilično korisna tokom tumačenja rezultata, ali mora se voditi računa da razlog nekog odstupanja može biti drugačiji od navedenog u tabeli. Na primer, veća sopstvena rastvorljivost od očekivane, može značiti da nije došlo do uspostavljanja ravnoteže u sistemu i da je potrebno još vremena kako bi se ravnoteža uspostavila. Osim toga, ova tabela jasno pokazuje važnost određivanja pK_a vrednosti nezavisnom metodom (potenciometrija, spektrofotometrija, kapilarna elektroforeza, hromatografija, NMR, konduktometrija) [3]. Vrednosti pK_a dobijene iz profila rastvorljivosti mogu biti drugačije od pravih vrednosti ukoliko se u sistemu odigravaju sporedne reakcije [14, 32, 84].

Ukoliko u rastvoru dolazi do građenja kompleksa između ispitivane supstance i liganda, rastvorljivost se povećava, ako su ispitivana supstanca – ligand kompleksi rastvorni u vodi [3, 48]. Ispitivane supstance mogu se vezivati i za surfaktante, koji postoje u micelarnom obliku. Kada je koncentracija surfaktanta manja od kritične micelarne koncentracije, surfaktant poboljšava kvašljivost, povećava brzinu rastvaranja, ali ne povećava drastično rastvorljivost ispitivane supstance. Kada je koncentracija surfaktanta veća od kritične micelarne koncentracije, dolazi do povećanja rastvorljivosti ispitivane supstance.

Interpretacija rezultata može biti vrlo zahtevna, kada u sistemu dolazi do više različitih sporednih reakcija: nastajanje više različitih agregata ili nastajanje agregata i kompleksa [3, 48].

II.4.2 Temperatura

Rastvorljivost se kod većine čvrstih supstanci povećava sa porastom temperature [5]. Kako bi određivanje rastvorljivosti bilo pouzdano, potrebno je imati odgovarajući sistem kontrole i merenja temperature suspenzije tokom eksperimenta [5, 14, 32]. Rastvorljivost se najčešće određuje na 25 ili 37 °C. Prikaz rezultata rastvorljivosti ne može se smatrati ozbiljnim, ukoliko nije navedena temperatura na kojoj je određivanje urađeno. Nije dovoljno napisati da je rastvorljivost određena na sobnoj temperaturi, zato što je „sobna temperatura“ nedovoljno definisan pojam, koji može da varira u različitim laboratorijama u zavisnosti od doba dana, godišnjih doba, propisa održavanja temperature i slično.

II.4.3 Jonska sila

„Jonska sila rastvora (I) je mera elektrostatičkog dejstva svih jona prisutnih u rastvoru“ [85]. Može se izračunati na osnovu jednačine (13), prema kojoj je jonska sila jednaka polovini zbira proizvoda koncentracije svakog jona (c_i) i kvadrata njegovog naelektrisanja (z_i):

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i \cdot z_i^2 \quad (13)$$

Rastvorljivost zavisi od jonske sile, posebno u slučajevima kada je u talogu, koji je u ravnoteži sa rastvorom, prisutna so [14, 32]. Jonska sila može se izračunati samo kada su dostupni podaci o tačnom obliku, stehiometriji i masi ispitivane supstance, komponenti pufera i pozadinskog elektrolita (koji se obično dodaje radi podešavanja jonske sile). Prilikom određivanja profila rastvorljivosti nije jednostavno kontrolisati jonsku silu, zato što se jonska sila menja sa promenom pH vrednosti kao posledica promena sastava rastvora/suspenzije [37].

Koncentracione konstante ravnoteža (konstante agregacije, proizvodi rastvorljivosti, konstante kiselosti i druge) zavise od jonske sile, za razliku od termodinamičkih konstanti u kojima figurišu aktiviteti [86]. Aktivitet jona u rastvoru predstavlja efektivnu koncentraciju jona. Jednak je proizvodu koncentracije (c_i) i koeficijenta aktiviteta jona (y_i):

$$a_i = c_i \cdot y_i \quad (14)$$

Razlike između aktiviteta i koncentracije dolaze do izražaja u koncentrovanim rastvorima kao posledica elektrostatičkog dejstva između jona [85]. Tada je aktivitet manji od koncentracije, a koeficijent aktiviteta manji od 1. U vrlo koncentrovanim rastvorima, aktivitet može biti veći od koncentracije. Aktivitet je jednak koncentraciji u vrlo razblaženim rastvorima ($I < 10^{-4}$ M) kada je elektrostatičko dejstvo između jona zanemarljivo.

Koeficijenti aktiviteta mogu se izračunati na osnovu uprošćene Debye–Hückel-ove jednačine, koja se primenjuje kada je $I < 0,1$ M (jednačina (15)):

$$-\log y_i = \frac{0,5 \cdot z^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (15)$$

Ukoliko je jonska sila veća od 0,1 M, koristi se Davis-ova jednačina (jednačina (16)):

$$-\log y_i = \frac{0,5 \cdot z^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,2 \cdot I \quad (16)$$

II.4.4 Puferi

Podešavanje pH vrednosti prilikom određivanja rastvorljivosti postiže se upotrebom različitih pufera, koji se mogu pripremati prema utvrđenim procedurama ili se mogu koristiti komercijalno dostupni puferi [14]. Prilikom dodavanja ispitivane supstance u pufer, pH rezultujućeg rastvora se uglavnom promeni u zavisnosti od puferskog kapaciteta, rastvorljivosti, dodate količine i jonizacionih karakteristika ispitivanog jedinjenja. Zbog toga je važno uvek izmeriti pH rezultujućeg heterogenog sistema u kome je postignuta ravnoteža [14, 32].

Osim što treba voditi računa o pH vrednosti, postoji još važnih detalja koji mogu uticati na rastvorljivost – na eksperiment i na tumačenje rezultujućeg logS–pH dijagrama [14]. Na primer, ukoliko se koristi metansulfonska kiselina ili fosfatni pufer, nije moguće odrediti koncentraciju supstance masenom spektrometrijom. Puferi koji sadrže bornu kiselinu kovalentno interaguju sa 1,2-diol grupama. Korišćenje kombinacije etilendiamina i fosfatnog pufera je komplikovano zbog građenja jonskih parova između pomenutih komponenti. Građenje kompleksa između pufera i ispitivanih supstanci uglavnom povećava rastvorljivost. Previše koncentrovani puferi nepotrebno povećavaju jonsku silu. Neki puferi imaju visoku apsorbanciju u UV/VIS oblasti, što može otežati određivanje koncentracije supstanci.

U nekim istraživanjima podešavanje pH vrednosti postiže se dodavanjem HCl ili NaOH, a ulogu pufera ima sama jonizujuća supstanca [14]. Međutim, kod slabo rastvornih supstanci javlja se problem podešavanja pH u delovima gde je puferski kapacitet zanemarljiv. Nedovoljno veliki puferski kapacitet može se prevazići korišćenjem univerzalnih puferskih smeša zadovoljavajućeg puferskog kapaciteta u širokoj oblasti pH, kao što je Britton–Robinson univerzalni pufer (40 mM sirćetna kiselina, 40 mM fosforna kiselina i 40 mM borna kiselina) početne pH vrednosti oko 1,9. Dodavanjem NaOH može se podesiti pH u širokom opsegu. Mana ovog pufera je drastična promena jonske sile sa promenom pH. Kako bi se prevazišao problem promenljive jonske sile u širokom pH opsegu osmišljen je *Minimalist Universal Buffer* AEM-10.10.30 (10 mM sirćetna kiselina, 10 mM etilendiamin i 30 mM metansulfonska kiselina), početnog pH oko 1,7. Zahvaljujući tome što je ovaj pufer kombinacija kiselina i baze, jonska sila ostaje skoro konstantna u širokom pH opsegu.

II.4.5 Sastav čvrste faze

Eksperimentalno određivanje rastvorljivosti zahteva pripremu zasićenog rastvora supstance, odnosno heterogenog sistema, koji se sastoji od tečne i čvrste faze. Kao što je važno poznavati sastav rastvora i prepoznati uticaj sporednih reakcija (nastajanje kompleksa, agregata, micela i slično), isto tako je važno poznavati sastav čvrste faze i njen uticaj na rastvorljivost [2, 3, 14].

Čvrsta faza u heterogenom sistemu može biti u **kristalnom** ili **amorfnom obliku** (nekada u delimično kristalnom/amorfnom obliku) [2]. Talog koji se izdvoji na početku eksperimenta obično je amorfan. Međutim, prilikom uspostavljanja ravnoteže, talog iz amornog prelazi u termodinamički stabilniji kristalni oblik. Makroskopska svojstva amornih taloga odgovaraju svojstvima čvrste faze, dok mikroskopska svojstva odgovaraju svojstvima tečnosti. Drugim rečima, uređenost taloga u amornom obliku je kratkog dometa. U većini slučajeva, rastvorljivost amornog oblika je veća u odnosu na kristalni oblik, tako da je rastvorljivost određena na početku eksperimenta (kinetička rastvorljivost) veća od rastvorljivosti određene nakon uspostavljanja ravnoteže u sistemu (termodinamička rastvorljivost) [2, 3].

Polimorfi (polimorfne modifikacije) su kristali istog hemijskog sastava, ali različite unutrašnje strukture (različite dimenzije jedinične ćelije, različito molekulsko pakovanje, različite konformacije ili različite tautomerne strukture) i različitih fizičkih i hemijskih osobina [2]. Drugačije fizičke i hemijske osobine polimorfa uslovljene su razlikama u unutrašnjoj strukturi kristala. Pudipeddi i Serajuddin su 2005. godine analizirali objavljene podatke o rastvorljivosti 55 izabranih jedinjenja koja postoje u obliku dva ili više polimorfa. Analizom podataka pokazano je da prosečan odnos rastvorljivosti dva polimorfna oblika iznosi 1,7; ali ima izuzetaka kod kojih je ovaj odnos veći [87]. Odnos rastvorljivosti polimorfnih oblika izražen je u odnosu na polimorf koji ima najmanju rastvorljivost, kada je broj polimorfih oblika veći od dva.

Solvati su kristali koji sadrže molekule rastvarača ugrađene u kristalnu rešetku date supstance [2]. **Hidrati** su solvati u kojima je rastvarač voda. Zahvaljujući različitim interakcijama između jedinjenja i molekula vode (mali molekul, može biti i donor i akceptor vodonične veze), hidrati imaju karakteristične kristalne strukture koje se razlikuju po fizičkim i hemijskim osobinama od anhidrovanog oblika, ali i od hidrata drugačije stehiometrije (stehiometrijski hidrati; tačno definisan sadržaj vode). Analizom podataka iz literature, koji se tiču rastvorljivosti parova anhidrovani oblik/hidrat istog jedinjenja, Pudipeddi i Serajuddin [87] su primetili da je kod mnogih parova (ne svih), anhidrovani oblik prosečno dva puta rastvorljiviji u vodenoj sredini od hidratisanog oblika. Postoje izuzeci od ovog pravila, ima slučajeva kada je rastvorljivost hidrata veća od rastvorljivosti anhidrovanog oblika [88]. Za razliku od opisanih stehiometrijskih hidrata, sadržaj vode u nestehiometrijskim hidratima nije konstantan i kristalna struktura supstance ne zavisi u velikoj meri od sadržaja vode [2]. Međutim, u trenutku potpune dehidratacije ovi hidrati često gube kristalnu strukturu i prelaze u amorfni oblik.

Habitusi su kristali istog hemijskog sastava i iste kristalne strukture (isti polimorf i ista jedinična ćelija) ali su različitih oblika (različite morfologije) [2].

Soli su supstance koje nastaju u reakciji između kiselina i baza pod uslovom da je minimalna razlika između pK_a vrednosti konjugovane kiseline (BH^+) i kiseline (HA) 3 jedinice [2, 82, 83]. Rastvorljivost soli je veća u odnosu na rastvorljivost čiste kiseline ili baze [2]. Ukoliko se porede različite soli iste kiseline ili baze, očekuju se različite rastvorljivosti, zato što različite soli imaju drugačije kristalne rešetke. Prilikom određivanja rastvorljivosti soli važno je utvrditi sastav čvrste faze kada je u sistemu uspostavljena ravnoteža, zato što bilo kakve transformacije u čvrstoj fazi mogu dovesti do pogrešnog tumačenja rezultata rastvorljivosti soli [81]. Spontani prelaz soli u čistu kiselinu ili bazu tokom određivanja rastvorljivosti soli u vodi, naziva se disproporcija (*disproportionation*) [82, 83]. Avdeef je podelio soli prema „sklonosti“ ka disproporciji na μ -tip i δ -tip soli. Soli μ -tipa (*microclimate stable*) su termodinamički stabilne u čistoj vodi, za razliku od soli δ -tipa (*disproportionation prone*) koje spontano podležu procesu disproporcije.

Kokristali se sastoje od dva kristala, između kojih postoje nejonske interakcije, kao što su vodonične veze, Van der Waals-ove interakcije, π - π interakcije [2]. Stehiometrijski odnos između dva kristala je tačno definisan, kokristal je homogeni kristalni oblik. Jasno je da različiti kokristali imaju različite fizičke i hemijske osobine. Rastvorljivost kokristala zavisi od pH vrednosti, pa se očekuju različiti profili rastvorljivosti u zavisnosti od toga da li su komponente kokristala jonizujuće/nejonizujuće ili amfoterne/bazne/kisele [14]. Kako bi se izbegla jonizacija u čvrstoj fazi, razlika u pK_a vrednostima, na primer baznog aktivnog farmaceutskog sastojka i kisele komponente (koformera) mora biti ΔpK_a ($pK_a^{baze} - pK_a^{kiselina}$) < 1 [89].

Solvati, hidrati, soli i kokristali mogu da postoje u više polimorfih oblika [2].

Higroskopnost u širem smislu je svojstvo taloga da sorbuje vodu iz atmosfere na određenoj temperaturi i relativnoj vlažnosti vazduha (RH), pri čemu se između čvrste faze i vode formiraju nekovalentne interakcije (vodonična veza) sa efektom na određena svojstva taloga [2]. Prilikom

adsorpcije, voda interaguje sa molekulima na površini taloga, tako da je praktično količinu adsorbovane vode izraziti kao masu vode po površini taloga (kg/m^2). Prilikom adsorpcije voda ulazi u unutrašnjost taloga, pa se količina adsorbovane vode izražava procentualno, kao odnos mase vode i ukupne mase taloga i vode (nekada kao odnos mase vode i mase „suvog“ taloga). Iz načina izražavanja količine sorbovane vode, proizilazi da adsorpcija zavisi od površine taloga izloženog atmosferi, a adsorpcija od mase taloga. Proces vraćanja sorbovane vode (iz taloga) nazad u atmosferu naziva se desorpcija i obično se dešava kao posledica smanjenja relativne vlažnosti vazduha i/ili povećanja temperature. U kontekstu proučavanja rastvorljivosti, sorbovana voda u talogu može biti posledica izlaganja taloga atmosferi (odnosno određenoj vlažnosti vazduha) ili posledica nedovoljnog sušenja taloga na vazduhu (nakon razdvajanja tečne i čvrste faze). U uslovima visoke vlažnosti vazduha, većina taloga će biti higroskopna, međutim u uslovima niske vlažnosti vazduha, samo su određeni talozi higroskopni. Detaljna analiza različitih interakcija između vode i taloga, kao i njihov uticaj na osobine različitih vrsta kristalnih ili amorfnih taloga i multikomponentnih taloga, prikazana je u odgovarajućoj literaturi [2, 90].

II.4.6 Količina čvrste supstance u višku

Uticaj količine čvrste supstance u višku na rastvorljivost dolazi do izražaja kod površinski aktivnih supstanci ili kod soli [54, 81, 91, 92].

Prilikom rada sa jedinjenjima u obliku soli, dodata količina soli može uticati na transformacije u čvrstoj fazi ili određivati koja će se hemijska vrsta taložiti u datim uslovima, što ima uticaja i na rastvorljivost i na pH vrednost suspenzije [81, 91]. To je jedan od razloga, zašto je neophodno znati tačnu količinu soli korišćenu u eksperimentu za određivanje rastvorljivosti i zašto je potrebno proveriti sastav čvrste faze kada je u sistemu uspostavljena ravnoteža [81].

Ukoliko dolazi do građenja agregata u sistemu, onda kritična micelarna koncentracija i količina čvrste supstance u višku određuju kolika će biti rastvorljivost molekula [54, 92]. Ukoliko dodata količina supstance nije dovoljna da se postigne KMK, rastvorljivost će biti manja. Ukoliko je dodata količina supstance dovoljna da se dostigne i pređe vrednost KMK, rastvorljivost će biti veća. Primer ovakvog uticaja može se videti u brzini delovanja amiodarona u obliku oralne i parenteralne formulacije. U parenteralnoj formulaciji koncentracija amiodarona je velika (iznad vrednosti KMK), tako da se terapijski efekat primećuje posle nekoliko minuta. Ukoliko se amiodaron unosi oralnim putem (koncentracija amiodarona ispod vrednosti KMK), potrebno je 30 dana kako bi se dostigao zadovoljavajući terapijski efekat.

Efekat količine čvrste supstance u višku na vrednost sopstvene rastvorljivosti hidrohlorotiazida proučavan je 2008. godine [5]. Dobijeni rezultati pokazali su da vrednost sopstvene rastvorljivosti ne zavisi od količine čvrste supstance u višku. Takvi rezultati su u skladu sa jednostavnim modelima u kojima se rastvorljivost može opisati HH jednačinom, prema kojima $\log S$ -pH profili rastvorljivosti ne zavise od dodate količine čvrste supstance, sve dok je čvrsta supstanca dodata u dovoljnom višku da rastvor bude zasićen [92].

Prema navodima iz literature, preveliki višak čvrste faze tokom eksperimenta za određivanje rastvorljivosti nije preporučljiv zbog teškoća u radu – merenje pH vrednosti i razdvajanje faza [5]. Osim toga, preveliki višak čvrste faze treba izbegavati u oblasti oko pH_{max} , zato što se može desiti da jedinjenje u obliku kiseline ili baze obavije jedinjenje u obliku soli i na taj način spreči kontakt između soli i rastvora [37]. Obavijene čestice (*coated particles*) mogu biti stabilne u suspenziji, tako

da na procese uspostavljanja ravnoteže u sistemu utiče samo spoljašnji sloj obavijene čestice, koji može biti kristalni, amorfni ili uljast [14].

II.4.7 Vreme uspostavljanja ravnoteže

Glavni uslov za precizno i tačno određivanje termodinamičke rastvorljivosti je postojanje ravnoteže između rastvora i taloga u heterogenom sistemu. Ravnotežno stanje se postiže kada se izjednače brzine rastvaranja i taloženja [14, 32]. Da bi se uspostavila ravnoteža, potrebno je da sistem prođe kroz dve faze: fazu mešanja i fazu sedimentacije. Iako je intenzivno mešanje suspenzije dovoljnom brzinom važno (da bi se postigla velika dodirna površina između čestica taloga i rastvora), pokazano je da vreme sedimentacije ipak ima značajniji uticaj na uspostavljanje stabilne ravnoteže [5, 14]. Ovaj efekat se posebno može primetiti u slučajevima kada za vreme intenzivnog mešanja dolazi do građenja prezasićenih rastvora.

Vreme potrebno za uspostavljanje ravnoteže, povezano je sa brzinom rastvaranja, koja zavisi od osobina taloga – morfologije, stepena kristalnosti (amorfni talozi se brže rastvaraju od kristalnih), veličine čestica (mikrokristali se brže rastvaraju od krupnijih kristala) i stepena hidratacije taloga (anhidrovani talozi se uglavnom brže rastvaraju u odnosu na hidrate) [14, 32]. Osim toga, primećeno je i da se čisti enantiomeri brže rastvaraju od racemskih smeša [32]. Vreme uspostavljanja ravnoteže može se razlikovati u različitim serijama iste vrste uzorka, ukoliko postoje razlike u fizičkim i hemijskim osobinama u okviru serija iste vrste uzorka [81].

Optimalno vreme mešanja i sedimentacije treba proveriti za svako jedinjenje, ali se pokazalo da je 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije) dovoljno za većinu supstanci [5, 14, 32]. Izuzetak su izuzetno teško rastvorna jedinjenja, koja imaju vrlo malu brzinu rastvaranja. Tada je potrebno produžiti vreme za uspostavljanje ravnoteže, ali ne previše, zato što posle određenog vremena postoji opasnost od razlaganja uzorka, promene pH vrednosti, isparavanja rastvora, “kvarenja” pufera pod uticajem razvitka gljivica, algi, mikroorganizama... kao i teškoća u kontroli temperature [14].

II.4.8 Razdvajanje faza

Razdvajanje faza heterogenog sistema postiže se sedimentacijom, centrifugiranjem ili filtracijom i smatra se uspešnim kada je dobijeni rastvor jedinjenja potpuno bistar, odnosno kada ne sadrži čestice taloga [14].

Iako je sedimentacija najbezbedniji i najjednostavniji način razdvajanja faza, često nije dovoljan, pa je potrebno dodatno filtrirati ili centrifugirati suspenziju [14]. Centrifugiranje se koristi u slučaju zamućenih suspenzija, kojima je potrebno mnogo vremena da se izbistre [5, 14]. Ovakve suspenzije nastaju kada se radi sa jedinjenjima koja postoje u rastvoru u obliku micela ili agregata. Kada nije moguće razdvojiti faze sedimentacijom i/ili centrifugiranjem, koristi se sedimentacija praćena filtracijom. Filtracija je najmanje bezbedan način razdvajanja faza, zbog niza faktora koji mogu da utiču na rezultat određivanja rastvorljivosti [14]. Jedan od ključnih koraka je pravilan izbor i pravilno korišćenje filtera. Filteri se razlikuju po materijalu od koga je napravljena membrana (poliviniliden-fluorid (PVDF), polietarsulfon (PES), politetrafluoroetilen (PTFE), poliamid,

poliimid, polietilen (PE), polipropilen (PP) i drugi), kvašljivosti (hidrofilni i hidrofobni), prečniku (25 mm uobičajeni) i veličini pora (0,22 μm i 0,45 μm uobičajeno) [93].

Upotreba filtera često dovodi do negativnih grešaka u određivanju rastvorljivosti, koje se javljaju kao posledica adsorpcije supstance na membranu filtera [14]. Kako bi se ovaj problem prevazišao, preporučuje se odbacivanje početnog dela filtrata (u kome se nalazi manja koncentracija ispitivane supstance zbog adsorpcije na membrani). Kada se membrana filtera zasiti supstancom, razdvajanje faza filtracijom daje dobre rezultate. U literaturi je pokazano da stepen adsorpcije jedinjenja na membranu filtera zavisi od kiselo-baznih karakteristika i polarnosti supstance [14, 93, 94]. Hidrofilna membrana u većem stepenu adsorbuje naelektrisani oblik jedinjenja, a hidrofobna membrana nanaelektrisani oblik. Prema tome, za razdvajanje faza u slučaju naelektrisanih oblika jedinjenja bolje je koristiti filtere sa hidrofobnim membranom, a u slučaju nanaelektrisanih oblika jedinjenja filtere sa hidrofilnom membranom. Pozitivne greške u određivanju termodinamičke rastvorljivosti, javljaju se kada se filtracija koristi odmah nakon faze mešanja [5, 14]. Prvi razlog je već pomenuto građenje prezasićenih rastvora. Drugi razlog je nedovoljno vremena za sedimentaciju suspendovanih čestica manjih od pora filtera.

II.5 Metode za određivanje rastvorljivosti

II.5.1 Turbidimetrija

Turbidimetrija je metoda za određivanje kinetičke rastvorljivosti [1]. Originalna procedura se zasniva na dodavanju alikvota osnovnog rastvora molekula u DMSO-u (0,5 μL) u 2,5 mL fosfatnog pufera (pH 7) do pojave taloga. Zamućenje uzrokuje rasipanje svetlosti (*light scattering*), koje se meri pomoću UV/VIS detektora u opsegu 620 – 820 nm. Metoda je dalje prilagođena i optimizovana za određivanje u posudama za 96 uzoraka male zapremine, što omogućava brze i automatizovane analize [3]. Prema tome, kinetička rastvorljivost se koristi za rangiranje potencijalno biološki aktivnih supstanci po rastvorljivosti u ranoj fazi razvoja lekova. Kada se radi sa slabo rastvornim jedinjenjima, ponovljivost metode je vrlo mala, što otežava poređenje rezultata. Osim toga, mana metode je upotreba DMSO-a. Iz tog razloga potrebno je dizajnirati eksperiment tako da količina DMSO-a ne bude veća od 0,5% (v/v).

II.5.2 Shake–flask metoda

Shake–flask metoda je metoda za određivanje termodinamičke rastvorljivosti [3]. Uobičajena procedura se zasniva na pripremi suspenzije ispitivanog jedinjenja u puferu [48]. Bočica u kojoj se nalazi suspenzija se zatim postavi u termostat (25/37 °C) i mučka 24, 48 sati ili duže do uspostavljanja ravnoteže. Nakon toga, faze se razdvajaju filtracijom ili centrifugiranjem, a koncentracija supstance u supernatantu određuje spektrofotometrijski ili HPLC-om. Ukoliko je potrebno konstruisati logS–pH profil, određivanje se izvodi na različitim pH vrednostima.

Opisana procedura je prilično jednostavna, ali se primenjavani eksperimentalni uslovi opisani u literaturi dosta razlikuju [1]. Kako bi kvalitet i uporedivost dobijenih rezultata bili poboljšani, ali i zbog boljeg razumevanja uticaja različitih faktora na rastvorljivost, objavljene su preporuke za određivanje rastvorljivosti jonizujućih jedinjenja [5, 14, 32]. Ukoliko se eksperiment dizajnira prema tim preporukama, mogu se očekivati tačni i precizni rezultati, koji ovu metodu čine zlatnim

standardom među metodama za određivanje rastvorljivosti. Dužina trajanja eksperimenata i zahtevan laboratorijski rad su dva glavna razloga zbog kojih *shake-flask* obično nije metoda izbora u farmaceutskoj industriji.

Na osnovu svega navedenog, jasno je da opis eksperimentalne procedure mora biti detaljan. Potrebno je navesti masu odmerene supstance, zapreminu rastvora, vreme mešanja, način razdvajanja faza (sedimentacija, filtriranje i centrifugiranje), temperaturu [5, 14, 32]. Treba naglasiti tačan sastav svih supstanci koje se koriste pri određivanju. Važno je kontrolisati pH vrednost tokom eksperimenta, a u obradi rezultata koristiti pH vrednost suspenzije nakon uspostavljanja ravnoteže. Poželjno je uraditi karakterizaciju čvrste faze radi utvrđivanja promena u sastavu taloga u zavisnosti od pH vrednosti suspenzije i proučavanja eventualnih transformacija u čvrstoj fazi [2].

II.5.3 Modifikacije *shake-flask* metode

Zahvaljujući automatizovanoj proceduri i izuzetnoj preciznosti određivanja, minijaturizovana *shake-flask* metoda koristi se u farmaceutskoj industriji za određivanje termodinamičke rastvorljivosti, iako je kapacitet metode približno 20 jedinjenja nedeljno [1, 3, 38]. Određena masa ispitivane supstance (<1 mg za slabo rastvorna jedinjenja) doda se u 2 mL pufera, koji se nalazi u posebno dizajniranom sudu (*Whatman UniPrep filter chamber*). Sud se zatvara čepom koji sadrži filter i mućka na određenoj temperaturi (25/37 °C). Tokom mućkanja, potrebno je proveravati i ukoliko je potrebno i podešavati pH vrednost suspenzije. Posle 24 sata filter se pod pritiskom pomera ka dnu bočice što dovodi do odvajanja supernatanta od taloga. Supernatant se zatim analizira pomoću HPLC metode sa UV/VIS ili MS detekcijom. Važno je naglasiti da tokom mućkanja ne dolazi do kontakta između suspenzije i filtera, tako da ne postoji opasnost od naduvanja ili začepljenja membrane filtera [38]. Kao i pri upotrebi uobičajenih filtera, potrebno je odbaciti prvi deo supernatanta, zbog potencijalne adsorpcije supstance na membranu filtera.

Bergström i saradnici primenili su sličnu metodu (*small-scale shake-flask*) u određivanju profila rastvorljivosti 25 baza (korišćena jedinjenja su bila u obliku baze ili soli) [39]. U okviru ove studije analiziran je i desipramin-hidrohlorid. U zavisnosti od rastvorljivosti jedinjenja na 22,5 °C, ispitivana supstanca dodavana je u 50 ili 200 µL fosfatnog pufera do pojave čvrste faze u sistemu. Pomoću standardnih rastvora H₃PO₄ ili KOH podešavane su pH vrednosti suspenzija. Vreme mućkanja bilo je 24 sata. Faze su razdvojene centrifugiranjem, a koncentracija supstance u supernatantu određena je pomoću HPLC metode sa UV ili fluorescentnim detektorom. Zahvaljujući priličnoj uštedi supstanci i tačnosti dobijenih podataka, ova metoda, takođe, može biti korisna u ranim fazama dizajna i razvoja lekova [3].

II.5.4 *Dissolution template* titracija (DTT)

Dissolution template titracija (DTT) je potenciometrijska metoda za određivanje termodinamičke rastvorljivosti, u kojoj se koristi pSOL titrator (*pSOL Model 3 instrument (pION, USA)*) [1, 3, 41, 48]. U prvom koraku izvodi se simulacija titracione krive na osnovu ulaznih vrednosti pK_a i $\log S_0$ (procenjuje se na osnovu Hansch–Yalkowsky jednačine: $\log S_0 = 1,17 - 1,38 \times \log P$). Simulirana titraciona kriva služi kao templat za pripremu suspenzije i izvođenje cele titracije. Titracija počinje od pH vrednosti na kojoj je supstanca u molekulskom obliku i gradi suspenziju, a odvija se u smeru rastvaranja taloga. Tokom titracije meri se pH vrednost. Algoritam

uzima u obzir brojne faktore koji utiču na brzinu rastvaranja: koncentraciju supstance u trenutku merenja, rastvorljivost, difuzioni koeficijent, debljinu difuzionog sloja (menja se sa promenom temperature i brzine mešanja) i specifičnu površinu. U skladu sa tim, brzina titracije je manja u prisustvu taloga. Kada se talog potpuno rastvori, brzina titracije se povećava. Eksperiment traje 3 – 10 sati. Što je rastvorljivost ispitivane supstance manja, vreme trajanja titracije je duže. Na osnovu titracionih podataka izračunava se sopstvena rastvorljivost, a zatim i $\log S$ –pH dijagram. Prilikom obrade titracionih podataka, u model je moguće uključiti potencijalne sporedne reakcije (kompleksiranje, agregacija i slično). Prednost metode je velika preciznost određivanja rastvorljivosti. Zbog dužine trajanja titracije, metoda se retko koristi u prvim fazama dizajna i razvoja lekova, ali može biti korisna u kasnijim fazama istraživanja.

II.5.5 *Chasing equilibrium Solubility (CheqSol) metoda*

Chasing equilibrium Solubility (CheqSol) je potenciometrijska metoda koja se koristi za određivanje kinetičke i sopstvene rastvorljivosti [1]. Za razliku od DDT metode, u CheqSol metodi titracija počinje od pH vrednosti na kojoj je jedinjenje u jonizovanom obliku i potpuno rastvoreno, a odvija se ka pH vrednosti na kojoj se jedinjenje taloži. Naizmeničnim dodavanjem kiseline ili baze (titraciona sredstva) nakon pojave taloga u sistemu, postiže se naizmenično taloženje i rastvaranje supstance. Prati se brzina promene pH tokom ovih procesa. Opisana procedura naziva se *Chasing equilibrium* jer ima za cilj brže uspostavljanje ravnoteže u sistemu. Kinetička rastvorljivost se dobija iz koncentracije supstance u rastvoru u trenutku prve pojave taloga. Kada se izjednače brzine rastvaranja i taloženja, može se dobiti vrednost sopstvene rastvorljivosti iz sledećih podataka: ravnotežna pH vrednost, zapremina rastvora, količina i pK_a dodate supstance, količina i koncentracija dodate kiseline i baze (titraciona sredstva), jonska sila i temperatura rastvora [4].

CheqSol metoda ima nekoliko prednosti u odnosu na klasičnu *shake-flask* metodu: vreme trajanja analize je kraće, merenja se izvode u prisustvu taloga pa razdvajanje faza nije potrebno, supstanca ne mora da sadrži hromoforu [4]. Međutim, ovu metodu je moguće primeniti samo za jedinjenja koja imaju jonizujuće funkcionalne grupe. Zbog načina izvođenja eksperimenta, teško je odrediti rastvorljivost veoma slabih kiselina ($pK_a > 11$) i veoma slabih baza ($pK_a < 3$). Osim toga, metoda još uvek nije prilagođena određivanju rastvorljivosti u puferskim rastvorima [14].

Prema promenama u sistemu koje se dešavaju tokom CheqSol procedure, molekuli se mogu podeliti u dve grupe: *chaser* i *non-chaser* [44]. Svrstavanje jedinjenja u jednu od ove dve grupe, može biti korisno u farmaceutskoj industriji, zato što svaka grupa pokazuje specifične karakteristike, koje se mogu iskoristiti tokom procesa razvoja i dizajna lekova. Osnovna razlika između *chaser* i *non-chaser* molekula je sposobnost građenja prezasićenih rastvora. *Chaser* molekuli grade prezasićene rastvore, dok *non-chaser* molekuli ne. Osim toga, karakteristična svojstva *chaser* molekula su: u čvrstom obliku su kristalni i imaju visoke temperature topljenja, sporo se talože i sporo rastvaraju, mogu biti kiseline, baze ili amfoliti, rastvorljivost im raste sa porastom temperature. Nekada je moguće produžiti prezasićenje i sprečiti kristalizaciju korišćenjem različitih aditiva. Svojstva *non-chaser* molekula su već opisana u poglavlju II.1: ne grade prezasićene rastvore; brzo se talože, a sporo rastvaraju; najčešće su baze; imaju niske tačke topljenja, na 25 °C obično su tečni ili amorfni; rastvorljivost se ne menja ili opada sa porastom temperature; često su površinski aktivni. Odnos kinetičke i sopstvene rastvorljivosti opisuje sposobnost jedinjenja da nagradi prezasićen rastvor (*supersaturation ratio*).

II.5.6 *Micro dissolution metoda* (μ DISS metoda)

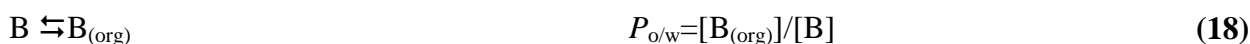
μ DISS je metoda za određivanje termodinamičke rastvorljivosti, u kojoj se koristi instrument originalno namenjen za određivanje brzine rastvaranja pod nazivom μ DISS Profiler *PLUS* (pION, US) [1]. Na početku, 5 mg supstance komprimuje se u peletu i postavi u rotirajući disk. Zatim se ovaj deo aparature uroni u sud koji sadrži 1 – 3 mL pufera. Koncentracija supstance određuje se pomoću *in situ fiber optic* UV detektora. Prednosti ove metode su velika preciznost određivanja, mogućnost procene vremena potrebnog za uspostavljanje ravnoteže direktno sa krive rastvaranja, određivanje rastvorljivosti različitih polimorfa/solvata, čije su transformacije jasno uočljive na krivoj rastvaranja [3, 32, 48]. Kapacitet metode je 6 jedinjenja dnevno (na instrumentu je moguće istovremeno postaviti 6 uzoraka) [1].

II.5.7 *Facilitated Dissolution metoda*

Facilitated Dissolution Method je metoda za određivanje termodinamičke rastvorljivosti, kojom se prevazilazi problem sporog uspostavljanja ravnoteže kod vrlo slabo rastvorljivih supstanci [45]. Zasniva se na dodatku male količine organskog rastvarača u vodeni rastvor slabo rastvorljive supstance [3, 45 – 47]. Prilikom izbora organskog rastvarača mora se voditi računa da organski rastvarač bude nemešljiv sa vodom (oktan, toluen, oktanol, amil-alkohol i drugi) i da supstanca bude bar 200 puta rastvorljivija u organskom rastvaraču nego u vodi. Pri radu sa lipofilnim jedinjenjima koja nemaju polarne funkcionalne grupe preporučuje se oktan ili izooktan, dok se pri radu sa lipofilnim jedinjenjima koja imaju više polarnih funkcionalnih grupa preporučuje oktanol. Odgovarajući izbor organskog rastvarača u slučaju manje lipofilnih jedinjenja je 1,2-dihloretan.

Organski rastvarač rastvara teško rastvornu supstancu [3, 45 – 47]. Ukoliko se suspenzija intenzivno mućka, dodirna površina između vodene i organske faze je velika, što omogućava transfer supstance iz organske u vodenu fazu. Na taj način se povećava ukupna brzina rastvaranja i značajno se smanjuje vreme potrebno za uspostavljanje ravnoteže. Povećanje količine čvrste faze u višku, nije dobar način za povećanje brzine rastvaranja, zato što prisustvo nečistoća u uzorku i heterogenost uzorka u smislu veličine čestica i postojanja mesta na kristalnoj rešetki koja imaju različit energetski sadržaj (defekti kristalne rešetke ili amorfni regioni) imaju uticaja na rastvorljivost. Zato se problem sporog uspostavljanja ravnoteže prevazilazi ovom metodom.

Dok se u sistemu nalaze tri faze (čvrsta faza, organska faza i voda), prisustvo organskog rastvarača ne menja vrednost termodinamičke rastvorljivosti (osim u slučaju jonizujućih jedinjenja u slabo puferisanim rastvorima) [3]. Ovaj sistem može se opisati sledećim ravnotežama i odgovarajućim konstantama ravnoteža (**17** i **18**):



gde je S_{org} rastvorljivost jedinjenja u organskoj fazi, a $P_{o/w}$ particioni koeficijent [3]. Množenjem jednačine (**17**) sa -1 i sabiranjem sa jednačinom (**18**), dobija se izraz za rastvorljivost supstance u vodi (**19**):



II.5.8 Program *pDISOL-X*TM

Jedan od najboljih programa za obradu podataka i izračunavanje konstanti ravnoteža, opisan u literaturi, je *pDISOL-X*TM (*in-ADME Research*) [31, 32, 35, 37, 47, 54, 82, 84, 89, 92]. Ulazni podaci su izmerene vrednosti pH i log*S* (kao i standardna devijacija log*S*) [35, 54, 92]. Rastvorljivost mora biti izražena u mol/L. Osim toga, potrebno je definisati vrstu i koncentraciju svih dodatih reagenasa. Tokom proračuna, u obzir se uzimaju sve vrste za koje se pretpostavlja da postoje u rastvoru (komponente pufera, kontra joni, inertni elektrolit i slično). Velika prednost programa je to što se proračuni ne zasnivaju na važenju HH jednačine, već program izvodi specifične jednačine na osnovu bilo kog broja hipotetičkih ravnoteža i procenjenih konstanti, koje korisnik predloži. U predložene ravnoteže može biti uključeno nastajanje soli u talogu, građenje agregata i kompleksa u rastvoru, ravnoteže koje uključuju žučne kiseline i surfaktante i slično. Eksperimentalno određeni parametri elektrode (α , k_S , j_H , j_{OH}) pri referentnoj jonskoj sili 0,15 M, koji figurišu u Avdeef–Butcher jednačini [3, 95], automatski se prilagođavaju pomoću programa *pDISOL-X*TM ukoliko je jonska sila u uslovima eksperimenta drugačija [35].

Avdeef–Butcher jednačina (20) koristi se za standardizaciju elektrode (prevođenje iz pH (-log $\alpha(H^+)$) u p_cH (-log[H⁺]) skalu) [3, 95].

$$pH = \alpha + k_S \times p_cH + j_H \times [H^+] + j_{OH} \times K_w / [H^+] \quad (20)$$

gde je:

α – negativan logaritam koeficijenta aktiviteta H⁺ jona na određenoj temperaturi i jonskoj sili,

k_S – odnos eksperimentalnog i teorijskog Nernst-ovog nagiba (*slope factor*),

j_H – korekcija nelinearnog odgovora prilikom merenja pH vrednosti, koji nastaje kao posledica difuzionog i asimetričnog potencijala u izrazito kiselim rastvorima (pH<1,5),

j_{OH} – korekcija nelinearnog odgovora prilikom merenja pH vrednosti u izrazito baznim rastvorima (pH>11,5), koji nastaje kao posledica difuzionog potencijala i/ili „sone“ greške,

K_w – koncentracioni jonski proizvod vode na određenoj temperaturi i jonskoj sili [96].

Svaka elektroda ima karakterističan set parametara, koji se dobija obradom podataka titracije hlorovodonične kiseline natrijum-hidroksidom/kalijum-hidroksidom u pH opsegu 1,8 – 12,2 u prisustvu pozadinskog elektrolita [3]. Na 25 °C i pri jonskoj sili 0,15 M, tipične vrednosti četiri parametara su: $\alpha=0,09$; $k_S=1,002$; $j_H=0,5$ i $j_{OH}=-0,5$.

Program *pDISOL-X*TM omogućava testiranje prisustva različitih kompleksa, taloga i ostalih hemijskih vrsta koje se mogu formirati u heterogenom sistemu [31, 35, 37, 54, 82, 92]. Program računa raspodelu hemijskih vrsta u suspenziji ispitivanog jedinjenja u pozadinskom elektrolitu, po dodatku standardnog rastvora HCl (ili H₃PO₄, H₂SO₄, CH₃COOH i drugi) u inkrementima, dok pH suspenzije ne dostigne vrednost oko nule. Zatim sledi simulacija dodavanja standardnog rastvora NaOH (ili KOH) u inkrementima, dok pH suspenzije ne dostigne vrednost oko 13. U svakoj tački simulirane titracije (korak pH 0,005 – 0,2) izračunavaju se rastvorljivost, jonska sila, koncentracione konstante ravnoteže (kiselinske konstante, proizvod rastvorljivosti, konstante agregacije ili konstante građenja kompleksa). Četiri parametra iz Avdeef–Butcher jednačine uključena su u proračun. Na kraju simulacije, upoređuju se izračunati log*S*–pH dijagram i eksperimentalno dobijeni dijagram. Proračun se ponavlja sve dok razlike između izračunatog i

eksperimentalno dobijenog dijagrama ne postanu minimalne. Tačnost predloženog modela ravnoteža, procenjuje se na osnovu parametra kvalitet korelacije („goodness-of-fit“ (GOF)), koji treba biti oko 1, ukoliko predloženi model dobro opisuje eksperimentalne podatke [35].

Prilikom postavljanja modela (ravnoteže i konstante ravnoteža), potrebno je znati vrednost pK_a određenu nezavisnom metodom, kao i prepoznati karakteristična odstupanja $\log S$ –pH dijagrama od teorijskog profila rastvorljivosti izračunatog na osnovu HH jednačine [92]. Za predlaganje vrednosti konstanti ravnoteža, mogu se koristiti različite relacije ili aproksimacije. Na osnovu analize eksperimentalno dobijenih podataka objavljenih u literaturi [39], Avdeef je odredio korelaciju između sopstvene rastvorljivosti i proizvoda rastvorljivosti dihidrogenfosfatnih ($K_{sp}^{1:1}$) i hidrogenfosfatnih ($K_{sp}^{2:1}$) soli [37, 54]:

$$pK_{sp}^{1:1} = 0,525 + 0,554 \times pS_0 \quad (21)$$

$$pK_{sp}^{2:1} = 0,744 + 1,207 \times pS_0 = -0,4002 + 2,1796 pK_{sp}^{1:1} \quad (22)$$

II.6 Kritična micelarna koncentracija

Površinski aktivna jedinjenja ili surfaktanti su amfilni molekuli karakterističnih struktura, čiji je jedan deo polaran (hidrofilni) a drugi nepolaran (hidrofobni) [97]. Prema sposobnosti da disosuju u vodi, ova jedinjenja se mogu podeliti na jonska i nejonska. Jonski surfaktanti (katjonski, anjonski i amfoliti) disosuju u vodi, dok nejonski ne disosuju. Polarna (hidrofilna) grupa je naelektrisana pozitivno u katjonskim surfaktantima, a negativno u anjonskim surfaktantima (u pH opsegu u kojem je jedinjenje u jonskom obliku). Amfoliti su površinski aktivna jedinjenja koja mogu da se ponašaju u vodenom rastvoru i kao katjonski i kao anjonski surfaktanti, u zavisnosti od pH vrednosti rastvora. Hidrofilne grupe nejonskih surfaktanata nemaju lokalizovano naelektrisanje u istoj meri kao jonski surfaktanti.

U vodenom rastvoru, površinski aktivna jedinjenja, pokazuju tendenciju da se akumuliraju na granici faza voda – vazduh, kao i da se, pri visokim koncentracijama, organizuju u termodinamički stabilne agregate, odnosno micide [98]. Organizovanje surfaktanata u micide, odvija se tako da hidrofilni deo molekula bude na površini u kontaktu sa vodenim rastvorom, za razliku od hidrofobnog dela, koji se nalazi u unutrašnjosti „zaštićen“ od molekula vode [59, 99, 100]. Sa porastom koncentracije, surfaktanti prvo grade premicelarne strukture, kao što su dimeri, trimeri i ostali manji agregati [97]. Sa daljim porastom koncentracije surfaktanta, od monomera i premicelarnih struktura nastaju sferne micide, čiji je poluprečnik aproksimativno jednak dužini surfaktanta, a broj monomera u miceli je u opsegu 10 – 100 (agregacioni broj). Ukoliko koncentracija surfaktanta nastavlja da raste, mogu nastati micide drugačijih oblika: cilindrične, heksagonalne i pločaste (laminarne). Interakcije između surfaktanata u agregatima ili micelama su nekovalentnog tipa, kao što su Van der Waals-ove interakcije, elektrostatičke interakcije, vodonične veze, donor – akceptor veze i druge [64].

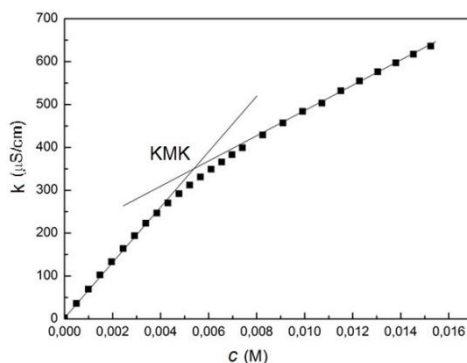
Kritična micelarna koncentracija (KMK) je koncentracija iznad koje počinje formiranje micela u rastvoru [101]. Prema IUPAC-u (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), KMK se definiše kao uzak opseg koncentracija koji razdvaja oblast u kojoj micide nisu detektovane od oblasti u kojoj svaki dodati molekul surfaktanta gradi micide [97]. Kritična micelarna koncentracija predstavlja jedan od najznačajnijih parametara koji se koristi prilikom proučavanja samoagregacije površinski aktivnih jedinjenja, bez obzira da li se micide posmatraju kao hemijska vrsta (*mass action model*) ili kao posebna faza (*phase separation model*) [63, 98, 100 – 102]. Vrednost KMK

zavisi od nekoliko faktora [59, 63, 64, 97, 100, 101]: temperatura, rastvarač, jonska sila, pH vrednost, struktura surfaktanta, prisustvo, koncentracija, veličina, naelektrisanje, hidrofobnost i priroda drugih elektrolita u rastvoru. Primećeno je da KMK opada sa porastom koncentracije drugih elektrolita, bez obzira na hemijsku prirodu surfaktanta [101]. Elektroliti neutrališu naelektrisanje jona surfaktanata, što smanjuje njihovo međusobno elektrostatičko odbijanje, tako da je nastajanje micela olakšano [63, 64, 101].

Metode za određivanje kritične micelarne koncentracije jedinjenja koja grade micelle, mogu se podeliti u dve grupe: direktne i indirektne [97]. Kod direktnih metoda meri se određeno svojstvo rastvora (električna provodljivost [29, 56, 58, 63, 64, 98, 100 – 106], viskoznost [97], površinski napon [29, 57, 59, 61, 100, 105], indeks refrakcije [107], osmotski pritisak [97], dielektrična konstanta [102], gustina [100]) u zavisnosti od rastuće koncentracije surfaktanta [97]. Promena nagiba grafika zavisnosti merenog signala od koncentracije surfaktanta ukazuje na vrednost kritične micelarne koncentracije. Kod indirektnih metoda meri se zavisnost svojstva neke druge supstance (probe), dodate u rastvor surfaktanta, od rastuće koncentracije surfaktanta. Promena svojstva dodate probe pokazuje vrednost KMK. Indirektno određivanje kritične micelarne koncentracije može se postići pomoću sledećih metoda: spektrofluorimetrija [29, 100], spektrofotometrija [59, 63, 101], micelarna elektrokinetička hromatografija [101].

Konduktometrija je široko primenjivana metoda za određivanje kritične micelarne koncentracije zbog jednostavnosti, brzine analize, lako dostupne i jeftine opreme [97, 98, 100, 101]. Moguće je odrediti samo KMK vrednosti jonskih surfaktanata, koji se u vodenim rastvorima ponašaju kao elektroliti. Ukoliko je vrednost KMK niska (dolazi do građenja micela pri niskim koncentracijama surfaktanta – na početku eksperimenta) konduktometrija nije metoda izbora zbog male osetljivosti.

Eksperimentalno određivanje kritične micelarne koncentracije metodom konduktometrijskih titracija zasniva se na merenju specifične provodljivosti rastvora u zavisnosti od dodate količine surfaktanta [101]. U prvom delu titracije u rastvoru postoje samo monomeri surfaktanta. Sa porastom koncentracije surfaktanta, specifična provodljivost rastvora raste. Kada počne formiranje micela, specifična provodljivost nastavlja da raste, ali sporije. Ukoliko se zavisnost specifične provodljivosti od koncentracije surfaktanta prikaže grafički (**Slika 6**), dobijaju se dve linearne funkcije različitog nagiba, koje se, u idealnom slučaju, seku u jednoj tački [108]. Koncentracija surfaktanta u tački preseka predstavlja kritičnu micelarnu koncentraciju. Preciznost određivanja KMK zavisi od širine opsega koncentracija u kome se dešava promena u nagibu grafika zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije [102].



Slika 6. Zavisnost specifične provodljivosti od koncentracije. Adaptirano iz *Verbić i saradnici, 2018* [108].

U literaturi je opisano i izračunavanje kritične micelarne koncentracije crtanjem prvog, drugog ili trećeg izvoda zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije surfaktanta [56, 58, 98, 100, 102, 104]. Koncentracija surfaktanta u prevojnoj tački prvog izvoda (sigmoida), minimalnoj vrednosti drugog izvoda ili nuli trećeg izvoda, uzima se kao KMK.

Osim kritične micelarne koncentracije, koristan parametar je stepen disocijacije micela (β), koji se može izračunati iz zavisnosti električne provodljivosti od koncentracije [56, 103]. Dobija se kao odnos nagiba prave nakon KMK i nagiba prave pre dostizanja KMK. Pokazuje efekat kontra jona na stabilnost micela. Nekada se ovaj efekat prikazuje kao stepen asocijacije kontra jona i micela $\alpha=1-\beta$ [64].

II.7 Metode za karakterizaciju taloga

II.7.1 Termogravimetrija

Termogravimetrija (TGA) je termička metoda u kojoj se meri promena mase uzorka u zavisnosti od temperature ili vremena, u kontrolisanoj atmosferi, pri čemu se temperatura menja (ili ostaje konstantna – izotermalni uslovi) prema unapred zadatom programu [1, 2, 109, 110]. Kriva termičke degradacije – termogram predstavlja zavisnost mase ili masenog udela od vremena ili temperature. Signal se nekada prikazuje kao prvi izvod termograma – zavisnost brzine promene mase sa vremenom (dm/dt) od temperature (T). Instrument namenjen za izvođenje termogravimetrijske analize naziva se termogravimetrijski analizator ili termovaga. Glavni delovi instrumenta su analitička vaga (rezolucija 1 μg ili bolja), peć, sistem za dovod/odvod gasa i računar. Uspešnost jedne termogravimetrijske analize zavisi od mase uzorka, temperaturnog opsega, brzine zagrevanja/hlađenja, atmosfere oko uzorka [2].

Opseg temperatura većine peći je od sobne do 1500 $^{\circ}\text{C}$, a opseg brzina zagrevanja/hlađenja 0 do 200 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ [110]. Kako bi se obezbedilo pouzdano merenje mase, dizajn instrumenta mora biti takav da spreči transfer toplote sa peći na vagu [109]. Izabran opseg temperatura za izvođenje analize treba da obuhvati temperature na kojima dolazi do promene mase uzorka [2].

U idealnom slučaju, uzorak treba biti sprашen, homogen i ravnomerno raspoređen po tasu [109]. Veličina čestica uzorka je veoma važna, zato što može uticati na kinetiku procesa gubitka mase [2]. Iako se najčešće termogravimetrijski analiziraju uzorci u čvrstom stanju, moguće su i analize uzoraka u tečnom stanju. Termogravimetrijskom analizom najčešće se prati termička stabilnost uzorka i gubitak isparljivih komponenti, kao što su vezani/apsorbovani rastvarač (proces desolvatacije) ili isparljivi degradacioni proizvodi (proces termičke degradacije). Iz tog razloga, termogravimetrija ima važnu ulogu u analizi solvata ili hidrata.

U novije vreme razvijene su tehnike koje omogućavaju strukturnu karakterizaciju isparljivih proizvoda dobijenih TGA analizom, kuplovanjem termogravimetrije sa infracrvenom spektroskopijom (TGA/FT-IR), masenom spektrometrijom (TGA/MS) ili kombinacijom gasne hromatografije i masene spektrometrije (TGA/GC-MS) [2].

II.7.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) je termička metoda kod koje se mere razlike u protoku toplote (*heat flow*) ka uzorku i standardu u zavisnosti od vremena ili temperature, dok se temperatura programirano menja [109, 110]. Grafik zavisnosti protoka toplote od temperature naziva se termogram [2].

Komercijalno su dostupna dva dizajna diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra: *power-compensated* DSC i *heat-flux* DSC [1, 2, 109, 110]. Dve peći, u kojima se nalaze uzorak i standard, karakteristične su za *power-compensated* DSC dizajn. Meri se razlika u protoku toplote koja je potrebna da održi uzorak i standard na istoj temperaturi. Zahvaljujući pećima mase oko 1 g, moguće je brzo uspostavljanje termičkih ravnoteža i korišćenje veoma velikih brzina skeniranja (250 ° C/min i više). U *heat-flux* DSC dizajnu, uzorak i standard su smešteni u istoj peći mase 100 – 200 g. Meri se razlika u temperaturi između uzorka i standarda (dok se temperatura programirano menja), koja se zatim prevodi u razliku u protoku toplote, pomoću termičkog ekvivalenta Omovog zakona ($q=\Delta T/R$; q – protok toplote ka uzorku, ΔT – razlika u temperaturi između uzorka i standarda, R – otpor).

Važni eksperimentalni parametri za DSC analizu su konfiguracija tase za uzorak, masa uzorka, temperaturni opseg, brzina skeniranja i atmosfera [1, 2]. Tas za uzorak može biti otvoren, zatvoren, hermetički zatvoren ili sa rupicom. Za analizu je potrebno 1 – 3 mg uzorka (5 – 10 mg u slučaju prelaza manjeg intenziteta). Temperaturni opseg bira se prema vrsti uzorka i tipu analize. Brzine skeniranja mogu da variraju u opsegu 0,001 – 500 ° C/min. Povećanjem brzine skeniranja raste osetljivost, ali se smanjuje rezolucija (posledica termičkog gradijenta u uzorku). Brzina skeniranja treba da obezbedi dobar balans između željene osetljivosti i rezolucije. Gas ima nekoliko važnih uloga: kontroliše atmosferu oko uzorka, uklanja isparljive supstance iz sistema, sprečava kontaminaciju i slično. Najčešće se koristi azot, zato što obezbeđuje inertnu atmosferu i sprečava oksidacione reakcije.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija omogućava praćenje različitih vrsta termičkih prelaza prvog i drugog reda, koji nastaju kao posledica fizičkih transformacija ili hemijskih reakcija [1, 2]. Pomenuti procesi dovode do promene entalpije (endotermni ili egzotermni termički prelazi prvog reda) ili do promene toplotnog kapaciteta (termički prelazi drugog reda) ispitivanog materijala. Primeri endotermnih prelaza su topljenje, ključanje, sublimacija i desolvacija, a egzotermnih kristalizacija. Polimorfni prelazi i hemijska degradacija takođe spadaju u termičke prelaze prvog reda, ali mogu biti i endotermni i egzotermni. Endotermni polimorfni prelaz ukazuje da su polimorfi enantiotropni, dok egzotermni prelaz znači da su polimorfi monotropni. Polimorfi su enantiotropni ako je jedan polimorf stabilan u jednom temperaturnom opsegu, a drugi polimorf u nekom drugom. Tada je temperatura prelaza jednog polimorfa u drugi niža od temperature topljenja. Kada je temperatura polimorfnog prelaza viša od temperature topljenja, jedan oblik je najstabilniji a polimorfi su monotropni. Stakleni prelaz, karakteristika amorfni materijala, predstavlja prelaz između superohlađene tečnosti (nastaje brzim hlađenjem tečnosti ispod temperature topljenja) u stakleno stanje. Spada u termičke prelaze drugog reda, povezanim sa promenama u toplotnom kapacitetu. U termogramu se prelaz vidi kao promena u baznoj liniji, za razliku od pikova koji ukazuju na termičke prelaze prvog reda.

Za *heat-flux* i *power-compensated* DSC karakteristična je linearna brzina skeniranja, koja omogućava praćenje zbira termičkih prelaza [2]. Tumačenje rezultata postaje pravi izazov kada se na istoj ili sličnoj temperaturi odigra više termičkih prelaza. Navedeni problem može biti prevaziđen korišćenjem modulisanе diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (MDSC), primenljive na *heat-flux* DSC instrumentalni dizajn. U MDSC se, na linearnu brzinu skeniranja, primenjuje

oscilatorna sinusoidna funkcija, definisane amplitude i perioda oscilacije [1, 2]. Na taj način postiže se razdvajanje reverzibilnih i nereverzibilnih termičkih prelaza, direktno merenje toplotnog kapaciteta i povećanje osetljivosti bez narušavanja rezolucije [2]. Korišćenjem Fourier-ove transformacije, DSC signal moguće je razdvojiti na signal koji potiče od reverzibilnih prelaza i signal koji potiče od nereverzibilnih prelaza [1]. Modulirana temperaturna diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, primenljiva na *power-compensated* DSC instrumentalni dizajn, funkcioniše po sličnim principima kao MDSC, ali se umesto sinusoidne funkcije koristi stepeničasta funkcija [2].

Na osnovu svega navedenog, očigledan je značaj kombinacije DSC i TGA analiza u proučavanju kristalnog i amornog materijala: karakterizacija polimorfa, solvata, hidrata, soli, kokristala, polimera, amornih oblika, praćenje procesa dehidratacije ili desolvatacije kristala, određivanje čistoće organskih jedinjenja, proučavanje reakcija u čvrstoj fazi i slično [2].

II.7.3 Difrakcija X-zraka praha (Powder X-ray diffraction, PXRD)

U PXRD metodi koristi se difrakcija X-zraka u cilju karakterizacije čvrstog materijala u obliku praha [2]. Grafik zavisnosti intenziteta difrakcije od difrakcionog ugla θ ili 2θ naziva se difraktogram.

Difraktometar se sastoji iz izvora X-zraka (rendgenska cev), držača za uzorak i detektora. Difrakcija X-zraka na kristalima dešava se ukoliko je ispunjen uslov definisan Bragg-ovim zakonom (23), odnosno ukoliko je putna razlika dva zraka jednaka celobrojnom umnošku talasnih dužina:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (23)$$

gde je λ talasna dužina X-zraka, d rastojanje između ravni u kristalu, θ Bragg-ov ugao (ugao pod kojim X-zraci padaju na kristal) i n ceo broj. U ovim eksperimentima najčešće se koristi Cu K α monohromatsko zračenje talasne dužine 1,5418 Å, ali je moguće upotrebiti i K α zračenje iz drugih izvora: molibden ($\lambda=0,7107$ Å), kobalt ($\lambda=1,7902$ Å) ili gvožđe ($\lambda=1,9373$ Å). Difrakcioni ugao zavisi od vrednosti d i talasne dužine X-zraka. Ugao difrakcije će biti veći ukoliko je rastojanje između ravni u kristalu manje. Osim toga, različiti izvori X-zraka usmereni na istu ravan kristalne faze, usloviće različite difrakcione uglove.

PXRD difraktogram zavisi od kristalne strukture materijala, odnosno od dimenzija jedinične ćelije, simetrije i molekuskog pakovanja. Prilikom analize difraktograma, uzimaju se u obzir položaj, intenzitet i oblik difrakcionih pikova, kao i raspodela intenziteta pikova. Intenzitet difrakcionog pika zavisi od molekuskog pakovanja, mase uzorka, veličine i orijentacije čestica, a oblik od kvaliteta uzorka (stepen kristalnosti i veličina čestica) i instrumentalnih parametara. Difraktogrami su jedinstveni i karakteristični za datu kristalnu strukturu, zbog čega PXRD tehnika ima veliku primenu: mogućnost razlikovanja različitih kristalnih oblika jedinjenja – polimorfi, soli, solvati, hidrati, kokristali; praćenje različitih transformacija – dehidratacija, hidratacija, polimorfni prelazi, kristalizacija amornog materijala; procena stepena kristalnosti; razlikovanje kristalnog od amornog materijala (amorfni materijal nema karakteristični PXRD difraktogram, difrakcija je vrlo slaba).

III NAŠI RADOVI

Kao što je u Uvodu navedeno, cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj metode koja će omogućiti tačno i precizno određivanje pH-zavisne termodinamičke rastvorljivosti i definisanje postojećih ravnoteža u heterogenim sistemima nekih tricikličnih antidepresiva u prisustvu fosfata i/ili hlorida. Izabrani su sledeći triciklični antidepresivi: desipramin, nortriptilin, imipramin i amitriptilin. Istaknuti su uticaji čvrste faze i različitih vrsta agregacije u rastvoru (građenje kompleksa sa komponentama fosfatnog pufera i građenje različitih agregata) na rastvorljivost nabrojanih jedinjenja.

III.1 pH–Ramp shake–flask metoda

pH–Ramp shake–flask metoda je metoda za određivanje termodinamičke rastvorljivosti, razvijena u toku izrade ove doktorske disertacije [6 – 13] uz poštovanje preporuka za tačno i precizno određivanje rastvorljivosti, prikazanih u literaturi [14]. Predstavlja modifikaciju klasične shake–flask metode.

Eksperiment počinje pripremom kisele (pH~2) ili bazne (pH~12) suspenzije ispitivanog jedinjenja, koja se zatim ravnomerno deli u više bočica. Neophodno je da se suspenzija intenzivno meša u ovom koraku. Ravnomerna podela suspenzije znači isti odnos mase ispitivane supstance i zapremine pufera (ili bilo kog vodenog rastvora koji se koristi u eksperimentu) u svakoj bočici. Ukoliko je pH vrednost suspenzije u svakoj bočici približno ista, može se smatrati da je ravnomerna podela postignuta.

Nakon toga se pH vrednosti suspenzija podešavaju u željenom pH opsegu. Standardni vodeni rastvori kiseline (na primer HCl ili H₃PO₄) koriste se u titracijama iz bazne sredine ka kiseloj (titracije od više ka nižoj pH vrednosti). Standardni vodeni rastvori baza (na primer NaOH ili KOH) koriste se u titracijama iz kisele sredine ka baznoj (titracije od niže ka višoj pH vrednosti). Uobičajeno vreme uspostavljanja ravnoteže je 24 sata (6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije) [14]. Tokom faze mešanja neophodna je kontrola pH vrednosti suspenzija, jer promene pH tokom rastvaranja i uspostavljanja ravnotežnog stanja mogu biti znatne. Tokom faze sedimentacije nije praktično meriti pH zbog mogućeg narušavanja procesa sedimentacije.

Posle 18 sati sedimentacije, obavezno je merenje pH vrednosti suspenzija (u ovom koraku ne treba mešati suspenziju) i poređenje sa vrednostima izmerenim nakon 6 sati mešanja. Ukoliko je ravnoteža postignuta, pH vrednosti će biti približno iste, tako da se faze dalje mogu razdvojiti filtracijom ili centrifugiranjem. Ukoliko ravnoteža nije postignuta, potrebno je produžiti vreme uspostavljanja ravnoteže. Koncentracija ispitivanog jedinjenja u supernatantu određuje se odgovarajućom metodom (najčešće spektrofotometrijski ili HPLC-om), dok se talog analizira metodama za karakterizaciju čvrstog stanja (elementalna analiza, termogravimetrija, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, difrakcija X-zraka praha i druge). Preporučeni program za obradu eksperimentalno dobijenih logS–pH podataka i izračunavanje različitih vrsta ravnotežnih konstanti je pDISOL–XTM [31, 32, 35, 37, 47, 54, 82, 84, 89, 92]. Osim toga, ovaj program može da se koristi u svrhe simulacije i dizajna eksperimenta.

III.2 Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima desipramin-hidrohlorida

III.2.1 Proučavanje rastvorljivosti desipramina u zavisnosti od pH vrednosti

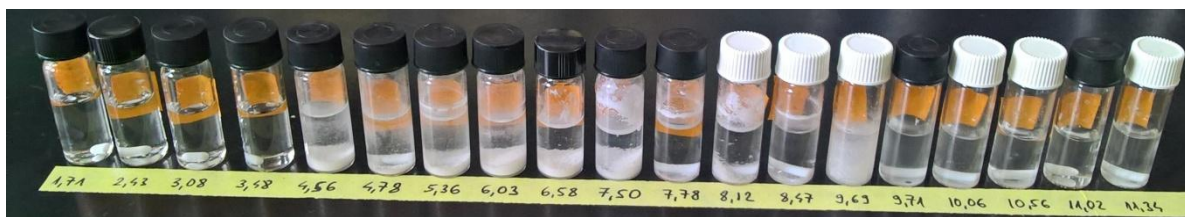
Rastvorljivost desipramin-hidrohlorida na 25 ± 1 °C u suspenzijama različitih pH vrednosti, koje sadrže fosfate i hloride, određena je primenom pH–*Ramp shake–flask* metode [6 – 8]. Izvedene su titracije u dva smera: iz bazne ka kiseloj sredini i iz kisele ka baznoj. Titracija iz bazne ka kiseloj sredini primenjena je u setovima 1 i 2. Prvo je napravljena suspenzija DsHCl u fosfatnom puferu visoke pH vrednosti ($\text{pH} > 11$) (**Tabela 3**). Dobijena suspenzija je zatim ravnomerno podeljena na određen broj uzoraka. Dodavanjem određenih zapremina 1 M HCl podešene su pH vrednosti uzoraka. Titracija iz kisele ka baznoj sredini izvedena je u setu 3. Na početku je pripremljen rastvor DsHCl u fosfatnom puferu pH vrednosti 1,90 (**Tabela 3**), koji je zatim raspoređen u više bočica. Standardni rastvor 1 M NaOH korišćen je za podešavanje pH uzoraka.

Tabela 3. Sastav početnih suspenzija/rastvora desipramina u setovima 1 – 3 (pre dodavanja standardnih rastvora radi podešavanja pH u željenom opsegu) [7]

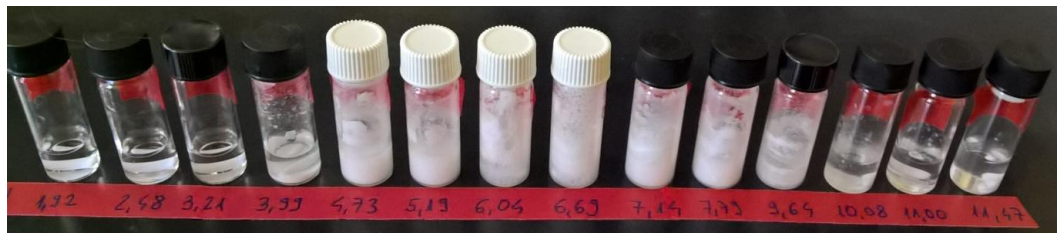
Set	V (ml)	m_{DsHCl} (g)	pH	$[\text{DsHCl}]_{\text{tot}}$ (M)	$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]_{\text{tot}}$ (M)	$[\text{Cl}]_{\text{tot}}$ (M)
1	50,0	0,41170	11,62	0,03	0,12	0,03
2	50,0	0,41220	11,61	0,03	0,12	0,03
3	15,0	0,34370	1,90	0,08	0,14	0,14

Vreme uspostavljanja ravnoteže u setovima 1 – 3 bilo je 24 sata (6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije). U cilju praćenja uspostavljanja ravnoteže u heterogenom sistemu, merene su pH vrednosti uzoraka nekoliko puta tokom perioda od 6 h mešanja. Ukoliko je dolazilo do promene pH vrednosti sa vremenom, dodate su nove količine 1 M standardnih rastvora HCl/NaOH, kako bi se pH vrednost svakog uzorka održala približno konstantnom. pH Vrednosti izmerene nakon 18 h sedimentacije, pre razdvajanja faza, uzete su kao finalne pH vrednosti suspenzija. Nakon sedimentacije, za razdvajanje faza korišćene su filtracija (setovi 1 i 2) ili centrifugiranje (set 3).

Na **Slikama 7.** i **8.** prikazani su uzorci iz setova 2 i 3, posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije, pre razdvajanja faza. U uzorcima sa $\text{pH} > 3,48$ formirani su heterogeni sistemi. U pH opsegu 3,99 – 8,47 nastao je beo čvrst talog, dok se uljast talog izdvojio u uzorcima na $\text{pH} \geq 9,71$. Prelaz iz čvrstog u uljasti talog odvijao se u opsegu pH 9,64 – 9,69, što se vidi po prisustvu oba taloga u bočicama. Mešanje je bilo otežano u uzorku pH vrednosti 9,69 jer je izdvojena čvrsta faza bila izuzetno lepljiva i otežavala rotaciju magneta, a nekada i potpuno onemogućila mešanje. Pošto su uslovi u fazi mešanja bili drugačiji u odnosu ostale uzorke, ovaj uzorak je odbačen. Osim toga, odbačen je i uzorak pH 4,56 zbog slučajne kontaminacije tokom razdvajanja faza.



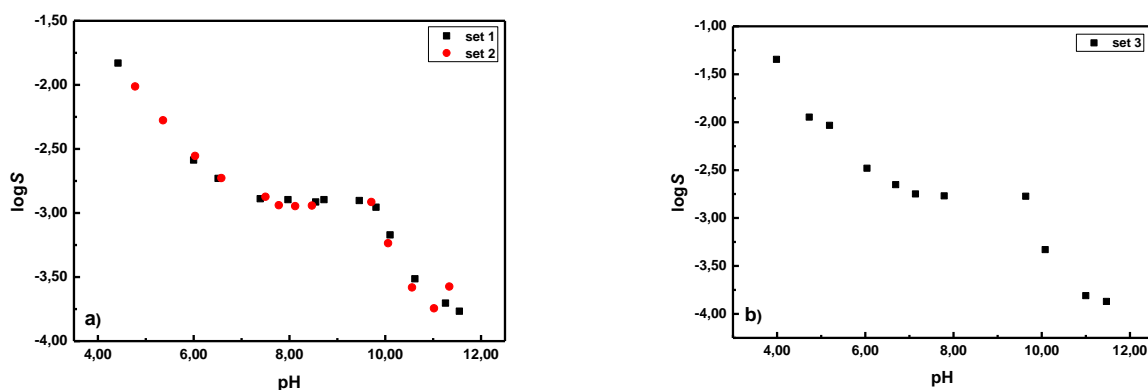
Slika 7. Set 2: uzorci desipramina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Brojevi predstavljaju pH vrednosti rastvora/suspenzija nakon 24 sata.



Slika 8. Set 3: uzorci desipramina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije [6]. Brojevi predstavljaju pH vrednosti rastvora/suspenzija nakon 24 sata.

U setovima 1 i 2, odnosi odmerenih masa $DsHCl_{(s)}$ i dodatih zapremina rastvora fosfatnog pufera, HCl i NaOH u početnim suspenzijama bili su: 8,23 mg/mL (set 1) i 8,24 mg/mL (set 2). U daljem tekstu, ovi odnosi su označeni kao „koncentracija“ suspenzije, iako nije u pitanju koncentracija u pravom smislu te reči jer je deo dodate supstance rastvoren, a deo je u talogu. Koncentracija početnog rastvora u setu 3 bila je 22,91 mg/mL. Pri opisanim uslovima (setovi 1 – 3) rastvorljivost nije bilo moguće odrediti u uzorcima sa $pH < 3,99$, jer zbog visoke rastvorljivosti u sistemu nije bilo čvrste faze u višku.

Rastvorljivost desipramina u suspenzijama dobijenim u setovima 1 – 3 određene su HPLC–UV/VIS metodom. Zavisnosti logaritma rastvorljivosti od pH vrednosti prikazane su na **Slici 9**.



Slika 9. logS–pH profili rastvorljivosti desipramin-hidrohlorida [6 – 8]: a) setovi 1 i 2 i b) set 3.

Dobro preklapanje profila rastvorljivosti u setovima 1 i 2 (titracije iz bazne ka kiseloj sredini) je očekivano, jer su eksperimentalni uslovi bili identični. logS–pH zavisnost dobijena iz seta 3 (titracija iz kisele ka baznoj sredini) pokazuje isti trend kao zavisnost dobijena iz setova 1 i 2, ali male razlike ipak postoje. Da bi se utvrdilo da li su te razlike značajne, ovaj set je u daljem radu analiziran odvojeno od setova 1 i 2 pomoću programa *pDISOL-X*TM.

U cilju određivanja rastvorljivosti desipramina pri $pH < 4$ dizajniran je set 4 [7, 8]. Pripremljena su tri uzorka *shake-flask* metodom, u kojima su „koncentracije“ početnih suspenzija bile: 96,22 mg/mL (uzorak 1), 96,11 mg/mL (uzorak 2) i 97,00 mg/mL (uzorak 3) (**Tabela 4**). Pomoću standardnog rastvora 1 M H_3PO_4 podešena je pH vrednost u uzorcima 1 i 2; dok je u slučaju rastvora 3, korišćen standardni rastvor 1 M HCl. U svim uzorcima formiran je heterogeni sistem, tako da je rastvorljivost bilo moguće odrediti u pH opsegu 2,02 – 3,59 (**Slika 10**; **Tabela P4**).

Tabela 4. Sastav početnih suspenzija desipramina u setu 4 (pre dodavanja standardnih rastvora radi podešavanja pH u željenom opsegu) [7]

Set	V (ml)	m_{DsHCl} (g)	pH	$[\text{DsHCl}]_{\text{tot}}$ (M)	$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]_{\text{tot}}$ (M)	$[\text{Cl}]_{\text{tot}}$ (M)
4	0,900	0,08650 – 0,08730	4,34	0,32	0,15	0,32

**Slika 10.** Set 4: uzorci desipramina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Brojevi predstavljaju pH vrednosti suspenzija nakon 24 sata.

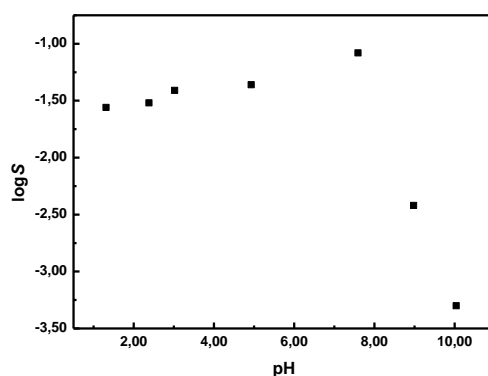
Rastvorljivost desipramina u uzorcima seta 4 je veća od očekivane (**Tabela P4**). Rastvorljivost uzorka kome je pH vrednost podešavana pomoću HCl je nešto niža u odnosu na uzorke u kojima je pH vrednost podešavana pomoću H_3PO_4 . Pomenuta razlika je verovatno posledica efekta zajedničkog jona (hlorida).

Uzorci desipramina u setovima 1 – 4 su suspenzije koje sadrže fosfate i hloride, što otežava tumačenje rezultata. Kako bi se olakšalo definisanje ravnoteža u heterogenim sistemima desipramina, dizajniran je set 5, kao set koji sadrži samo hloride [7, 8]. Uzorci su pripremljeni *shake-flask* metodom dodavanjem 0,15 M NaCl u bočice koje sadrže tačno odmerenu masu $\text{DsHCl}_{(s)}$ (**Tabela 5**). Standardni rastvori 1 M NaOH i 1 M HCl korišćeni su za podešavanje pH vrednosti uzoraka u opsegu pH 1,31 – 10,04.

Tabela 5. Sastav početnih suspenzija desipramina u setu 5 (pre dodavanja standardnih rastvora radi podešavanja pH u željenom opsegu) [7]

Set	V (ml)	m_{DsHCl} (g)	pH	$[\text{DsHCl}]_{\text{tot}}$ (M)	$[\text{Cl}]_{\text{tot}}$ (M)
5	1,000	0,04745 – 0,11205	4,75 – 7,12	0,16 – 0,37	0,31 – 0,52

Profil rastvorljivosti dobijen iz seta 5 (**Slika 11**) ima drugačiji trend u odnosu na setove 1 – 3 (**Slika 9**), što nije veliko iznenađenje, kada se uzme u obzir da ovaj set sadrži samo hloride.

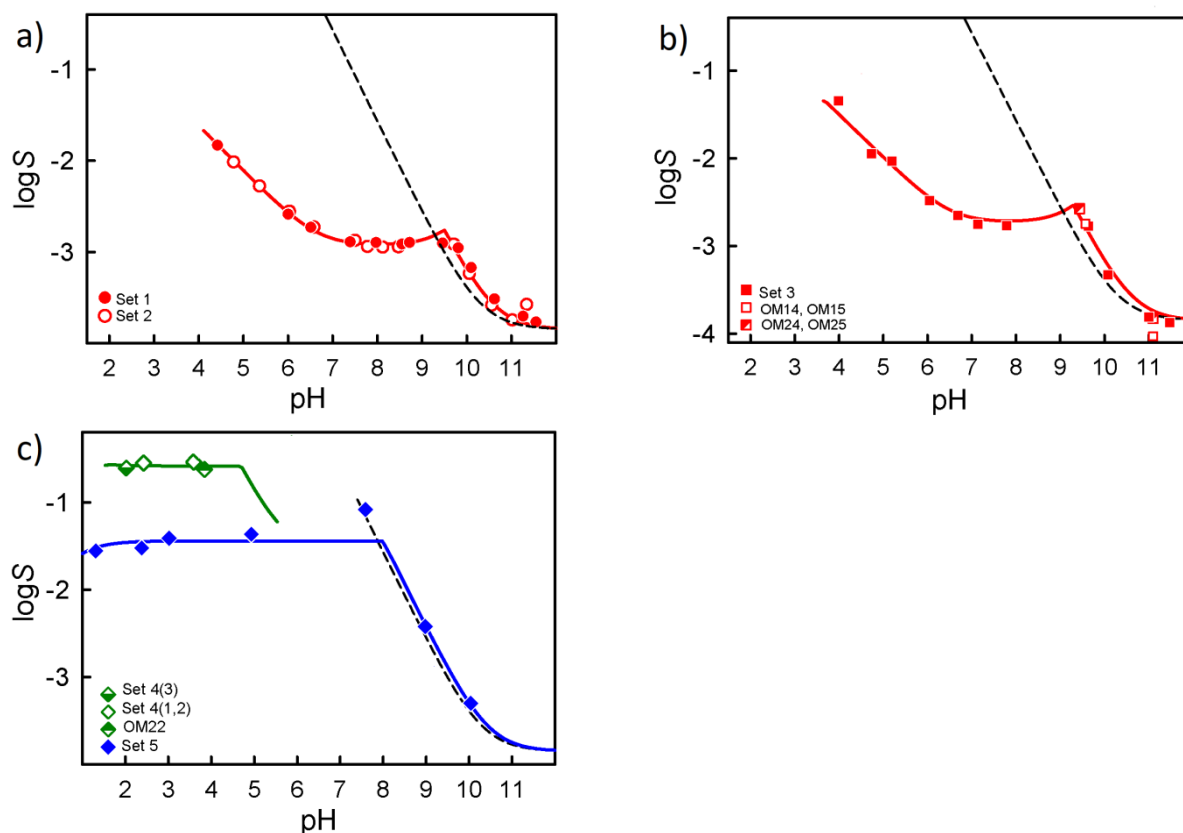
**Slika 11.** logS–pH profil rastvorljivosti desipramin-hidrohlorida: set 5 [7].

Količina čvrste faze u višku u uzorcima setova 1 – 5, nije bila dovoljna za detaljnu karakterizaciju taloga pomoću TGA, DSC i PXRD, pa su dizajnirani setovi 6 i 7 [7, 8]. Uzorci OM11 – OM15 (set 6) i OM22 – OM25 (set 7) dobijeni su iz suspenzija koje sadrže fosfate i hloride, a desipramin je odmeren u obliku desipramin-hidrohlorida. Uzorak OM21 (set 7) dobijen je iz suspenzije koja sadrži fosfate. Za pripremu ovog uzorka korišćena je desipramin baza.

Rastvorljivost je određena i u uzorcima setova 6 i 7 (**Tabela P6. i P7**), iako su ovi uzorci dizajnirani za analizu čvrstog stanja. Kada se uzmu u obzir „koncentracije“ suspenzija, uzorke iz ovih setova treba analizirati odvojeno od setova 1 – 5. Međutim, kako bi pretpostavljene ravnoteže bile potvrđene, pojedini uzorci analizirani su zajedno sa nekim od setova 1 – 5.

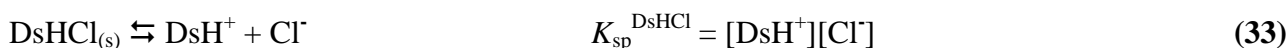
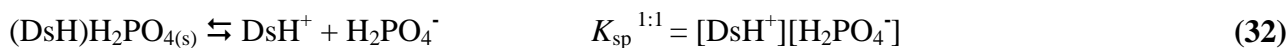
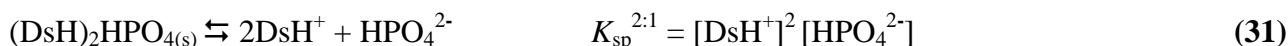
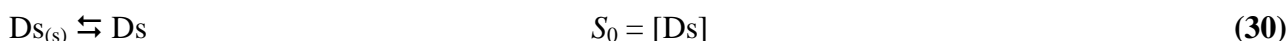
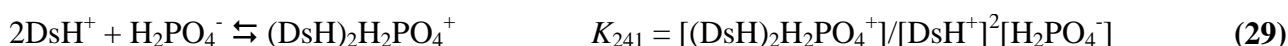
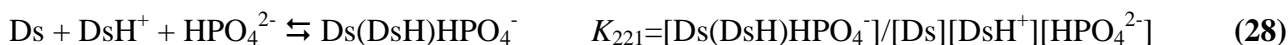
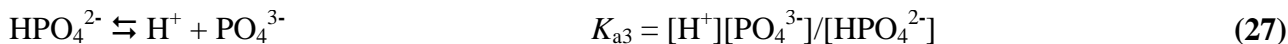
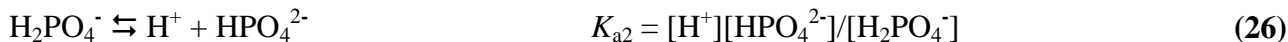
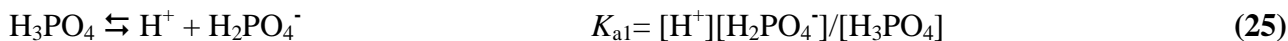
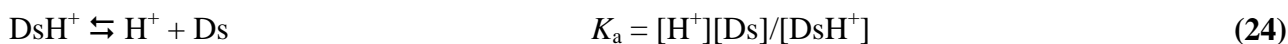
III.2.2 Određivanje ravnotežnih konstanti u heterogenim sistemima desipramina pomoću programa *pDISOL-X*TM

Profili rastvorljivosti desipramin-hidrohlorida, dobijeni pomoću programa *pDISOL-X*TM, prikazani su na **Slici 12**. Punom linijom prikazani su profili rastvorljivosti dobijeni na osnovu eksperimentalnih tačaka. Teorijski profili rastvorljivosti, izračunati pomoću HH jednačine ($pK_a=10,28$ i $\log S_0=-3,85$), prikazani su isprekidanom linijom. Vrednost kiseline konstante desipramina $pK_a=10,28\pm 0,03$ (26 °C, I_{ref} 0,15 M) preuzeta je iz literature [3]. Vrednost sopstvene rastvorljivosti desipramina izračunata je iz seta 5.



Slika 12. Profili rastvorljivosti (puna linija) desipramina na 25 ± 1 °C dobijeni pomoću programa *pDISOL-X*TM. Teorijski profili rastvorljivosti (isprekidana linija) izračunati su pomoću HH jednačine ($pK_a=10,28$ i $\log S_0 = -3,85$). Rastvorljivost (S) data je u jedinicama mol/L. Adaptirano iz Marković i saradnici, 2019 [7].

Prilikom analize rezultata programom *pDISOL-XTM*, modeli su definisani ravnotežama, prikazanim jednačinama (24 – 33) [7]:



U zavisnosti od sastava suspenzija u setovima 1 – 7, za analizu svakog pojedinačnog seta birane su ravnoteže koje najbolje opisuju dati sistem.

Kiselinska konstanta, dobijena iz profila rastvorljivosti setova 1 i 2 ($pK_a=10,44$), veća je kiselinske konstante dobijene nezavisnom metodom. Ovakva razlika u vrednostima konstanti, ukazuje da se u baznim rastvorima koji sadrže fosfate, dešavaju ili reakcije samoagregacije ili reakcije građenja kompleksa.

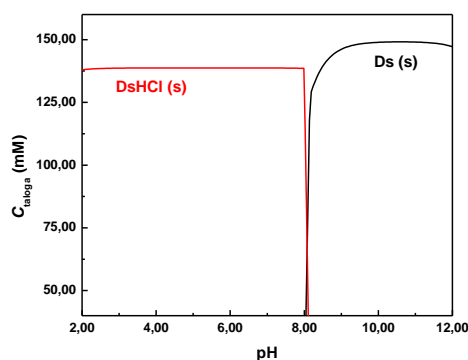
Sopstvena rastvorljivost desipramina i proizvod rastvorljivosti desipramin-hidrohlorida izračunati su iz seta 5 (**Tabela 6**), koji je dizajniran tako da suspenzije desipramina sadrže hloride, a da ne sadrže fosfate. Prilikom analize podataka dobijenih iz preostalih setova, ove konstante su uzete kao fiksne, pošto su izračunate iz seta u kome ne dolazi do smetnji izazvanih fosfatima.

Tabela 6. Set 5 – Ravnotežne konstante^a izračunate pomoću programa *pDISOL-XTM* [7]

Set	$\log S_0$	$\log K_{sp}^{\text{DsHCl}}$	pH_{opseg}	pH_{max}	I_{sr}^b	GOF
5	-3,85±0,04	-2,19±0,03	1,3 – 10,0	8,0	0,25	0,50

^aReferentna jonska sila 0,15 M, temperatura 25 ° C. ^bSrednja jonska sila (M)

Profil rastvorljivosti desipramina u setu 5, tačno se može opisati HH jednačinom na $\text{pH} > \text{pH}_{\text{max}}$, dok na nižim pH vrednostima dolazi do odstupanja (**Slika 12.c**). Rastvorljivost desipramina na $\text{pH} \sim \text{pH}_{\text{max}}$ veća je od teorijski izračunate vrednosti, što je posledica prezasićenja. Prema *pDISOL-XTM* analizi, čvrsta faza na $\text{pH} < 8,0$ je desipramin-hidrohlorid, a na $\text{pH} > 8,0$ molekularni desipramin (**Slika 13**).



Slika 13. Dijagram raspodele taloga u suspenzijama desipramina koje sadrže hloride (set 5). Koncentracija taloga izražena je kao broj mmol taloga u 1 L suspenzije.

Odvojenim analizama setova 1 i 2, dobijene su skoro iste vrednosti ravnotežnih konstanti. Zbog toga je bilo moguće analizirati ova dva seta kao jedan kombinovani set (**Tabela 7**).

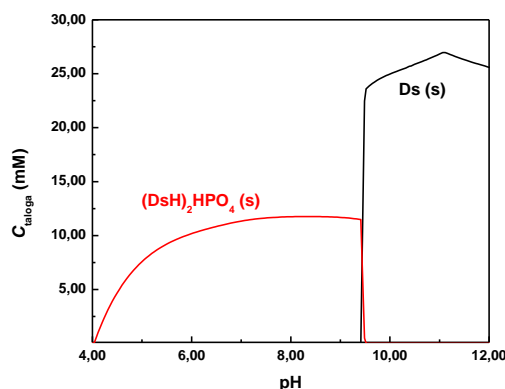
Tabela 7. Setovi 1 – 3 i uzorci OM14, OM15, OM24, OM25 – Ravnotežne konstante^a izračunate pomoću programa *pDISOL-X*TM [7]

Set/Uzorci	$\log S_0$	$\log K_{sp}^{2:1}$	$\log K_{221}$	pH_{opseg}	pH_{max}	I_{sr}^b	GOF
1, 2	-3,85 ^c	-7,38±0,01	4,58±0,10	4,4 – 11,6	9,5	0,41	0,51
3, OM14, OM15, OM24, OM25	-3,85 ^c	-7,06±0,03	4,80±0,10	4,0 – 11,5	9,3	0,41	0,67

^aReferentna jonska sila 0,15 M, temperatura 25 ° C. ^bSrednja jonska sila (M)

^cFiksna konstanta (dobijena analizom seta 5).

Profil rastvorljivosti desipramina u setovima 1 i 2 ne može se opisati pomoću HH jednačine (**Slika 12.a**). Kada je $pH > pH_{\text{max}}$, eksperimentalno određena rastvorljivost veća je od teorijski izračunate. Povećanje rastvorljivosti može se objasniti građenjem anjonskog kompleksa $Ds(DsH)HPO_4^-$. Mogućnost nastajanja samoagregata desipramina odbačena je zbog zapažanja da u suspenzijama desipramina koje ne sadrže fosfate (set 5), nema porasta rastvorljivosti na $pH > pH_{\text{max}}$. Proračuni su pokazali da je čvrsta faza u suspenzijama desipramina u pH opsegu 4 – 9 desipramin-hidrogenfosfat, a iznad pH 9 desipramin u obliku baze (**Slika 14**).



Slika 14. Dijagram raspodele taloga u suspenzijama desipramina koje sadrže hloride i fosfate (setovi 1 i 2). Koncentracija taloga izražena je kao broj mmol taloga u 1 L suspenzije.

Set 3 (suspenzije desipramina koje sadrže fosfate i hloride) analiziran je odvojeno od setova 1 i 2, iako se u oba slučaja može primeniti isti model. Prilikom obrade podataka iz seta 3, u proračun su uključeni i sledeći uzorci: OM14 (pH 9,57), OM15 (pH 11,10), OM24 (pH 9,44) i OM25 (pH 11,10), zato što su njihove pH vrednosti veće od pH_{max} , pa je na taj način moguće dobiti još jednu potvrdu nastajanja anjonskog kompleksa (**Tabela 7**). U baznoj sredini, $\log S$ -pH kriva odstupa na sličan način od krive dobijene na osnovu HH jednačine kao kod setova 1 i 2 (**Slika 12.b**). Dobijena vrednost konstante građenja kompleksa ne razlikuje se značajno od vrednosti dobijene analizom setova 1 i 2. Međutim, vrednost proizvoda rastvorljivosti fosfatne soli, određena iz seta 3, veća je nego u slučaju setova 1 i 2 (takođe veća od vrednosti dobijene analizom uzorka OM23 (pH 8,03) (**Tabela 8**)).

Tabela 8. Uzorak OM23 – Ravnotežne konstante^a izračunate pomoću programa $pDISOL-X^{TM}$ [7]

Uzorak	$\log K_{sp}^{1:1}$	$\log K_{sp}^{2:1}$	pH	pH_{max}	I_{sr}^b	GOF
OM23	-2,55 ^c	-7,27 ^d	8,03	4,9	0,28	^d

^aReferentna jonska sila 0,15 M, temperatura 25 ° C. ^bSrednja jonska sila (M)

^cVrednost korišćena kao fiksna konstanta (dobijena analizom uzorka OM21).

^dStandardna devijacija/GOF nije izračunata (broj uzoraka je 1).

Da bi se definisao model, koji najbolje opisuje ravnoteže na $pH < 4$ (Set 4), potrebno je, između ostalog, uzeti u obzir dve važne činjenice:

a) na niskim pH vrednostima i pri visokim koncentracijama desipramina, moguće je formiranje dva taloga: $DsHCl$ i $(DsH)H_2PO_4$ [7, 35, 54];

b) rastvorljivost desipramina je veća od očekivane u odnosu na ostale $\log S$ -pH profile (**Slika 12**).

Proizvod rastvorljivosti soli $DsHCl_{(s)}$ određen je analizom seta 5 (set bez fosfata) i iznosi $\log K_{sp}^{DsHCl} = -2,19$ (**Tabela 6**). Proizvod rastvorljivosti soli $(DsH)H_2PO_{4(s)}$ izračunat je analizom uzorka OM21 (pH=2,13; suspenzija bez hlorida) i iznosi $\log K_{sp}^{1:1} = -2,55$ (**Tabela 9**) [7]. Prema proračunima, čvrsta faza na $pH < 4$ u setu 4 je desipramin-hidrohlorid, uprkos nižem proizvodu rastvorljivosti fosfatne soli desipramina (**Tabela 10**). Glavni razlog ovome je formiranje katjonskog kompleksa $(DsH)_2H_2PO_4^+$ u rastvoru, što znači da nema dovoljno slobodnih fosfatnih jona da bi proizvod rastvorljivosti bio prekoračen.

Tabela 9. Uzorak OM21 – Ravnotežne konstante^a izračunate pomoću programa $pDISOL-X^{TM}$ [7]

Uzorak	$\log K_{sp}^{1:1}$	$\log K_{sp}^{2:1}$	pH	pH_{max}	I_{sr}^b	GOF
OM21	-2,55 ^c	-7,38 ^d	2,13	3,3	0,15	^c

^aReferentna jonska sila 0,15 M, temperatura 25 ° C. ^bSrednja jonska sila (M)

^cStandardna devijacija/GOF nije izračunata (broj uzoraka je 1).

^dFiksna konstanta (dobijena analizom setova 1 i 2).

Tabela 10. Set 4 i uzorak OM22 – Ravnotežne konstante^a izračunate pomoću programa $pDISOL-X^{TM}$ [7]

Set/Uzorak	$\log K_{sp}^{1:1}$	$\log K_{sp}^{2:1}$	$\log K_{241}$	$\log K_{sp}^{DsHCl}$	pH_{opseg}	pH_{max}	I_{sr}^b	GOF
4 i OM22	-2,55 ^c	-7,06 ^c	3,96±0,02	-2,19 ^c	2,0 – 3,8	4,7	0,30	0,37

^aReferentna jonska sila 0,15 M, temperatura 25 ° C. ^bSrednja jonska sila (M)

^cFiksne konstante ($\log K_{sp}^{1:1}$ je dobijena analizom uzorka OM21, $\log K_{sp}^{2:1}$ je dobijena analizom seta 3 i uzoraka OM14, OM15, OM24 i OM25, $\log K_{sp}^{DsHCl}$ je dobijena analizom seta 5).

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da je sistem ravnoteža u heterogenim sistemima desipramina koji sadrže hloride i fosfate vrlo komplikovan. Nastajanje kompleksa između desipramina i fosfata u rastvoru, povećava rastvorljivost desipramina na $\text{pH} < 4$ ($(\text{DsH})_2\text{H}_2\text{PO}_4^+$) i $\text{pH} > \text{pH}_{\text{max}}$ ($\text{Ds}(\text{DsH})\text{HPO}_4^-$). U čvrstoj fazi postoje dve transformacije, odnosno dolazi do formiranja tri taloga: desipramin-hidrohlorid ($\text{pH} < 4$), desipramin-hidrogenfosfat ($\text{pH} 4 - 9$) i desipramin baza $\text{pH} > 9$. Tačne vrednosti prelaza (pH_{max}) variraju u zavisnosti od odnosa koncentracija prisutnih jona u rastvoru. Dizajn suspenzija desipramina koje sadrže samo hloride (set 5) i suspenzija koje sadrže samo fosfate (OM21), olakšao je analizu izuzetno komplikovanih heterogenih sistema desipramina koje sadrže i fosfate i hloride. Izračunavanje proizvoda rastvorljivosti desipramin-hidrohlorida i sopstvene rastvorljivosti desipramina bez potencijalnih smetnji od strane fosfata, omogućeno je analizom seta 5. Proizvod rastvorljivosti desipramin-dihidrogenfosfata izračunat je analizom uzorka OM21 ($\text{pH} 2,13$), odnosno suspenzije desipramina koja sadrži fosfate.

Definisanje procedure koja će umanjiti prezasićenje bila je jedna od početnih ideja prilikom razvijanja *pH-Ramp shake-flask* metode. Kod jedinjenja strukturno sličnih desipraminu, tendencija ka formiranju prezasićenih rastvora zavisi od odmerenog čvrstog oblika jedinjenja (baza ili so) i izraženija je u suspenzijama pripremljenim dodavanjem supstance u obliku soli [17, 19, 22, 37]. Iz tog razloga, prvi korak kod titracija iz bazne ka kiseloj sredini, bila je priprema bazne suspenzije ($\text{pH} > 11$, u talogu desipramin baza). Rezultati su pokazali da u suspenzijama desipramina (setovi 1 i 2) ne dolazi do prezasićenja [7]. Nastajanje prezasićenih rastvora nije primećeno ni u setu 3, gde je primenjena titracija u suprotnom smeru (iz kisele ka baznoj sredini). Međutim, prezasićenje blizu pH_{max} uočljivo je u setu 5, setu koji je dizajniran kao set koji sadrži samo hloride i koji je analiziran pomoću *shake-flask* metode, ne pomoću *pH-Ramp shake-flask* metode.

III.2.3 Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama desipramina

Za karakterizaciju čvrste faze, dobijene u suspenzijama desipramina (setovi 6 i 7), korišćene su sledeće metode: elementalna analiza, termogravimetrija, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i difrakcija X-zraka praha [7]. U nekim slučajevima, nije bilo moguće analizirati talog pomoću svih navedenih metoda, zato što je dobijena masa taloga bila manja od očekivane.

Rezultati elementalne analize taloga izolovanih iz setova 1, 2 i 5 – 7 prikazani su u **Tabelama 11. i 12.**

Tabela 11. Elementalna analiza taloga, izolovanih iz suspenzija desipramina koje sadrže hloride (set 5) [7]

uzorak	pH	%C	%H	%N
1	1,31	70,18	7,25	9,12
2	2,38	70,62	7,64	9,34
3	3,02	70,53	7,22	9,25
4	4,93	70,96	7,29	9,21
5	7,59	70,85	7,30	9,18

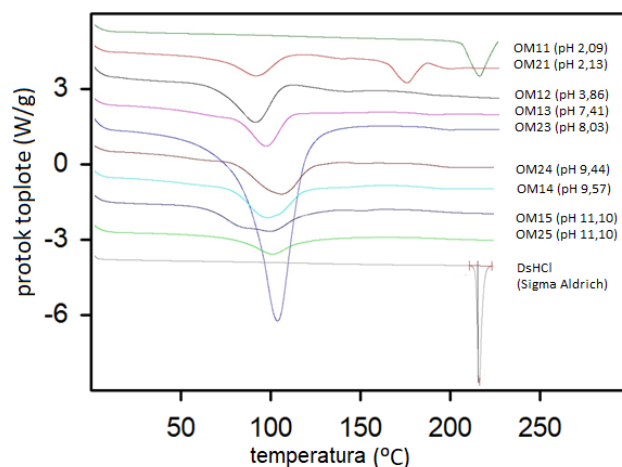
Tabela 12. Elementalna analiza taloga, izolovanih iz suspenzija Ds koje sadrže fosfate i hloride (setovi 1, 2, 6, 7). Jedino je talog OM21 izolovan iz suspenzije Ds koja sadrži fosfate (ne sadrži hloride) [7]

uzorak	pH	%C	%H	%N	sastav taloga na osnovu teorijskih izračunavanja
OM11	2,09	76,64	10,36	9,88	DsHCl
OM21	2,13	54,65	7,25	7,03	(DsH) ₂ H ₂ PO ₄ ×2H ₂ O
OM22	3,84	57,51	6,95	7,36	(DsH) ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O
OM12	3,86	62,12	8,13	7,97	(DsH) ₂ HPO ₄ ×4H ₂ O
2 (set 2)	5,36	60,94	7,52	8,16	(DsH) ₂ HPO ₄ ×5H ₂ O
OM13	7,41	60,41	7,80	7,82	(DsH) ₂ HPO ₄ ×5H ₂ O
5 (set 2)	7,50	60,78	7,36	7,87	(DsH) ₂ HPO ₄ ×5H ₂ O
OM23	8,03	46,80	8,44	6,01	(DsH) ₂ HPO ₄ ×16H ₂ O
6 (set 1)	8,55	58,70	7,20	7,73	(DsH) ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O
OM24	9,44	58,49	8,37	7,66	Ds×6H ₂ O ^a
OM14	9,57	56,64	6,46	7,29	Ds×6H ₂ O ^a
OM15	11,10	72,47	9,09	9,36	Ds×2H ₂ O

^apH vrednost uzoraka je bliska vrednosti pH_{max}. Postoji mogućnost da je sastav taloga (DsH)₂HPO₄×6/7H₂O ili smeša fosfatne soli i baze.

U cilju jednostavnijeg tumačenja rezultata urađena je i elementalna analiza komercijalnog uzorka desipramin-hidrohlorida (Sigma–Aldrich). Prema rezultatima analize, komercijalni uzorak sadrži: 70,89% C, 7,46% H i 9,20% N. Poređenjem ovih vrednosti sa ostalim vrednostima, može se zaključiti da je talog u suspenzijama seta 5 u pH opsegu 1,31 – 7,59 najverovatnije desipramin-hidrohlrid. Sastav ostalih taloga nije očigledan na osnovu elementalne analize. Teorijsko izračunavanje procenata C, H i N (uzimajući u obzir rezultate pDISOL–XTM analize) ukazuje da su uzorci hidratizani u različitom stepenu: talog desipramin-hidrogenfosfata sadrži 4 – 16 molekula vode, talog desipramina 2 – 6 molekula vode, dok talog desipramin-dihidrogenfosfata sadrži 2 molekula vode.

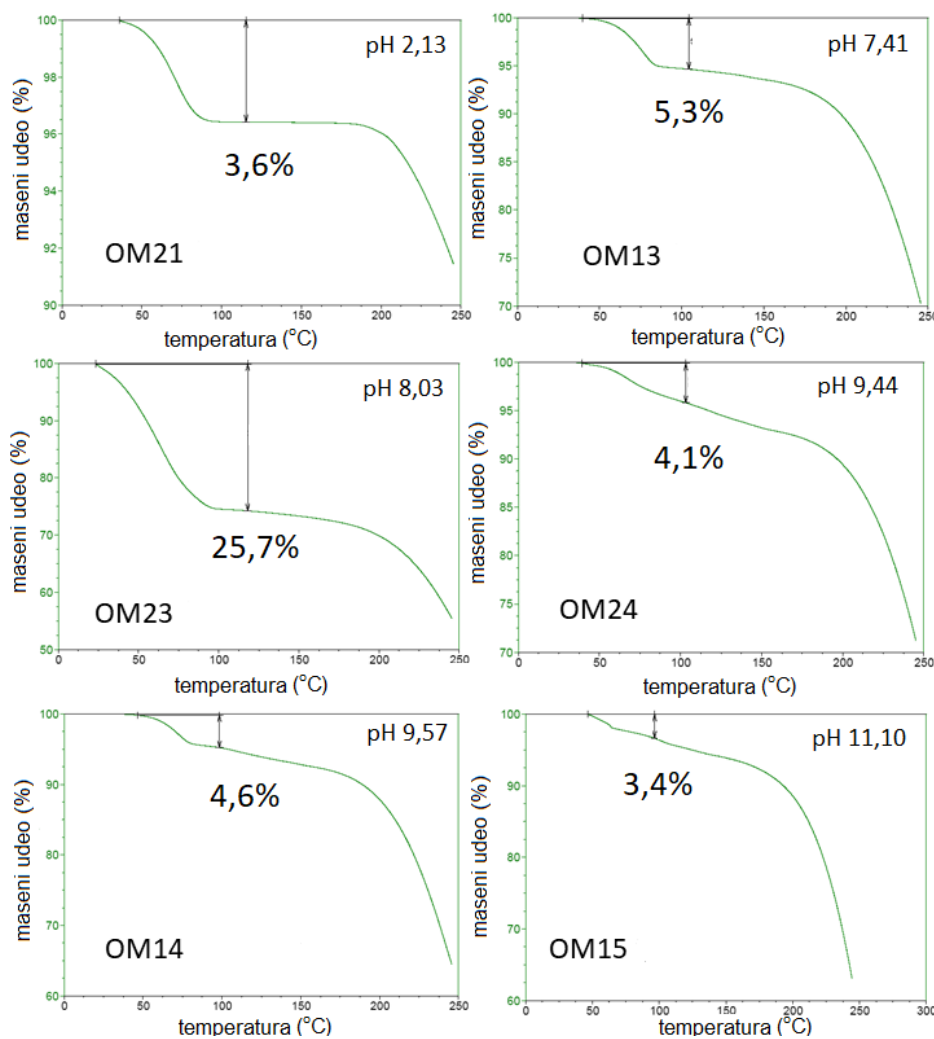
Termičko ponašanje uzoraka analizirano je pomoću DSC. Radi poređenja, analiziran je i komercijalni uzorak desipramin-hidrohlorida (Sigma Aldrich). DSC termogrami prikazani su na **Slici 15**.



Slika 15. DSC termogrami komercijalnog DsHCl i uzoraka iz setova 6 i 7. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2019* [7].

Na termogramima svih uzoraka uočava se široka endoterma u opsegu 100 – 120 ° C, izuzev u uzorcima komercijalnog DsHCl i uzorka OM11. DSC termogram komercijalnog DsHCl sadrži samo endotermu na 217 ° C, koja potiče od topljenja soli. Endoterma na istoj temperaturi postoji u termogramu uzorka OM11 (pH 2,09), što ukazuje da je ovaj talog anhidrovani desipramin-hidrochlorid. Rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim *pDISOL-XTM* i elementalnom analizom. DSC termogrami ostalih uzorka razlikuju se od termograma komercijalnog DsHCl i OM11, što znači da talog u ostalim uzorcima nije hidrohloridna so desipramina.

Sadržaj vode u talozima određen je termogravimetrijskom analizom. Tokom eksperimenta, uzorci su zagrevani u atmosferi azota od 25 do 300 ° C, brzinom zagrevanja od 10 ° C/min. Dobijeni termogrami prikazani su na **Slici 16**.

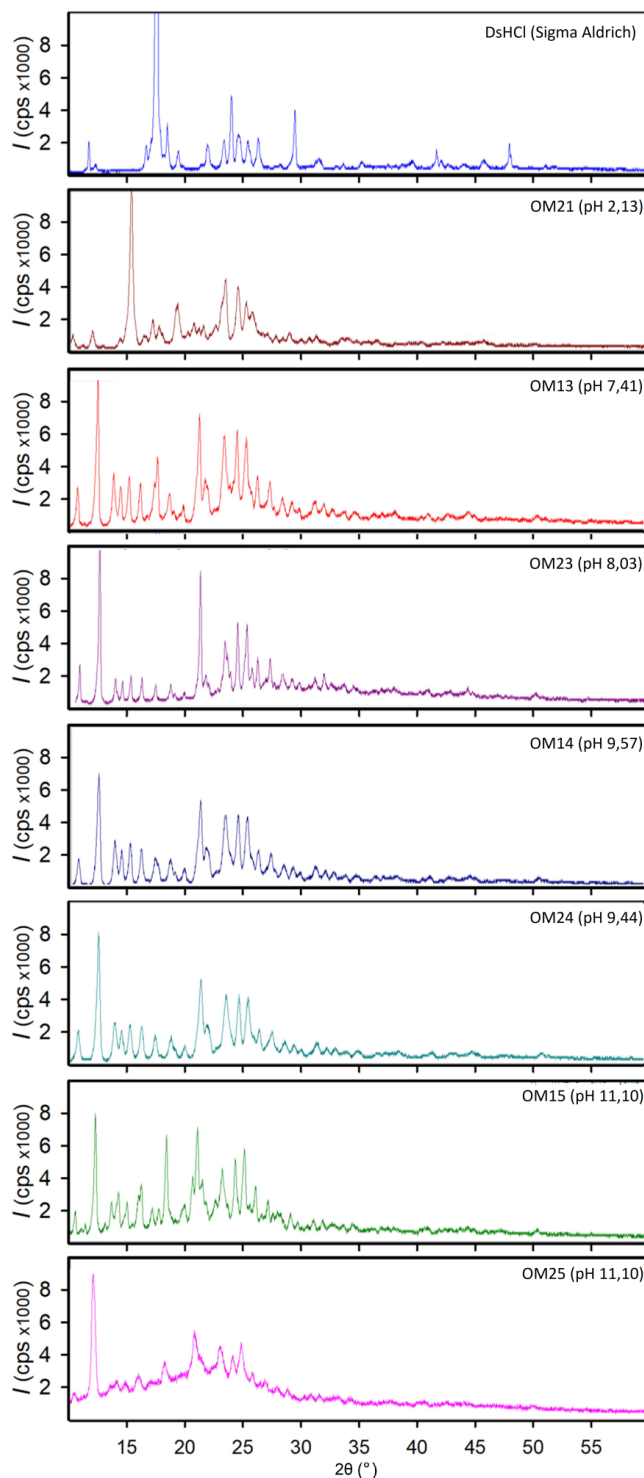


Slika 16. Termogrami taloga dobijenih u suspenzijama desipramina iz setova 6 (OM13, OM14, OM15) i 7 (OM21, OM23, OM24). Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2019* [7].

Gubitak mase na temperaturi oko 100 ° C (**Slika 16**) ukazuje na prisustvo vode u svim uzorcima (gubitak mase počinje na temperaturi nižoj od 100 ° C zbog efekta prodivavanja azota). Na temperaturi iznad 100 ° C javlja se plato na termogramima uzorka OM21, OM13 i OM23, za razliku od uzorka OM24, OM14 i OM15, kod kojih masa nastavlja da se smanjuje sa porastom temperature. To znači da se u drugom slučaju, osim procesa dehidracije, dešava i proces sublimacije.

Prisustvo endoterme u DSC termogramima oko 100°C i gubitak mase u TGA termogramima na približno istoj temperaturi, dovoljni su dokazi prisustva vode vezane za čvrstu fazu u analiziranim uzorcima. Vezana voda može biti ili deo kristalne rešetke ili može biti smeštena u tunele kristalne rešetke.

Metodom difrakcije X-zraka praha (**Slika 17**) potvrđeno je da su analizirani uzorci kristalni, osim uzorka OM25, koji ima delimično amorfni karakter.



Slika 17. PXRD difraktogrami komercijalnog DsHCl i uzoraka iz setova 6 i 7. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2019* [7].

Na **Slici 17.** mogu se uočiti razlike u difraktogramima na sledećim pH vrednostima: I) pH 2,13; II) pH 7,41 – 9,57 (male razlike u difraktogramima se mogu objasniti različitim stepenima hidratacije kristala) i III) pH 11,10. Svi difraktogrami razlikuju se od difraktograma komercijalnog DsHCl. DSC termogrami većine uzoraka takođe se razlikuju (osim uzorka OM11) od termograma komercijalnog DsHCl. Na osnovu PXRD, DSC i $pDISOL-X^{TM}$ analiza, može se zaključiti da su ostali talozi (osim OM11) ili fosfatne soli desipramina ili čist molekulski desipramin (baza). Tri pomenuta difraktograma odgovaraju sledećim jedinjenjima:

I) $(DsH)H_2PO_4$ hidrat na pH 2,13 (OM21),

II) $(DsH)_2HPO_4$ hidrat u pH oblasti 7,41 – 9,57 (OM13, OM23, OM14 i OM24),

III) Ds hidrat na pH 11,10 (OM15 i OM25).

Uzorak OM21 (pH 2,13) je suspenzija Ds koja sadrži fosfate, a ne sadrži hloride. Ovaj uzorak je specifično dizajniran za određivanje proizvoda rastvorljivosti desipramin-dihidrogenfosfata. Analizom čvrste faze utvrđeno je prisustvo očekivanog taloga, što potvrđuje da je način pripreme uzorka bio odgovarajući. Zanimljivo je da samo u DSC termogramu ovog uzorka, osim dehidratacione endoterme, postoji i endoterma topljenja oko 175 ° C.

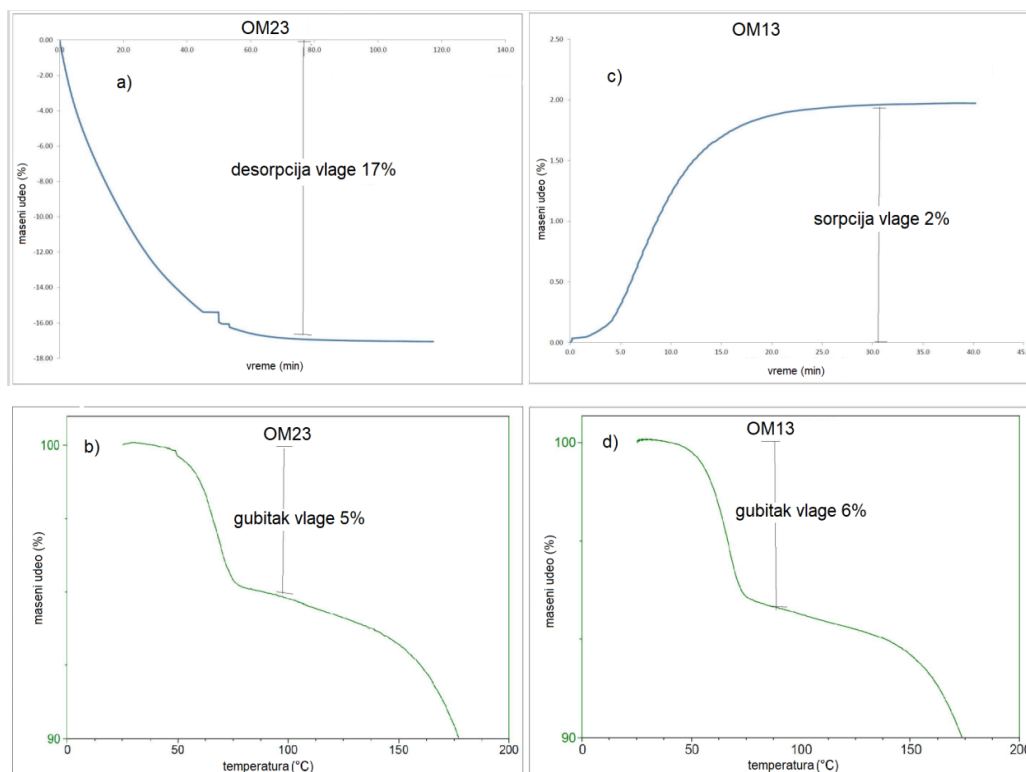
Na pH ~ 3,9 može dolaziti do prelaza dihidrogenfosfatne u hidrogenfosfatnu so (pH vrednost je bliska pH_{max}), ali i do faznog prelaza hidrohloridne soli u hidrogenfosfatnu u zavisnosti od toga da li dolazi do građenja kompleksa u rastvoru između desipramina i fosfata. Nažalost, količina uzorka OM12 (pH 3,86) i OM22 (pH 3,84) nije bila dovoljna za izvođenje PXRD analize radi potvrde strukture taloga. Ali DSC termogram uzorka OM12 uporediv je sa termogramom uzorka OM13 ($(DsH)_2HPO_4$ hidrat), a razlikuje se od termograma uzorka OM11 (DsHCl) i OM21 ($(DsH)H_2PO_4$ hidrat), što može značiti da su ovi uzorci najverovatnije hidrati desipramin-hidrogenfosfata.

Uzorci OM14 (pH 9,57) i OM24 (pH 9,44) analizirani su pomoću programa $pDISOL-X^{TM}$ zajedno sa uzorcima iz seta 3, pri čemu je izračunat pH_{max} 9,3. Prema tome, u ovim uzorcima se desipramin najverovatnije nalazi u molekulskom obliku (baza). Poređenjem TGA termograma, može se primetiti da postoji veća sličnost u termičkom ponašanju ovih uzoraka (dehidratacija + sublimacija) sa uzorcima molekuskog desipramina, nego hidrogenfosfatne soli (dehidratacija). Uprskos navedim činjenicama, PXRD analiza ukazuje da difraktogrami ovih uzoraka više odgovaraju desipramin-hidrogenfosfatu, nego molekulskom desipraminu.

PXRD difraktogrami pokazuju da je uzorak OM15 potpuno kristalan, dok je uzorak OM25 delimično kristalan. Ovakve razlike u PXRD difraktogramima uzorka izolovanih na istoj pH vrednosti iz suspenzija sličnog sastava, ukazuju da je desipramin verovatno tokom određivanja rastvorljivosti u obliku kristalnog hidrata, ali da vrlo lako može biti preveden u amorfni oblik tokom razdvajanja faza ili sušenja taloga. Takođe TGA analiza pokazuje da je molekulski desipramin isparljiv, pošto se gubitak mase dešava i nakon dehidratacije.

Elementalna i TGA analiza pokazale su velike razlike u sadržaju vode u različitim uzorcima, pa je bilo potrebno proveriti da li je to posledica formiranja različitih hidrata ili drugih efekata (različit stepen sušenja taloga ili različita sorpcija vlage tokom sušenja na vazduhu). Vremenski gledano, vreme sušenja svih taloga je bilo jednako – 3 dana. Ali, stepen sušenja taloga i stepen sorpcije/desorpcije vode može da varira sa masom taloga, količinom vode prisutne u talogu i relativnom vlažnošću vazduha [2]. Zbog toga je urađen dodatni eksperiment. Uzorci OM13 (pH 7,41) i OM23 (pH 8,03), desipramin-hidrogenfosfati, koji pokazuju bitno različit gubitak mase u termogramima (5,3% i 25,7%, respektivno) izloženi su relativnoj vlažnosti vazduha od 50% na 25 ° C [7]. Ovi uslovi su izabrani zato što najpribližnije opisuju realne uslove u kojima je talog sušen na vazduhu. Eksperiment je trajao sve dok se masa taloga nije ustalila, odnosno kada više nije dolazilo do gubitka mase zbog sorpcije ili desorpcije (**Slike 18.a i 18.c**). Nakon toga, snimljeni su TGA termogrami ovih uzoraka (**Slike 18.b i 18.d**), na kojima se vidi da je gubitak mase u oba

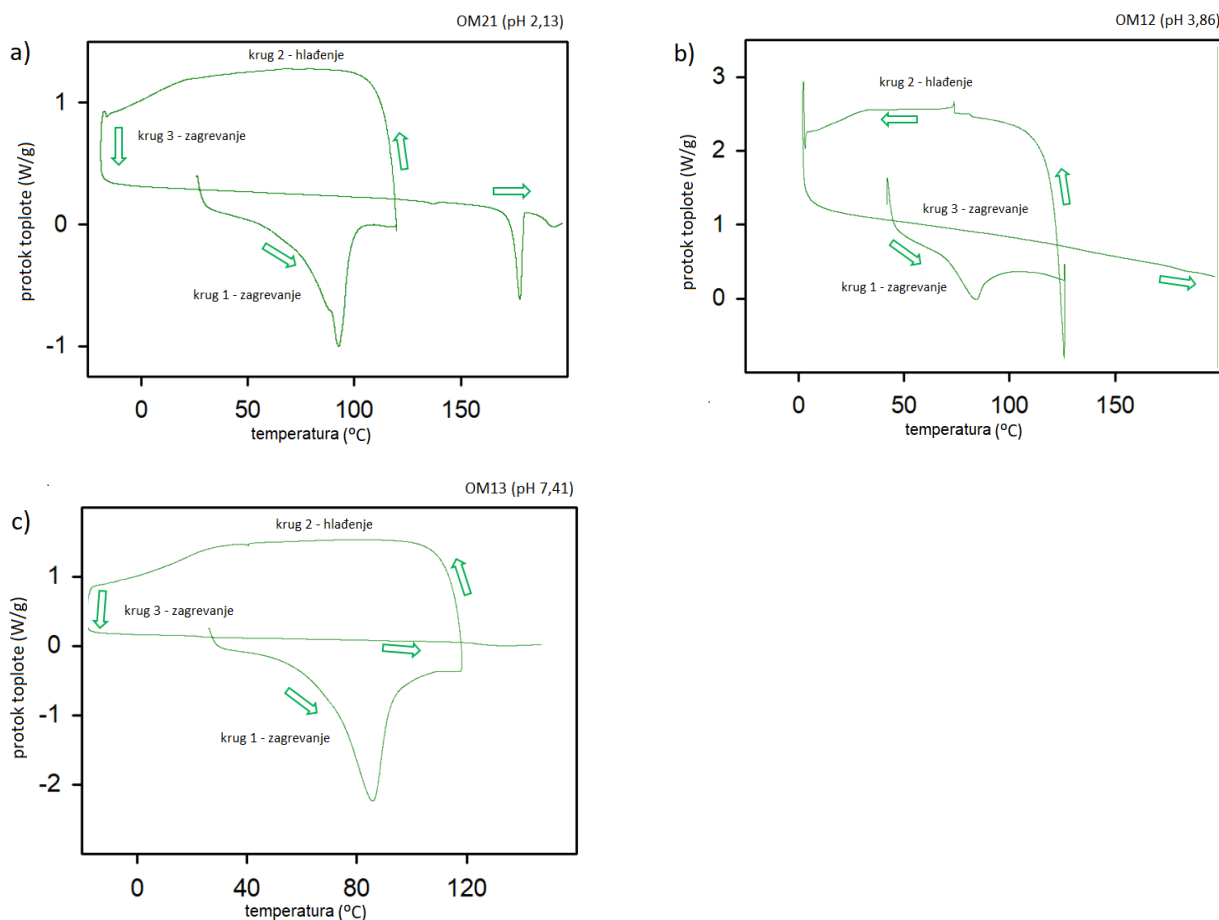
slučaja približan (5 i 6%). To znači da sadržaj vode u uzorcima zavisi i od stepena sušenja taloga na vazduhu.



Slika 18. Termogrami: a) desorpcije vlage na 25 °C/50% RH uzorka OM23, (b) uzorka OM23 nakon postizanja ravnoteže u uslovima 25 °C/50% RH, c) sorpcije vlage na 25 °C/50% RH uzorka OM13, d) uzorka OM13 nakon postizanja ravnoteže u uslovima 25 °C/50% RH. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2019* [7].

Pokazano je da sadržaj vode određen EA i TGA analizom zavisi od uslova u kojima su talozi sušeni, nakon razdvajanja faza. Da bi se proverilo da li je to imalo uticaja na dobijene DSC termograme, tri uzorka su podvrgnuta ciklusima zagrevanje – hlađenje – zagrevanje (**Slika 19**). Na termogramu uzorka OM21 (pH 2,13) uočava se dehidrataciona endoterma u prvom krugu zagrevanja, nakon čega sledi drugi krug hlađenja i treći krug ponovnog zagrevanja. U trećem krugu, na termogramu se uočava samo endoterma topljenja, a ne dehidrataciona endoterma. U slučaju uzoraka OM12 i OM13, na termogramu se uočava dehidrataciona izoterma u prvom krugu zagrevanja, međutim nema ni dehidratacione, ni endoterme topljenja u trećem krugu zagrevanja.

Ovakvo termičko ponašanje ukazuje da uzorci prelaze iz kristalnog u amorfno stanje nakon dehidratacije, osim kada u termogramu postoji još jedna endoterma na višim temperaturama. Drugim rečima, kristalni hidrati desipramin-hidrogenfosfata prelaze u amorfni oblik nakon dehidratacije, dok kristalni hidrat desipramin-dihidrogenfosfata zadržava kristalni oblik i nakon dehidratacije. Zanimljivo zapažanje je da endoterma topljenja dihidrogenfosfatne soli postaje oštrija nakon ciklusa zagrevanje – hlađenje – zagrevanje, što je još jedan parametar koji pokazuje izuzetno visok kristalni karakter ove soli. Sličnosti između DSC termograma uzoraka molekuskog desipramina (OM15 i OM25) i termograma hidrogenfosfatnih soli, mogu značiti da i molekulski desipramin nakon zagrevanja (dehidratacije) može preći u amorfni oblik. Ova tvrdnja je dodatno opravdana rezultatima PXRD analize, gde se jasno uočava razlika u kristalnosti/amorfности dva uzorka.



Slika 19. Ciklusi zagrevanje – hlađenje – zagrevanje taloga izolovanih iz suspenzija: a) OM21 (pH 2,13), b) OM12 (pH 3,86) i c) OM13 (pH 7,41). Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2019* [7].

Ovaj eksperiment (**Slika 19**) potvrđuje da različit stepen sušenja taloga na vazduhu ne menja DSC termograme, niti PXRD difraktograme, ali može objasniti različit sadržaj vode u TGA i EA analizama. Jasno se vidi da bilo koji hidrogenfosfat prelazi u amorfni oblik nakon dehidratacije, dok dihidrogenfosfat zadržava kristalnu strukturu. PXRD difraktogrami pokazuju razliku između dihidrogenfosfata i hidrogenfosfata, kao i sličnosti između hidrogenfosfata izolovanih na različitim pH vrednostima, bez obzira na sadržaj vode. Zbog sličnosti u termičkom ponašanju uzoraka OM12 i OM13, koje se razlikuje od termičkog ponašanja uzorka OM21, opisani eksperiment daje još jednu potvrdu da je uzorak OM12 (pH 3,86) hidrat desipramin-hidrogenfosfata.

Na osnovu karakterizacije čvrste faze, očigledno je da voda ima važnu ulogu u stabilizaciji kristalne strukture hidrogenfosfata i molekuskog desipramina. Voda može biti ili deo kristalne rešetke hidrata ili može biti nestehiometrijska voda, koja ispunjava tunele u kristalnoj rešetki. U svakom slučaju, tokom određivanja rastvorljivosti, talozi su u kontaktu sa vodom, što znači da su u kristalnom obliku. Odnosno, određena rastvorljivost desipramina je prava termodinamička rastvorljivost.

III.3 Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima nortriptilin-hidrohlorida

III.3.1 Proučavanje rastvorljivosti nortriptilina u zavisnosti od pH vrednosti

pH–*Ramp shake–flask* metoda uspešno je primenjena na proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima desipramina [6 – 8]. U cilju daljeg razvoja i optimizacije metode, istraživanje je usmereno na proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima nortriptilina, strukturnog analoga desipramina. Razlika u strukturi ogleda se u zameni atoma azota u tricikličnom sistemu atomom ugljenika (**Slika 1**).

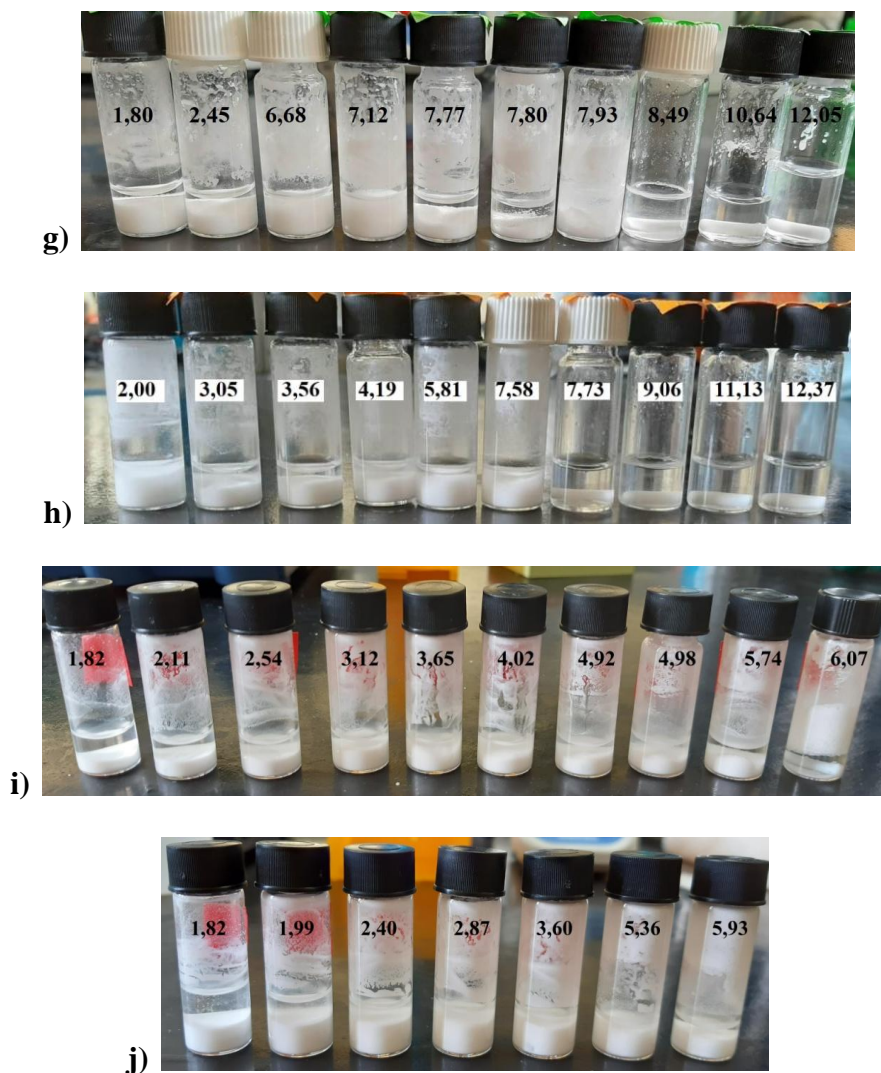
Tumačenje rezultata pH-zavisne rastvorljivosti desipramina u suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate bio je priličan izazov [7]. Dobijeni rezultati pokazuju koliko je važno osmisлити dobru proceduru pre početka eksperimentalnog rada u smislu lakšeg tumačenja kasnije dobijenih rezultata, ali i u smislu uštede supstance. U procesu dizajna i razvoja lekova važna su oba aspekta. „Koncentracije“ suspenzija desipramina u setovima 1 – 5 bile su dizajnirane tako da ušteda jedinjenja bude što je moguće veća, ali da dobijeni rezultati, bez obzira na razlike u „koncentraciji“ suspenzije, suštinski odgovaraju jedinstvenom logS–pH dijagramu. Eksperimenti za definisanje ravnoteža u heterogenim sistemima nortriptilina isplanirani su tako da osnovni uslovi ostanu isti kao u eksperimentima za proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima desipramina (na primer temperatura određivanja 25 ± 1 °C i vreme uspostavljanja ravnoteže 24 sata (6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije)), ali sa nekim modifikacijama, koje mogu podići eksperimentalni dizajn na viši nivo.

Osmišljeno je 11 setova za određivanje rastvorljivosti u kojima su „koncentracije“ suspenzija nortriptilina bile približno 60 mg/mL [10, 11, 13]. Suspenzije nortriptilina koje sadrže i hloride i fosfate pripremljene su u okviru setova 1 – 7. Setovi 8 i 9 bili su suspenzije koje sadrže samo hloride, a setovi 10 i 11 supenzije koje sadrže samo fosfate. Titracije od niže ka višoj pH vrednosti primenjene su u setovima 1 – 4, dok su titracije od više ka nižoj pH vrednosti primenjene u setovima 5 – 7, 10 i 11. U slučaju setova 8 i 9, koji ne sadrže fosfate, napravljene su početne suspenzije u 0,15 M NaCl, koje su nakon podele u više bočica, titrovane ka višoj ili ka nižoj pH vrednosti. U svim eksperimentima korišćen je komercijalno dostupan nortriptilin u obliku hidrohloridne soli. Uzorci u setovima 10 i 11, pripremljeni su u nekoliko koraka: priprema nortriptilin baze od NorHCl, priprema početne suspenzije baze, priprema pojedinačnih uzoraka. Koncentracija nortriptilina u supernatantu, dobijenom nakon razdvajanja faza centrifugiranjem, određena je pomoću HPLC–UV/VIS metode.

Uzorci nortriptilina nakon 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije, a pre razdvajanja faza, prikazani su na **Slici 20**. U svim uzorcima evidentno je postojanje heterogenog sistema sa приметnim belim čvrstim talogom (potiče od fosfatnih i/ili hloridnih soli nortriptilina) ili uljastim talogom nortriptiln baze. Uzorci pH vrednosti 11,44 i 11,74 iz seta 7 nisu analizirani zbog slučajne kontaminacije tokom razdvajanja faza.



Slika 20. Fotografije uzoraka Nor posle 24 sata uspostavljanja ravnoteže iz: a) seta 2, b) seta 3 [10], c) seta 4, d) seta 5, e) seta 6, f) seta 7, g) seta 8, h) seta 9, i) seta 10 i j) seta 11. Brojevi na slikama predstavljaju pH vrednosti suspenzija nakon 24 sata.



Slika 20. (nastavak) Fotografije uzoraka Nor posle 24 sata uspostavljanja ravnoteže iz: a) seta 2, b) seta 3 [10], c) seta 4, d) seta 5, e) seta 6, f) seta 7, g) seta 8, h) seta 9, i) seta 10 i j) seta 11. Brojevi na slikama predstavljaju pH vrednosti suspenzija nakon 24 sata.

III.3.2 Određivanje ravnotežnih konstanti u heterogenim sistemima nortriptilina pomoću programa $pDISOL-X^{TM}$

Program $pDISOL-X^{TM}$ korišćen je za obradu $\log S-pH$ podataka, dobijenih analizom setova 1 – 11 [13]. Modeli u programu definisani su ravnotežama (34 – 43). Nisu sve prikazane ravnoteže korišćene prilikom postavljanja modela svakog seta. Izračunate ravnotežne konstante (sopstvene rastvorljivosti, proizvodi rastvorljivosti, konstante stabilnosti) u heterogenim sistemima nortriptilina prikazane su u **Tabeli 13**.

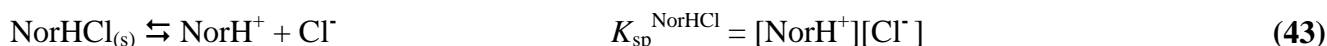
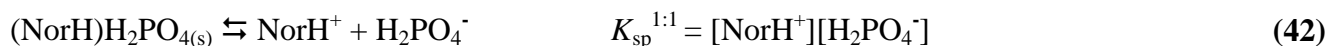
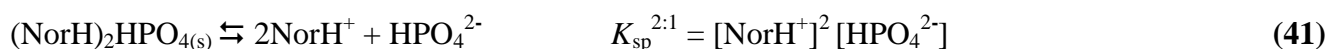
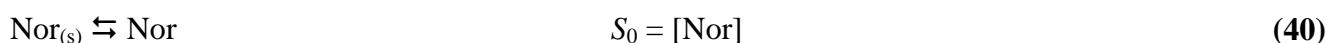
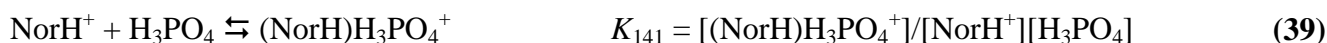
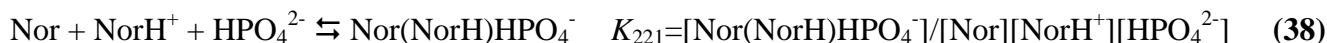
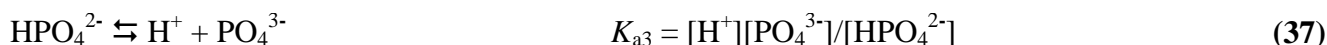
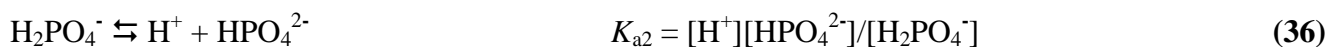
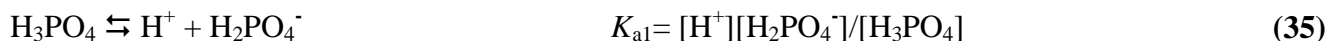
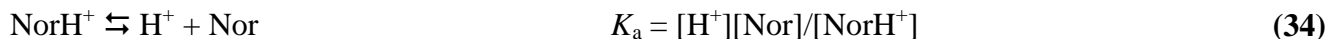
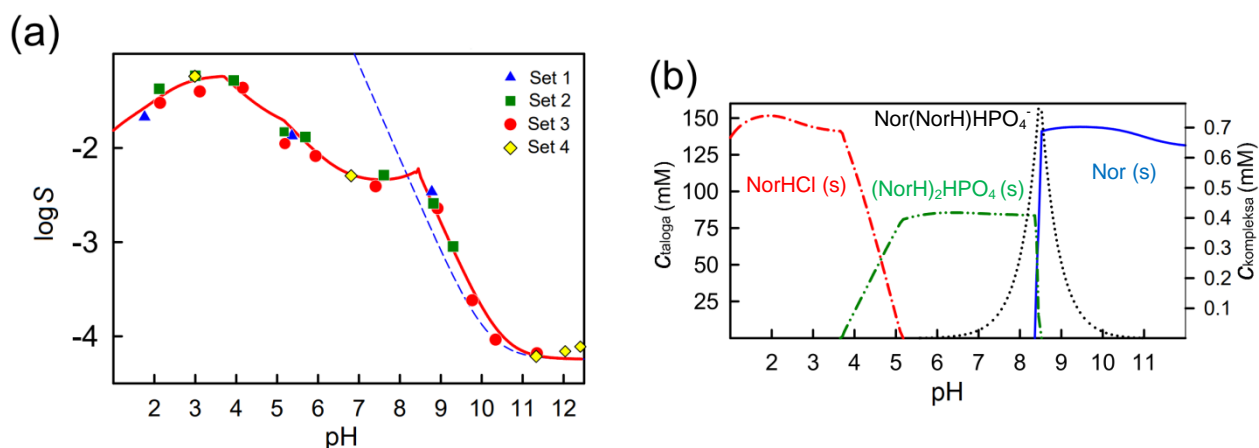


Tabela 13. Ravnotežne konstante u suspenzijama nortriptilina (*pDISOL-XTM*)^a [13]

Set	log S_0	log K_{sp}^{NorHCl}	log $K_{sp}^{1:1}$	log $K_{sp}^{2:1}$	log K_{221}	log K_{141}	I_{sr} (M)
1 - 4	-4,24±0,03	-2,52±0,03	/	-6,50±0,03	5,20±0,07	/	0,33
5	-4,24±0,08	-2,80±0,03	/	/	5,14±0,41	/	0,50
6	-4,23±0,09	-2,83±0,04	/	-7,22±0,06	5,07±0,54	/	0,40
7	-4,24±0,06	-2,84±0,04	/	-6,67±0,07	5,11±0,31	/	0,47
8, 9	-4,23±0,02	-2,72±0,01	/	/	/	/	0,21
10, 11	/	/	-2,95±0,01	-6,64±0,01	/	0,69±0,08	0,46

^a 25 °C; $I_{ref}=0,15$ M; $pK_a=10,13$

Na **Slikama 21 – 24.** prikazani su profili rastvorljivosti nortriptilina, dobijeni pomoću programa *pDISOL-XTM*, analizom setova 1 – 11 (puna linija); kao i dijagrami raspodele koji pokazuju zavisnost koncentracije taloga i kompleksa u sistemu od pH vrednosti. „Koncentracija“ taloga izražena je u jedinicama mmol/L. Odnosi se na broj milimolova taloga u 1 L suspenzije. Teorijski profili rastvorljivosti, određeni pomoću HH jednačine, prikazani su isprekidanim linijama.

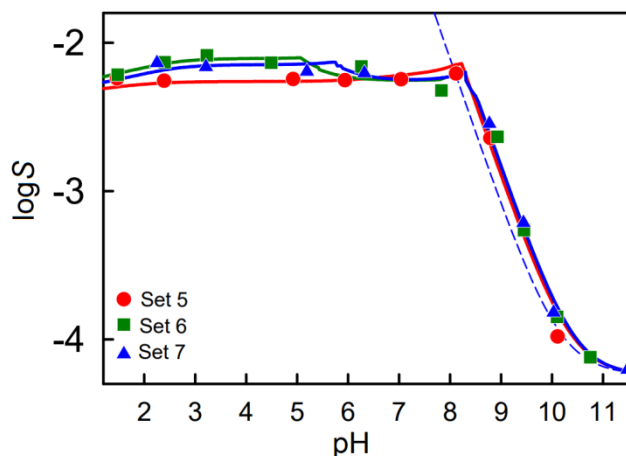


Slika 21. Setovi 1 – 4 (titracije iz kisele ka baznoj sredini, $pDISOL-X^{TM}$): a) profil rastvorljivosti nortriptilina (puna linija) u suspenziji koja sadrži hloride i fosfate. Teorijski profil (isprekidana linija) rastvorljivosti dobijen pomoću HH jednačine; b) dijagrami raspodele taloga i kompleksa. Rastvorljivost je izražena u jedinicama mol/L. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].

Kao što se sa **Slike 21.** može videti, setovi 1 – 4 (suspenzije nortriptilina koje sadrže hloride i fosfate, titracije iz kisele ka baznoj sredini) analizirani su kao jedan set, zato što su pojedinačnom analizom setova dobijene gotovo jednake vrednosti konstanti ravnoteža. Dobijeni profil rastvorljivosti nortriptilina ne može se opisati HH jednačinom. Građenje anjonskog kompleksa između nortriptilina i fosfata $Nor(NorH)HPO_4^-$ ima za posledicu povećanje rastvorljivosti nortriptilina u pH opsegu 8,5 – 11. Osim toga, izgled profila rastvorljivosti ukazuje na postojanje dva prelaza u čvrstoj fazi. Proračuni pokazuju da se na $pH < 3,71$ (pH_{max}) u čvrstoj fazi nalazi NorHCl. Zatim, dolazi do transformacije NorHCl u $(NorH)_2HPO_4$ u pH opsegu 3,71 (pH_{max}) – 5,19 (pH_{min}). Nortriptilin-hidrogenfosfat jedino je jedinjenje u čvrstoj fazi od pH 5,19 do pH 8,36, kada počinje prelaz u nortriptilin bazu. Transformacija fosfatne soli u molekularni nortriptilin dešava se u pH opsegu 8,36 (pH_{max}) – 8,47 (pH_{min}). Iznad pH 8,47 izdvaja se samo molekularni nortriptilin. Prva transformacija (iz hidrohloridne u fosfatnu so nortriptilina) dešava se u pH opsegu suspenzije od 1,48 pH jedinica, dok se druga transformacija (iz fosfatne soli u bazu) odigrava u užem opsegu od 0,11 pH jedinica.

Promena pH vrednosti i rastvorljivosti u prisustvu dve čvrste faze u talogu, nije u skladu sa objašnjenjem pojma pH_{max} koji su predložili Bogardus i Blackwood 1979. godine [23]. Avdeef je primetio da u nekim slučajevima i pH vrednost i rastvorljivost variraju tokom prelaza u čvrstoj fazi, posebno kada eksperimentalni dizajn odgovara uslovima titracije iz kisele ka baznoj sredini [13, 82].

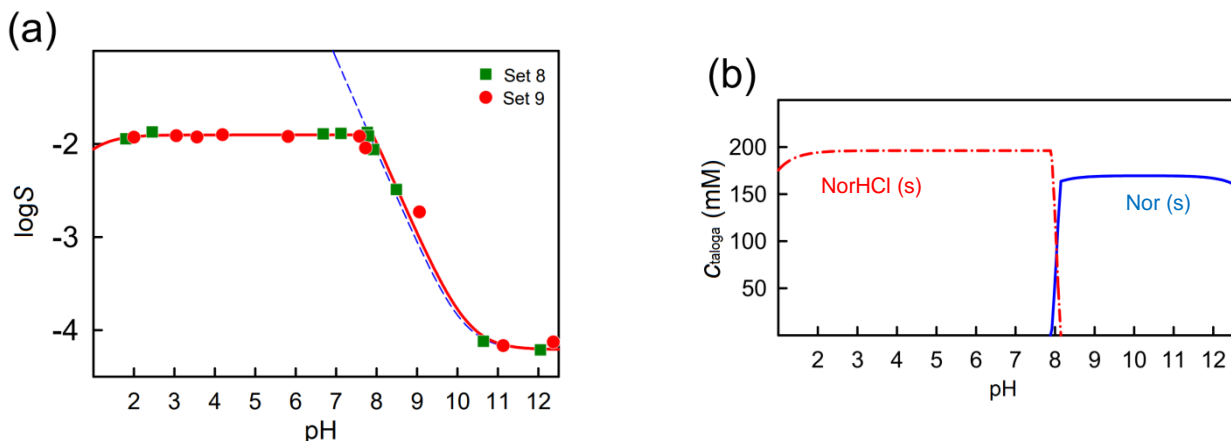
Setovi 5 – 7 prikazani su na **Slici 22.** (titracije iz bazne ka kiselj sredini) sadrže različite totalne koncentracije fosfata i hlorida, pa su analizirani odvojeno [13]. Veća rastvorljivost nortriptilina od teorijski izračunate na pH vrednostima većim od 8, objašnjava se nastajanjem anjonskog kompleksa $Nor(NorH)HPO_4^-$, kao i u slučaju titracija iz kisele ka baznoj sredini. U setu 5 maksimalna koncentracija ovog kompleksa (0,58 mM) je na pH 8,22 (približna pH vrednost kao kod setova 1 – 4). Analizom setova 5 – 7 pomoću programa $pDISOL-X^{TM}$ dobijene su slične vrednosti konstante građenja anjonskog 221 kompleksa, koje se ne razlikuju značajno od vrednosti dobijene analizom setova 1 – 4 (**Tabela 13**).



Slika 22. Setovi 5–7 (titracije iz bazne ka kiseloj sredini, $pDISOL-X^{TM}$) – Profili rastvorljivosti nortriptilina (pune linije) u suspenziji koja sadrži hloride i fosfate. Teorijski profil rastvorljivosti (isprekidana linija) dobijen pomoću HH jednačine. Rastvorljivost je izražena u jedinicama mol/L. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].

Na pH vrednostima nižim od 8, mogu se primetiti drastične razlike u izgledu profila rastvorljivosti dobijenih titracijama iz kisele ka baznoj sredini (setovi 1 – 4) i titracijama iz bazne ka kiseloj sredini (setovi 5 – 7). Različit izgled profila rastvorljivosti uslovljen je razlikama u totalnim koncentracijama hlorida i fosfata u okviru setova 1 – 7. Totalna koncentracija fosfata (0,06 M) u setu 5 nije dovoljna za postizanje proizvoda rastvorljivosti fosfatnih soli. Kada je $pH \leq 8,21$ čvrsta faza je nortriptilin-hidrochlorid. Transformacija NorHCl u Nor bazu dešava se u vrlo uskom pH opsegu 8,21 (pH_{max}) – 8,27 (pH_{min}). Iznad pH 8,27 u talogu se nalazi samo Nor baza. Za razliku od seta 5, totalna koncentracija fosfata u setovima 6 i 7 (0,11 – 0,12 M) dovoljna je za postizanje proizvoda rastvorljivosti 2:1 fosfatne soli nortriptilina. U čvrstoj fazi dolazi do prelaza nortriptilin-hidrochlorida u nortriptilin-hidrogenfosfat na pH_{max} 5,0 (set 6) i pH_{max} 5,7 (set 7), iako je oblik logS–pH dijagrama po izgledu sličniji logS–pH dijagramu seta 5, nego profilu rastvorljivosti titracija iz kisele ka baznoj sredini (pH_{max} 3,71). Razlike u sastavu čvrste faze, ogledaju se i u razlikama u izračunatim vrednostima proizvoda rastvorljivosti nortriptilin-hidrogenfosfata pomoću programa $pDISOL-X^{TM}$ (**Tabela 13**). Takođe, pojedinačnom analizom setova 5 – 7, dobijene su približne vrednosti proizvoda rastvorljivosti nortriptilin-hidrochlorida, ali se ove vrednosti prilično razlikuju od vrednosti dobijene analizom titracija iz kisele ka baznoj sredini.

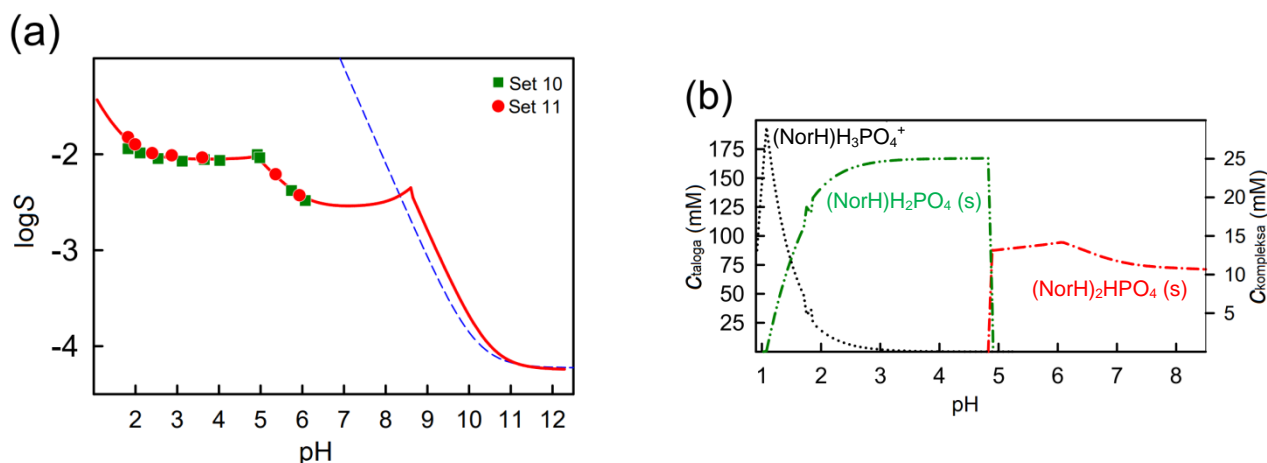
Setovi 8 i 9 (**Slika 23**) (suspenzije nortriptilina koje sadrže samo hloride, a ne sadrže fosfate) analizirani su kao jedan set.



Slika 23. Setovi 8 i 9 (*pDISOL-X*TM): a) Profil rastvorljivosti nortriptilina (puna linija) u suspenziji koja sadrži hloride. Teorijski profil (isprekidana linija) rastvorljivosti dobijen pomoću HH jednačine; b) Dijagram raspodele taloga. Rastvorljivost je izražena u jedinicama mol/L. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].

Za razliku od setova koji sadrže i hloride i fosfate, u setovima 8 i 9 nema odstupanja rastvorljivosti od teorijski izračunatih vrednosti na $\text{pH} > 8$. U ovim suspenzijama ne dolazi do građenja agregata niti kompleksa. Čvrsta faza u suspenzijama je nortriptilin-hidrohlorid na $\text{pH} < 8$, dok se na $\text{pH} > 8$ izdvaja nortriptilin baza. Prelaz između nortriptilin-hidrohlorida u nortriptilin bazu u talogu, dešava se u vrlo uskom pH opsegu. Vrednosti sopstvene rastvorljivosti i proizvoda rastvorljivosti nortriptilin-hidrohlorida izračunate iz ovih setova se mogu smatrati pouzdanim, zato što ovde nema smetnji od fosfata. Kao što se iz **Tabele 13.** vidi, vrednosti $\log S_0$ dobijene iz drugih setova, su praktično iste kao vrednost izračunata iz setova 8 i 9. Međutim, razlike postoje u vrednostima proizvoda rastvorljivosti hidrohloridne soli nortriptilina.

Setovi 10 i 11 (**Slika 24**) (suspenzije nortriptilina koje sadrže fosfate, a ne sadrže hloride) analizirani su kao jedan set.



Slika 24. Setovi 10 i 11 (*pDISOL-X*TM): a) Profil rastvorljivosti nortriptilina (puna linija) u suspenziji koja sadrži fosfate. Teorijski profil (isprekidana linija) rastvorljivosti dobijen pomoću HH jednačine; b) Dijagrami raspodele taloga i kompleksa. Rastvorljivost je izražena u jedinicama mol/L. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].

Povećana rastvorljivost na $\text{pH} < 2$ potiče od formiranja katjonskog kompleksa $(\text{NorH})\text{H}_3\text{PO}_4^+$. U čvrstoj fazi dolazi do taloženja nortriptilin-dihidrogenfosfata u pH oblasti 2 – 5, a nortriptilin-hidrogenfosfata u pH opsegu 5 – 9. Prelaz u čvrstoj fazi dešava se u uskom opsegu pH vrednosti. Pošto u ovim setovima nema smetnji od hlorida, izračunati proizvodi rastvorljivosti fosfatnih soli mogu se smatrati pouzdanim.

III.3.3 Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama nortriptilina

Čvrste faze nekih uzoraka iz setova 3, 6, 7 i 9 analizirane su pomoću elementalne analize [11, 13]. Teorijski izračunat procentni sastav komercijalno dostupnog nortriptilin-hidrohlorida je: 76,11% C; 7,40% H i 4,67% N. Na osnovu prikazanog procentnog sastava i analize programom $p\text{DISOL-X}^{\text{TM}}$, jasno je da je čvrsta faza izolovana iz seta 9 (**Tabela 14**) u pH opsegu 2,00 – 7,58 nortriptilin-hidrohlorid. Rezultati elementalne analize setova 3, 6 i 7 (**Tabele 15 – 17**) ukazuju na prelaz u čvrstoj fazi iz NorHCl u $(\text{NorH})_2\text{HPO}_4$, što je u skladu sa proračunima dobijenim pomoću programa $p\text{DISOL-X}^{\text{TM}}$. Izračunate vrednosti pH_{max} iz setova 3, 6 i 7 su redom 3,71; 5,0 i 5,7 [13].

Tabela 14. Elementalna analiza čvrste faze izolovane iz suspenzija seta 9 (suspenzije Nor koje sadrže hloride) [11, 13]

pH	% C	%H	%N	pretpostavljen sastav taloga ^a
2,00	74,32	6,95	4,64	NorHCl
3,05	74,54	7,09	4,74	NorHCl
3,56	74,40	7,00	4,63	NorHCl
4,19	72,27	6,85	4,70	NorHCl
5,81	74,86	6,86	4,64	NorHCl
7,58	73,92	6,91	4,58	NorHCl

^a verovatno hidratisan

Tabela 15. Elementalna analiza čvrste faze izolovane iz suspenzija seta 3 (suspenzije Nor koje sadrže hloride i fosfate) [11, 13]

pH	% C	%H	%N	pretpostavljen sastav taloga ^a
2,14	73,55	6,69	4,53	NorHCl
3,11	73,75	6,70	4,55	NorHCl
5,19	69,11	6,90	4,29	$(\text{NorH})_2\text{HPO}_4$
5,94	65,26	6,93	4,04	$(\text{NorH})_2\text{HPO}_4$
7,41	65,45	6,92	4,05	$(\text{NorH})_2\text{HPO}_4$

^a verovatno hidratisan

Tabela 16. Elementalna analiza čvrste faze izolovane iz suspenzija seta 6 (suspenzije Nor koje sadrže hloride i fosfate) [11, 13]

pH	% C	%H	%N	pretpostavljen sastav taloga ^a
1,48	69,87	6,57	4,34	NorHCl
2,40	69,09	6,46	4,28	NorHCl
3,23	72,40	6,65	4,49	NorHCl
4,49	69,69	6,54	4,32	NorHCl
6,26	66,05	6,74	4,08	(NorH) ₂ HPO ₄
7,83	65,53	7,00	4,04	(NorH) ₂ HPO ₄

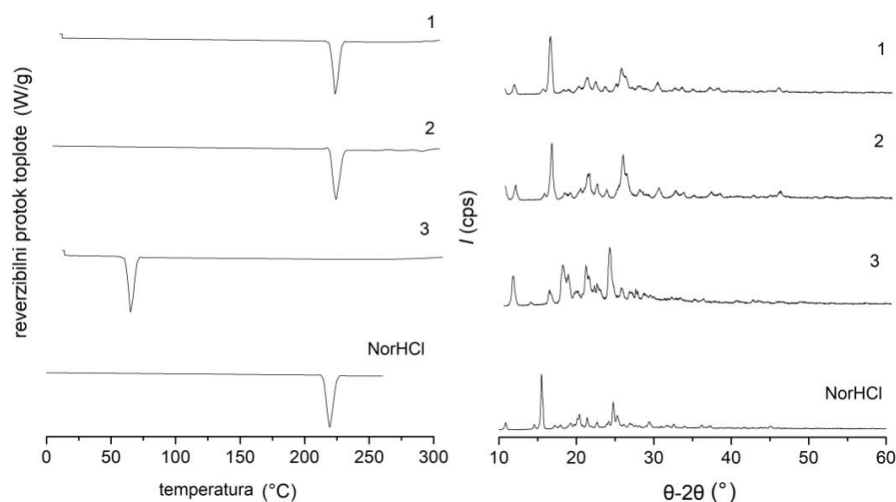
^a verovatno hidratisan**Tabela 17.** Elementalna analiza čvrste faze izolovane iz suspenzija seta 7 (suspenzije Nor koje sadrže hloride i fosfate) [11, 13]

pH	% C	%H	%N	pretpostavljen sastav taloga ^a
2,25	70,55	6,65	4,38	NorHCl
3,21	69,44	6,56	4,31	NorHCl
5,19	68,16	6,45	4,22	NorHCl
6,32	65,43	6,88	4,05	(NorH) ₂ HPO ₄

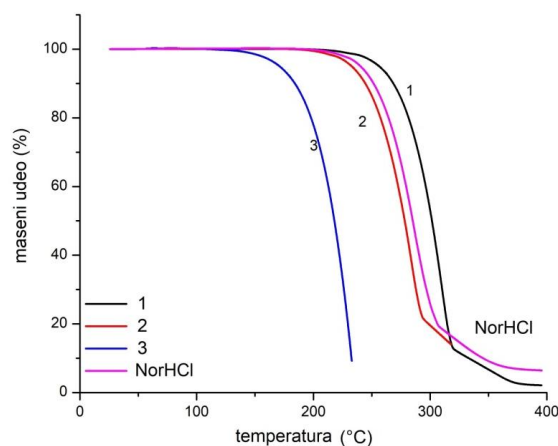
^a verovatno hidratisan

U cilju dobijanja dovoljne količine taloga za karakterizaciju čvrstog stanja (TGA, DSC i PXRD), pripremljen je set 12, povećavanjem „koncentracije“ suspenzija nortriptilina [13]. Uzorci iz seta 12 su suspenzije nortriptilina koje sadrže: samo hloride (uzorci 1 – 3), samo fosfate (uzorci 4 – 6) ili hloride i fosfate (uzorci 7 – 9).

Na **Slici 25.** prikazani su DSC termogrami i PXRD difraktogrami, a na **Slici 26.** TGA termogrami, uzoraka 1 – 3 i komercijalno dostupnog NorHCl.



Slika 25. DSC termogrami (levo) i PXRD difraktogrami (desno) uzoraka 1 (pH 2,3), 2 (pH 6,33) i 3 (pH 13) (suspenzije nortriptilina koje sadrže hloride) i komercijalno dostupnog NorHCl. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].



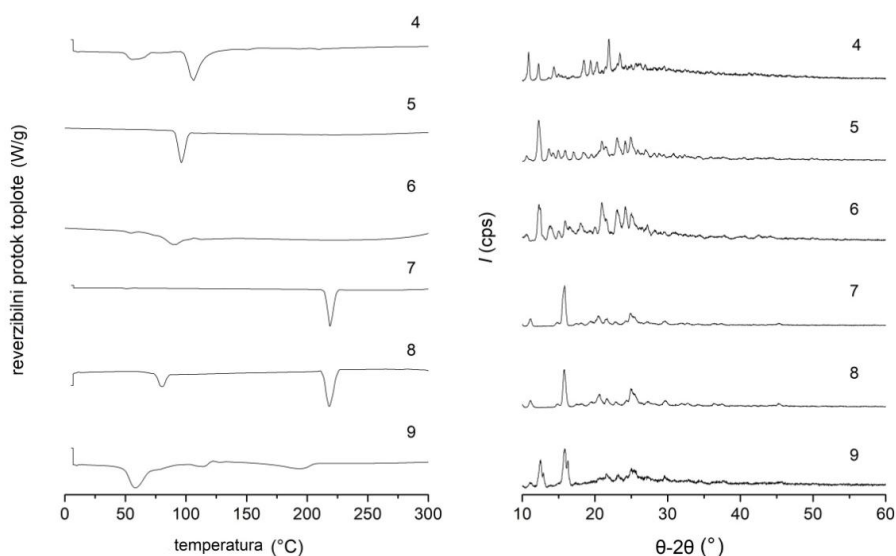
Slika 26. TGA termogrami uzoraka 1 (pH 2,3), 2 (pH 6,33) i 3 (pH 13) (suspencije nortriptilina koje sadrže hloride) i komercijalno dostupnog NorHCl. Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].

Na DSC termogramima uzoraka 1 (pH 2,3), 2 (pH 6,33) i komercijalno dostupnog NorHCl može se primetiti endoterma koja potiče od topljenja na 215 °C (početak prelaza (*onset*)), što ukazuje da su uzorci 1 i 2 po sastavu nortriptilin-hidrohlorid. Ova tvrdnja je dodatno opravdana sličnošću PXRD difraktograma uzoraka 1 i 2 sa komercijalno dostupnim NorHCl. TGA termogrami pokazuju da su uzorci 1 i 2 anhidrovani.

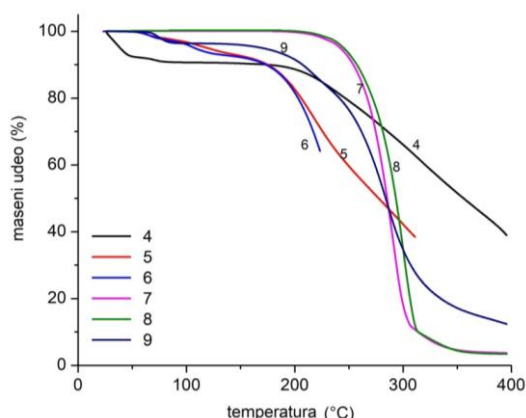
DSC termogrami i PXRD difraktogrami uzorka 3 (pH 13) razlikuju se od DSC termograma i PXRD difraktograma komercijalno dostupnog NorHCl, što ukazuje da je uzorak 3 po sastavu molekularni nortriptilin. U zavisnosti od načina pripreme, molekularni nortriptilin može biti u kristalnom ili delimično amorfnom/kristalnom obliku. Kada je pH vrednost suspencije nortriptilina veća od 9, izdvaja se uljast talog nortriptilina. Ukoliko se, nakon 6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije (pH 12 – 13), talog odvoji od rastvora i suši na vazduhu, talog ostaje u uljastom obliku, koji ima delimično amorfan/kristalni karakter i najverovatnije postoji u obliku hidrata, koji sadrži stehiometrijsku ili nestehiometrijsku vodu. Međutim, ukoliko se vreme uspostavljanja ravnoteže produži na 72 sati mešanja + 18 sati sedimentacije (uzorak 3, pH 13) i suši pod vakuumom, molekularni nortriptilin prelazi potpuno u kristalni oblik, što se jasno vidi po PXRD difraktogramu. U DSC termogramu Nor baze postoji endoterma topljenja na 54,8 °C (*onset*), a TGA termogram pokazuje da je baza u anhidrovanom obliku. Ova zapažanja pokazuju da nortriptilin baza može postojati u delimično amorfnom/kristalnom ili kristalnom obliku, kao i u anhidrovanom obliku ili u obliku hidrata. Tokom eksperimenta za određivanje rastvorljivosti, nortriptilin baza postoji u delimično amorfnom/kristalnom ili kristalnom obliku u zavisnosti od vremena za uspostavljanje ravnoteže i oba oblika su hidratizirana. Tek nakon sušenja pod vakuumom, baza prelazi u anhidrovani oblik.

Uzorci 4 (pH 2,0), 5 (pH 4,46) i 6 (pH 8,23) izolovani su iz suspencija nortriptilina koje sadrže samo fosfate. Prema analizi podataka pomoću programa *pDISOL-X*, očekivano je da uzorak 4 bude nortriptilin-dihidrogenfosfat, a uzorci 5 i 6 nortriptilin-hidrogenfosfat. DSC i PXRD analize su u skladu sa tim proračunom (**Slika 27**). Uočljiva je sličnost između DSC termograma i PXRD difraktograma uzoraka 5 i 6, kao i razlike između ovih uzoraka i uzorka 4. Razlika u intenzitetu endoterma u termogramima uzoraka 5 i 6 potiče od različite količine uzorka dostupnog za analizu. TGA analiza pokazuje da su uzorci hidratizirani (**Slika 28**). Gubitak mase uzorka 4 od 9,1% do 100 °C pokazuje da uzorak 4 nortriptilin-dihidrogenfosfat dihidrat. Masa uzoraka 5 i 6 smanji se za 2,1 – 2,5% u opsegu temperatura 90 – 100 °C, što ukazuje da su ovi uzorci monohidrati nortriptilin-hidrogenfosfata.

Uzorci 7 (pH 2,9), 8 (pH 4,7) i 9 (pH 6,38) izolovani su iz suspenzija nortriptilina koje sadrže i hloride i fosfate. Poređenjem rezultata DSC i PXRD analiza ovih uzoraka (**Slika 27**) sa uzorcima, za koje je utvrđeno da su hloridne ili fosfatne soli nortriptilina (**Slike 25. i 27**), potvrđene su već navedene predložene ravnoteže u heterogenim sistemima nortriptilina i pokazano je da dolazi do faznog prelaza u čvrstoj fazi između hloridne i fosfatne soli. Jasno se vidi da je uzorak 7 so nortriptilin-hidrohlorid i da praktično nema fosfata u talogu. Zatim, uzorak 8 je smeša NorHCl i $(\text{NorH})_2\text{HPO}_4$, dok je uzorak 9 skoro potpuno $(\text{NorH})_2\text{HPO}_4$. Iako je razlika između uzoraka 7 i 8 lako vidljiva na DSC termogramima, PXRD difraktogrami ova dva uzorka izgledaju slično, verovatno zbog male količine fosfata u talogu. Isto tako, uzorak 9 uglavnom je fosfatna so nortriptilina, ali u DSC termogramu i PXRD difraktogramu mogu se uočiti i tragovi hloridne soli. Rezultati TGA analize (**Slika 28**) pokazuju da je uzorak 9 hidratisan, dok su uzorci 7 i 8 anhidrovani.



Slika 27. DSC termogrami (levo) i PXRD difraktogrami (desno) uzoraka 4 – 6 (suspenzije nortriptilina koje sadrže samo fosfate) i uzoraka 7 – 9 (suspenzije nortriptilina koje sadrže i hloride i fosfate). Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].



Slika 28. TGA termogrami uzoraka 4 – 6 (suspenzije nortriptilina koje sadrže samo fosfate) i uzoraka 7 – 9 (suspenzije nortriptilina koje sadrže i hloride i fosfate). Adaptirano iz *Marković i saradnici, 2022* [13].

Ravnoteže u heterogenim sistemima nortriptilina u suspenzijama koje sadrže hloride i/ili fosfate definisane su zahvaljujući kombinovanoj primeni pH–*Ramp shake–flask* metode, programa pDISOL–XTM i metoda za karakterizaciju čvrstog stanja (TGA, PXRD, DSC i elementalna analiza) [13]. Razlike u izgledu profila rastvorljivosti nortriptilina dobijenih određivanjem rastvorljivosti u setovima 1 – 11, uspešno su objašnjene zahvaljujući detaljnoj analizi sastava rastvora i taloga. Pokazano je da smer u kome se izvodi podešavanje pH vrednosti suspenzija ima mnogo veći uticaj na rastvorljivost nortriptilina u suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate, nego što je to bio slučaj kod desipramina [7, 13].

Izuzetno su važna zapažanja da i desipramin i nortriptilin mogu da grade katjonske ((DsH)₂H₂PO₄⁺, (NorH)₃PO₄⁺) i anjonske komplekse (Ds(DsH)HPO₄⁻, Nor(NorH)HPO₄⁻) sa komponentama fosfatnog pufera, kao i da u zavisnosti od odnosa koncentracija kontra jona (hloridi i/ili fosfati) u suspenziji može doći do taloženja ovih jedinjenja u obliku hidrohloridnih soli, fosfatnih soli ili čistih baza [7, 13]. Takođe, transformacije u čvrstoj fazi počinju na različitim pH vrednostima (pH_{max}) u zavisnosti od smera u kome se izvodi podešavanje pH vrednosti suspenzija (iz kisele ka baznoj ili iz bazne ka kiseloj sredini) i sastava rastvora. Rezultati su pokazali da pomenuti parametri mogu da određuju i opseg pH vrednosti (pH_{max} – pH_{min}) u kojima se transformacija u čvrstoj fazi dešava. Prezasićenje nije primećeno u suspenzijama desipramina i nortriptilina analiziranih pH–*Ramp shake–flask* metodom.

U literaturi [14, 32, 81 – 83] je naglašena važnost poznavanja pH-zavisne rastvorljivosti slabo rastvornih jedinjenja u procesu razvoja formulacije potencijalnih lekova, posebno onih koje se koriste u obliku soli. Napomenuto je da su za pripremu odgovarajuće formulacije leka u obliku soli, koja će omogućiti najbolje terapijsko dejstvo, potrebni podaci o pH vrednosti sredine na mestu delovanja, kiselinskim konstantama leka i vrednosti pH_{max}, zato što ovi faktori direktno utiču na rastvorljivost leka na mestu delovanja. Ako se u tom kontekstu posmatra pH-zavisna rastvorljivost desipramina i nortriptilina u vodenim suspenzijama koje sadrže fosfate i/ili hloride, očigledan je značaj dobijenih rezultata [6 – 8, 10, 11, 13]. Prikazana zavisnost eksperimentalno dobijenih profila rastvorljivosti od kompletnog sastava suspenzije, sa akcentom na nastajanje kompleksa u rastvoru, sastava čvrste faze, vrednosti pH_{max}, opsega pH_{max} – pH_{min}, mogu biti od velike važnosti prilikom pripreme formulacija lekova i predviđanja i optimizacije njene uspešnosti u *in vivo* uslovima.

III.4 Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima imipramin-hidrohlorida

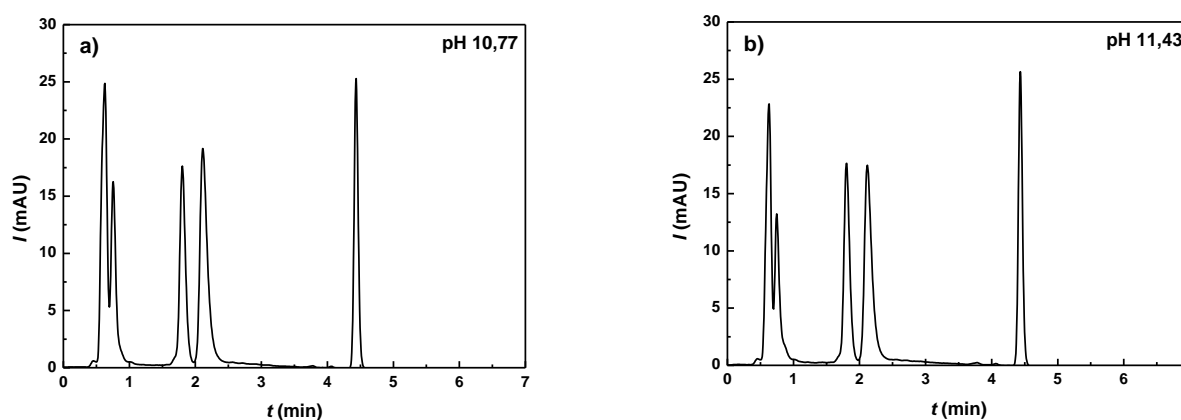
III.4.1 Proučavanje rastvorljivosti imipramina u zavisnosti od pH vrednosti

U cilju razvoja pH-Ramp shake-flask metode, istraživanje je usmereno na imipramin, strukturni analog desipramina, koji sadrži tercijarnu amino grupu umesto sekundarne amino grupe (jedan H atom je zamenjen metil grupom) (Slika 1). Rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate na 25 ± 1 °C, određena je u zavisnosti od pH vrednosti ovom metodom. Urađena su dva seta uzoraka (set 1 i 2) korišćenjem titracija od niske ka visokoj pH vrednosti [9]. Fotografija uzoraka imipramina iz seta 1 data je na Slici 29. U pH opsegu 4,06 – 8,11 u suspenziji postoji beo zrnast talog, dok se na $\text{pH} > 8,11$ izdvojilo ulje.



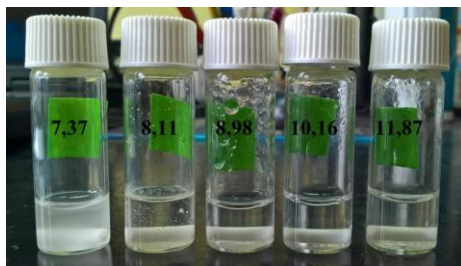
Slika 29. Set 1: uzorci imipramina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Brojevi predstavljaju pH vrednosti suspenzija nakon 24 sata.

„Koncentracije“ početnih kiselih suspenzija iz setova 1 i 2, bile su 56,5 mg/mL i 68,3 mg/mL. U ovim uslovima, nije bilo čvrste faze u sistemu kada je pH vrednost bila niža od 3,82. Nakon razdvajanja faza centrifugiranjem, koncentracije imipramina u tečnoj fazi, određene su pomoću HPLC-UV/VIS metode. Kvantifikacija je bila jednostavna u pH opsegu 3,82 – 8,87 zato što su hromatogrami tih uzoraka imali samo jedan pik, kao što je očekivano. Međutim, hromatogrami uzoraka čija je $\text{pH} > 10$, sadržali su više pikova (Slika 30). Postoji mogućnost da se u ovim rastvorima dešava degradacija imipramina i da preostali pikovi potiču od degradacionih proizvoda [111]. Rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže degradacione proizvode, izražena je kao koncentracija imipramina u tečnoj fazi.



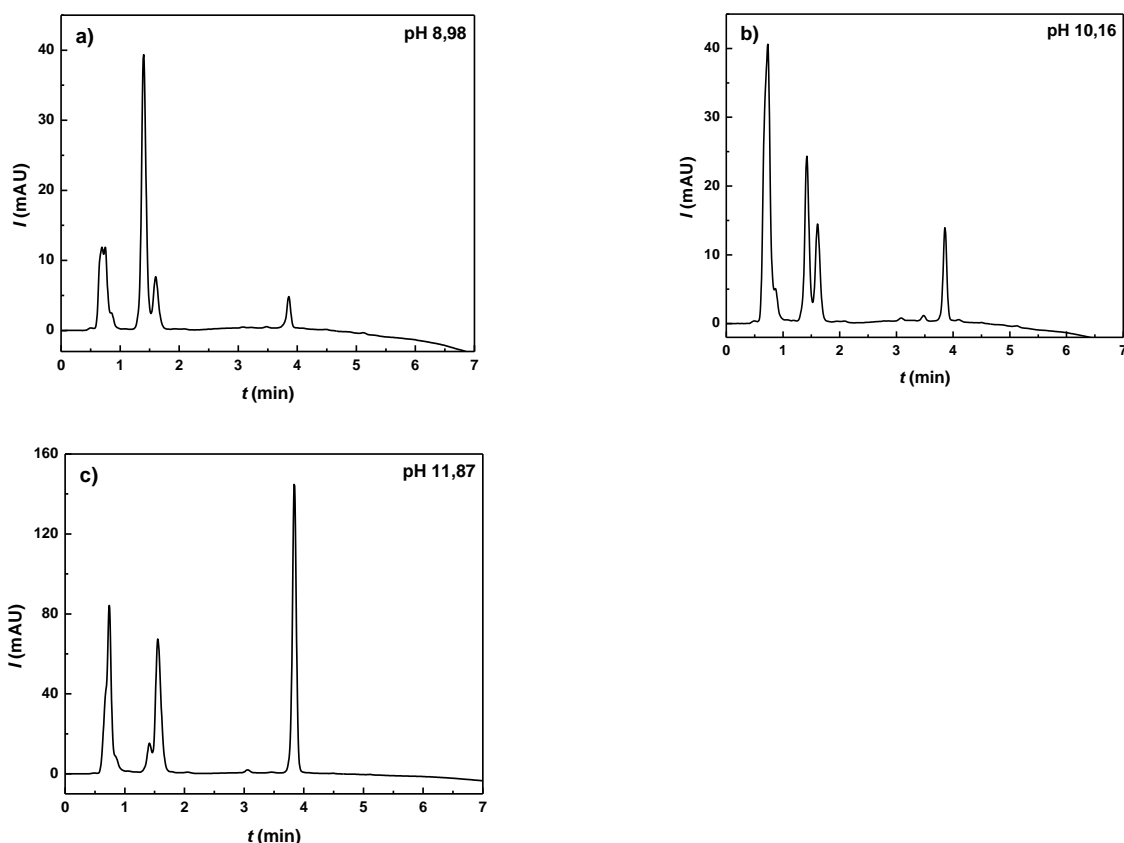
Slika 30. Hromatogrami uzoraka imipramina iz seta 1, čije su pH vrednosti [9]: a) 10,77 (razblaženje 2×) i b) 11,43 (razblaženje 2×).

Pripremljene su suspenzije imipramina koje sadrže hloride [9]. Na **Slici 31.** prikazani su uzorci iz seta 3, nakon 6 h mešanja i 18 h sedimentacije. Kao što se na **Slici 31.** može videti, u suspenziji pH vrednosti 7,37 faze nisu bile jasno razdvojene – suspenzija je mutna. U pH opsegu 8,11 – 11,87 došlo je do izdvajanja ulja.



Slika 31. Set 3: uzorci imipramina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Brojevi predstavljaju pH vrednosti suspenzija nakon 24 sata.

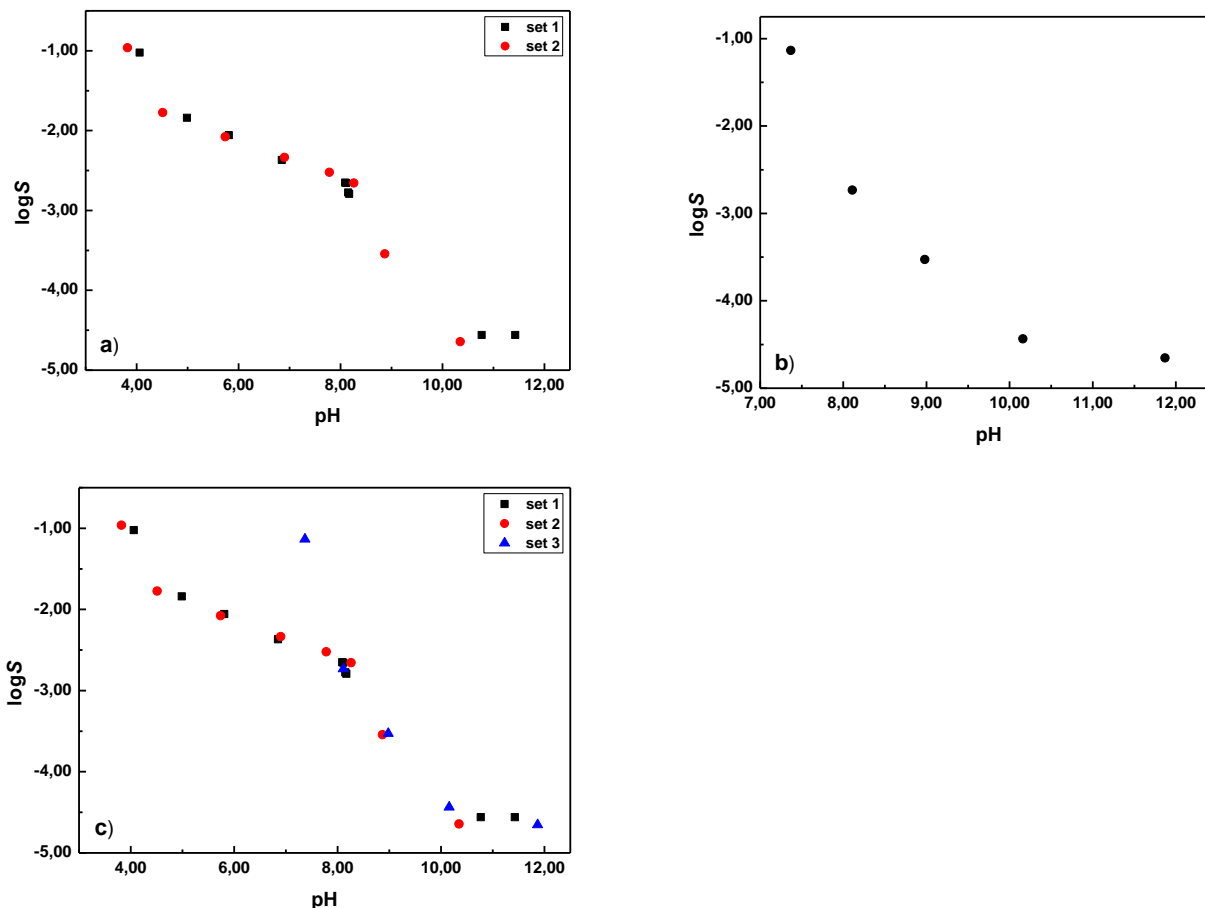
„Koncentracije“ suspenzija imipramina u uzorcima seta 3 bile su u opsegu 50,1 – 57,2 mg/mL. Pri $\text{pH} < 7,37$ nisu formirani zasićeni rastvori. Kvantifikacija imipramina u ovom setu bila je otežana na $\text{pH} \geq 8,98$ zbog pojave više pikova u hromatogramima, koji nisu uvek potpuno razdvojeni (loša rezolucija) (**Slika 32**). Na **Slici 32.** može se primetiti kako se odnos koncentracija imipramina i degradacionih proizvoda menja sa promenom pH vrednosti.



Slika 32. Hromatogrami uzoraka imipramina iz seta 3, čije su pH vrednosti: a) 8,98 (razblaženje 10×); b) 10,16 (razblaženje 2×) i c) 11,87 (razblaženje 2×) [9].

Profili rastvorljivosti imipramin-hidrohlorida dobijeni iz setova 1 – 3 prikazani su na **Slici 33.**

Kao što se vidi na **Slici 32.** rezolucija između pikova koji potiču od imipramina i degradacionog proizvoda nije zadovoljavajuća. Odnosno, koncentracije imipramina na $\text{pH} \geq 8,98$ ne mogu se smatrati tačnim vrednostima, već samo približnim. Međutim, ove vrednosti prikazane su na logS–pH dijagramu zato što se ne razlikuju značajno od rastvorljivosti imipramina određenim u setovima 1 i 2.



Slika 33. Profili rastvorljivosti imipramin-hidrohlorida [9]: a) setovi 1 i 2 (suspenzije koje sadrže hloride i fosfate), b) set 3 (suspenzije koje sadrže hloride) i c) setovi 1 – 3 na 25 ± 1 °C.

III.4.2 Određivanje kritične micelarne koncentracije imipramin-hidrohlorida

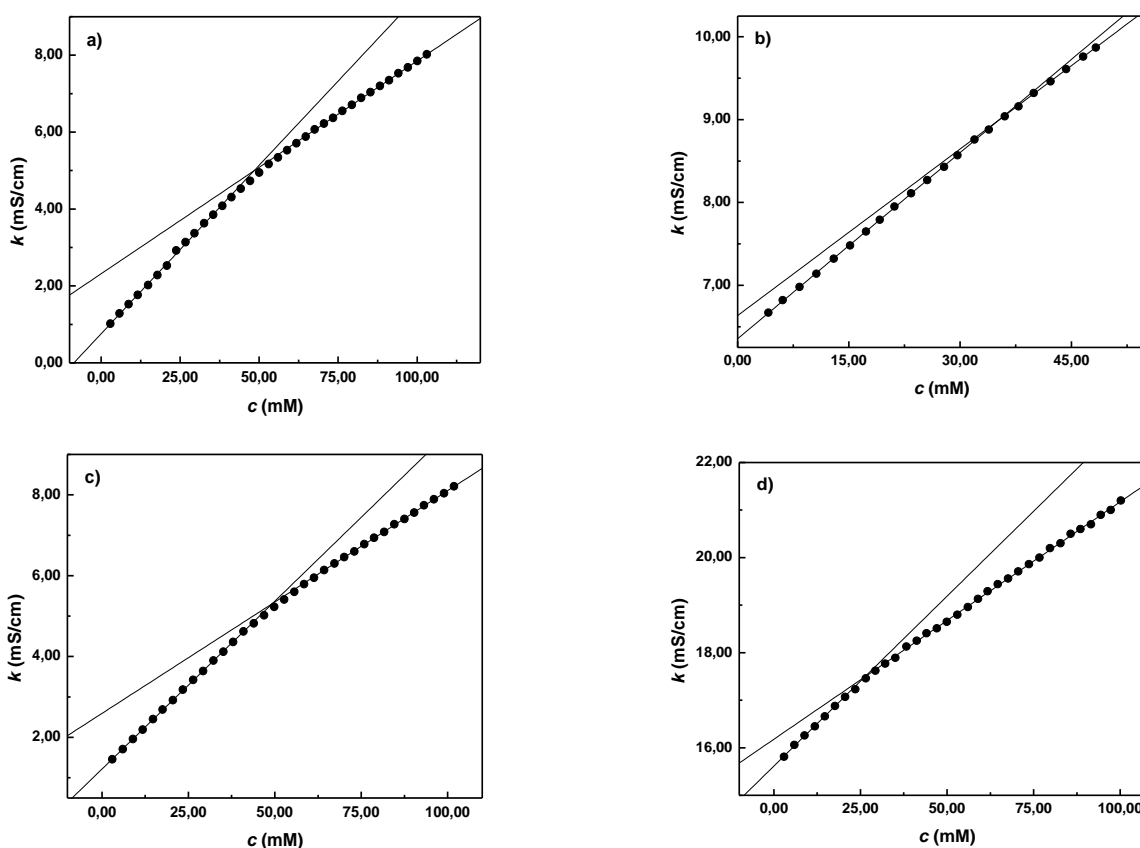
Čvrsta faza nije dobijena u uzorcima imipramina na $\text{pH} < 4$ u suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate, kao ni na $\text{pH} < 7$ u suspenzijama koje sadrže hloride. Radi utvrđivanja „koncentracije“ suspenzije koja je potrebna za dobijanje zasićenog rastvora imipramina urađen je sledeći eksperiment: Tačno odmerena masa čvrstog ImHCl dodavana je u alikvotima u rastvor dobijen mešanjem 0,15 M NaH_2PO_4 i 0,9725 M HCl. Izmerena pH vrednost bila je u opsegu 1,83 – 1,88. Suspenzija nije nastala čak ni kada je koncentracija imipramin-hidrohlorida dostigla vrednost 1,12 M (354,5 mg/mL).

U Opštem delu je navedeno da je imipramin površinski aktivna supstanca, tako da se povećana rastvorljivost u kiseljoj sredini može objasniti nastajanjem agregata u rastvoru [3, 9]. Prilikom razblaživanja nekih uzoraka u okviru pripreme za HPLC analizu, primećeno je da dolazi do taloženja imipramina (uzorci: pH 4,06 (set 1), 3,82 (set 2) i 7,37 (set 3)). Talog se brzo rastvorio, samo stajanjem ili nakon centrifugiranja. Ovakvo hemijsko ponašanje ukazuje da dolazi do

agregacije u rastvoru.

Na osnovu ovih zapažanja, jasno da je da dolazi do građenja agregata u proučavanim sistemima imipramin-hidrohlorida u kiseljoj sredini [9]. Iz tog razloga, poželjno je odrediti kritičnu micelarnu koncentraciju u sličnim eksperimentalnim uslovima koji su korišćeni za pripremu uzoraka u setovima 1 – 3.

Kritične micelarne koncentracije imipramin-hidrohlorida u rastvorima natrijum-dihidrogenfosfata (0,01 M i 0,10 M) i natrijum-hlorida (0,01 M i 0,15 M) na $25,0 \pm 0,1$ °C određene su metodom konduktometrijskih titracija [12]. Zavisnosti specifičnih provodljivosti od koncentracije ImHCl prikazane su na **Slici 34**. Na svakom grafiku mogu se uočiti dve linearne zavisnosti, koje se seku u jednoj tački. Koncentracija imipramin-hidrohlorida u tački preseka predstavlja vrednost kritične micelarne koncentracije, a iz odnosa nagiba pravih posle i pre KMK izračunat je stepen disocijacije agregata u rastvoru [56]. Vrednosti KMK i stepena disocijacije agregata prikazane su u **Tabeli 18**.



Slika 34. Zavisnost specifične provodljivosti od koncentracije ImHCl [12] u: a) 0,01 M NaH_2PO_4 (pH 4,81 – 4,60), b) 0,10 M NaH_2PO_4 (pH 4,45 – 4,33), c) 0,01 M NaCl (pH 5,98 – 5,17), d) 0,15 M NaCl (pH 5,92 – 5,17) na $25,0 \pm 0,1$ °C. Vrednosti pH u zagradi označavaju vrednosti izmerene na početku i na kraju eksperimenta.

Tabela 18. Kritične micelarne koncentracije (KMK) [12] i stepen disocijacije agregata (β) u rastvorima imipramin-hidrohlorida koji sadrže hloride i/ili fosfate na $25,0\pm 0,1$ °C

	0,01 M NaH ₂ PO ₄	0,10 M NaH ₂ PO ₄	0,01 M NaCl	0,15 M NaCl
KMK (mM)	48,34±1,82	35,46±8,69	49,27±1,06	26,21±2,28
β	0,63±0,01	0,89±0,02	0,66±0,01	0,70±0,01

Za pripremu početne kisele suspenzije imipramin-hidrohlorida u setovima 1 i 2 korišćen je 0,15 M rastvor NaH₂PO₄ [9]. Međutim, prilikom određivanja KMK vrednosti ImHCl u ovom rastvoru, nastala je suspenzija pre nego što je dostignuta vrednost kritične micelarne koncentracije [12]. Koncentracija ImHCl u trenutku nastanka suspenzije iznosila je 25,01 mM. Iz tog razloga, bilo je potrebno smanjiti totalnu koncentraciju fosfata u rastvoru, pa je korišćen 0,10 M rastvor. Kritična micelarna koncentracija u 0,10 M NaH₂PO₄ iznosi 35,46±8,69. Neobično velika vrednost standardne devijacije posledica je malog broja tačaka na grafiku nakon kritične micelarne koncentracije. Razlog tome je nastajanje suspenzije u trenutku kada je totalna koncentracija ImHCl dostigla vrednost 52,29 mM. Prilikom određivanja KMK u 0,01 M NaH₂PO₄, nije došlo do formiranja suspenzije, čak ni kada je vrednost totalne koncentracije ImHCl bila 103,10 mM.

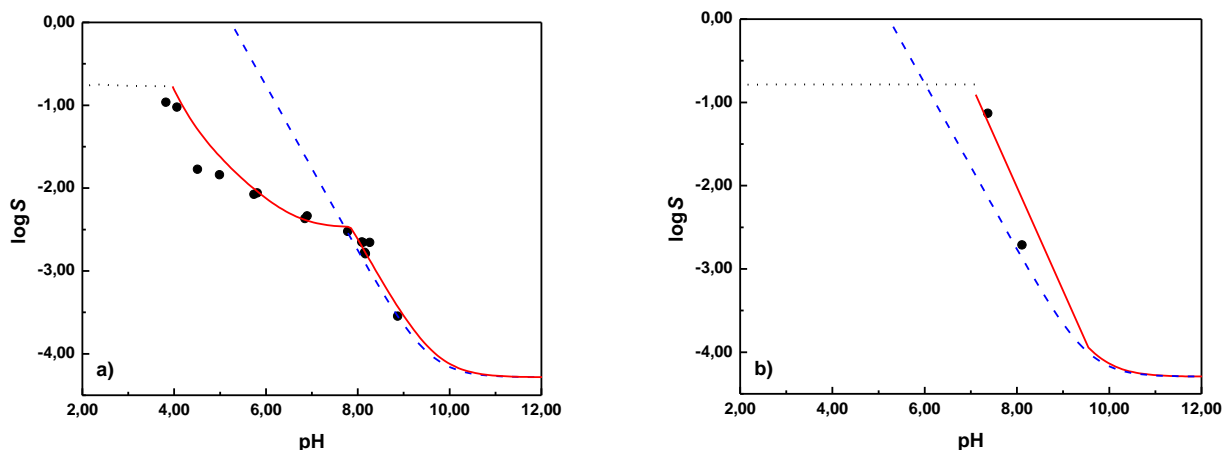
Suspenzije imipramin-hidrohlorida u setu 3, pripremane su u 0,15 M NaCl [9], tako da je bilo praktično odrediti vrednost KMK u istom rastvoru. Radi poređenja, kritična micelarna koncentracija određena je i u 0,01 M rastvoru. U ovim eksperimentima, nije dolazilo do građenja suspenzije [12].

Niže vrednosti KMK u koncentrovanijim rastvorima elektrolita su očekivane. Elektroliti olakšavaju nastajanje agregata, zato što smanjuju međusobno elektrostatičko odbijanje između jona surfaktanata [101]. Stepenn disocijacije agregata uporediv je u svim eksperimentima (osim u 0,10 M NaH₂PO₄) što znači da fosfatni i hloridni joni u slučaju agregacije imipramina, u sličnom stepenu stabilizuju agregate. Veća vrednost stepena disocijacije agregata u slučaju 0,10 M NaH₂PO₄ može biti posledica nedovoljnog broja eksperimentalnih tačaka posle KMK, ali i posledica taloženja fosfatne soli imipramina u sistemu.

Poređenjem rastvorljivosti imipramina u setovima 1 – 3 i vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija, može se primetiti da je rastvorljivost imipramina u pH opsegu 3,82 – 4,06 (setovi 1 i 2) i na pH 7,37 (set 3) iznad vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija [9, 12]. Time se objašnjava veća rastvorljivost imipramina od očekivane na ovim pH vrednostima, kao i nemogućnost pripreme suspenzija imipramina koje sadrže hloride i fosfate na pH<3,82, niti suspenzija imipramina koje sadrže samo hloride na pH<7,37, u uslovima definisanim setovima 1 – 3. Osim toga, rezultati pokazuju da, zbog nastajanja agregata u rastvoru, nije moguće pripremiti suspenziju imipramina jednostavnim povećanjem „koncentracije“ suspenzije.

III.4.3 Određivanje konstanti ravnoteža u heterogenim sistemima imipramina pomoću programa pDISOL-XTM

Na **Slici 35.** prikazani su profili rastvorljivosti imipramina dobijeni pomoću programa pDISOL-XTM (crvena puna linija). Profili rastvorljivosti izračunati pomoću HH jednačine ($pK_a=9,52$ i $\log S_0=-4,28$) prikazani su isprekidanom plavom linijom. Vrednost kiselinske konstante imipramina preuzeta je iz literature [3]: $pK_a=9,52\pm 0,03$ (25 °C, $I=0,15$ M), a vrednost sopstvene rastvorljivosti dobijena je analizom setova 1 – 3. Tačkasta crna linija označava pH opseg u kome ne postoji čvrsta faza u sistemu, odnosno cela količina dodatog ImHCl se rastvorila. U proračune nisu uključeni uzorci u kojima se dešavala degradacija (setovi 1 i 2: pH>10; set 3: pH>8,5).



Slika 35. Profili rastvorljivosti imipramina dobijeni pomoću programa *pDISOL-X*TM (crvena linija) [9]: a) setovi 1 i 2 (suspencije koje sadrže hloride i fosfate, titracije iz kisele ka baznoj sredini); b) set 3 (suspencije koje sadrže samo hloride). Teorijski profil rastvorljivosti (plava isprekidana linija) dobijen je pomoću HH jednačine. Tačkasta linija označava opseg u kome nema čvrste faze. Rastvorljivost izražena je u jedinicama mol/L.

Heterogeni sistemi imipramina u setovima 1 – 3 mogu se opisati ravnotežama (44 – 50) [9]. Nisu sve ravnoteže uključene u model svakog seta. Konstante ravnoteža, izračunate pomoću programa *pDISOL-X*TM, prikazane su u **Tabeli 19**.

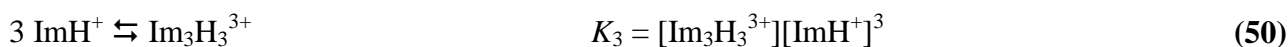
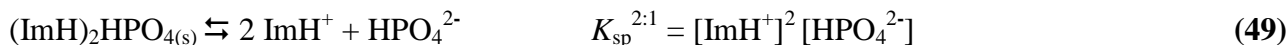
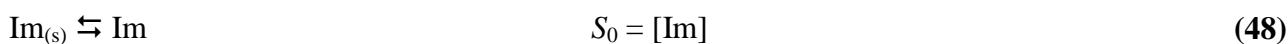
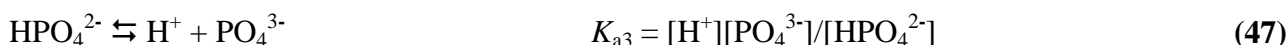
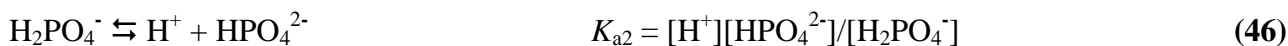
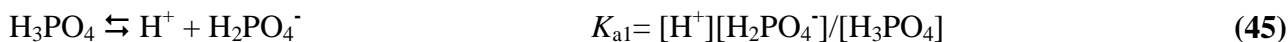
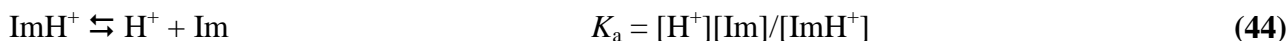


Tabela 19. Ravnotežne konstante u suspencijama Im izračunate pomoću programa *pDISOL-X*TM

Set ^a	$\log S_0$	$\log K_{sp}^{2:1}$	$\log K_3$	pH_{\max}	I_{sr} (M)	GOF
1 i 2	-4,28±0,02	-6,71±0,02	2,15±0,09	7,85	0,37	0,87
3	-4,28±0,01	/	3,67±0,01	/	0,32	0,03

^a 25 ° C; $I_{\text{ref}}=0,15$ M; $\text{p}K_a=9,52$.

Profil rastvorljivosti imipramina u suspencijama koje sadrže hloride i fosfate (setovi 1 i 2) ne može se opisati HH jednačinom na pH vrednostima manjim od 8 [9]. Proračuni pokazuju da se u pH

opsegu 3,82 – 7,85 taloži imipramin-hidrogenfosfat, dok na većim pH vrednostima dolazi do izdvajanja molekulskog imipramina. Povećana rastvorljivost imipramina na $\text{pH} < 4$ može se objasniti nastajanjem trimera imipramina $\text{Im}_3\text{H}_3^{3+}$, na osnovu $p\text{DISOL-X}^{\text{TM}}$ analize. Na $\log S$ – pH dijagramu (Slika 35.a) može se primetiti dosta niža rastvorljivost imipramina na $\text{pH} 4,51$ (eksperimentalna vrednost) u odnosu na izračunatu rastvorljivost (crvena linija). To znači da pri $\text{pH} < 5$ dolazi do „takmičenja“ između reakcije taloženja imipramina u obliku soli (hloridne ili fosfatne) i vezivanja imipramina u rastvorni katjonski trimer. Pobudkowska i saradnici su 2016. godine primetili slično hemijsko ponašanje strukturno sličnih jedinjenja prilikom proučavanja pH -zavisne rastvorljivosti fenotiazina, koji pokazuju sklonost ka agregaciji [37].

Povećana rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže hloride, takođe se može objasniti formiranjem trimera imipramina $\text{Im}_3\text{H}_3^{3+}$. Za razliku od setova 1 i 2, katjonski trimer se formira na $\text{pH} < 9$. Izračunata konstanta agregacije veća je u setu 3 u odnosu na setove 1 i 2, što ukazuje da u suspenzijama hlorida imipramin ima veću sklonost ka agregaciji, nego u suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate. Kada je $\text{pH} > 7$ dolazi do taloženja imipramin baze.

Pomenuto je da uzorci u kojima je došlo do degradacije imipramina nisu uzeti u obzir prilikom analize rezultata pomoću programa $p\text{DISOL-X}^{\text{TM}}$. Iz tog razloga, izračunata vrednost sopstvene rastvorljivosti ($\log S_0 = -4,28$) veća je od eksperimentalno određenih vrednosti u prisustvu degradacionih proizvoda: $\log S_0 = -4,56$ (setovi 1 i 2, $\text{pH} 11,43$) i $\log S_0 = -4,65$ (set 3, $\text{pH} 11,87$).

III.4.4 Određivanje rastvorljivosti imipramina u uslovima povećane jonske sile

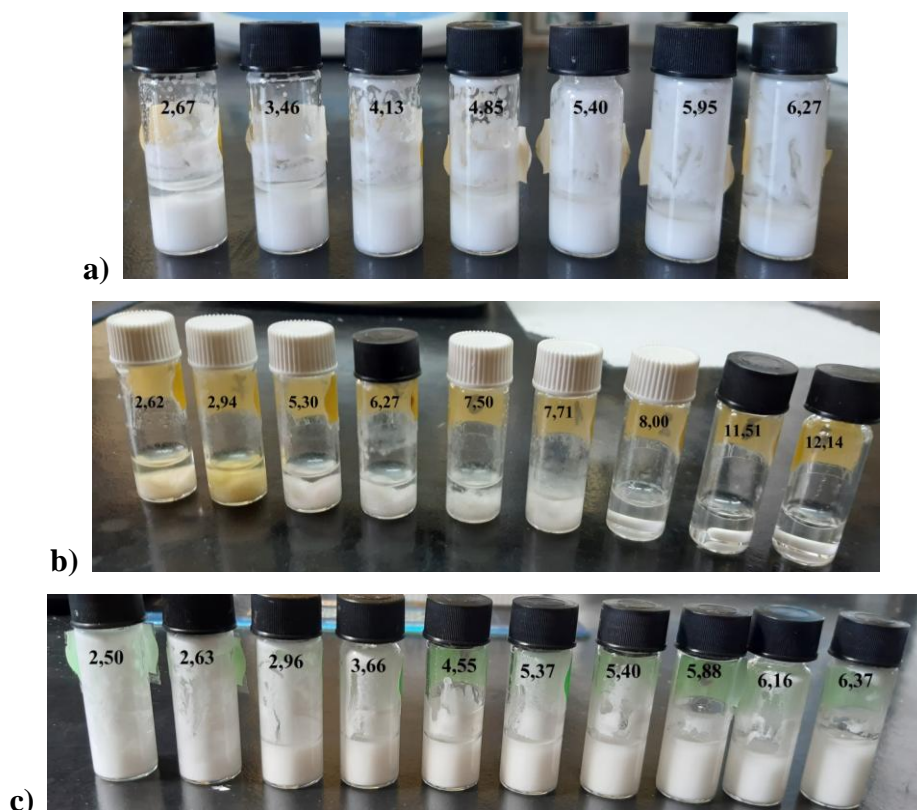
Setovi 4 – 6 dizajnirani su u cilju kompletiranja profila rastvorljivosti imipramina. Uzorci su pripremljeni kao: a) suspenzije koje sadrže hloride i fosfate (set 4), b) suspenzije koje sadrže hloride (set 5) i c) suspenzije koje sadrže fosfate (set 6) [12]. Rezultati prethodnih eksperimenata pokazuju da priprema suspenzija jedinjenja, koje podležu reakcijama agregacije, neće biti uspešna povećavanjem „koncentracije“ suspenzije. Iz tog razloga, uvedene su dve modifikacije u odnosu na setove 1 – 3.

Prva modifikacija bila je korišćenje imipramin baze, umesto imipramin-hidrohlorida, prema rezultatima analiza strukturno sličnih jedinjenja objavljenih u literaturi [17, 19, 22, 37]. Uticaj početnog oblika ispitivane supstance (so ili baza) na tendenciju građenja prezasićenih rastvora primetili su Zografi i Zarenda 1966. godine, na primeru hlorpromazina, prilikom proučavanja uticaja različitih faktora na površinsku aktivnost odabranih jedinjenja [17]. Prezasićen rastvor hlorpromazina nastao je samo u slučaju korišćenja hidrohloridne soli za pripremu uzorka (ne u slučaju korišćenja baze). Green je 1967. godine odredio rastvorljivost perfenazina, površinski aktivnog jedinjenja koje ima tendenciju za građenjem micela [19]. Rastvorljivost, dobijena *shake-flask* metodom i turbidimetrijom, iznosila je $70 \mu\text{M}$, kada je u eksperimentu korišćen perfenazindihidrohlorid (so). Međutim, pomoću *shake-flask* metode dobijena je mnogo manja vrednost rastvorljivosti ($26 \mu\text{M}$), kada je za pripremu uzorka korišćena perfenazin baza. Liu je 1977. proučavao ravnoteže u suspenzijama acetilpromazin-maleata [22]. Pokazano je da rastvorljivost na $\text{pH} 7,5$ iznosi oko 1 mg/mL ($3,1 \text{ mM}$), kada se za pripremu suspenzija koristi baza acetilpromazin. Međutim, upotreba acetilpromazin-maleata u koncentraciji većoj od 20 mg/mL ($45,2 \text{ mM}$), dovodi do građenja micela. Nastajanje micela u ovom slučaju omogućava pripremu bistrog rastvora koncentracije 240 mg/mL ($542,4 \text{ mM}$). Pobudkowska i saradnici su 2016. primetili da je tendencija ka agregaciji veća ukoliko se koriste jedinjenja u obliku soli (hlorpromazin-hidrohlorid, flufenazindihidrohlorid, trifluoperazin-dihidrohlorid) u odnosu na jedinjenja korišćena u obliku baze (perfenazin) [37].

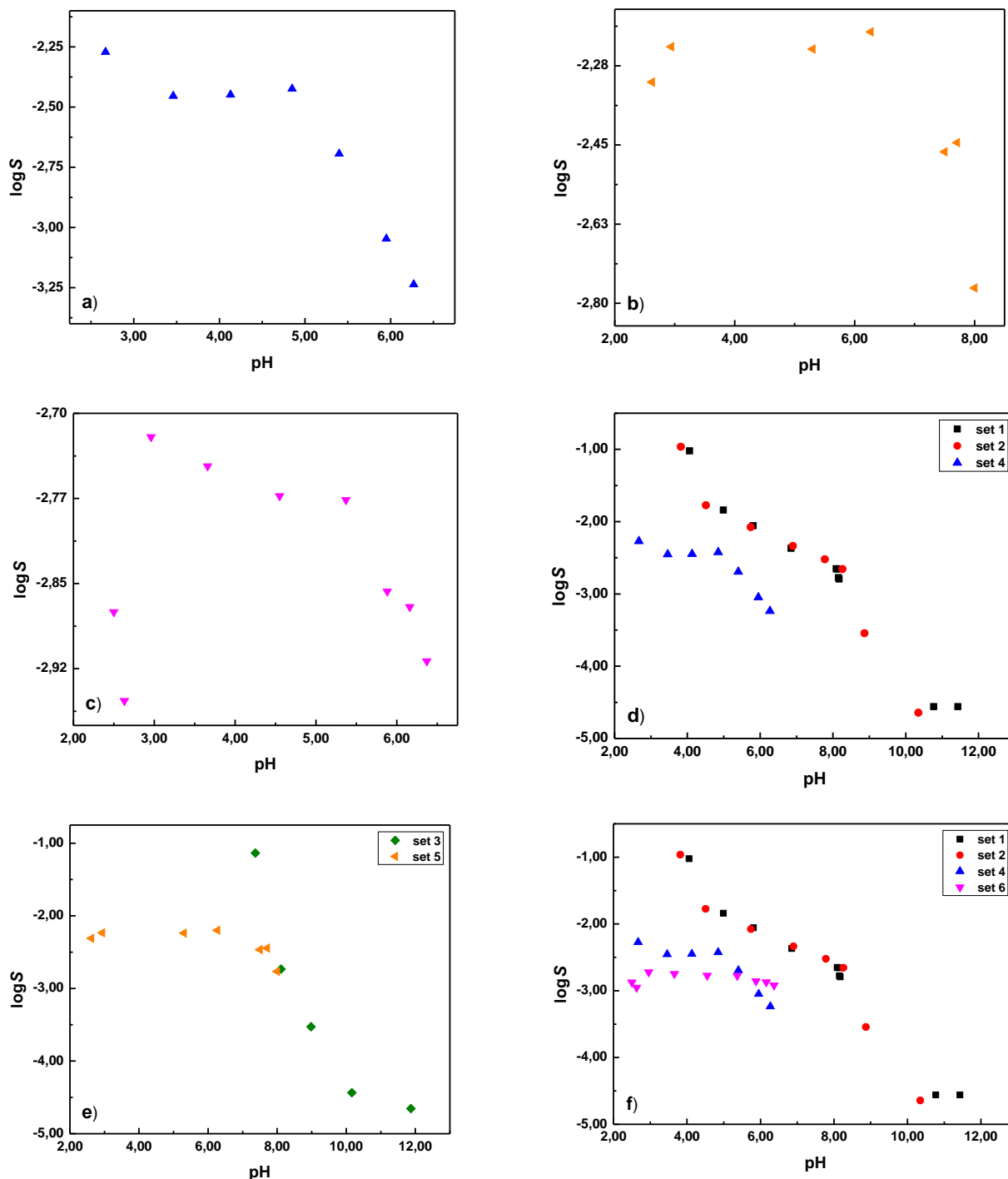
Druga modifikacija bila je povećanje koncentracije pozadinskog elektrolita (fosfata ili hlorida)

u sistemu, čime se postiže smanjenje rastvorljivosti imipramina, kao posledica efekta zajedničkog jona, odnosno pomeranja ravnoteže u smeru nastanka taloga [23, 24, 29, 33, 79]. Bogardus i Blackwood Jr. odredili su 1979. profil rastvorljivosti doksiciklina i proučavali uticaj različitih pozadinskih elektrolita na rastvorljivost [23]. Smanjenje rastvorljivosti doksiciklin-hloridna u hlorovodoničnoj kiselini na $\text{pH} < 2$, objasnili su efektom zajedničkog hloridnog jona. Serajuddin i Rosoff su 1984. godine primetili smanjenje rastvorljivosti papaverin-hloridna u vodi na $\text{pH} < 2$, sa povećanjem koncentracije hloridnih jona, koji potiču od hlorovodonične kiseline (korišćene za podešavanje pH vrednosti) [24]. Razlog smanjenja rastvorljivosti je takođe efekat zajedničkog jona. Isti efekat, objavili su Li i saradnici 2005. godine prilikom proučavanja rastvorljivosti haloperidola u obliku baze i u obliku hidrohloridne soli [79]. Ledwidge i saradnici su 1998. primetili smanjenje rastvorljivosti soli različitih kiselina i baza, pod uticajem različitih zajedničkih jona: hloridni, fosfatni, natrijum [29]. Völgyi i saradnici su 2010. godine takođe primetili efekat smanjenja rastvorljivosti soli različitih baza i amfolita pod uticajem zajedničkog jona [33]. Pobudkowska i saradnici su 2016. izračunali da je za taloženje fosfatnih soli hlorpromazina, flufenazina i trifluoperazina potrebna jonska sila od 1,6 M, što je drastično viša vrednost od jonske sile korišćene prilikom proučavanja pH-zavisne rastvorljivosti ovih jedinjenja u njihovom istraživanju (0,32 – 0,36 M) [37].

Tokom dizajna setova 4 – 6, korišćena su navedena zapažanja iz literature i zapažanja iz eksperimenata urađenih u okviru ove doktorske disertacije. Uzorci iz setova 4 – 6 prikazani su na **Slici 36**. Profili rastvorljivosti imipramina dobijeni analizom setova 1 – 6 prikazani su na **Slici 37**.



Slika 36. Fotografije uzoraka imipramina posle 24 sata uspostavljanja ravnoteže iz: a) seta 4, b) seta 5 i c) seta 6. Brojevi na slikama predstavljaju pH vrednosti suspenzija nakon 24 sata.



Slika 37. Profili rastvorljivosti imipramin-hidrohlorida [9, 12]: a) set 4 (suspencije koje sadrže fosfate i hloride), b) set 5 (suspencije koje sadrže hloride), c) set 6 (suspencije koje sadrže fosfate), d) setovi 1, 2 i 4 (suspencije koje sadrže fosfate i hloride), e) setovi 3 i 5 (suspencije koje sadrže samo hloride), f) setovi 1, 2, 4 i 6 na 25 ± 1 °C. Rastvorljivost izražena je u jedinicama mol/L.

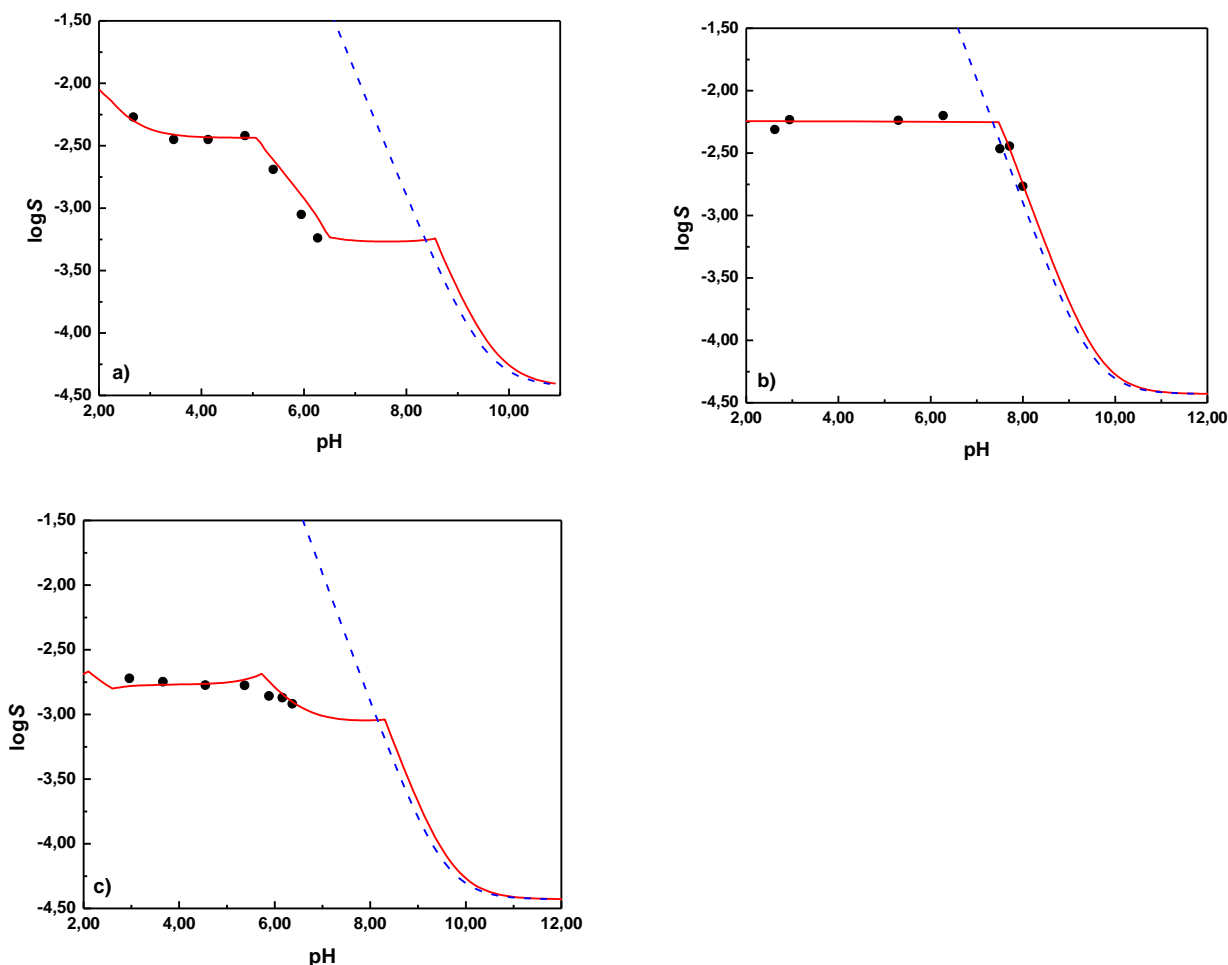
Uvođenjem pomenutih modifikacija u eksperimentalnu proceduru setova 1 i 2 (suspencije koje sadrže hloride i fosfate), nastao je set 4 [12]. Umesto imipramin-hidrohlorida, za pripremu početne suspencije korišćena je imipramin baza. „Konzentracija“ početne suspencije imipramina (66,08 mg/mL) bila je uporediva sa „konzentracijama“ početnih suspencija u setovima 1 (50,0 mg/mL) i 2 (60,4 mg/mL). Totalna koncentracija fosfata povećana je na 1,69 M (u setovima 1 i 2 bila je 0,14 M). Standardni rastvor 1 M HCl, korišćen za podešavanje pH vrednosti uzoraka imipramina

(dobijenih nakon ravnomerne podele početne suspenzije na više bočica) bio je izvor hloridnih jona. Zahvaljujući navedenim modifikacijama, dobijen je talog u pH opsegu 2,67 – 6,27. Rastvorljivost imipramina u svim uzorcima je ispod kritične micelarne koncentracije, tako da se u suspenzijama ne očekuje prisustvo agregata. Osim toga, rastvorljivosti uzoraka iz seta 4 su manje u odnosu na rastvorljivosti uzoraka iz setova 1 i 2 [9, 12] (**Slika 37.d**). U uslovima povećane totalne koncentracije fosfata (1,69 M) velika je verovatnoća taloženja fosfatnih soli imipramina.

Set 5 (suspenzije imipramina koja sadrže hloride) dobijen je modifikacijom eksperimentalnih uslova seta 3 [9, 12]. Imipramin baza korišćena je za pripremu suspenzija imipramina (ne ImHCl). „Koncentracija“ suspenzija imipramina (70,82 mg/mL) bila je veća (ali i dalje uporediva) u odnosu na suspenzije seta 3 (44,3 – 50,6 mg/mL). Totalna koncentracija hlorida u suspenzijama (pre podešavanja pH vrednosti) bila je 1,70 M. Pri ovakvim uslovima, dobijen je talog u kiselj sredini, a rastvorljivost imipramina je ispod kritične micelarne koncentracije (**Slika 37.e**). Osim toga, pripremljene su suspenzije u baznoj sredini. Degradacija u rastvoru iznad pH 8 dešava se i u setu 5, bez obzira što su neki od uslova promenjeni.

Za bolje razumevanje profila rastvorljivosti imipramina u uslovima povećane jonske sile, dizajniran je još jedan set – set 6, koji sadrži samo fosfate [12]. „Koncentracija“ suspenzije bila je 69,14 mg/mL, približno ista kao u setovima 4 i 5. Totalna koncentracija fosfata bila je 2,00 M. Početna suspenzija (pH 2,24) pripremljena je mešanjem natrijum-dihidrogenfosfata i fosforne kiseline. Nakon podele suspenzije u više bočica, pH vrednosti su podešene dodavanjem standardnog rastvora NaOH. Drugim rečima, titracija je izvedena u suprotnom smeru u odnosu na set 4. Zasićeni rastvori dobijeni su u kiselj sredini (**Slika 37.c**). Rastvorljivost imipramina u setu 6 manja je u odnosu na rastvorljivost u setovima 1, 2 (u celom merenom opsegu) i 4 (kada je pH<6), što je očekivano ako se uzme u obzir povišena koncentracija fosfata (**Slika 37.f**) [9, 12].

Setovi 4 – 6 analizirani su pomoću programa *pDISOL-X*TM. Profili rastvorljivosti prikazani su na **Slici 38**, a izračunate ravnotežne konstante u **Tabeli 20**. Proračuni pokazuju da u ovim uslovima ne dolazi do agregacije imipramina.



Slika 38. Profili rastvorljivosti imipramina dobijeni pomoću programa *pDISOL-X*TM (crvena linija): a) set 4 (suspenzije koje sadrže hloride i fosfate); b) set 5 (suspenzije koje sadrže samo hloride) i c) set 6 (suspenzije koje sadrže samo fosfate). Teorijski profil rastvorljivosti (plava isprekidana linija) dobijen je pomoću HH jednačine. Rastvorljivost izražena je jedinicama mol/L.

U prikazanom pH opsegu dolazi do izdvajanja tri taloga u uzorcima seta 4 (suspenzije koje sadrže hloride i fosfate): imipramin-dihidrogenfosfat, imipramin-hidrogenfosfat i imipramin baza, pri čemu se prelazi dešavaju na pH_{max} 5,15 i pH_{max} 8,56 (**Slika 38.a**). Prisustvo imipramin-hidrogenfosfata u čvrstoj fazi u pH opsegu 3,82 – 7,85 pokazano je analizom setova 1 i 2, što je bio jedan od razloga za povećanje totalne koncentracije fosfata (a ne hlorida) u uzorcima seta 4.

Analizom seta 5 (suspenzije koje sadrže hloride) potvrđeno je izdvajanje imipramin-hidrohlorida na $\text{pH} < 7,47$ (pH_{max}) (**Slika 38.b**). Na višim pH vrednostima dolazi do izdvajanja imipramin ulja. Mada nije jasno zašto su talozi u uzorcima pH vrednosti 2,62 (jedva vidljivo) i 2,94 žuti (**Slika 36.b**).

Proračuni pokazuju da u uzorcima seta 6 (suspenzije koje sadrže fosfate) dolazi do transformacije u čvrstoj fazi između imipramin-dihidrogenfosfata i imipramin-hidrogenfosfata na pH_{max} 5,73; dok na pH_{max} 8,31 dolazi do prelaza imipramin-hidrogenfosfata u imipramin bazu (**Slika 38.c**).

Tabela 20. Ravnotežne konstante u suspenzijama imipramina u uslovima povećane jonske sile izračunate pomoću programa *pDISOL-X*TM

Set ^a	logS ₀	logK _{sp} ^{1:1}	logK _{sp} ^{2:1}	logK _{sp} ^{ImHCl}	pH _{max}	I _{sr} (M)	GOF
4	-4,43±0,02	-3,53±0,01	-7,70±0,02	/	5,15 i 8,56	1,64	0,47
5	-4,43±0,02	/	/	-2,33±0,02	7,47	1,49	0,60
6	-4,43±0,01	-3,69±0,02	-7,70±0,03	/	5,73 i 8,31	1,42	0,80

^a 25 ° C; I_{ref}=0,15 M; pK_a= 9,52.

Primenjene modifikacije eksperimentalne procedure u setovima 4 – 6 (korišćenje imipramin baze i visoke koncentracije pozadinskog elektrolita) dovele su do uspešne pripreme zasićenih rastvora imipramina, čija je priprema bila problematična u uslovima definisanim setovima 1 – 3. Na ovaj način, izbegnuto je formiranje agregata, koji su prilično povećavali rastvorljivost. Pokazano je da odnosi koncentracija svih prisutnih vrsta u ispitivanom sistemu, imaju veliki uticaj na profile rastvorljivosti imipramina.

III.4.5 Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama imipramina

Analiza čvrste faze u suspenzijama imipramina, iz seta 1, koje sadrže hloride i fosfate, urađena je elementalnom analizom. Prema rezultatima elementalne analize (**Tabela 21**), hidratizirani imipramin-hidrogenfosfat taloži se u pH oblasti 4,06 – 6,85; dok se imipramin baza u obliku ulja izdvaja u baznoj sredini. Rezultati su u saglasnosti sa sastavom taloga dobijenim analizom setova 1 i 2 pomoću programa *pDISOL-X*TM.

Tabela 21. Elementalna analiza taloga dobijenih u suspenzijama Im iz seta 1

pH	%C	%H	sastav taloga na osnovu teorijskih izračunavanja
4,06	63,64	8,17	(ImH) ₂ HPO ₄ ×4H ₂ O
4,99	61,06	7,79	(ImH) ₂ HPO ₄ ×4H ₂ O
5,81	65,21	7,65	(ImH) ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O
6,85	64,04	7,67	(ImH) ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O
8,09	66,79	8,30	Im×4H ₂ O ^a
8,11	66,57	8,06	Im×4H ₂ O ^a
8,15	71,55	8,14	Im×2H ₂ O

^a Oblast blizu pH_{max}, u talogu se može nalaziti smeša fosfatne soli i baze.

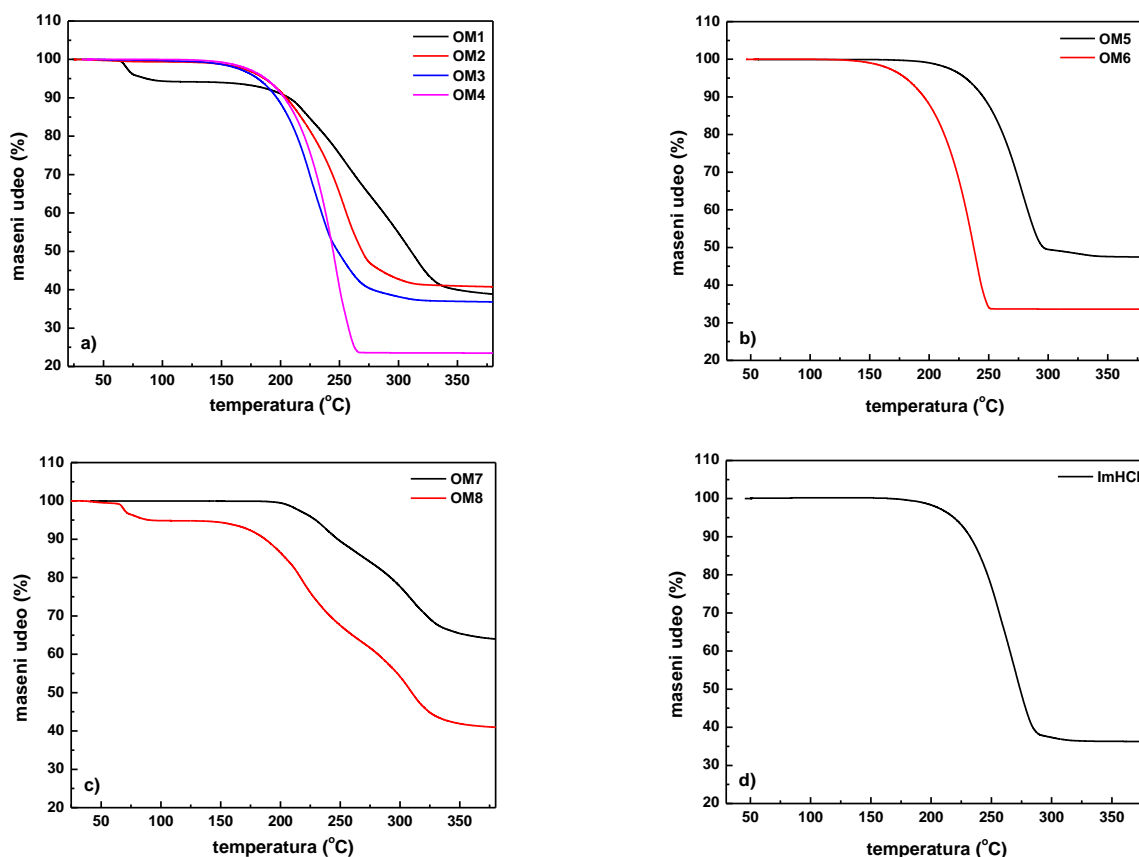
U cilju dobijanja dovoljno taloga za kompletnu karakterizaciju čvrstog stanja (TGA, DSC, PXRD) dizajniran je set 7.

Uzorci OM1 – OM4 dobijeni su iz suspenzija imipramina koje sadrže fosfate i hloride. Povećavanjem „koncentracije“ suspenzije, bilo je moguće dobiti dovoljnu količinu taloga u uzorcima OM2 (pH 6,21), OM3 (pH 8,28) i OM4 (pH 12,55). Zbog toga su ovi uzorci pripremljeni u skladu sa eksperimentalnim uslovima definisanim setovima 1 i 2. Kako bi se sprečilo nastajanje agregata na pH<4, uzorak OM1 (pH 2,67) pripremljen je prema principima opisanim u setu 4 (korišćen je imipramin u obliku baze uz veću totalnu koncentraciju fosfata).

Uzorci OM5 i OM6 pripremljeni su iz suspenzija imipramina koje sadrže hloride. Eksperimentalni uslovi su birani u zavisnosti od toga da li postoji mogućnost nastajanja agregata u rastvoru. Uzorak OM5 (pH 1,40) pripremljen je prema sličnoj proceduri kao set 5 (imipramin u obliku baze i povećana totalna koncentracija hlorida), a uzorak OM6 (pH 12,87) prema sličnoj proceduri kao set 3.

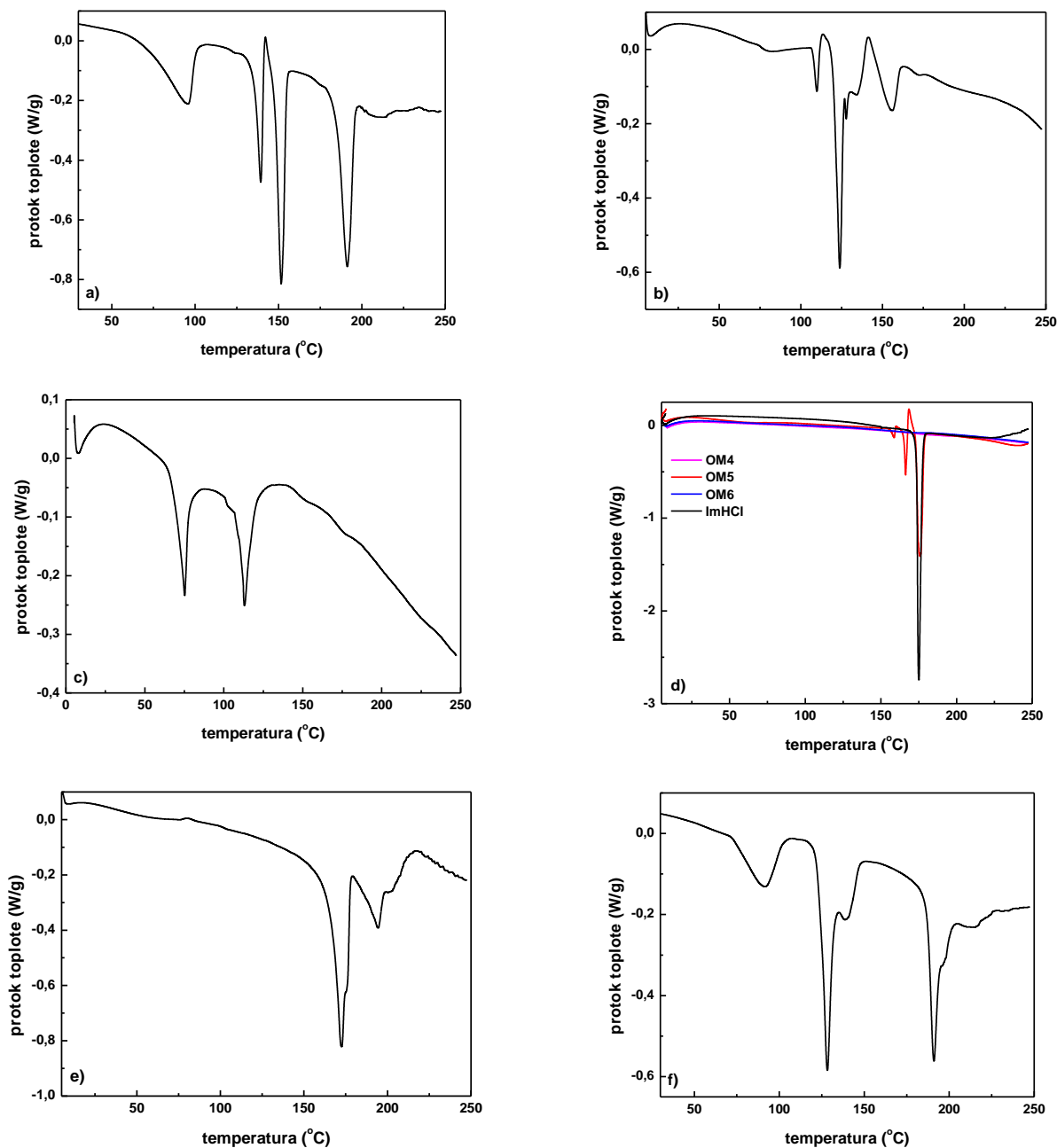
Prema sličnoj eksperimentalnoj proceduri opisanoj u setu 6 (imipramin dodat u obliku baze, povećana totalna količina fosfata), pripremljeni su uzorci OM7 (pH 1,26) i OM8 (pH 5,20), kao suspenzije imipramina koje sadrže fosfate.

Svi uzorci sušeni su tri dana na 25 ° C u vakuumu, nakon razdvajanja faza. Čvrsta faza je zatim analizirana pomoću termogravimetrijske analize (**Slika 39**). Na osnovu TGA termograma, može se zaključiti da su svi uzorci anhidrovani, osim uzoraka OM1 (pH 2,67) i OM8 (pH 5,20), koji su hidrati.

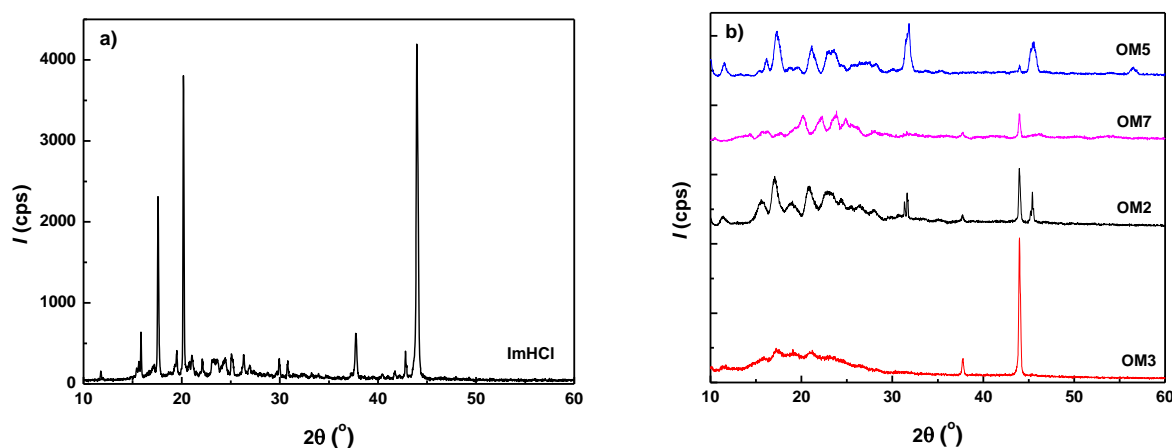


Slika 39. TGA termogrami uzoraka izolovanih iz: a) suspenzija imipramina koje sadrže hloride i fosfate (OM1 – OM4); b) suspenzija imipramina koje sadrže hloride (OM5 i OM6); c) suspenzija imipramina koje sadrže fosfate (OM7 i OM8) i d) komercijalno dostupnog ImHCl. Svi uzorci sušeni su tri dana na 25 ° C u vakuumu.

Na **Slici 40**, prikazani su DSC termogrami, a na **Slici 41**, PXRD difraktogrami komercijalno dostupnog ImHCl i uzoraka imipramina.



Slika 40. DSC termogrami uzoraka imipramina: a) OM1 (pH 2,67); b) OM2 (pH 6,21); c) OM3 (pH 8,28); d) OM4 (pH 12,55), OM5 (pH 1,40), OM6 (pH 12,87) i komercijalno dostupan ImHCl; e) OM7 (pH 1,26) i f) OM8 (pH 5,20). Svi uzorci sušeni su tri dana na 25 ° C u vakuumu. Uzorci OM1 i OM8 dodatno su sušeni 1 dan na 60 ° C.



Slika 41. PXRD difraktogrami: a) komercijalno dostupnog ImHCl i b) uzoraka OM2 (pH 6,21), OM3 (pH 8,28), OM5 (pH 1,40) i OM7 (pH 1,26). Svi uzorci sušeni su tri dana na 25 ° C u vakuumu.

U DSC termogramu komercijalno dostupnog ImHCl može se primetiti endoterma na 175 ° C koja potiče od topljenja soli (**Slika 40.d**), dok PXRD difraktogram pokazuje veliki kristalni karakter imipramin-hidrohlorida (**Slika 41.a**).

Uzorci OM5 (pH 1,40) i OM6 (pH 12,87) izolovani su iz suspenzija imipramina koje sadrže hloride. Analiza pomoću programa *pDISOL-X*TM predviđa da se na pH vrednostima nižim od 7,47 (pH_{max}) u čvrstoj fazi nalazi ImHCl, a na višim Im baza. U DSC termogramu uzorka OM5 postoji endoterma na 175 ° C, koja potvrđuje da je ovaj uzorak imipramin-hidrohlord (**Slika 40.d**). Za razliku od komercijalno dostupnog ImHCl, u termogramu se javljaju još dve endoterme manjeg intenziteta na nižim temperaturama. To može da znači da je u talogu prisutna nečistoća ili da dolazi do neke transformacije u čvrstoj fazi [37]. Kako bi se dobio talog na ovoj pH vrednosti, korišćen je 1,70 M NaCl. Jedno od mogućih objašnjenja je da se kristalna stuktura imipramin-hidrohlorida izolovana u ovim uslovima (žučkast talog), razlikuje od kristalne strukture izolovane pri nižim jonskim silama (beo talog), što je uočljivo na PXRD difraktogramima.

U termogramu uzorka OM6 nema karakterističnih termičkih prelaza, što ukazuje da je ovaj uzorak imipramin baza amornog karaktera (**Slika 40.d**). Pobudkowska i saradnici su 2016. primetili da se baze određenih fenotiazina izdvajaju u amornom obliku, što su potvrdili DSC termogramima, u kojima takođe nije bilo karakterističnih prelaza [37]. Uzorak OM4 (pH 12,55) izolovan je iz suspenzije imipramina koja sadrži hloride i fosfate. Kao i kod uzorka OM6, termogram uzorka OM4 nema karakteristične termičke prelaze, što ponovo ukazuje na amorfni karakter imipramin baze (**Slika 40.d**).

Uzorci OM1 (pH 2,67), OM2 (pH 6,21) i OM3 (pH 8,28) izolovani su iz suspenzija imipramina koje sadrže hloride i fosfate, dok su uzorci OM7 (pH 1,26) i OM8 (pH 5,20) izolovani iz suspenzija imipramina koje sadrže fosfate. DSC termogrami i PXRD difraktogrami ovih uzoraka razlikuju se od termograma/difraktograma komercijalno dostupnog ImHCl, što ukazuje da ovi uzorci nisu imipramin-hidrohlord.

Prema *pDISOL-X*TM analizi očekivano je da su uzorci OM1 (pH 2,67) i OM7 (pH 1,26) imipramin-dihidrogenfosfat. Razlike u DSC termogramima ovih uzoraka (odnosno temperaturama na kojima se odigravaju termički prelazi) (**Slike 40.a i 40.e**), verovatno potiču od različitog sadržaja vode. Uzorak OM7 je anhidrovan, dok je uzorak OM1 hidrat, što se može zaključiti na osnovu endoterme dehidracije oko 100 ° C. Dodatno sušenje u vakuumu na 60 ° C, nije bilo dovoljno da se imipramin-dihidrogenfosfat monohidrat (sadržaj vode određen pomoću TGA) prevede u

anhidrovani oblik.

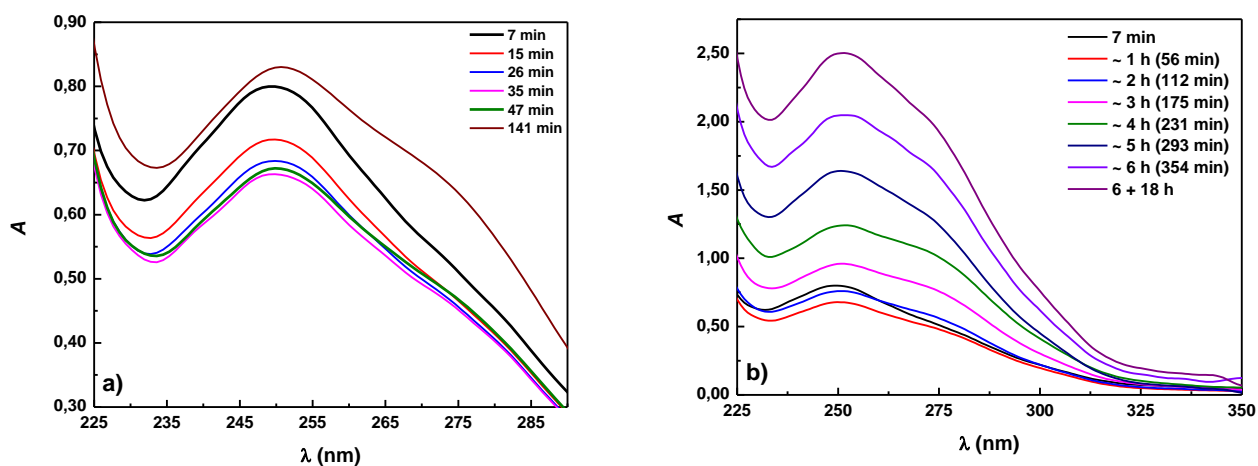
Vrednost pH_{max} prelaza 1:1 u 2:1 fosfatnu so imipramina varira u zavisnosti od sastava suspenzije u opsegu 5,15 (set 4) – 5,73 (set 6). Prema tome, uzorci OM8 (pH 5,20) i OM2 (pH 6,21) su najverovatnije smeša dve fosfatne soli prisutne u različitom molaskom odnosu, što objašnjava različit intenzitet endoterma u termogramima ovih uzoraka (**Slike 40.f. i 40.b**). Osim razlike u molaskom odnosu fosfatnih soli, ovi uzorci se razlikuju po sadržaju vode. Endoterma dehidratacije postoji u termogramu uzorka OM8, čak i nakon sušenja uzorka na 60°C u vakuumu.

Uzorci OM7 (pH 1,26) i OM2 (pH 6,21) imaju kristalni karakter (**Slika 41**). Osim toga, PXRD difraktogrami potvrđuju prisustvo dve fosfatne soli u uzorku OM2, za razliku od uzorka OM7, koji je verovatno imipramin-dihidrogenfosfat.

Uzorak OM3 (pH 8,28) izolovan je iz suspenzije čija je pH vrednost u oblasti prelaza 2:1 fosfatne soli imipramina u imipramin bazu: pH_{max} 7,85 (setovi 1 i 2) – pH_{max} 8,56 (set 4). PXRD difraktogrami (**Slika 41**) i DSC termogrami (**Slika 40.c**) pokazuju da je uzorak OM3 smeša imipramin-hidrogenfosfata i imipramin baze. PXRD difraktogram potvrđuje amorfni karakter imipramin baze, što je u skladu sa do sada prikazanim rezultatima. Vreme uspostavljanja ravnoteže od 24 sata nije dovoljno da amorfna imipramin baza pređe u kristalni oblik. Dve endoterme u DSC termogramu i nekoliko karakterističnih pikova u PXRD difraktogramu ukazuju na prisustvo kristalnog imipramin-hidrogenfosfata u uzorku OM3 pored imipramin baze.

III.4.6 Praćenje degradacije imipramina u baznoj suspenziji

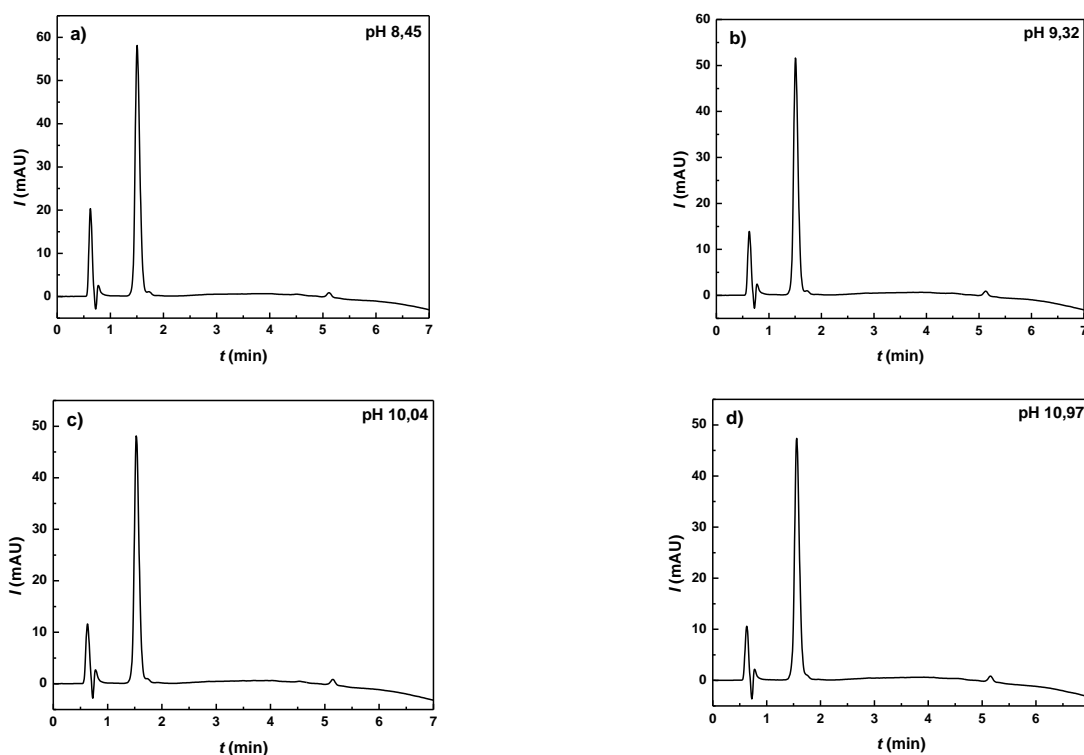
U hromatogramima zasićenih rastvora imipramina u fosfatnom puferu (u prisutvu hlorida) na $\text{pH} > 10$ postoji više pikova (**Slika 30**). Takav izgled hromatograma može ukazati na pojavu degradacije imipramina u suspenziji [111]. Radi provere, napravljena je suspenzija imipramina pH vrednosti 10,57, koja sadrži fosfate i hloride. „Konzentracija“ suspenzije bila je 42,24 mg/mL. Tokom 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije snimani su apsorpcioni spektri zasićenog rastvora imipramina (**Slika 42**).



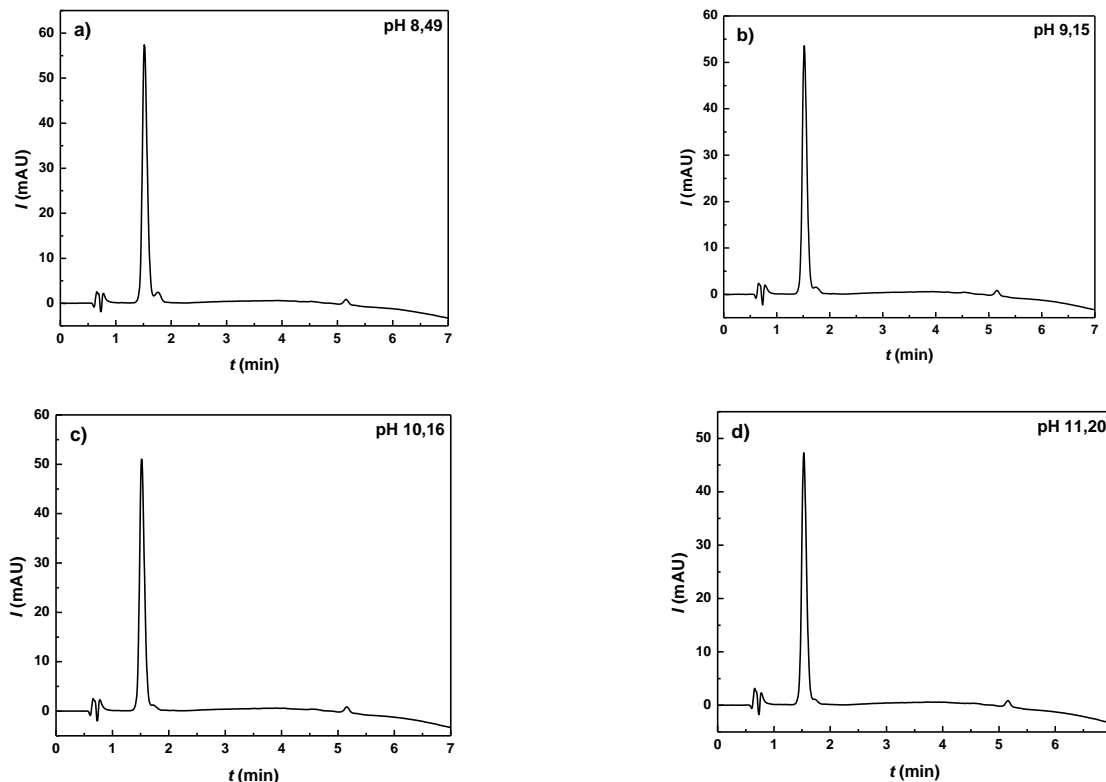
Slika 42. Apsorpcioni spektri zasićenog rastvora imipramina u fosfatnom puferu na pH 10,57 u prisutvu hloridnih jona tokom: a) 141 minuta mešanja (~ 2,5 sati); b) 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Alikvoti zasićenog rastvora imipramina uzeti posle 293 minuta mešanja, 354 minuta mešanja i 6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije razblaženi su 5 puta pre snimanja spektara. Kako bi prikaz rezultata bio praktičan, apsorbcije ovih uzoraka povećane su 5 puta ($A_{\text{prikazana}} = A_{\text{izmerena}} \times 5$).

Prvi spektar zasićenog rastvora imipramina, snimljen je posle 7 minuta mešanja. Kao što se na **Slici 42.a** može videti, apsorbancija supernatanta se smanjuje u prvih 35 minuta mešanja. Nakon 47 minuta mešanja, apsorbancija počinje da raste. Porast apsorbancije se nastavlja tokom faze mešanja i faze sedimentacije. Posle 4 sata mešanja bilo je potrebno razblaživati alikvote uzete za snimanje spektara (5 puta). Porast apsorbancije i promena izgleda spektara tokom eksperimenta, ukazuje da u rastvoru nastaje jedan ili više degradacionih proizvoda.

U cilju praćenja degradacije imipramina u rastvoru pomoću HPLC–UV/VIS metode, pripremljeni su rastvori imipramin-hidrohlorida u 0,15 M NaH_2PO_4 iste koncentracije ($5,26 \times 10^{-5}$ M) ali različitih pH vrednosti (u pH opsegu 8,45 – 10,97). Po istom principu pripremljeni su rastvori imipamin-hidrohlorida u 0,15 M NaCl (u pH opsegu 8,49 – 11,20). Nakon 24 sata mešanja na 25 ± 1 °C, snimljeni su hromatogrami pod istim uslovima kao za uzorke setova 1 – 3 (**Slike 43. i 44**).



Slika 43. Hromatogrami rastvora imipramin-hidrohlorida koncentracije $5,26 \times 10^{-5}$ M u 0,15 M NaH_2PO_4 sledećih pH vrednosti: a) pH 8,45; b) pH 9,32; c) pH 10,04 i d) pH 10,97, snimljeni posle 24 sata mešanja.

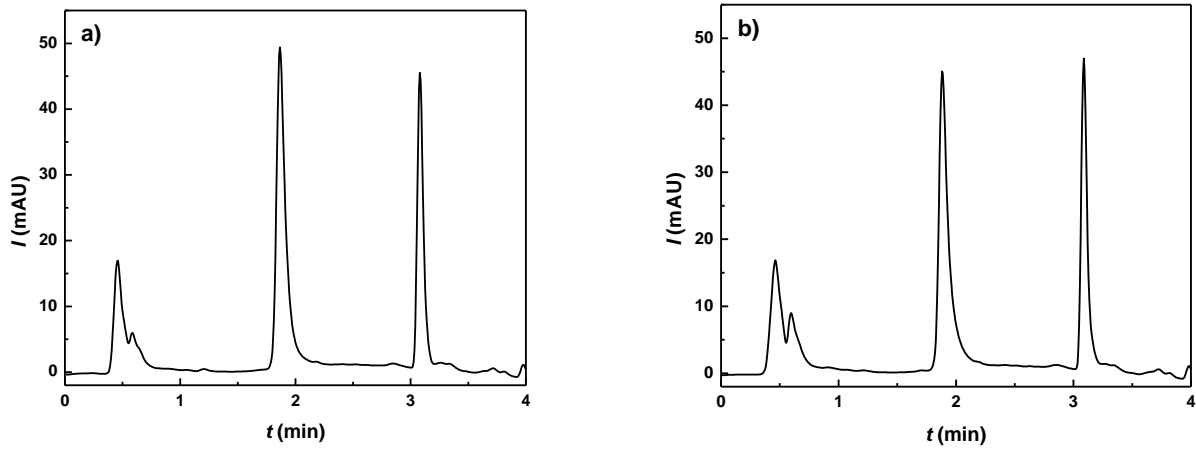


Slika 44. Hromatogrami rastvora imipramin-hidrohlorida koncentracije $5,26 \times 10^{-5}$ M u 0,15 M NaCl sledećih pH vrednosti: a) pH 8,49; b) pH 9,15; c) pH 10,16 i d) pH 11,20 snimljeni posle 24 sata mešanja.

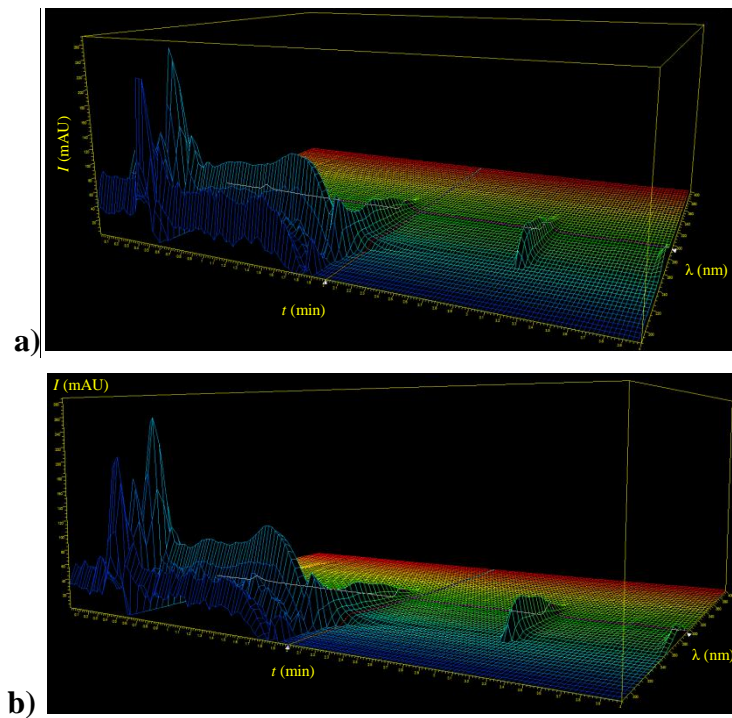
Nakon analize dobijenih rezultata, može se izvesti zaključak da u rastvorima imipramina ne dolazi do značajnog stepena degradacije. To znači da se degradacija dešava samo u suspenzijama imipramina, odnosno kada je u sistemu prisutna i čvrsta faza.

Rezultati analize dva uzorka iz seta 7 (OM4 i OM6) omogućili su izračunavanje procenta degradacije imipramina u suspenziji. Uzorak OM4 pripremljen je kao suspenzija imipramina koja sadrži hloride i fosfate (pH 12,55), dok je uzorak OM6 napravljen kao suspenzija imipramina koja sadrži hloride (pH 12,87). Čvrsta faza u ovim uzorcima je imipramin baza, koja se izdvojila u obliku ulja. Koncentracija imipramina u tečnoj fazi određena je pomoću HPLC–UV/VIS metode, a masa izdvojenog ulja izmerena je na vagi. Rezultati TGA analize pokazali su da je imipramin baza u anhidrovanom obliku. Ovi podaci (zajedno sa masama i zapreminama reagenasa korišćenih za pripremu suspenzija) omogućavaju izračunavanje mase degradacionih proizvoda, odnosno procenta degradacije imipramina.

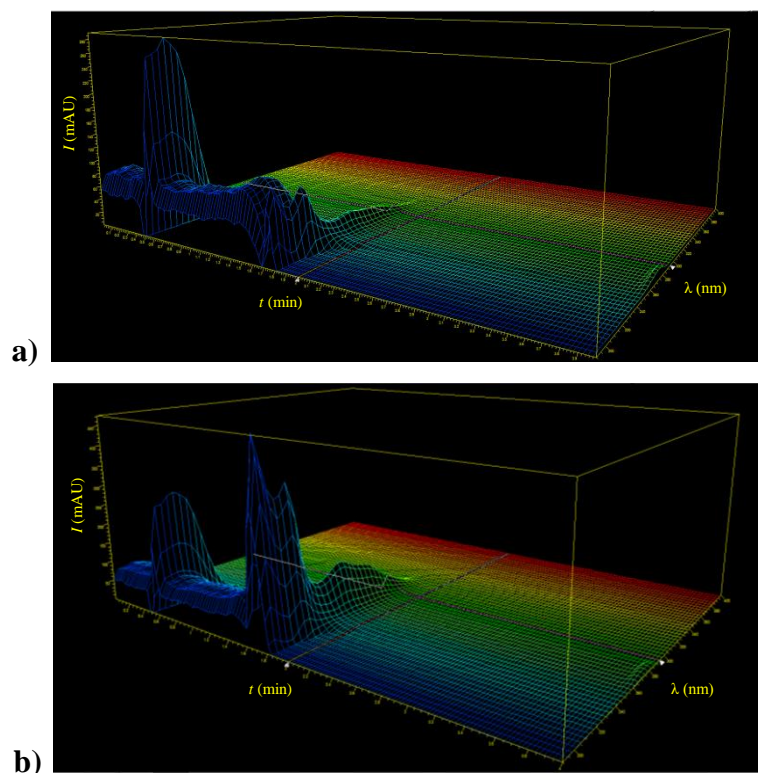
Na **Slici 45.** prikazani su hromatogrami uzoraka OM4 i OM6 na talasnoj dužini detekcije 252 nm, a 3D hromatogrami ovih uzoraka na **Slici 46.** Na **Slici 47.** dati su 3D hromatogrami eksternih standarda imipramina, korišćenih za pripremu kalibracione prave, čije su koncentracije $1,21 \times 10^{-4}$ M (vrednost bliska koncentracijama imipramina u uzorcima OM4 ($1,47 \times 10^{-4}$ M) i OM6 ($1,41 \times 10^{-4}$ M)) i $4,96 \times 10^{-4}$ M.



Slika 45. Hromatogrami nerazblaženih uzoraka imipramina iz seta 7: a) OM4 (pH 12,55) i b) OM6 (pH 12,87). Talasna dužina detekcije: 252 nm.



Slika 46. 3D hromatogrami nerazblaženih uzoraka imipramina iz seta 7: a) OM4 (pH 12,55) i b) OM6 (pH 12,87).



Slika 47. 3D hromatogrami eksternih standarda imipramina, korišćenih za pripremu kalibracione prave, čije su koncentracije: a) $1,21 \times 10^{-4}$ M i b) $4,96 \times 10^{-4}$ M.

Na osnovu **Slika 45 – 47.** može se zaključiti da u baznim suspenzijama imipramina (pH>12) koje sadrže hloride i fosfate (OM4) i suspenzijama koje sadrže samo hloride (OM6), nastaje degradacioni proizvod koji apsorbuje u sličnom opsegu talasnih dužina kao imipramin (240 – 300 nm). Apsorpcija u opsegu 190 – 240 nm potiče od acetonitrila i sirćetne kiseline, koji su bili komponente mobilne faze tokom HPLC–UV/VIS analize. Pik na 1,9 min potiče od imipramina, dok pik na 3,1 min potiče od degradacionog proizvoda. U **Tabeli 22.** prikazan je procenat degradacije imipramina u ispitivanim suspenzijama.

Tabela 22. Procenat degradacije imipramina u uzorcima OM4 (suspenzija koja sadrži hloride i fosfate) i OM6 (suspenzija koja sadrži hloride)

uzorak	% Im u suspenziji	% degradacionog proizvoda u suspenziji
OM4 (pH 12,55)	98,40	1,60
OM6 (pH 12,87)	87,76	12,24

Veći procenat degradacije imipramina u suspenziji koja sadrži hloride (12,24%) u odnosu na suspenziju koja sadrži hloride i fosfate (1,60%) u skladu je sa zapažanjima prikazanim u okviru setova 1 – 3. U suspenzijama imipramina koje sadrže hloride i fosfate, degradacija se dešava samo na pH>10 i može se smatrati zanemarljivom. Međutim, u suspenzijama koje sadrže hloride, degradacija počinje već iznad pH 8, a stepen degradacije se povećava sa porastom pH vrednosti.

Sistem ravnoteža u heterogenim sistemima imipramina prilično se razlikuje u odnosu na sistem ravnoteža u heterogenim sistemima desipramina i nortriptilina. Desipramin i nortriptilin grade katjonske i anjonske komplekse sa komponentama fosfatnog pufera, koji su rastvorni u vodi, tako da dolazi do povećanja rastvorljivosti u definisanom opsegu pH vrednosti [7, 13]. U suspenzijama

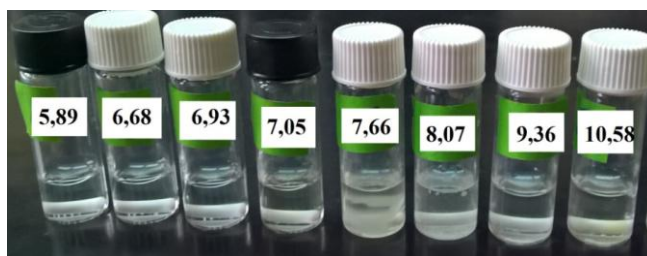
imipramina nije primećeno nastajanje kompleksa sa komponentama fosfatnog pufera. Međutim, dolazi do drastičnog povećanja rastvorljivosti imipramina u kiseloj sredini kao posledica procesa samoagregacije [9]. Kako bi se pripremili zasićeni rastvori imipramina u kiseloj sredini, a da „koncentracije“ suspenzija ostanu uporedive sa početno dizajniranim setovima, bilo je neophodno raditi u uslovima povećane jonske sile [12]. Osim toga, u baznim suspenzijama dolazilo je do degradacije imipramina [9]. Ovoliko komplikovan sistem, ne bi bilo moguće rešiti bez određivanja pH-zavisne rastvorljivosti, kritične micelarne koncentracije, analize čvrste faze, korišćenje HPLC metode sa UV/VIS detekcijom, 3D hromatograma i programa *pDISOL-X*TM. Iako program *pDISOL-X*TM ne uzima u obzir reakcije degradacije, velika prednost programa je mogućnost obrade podataka u uslovima povećane jonske sile [31, 32, 35, 37, 47, 54, 82, 84, 89, 92].

U ovom trenutku, važno je istaći razliku između molekuskog desipramina, nortriptilina i imipramina u čvrstom obliku. Desipramin baza se tokom određivanja rastvorljivosti izdvaja u obliku kristalnog hidrata u periodu od 6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije [7]. Međutim, kristalna struktura baze se gubi dehidratacijom, tako da anhidrovana baza ima delimično kristalni/amorfni karakter. Nortriptilin baza se izdvaja u delimično kristalnom/amorfnom obliku (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije) i može preći iz delimično kristalnog/amorfnog u kristalno stanje ukoliko se produži vreme uspostavljanja ravnoteže (72 sata mešanja + 18 sati sedimentacije) [13]. Nortriptilin baza ima kristalnu strukturu i u obliku hidrata i u anhidrovanom obliku. Imipramin baza se izdvaja u anhidrovanom amorfnom obliku i 24 sata nije dovoljno za transformaciju baze iz amorfnog u kristalni oblik.

III.5 Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima amitriptilin-hidrohlorida

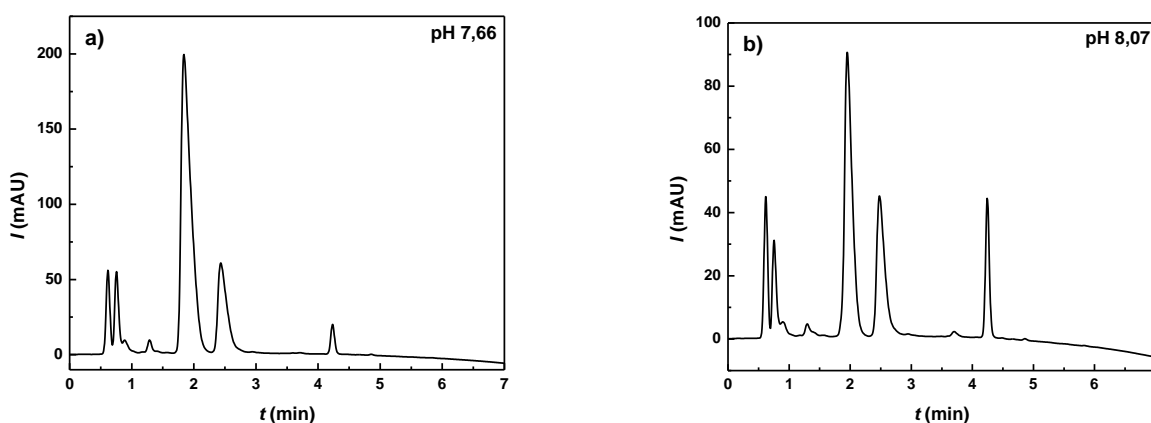
III.5.1 Proučavanje rastvorljivosti amitriptilina u zavisnosti od pH vrednosti

Amitriptilin je strukturni analog desipramina (**Slika 1**), kod koga je azot u tricikličnom prstenu zamenjen ugljenikovim atomom (sličnost sa nortiprilinom) i koji umesto sekundarne amino grupe sadrži tercijarnu amino grupu (sličnost sa imipraminom). pH-*Ramp shake-flask* metoda korišćena je za određivanje rastvorljivosti amitriptilina u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride na 25 ± 1 °C [9]. Titracija iz kisele ka baznoj sredini primenjena je u setu 1. „Koncentracija“ početne kisele suspenzije amitriptilina bila je 60,54 mg/mL, totalna koncentracija fosfata 0,14 M, a totalna koncentracija hlorida 0,25 M. Pri ovim uslovima, nije bilo moguće pripremiti zasićene rastvore sa $\text{pH} < 7,66$. U uzorcima čije su $\text{pH} \geq 7,66$ došlo je do izdvajanja ulja (**Slika 48**).



Slika 48. Set 1: uzorci amitriptilina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Brojevi na slikama predstavljaju pH vrednosti rastvora/suspenzija nakon 24 sata.

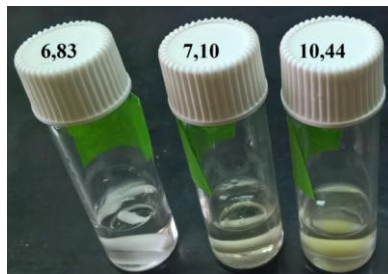
Hromatogrami zasićenih rastvora amitriptilina sadržali su više pikova (**Slika 49**), koji najverovatnije potiču od nastalih degradacionih proizvoda [112 – 115]. Za kvantifikaciju amitriptilina u uzorcima čije su pH vrednosti 7,66 i 8,07 korišćen je pik koji potiče od amitriptilina (1,840 min i 1,952 min). Kvantifikacija nije bila moguća u ostalim uzorcima (signal ispod granice detekcije).



Slika 49. Hromatogrami uzoraka amitriptilina iz seta 1, čije su pH vrednosti: a) 7,66 (razblaženje $10\times$) i b) 8,07 (razblaženje $10\times$).

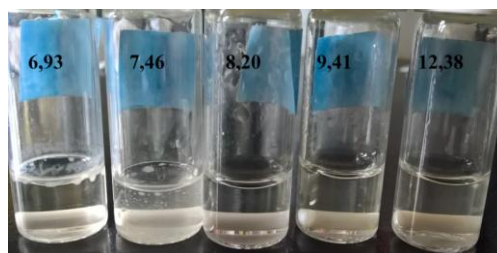
Titracija iz bazne ka kiseloj sredini primenjena je u setu 2 (suspenzije koje sadrže hloride i fosfate) [9]. Međutim, nije bilo čvrste faze u kiseloj sredini, dok je u baznoj sredini kvantifikacija

bila otežana prisustvom degradacionih proizvoda. Promena smera titracije omogućila je pripremu zasićenog rastvora na pH 7,10 i uspešnu kvantifikaciju amitriptilina na pH 10,44; što nije bilo izvodljivo u setu 1. Za uzorke amitriptilina u setovima 1 i 2 karakteristično je da izdvojeno ulje amitriptilina pluta po površini suspenzije (**Slike 48. i 50**), što je različito u odnosu na do sada proučavana jedinjenja: desipramin baza, nortiptilin baza i imipramin baza.



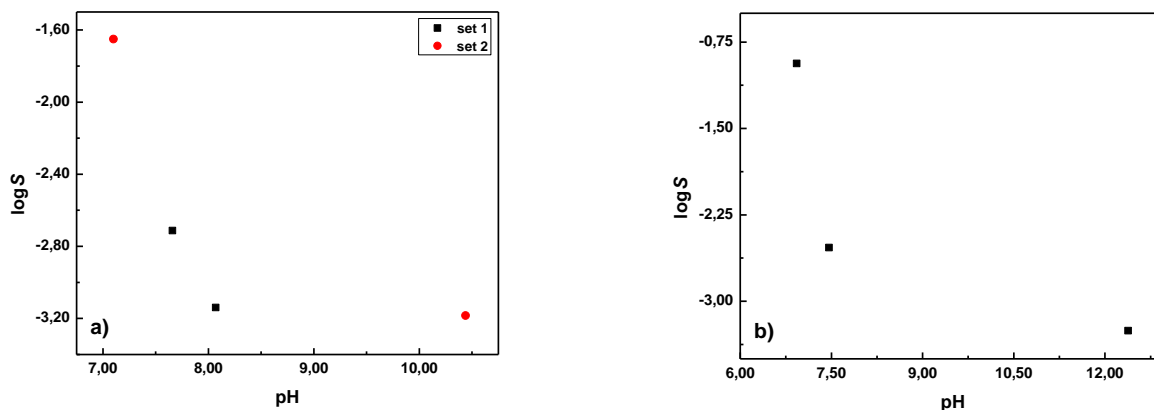
Slika 50. Set 2: uzorci amitriptilina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Brojevi na slikama predstavljaju pH vrednosti rastvora/suspenzija nakon 24 sata.

Uzorci u setu 3 pripremljeni su kao suspenzije amitriptilina koje sadrže samo hloride [9]. „Koncentracije“ suspenzija amitriptilina (pre podešavanja pH vrednosti u širem opsegu) bile su u opsegu 60,85 – 61,35 mg/mL. Nije bilo moguće pripremiti suspenzije amitriptilina u oblasti $\text{pH} < 6,93$. U uspešno pripremljenim suspenzijama, izdvojeno je ulje amitriptilina (**Slika 51**). Takođe, u baznoj sredini došlo je do degradacije amitriptilina.



Slika 51. Set 3: uzorci amitriptilina posle 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije. Brojevi na slikama predstavljaju pH vrednosti suspenzija nakon 24 sata.

Zavisnost rastvorljivosti amitriptilina od pH vrednosti u setovima 1 – 3, prikazani su na **Slici 52**. Rezultati nisu analizirani pomoću programa *pDISOL-XTM* zbog prisustva degradacionih proizvoda u skoro svim pripremljenim uzorcima: pH opseg 7,66 – 10,44 (setovi 1 i 2) i 7,46 – 12,38 (set 3).

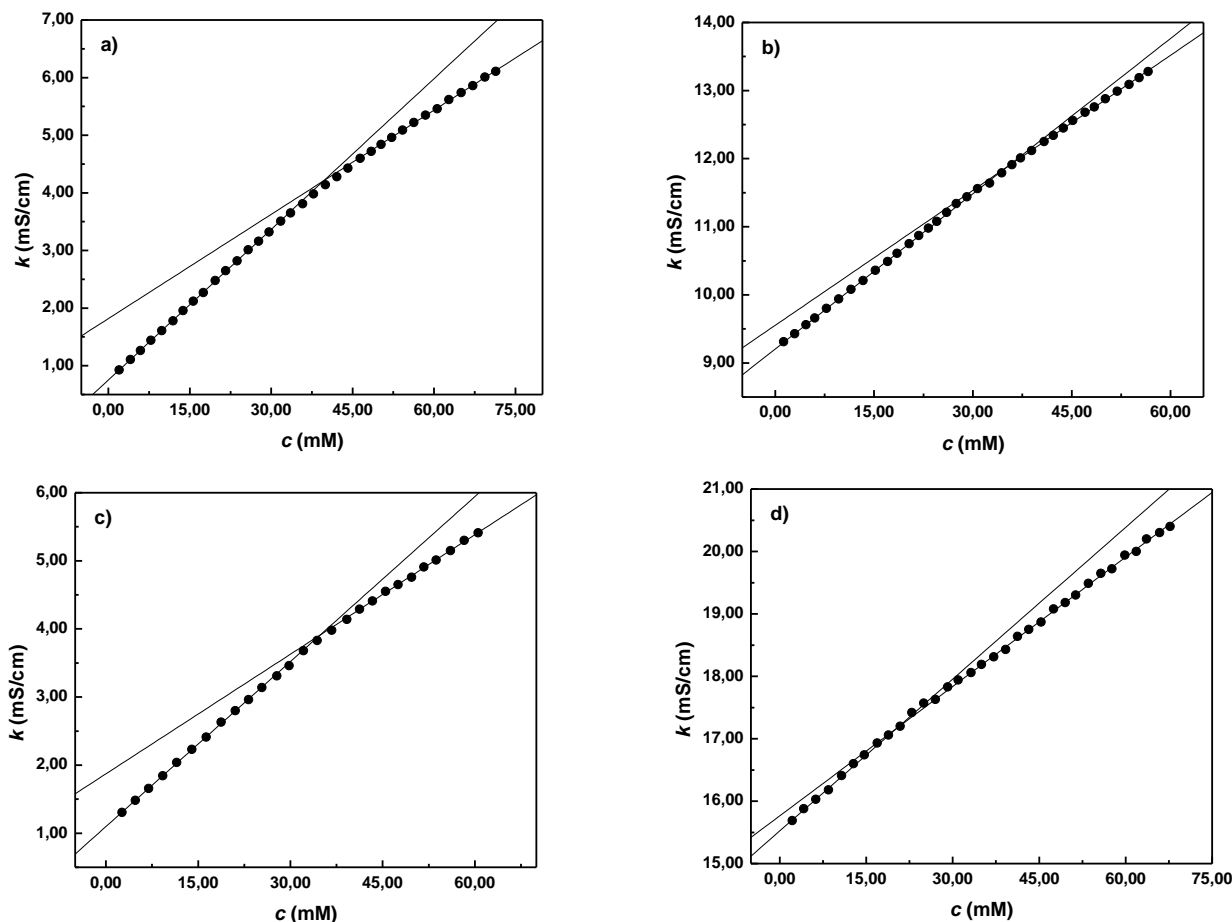


Slika 52. Zavisnost rastvorljivosti amitriptilin-hidrohlorida od pH vrednosti [9]: a) setovi 1 i 2 (suspenzije koje sadrže fosfate i hloride), b) set 3 (suspenzije koje sadrže hloride) na 25 ± 1 °C.

III.5.2 Određivanje kritične micelarne koncentracije amitriptilin-hidrohlorida

Rastvorljivost amitriptilina u kiselj sredini prilično je velika u uslovima definisanim setovima 1 – 3. Dodavanje čvrstog amitriptilin-hidrohlorida u rastvor, dobijen mešanjem 0,900 mL 0,15 NaH_2PO_4 i 0,030 mL 0,9725 M HCl, nije dovelo do nastanka suspenzije, čak ni kada je koncentracija amitriptilin-hidrohlorida bila 5,38 M (1689 mg/mL, pH 2,33). Nastajanje agregata u kiselj sredini, može objasniti rezultate prethodno opisanih eksperimenata.

Kritična micelarna koncentracija amitriptilin-hidrohlorida u rastvorima NaH_2PO_4 (0,01 M i 0,15 M) i NaCl (0,01 M i 0,15 M) na $25,0 \pm 0,1$ °C, određena je metodom konduktometrijskih titracija [12]. Zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije AmHCl prikazane su na **Slici 53**. Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija i stepena disocijacije agregata, date su u **Tabeli 23**.

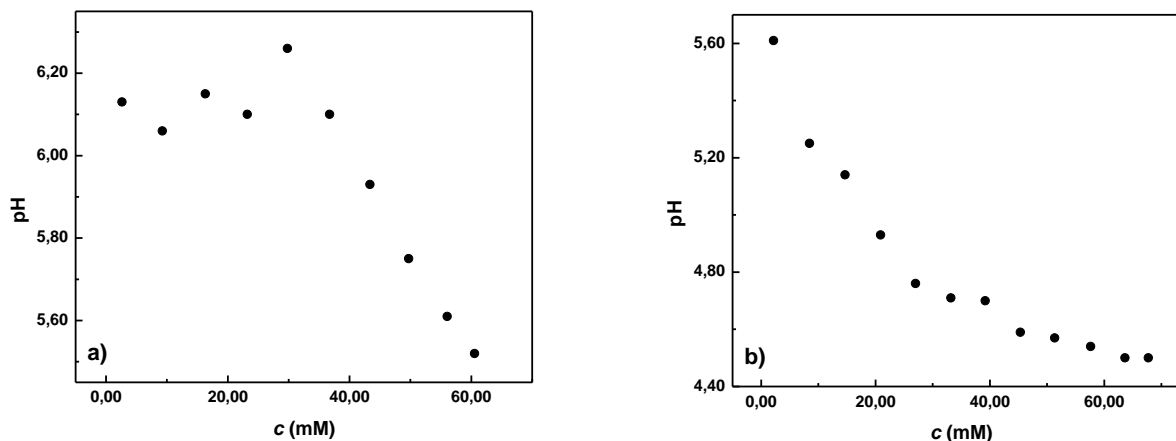


Slika 53. Zavisnost specifične provodljivosti od koncentracije AmHCl [12] u: a) 0,01 M NaH₂PO₄ (pH 4,84 – 4,57), b) 0,15 M NaH₂PO₄ (pH 4,35 – 4,29), c) 0,01 M NaCl (pH 6,13 – 5,52), d) 0,15 M NaCl (pH 5,61 – 4,50) na 25,0±0,1 °C. Izmerene pH vrednosti na početku i na kraju eksperimenta date su u zagradi.

Tabela 23. Kritične micelarne koncentracije (KMK) [12] i stepen disocijacije agregata (β) u rastvorima amitriptilin-hidrohlorida koji sadrže hloride i/ili fosfate na 25,0±0,1 °C

	0,01 M NaH ₂ PO ₄	0,15 M NaH ₂ PO ₄	0,01 M NaCl	0,15 M NaCl
KMK (mM)	39,67±1,36	35,04±3,33	34,85±2,37	20,23±6,90
β	0,69±0,01	0,87±0,01	0,72±0,01	0,85±0,04

Rezultati u **Tabeli 23.** pokazuju da se vrednost KMK amitriptilin-hidrohlorida ne menja značajno sa povećanjem koncentracije fosfata (kada se uzmu u obzir standardne devijacije). U rastvoru natrijum-hlorida, dolazi do smanjenja vrednosti KMK sa porastom koncentracije hlorida, kao što je očekivano [101]. Velika vrednost standardne devijacije KMK određene u 0,15 M NaCl posledica je malog broja tačaka u opsegu koncentracija ispod kritične micelarne koncentracije. Radi potvrde vrednosti KMK, praćena je zavisnost pH vrednosti rastvora od rastuće koncentracije amitriptilin-hidrohlorida u rastvorima natrijum-hlorida (**Slika 54**) [12]. Nagle promene pH vrednosti dešavaju se u oblasti KMK. Ovi eksperimenti potvrđuju tačnost KMK vrednosti, koje su prikazane u **Tabeli 23.** U 0,15 M NaCl, pH vrednost rastvora odmah počinje da opada sa porastom koncentracije AmHCl, što ukazuje da na početku titracije počinje formiranje agregata u sistemu.



Slika 54. Zavisnost pH vrednosti od koncentracije AmHCl [12] u:
a) 0,01 M NaCl i b) 0,15 M NaCl

Vrednosti stepena disocijacije micela u rastvorima amitriptilina približno su iste u rastvorima istih koncentracija hlorida i fosfata (poređenje 0,01 M NaCl i 0,01 M NaH₂PO₄; poređenje 0,15 M NaCl i 0,15 M NaH₂PO₄). Sa porastom koncentracije hlorida ili fosfata raste stepen disocijacije agregata amitriptilina. Ovi podaci pokazuju da, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, veći uticaj na stabilizaciju agregata amitriptilina ima koncentracija kontra jona, nego vrsta (hlorid ili fosfat).

Ukoliko se uporede rastvorljivosti amitriptilina u setovima 1 – 3 sa vrednostima KMK, može se zaključiti da je jedino rastvorljivost na pH 6,93 u setu 3, iznad kritične micelarne koncentracije [9, 12].

III.5.3 Određivanje rastvorljivosti amitriptilina u uslovima povećane jonske sile

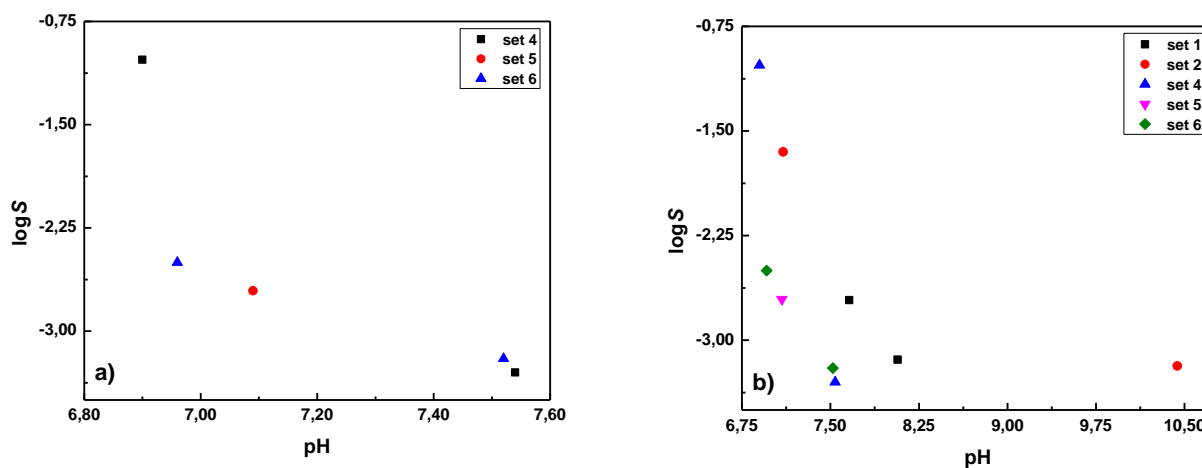
Priprema zasićenih rastvora amitriptilina u kiselj sredini bila je otežana zbog velike rastvorljivosti amitriptilina, koja je uslovljena građenjem agregata. Sličan problem u eksperimentima za određivanje rastvorljivosti imipramina u kiselj sredini, rešen je uvođenjem nekih modifikacija, kao što su upotreba imipramin baze umesto imipramin-hidrohlorida i povećanjem koncentracije pozadinskog elektrolita. Slični principi su primenjeni u setovima amitriptilina 4 – 6 [12].

Uzorci u setu 4 pripremljeni su kao suspenzije amitriptilina koje sadrže fosfate. „Koncentracija“ početne suspenzije amitriptilina bila je 63,41 mg/mL. Totalna koncentracija fosfata bila je 1,29 M, a pH vrednost 6,84. Standardnim rastvorom 1 M NaOH podešavana je pH vrednost pojedinačnih uzoraka (nakon raspodele početne suspenzije u više bočica). Pripremljene su suspenzije u pH opsegu 6,90 – 10,11. Kvantifikacija je bila uspešna u pH opsegu 6,90 – 7,54. Na višim pH vrednostima dolazilo je do degradacije amitriptilina (koncentracija amitriptilina bila je ispod granice detekcije). Ovaj eksperiment je originalno zamišljen kao titracija od više (pH 6,84) ka nižoj pH vrednosti pomoću standardnog rastvora HCl, koji bi bio izvor hloridnih jona. Međutim, priprema zasićenih rastvora u kiselj sredini nije bila uspešna.

Titracija od niže ka višoj pH vrednosti korišćena je u setu 5. Pripremljen je početni rastvor amitriptilina koncentracije 70,54 mg/mL, u kome je totalna koncentracija fosfata bila 2,00 M, a pH vrednost 5,12. Korišćenjem standardnog rastvora 1 M NaOH podešene su pH vrednosti pojedinačnih uzoraka u pH opsegu 5,14 – 7,09. Svi uzorci su ostali bistri, osim uzorka čija je pH vrednost 7,09. U suspenziji se izdvojilo ulje amitriptilina.

Set 6 je dizajniran kao titracija od više ka nižoj pH vrednosti. Za razliku od setova 4 i 5, za pripremu početne suspenzije korišćen je natrijum-hidrogenfosfat, umesto natrijum-dihidrogenfosfata. Totalna koncentracija fosfata bila je 0,51 M (vrednost ograničena rastvorljivošću natrijum-hidrogenfosfata u vodi (0,52 M)) a pH vrednost 10,91. Vrednosti pH pojedinačnih uzoraka podešene su 2,00 M fosfornom kiselinom. Rastvorljivost je određena u pH opsegu 6,96 – 7,52. Priprema suspenzija na $\text{pH} < 6,96$ nije bila uspešna.

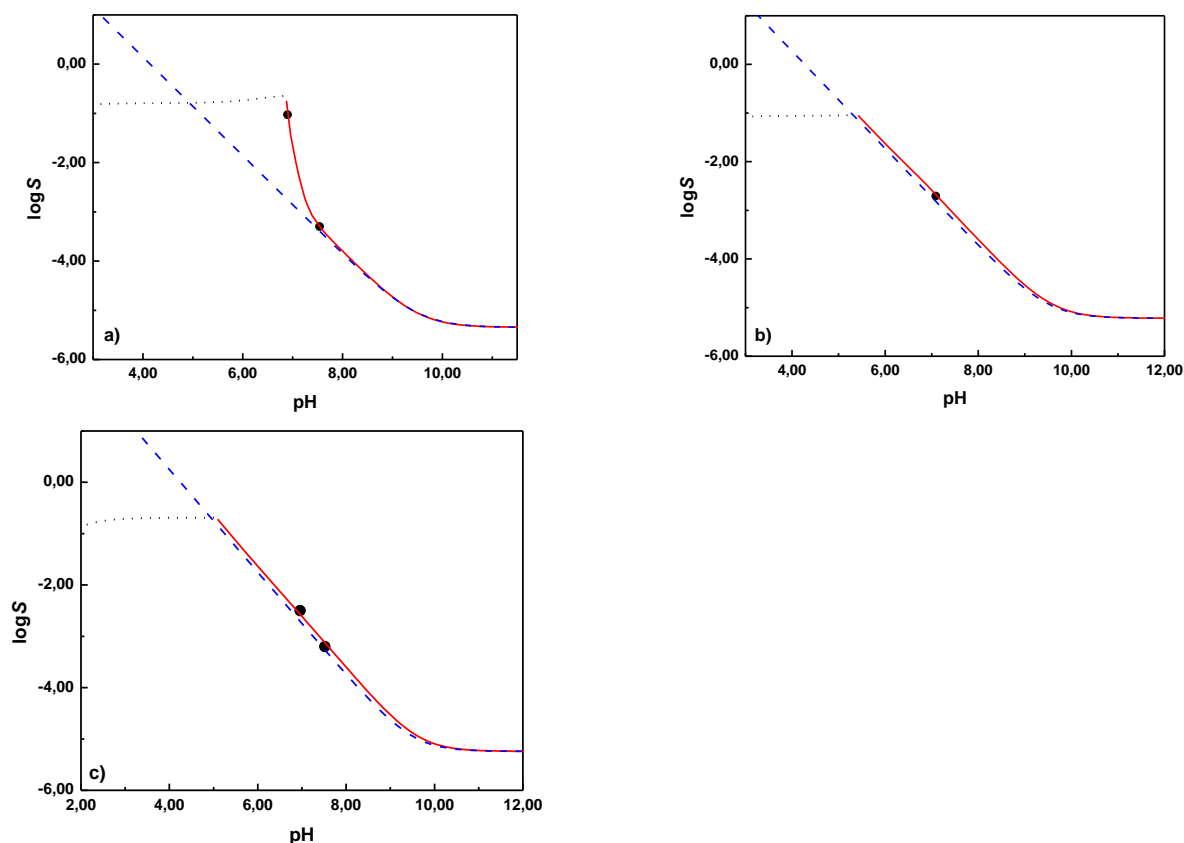
Rastvorljivosti amitriptilina dobijene u setovima 4 – 6, prikazane su na **Slici 55**. Pri eksperimentalnim uslovima definisanim setovima 4 – 6, rastvorljivost amitriptilina je smanjena, ali ne dovoljno, da bi formiranje zasićenih rastvora u celoj kiseljoj sredini bilo moguće. Izuzetak je rastvorljivost amitriptilina na pH 6,90 u setu 4, čija je vrednosti iznad kritične micelarne koncentracije.



Slika 55. Zavisnosti rastvorljivosti amitriptilin-hidrohlorida od pH vrednosti [9, 12]: a) setovi 4 – 6 (suspenzije koje sadrže fosfate) i b) setovi 1, 2, 4–6 na 25 ± 1 °C. Rastvorljivost je izražena u jedinicama mol/L.

Ovi rezultati pokazuju da zasićene rastvore amitriptilina u kiseljoj sredini nije moguće pripremiti korišćenjem već pomenutih modifikacija (amitriptilin baza (umesto soli) i povećanje koncentracije pozadinskog elektrolita), a da „koncentracije“ suspenzija ostanu uporedive sa „koncentracijama“ suspenzija u setovima 1 – 3. Činjenica da su navedene modifikacije bile uspešne prilikom pripreme suspenzija imipramina, pokazuju da amitriptilin ima mnogo veću tendenciju za agregacijom u kiseljoj sredini u odnosu na imipramin.

Analiza setova 4 – 6 pomoću programa *pDISOL-X*TM bila je moguća zato što u ovim uzorcima nije došlo do degradacije amitriptilina u rastvoru. Profili rastvorljivosti amitriptilina, dobijeni pomoću programa (crvena linija), prikazani su na **Slici 56**. Isprekidana plava linija označava teorijski profil rastvorljivosti izračunat na osnovu HH jednačine. Tačkastom linijom prikazana je pH oblast u kojoj nije bilo čvrste faze u sistemu. Model je napravljen na osnovu ravnoteža predstavljenih jednačinama (51 – 56), čije su vrednosti date u **Tabeli 24**.



Slika 56. Profili rastvorljivosti amitriptilina dobijeni pomoću programa *pDISOL-X*TM analizom sledećih setova: a) set 4, b) set 5 i c) set 6. Rastvorljivost je izražena u jedinicama mol/L.

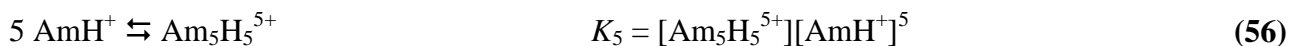
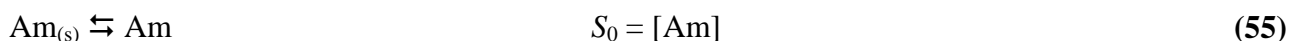
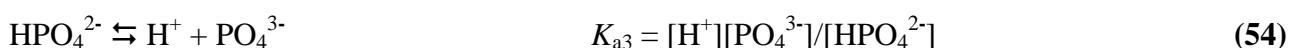
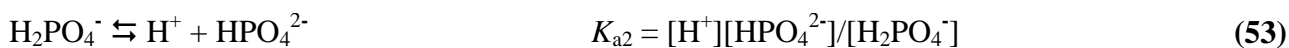
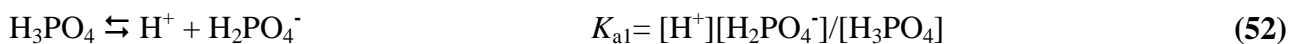
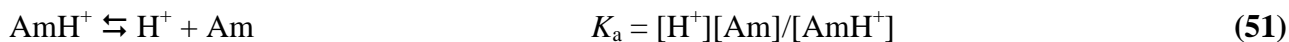


Tabela 24. Konstante ravnoteža u suspenzijama amitriptilina izračunate pomoću programa *pDISOL-X*TM

Set ^a	log S_0	log K_5	I_{sr} (M)	GOF
4	-5,35±0,01	11,37±0,01	2,79	0,03
5	-5,22	/	2,08	/
6	-5,24±0,05	/	1,42	1,40

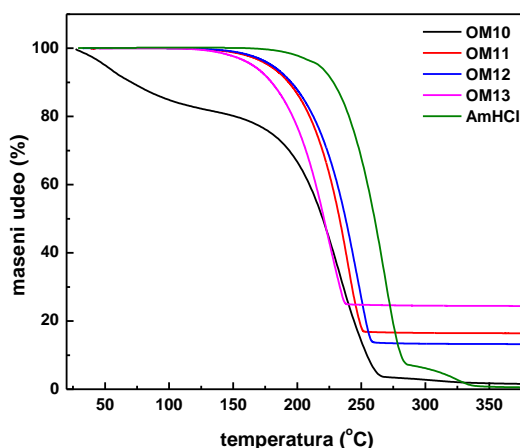
^a 25 ° C; I_{ref} =0,15 M; pK_a = 9,49.

Na osnovu proračuna, može se zaključiti da amitriptilin ima nižu sopstvenu rastvorljivost u odnosu na do sada prikazana jedinjenja. Veća rastvorljivost amitriptilina na $\text{pH} < 7,5$ u setu 4, od teorijski izračunate, može se objasniti nastajanjem katjonskog pentamera amitriptilina. Velika vrednost konstante agregacije pokazuje izrazito veliku tendenciju amitriptilina ka agregaciji, čak i u uslovima povećane jonske sile, odnosno povećane koncentracije zajedničkog jona. U setovima 5 i 6, nije primećeno nastajanje agregata u zasićenim rastvorima amitriptilina. Međutim, nemogućnost pripreme suspenzija amitriptilina u kiseljoj sredini ukazuje na agregaciju amitriptilina na nižim pH vrednostima (posebno kada se uzmu u obzir svi do sada prikazani rezultati).

III.5.4 Karakterizacija čvrste faze u suspenzijama amitriptilina

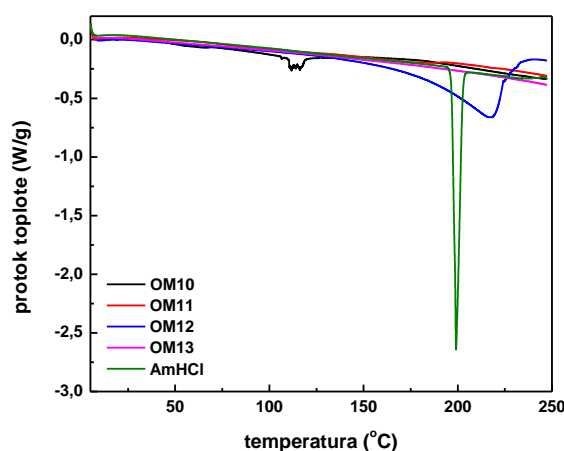
Posledica visokog stepena agregacije amitriptilina u kiseljoj sredini bila je nemogućnost dobijanja dovoljne količine taloga za karakterizaciju čvrstog stanja. Iz toga razloga, pripremljeni su uzorci amitriptilina u baznim suspenzijama koje sadrže hloride (OM10 (pH 7,37) i OM11 (pH 12,50)) i baznim suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate (OM12 (pH 7,24) i OM13 (pH 11,11)). Heterogeni sistemi pripremljeni su povećavanjem „koncentracije” amitriptilin-hidrohlorida u sličnim eksperimentalnim uslovima kao u setovima 1 – 3. Kada se uzme u obzir da u uslovima povećane jonske sile (setovi 4 – 6) nisu dobijeni zasićeni rastvori u širem pH opsegu u odnosu na setove 1 – 3, nije bilo potrebe pripremati uzorke za karakterizaciju čvrstog stanja u uslovima povećane jonske sile.

Vizuelnom detekcijom primećeno je izdvajanje ulja amitriptilina u svim uzorcima, što je u skladu sa proračunima pomoću programa *pDISOL-XTM*. Radi potvrde da li je amitriptilin baza izdvojena u anhidrovanom obliku ili u obliku hidrata, urađena je termogravimetrijska analiza uzoraka OM10 – OM13, kao i komercijalno dostupnog amitriptilin-hidrohlorida. TGA termogrami (Slika 57) pokazuju da je amitriptilin baza u uzorcima OM11 – OM13 u anhidrovanom obliku, zato što do gubitka mase dolazi tek iznad 150 °C. Amitriptilin baza u uzorku OM10 je u obliku hidrata. Do gubitka mase od 18,34% dolazi u širokom opsegu temperatura oko 100 °C, što ukazuje da je amitriptilin baza najverovatnije nestehiometrijski hidrat u kom molekuli vode najčešće formiraju kanale ili slojeve u unutrašnjosti hidrata [2]. Komercijalno dostupni AmHCl je u anhidrovanom obliku, kao što je i očekivano.



Slika 57. TGA termogrami uzoraka amitriptilina izolovanih iz suspenzija koje sadrže hloride (OM10 (pH 7,37) i OM11 (pH 12,50)) i suspenzija koje sadrže hloride i fosfate (OM12 (pH 7,24) i OM13 (pH 11,11)).

Termičko ponašanje ovih uzoraka praćeno je pomoću diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (**Slika 58**). U termogramu amitriptilin-hidrohlorida može se primeti endoterma koja potiče od topljenja soli blizu 200 °C, što pokazuje kristalni karakter ove soli. Karakterističnih prelaza nema u termogramima uzoraka OM11 i OM13 što ukazuje da je amitriptilin baza u amorfnom obliku. Već je pomenuto da su u literaturi prikazana slična zapažanja nastala termičkom analizom strukturno sličnih jedinjenja u obliku baza [37]. Široka endoterma niskog intenziteta oko 115 °C u uzorku OM10 verovatno potiče od dehidracije amitriptilin baze, što se poklapa sa rezultatima termogravimetrijske analize (gubitak mase dešava se u širokom opsegu oko 100 °C). Prisustvo ove endoterme pokazuje da je amitriptilin baza, izolovana u obliku hidrata, delimično amorfno/kristalnog karaktera. Isti karakter amitriptilin baze (delimično amorfni/kristalni), može se primetiti kod uzorka OM12. Ovaj uzorak nije hidrat, tako da nema gubitka mase oko 100 °C u TGA termogramu (**Slika 57**), niti termičkog prelaza koji potiče od dehidracije u DSC termogramu (**Slika 58**). Međutim, u termogramu ovog uzorka javlja se široka endoterma oko 220 °C, koja može poticati od topljenja, koje je praćeno degradacijom. To takođe znači da amitriptilin baza nema potpuno amorfni karakter.



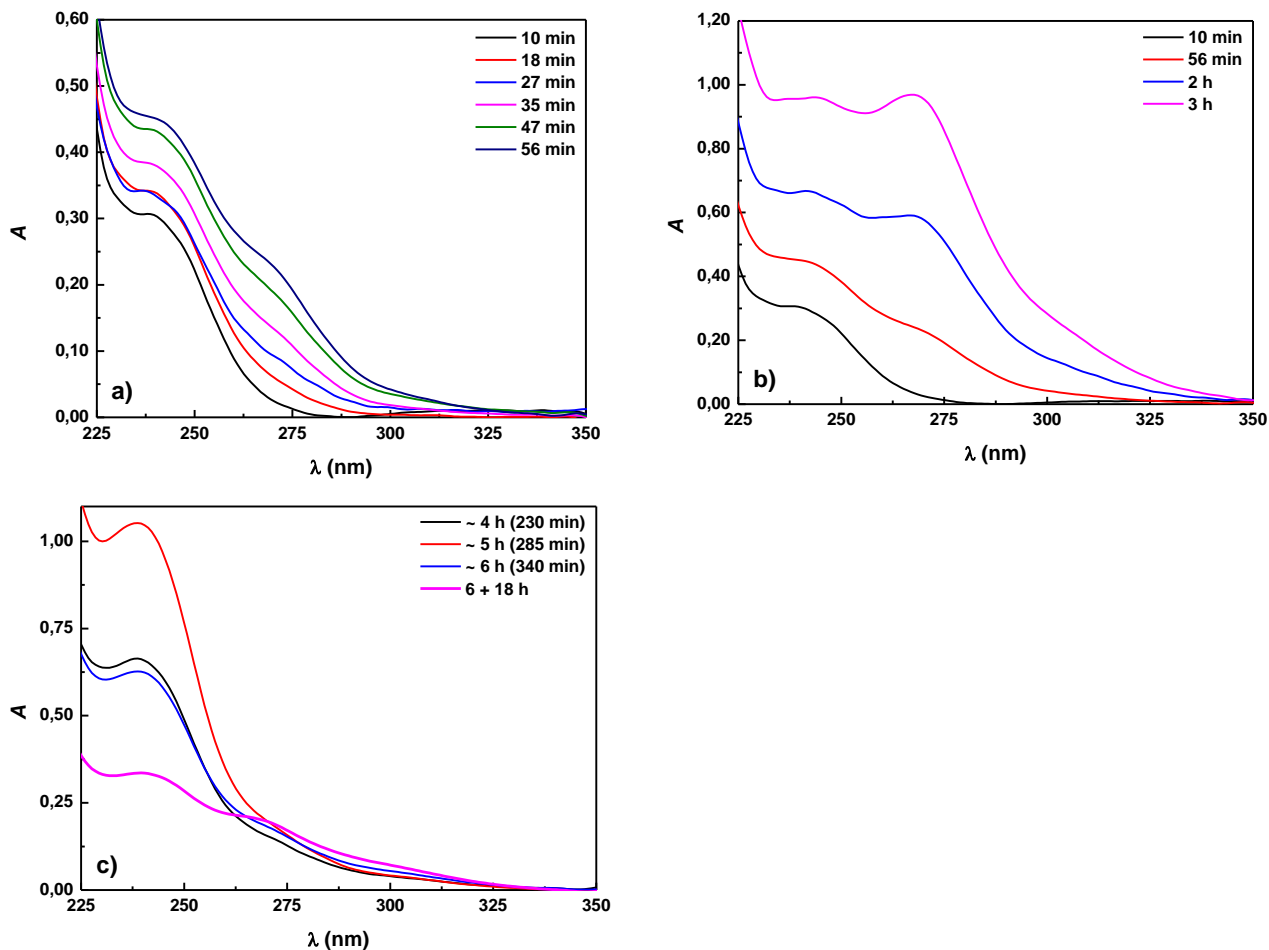
Slika 58. DSC termogrami uzoraka amitriptilina izolovanih iz suspenzija koje sadrže hloride (OM10 (pH 7,37) i OM11 (pH 12,50)) i suspenzija koje sadrže hloride i fosfate (OM12 (pH 7,24) i OM13 (pH 11,11)).

Prikazani rezultati pokazuju da za vreme uspostavljanja ravnoteže u heterogenom sistemu od 24 sata, amitriptilin baza može postojati u amorfnom ili delimično amorfnom/kristalnom obliku. Takođe, može biti u anhidrovanom obliku ili u obliku hidrata. Zanimljivo zapažanje je da amitriptilin baza izdvojena iz suspenzija pH vrednosti 7,24 – 7,37 (uzorci OM10 i OM12) ima delimično amorfni/kristalni karakter. Međutim, amitriptilin baza je u potpuno amorfnom obliku, ukoliko je izdvojena iz suspenzija pH vrednosti 11,11 – 12,50 (uzorci OM11 i OM13).

III.5.5 Praćenje degradacije u suspenzijama amitriptilin-hidrohlorida

Pojava više pikova u hromatogramima zasićenih rastvora amitriptilina u baznoj sredini ukazuje na pojavu degradacije amitriptilina u suspenzijama. Proces degradacije praćen je pomoću UV/VIS spektrofotometrije. Pripremljena je suspenzija amitriptilina koja sadrži hloride i fosfate, pH vrednosti 10,98 i „koncentracije“ 44,31 mg/mL. Tokom faze mešanja i posle 18 sati sedimentacije, snimljeni su apsorpcioni spektri uzetih alikvota zasićenog rastvora amitriptilina (**Slika 59**). Nakon 230 minuta mešanja bilo je potrebno razblažiti uzorak. Na spektrima se može uočiti porast

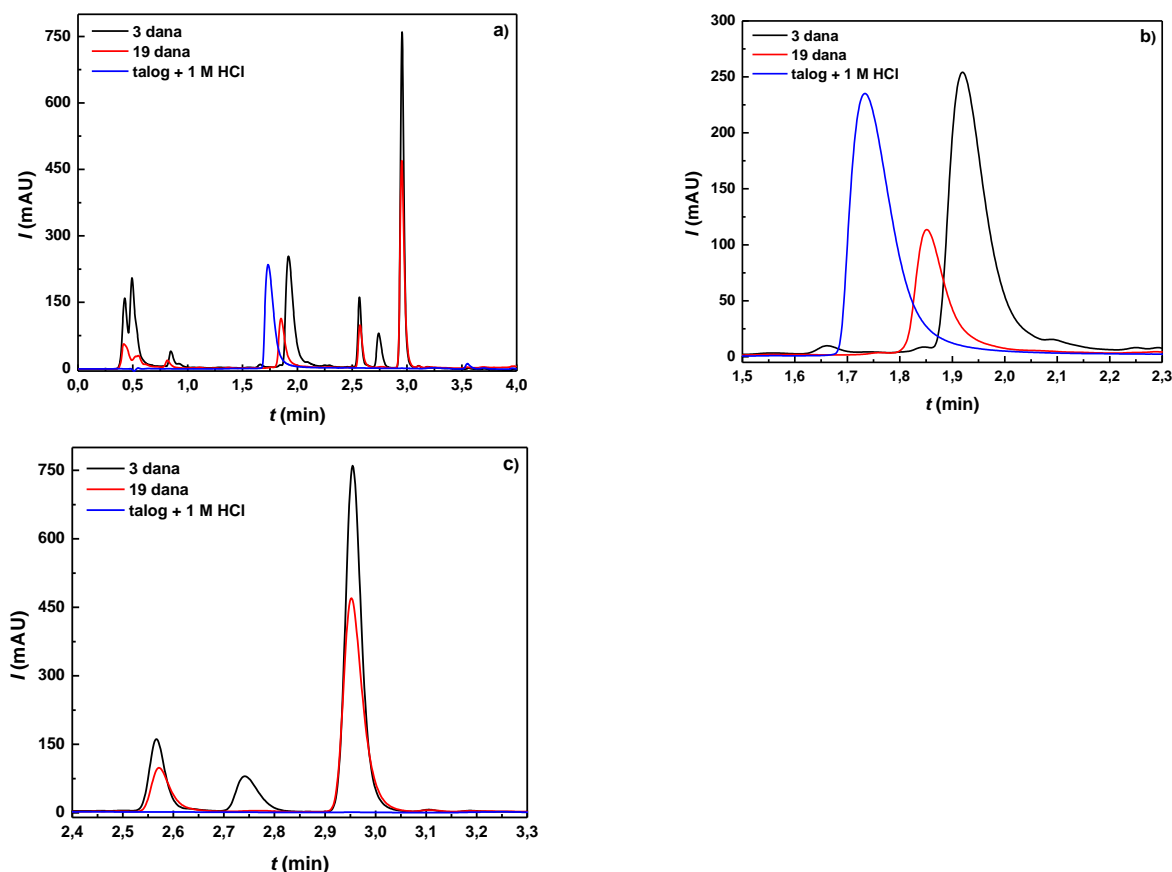
apsorbancije tokom 5 sati mešanja, a zatim apsorbanija opada. Osim toga, posle 1 sata mešanja dolazi do promena oblika pika (**Slika 59.a**). Ovakvo zapaženje ukazuje da u suspenziji nastaje jedan ili više degradacionih proizvoda, koji apsorbuju u sličnom opsegu talasnih dužina kao amitriptilin, ali je maksimum apsorpcije različit (amitriptilin ~240 nm, degradacioni proizvod ~270 nm).



Slika 59. Apsorpcioni spektri zasićenog rastvora amitriptilin-hidrohlorida u fosfatnom puferu na pH 10,98 tokom: a) 56 minuta mešanja (uzorci nisu razblaženi), b) 3 sata mešanja (uzorci nisu razblaženi), c) 4 – 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije (razlaženje 10 puta)

Procenat degradacije amitriptilina u periodu od 24 sata u suspenziji koja sadrži hloride i fosfate, izračunat na osnovu podataka o pripremi i analizi uzorka OM13 (pH 11,11) iznosi 9%. U cilju detaljnijeg proučavanja degradacije amitriptilina u baznoj sredini, dizajnirana su dva eksperimenta, u kojima je degradacija praćena tokom faze mešanja (**eksperiment 1**) i tokom faze sedimentacije (**eksperiment 2**).

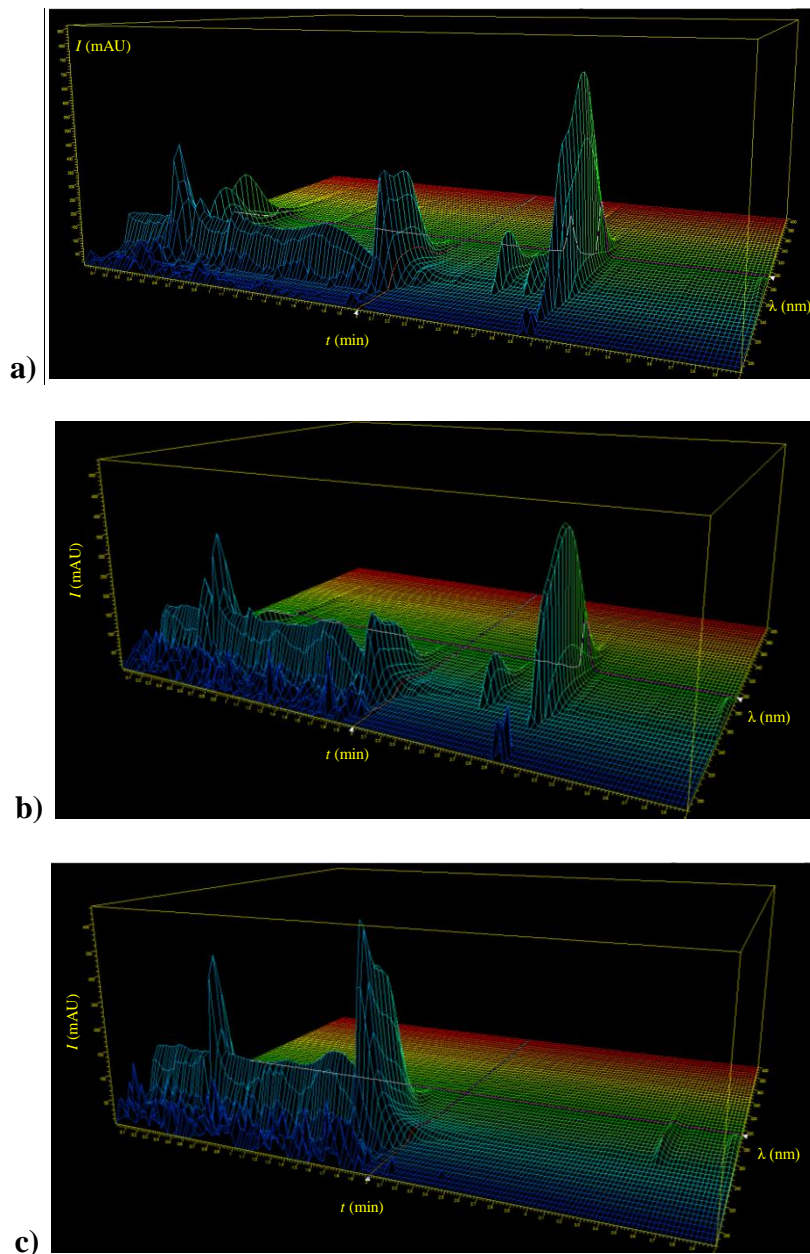
U **eksperimentu 1**, praćena je degradacija amitriptilina za vreme mešanja suspenzije (pH>12) u toku 19 dana. Nakon mešanja, faze su razdvojene, a talog je rastvoren dodatkom 1 M HCl. Hromatogrami na talasnoj dužini detekcije 250 nm i 3D hromatogrami prikazani su na **Slikama 60.** i **61.**



Slika 60. Eksperiment 1. Hromatogrami zasićenih rastvora amitriptilina nakon 3 i 19 dana (razblažen $5\times$) mešanja. Hromatogram rastvora amitriptilina napravljenog rastvaranjem taloga amitriptilina pomoću rastvora HCl nakon razdvajanja faza (razblažen $625\times$). Talasna dužina detekcije 250 nm. a) Kompletni hromatogrami (0 – 4,0 min), b) uvećan prikaz pikova koji potiču od amitriptilina, c) uvećan prikaz pikova koji potiču od degradacionih proizvoda.

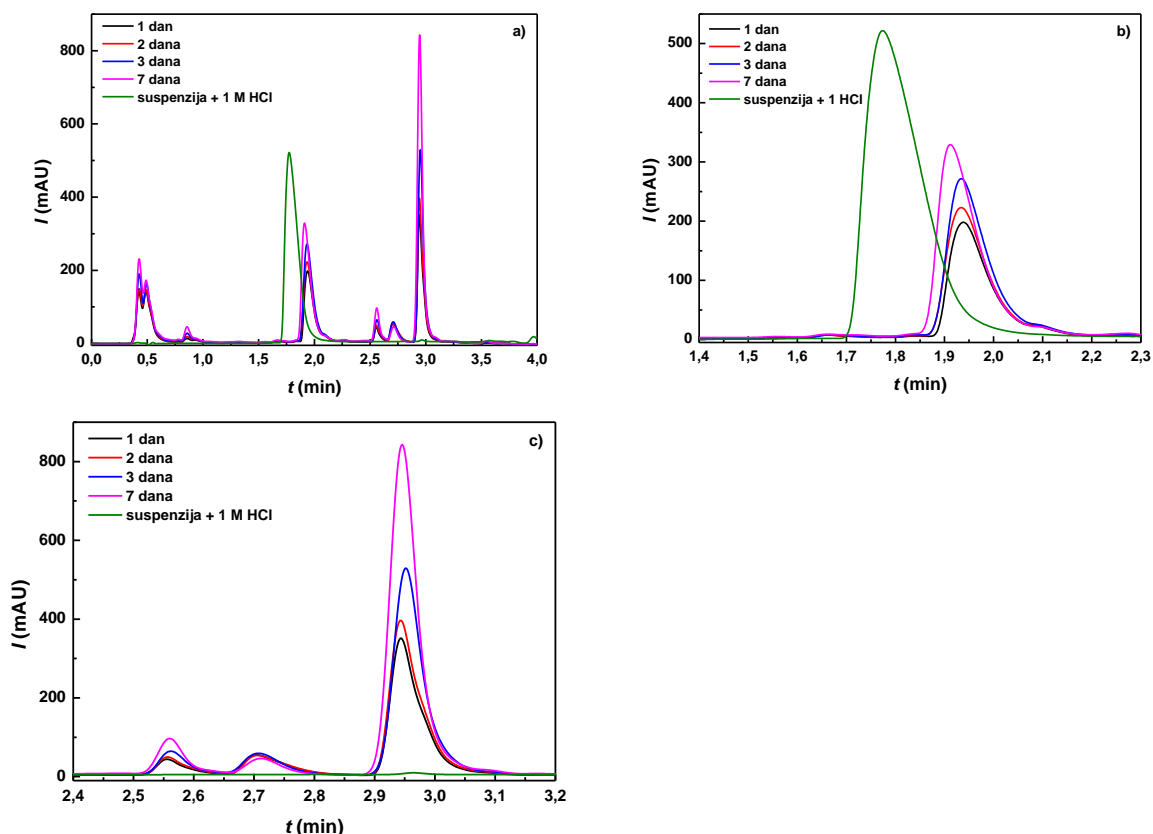
U hromatogramima zasićenih rastvora amitriptilina na $\text{pH} > 12$, osim pika koji potiče od amitriptilina (**Slika 60.b**), postoje još tri pika, koji verovatno potiču od degradacionih proizvoda (**Slika 60.c**). Kada se rastvori ulje amitriptilina, pomoću rastvora HCl (faze prethodno razdvojene), u hromatogramu se uočava samo pik koji potiče od amitriptilina (1,75 min). Ukupna koncentracija amitriptilina dosta je veća u odnosu na koncentraciju degradacionih proizvoda u rastvoru, stoga njihovo prisustvo nije primetno u hromatogramu. Ovo zapažanje može značiti da dolazi do degradacije rastvorenog amitriptilina, a ne dolazi do degradacije amitriptilina u čvrstoj fazi suspenzije. Drugim rečima, čvrsta faza u suspenziji je amitriptilin baza, dok se u rastvoru nalazi smeša amitriptilina i degradacionih proizvoda.

U uslovima postavljenim **eksperimentom 1**, procenat degradacije amitriptilina, u suspenziji nakon 19 dana mešanja iznosi 11,2%. Intenzivno i duže vreme mešanja suspenzije nije drastično promenilo procenat degradacije amitriptilina (9%) izračunat nakon 24 h u suspenziji uzorka OM13.



Slika 61. Eksperiment 1 – 3D hromatogrami: a) 3 dana mešanja, b) 19 dana mešanja (razblažen $5\times$), c) rastvor amitriptilina dobijen rastvaranjem taloga nakon razdvajanja faza (razblažen $625\times$).

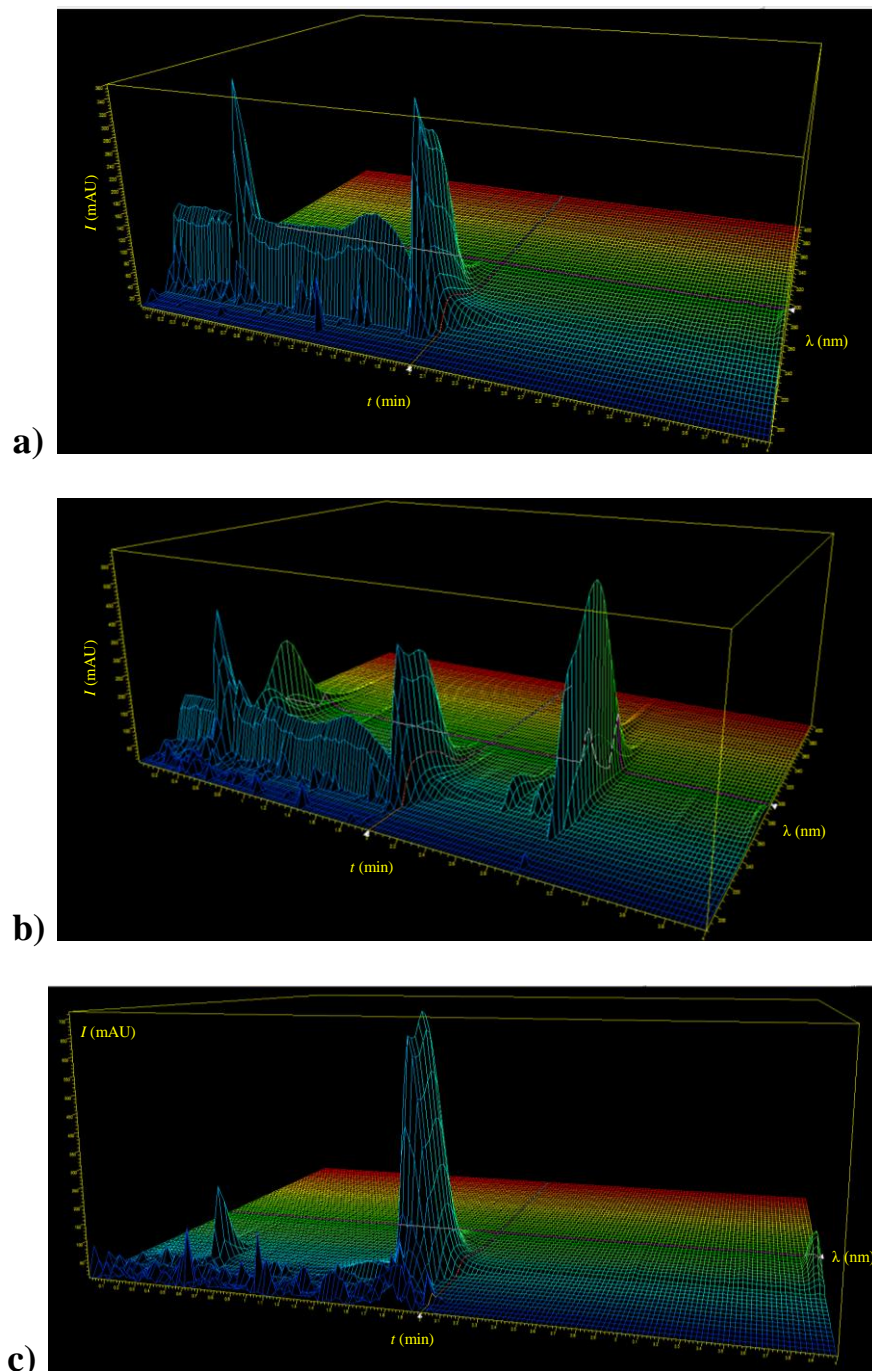
U **eksperimentu 2**, degradacija amitriptilina u suspenziji koja sadrži fosfate i hloride ($\text{pH} > 12$), praćena je tokom faze sedimentacije (koja je usledila nakon 6 sati mešanja) u periodu od 7 dana na 25 ± 1 ° C. Posle 7 dana, u suspenziju je dodat 1 M rastvor HCl, kako bi se talog rastvorio. Izmerena pH vrednost dobijenog rastvora bila je 6,66. Hromatogrami na talasnoj dužini detekcije 250 nm i 3D hromatogrami svih alikvota, snimljeni su na HPLC-u sa UV/VIS detekcijom (**Slike 62. i 63**).



Slika 62. Eksperiment 2. Hromatogrami nerazblaženih zasićenih rastvora amitriptilina (pH 12,16 – 12,67) snimljeni nakon uspostavljanja ravnoteže od 1/2/3/7 dana. Hromatogram rastvora amitriptilina (pH 6,66; razblažen 80 \times), dobijen nakon dodavanja 1 M HCl u suspenziju amitriptilina (kako bi došlo do rastvaranja taloga). Talasna dužina detekcije 250 nm. a) Kompletni hromatogrami (0 – 4,0 minuta), b) uvećan prikaz pikova koji potiču od amitriptilina, c) uvećan prikaz pikova koji potiču od degradacionih proizvoda.

U hromatogramima zasićenih rastvora amitriptilina na $\text{pH} > 12$, osim pika koji potiče od amitriptilina (**Slika 62.b**), postoje još tri pika, koji potiču od degradacionih proizvoda (**Slika 62.c**). Sa povećanjem vremena sedimentacije, rastu površine pikova na $\sim 2,55$ i $\sim 2,95$ minuta, međutim površina pika na $\sim 2,7$ minuta se smanjuje. Kada se rastvori ulje amitriptilina, pomoću rastvora HCl (bez prethodnog razdvajanja faza), u hromatogramu se uočava samo pik koji potiče od amitriptilina (1,8 min).

U uslovima postavljenim **eksperimentom 2**, procenat degradacije amitriptilina, u suspenziji nakon 6 sati mešanja i 7 dana sedimentacije iznosi 7%.



Slika 63. Eksperiment 2 – 3D hromatogrami: a) eksternog standarda amitriptilin-hidrohlorda koncentracije $4,52 \times 10^{-4}$ M, b) nerazblaženog zasićenog rastvora amitriptilina (pH 12,16) nakon 24 sata, c) rastvora amitriptilina (pH 6,66; razblažen $80\times$), dobijenog nakon dodavanja 1 M HCl u suspenziju amitriptilina, kako bi došlo do rastvaranja taloga.

3D hromatogrami potvrđuju navedene činjenice o degradaciji amitriptilina u suspenziji koja sadrži hloride i fosfate. Apsorpcija u oblasti 190 – 240 nm potiče od mobilne faze, koja se sastoji od sirćetne kiseline i acetonitrila. 3D hromatogram eksternog standarda amitriptilin-hidrohlorda prikazan je na **Slici 63.a**. U 3D hromatogramu zasićenog rastvora amitriptilina nakon 24 sata uspostavljanja ravnoteže, mogu se uočiti apsorpcioni spektri amitriptilina i degradacionih

proizvoda, koji se mogu povezati sa izgledom apsorpcionih spektara zasićenog rastvora amitriptilina snimljenih posle 24 sata (**Slika 63.b.** i **Slika 59**). U 3D hromatogramu snimljenom nakon rastvaranja čvrste faze (**Slika 63.c**), uočava se pik (i apsorpcioni spektar) koji potiče od amitriptilina. Hromatogrami (**Slika 62**) i 3D hromatogrami (**Slika 63**), dobijeni u **eksperimentu 2**, pokazuju da u suspenziji amitriptilina verovatno nastaju isti degradacioni proizvodi kao u **eksperimentu 1** (**Slika 60.** i **61**).

Odmerena masa $\text{AmHCl}_{(s)}$, korišćena za pripremu suspenzije, bila je približno ista u **eksperimentima 1 i 2** (132,55 mg i 132,80 mg). Mase dobijenih degradacionih proizvoda bile su 14,9 i 9,3 mg, redom. Pokušano je razdvajanje degradacionih proizvoda na gravitacionoj koloni, međutim izolovane mase pojedinačnih proizvoda nisu bile dovoljne za snimanje NMR spektara i određivanje strukture degradacionih proizvoda. Produženo vreme mešanja (19 dana) i vreme sedimentacije (7 dana) u **eksperimentima 1 i 2** nije značajno promenilo procenat degradacije amitriptilina.

Proučavanje pH-zavisne rastvorljivosti amitriptilina izuzetno je otežano intenzivnom samoagregacijom u kiseloj sredini, koja onemogućava nastajanje zasićenih rastvora, kao i degradacijom u baznoj sredini. Iako konstruisanje $\log S$ -pH dijagrama u široj pH oblasti nije bilo uspešno, pomenuta zapažanja mogu biti od koristi prilikom dalje analize heterogenih sistema amitriptilina.

U ovoj doktorskoj disertaciji razvijena je *pH-Ramp shake-flask* metoda. Ova metoda predstavlja modifikaciju klasične *shake-flask* metode i služi za određivanje termodinamičke rastvorljivosti. Kao model jedinjenja izabrani su sledeći triciklični antidepresivi: desipramin, nortriptilin, imipramin i amitriptilin. Heterogeni sistemi TCA pripremljeni su kao suspenzije koje sadrže hloride i fosfate, kao suspenzije koje sadrže hloride i kao suspenzije koje sadrže fosfate.

Primećeno je da desipramin i nortriptilin grade u vodi rastvorne katjonske $((\text{DsH})_2\text{H}_2\text{PO}_4^+$, $(\text{NorH})\text{H}_3\text{PO}_4^+$) i anjonske komplekse $(\text{Ds}(\text{DsH})\text{HPO}_4^-$, $\text{Nor}(\text{NorH})\text{HPO}_4^-)$ sa komponentama fosfatnog pufera, što povećava njihovu rastvorljivost [7, 13]. Osim toga, pokazano je da u zavisnosti od odnosa koncentracija kontra jona (hloridi i/ili fosfati) u suspenziji može doći do taloženja desipramina i nortriptilina u obliku hidrohloridnih soli, fosfatnih soli ili čistih baza.

U heterogenim sistemima imipramina i amitriptilina primećeno je povećanje rastvorljivosti u kiseloj sredini kao posledica procesa samoagregacije [9]. U baznoj sredini dolazilo je do degradacije imipramina i amitriptilina. Opseg pH vrednosti u kome se samoagregacija ili degradacija odvijaju zavisi od sastava suspenzije. Priprema zasićenih rastvora imipramina u kiseloj sredini bila je moguća u uslovima povećane koncentracije kontra jona (hlorida ili fosfata) u suspenziji, odnosno povećane jonske sile [12]. Međutim, ovi uslovi nisu olakšali pripremu zasićenih rastvora amitriptilina u kiseloj sredini.

Na osnovu prikazanih rezultata uočljiva je sličnost u hemijskom ponašanju između desipramina i nortriptilina, kao i sličnost između imipramina i amitriptilina, što se može objasniti strukturom ovih jedinjenja (**Slika 1**). Desipramin i nortriptilin sadrže sekundarnu amino grupu na kraju ugljovodoničnog niza, dok imipramin i amitriptilin sadrže tercijarnu amino grupu. Pored toga, desipramin i imipramin pripadaju klasi dibenzazepina, dok nortriptilin i amitriptilin pripadaju klasi dibenzocikloheptadiena. Prisustvo sekundarne ili tercijarne amino grupe u većoj meri doprinosi ponašanju ovih jedinjenja u ispitivanim sistemima od strukture tricikličnog sistema.

IV EKSPERIMENTALNI DEO

IV.1 Reagensi

Za pripremu svih rastvora korišćena je voda HPLC stepena čistoće. Sve korišćene supstance bile su p.a. stepena čistoće: desipramin-hidrohlorid ($\geq 98\%$ (TLC), powder, Sigma–Aldrich); nortriptilin-hidrohlorid (Tokyo Chemical Industry co, LDT); imipramin-hidrohlorid ($\geq 99\%$ (TLC), powder, Sigma–Aldrich i Alfa Aesar); amitriptilin-hidrohlorid ($\geq 98\%$ (TLC), powder, Sigma–Aldrich); natrijum-dihidrogenfosfat dihidrat (Merck); natrijum-hidrogenfosfat dihidrat (Alkaloid AD Skopje); natrijum-hlorid (Sigma–Aldrich); fosforna kiselina (Fisher Chemical); natrijum-hidroksid ($\geq 98\%$, small beads, Fluka i $\geq 98\%$, pellets, Honeywell Fluka).

Titrisol[®] ampula ($c(\text{NaOH})=1$ mol/L, Merck) korišćena je za pripremu rastvora natrijum-hidroksida, koji je zatim standardizovan pomoću kalijum-hidrogenftalata (p.a. stepen čistoće, Merck). Titrisol[®] ampula ($c(\text{HCl})=1$ mol/L, Merck) korišćena je za pripremu rastvora hlorovodonične kiseline, koji je zatim standardizovan pomoću standardnog rastvora natrijum-hidroksida.

IV.2 Merenje pH vrednosti, kalibracija i standardizacija elektrode

Sve pH vrednosti merene su na titratoru Crison pH–Burette 24 2S sa automatskom biretom, pomoću mikroelektroda Crison 50 29 i Hach 52 09. Mikroelektrode su kalibrisane Crison-ovim/Hach-ovim puferima pH 4,01; 7,00 i 9,21.

Standardizacija elektroda (prevođenje iz pH ($-\log \alpha(\text{H}^+)$) u p_{cH} ($-\log[\text{H}^+]$) skalu) urađena je pomoću Avdeef – Butcher jednačine [3, 95]. Četiri parametara (α , k_{S} , j_{H} i j_{OH}) koji figurišu u ovoj jednačini određeni su obradom podataka titracije hlorovodonične kiseline natrijum-hidroksidom u prisustvu pozadinskog elektrolita (NaCl).

Primer standardizacije Hach 52 09 mikroelektrode

Urađene su 4 probe. U bočicu je odmereno 4,000 mL 0,15 M NaCl i 0,090 mL 0,9397 M rastvora HCl. Titracija je vršena standardnim rastvorom NaOH (0,9065 M) na 25 ± 1 ° C u atmosferi argona. pH Vrednosti na početku titracija iznosile su 1,61 – 1,65 a pH vrednost na kraju bila je 12,20. Obradom podataka pomoću Avdeef – Butcher jednačine dobijene su sledeće srednje vrednosti četiri parametara: $\alpha=0,048$; $k_{\text{S}}=1,0040$; $j_{\text{H}}=-5,1$ i $j_{\text{OH}}=-3,3$.

IV.3 Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti desipramina

Pripremljeno je pet setova suspenzija za određivanje rastvorljivosti desipramina na 25 ± 1 °C [7]. U svim setovima, vreme uspostavljanja ravnoteže bilo je 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije). Faze su razdvojene centrifugiranjem ili filtracijom. Ukoliko je za razdvajanje faza korišćena filtracija, navedena je vrsta membrane i vrsta filtera. Svi ostali eksperimentalni parametri opisani su u okviru svakog seta.

IV.3.1 Setovi 1 i 2 (titracije od visoke ka niskoj pH vrednosti)

Suspenzija desipramin-hidrohlorida u fosfatnom puferu (pH 11,61 – 11,62) pripremljena je dodavanjem 39,5 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,34 – 4,37) i 10,5 mL standardnog rastvora 1,0074 M NaOH u čašu koja sadrži tačno odmerene mase DsHCl (0,41170 g (set 1) i 0,41220 g (set 2)) [7]. Suspenzija je, zatim, podeljena u više bočica odmeravanjem alikvota od po 2,000 mL. Suspenzija je intenzivno mešana tokom odmeravanja alikvota da bi odnos mase i zapremine u svim uzorcima bio jednak. Izmerena je početna pH vrednost svakog uzorka (pH 11,27 – 11,62). Nakon toga, pH vrednosti uzoraka su podešene na pH vrednosti u opsegu 4,42 – 11,55 pomoću standardnih rastvora 0,9896 M HCl i 1,0074 M NaOH. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabelama 25.** i **26.** Vrednost pH_{fin} odnosi se na pH vrednost suspenzije izmerene nakon 6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije, pre razdvajanja faza. U uzorcima pri $\text{pH} < 4,42$ nije bilo čvrste faze, stoga ti uzorci nisu prikazani. Faze su razdvojene upotrebom hidrofobnih PTFE filtera (veličina pora 0,22 μm). Prvih 5 kapi supernatanta je uvek odbacivano zbog moguće adsorpcije supstance iz rastvora na membrani.

Tabela 25. Set 1 (titracija od visoke ka niskoj pH) – podaci za pripremu uzoraka desipramina^a [7]

uzorak	$\text{pH}_{\text{poč}}$	$V_{\text{HCl}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{NaOH}} (\mu\text{L})$	pH_{fin}
1	11,27	410,0	–	4,42
2	11,52	350,0	–	6,00
3	11,60	320,0	–	6,51
4	11,55	205,0	–	7,39
5	11,48	194,0	5,0	7,97
6	11,33	210,0	40,0	8,55
7	11,49	180,0	5,0	8,72
8	11,56	143,0	–	9,46
9	11,50	130,0	10,0	9,81
10	11,52	130,0	–	10,10
11	11,50	100,0	–	10,62
12	11,60	50,0	–	11,26
13	11,56	–	–	11,55

^a $c_{\text{HCl}} = 0,9896 \text{ M}$; $c_{\text{NaOH}} = 1,0074 \text{ M}$

Tabela 26. Set 2 (titracija od visoke ka niskoj pH) – podaci za pripremu uzoraka desipramina^a [7]

uzorak	pH _{poč}	V _{HCl} (μL)	V _{NaOH} (μL)	pH _{fin}
1	11,51	400,0	–	4,78
2	11,58	401,0	20,0	5,36
3	11,60	360,0	–	6,03
4	11,59	300,0	–	6,58
5	11,56	200,0	–	7,50
6	11,45	170,0	–	7,78
7	11,62	180,0	20,0	8,12
8	11,54	163,0	20,0	8,47
9	11,48	130,0	–	9,71
10	11,61	125,0	–	10,06
11	11,51	100,0	–	10,56
12	11,57	50,0	–	11,02
13	11,55	–	–	11,34

^a c_{HCl} = 0,9896 M; c_{NaOH} = 1,0074 M

IV.3.2 Set 3 (titracije od niske ka visokoj pH vrednosti)

Dodavanjem 14,0 mL 0,15 M NaH₂PO₄ (pH 4,45) i 1,000 mL standardnog rastvora 0,9896 M HCl u čašu koja sadrži 0,34370 g DsHCl, pripremljen je rastvor desipramin-hidrohlorida u fosfatnom puferu (pH 1,90; nije nastala suspenzija) [7]. Automatskom pipetom su odmereni alikvoti od po 1,000 mL početnog rastvora i preneti u bočice. Početna pH vrednost uzoraka bila je u opsegu 1,86 – 1,94. Nakon toga, standardni rastvori 1,0074 M NaOH i 0,9896 M HCl korišćeni su za podešavanje pH vrednosti uzoraka. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 27**. U uzorcima pri pH < 3,99 nije bilo čvrste faze, stoga ti uzorci nisu prikazani u tabeli.

Tabela 27. Set 3 (titracija od niske ka visokoj pH) – podaci za pripremu uzoraka desipramina^a [7]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL)	V _{HCl} (μL)	pH _{fin}
1	1,86	80,0	–	3,99
2	1,87	100,0	–	4,73
3	1,89	150,0	50,0	5,19
4	1,88	120,0	–	6,04
5	1,88	150,0	–	6,69
6	1,92	180,0	–	7,14
7	1,94	200,0	–	7,79
8	1,91	220,0	–	9,64
9	1,91	280,0	–	10,08
10	1,89	325,0	–	11,00
11	1,91	370,0	–	11,47

^a c_{HCl} = 0,9896 M; c_{NaOH} = 1,0074 M

IV.3.3 Set 4

Suspencije desipramin-hidrohlorida u fosfatnom puferu pripremljene su odmeravanjem 0,900 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,34) u bočice koje sadrže 0,08650 – 0,08730 g DsHCl [7]. Za podešavanje pH vrednosti uzorka korišćeni su sledeći standardni rastvori: 1,0048 M H_3PO_4 (uzorak 1); 1,0048 M H_3PO_4 i 1,0215 M NaOH (uzorak 2) i 1,0032 M HCl (uzorak 3). Detaljni podaci za pripremu uzoraka prikazani su u **Tabeli 28**. Faze u uzorku 3 razdvojene su filtracijom kroz hidrofobne PTFE filtere (veličina pora 0,22 μm).

Tabela 28. Set 4 – podaci za pripremu uzoraka desipramina^a [7]

uzorak	$V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$ (mL)	m_{DsHCl} (g)	V_{NaOH} (μL)	$V_{\text{H}_3\text{PO}_4}$ (μL)	V_{HCl} (μL)	pH _{fin}
1	0,900	0,08660	–	40,0	–	2,42
2	0,900	0,08650	10,0	13,0	–	3,59
3	0,900	0,08730	–	–	50,0	2,02

^a $c_{\text{HCl}}=1,0032$ M; $c_{\text{NaOH}}=1,0215$ M; $c_{\text{H}_3\text{PO}_4}=1,0048$ M

IV.3.4 Set 5

Suspencije desipramin-hidrohlorida u natrijum-hloridu pripremljene su dodavanjem 1,000 mL 0,15 M NaCl u bočice koje sadrže 0,04745 – 0,11205 g DsHCl [7]. Pomoću standardnih rastvora 1,0215 M NaOH i 1,0211 M HCl podešene su pH vrednosti uzoraka. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 29**.

Tabela 29. Set 5 – podaci za pripremu uzoraka desipramina^a [7]

uzorak	m_{DsHCl} (g)	V_{NaOH} (μL)	V_{HCl} (μL)	pH _{fin}
1	0,10955	53,0	100,0	1,31
2	0,11205	–	4,0	2,38
3	0,09140	23,0	25,0	3,02
4	0,05300	–	–	4,93
5	0,04745	5,0	–	7,59
6	0,05475	130,0	–	8,98
7	0,05120	170,0	–	10,04

^a $c_{\text{HCl}}=1,0211$ M; $c_{\text{NaOH}}=1,0215$ M

IV.4 Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrstog stanja u suspenzijama desipramina

IV.4.1. Set 6

Odmeravanjem 2,000 mL 0,15 M NaH_2PO_4 u 5 bočica koje sadrže tačno odmerenu masu DsHCl (0,13580 – 0,17615 g), pripremljene su suspenzije desipramin-hidrohlorida u fosfatnom puferu [7]. Standardni rastvori 1,1047 M NaOH i 1,0211 M HCl korišćeni su za podešavanje pH vrednosti. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 30**. Vreme uspostavljanja ravnoteže je bilo 24 sata (6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije) na temperaturi od 25 ± 1 °C. Faze su razdvojene centrifugiranjem. Talozi su isprani hladnom vodom HPLC čistoće i ostavljeni da se suše na vazduhu tri dana.

Tabela 30. Set 6 – podaci za pripremu uzoraka desipramina za karakterizaciju čvrstog stanja^a [7]

uzorak	$V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$ (mL)	m_{DsHCl} (g)	$\text{pH}_{\text{poč}}$	V_{HCl} (μL)	V_{NaOH} (μL)	pH_{fin}	$[\text{DsHCl}]_{\text{tot}}$ (M)	$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]_{\text{tot}}$ (M)	$[\text{Cl}]_{\text{tot}}$ (M)
OM11	2,000	0,17615	3,92	100,0	–	2,09	0,28	0,14	0,33
OM12	2,000	0,16315	3,90	–	20,0	3,86	0,27	0,15	0,27
OM13	2,000	0,15035	3,78	–	270,0	7,41	0,22	0,13	0,22
OM14	2,000	0,13580	3,80	–	300,0	9,57	0,19	0,13	0,19
OM15	2,000	0,13950	3,84	–	600,0	11,10	0,18	0,12	0,18

^a $c_{\text{HCl}}=1,0211$ M; $c_{\text{NaOH}}=1,1047$ M

IV.4.2. Set 7

Uzorak OM21 je pripremljen u 2 koraka [7]:

a) Priprema desipramin baze: dodato je 2,00 mL 0,15 M NaH_2PO_4 i 650,0 μL 1,1047 M NaOH u bočicu, koja sadrži 0,12485 g DsHCl . Vreme mešanja bilo je 6 sati, a vreme sedimentacije 62 sata, na temperaturi od 25 ± 1 °C. Ulje (desipramin baza) nije prešlo u kristalni oblik, iako je vreme sedimentacije produženo. pH vrednost suspenzije bila je 11,11. Faze su razdvojene centrifugiranjem. Desipramin baza osušena je na vazduhu.

b) U drugom koraku odmereno je 900,0 μL 0,15 M NaH_2PO_4 i 400,0 μL 1,0048 M H_3PO_4 u bočicu, koja sadrži 0,09605 g ulja, dobijenog u koraku 1. Bočica je zatvorena i mešana 6 sati na temperaturi od 25 ± 1 °C. Nakon toga, mešanje je isključeno i uzorak je ostavljen još 18 sati na temperaturi od 25 ± 1 °C. Faze su razdvojene centrifugiranjem. Talog je ispran vodom HPLC čistoće i ostavljen da se osuši.

Uzorak OM22 pripremljen je dodavanjem 2,000 mL 0,15 M NaH_2PO_4 u bočicu koja sadrži 0,14995 g DsHCl [7]. Uzorci OM23 – OM25 napravljeni su odmeravanjem vode HPLC čistoće u bočice koje sadrže tačno odmerene mase DsHCl (0,12455 – 0,24980 g) i $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04945 – 0,07000 g). pH vrednosti su podešene korišćenjem standardnog rastvora 1,1047 M NaOH . Vreme uspostavljanja ravnoteže u uzorcima OM22 – OM25 je bilo 24 sata (6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije). Faze su razdvojene centrifugiranjem. Talozi su isprani hladnom vodom HPLC čistoće i ostavljeni da se suše na vazduhu tri dana.

Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka OM21 – OM25 prikazani su u **Tabeli 31**.

Tabela 31. Set 7 – podaci za pripremu uzoraka desipramina za karakterizaciju čvrstog stanja [7]

uzorak	$V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$ (mL)	$m_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}$ (g)	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)	m_{Ds} (g)	m_{DsHCl} (g)	$\text{pH}_{\text{poč}}$	$V_{\text{H}_3\text{PO}_4}$ (μL) ^b	V_{NaOH} (μL) ^b	pH_{fin}	$[\text{DS}]_{\text{tot}}$ (M) ^c	$[\text{PO}_4]_{\text{tot}}$ (M) ^c	$[\text{Cl}]_{\text{tot}}$ (M) ^c
OM21 ^a	0,900	–	–	0,09605	–	5,99	400,0	–	2,13	0,28	0,41	–
OM22	2,000	–	–	–	0,14995	3,87	–	–	3,84	0,25	0,15	0,25
OM23	–	0,07000	3,000	–	0,24980	3,95	–	410,0	8,03	0,24	0,13	0,24
OM24	–	0,06995	3,000	–	0,24985	3,96	–	450,0	9,44	0,24	0,13	0,24
OM25	–	0,04945	2,000	–	0,12455	4,00	–	680,0	11,10	0,15	0,12	0,15

^a Talog dobijen iz suspenzije koja sadrži samo fosfate. ^b $C_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 1,0048 \text{ M}$ i $C_{\text{NaOH}} = 1,1047 \text{ M}$.

IV.5 Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti nortriptilina

Setovi 1 – 11 pripremljeni su za određivanje rastvorljivosti nortriptilina [10, 11, 13]. Vreme uspostavljanja ravnoteže bilo je 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije) u svim setovima, dok su faze razdvojene centrifugiranjem. Detaljne eksperimentalne procedure opisane su u okviru svakog seta.

IV.5.1 Setovi 1 – 4 (titracije iz kisele ka baznoj sredini)

Početne suspenzije nortriptilina (pH 1,66 – 2,17) pripremljene su dodavanjem 0,15 M NaH_2PO_4 i 0,9397 M HCl u bočicu koja sadrži tačno odmerenu masu $\text{NorHCl}_{(s)}$ [10, 11, 13]. Detaljni podaci za pripremu početnih suspenzija u setovima 1 – 4 prikazani su u **Tabeli 32**.

Tabela 32. Titracije iz kisele ka baznoj sredini – podaci za pripremu početnih suspenzija nortriptilina [10, 11, 13]

Set	m_{NorHCl} (g)	$V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$ (mL) ^a	V_{HCl} (mL) ^b	pH
1	0,18045	2,700	0,300	1,66
2	0,59770	9,40	0,600	2,03
3	0,60050	9,40	0,600	2,10
4	0,30040	4,70	0,300	2,17

^a 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,32 – 4,34); ^b $C_{\text{HCl}} = 0,9397 \text{ M}$

Uz intenzivno mešanje suspenzije, odmereni su alikvoti od po 1,000 mL i raspoređeni u više bočica. Izmerena je pH vrednost svake suspenzije. Zatim je pH vrednost podešena dodavanjem različitih zapremina standardnih rastvora 0,9065 M NaOH i 0,9397 M HCl. Detaljani podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabelama 33 – 36**.

Tabela 33. Set 1 (titracija iz kisele ka baznoj sredini) – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina [10, 11, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	1,66	–	1,76
2	1,66	150,0	5,36
3	1,66	320,0	8,78

^a c_{NaOH}=0,9065 M**Tabela 34.** Set 2 (titracija iz kisele ka baznoj sredini) – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina [10, 11, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{HCl} (μL) ^a	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	1,99	–	–	2,12
2	2,08	–	50,0	3,00
3	2,03	10,0	70,0	3,94
4	2,06	–	110,0	5,17
5	2,03	–	150,0	5,69
6	2,04	–	200,0	7,61
7	2,04	–	300,0	8,82
8	2,02	–	415,0	9,30

^a c_{HCl}=0,9397 M; c_{NaOH}=0,9065 M**Tabela 35.** Set 3 (titracija iz kisele ka baznoj sredini) – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina [10, 11, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	2,10	–	2,14
2	2,09	50,0	3,11
3	2,09	60,0	4,16
4	2,08	110,0	5,19
5	2,05	160,0	5,94
6	2,07	200,0	7,41
7	2,08	300,0	8,92
8	2,03	420,0	9,77
9	2,03	440,0	10,34
10	2,01	500,0	11,35

^a c_{NaOH}=0,9065 M**Table 36.** Set 4 (titracija iz kisele ka baznoj sredini) – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina [10, 11, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	2,11	50,0	2,99
2	2,15	190,0	6,81
3	2,15	520,0	11,33
4	2,16	580,0	12,04
5	2,22	685,0	12,41

^a c_{NaOH}=0,9065 M

IV.5.2 Setovi 5 – 7 (titracije iz bazne ka kiseljoj sredini)

Početne suspenzije nortriptilina (pH 11,24 – 12,57) u setovima 5 i 6 pripremljene su dodavanjem 0,15 M NaH₂PO₄ i 0,9065 M NaOH u bočice koje sadrže NorHCl [10, 11, 13]. Početna suspenzija nortriptilina (pH 11,12) u setu 7 pripremljena je na isti način, osim što je korišćen 0,15 M Na₂HPO₄ (umesto NaH₂PO₄). Detaljni podaci za pripremu početnih suspenzija u setovima 5 – 7 prikazani su u **Tabeli 37**.

Tabela 37. Titracije iz bazne ka kiseljoj sredini – podaci za pripremu početnih suspenzija nortriptilina [10, 11, 13]

Set	m_{NorHCl} (g)	$V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$ (mL) ^a	$V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$ (mL) ^b	V_{NaOH} (mL) ^c	pH
5	0,60085	4,00	–	6,00	12,57
6	0,60080	7,00	–	3,00	11,24
7	0,60020	–	8,00	2,05	11,12

^a0,15 M NaH₂PO₄ (pH 4,32 – 4,34); ^b0,15 M Na₂HPO₄ (pH 8,97); ^c $c_{\text{NaOH}}=0,9065$ M

Početna suspenzija je, u alikvotima od 1,000 mL, podeljena u više bočica. Izmeren je pH u svakoj bočici. Zatim su dodavanjem standardnih rastvora 0,9397 M HCl i 0,9065 M NaOH podešene pH vrednosti svakog uzorka. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka u setovima 5 – 7 prikazani su u **Tabelama 38 – 40**.

Tabela 38. Set 5 (titracija iz bazne ka kiseljoj sredini) – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina [10, 11, 13]

vial	pH _{poč}	V_{NaOH} (μL) ^a	V_{HCl} (μL) ^a	pH _{fin}
1	12,39	–	600,0	1,47
2	12,42	16,0	450,0	2,39
3	12,54	–	400,0	4,92
4	12,47	–	400,0	5,94
5	12,24	–	325,0	7,04
6	11,94	–	300,0	8,12
7	12,11	–	300,0	8,79
8	11,97	–	260,0	10,11
9	12,43	–	185,0	11,86
10	12,26	–	–	12,49

^a $c_{\text{HCl}}=0,9397$ M; $c_{\text{NaOH}}=0,9065$ M

Tabela 39. Set 6 (titracija iz bazne ka kiseloj sredini) – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina [10, 11, 13]

vial	pH _{poč}	V _{HCl} (μL) ^a	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	11,26	500,0	205,0	1,48
2	11,30	240,0	–	2,40
3	11,21	300,0	–	3,23
4	11,16	225,0	–	4,49
5	11,34	150,0	–	6,26
6	11,30	135,0	–	7,83
7	11,49	50,0	–	8,93
8	11,39	35,0	50,0	9,45
9	11,10	–	–	10,10
10	11,35	–	20,0	10,75

^a c_{HCl}=0,9397 M; c_{NaOH}=0,9065 M

Tabela 40. Set 7 (titracija iz bazne ka kiseloj sredini) – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina [10, 11, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	V _{HCl} (μL) ^a	pH _{fin}
1	11,12	–	300,0	2,25
2	11,24	15,0	230,0	3,21
3	11,00	20,0	240,0	5,19
4	10,86	–	200,0	6,32
5	11,10	–	120,0	8,77
6	10,88	–	10,0	9,44
7	11,04	10,0	–	10,03
8	10,59	100,0	–	11,48

^a c_{HCl}=0,9397 M; c_{NaOH}=0,9065 M

IV.5.3 Setovi 8 i 9 (suspenzije nortriptilina koje sadrže hloride, a ne sadrže fosfate)

Dodavanjem 0,15 M NaCl u bočicu koja sadrži nortriptilin-hidrohlorid, pripremljene su početne suspenzije nortriptilina [10, 11, 13]. Detaljni podaci za pripremu početnih suspenzija prikazani su u **Tabeli 41.**

Tabela 41. Podaci za pripremu početnih suspenzija koje sadrže hloride, a ne sadrže fosfate [10, 11, 13]

Set	m _{NorHCl} (g)	V _{NaCl} (mL) ^a	pH
8	0,59980	10,00	5,62
9	0,60030	10,00	5,90

^a 0,15 M NaCl

Uz intenzivno mešanje suspenzije, odmereni su alikvoti od 1,000 mL u raspoređeni u više bočica. Izmerena je pH vrednost svakog uzorka i dodatno podešena korišćenjem standardnih rastvora 0,9065 M NaOH i 0,9397 M HCl. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka u setovima 8 i 9 prikazani su u **Tabelama 42. i 43.**

Tabela 42. Set 8 – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina u sustemu koji sadrži hloride, a ne fosfate [10, 11, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	V _{HCl} (μL) ^a	pH _{fin}
1	5,73	35,0	50,0	1,80
2	5,67	–	3,0	2,45
3	6,37	5,0	5,0	6,68
4	6,13	–	–	7,12
5	5,56	5,0	–	7,77
6	5,72	24,0	18,0	7,80
7	7,52	273,0	160,0	7,93
8	6,91	174,0	–	8,49
9	6,48	205,0	–	10,64
10	5,82	140,0	100,0	12,05

^a c_{HCl}=0,9397 M; c_{NaOH}=0,9065 M

Tabela 43. Set 9 – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina u sustemu koji sadrži hloride, a ne fosfate [10, 11, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	V _{HCl} (μL) ^a	pH _{fin}
1	5,87	–	10,0	2,00
2	5,92	4,0	5,0	3,05
3	6,11	9,3	9,7	3,56
4	5,74	0,7	0,7	4,19
5	6,13	–	–	5,81
6	6,03	3,0	1,7	7,58
7	6,32	101,0	–	7,73
8	5,94	187,0	3,0	9,06
9	6,01	250,0	2,7	11,13
10	6,07	300,0	–	12,37

^a c_{HCl}=0,9397 M; c_{NaOH}=0,9065 M

IV.5.4 Setovi 10 i 11 (suspenzije nortriptilina koje sadrže fosfate, a ne sadrže hloride)

Uzorci u setovima 10 i 11 su pripremljeni u dva koraka [10, 13]. Prvi korak je priprema nortriptilin baze, a drugi priprema suspenzija nortriptilina koje sadrže fosfate, a ne sadrže hloride.

Set 10

I) Priprema nortriptilin baze: u bočicu koja sadrži 0,60050 g NorHCl, dodato je 1,80 mL 0,9065 M NaOH. Suspenzija je intenzivno mešana 10 min, a izmerena pH vrednost iznosila je 12,64. Celokupna količina dodatog NorHCl prevedena je u Nor bazu, koja se izdvojila u obliku ulja. Ulje je potrebno isprati destilovanom vodom, kako bi se uklonili preostali hloridi. Prvo je dodato 0,500 mL vode HPLC čistoće u bočicu koja sadrži ulje. Suspenzija je mešana 10 minuta, zatim centrifugirana. U bočicu je dodato 0,200 mL vode HPLC čistoće, bočica je mučkana, a faze su razdvojene centrifugiranjem. Ovakva procedura je ponovljena dva puta.

II) Priprema uzoraka: u bočicu koja sadrži 0,50105 g Nor (ulje dobijeno u prvom koraku) i 0,65020 g NaH₂PO₄×2H₂O, odmereno je 10,00 mL vode HPLC čistoće. Izmerena pH vrednost

suspenzije je 4,93. Uz intenzivno mešanje suspenzije, odmereni su alikvoti od 1,000 mL i raspoređeni u više bočica. Pomoću standardnih rastvora 2,00 M H_3PO_4 i 0,9065 M NaOH, podešena je pH vrednost uzoraka. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 44**.

Tabela 44. Set 10 – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina u sistemu koji sadrži fosfate, a ne hloride [10, 13]

uzorak	pH _{poč}	V _{H₃PO₄} (μL)	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	4,98	185,0	–	1,82
2	4,98	113,0	–	2,11
3	4,92	64,0	–	2,54
4	4,97	37,0	–	3,12
5	4,96	29,0	–	3,65
6	4,96	26,0	1,0	4,02
7	4,88	6,0	–	4,92
8	5,00	–	–	4,98
9	4,90	–	45,0	5,74
10	4,98	–	75,0	6,07

^a $c_{\text{NaOH}}=0,9065 \text{ M}$

Set 11

I) Priprema Nor baze: dodato je 2,40 mL standardnog rastvora 0,9065 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,60075 g NorHCl. Suspenzija je mešana 10 minuta, izmerena pH vrednost je bila 12,48. Celokupna količina dodatog NorHCl prevedena je u Nor bazu (ulje). U bočicu je dodato 0,200 mL vode HPLC čistoće. Suspenzija je vorteksirana i centrifugirana. Procedura ispiranja ponovljena je tri puta.

II) Priprema uzoraka nortriptilina: 1 mL vode HPLC čistoće dodat je u bočice koje sadrže 0,05020 – 0,05250 g Nor (ulje dobijeno u koraku I) i 0,06435 – 0,06685 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Standardni rastvor 1,00 M H_3PO_4 korišćen je za podešavanje pH vrednosti. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 45**.

Tabela 45. Set 11 – podaci za pripremu uzoraka nortriptilina u sustemu koji sadrži fosfate, a ne hloride [10, 13]

uzorak	m_{ulje} (g)	$m_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}$ (g)	V _{vode} (mL)	pH _{poč}	V _{H₃PO₄} (μL)	pH _{fin}
1	0,05120	0,06595	1,000	6,02	680,0	1,82
2	0,05135	0,06515	1,000	5,99	501,0	1,99
3	0,05250	0,06525	1,000	5,98	305,0	2,40
4	0,05020	0,06550	1,000	5,99	200,0	2,87
5	0,05130	0,06685	1,000	5,98	155,0	3,60
6	0,05185	0,06555	1,000	6,11	45,0	5,36
7	0,05155	0,06435	1,000	6,04	–	5,93

^a $c_{\text{NaOH}}=0,9065 \text{ M}$

IV.6 Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrstog stanja u suspenzijama nortriptilina

Za karakterizaciju čvrstog stanja u suspenzijama nortriptilina pripremljeno je 9 uzoraka (set 12) [13]. Vreme uspostavljanja ravnoteže bilo je 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije) na 25 ± 1 °C, osim kod uzorka 3 (72 sata mešanja + 18 sati sedimentacije). Uzorci su sušeni na vazduhu 3 – 4 dana, osim uzorka 3 i 7 (12 sati u vakuumu). Uzorci 1 – 3 su suspenzije nortriptilina koje sadrže hloride. Uzorci 4 – 6 su suspenzije nortriptilina koje sadrže fosfate. Prvo je pripremljena nortriptilin baza (korak 1), a onda uzorak (korak 2). Uzorci 7 – 9 su suspenzije nortriptilina koje sadrže hloride i fosfate.

Uzorak 1: Odmereno je 2,000 mL 0,15 M NaCl u bočicu koja sadrži 0,3 g NorHCl_(s) (pH~5,3). Zatim je u bočicu dodat 0,100 mL 1 M HCl. **pH** Vrednost suspenzije je iznosila **2,3**. Faze su razdvojene filtracijom.

Uzorak 2: U bočicu koja sadrži 0,13090 g NorHCl_(s) i 0,01785 g NaCl_(s), dodato je 2,000 mL vode HPLC čistoće (pH 6,28). Nakon uspostavljanja ravnoteže, **pH** vrednost je bila **6,33**. Faze su razdvojene centrifugiranjem.

Uzorak 3: U bočicu je odmereno 0,3 g NorHCl_(s) i 2,000 mL vode HPLC čistoće. U suspenziju je, zatim, dodato 2,000 mL 1 M NaOH. **pH** vrednost je iznosila **13**. Faze su razdvojene filtriranjem.

Uzorak 4

1) Odmereno je 5,000 mL vode HPLC čistoće u bočicu koja sadrži 0,3 g NorHCl_(s) (pH 5,79). Nakon toga, dodato je 2,700 mL rastvora 1 M NaOH (pH 12). Tečna faza je odbačena, a izolovano ulje je isprano vodom.

2) U bočicu koja sadrži Nor ulje, dodato je 4,000 mL rastvora 0,15 M NaH₂PO₄ (pH 7,15). **pH** Vrednost suspenzije je podešena na **2,0** korišćenjem 2 M H₃PO₄. Faze su razdvojene filtracijom.

Uzorak 5

1) U bočicu je odmereno 0,22750 g NorHCl_(s), 2,000 mL vode HPLC čistoće i 0,790 mL 0,9065 M NaOH (pH=12,25). Faze su razdvojene centrifugiranjem. Tečna faza je odbačena. Ulje je isprano 2 puta dodavanjem 0,200 mL vode HPLC čistoće, nakon čega je suspenzija mučkana i centrifugirana.

2) Odmereno je 1,500 ml vode HPLC čistoće i 0,190 mL 2,00 M H₃PO₄ u bočicu koja sadrži ulje. Nakon uspostavljanja ravnoteže **pH** vrednost je iznosila **4,46**. Faze su razdvojene centrifugiranjem.

Uzorak 6

1) U bočicu koja sadrži 0,15780 g NorHCl_(s), odmereno je 2,000 mL vode HPLC čistoće i 0,790 mL 0,9065 M NaOH (pH=12,45). Centrifugiranje je korišćeno za razdvajanje faza. Ulje je isprano na isti način kao u uzorku 5.

2) U bočicu sa izolovanim uljem, dodato je 1,500 mL vode HPLC čistoće, 0,037 mL 2,00 M H₃PO₄ i 0,007 mL 0,9065 M NaOH. Posle 24 h, **pH** vrednost suspenzije je bila **8,23**. Faze su razdvojene centrifugiranjem.

Uzorak 7: Odmereno je 0,3 g NorHCl_(s) i 4,700 mL 0,15 M NaH₂PO₄ (pH 4,7). U istu bočicu je, zatim, dodato 0,300 mL 1 M HCl. **pH** vrednost suspenzije iznosila je **2,9**. Faze su razdvojene filtracijom.

Uzorak 8: U bočicu je odmereno 0,3 g $\text{NorHCl}_{(s)}$ i 4,700 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (**pH 4,7**). Faze su razdvojene na isti način kao u uzorku 7.

Uzorak 9: Pomešano je 0,3 g $\text{NorHCl}_{(s)}$ i 4,700 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,7). Nakon toga, dodato je 0,200 mL 1 M NaOH. **pH** vrednost suspenzije iznosila je **6,38**. Filtracija je korišćena za razdvajanje faza.

IV.7 Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti imipramina

Pripremljeno je šest setova za određivanje rastvorljivosti imipramina na 25 ± 1 °C [9, 12]. Vreme uspostavljanja ravnoteže bilo je 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije) u svim setovima. Faze su razdvojene centrifugiranjem.

IV.7.1 Setovi 1 i 2 (titracije od niske ka visokoj pH vrednosti)

Početni kiseli rastvori imipramin-hidrohlorida u fosfatnom puferu pripremljeni su dodavanjem 0,15 M rastvora NaH_2PO_4 i standardnog rastvora 0,9725 M HCl u bočice koje sadrže tačno odmerenu masu imipramin-hidrohlorida (nije bilo čvrste faze u sistemu) [9]. Izmerena pH vrednost početnih rastvora bila je 1,90 – 2,09. Detaljni podaci za pripremu početnih rastvora prikazani su u **Tabeli 46**.

Tabela 46. Titracije od niske ka visokoj pH – podaci za pripremu početnih rastvora imipramin-hidrohlorida [9]

Set	m_{ImHCl} (g)	$V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$ (mL) ^a	V_{HCl} (mL) ^b	pH
1	0,56500	9,500	0,500	2,09
2	0,54640	7,500	0,500	1,90

^a 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,36 – 4,45); ^b $c_{\text{HCl}}=0,9725$ M

Početni rastvor imipramin-hidrohlorida podeljen je u više bočica, odmeravanjem alikvota od 1,000 mL u svaku bočicu. Dodavanjem standardnog rastvora 0,9083 M NaOH (i 0,9725 M HCl gde je bilo potrebe) podešene su pH vrednosti svih uzoraka u opsegu 3,82 – 11,43. U **Tabelama 47. i 48.** prikazani su detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka.

Tabela 47. Set 1 (titracija od niske ka visokoj pH) – podaci za pripremu suspenzija imipramina koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	2,11	70,0	4,06
2	2,12	100,0	4,99
3	2,27	140,0	5,81
4	2,13	180,0	6,85
5	2,12	250,0	8,09
6	2,10	260,0	8,11
7	2,10	320,0	8,15
8	2,10	350,0	8,17
9	2,12	450,0	10,77
10	2,10	500,0	11,43

^a c_{NaOH}=0,9083 M**Tabela 48.** Set 2 (titracija od niske ka visokoj pH) – podaci za pripremu suspenzija imipramina koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	V _{HCl} (μL) ^b	pH _{fin}
1	1,87	90,0	–	3,82
2	1,82	132,0	–	4,51
3	1,83	150,0	–	5,74
4	1,81	200,0	5,0	6,90
5	1,83	230,0	–	7,78
6	1,84	290,0	–	8,26
7	1,87	469,0	–	8,87
8	1,84	450,0	–	10,35

^a c_{NaOH}=0,9083 M; ^b c_{HCl}=0,9725 M

IV.7.2 Set 3

Uzorci u setu 3 pripremljeni su odmeravanjem 0,15 M NaCl u bočice koje sadrže tačno odmerene mase imipramin-hidrohlorida [9]. Izmerena pH vrednost pripremljenih rastvora iznosila je 5,49 – 6,40. Suspenzije imipramina u baznoj sredini pripremljene su dodavanjem standardnog rastvora 0,9083 M NaOH (i 0,9725 M HCl gde je bilo potrebe). Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 49**.

Tabela 49. Set 3 – podaci za pripremu suspenzija imipramina koje sadrže hloride [9]

uzorak	m _{ImHCl} (g)	V _{NaCl} (mL) ^a	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^b	V _{HCl} (μL) ^c	pH _{fin}
1	0,05055	1,000	5,49	100,0	–	7,37
2	0,05720	1,000	6,14	190,0	–	8,11
3	0,05010	1,000	6,34	174,0	3,0	8,98
4	0,05215	1,000	6,15	225,0	37,0	10,16
5	0,05010	1,000	6,40	200,0	–	11,87

^a 0,15 M NaCl; ^b c_{NaOH}=0,9083 M; ^c c_{HCl}=0,9725 M

IV.7.3 Set 4 (titracija od više ka nižoj pH vrednosti)

Imipramin u obliku baze pripremljen je dodavanjem 3,000 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,70665 g ImHCl_(s) [12]. Izmerena pH suspenzije iznosila je 12,41. U Im (ulje) dodato je 200,0 µL vode HPLC čistoće. Bočica je mučkana, zatim je suspenzija centrifugirana. Proces ispiranja taloga ponovljen je tri puta.

Početna suspenzija pripremljena je dodavanjem 4,500 mL 3,00 M NaH₂PO₄ (pH 3,75) i 3,500 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,52865 g Im (ulja). Ukupna koncentracija fosfata u suspenziji je iznosila 1,69 M. Izmerena pH suspenzije je bila 6,13. Odmeravanjem alikvota od po 1,000 mL, početna suspenzija je podeljena u više bočica. Pomoću standardnog rastvora 1,0729 M HCl podešene su pH vrednosti uzoraka. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 50**.

Tabela 50. Set 4 – podaci za pripremu suspenzija imipramina koje sadrže fosfate i hloride [12]

uzorak	pH _{poč}	V _{HCl} (µL) ^a	pH _{fin}
1	6,33	700,0	2,67
2	6,24	600,0	3,46
3	6,29	570,0	4,13
4	6,18	500,0	4,85
5	6,30	300,0	5,40
6	6,25	100,0	5,95
7	6,28	–	6,27

^a c_{HCl}=1,0729 M

IV.7.4 Set 5

Odmeravanjem 3,000 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,84240 g ImHCl_(s), pripremljena je imipramin baza (ulje) [12]. Izmerena pH suspenzije iznosila je 11,53. U Im (ulje) dodato je 200,0 µL vode HPLC čistoće. Bočica je mučkana, zatim je suspenzija centrifugirana. Proces ispiranja taloga ponovljen je tri puta.

Početna suspenzija imipramina pripremljena je dodatkom 9,000 mL 1,70 M NaCl (pH 5,42) u bočicu koja sadrži 0,63735 g Im ulja. Izmerena pH suspenzije je bila 7,93. Početna suspenzija je podeljena u više bočica odmeravanjem alikvota od 1,000 mL. Korišćenjem standardnog rastvora 1,0729 M HCl (i 1,0621 M NaOH gde je bilo potrebe) podešene su pH vrednosti uzoraka. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 51**.

Tabela 51. Set 5 – podaci za pripremu suspenzija imipramina koje sadrže hloride [12]

uzorak	pH _{poč}	V _{HCl} (μL) ^a	V _{NaOH} (μL) ^b	pH _{fin}
1	8,00	125,0	55,0	2,62
2	7,98	120,0	10,0	2,94
3	8,07	115,0	40,0	5,30
4	8,16	135,0	7,0	6,27
5	7,91	110,0	–	7,50
6	7,96	135,0	–	7,71
7	7,93	–	–	8,00

^a c_{HCl}=1,0729 M; ^b c_{NaOH}=1,0621 M

IV.7.5 Set 6

Dodavanjem 3,000 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,84015 g ImHCl_(s), pripremljena je imipramin baza (ulje) [12]. Izmerena pH suspenzije iznosila je 12,75. U Im (ulje) dodato je 200,0 μL vode HPLC čistoće. Bočica je mučkana, zatim je suspenzija centrifugirana. Proces ispiranja taloga ponovljen je tri puta.

Početna suspenzija imipramina pripremljena je dodatkom 7,000 mL 2,00 M NaH₂PO₄ (pH 4,03) i 3,000 mL 2,00 M H₃PO₄ u bočicu koja sadrži 0,69140 g Im (ulja). Izmerena pH suspenzije je bila 2,24. Početna suspenzija je podeljena u više bočica odmeravanjem alikvota od 1,000 mL. Pomoću standardnog rastvora 1,0621 M NaOH podešene su pH vrednosti uzoraka. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazi su u **Tabeli 52**.

Tabela 52. Set 6 – podaci za pripremu suspenzija imipramina koje sadrže fosfate [12]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	2,27	–	2,50
2	2,32	60,0	2,63
3	2,29	200,0	2,96
4	2,28	300,0	3,66
5	2,35	350,0	4,55
6	2,31	500,0	5,37
7	2,36	800,0	5,88
8	2,36	700,0	6,16
9	2,46	1000,0	6,37

^a c_{NaOH}=1,0621 M

IV.8 Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrste faze u suspenzijama imipramina

U cilju karakterizacije čvrste faze u suspenzijama imipramina, pripremljeno je osam uzoraka (set 7): uzorci OM1 – OM4 (suspenzije imipramina koje sadrže i hloride i fosfate), uzorci OM5 i OM6 (suspenzije imipramina koje sadrže hloride), uzorci OM7 i OM8 (suspenzije imipramina koje sadrže fosfate). Vreme uspostavljanja ravnoteže bilo je 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije) na 25 ± 1 °C u svim uzorcima. Faze su razdvojene centrifugiranjem.

OM1 (pH 2,67), beo talog: u bočicu je odmereno 0,19710 g Im (ulje), 1,000 mL 2,00 M NaH_2PO_4 i 0,700 mL 1,0729 M HCl.

OM2 (pH 6,21), beo talog: odmereno je 1,800 mL 0,15 M Na_2HPO_4 i 0,05 mL 1,0729 M HCl u bočicu koja sadrži 0,23665 g ImHCl.

OM3 (pH 8,28), beo talog: u bočicu koja sadrži 0,24775 g ImHCl, dodato je 1,300 mL 0,15 M Na_2HPO_4 i 0,200 mL 1,0621 M NaOH.

OM4 (pH 12,55), ulje: u bočicu je odmereno 0,25900 g ImHCl. Nakon toga, dodato je 1,000 mL 0,15 M Na_2HPO_4 i 1,000 mL 1,0621 M NaOH.

OM5 (pH 1,40), žućkast talog: u bočicu je odmereno 0,18580 g Im (ulje), 1,400 mL 1,70 M NaCl, 0,800 mL 1,0729 M HCl i 0,200 mL 1,0621 M NaOH.

OM6 (pH 12,87), ulje: u bočicu koja sadrži 0,27410 g ImHCl, dodato je 0,700 mL 0,15 M NaCl i 1,300 mL 1,0621 M NaOH.

OM7 (pH 1,26), beo talog: odmereno je 0,500 mL 2,00 M NaH_2PO_4 i 2,900 mL 2,00 M H_3PO_4 u bočicu koja sadrži 0,18065 g Im (ulje).

OM8 (pH 5,20), beo talog: u bočicu je odmereno 0,13005 g Im (ulje), a zatim 1,500 mL 2,00 M NaH_2PO_4 i 0,100 mL 2,00 M H_3PO_4 .

Priprema imipramin ulja, koje je korišćeno za pripremu uzoraka OM1, OM5, OM7 i OM8: u ependorf je odmereno 0,86385 g $\text{ImHCl}_{(s)}$ i 3,000 mL 1,0621 M NaOH. Izmerena pH vrednost suspenzije iznosila je 12,89. Suspenzija je centrifugirana. Ulje imipramina je isprano dva puta sa po 300 μL vode HPLC čistoće.

IV.9 Priprema uzoraka za određivanje rastvorljivosti amitriptilina

Setovi 1 – 6 pripremljeni su za određivanje rastvorljivosti amitriptilina [9, 12]. Vreme uspostavljanja ravnoteže bilo je 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije). Faze su razdvojene centrifugiranjem.

IV.9.1 Set 1 (titracija od niže ka višoj pH)

Osnovni rastvor amitriptilina napravljen je odmeravanjem 8,500 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,54) i 0,500 mL 0,9725 M HCl u bočicu koja sadrži 0,54490 g $\text{AmHCl}_{(s)}$ (nije bilo čvrste faze u sistemu) [9]. Izmerena pH vrednost suspenzije je bila 2,12. Osnovni rastvor amitriptilina je podeljen u više bočica odmeravanjem alikvota od po 1,000 mL. Standardni rastvor 0,9083 M NaOH korišćen je za podešavanje pH u opsegu 5,89 – 11,07. Detaljni podaci za pripremu suspenzija prikazani su u **Tabeli 53**. Nisu prikazani uzorci čija je $\text{pH} < 7,66$ (zato što nije bilo čvrste faze u sistemu) i uzorci čija je $\text{pH} > 8,07$ (kvantifikacija nije bila moguća).

Tabela 53. Set 1 (titracija od niže ka višoj pH) – podaci za pripremu suspenzija amitriptilina koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	$\text{pH}_{\text{poč}}$	$V_{\text{NaOH}} (\mu\text{L})^a$	pH_{fin}
1	2,17	390,0	7,66
2	2,19	400,0	8,07

^a $c_{\text{NaOH}} = 0,9083 \text{ M}$

IV.9.2 Set 2 (titracija od više ka nižoj pH)

Odmeravanjem 2,000 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,34) i 1,300 mL 0,9083 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,24565 g $\text{AmHCl}_{(s)}$, pripremljena je početna suspenzija amitriptilina [9]. Izmerena pH vrednost je 11,04. Suspenzija je podeljena u 3 bočice odmeravanjem alikvota od 1,100 mL. pH Vrednost uzoraka je podešena pomoću standardnog rastvora 0,9725 M HCl. Detaljni podaci za pripremu pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 54**. Uzorak čija je pH vrednost 6,83 nije dat u tabeli zbog nedostatka čvrste faze u sistemu.

Tabela 54. Set 2 (titracija od više ka nižoj pH) – podaci za pripremu suspenzija amitriptilina koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	$\text{pH}_{\text{poč}}$	$V_{\text{HCl}} (\mu\text{L})^a$	pH_{fin}
1	11,12	100,0	7,10
2	10,87	–	10,44

^a $c_{\text{HCl}} = 0,9725 \text{ M}$

IV.9.3 Set 3

Suspenzije amitriptilina pripremljene su odmeravanjem 0,15 M NaCl u bočice koje sadrže tačno odmerenu masu $\text{AmHCl}_{(s)}$ [9]. Izmerene su pH vrednosti svih suspenzija, a zatim podešene pomoću standardnog rastvora 0,9083 M NaOH (i 0,9725 M HCl gde je bilo potrebno). Detaljni podaci za pripremu suspenzija amitriptilina prikazani su u **Tabeli 55**. Priprema uzoraka čije su pH

8,20 i 9,41 nije prikazana zato što u ovim uzorcima nije bila moguća kvantifikacija (signal ispod granice detekcije).

Tabela 55. Set 3 – podaci za pripremu suspenzija amitriptilina koje sadrže hloride [9]

uzorak	$m_{\text{AmHCl}} \text{ (g)}$	$V_{\text{NaCl}} \text{ (mL)}^{\text{a}}$	$\text{pH}_{\text{poč}}$	$V_{\text{NaOH}} \text{ (}\mu\text{L)}^{\text{b}}$	$V_{\text{HCl}} \text{ (}\mu\text{L)}^{\text{c}}$	pH_{fin}
1	0,06085	1,000	4,50	100,0	–	6,93
2	0,06130	1,000	4,69	217,0	4,0	7,46
3	0,06135	1,000	5,21	300,0	–	12,38

^a0,15 M NaCl; ^b $c_{\text{NaOH}}=0,9083 \text{ M}$; ^c $c_{\text{HCl}}=0,9725 \text{ M}$

IV.9.4 Set 4

Amitriptilin baza pripremljena je odmeravanjem 3,000 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,70195 g AmHCl_(s) [12]. Izmerena pH suspenzije je 12,60. Vodeni rastvor je uklonjen iz bočice (uljasti talog je bio lakši od vode, za razliku od imipramin ulja i nortriptilin ulja). Amitriptilin baza (ulje) isprana je 3 puta sa po 200 μL vode HPLC čistoće. Suspenzija je svaki put mučkana i centrifugirana.

Početna suspenzija amitriptilina pripremljena je odmeravanjem 3,000 mL 3,00 M NaH₂PO₄ i 4,000 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,44385 g Am (ulje). Izmerena pH suspenzije je bila 6,84. Suspenzija je podijeljena u više bočica odmeravanjem alikvota od 1,000 mL. pH Vrednost suspenzija podešavana je pomoću standardnog rastvora 1,0621 M NaOH. Detaljni podaci za pripremu suspenzija prikazani su u **Tabeli 56**. Nisu prikazani uzorci čija je pH > 7,54 (kvantifikacija nije bila moguća, signal ispod granice detekcije).

Tabela 56. Set 4 – podaci za pripremu suspenzija amitriptilina koje sadrže fosfate [12]

uzorak	$\text{pH}_{\text{poč}}$	$V_{\text{NaOH}} \text{ (}\mu\text{L)}^{\text{a}}$	pH_{fin}
1	6,88	–	6,90
2	6,84	300,0	7,54

^a $c_{\text{NaOH}}=1,0621 \text{ M}$

IV.9.5 Set 5

Odmeravanjem 3,000 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,70800 g AmHCl_(s), napravljena je amitriptilin baza [12]. Amitriptilin baza isprana je vodom HPLC čistoće (3 puta po 200 μL). Suspenzija je svaki put mučkana, a zatim centrifugirana.

Početna suspenzija amitriptilina (pH 5,12) pripremljena je odmeravanjem 0,49380 g amitriptilin baze i 7,000 mL 2,00 M NaH₂PO₄ (pH 3,73). Nakon toga, podijeljena je u više bočica i pH vrednosti su podešene, dodavanjem rastvora 1,0621 M NaOH, u opsegu 5,14 – 7,09. Nije bilo čvrste faze u suspenzijama čija je pH < 7,09, tako da priprema ovih uzoraka nije prikazana u **Tabeli 57**.

Tabela 57. Set 5 – podaci za pripremu suspenzija amitriptilina koja sadrži samo fosfate [12]

uzorak	pH _{poč}	V _{NaOH} (μL) ^a	pH _{fin}
1	5,16	1150,0	7,09

^a c_{NaOH}=1,0621 M

IV.9.6 Set 6

Amitriptilin baza pripremljena je odmeravanjem 2,500 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,51150 g AmHCl_(s) [12]. Izmerena pH suspenzije je 12,28. Amitriptilin baza (ulje) isprana je 3 puta sa po 200 μL vode HPLC čistoće. Suspenzija je svaki put mučkana i centrifugirana.

Odmeravanjem 4,000 mL 0,51 M Na₂HPO₄ u bočicu koja sadrži 0,31615 g Am (baze), pripremljena je početna suspenzija amitriptilina (pH 10,91), koja je zatim podeljena u 4 bočice u alikvotima od po 1,000 mL. Pomoću standardnog rastvora 2,00 M H₃PO₄ podešene su pH vrednosti suspenzija. Detaljni podaci za pripremu suspenzija u kojima je bilo čvrste faze, prikazani su u **Tabeli 58**.

Tabela 58. Set 6 – podaci za pripremu suspenzija amitriptilina koje sadrže fosfate [12]

uzorak	pH _{poč}	V _{H3PO4} (μL)	pH _{fin}
1	10,96	100,0	6,96
2	10,81	70,0	7,52

IV.10 Priprema uzoraka za karakterizaciju čvrste faze u suspenzijama amitriptilina

Pripremljena su četiri uzorka amitriptilina za karakterizaciju čvrste faze u suspenzijama amitriptilina koje sadrže samo hloride (OM10 i OM11), kao i u suspenzijama koje sadrže i fosfate i hloride (OM12 i OM13). U svim uzorcima, vreme uspostavljanja ravnoteže bilo je 24 sata (6 sati mešanja i 18 sati sedimentacije), a faze su razdvojene centrifugiranjem.

OM10 (pH 7,37), ulje: u bočicu je odmereno 0,31015 g AmHCl, 0,500 mL 0,15 M NaCl, 1,000 mL 1,0621 M NaOH i 0,200 mL 1,0729 M HCl.

OM11 (pH 12,50), ulje: odmereno je 0,500 mL 0,15 M NaCl i 1,200 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,32055 g AmHCl.

OM12 (pH 7,24), ulje: u bočicu koja sadrži 0,30580 g AmHCl, dodato je 1,000 mL 0,15 M Na₂HPO₄ i 0,650 mL 1,0621 M NaOH.

OM13 (pH 11,11), ulje: u bočicu je odmereno 0,30465 g AmHCl, a zatim 1,000 mL 0,15 M Na₂HPO₄ i 1,000 mL 1,0621 M NaOH.

IV.11 Određivanje koncentracije HPLC–UV/VIS metodom

Koncentracija desipramina u rastvoru određena je pomoću HPLC–UV/VIS sistema Agilent Technologies 1260 Infinity LC System [7]. Kao stacionarne faze korišćene su kolone Zorbax Eclipse XDB-C18 50×4,6 mm, veličina čestica 1,8 μm (setovi 1 – 4) i Hypersil Gold 50×3 mm, veličina čestica 5 μm (setovi 5 – 7), a kao mobilna 1% sirćetna kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 0,500 mL/min. Uzorci su analizirani gradientnom elucijom (**Tabela 59**). Injektovana zapremina uzorka je bila 10 μL , temperatura kolone 25 °C, a talasna dužina detekcije 250 nm.

Tabela 59. Program gradijentne elucije za određivanje koncentracije desipramina HPLC–UV/VIS metodom [7]

<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)
0,00	70	30
5,00	0	100
6,00	0	100
7,00	70	30

Koncentracija nortriptilina u rastvoru određena je na isti način kao i koncentracija desipramina [10, 11, 13]. Kao stacionarna faza korišćena je samo Hypersil Gold 50×3 mm, veličina čestica 5 μm . Injektovana zapremina uzorka bila je 2 μL .

Koncentracija imipramina (setovi 1 – 3) i amitriptilina (setovi 1 – 3) u rastvoru određena je pod istim uslovima kao koncentracija desipramina, osim što je kao stacionarna faza korišćena samo Hypersil Gold 50×3 mm, veličina čestica 5 μm [9]. Talasna dužina detekcije imipramina bila je 252 nm.

Koncentracija imipramina (setovi 4 – 6) i amitriptilina (setovi 4 – 6) u rastvoru određena je pomoću HPLC–UV/VIS sistema Agilent Technologies 1260 Infinity LC System [12]. Kao stacionarna faza korišćena je Purospher® STAR RP-18 endapped column, veličina čestica 3 μm , a kao mobilna 1% sirćetna kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 1,000 mL/min. Uzorci su analizirani gradientnom elucijom (**Tabela 60**). Injektovana zapremina uzorka je bila 5 μL , temperatura kolone 25 °C, a talasna dužina detekcije 250 nm (amitriptilin) i 252 nm (imipramin).

Tabela 60. Program gradijentne elucije za određivanje koncentracije imipramina i amitriptilina HPLC–UV/VIS metodom [12]

<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)
0,00	70	30
3,00	0	100
3,50	0	100
4,00	70	30

IV.12 Određivanje kritične micelarne koncentracije

Sva konduktometrijska merenja izvedena su na konduktometru Conductivity Pocket Meter Cond 330i (WTW, Germany) opremljenom standardnom konduktometrijskom ćelijom TetraCon 325 (WTW, Germany) [12]. Konduktometrijska ćelija (K – konstanta konduktometrijske ćelije) je kalibrisana N.I.S.T. standardnim rastvorom za kalibraciju, čija je specifična provodljivost $1413 \mu\text{S}/\text{cm}$ na $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Konduktometrijske titracije su izvedene dodavanjem tačno odmerene mase imipramin-hidrohlorida ili amitriptilin-hidrohlorida u $8,000 \text{ mL}$ rastvora NaCl ili NaH_2PO_4 . Posle svakog dodatka izmerena je specifična provodljivost rastvora na $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Detaljan opis eksperimenata prikazan je u **Tabelama 61 – 68**.

Tabela 61. Određivanje KMK ImHCl u 0,01 M NaH₂PO₄ (767 μS/cm; pH 4,87) na 25,0±0,1 °C. $K=0,480 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=4,81$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=4,60$ [12]

m_{Im} (g) dodata	m_{Im} (g) ukupna	c_{Im} (mM)	k (mS/cm)
0,00745	0,00745	2,939	1,018
0,00735	0,01480	5,838	1,283
0,00730	0,02210	8,718	1,524
0,00725	0,02935	11,578	1,765
0,00835	0,03770	14,872	2,02
0,00745	0,04515	17,811	2,28
0,00765	0,05280	20,829	2,53
0,00745	0,06025	23,768	2,92
0,00740	0,06765	26,687	3,14
0,00725	0,07490	29,547	3,37
0,00775	0,08265	32,604	3,63
0,00735	0,09000	35,504	3,85
0,00735	0,09735	38,403	4,08
0,00730	0,10465	41,283	4,31
0,00745	0,11210	44,222	4,53
0,00735	0,11945	47,121	4,73
0,00745	0,12690	50,060	4,95
0,00760	0,13450	53,058	5,17
0,00740	0,14190	55,977	5,34
0,00740	0,14930	58,896	5,53
0,00740	0,15670	61,816	5,71
0,00750	0,16420	64,774	5,88
0,00710	0,17130	67,575	6,07
0,00755	0,17885	70,553	6,22
0,00730	0,18615	73,433	6,37
0,00745	0,19360	76,372	6,55
0,00760	0,20120	79,370	6,71
0,00740	0,20860	82,289	6,89
0,00750	0,21610	85,248	7,04
0,00765	0,22375	88,266	7,20
0,00730	0,23105	91,145	7,35
0,00740	0,23845	94,065	7,53
0,00760	0,24605	97,063	7,68
0,00765	0,25370	100,080	7,85
0,00765	0,26135	103,098	8,02

Tabela 62. Određivanje KMK ImHCl u 0,10 M NaH₂PO₄ (6,35 mS/cm; pH 4,38) na 25,0±0,1 °C. $K=0,479 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=4,45$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=4,33$ [12]

m_{Im} (g) dodata	m_{Im} (g) ukupna	c_{Im} (mM)	k (mS/cm)
0,00470	0,00470	1,854	6,47
0,00585	0,01055	4,162	6,67
0,00485	0,01540	6,075	6,82
0,00575	0,02115	8,343	6,98
0,00580	0,02695	10,631	7,14
0,00595	0,03290	12,979	7,32
0,00555	0,03845	15,168	7,48
0,00545	0,04390	17,318	7,65
0,00470	0,04860	19,172	7,79
0,00500	0,05360	21,144	7,95
0,00570	0,05930	23,393	8,11
0,00550	0,06480	25,563	8,27
0,00575	0,07055	27,831	8,43
0,00460	0,07515	29,645	8,57
0,00585	0,08100	31,953	8,76
0,00485	0,08585	33,866	8,88
0,00545	0,09130	36,016	9,04
0,00470	0,09600	37,870	9,16
0,00525	0,10125	39,941	9,32
0,00575	0,10700	42,210	9,46
0,00530	0,11230	44,301	9,61
0,00585	0,11815	46,608	9,76
0,00430	0,12245	48,305	9,87
0,00515	0,12760	50,336	10,01
0,00495	0,13255	52,289	10,12

Tabela 63. Određivanje KMK ImHCl u 0,01 M NaCl (1201 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH 6,58) na $25,0 \pm 0,1$ °C.
 $K=0,478 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=5,98$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=5,17$ [12]

$m_{\text{Im}} \text{ (g)}$ dodata	$m_{\text{Im}} \text{ (g)}$ ukupna	c_{Im} (mM)	k (mS/cm)
0,00765	0,00765	3,018	1,457
0,00760	0,01525	6,016	1,709
0,00745	0,02270	8,955	1,957
0,00725	0,02995	11,815	2,19
0,00745	0,03740	14,754	2,45
0,00710	0,04450	17,555	2,69
0,00760	0,05210	20,553	2,92
0,00730	0,05940	23,432	3,18
0,00745	0,06685	26,371	3,42
0,00740	0,07425	29,290	3,64
0,00750	0,08175	32,249	3,90
0,00735	0,08910	35,148	4,12
0,00715	0,09625	37,969	4,36
0,00760	0,10385	40,967	4,62
0,00750	0,11135	43,926	4,82
0,00760	0,11895	46,924	5,02
0,00745	0,12640	49,863	5,23
0,00720	0,13360	52,703	5,41
0,00745	0,14105	55,642	5,60
0,00720	0,14825	58,482	5,79
0,00725	0,15550	61,342	5,95
0,00750	0,16300	64,301	6,14
0,00745	0,17045	67,240	6,30
0,00725	0,17770	70,100	6,46
0,00740	0,18510	73,019	6,60
0,00735	0,19245	75,918	6,78
0,00715	0,19960	78,739	6,94
0,00735	0,20695	81,638	7,08
0,00740	0,21435	84,558	7,27
0,00750	0,22185	87,516	7,40
0,00720	0,22905	90,356	7,56
0,00710	0,23615	93,157	7,74
0,00730	0,24345	96,037	7,89
0,00745	0,25090	98,976	8,04
0,00730	0,25820	101,856	8,21

Tabela 64. Određivanje KMK ImHCl u $0,15 \text{ M NaCl}$ ($15,69 \text{ mS/cm}$; $\text{pH } 6,17$) na $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. $K=0,482 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=5,92$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=5,17$ [12]

$m_{\text{Im}} \text{ (g)}$ dodata	$m_{\text{Im}} \text{ (g)}$ ukupna	c_{Im} (mM)	k (mS/cm)
0,00750	0,00750	2,959	15,81
0,00760	0,01510	5,957	16,06
0,00740	0,02250	8,876	16,26
0,00755	0,03005	11,854	16,45
0,00730	0,03735	14,734	16,66
0,00735	0,04470	17,633	16,88
0,00750	0,05220	20,592	17,07
0,00745	0,05965	23,531	17,23
0,00770	0,06735	26,568	17,46
0,00705	0,07440	29,350	17,62
0,00715	0,08155	32,170	17,77
0,00735	0,08890	35,070	17,89
0,00815	0,09705	38,285	18,13
0,00750	0,10455	41,243	18,25
0,00720	0,11175	44,084	18,41
0,00760	0,11935	47,082	18,51
0,00725	0,12660	49,942	18,65
0,00765	0,13425	52,959	18,80
0,00780	0,14205	56,036	18,96
0,00735	0,14940	58,936	19,13
0,00710	0,15650	61,737	19,29
0,00745	0,16395	64,676	19,44
0,00755	0,17150	67,654	19,56
0,00740	0,17890	70,573	19,71
0,00780	0,18670	73,650	19,86
0,00770	0,19440	76,688	20,0
0,00775	0,20215	79,745	20,2
0,00765	0,20980	82,763	20,3
0,00740	0,21720	85,682	20,5
0,00715	0,22435	88,502	20,6
0,00775	0,23210	91,560	20,7
0,00715	0,23925	94,380	20,9
0,00725	0,24650	97,240	21,0
0,00750	0,25400	100,199	21,2

Tabela 65. Određivanje KMK AmHCl u 0,01 M NaH₂PO₄ (757 μS/cm; pH 4,80) na 25,0±0,1 °C. $K=0,479 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=4,84$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=4,57$ [12]

$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ dodata	$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ ukupna	c_{Am} (mM)	k (mS/cm)
0,00495	0,00495	1,971	0,93
0,00525	0,01020	4,062	1,11
0,00465	0,01485	5,914	1,26
0,00485	0,01970	7,846	1,44
0,00500	0,02470	9,837	1,61
0,00520	0,02990	11,908	1,78
0,00465	0,03455	13,760	1,96
0,00470	0,03925	15,632	2,12
0,00470	0,04395	17,504	2,27
0,00545	0,04940	19,674	2,48
0,00490	0,05430	21,626	2,65
0,00530	0,05960	23,737	2,82
0,00505	0,06465	25,748	3,01
0,00490	0,06955	27,699	3,16
0,00480	0,07435	29,611	3,32
0,00545	0,07980	31,782	3,51
0,00450	0,08430	33,574	3,65
0,00555	0,08985	35,784	3,81
0,00510	0,09495	37,815	3,98
0,00550	0,10045	40,006	4,14
0,00525	0,10570	42,097	4,28
0,00515	0,11085	44,148	4,43
0,00570	0,11655	46,418	4,60
0,00510	0,12165	48,449	4,72
0,00450	0,12615	50,241	4,84
0,00495	0,13110	52,213	4,96
0,00505	0,13615	54,224	5,09
0,00525	0,14140	56,315	5,22
0,00535	0,14675	58,446	5,35
0,00540	0,15215	60,596	5,46
0,00540	0,15755	62,747	5,62
0,00570	0,16325	65,017	5,74
0,00540	0,16865	67,168	5,86
0,00555	0,17420	69,378	6,01
0,00510	0,17930	71,409	6,11

Tabela 66. Određivanje KMK AmHCl u 0,15 M NaH₂PO₄ (9,22 mS/cm; pH 4,37) na 25,0±0,1 °C. $K=0,481 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=4,35$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=4,29$ [12]

$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ dodata	$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ ukupna	c_{Am} (mM)	k (mS/cm)
0,00325	0,00325	1,294	9,28
0,00415	0,00740	2,947	9,43
0,00435	0,01175	4,680	9,56
0,00335	0,01510	6,014	9,66
0,00445	0,01955	7,786	9,80
0,00465	0,02420	9,638	9,94
0,00470	0,02890	11,510	10,08
0,00460	0,03350	13,342	10,21
0,00470	0,03820	15,214	10,36
0,00465	0,04285	17,066	10,49
0,00360	0,04645	18,499	10,61
0,00460	0,05105	20,332	10,75
0,00365	0,05470	21,785	10,87
0,00370	0,05840	23,259	10,98
0,00320	0,06160	24,533	11,08
0,00375	0,06535	26,027	11,21
0,00365	0,06900	27,480	11,34
0,00405	0,07305	29,093	11,44
0,00410	0,07715	30,726	11,56
0,00460	0,08175	32,558	11,64
0,00460	0,08635	34,390	11,79
0,00390	0,09025	35,944	11,91
0,00330	0,09355	37,258	12,01
0,00415	0,09770	38,911	12,12
0,00480	0,10250	40,822	12,25
0,00350	0,10600	42,216	12,34
0,00385	0,10985	43,750	12,45
0,00355	0,11340	45,163	12,56
0,00470	0,11810	47,035	12,68
0,00350	0,12160	48,429	12,76
0,00425	0,12585	50,122	12,88
0,00450	0,13035	51,914	12,99
0,00450	0,13485	53,706	13,09
0,00385	0,13870	55,240	13,19
0,00345	0,14215	56,614	13,28

Tabela 67. Određivanje KMK AmHCl u 0,01 M NaCl (1091 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH 6,70) na $25,0 \pm 0,1$ °C. $K=0,440 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=6,13$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=5,52$ [12]

$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ dodata	$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ ukupna	c_{Am} (mM)	k (mS/cm)
0,00660	0,00660	2,629	1,30
0,00545	0,01205	4,799	1,48
0,00540	0,01745	6,950	1,66
0,00580	0,02325	9,260	1,84
0,00570	0,02895	11,530	2,04
0,00615	0,03510	13,979	2,23
0,00590	0,04100	16,329	2,41
0,00605	0,04705	18,738	2,63
0,00575	0,05280	21,028	2,80
0,00550	0,05830	23,219	2,96
0,00540	0,06370	25,370	3,14
0,00615	0,06985	27,819	3,31
0,00500	0,07485	29,810	3,46
0,00580	0,08065	32,120	3,68
0,00560	0,08625	34,351	3,83
0,00600	0,09225	36,740	3,98
0,00620	0,09845	39,209	4,14
0,00515	0,10360	41,260	4,29
0,00525	0,10885	43,351	4,41
0,00540	0,11425	45,502	4,55
0,00505	0,11930	47,513	4,65
0,00555	0,12485	49,724	4,76
0,00500	0,12985	51,715	4,91
0,00505	0,13490	53,726	5,01
0,00585	0,14075	56,056	5,15
0,00555	0,14630	58,266	5,30
0,00570	0,15200	60,537	5,41

Tabela 68. Određivanje KMK AmHCl u 0,15 M NaCl (15,57 mS/cm; pH 5,56) na $25,0 \pm 0,1$ °C. $K=0,480 \text{ cm}^{-1}$. $V_{\text{rastvora}}=8,000 \text{ mL}$. $\text{pH}_{\text{na početku}}=5,61$; $\text{pH}_{\text{na kraju}}=4,50$ [12]

$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ dodata	$m_{\text{Am}} \text{ (g)}$ ukupna	c_{Am} (mM)	k (mS/cm)
0,00545	0,00545	2,171	15,69
0,00500	0,01045	4,162	15,88
0,00525	0,01570	6,253	16,03
0,00555	0,02125	8,463	16,18
0,00575	0,02700	10,753	16,41
0,00515	0,03215	12,804	16,60
0,00470	0,03685	14,676	16,74
0,00560	0,04245	16,906	16,93
0,00495	0,04740	18,878	17,06
0,00510	0,05250	20,909	17,20
0,00505	0,05755	22,920	17,42
0,00520	0,06275	24,991	17,57
0,00505	0,06780	27,002	17,63
0,00535	0,07315	29,133	17,83
0,00460	0,07775	30,965	17,94
0,00560	0,08335	33,196	18,06
0,00450	0,08785	34,988	18,19
0,00535	0,09320	37,118	18,31
0,00520	0,09840	39,189	18,43
0,00520	0,10360	41,260	18,64
0,00485	0,10845	43,192	18,75
0,00535	0,11380	45,323	18,87
0,00545	0,11925	47,493	19,08
0,00510	0,12435	49,524	19,18
0,00455	0,12890	51,337	19,30
0,00550	0,13440	53,527	19,49
0,00545	0,13985	55,698	19,65
0,00485	0,14470	57,629	19,72
0,00560	0,15030	59,859	19,94
0,00500	0,15530	61,851	20,0
0,00450	0,15980	63,643	20,2
0,00565	0,16545	65,893	20,3
0,00460	0,17005	67,725	20,4

IV.13 Elementalna analiza

Elementalni sastav uzoraka određen je metodom sagorevanja (*combustion analysis*) pomoću instrumenta Vario EL III C,H,N,S/O Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau-Germany) [7 – 11, 13].

IV.14 Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijski analizator TGA Q50 thermogravimetric analyzer (TA instruments, DE, USA) korišćen je za termogravimetrijsku analizu [7, 13]. Čvrsta faza, dobijena iz suspenzija desipramina (4 – 6 mg) i nortriptilina, zagrevana je u atmosferi azota brzinom zagrevanja 10 °C/min u opsegu 25 – 300/400 °C. Analiza uzoraka imipramina (5,54 – 12,00 mg) i amitriptilina (6,29 – 11,86 mg) urađena je na isti način.

Ekvilibracija uzoraka čvrste faze dobijene iz suspenzija desipramina (OM13 i OM23), na 25 °C i relativnoj vlažnosti vazduha 50% RH je praćena pomoću instrumenta VTI SA dynamic vapor sorption instrument (TA Instruments, Wilmington, DE) [7].

IV.15 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

DSC termogrami snimljeni su pomoću Q200 diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra (TA instruments, DE, USA), za koji je karakterističan heat flux dizajn [7, 13]. Podaci su analizirani pomoću Universal Analysis software verzija 2000 (TA instruments).

U Tzero tas za uzorak sa rupicom za uklanjanje isparljivih supstanci odmereno je 5 – 10 mg uzoraka desipramina, koji su prvo ekvilibrisani na 5 °C tokom 5 min, a zatim zagrevani do 225 °C, brzinom zagrevanja 10 °C/min [7]. Prilikom primene ciklusa zagrevanje – hlađenje – zagrevanje, uzorci desipramina pripremljeni su na sličan način. Zagrevanje, hlađenje i ponovno zagrevanje sprovedeno je brzinama 10, 30 i 3 °C/min, redom. Kako bi se olakšala moguća rekristalizacija materijala, ponovno zagrevanje izvedeno je manjom brzinom.

Uzorci nortriptilina (5 – 10 mg) u Tzero tasu sa rupicom zagrevani su do temperature 250 °C brzinom zagrevanja 5 °C/min sa amplitudom modulacije (oscilacije) $\pm 1,0$ °C i periodom modulacije od 1 min (*modulated* DSC) [13]. Na isti način, analizirani su uzorci imipramina (8,6 – 9,8 mg) i amitriptilina (8,2 – 10,1 mg).

IV.16 Difrakcija X-zraka praha

Difraktometar Shimadzu 6000 (Kyoto, Japan) korišćen je za sminanje PXRD difraktograma uzoraka desipramina i nortriptilina na sobnoj temperaturi pomoću izvora monohromatskog zračenja Cu K α (40 kV i 30 mA) i brzine skeniranja 2 °/min u 2 θ opsegu 10 – 60°. Čvrsta faza naneta je kao tanak sloj unutar staklenog držača uzorka [7, 13]. PXRD difraktogrami uzoraka imipramina snimljeni su na isti način.

IV.17 Praćenje degradacije u suspenzijama imipramina i amitriptilina

IV.17.1 Praćenje degradacije imipramina i amitriptilina pomoću UV/VIS spektrofotometrije

Apsorpcioni spektri snimljeni su na spektrofotometru GBC Cintra 6 (GBC Dandenong, Australia) u kvarcnoj kiveti širine 1 cm i zapremine 0,600 mL. Brzina skeniranja bila je 1000 nm/min a širina slita na monohromatoru 1,5 nm.

Suspenzija imipramina koja sadrži hloride i fosfate pH 10,57

Suspenzija imipramina pripravljena je odmeravanjem 0,900 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,37) i 0,350 mL 0,9274 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,05280 g $\text{ImHCl}_{(s)}$. Izmerena pH vrednost suspenzije iznosila je 10,54. U toku 6 sati mešanja, uzimani su alikvoti za snimanje apsorpcionih spektara. Da ne bi došlo do promene „koncentracije“ suspenzije, alikvot rastvora je nakon snimanja spektra vraćen u suspenziju. Posle 4 sata mešanja alikvoti nisu vraćani u suspenziju, zbog neophodnog razblaživanja. Pre uzimanja svakog alikvota suspenzija je bila centrifugirana, kako bi se dobio bistar rastvor potreban za uspešno snimanje apsorpcionih spektara. Posle 18 sati sedimentacije, pH vrednost suspenzije je bila 10,57.

Suspenzija amitriptilina koja sadrži hloride i fosfate pH 10,98

Dodavanjem 0,900 mL 0,15 M NaH_2PO_4 (pH 4,37) i 0,400 mL 0,9274 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,05760 g $\text{AmHCl}_{(s)}$, napravljena je suspenzija amitriptilina početne pH vrednosti 11,01. Vreme mešanja suspenzije je bilo 6 sati, a vreme sedimentacije 18 sati. Alikvoti za snimanje apsorpcionih spektara uzimani su na isti način kao prilikom praćenja degradacije imipramina.

IV.17.2. Praćenje degradacije imipramina u rastvoru pomoću HPLC–UV/VIS metode

Odmeravanjem 1160,0 μL 0,15 M rastvora NaH_2PO_4 različitih pH vrednosti (koje su podešene upotrebom 0,9083 M NaOH i 0,9725 M HCl) u bočice koje sadrže 40,0 μL $1,58 \times 10^{-3}$ M rastvora imipramin-hidrohlorida, pripremljeni su rastvori imipramin-hidrohlorida iste koncentracije ($5,26 \times 10^{-5}$ M) a različitih pH vrednosti (8,45; 9,32; 10,04 i 10,97).

Rastvori imipramin-hidrohlorida u 0,15 M NaCl iste koncentracije ($5,26 \times 10^{-5}$ M) a različitih pH vrednosti (8,49; 9,15; 10,16 i 11,20) pripremljeni su odmeravanjem 40,0 μL $1,58 \times 10^{-3}$ M rastvora imipramin-hidrohlorida i različitih zapremina rastvora 0,15 M NaCl, 0,9083 M NaOH i 0,9725 M HCl.

IV.17.3 Praćenje degradacije amitriptilina u suspenziji pomoću HPLC–UV/VIS metode

Eksperiment 1

Odmeravanjem 1,200 mL 0,15 M Na_2HPO_4 (pH 9,14) i 0,800 mL 1,0621 M NaOH u bočicu koja sadrži 0,13255 g $\text{AmHCl}_{(s)}$, pripremljena je suspenzija amitriptilina koja sadrži hloride i fosfate početne pH vrednosti 12,50. Alikvoti zasićenog rastvora uzeti su posle 3 i posle 19 dana mešanja suspenzije (pH 12,42 – 12,50). Zatim suspenzija je centrifugirana, kako bi se razdvojile faze. Talog je rastvoren dodavanjem 1,000 mL 1,0729 M HCl. Snimljeni su hromatogrami na talasnoj dužini detekcije 250 nm i 3D hromatogrami uzetih alikvota i rastvorenog taloga.

Eksperiment 2

Suspenzija amitriptilina koja sadrži fosfate i hloride pripremljena je odmeravanjem sledećih reagenasa: 0,13280 g $\text{AmHCl}_{(s)}$, 1,200 mL 0,15 M Na_2HPO_4 (pH 9,15) i 0,800 mL 1,0621 M NaOH. Početna pH vrednost suspenzije bila je 12,49. Suspenzija je mešana 6 sati, nakon toga usledila je faza sedimentacije. Posle 1/2/3/7 dana uzeti su alikvoti (100,0 μL) zasićenog rastvora amitriptilina i analizirani pomoću HPLC–UV/VIS metode. Osim hromatograma na talasnoj dužini detekcije 250 nm, snimljeni su i 3D hromatogrami. Pre uzimanja alikvota, izmerene su pH vrednosti suspenzije (pH 12,16 – 12,67) i suspenzija je centrifugirana kako bi se dobio bistar rastvor potreban za snimanje hromatograma. Posle 7 dana, u suspenziju je dodato 0,600 mL 1,0729 M HCl, kako bi se talog rastvorio (pH 6,66). Snimljen je hromatogram na talasnoj dužini detekcije 250 nm i 3D hromatogram ovako pripremljenog uzorka.

V ZAKLJUČAK

Triciklični antidepresivi (TCA) su slabo rastvorljiva, jonizujuća i površinski aktivna jedinjenja, koja imaju široku primenu u terapiji depresije [3, 51]. U literaturi postoje podaci o rastvorljivosti TCA, ali u objavljenim studijama nije analizirana čvrsta faza, niti je dat detaljni prikaz ravnoteža u suspenzijama TCA [4, 19, 39, 52, 53]. Kako bi se dobila kompletna slika o ravnotežama u heterogenim sistemima TCA potrebna je analiza i tečne i čvrste faze. Osim toga, potrebno je voditi računa o faktorima koji utiču na rastvorljivost (pH, temperatura, jonska sila, rastvarač, vreme mešanja, vreme sedimentacije, način razdvajanja faza, sastav i struktura čvrste faze) [1 – 3, 5, 14, 30, 32].

U ovoj doktorskoj disertaciji proučavane su ravnoteže u heterogenim sistemima odabranih tricikličnih antidepresiva (desipramin, nortriptilin, imipramin i amitriptilin) koji sadrže hloride i fosfate, samo hloride ili samo fosfate. Rastvorljivost na 25 ± 1 °C određena je *pH-Ramp shake-flask* metodom, razvijenom tokom izrade ove doktorske disertacije. Koncentracije jedinjenja u tečnoj fazi određene su HPLC–UV/VIS metodom, dok je čvrsta faza analizirana primenom elementalne analize, termogravimetrije, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i/ili difrakcije X-zraka praha. Rezultati su analizirani pomoću programa *pDISOL–XTM*, što je omogućilo izračunavanje odgovarajućih koncentracionih konstanti ravnoteža ($I_{ref}=0,15$ M, 25 °C): sopstvenih rastvorljivosti (S_0), proizvoda rastvorljivosti (K_{sp}), konstanti građenja kompleksa (K) i konstanti agregacije (K_n) (**Tabela 69**). Kritične micelarne koncentracije određene su primenom konduktometrijskih titracija (**Tabela 70**). Degradacija imipramina i amitriptilina u baznoj sredini proučavana je korišćenjem UV/VIS spektrofotometrije i HPLC–UV/VIS metode.

Rastvorljivost desipramina u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride veća je od očekivane na $pH < 4$ i $pH > pH_{max}$ ($pH_{max}=9,5$ u setovima 1 i 2 (titracije iz bazne ka kiseloj sredini); $pH_{max}=9,3$ u setu 3 (titracije iz kisele ka baznoj sredini)) zbog nastajanja kompleksa između desipramina i komponenata fosfatnog pufera: $(DsH)_2H_2PO_4^+$ i $Ds(DsH)HPO_4^-$ [7]. U čvrstoj fazi dolazi do formiranja desipramin-hidrohlorida na $pH < 4$, desipramin-hidrogenfosfata u pH opsegu 4 – 9 i desipramin baze na $pH > 9$. Vreme uspostavljanja ravnoteže od 24 sata (6 sati mešanja + 18 sati sedimentacije) bilo je dovoljno za taloženje 2:1 fosfatne soli desipramina i desipramin baze u hidratizanim kristalnim oblicima. Metodama za karakterizaciju čvrstog stanja pokazano je da, nakon dehidratacije, 2:1 fosfatna so i desipramin baza prelaze u amorfni oblik, što ukazuje na veliki značaj molekula vode u stabilizaciji kristalne strukture ovih jedinjenja. Sa druge strane, desipramin-dihidrogenfosfat ima kristalnu strukturu bez obzira na sadržaj vode.

Nortriptilin pokazuje tendenciju ka građenju kompleksa sa komponentama fosfatnog pufera u baznim suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate ($Nor(NorH)HPO_4^-$) i u vrlo kiselim suspenzijama koje sadrže fosfate ($(NorH)H_3PO_4^+$), što povećava rastvorljivost [13]. Za razliku od suspenzija desipramina, pokazano je da smer titracije (iz kisele ka baznoj ili iz bazne ka kiseloj) ima veliki uticaj na rastvorljivost nortriptilina i na izgled profila rastvorljivosti. Ukoliko je totalna koncentracija fosfata dovoljna, u čvrstoj fazi dolazi do transformacije nortriptilin-hidrohlorida u nortriptilin-hidrogenfosfat, a na višim pH vrednostima do prelaza nortriptilin-hidrogenfosfata u nortriptilin bazu. Odnos totalnih koncentracija hlorida i fosfata određuje na kojim će se pH vrednostima dešavati transformacije u čvrstoj fazi (pH_{max}), a smer titracije širinu pH opsega u kome se prelazi dešavaju ($pH_{max} - pH_{min}$). Pokazano je da nortriptilin baza prelazi iz delimično kristalnog/amorfnog u kristalni oblik tek nakon 72 sata mešanja + 18 sati sedimentacije i da sadržaj vode ne određuje stepen kristalnosti nortriptilin baze – anhidrovana nortriptilin baza takođe ima kristalni karakter.

Tabela 69. Ravnotežne konstante (25°C , $I_{\text{ref}}=0,15\text{ M}$)^a u heterogenim sistemima tricikličnih antidepresiva (B) izračunate pomoću programa $p\text{DISOL-X}^{\text{TM}}$

B	Set/ Uzorak	pS_0	$pK_{\text{sp}}^{\text{BHCl}}$	$pK_{\text{sp}}^{1:1}$	$pK_{\text{sp}}^{2:1}$	$\log K_{241}$	$\log K_{221}$	$\log K_{141}$	$\log K_n$
desipramin ^d	1, 2	3,85	–	–	<u>7,38</u> $\pm 0,01$	–	<u>4,58</u> $\pm 0,10$	–	–
	OM21	–	–	<u>2,55</u>	7,38	–	–	–	–
	3 ^b	3,85	–	–	<u>7,06</u> $\pm 0,03$	–	<u>4,80</u> $\pm 0,10$	–	–
	OM23	–	–	2,55	<u>7,27</u>	–	–	–	–
	4 ^c	–	2,19	2,55	7,06	<u>3,96</u> $\pm 0,02$	–	–	–
5	<u>3,85</u> $\pm 0,04$	<u>2,19</u> $\pm 0,03$	–	–	–	–	–	–	
nortriptilin	1-4	<u>4,24</u> $\pm 0,03$	<u>2,52</u> $\pm 0,03$	–	<u>6,50</u> $\pm 0,03$	–	<u>5,20</u> $\pm 0,07$	–	–
	5	<u>4,24</u> $\pm 0,08$	<u>2,80</u> $\pm 0,03$	–	–	–	<u>5,14</u> $\pm 0,41$	–	–
	6	<u>4,23</u> $\pm 0,09$	<u>2,83</u> $\pm 0,04$	–	<u>7,22</u> $\pm 0,06$	–	<u>5,07</u> $\pm 0,54$	–	–
	7	<u>4,24</u> $\pm 0,06$	<u>2,84</u> $\pm 0,04$	–	<u>6,67</u> $\pm 0,07$	–	<u>5,11</u> $\pm 0,31$	–	–
	8, 9	<u>4,23</u> $\pm 0,02$	<u>2,72</u> $\pm 0,01$	–	–	–	–	–	–
10, 11	–	–	<u>2,95</u> $\pm 0,01$	<u>6,64</u> $\pm 0,01$	–	–	<u>0,69</u> $\pm 0,08$	–	
imipramin	1, 2	<u>4,28</u> $\pm 0,02$	–	–	<u>6,71</u> $\pm 0,02$	–	–	–	<u>2,15</u> $\pm 0,09$
	3	<u>4,28</u> $\pm 0,01$	–	–	–	–	–	–	<u>3,67</u> $\pm 0,01$
	4	<u>4,43</u> $\pm 0,02$	–	<u>3,53</u> $\pm 0,01$	<u>7,70</u> $\pm 0,02$	–	–	–	–
	5	<u>4,43</u> $\pm 0,02$	<u>2,33</u> $\pm 0,02$	–	–	–	–	–	–
	6	<u>4,43</u> $\pm 0,01$	–	<u>3,69</u> $\pm 0,02$	<u>7,70</u> $\pm 0,03$	–	–	–	–
amitriptilin	4	<u>5,35</u> $\pm 0,01$	–	–	–	–	–	–	<u>11,37</u> $\pm 0,01$
	5	5,22	–	–	–	–	–	–	–
	6	<u>5,24</u> $\pm 0,05$	–	–	–	–	–	–	–

^a $K_{\text{sp}}^{1:1}$ – proizvod rastvorljivosti $(\text{BH})\text{H}_2\text{PO}_4$, $K_{\text{sp}}^{2:1}$ – proizvod rastvorljivosti $(\text{BH})_2\text{HPO}_4$, K_{241} – konstanta građenja kompleksa $(\text{BH})_2\text{H}_2\text{PO}_4^-$, K_{221} – konstanta građenja kompleksa $\text{B}(\text{BH})\text{HPO}_4^-$, K_{141} – konstanta građenja kompleksa $(\text{BH})\text{H}_3\text{PO}_4$, K_n – konstanta agregacije (imipramin $n=3$, amitriptilin $n=5$).

^b U model su uključeni uzorci OM14, OM15, OM24 i OM25. ^c U model je uključen uzorak OM22.

^d Podvučene vrednosti predstavljaju izračunate konstante, dok su ostale vrednosti fiksne konstante preuzete iz drugih setova.

Tabela 70. Kritične micelarne koncentracije (mM) u rastvorima imipramin-hidrohlorida i amitriptilin-hidrohlorida koji sadrže hloride i/ili fosfate na $25,0\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ [12]

TCA	0,01 M NaH_2PO_4	0,10/0,15 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4^{\text{a}}$	0,01 M NaCl	0,15 M NaCl
imipramin	<u>48,34</u> $\pm 1,82$	<u>35,46</u> $\pm 8,69$	<u>49,27</u> $\pm 1,06$	<u>26,21</u> $\pm 2,28$
amitriptilin	<u>39,67</u> $\pm 1,36$	<u>35,04</u> $\pm 3,33$	<u>34,85</u> $\pm 2,37$	<u>20,23</u> $\pm 6,90$

^a 0,10 M NaH_2PO_4 u slučaju imipramina, a 0,15 M NaH_2PO_4 u slučaju amitriptilina.

U heterogenim sistemima imipramina koji sadrže hloride i fosfate dolazi do samoagregacije imipramina na $\text{pH} < 4$ (trimeri prema $p\text{DISOL-X}^{\text{TM}}$ analizi) [9], dok na $\text{pH} > 10$ dolazi do delimične degradacije imipramina (1,60% na $\text{pH} 12,55$). Nastajanje katjonskih ili anjonskih kompleksa sa komponentama fosfatnog pufera nije primećeno. U suspenzijama imipramina koje sadrže hloride dolazi do većeg stepena i samoagregacije ($\text{pH} < 7$) i degradacije ($\text{pH} > 8,5$; 12,24% na $\text{pH} 12,87$) u odnosu na suspenzije koje sadrže hloride i fosfate. Rezultati su pokazali da se stepen agregacije može smanjiti ukoliko se u eksperimentima koristi imipramin baza, umesto imipramin-hidrohlorida i veliki višak hlorida ili fosfata ($I_{\text{sr}} 1,42 - 1,64 \text{ M}$) [12]. U zavisnosti od totalnih koncentracija hlorida i fosfata, primećeno je taloženje hidrohloridnih ili fosfatnih soli imipramina [9, 12]. Imipramin baza izdvaja se u baznoj sredini u anhidrovanom amorfnom obliku i 24 sata nije dovoljno da se baza prevede u kristalni oblik. Kao i u slučaju desipramina i nortriptilina, pH_{max} vrednosti na kojima se dešavaju transformacije u čvrstoj fazi variraju u zavisnosti od sastava suspenzije.

Heterogeni sistemi amitriptilina sličniji su heterogenim sistemima imipramina nego heterogenim sistemima desipramina i nortriptilina. Nastajanje kompleksa sa komponentama fosfatnog pufera nije primećeno u heterogenim sistemima amitriptilina [9]. Međutim, dolazi do velikog povećanja rastvorljivosti u kiselj sredini kao posledica velikog stepena samoagregacije amitriptilina u rastvoru. Sklonost amitriptilina ka samoagregaciji je toliko velika, da korišćenje amitriptilin baze, umesto amitriptilin-hidrohlorida i povećanje koncentracije fosfata ($I_{\text{sr}} 1,42 - 2,79 \text{ M}$) nije dovelo do nastajanja zasićenih rastvora amitriptilina u kiselj sredini [12]. Nemogućnost pripreme zasićenih rastvora u kiselj sredini i degradacija u baznoj sredini onemogućile su konstrukciju profila rastvorljivosti amitriptilina. Stepenn degradacije amitriptilina na $\text{pH} > 12$ posle 24 sata iznosi 9%. Produženo vreme mešanja (19 dana) i produženo vreme sedimentacije (7 dana) nije drastično promenilo stepenn degradacije amitriptilina na $\text{pH} > 12$ (11,2% i 7%, redom). Pokazano je da se amitriptilin baza izdvaja u amorfnom ili delimično amorfnom/kristalnom obliku tokom uspostavljanja ravnoteže od 24 sata i da stepenn hidratacije nema uticaja na kristalnu strukturu baze.

Na osnovu prikazanih rezultata uočljiva je sličnost u hemijskom ponašanju između desipramina i nortriptilina, kao i sličnost između imipramina i amitriptilina, što se može objasniti strukturom ovih jedinjenja (**Slika 1**). Desipramin i nortriptilin sadrže sekundarnu amino grupu na kraju ugljovodoničnog niza, dok imipramin i amitriptilin sadrže tercijarnu amino grupu. Pored toga, desipramin i imipramin pripadaju klasi dibenzazepina, dok nortriptilin i amitriptilin pripadaju klasi dibenzocikloheptadiena. Prisustvo sekundarne ili tercijarne amino grupe u većoj meri doprinosi ponašanju ovih jedinjenja u ispitivanim sistemima od strukture tricikličnog sistema.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da $\text{pH-Ramp shake-flask}$ metoda ima veliki kapacitet u proučavanju zavisnosti rastvorljivosti tricikličnih antidepressiva od pH vrednosti. Dobijeni rezultati mogu biti izuzetno korisni u svim fazama dizajna i razvoja lekova, kao i u procesima predviđanja rastvorljivosti ili mogućih interakcija u *in vitro* ili *in vivo* uslovima. Zbog velikog značaja podataka o rastvorljivosti i ravnotežama u heterogenim sistemima ispitivanih supstanci, u planu je nastavak ovog istraživanja. Dalji razvoj $\text{pH-Ramp shake-flask}$ metode može se ostvariti analizom drugih jedinjenja koja se u većoj ili manjoj meri razlikuju od jedinjenja proučavanih u ovoj doktorskoj disertaciji. Osim toga, značajno bi bilo ispitati uticaj različitih sredina na rastvorljivost ispitivanih supstanci ovom metodom. Na taj način može se unaprediti čitav proces proučavanja rastvorljivosti potencijalno biološki aktivnih i biološki aktivnih supstanci.

VI LITERATURA

- [1] Zoran Mandić (editor), *Physico-chemical methods in drug discovery and development*, IAPC Publishing, Zagreb, Croatia, 2012. ISBN 978-953-56942-0-5
- [2] Stephen R. Byrn, George Zografi, Xiaoming Sean Chen, *Solid State Properties of Pharmaceutical Materials*, Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, USA, 2017. ISBN 9781118145302
- [3] Alex Avdeef, *Absorption and drug development. Solubility, permeability, and charge state*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2012. ISBN 978-1-118-05745-2
- [4] Karl J. Box, Gergely Völgyi, Edit Baka, Martin Stuart, Krisztina Takács-Novák, John E. A. Comer, Equilibrium versus kinetic measurements of aqueous solubility, and the ability of compounds to supersaturate in solution – A validation study, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, 1298–1307, (2006).
- [5] Edit Baka, John E. A. Comer, Krisztina Takács-Novák, Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake–flask method using hydrochlorothiazide as model compound, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 335–341, (2008).
- [6] Olivera S. Marković, Miloš P. Pešić, Tatjana Ž. Verbić, Alex Avdeef, pH-Dependent solubility profile of desipramine hydrochloride, *6th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery*, September 4–6, 2017, Zagreb, Croatia, Book of Abstracts, 42.
- [7] Olivera S. Marković, Miloš P. Pešić, Ankita V. Shah, Abu T.M. Serajuddin, Tatjana Ž. Verbić, Alex Avdeef, Solubility-pH profile of desipramine hydrochloride in saline phosphate buffer: Enhanced solubility due to drug-buffer aggregates, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 133, 264–274, (2019).
- [8] Olivera S. Marković, Miloš P. Pešić, Ankita V. Shah, Abu T.M. Serajuddin, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, Desipramine solubility studies: enhanced solubility due to drug-buffer aggregates, *8th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery*, September 9–11, 2019, Split, Croatia, Book of Abstracts, 17.
- [9] Olivera S. Marković, Miloš P. Pešić, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, pH-Dependent solubility profiles of imipramine and amitriptyline hydrochlorides, *8th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery*, September 9–11, 2019, Split, Croatia, Book of Abstracts, 51.
- [10] Olivera S. Marković, Nemanja Ž. Marjanović, Nirali Patel, Abu T. M. Serajuddin, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, pH-Dependent solubility profile of nortriptyline hydrochloride, *57th Meeting of the Serbian Chemical Society*, June 18–19, 2021, Kragujevac, Serbia, Book of Abstracts, 32. ISBN 978-86-7132-077-1.
- [11] Nemanja Marjanović, Proučavanje pH-zavisne rastvorljivosti nortriptilin-hidrohlorida primenom pH–*Ramp shake–flask* metode, Završni rad, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, Beograd, (2021).
- [12] Brankica Gajić, Proučavanje ravnoteža u heterogenim sistemima imipramin i amitriptilin-hidrohlorida, Završni rad, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, Beograd, (2021).

- [13] Olivera S. Marković, Nirali G. Patel, Abu T. M. Serajuddin, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, Nortriptyline hydrochloride solubility-pH profiles in a saline phosphate buffer: drug-phosphate complexes and multiple pH_{max} domains with a Gibbs phase rule “soft” constraints, *Molecular Pharmaceutics*, 19, 710–719, (2022).
- [14] Alex Avdeef, Elisabet Fuguet, Antonio Llinàs, Clara Ràfols, Elisabeth Bosch, Gergely Völgyi, Tatjana Verbić, Elena Boldyreva, Krisztina Takács-Novák, Equilibrium solubility measurement of ionizable drugs – consensus recommendations for improving data quality, White paper, *ADMET&DMPK*, 4(2), 117–178, (2016).
- [15] Takeru Higuchi, Mohit Gupta, L. W. Busse, Influence of electrolytes, pH, and alcohol concentration on the solubilities of acidic drugs, *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 42, 157–161, (1953).
- [16] George Zografi, David E. Auslander, Peter L. Lytell, Interfacial properties of phenothiazine derivatives, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53, 573–574, (1964).
- [17] George Zografi, Ivan Zarenda, The surface activity of phenothiazine derivatives at the air-solution interface, *Biochemical Pharmacology*, 15, 591–598, (1966).
- [18] Donald L. Sorby, Elmer M. Plein, Joseph D. Benmaman, Adsorption of phenothiazine derivatives by solid adsorbents, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 785–794, (1966).
- [19] A. L. Green, Ionization constants and water solubilities of some aminoalkylphenothiazine tranquilizers and related compounds, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 19, 10–16, (1967).
- [20] A. T. Florence, R. T. Parfitt, Micelle formation by some phenothiazine derivatives. II. Nuclear magnetic resonance studies in deuterium oxide, *The Journal of Physical Chemistry*, 75, 3554–3560, (1971).
- [21] D. Attwood, A. T. Florence, J. M. N. Gillan, Micellar properties of drugs: properties of micellar aggregates of phenothiazines and their aqueous solutions, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 988–993, (1974).
- [22] Sung-Tsuen Liu, Arthur Hurwitz, The effect of micelle formation on solubility and pK_a determination of acetylpromazine maleate, *Journal of Colloid and Interface Science*, 60(2), 410–413, (1977).
- [23] Joseph B. Bogardus, Robert K. Blackwood, Jr, Solubility of doxycycline in aqueous solution, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 188–194, (1979).
- [24] Abu T. M. Serajuddin, Morton Rosoff, pH-Solubility profile of papaverine hydrochloride and its relationship to the dissolution rate of sustained-release pellets, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73, 1203–1208, (1984).
- [25] Abu T. M. Serajuddin, Charles I. Jarowski, Effect of diffusion layer pH and solubility on the dissolution rate of pharmaceutical bases and their hydrochloride salts I: phenazopyridine, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74, 142–147, (1985).
- [26] Adamo Fini, Giuseppe Fazio, Giorgio Feroci, Solubility and solubilization properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 126, 95–102, (1995).
- [27] Chengyue Zhu, William H. Streng, Investigation of drug self-association in aqueous solution using calorimetry, conductivity, and osmometry, *International Journal of Pharmaceutics*, 130, 159–168, (1996).

- [28] D. Attwood, E. Boitard, J.-P. Dubès, H. Tachoire, Calorimetric study of the influence of electrolyte on the micellization of phenothiazine drugs in aqueous solution, *The Journal of Physical Chemistry B*, 101, 9586–9592, (1997).
- [29] Mark T. Ledwidge, Owen I. Corrigan, Effects of surface active characteristics and solid state forms on the pH solubility profiles of drug–salt systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 174, 187–200, (1998).
- [30] Christel A. S. Bergström, Alex Avdeef, Perspectives in solubility measurement and interpretation, *ADMET & DMPK*, 7(2), 88–105, (2019).
- [31] Elisabet Fuguet, Xavier Subirats, Clara Ràfols, Elisabeth Bosch, Alex Avdeef, Ionizable drug self–associations and the solubility dependence on pH: detection of aggregates in saturated solutions using mass spectrometry (ESI–Q–TOF–MS/MS), *Molecular Pharmaceutics*, 18(6), 2311–2321, (2021).
- [32] Alex Avdeef, Suggested improvements for measurement of equilibrium solubility–pH of ionizable drugs, *ADMET & DMPK*, 3(2), 84–109, (2015).
- [33] Gergely Völgyi, Edit Baka, Karl J. Box, John E. A. Comer, Krisztina Takács-Novák, Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship, *Analytica Chimica Acta*, 673, 40–46, (2010).
- [34] Krisztina Takács-Novák, Vera Szőke, Gergely Völgyi, Péter Horváth, Rita Ambrus, Piroska Szabó-Révész, Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 279–285, (2013).
- [35] Gergely Völgyi, Attila Marosi, Krisztina Takács-Novák, Alex Avdeef, Salt solubility products of diprenorphine hydrochloride, codeine and lidocaine hydrochlorides and phosphates – Novel method of data analysis not dependent on explicit solubility equations, *ADMET & DMPK*, 1(4), 48–62, (2013).
- [36] Elham Shoghi, Elisabet Fuguet, Elisabeth Bosch, Clara Ràfols, Solubility–pH profiles of some acidic, basic and amphoteric drugs, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 291–300, (2013).
- [37] Aneta Pobudkowska, Clara Ràfols, Xavier Subirats, Elisabeth Bosch, Alex Avdeef, Phenothiazines solution complexity – Determination of pK_a and solubility–pH profiles exhibiting sub-micellar aggregation at 25 and 37 °C, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 163–176, (2016).
- [38] Alexander Glomme, Joachim März, Jennifer B. Dressman, Comparison of a miniaturized *shake–flask* solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, 1–16, (2005).
- [39] Christel A. S. Bergström, Kristina Luthman, Per Artursson, Accuracy of calculated pH-dependent aqueous drug solubility, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 387–398, (2004).
- [40] Alex Avdeef, pH-metric solubility. 1. Solubility–pH profiles from Bjerrum plots. Gibbs buffer and pK_a in the solid state, *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 4, 165–178, (1998).
- [41] Alex Avdeef, Cynthia M. Berger, Charles Brownell, pH-Metric solubility. 2. Correlation between the acid–base titration and the saturation *shake–flask* solubility–pH methods, *Pharmaceutical Research*, 17, 85–89, (2000).

- [42] Alex Avdeef, Cynthia M. Berger, pH-metric solubility. 3. Dissolution titration template method for solubility determination, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 281–291, (2001).
- [43] Martin Stuart, Karl Box, Chasing equilibrium: Measuring the intrinsic solubility of weak acids and bases, *Analytical Chemistry*, 77, 983–990, (2005).
- [44] Karl Box, John E. Comer, Tom Gravestock, Martin Stuart, New ideas about the solubility of drugs, *Chemistry and Biodiversity*, 6, 1767–1788, (2009).
- [45] Takeru Higuchi, Fong–Mei L. Shih, Toshikuro Kimura, J. Howard Rytting, Solubility determination of barely aqueous-soluble organic solids, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 1267–1272, (1979).
- [46] Srinivasan Venkatesh, Jianmin Li, Yuehong Xu, Rao Vishnuvajjala, Bradley D. Anderson, Intrinsic solubility estimation and pH–solubility behavior of cosalane (NSC 658586), an extremely hydrophobic diprotic acid, *Pharmaceutical Research*, 13, 1453–1459, (1996).
- [47] Krisztina Takács–Novák, Maria Urac, Péter Horváth, Gergely Völgyi, Bradley D. Anderson, Alex Avdeef, Equilibrium solubility measurement of compounds with low dissolution rate by Higuchi's Facilitated Dissolution Method. A validation study, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 133–141, (2017).
- [48] Alex Avdeef, Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 568–590, (2007).
- [49] Alex Avdeef, Oksana Tsinman, Miniaturized rotating disk intrinsic dissolution rate measurement: Effects of buffer capacity in comparisons to traditional Wood's apparatus, *Pharmaceutical Research*, 25, 2613–2627, (2008).
- [50] Konstantin Tsinman, Alex Avdeef, Oksana Tsinman, Dmytro Voloboy, Powder dissolution method for estimating rotating disk intrinsic dissolution rates of low solubility drugs, *Pharmaceutical Research*, 26, 2093–2100, (2009).
- [51] Humphrey P. Rang, Maureen M. Dale, James M. Ritter, Philip K. Moore, Farmakologija, Prvo srpsko izdanje (prevod sa engleskog jezika petog izdanja knjige, urednik srpskog izdanja Zoran Todorović). Data status, Beograd, 2005. ISBN: 86-7478-008-3
- [52] Antonio Llinàs, Robert C. Glen, Jonathan M. Goodman, Solubility challenge: Can you predict solubilities of 32 molecules using a database of 100 reliable measurements? *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48, 1289–1303, (2008).
- [53] Ana Melero, T. M. Garrigues, P. Almudever, A. Martín Villodre, C. M. Lehr, U. Schäfer, Nortriptyline hydrochloride skin absorption: Development of a transdermal patch, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 588–596, (2008).
- [54] Alex Avdeef, Phosphate precipitates and water-soluble aggregates in re-analyzed solubility-pH data of twenty-five basic drugs, *ADMET & DMPK*, 2(1), 43-55, (2014).
- [55] D. Attwood, J. Gibson, Aggregation of antidepressant drugs in aqueous solution, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 30, 176–180, (1978).
- [56] Elena Junquera, J. C. Romero, Emilio Aicart, Behavior of tricyclic antidepressants in aqueous solution: Self-aggregation and association with β -Cyclodextrin, *Langmuir*, 17, 1826–1832, (2001).

- [57] Manuel Gutiérrez-Pichel, Silvia Barbosa, Pablo Taboada, Víctor Mosquera, Surface properties of some amphiphilic antidepressant drugs in different aqueous media, *Colloid and Polymer Science*, 281, 575–579, (2003).
- [58] Alberto Rodríguez, Elena Junquera, Patricia del Burgo, Emilio Aicart, Conductometric and spectrofluorimetric characterization of the mixed micelles constituted by dodecyltrimethylammonium bromide and a tricyclic antidepressant drug in aqueous solution, *Journal of Colloid and Interface Science*, 269, 476–483, (2004).
- [59] Md. Sayem Alam, Andleeb Z. Naqvi, Kabir-ud-Din, Surface and micellar properties of some amphiphilic drugs in the presence of additives, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 52, 1326–1331, (2007).
- [60] Md. Sayem Alam, Kabir-ud-Din, Investigation of the role of electrolytes and non-electrolytes on the cloud point and dye solubilization in antidepressant drug imipramine hydrochloride solutions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 74–79, (2008).
- [61] Md. Sayem Alam, Kabir-ud-Din, Asit Baran Mandal, Thermodynamics of the amphiphilic drug, amitriptyline hydrochloride-surfactant/polymer systems at the cloud point, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31, 1721–1726, (2010).
- [62] Md. Sayem Alam, Kabir-ud-Din, Asit Baran Mandal, Evaluation of thermodynamic parameters of amphiphilic tricyclic antidepressant drug imipramine hydrochloride-additive systems at the cloud point, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 577–584, (2010).
- [63] Kabir-ud-Din, Malik Abdul Rub, Andleeb Z. Naqvi, Self-association behavior of amitriptyline hydrochloride as a function of temperature and additive (inorganic salts and ureas) concentration, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82, 87–94, (2011).
- [64] Md. Sayem Alam, Debasis Samanta, Asit Baran Mandal, Micellization and clouding phenomenon of amphiphilic antidepressant drug amitriptyline hydrochloride: Effect of KCl, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 203–208, (2012).
- [65] Malik Abdul Rub, Dileep Kumar, Micellization behavior of antidepressant imipramine hydrochloride drug and hydrotrope (sodium tosylate) mixtures at different compositions and temperatures in different media, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65, 2659–2672, (2020).
- [66] Klára Valkó, Physicochemical and biomimetic properties in drug discovery: chromatographic techniques for lead optimization, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2014. ISBN 978-1-118-15212-6.
- [67] Christel A. S. Bergström, Melissa Strafford, Lucia Lazorova, Alex Avdeef, Kristina Luthman, Per Artursson, Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties, *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 558–570, (2003).
- [68] Christel A. S. Bergström, René Holm, Søren Astrup Jørgensen, Sara B. E. Andersson, Per Artursson, Stefania Beato, Anders Borde, Karl Box, Marcus Brewster, Jennifer Dressman, Kung-I. Feng, Gavin Halbert, Edmund Kostewicz, Mark McAllister, Uwe Muenster, Julian Thinnes, Robert Taylor, Anette Mullertz, Early pharmaceutical profiling to predict oral drug absorption: Current status and unmet needs, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 173–199, (2014).
- [69] William L. Jorgensen, Erin M. Duffy, Prediction of drug solubility from structure, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(3), 355–366, (2002).

- [70] Jennifer B. Dressman, Gordon L. Amidon, Christos Reppas, Vinod P. Shah, Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms, *Pharmaceutical Research*, 15, 11–22, (1998).
- [71] Samuel H. Yalkowsky, Yan He, Parijat Jain, Handbook of Aqueous Solubility Data, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, FL, 2010.
- [72] Antonio Llinàs, Alex Avdeef, Solubility challenge revisited after ten years, with multilab *shake-flask* data, using tight (SD ~ 0.17 log) and loose (SD ~ 0.62 log) test sets, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59, 3036–3040, (2019).
- [73] David S. Palmer, John B. O. Mitchell, Is experimental data quality the limiting factor in predicting the aqueous solubility of druglike molecules? *Molecular Pharmaceutics*, 11, 2962–2972, (2014).
- [74] Arzu Selen, Paul A. Dickinson, Anette Müllertz, John R. Crison, Hitesh B. Mistry, Maria T. Cruaños, Marilyn N. Martinez, Hans Lennernäs, Tim L. Wigal, David C. Swinney, James E. Polli, Abu T. M. Serajuddin, Jack A. Cook, Jennifer B. Dressman, The Biopharmaceutics Risk Assessment Roadmap for optimizing clinical drug product performance, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103, 3377–3397, (2014).
- [75] Paul A. Dickinson, Filippos Kesisoglou, Talia Flanagan, Marilyn N. Martinez, Hitesh B. Mistry, John R. Crison, James E. Polli, Maria T. Cruaños, Abu T. M. Serajuddin, Anette Müllertz, Jack A. Cook, Arzu Selen, Optimizing clinical drug product performance: Applying Biopharmaceutics Risk Assessment Roadmap (BioRAM) and the BioRAM Scoring Grid, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 3243–3255, (2016).
- [76] Alex Avdeef, Multi-lab intrinsic solubility measurement reproducibility in CheqSol and *shake-flask* methods, *ADMET&DMPK*, 7(3), 210–219, (2019).
- [77] William H. Streng, Swee K. Hsi, Paul E. Helms, Hetty G. H. Tan, General treatment of pH-solubility profiles of weak acids and bases and the effects of different acids on the solubility of a weak base, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(12), 1679–1684, (1984).
- [78] Abu T. M. Serajuddin, Pai-Chang Sheen, Matthew A. Augustine, Common ion effect on solubility and dissolution rate of the sodium salt of an organic acid, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39(8), 587–591, (1987).
- [79] Shoufeng Li, SuiMing Wong, Sundeep Sethia, Hassan Almoazen, Yatindra M. Joshi, Abu T. M. Serajuddin, Investigation of solubility and dissolution of a free base and two different salt forms as a function of pH, *Pharmaceutical Research*, 22(4), 628–635, (2005).
- [80] Abu T. M. Serajuddin, Salt formation to improve drug solubility, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 603–616, (2007).
- [81] Yan He, Chris Ho, Donglai Yang, Jeane Chen, Edward Orton, Measurement and accurate interpretation of the solubility of pharmaceutical salts, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 1190–1196, (2017).
- [82] Alex Avdeef, Disproportionation of pharmaceutical salts: pH_{max} and phase-solubility/pH variance, *Molecular Pharmaceutics*, 18(7), 2724–2743, (2021).

- [83] Alex Avdeef, Kiyohiko Sugano, Salt solubility and disproportionation – uses and limitations of equations for pH_{max} and the *in-silico* prediction of pH_{max} , *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111, 225–246, (2022).
- [84] George Butcher, John Comer, Alex Avdeef, pK_a -critical interpretations of solubility–pH profiles: PG-300995 and NSC-639829 Case studies, *ADMET & DMPK*, 3(2), 131–140, (2015).
- [85] Lidija Pfendt, Dušanka Milojković-Opsenica: Jonske ravnoteže, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, Beograd, 2014. ISBN 978-86-7220-055-3
- [86] James N. Butler, Ionic equilibrium – Solubility and pH calculations, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1998. ISBN 0-471-58526-2
- [87] Madhu Pudipeddi, Abu T. M. Serajuddin, Trends in solubility of polymorphs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, 929–939, (2005).
- [88] Susan M. Reutzel-Edens, Rita L. Kleemann, Peggy L. Lewellen, Alfio L. Borghese, Luc J. Antoine, Crystal forms of LY334370 HCl: isolation, solid-state characterization, and physicochemical properties, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(6), 1196–1205, (2003).
- [89] Alex Avdeef, Cocrystal solubility product analysis – Dual concentration – pH mass action model not dependent on explicit solubility equations, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110, 2–18, (2017).
- [90] Ann Newman, George Zograf, An examination of water vapor sorption by multicomponent crystalline and amorphous solids and its effects on their solid–state properties, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108, 1061–1080, (2019).
- [91] Zeren Wang, Lana S. Burrell, William J. Lambert, Solubility of E2050 at various pH: a case in which apparent solubility is affected by the amount of excess solid, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(6), 1445–1455, (2002).
- [92] Alex Avdeef, Anomalous solubility behavior of several acidic drugs, *ADMET & DMPK*, 2(1), 33–42, (2014).
- [93] Gergely Völgyi, Dóra Csicsák, Krisztina Takács-Novák, Right filter-selection for phase separation in equilibrium solubility measurement, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 123, 98–105, (2018).
- [94] Olivera S. Marković, Dragana D. Stojkov, Petar M. Ranković, Miloš P. Pešić, Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić, The effect of the filter type on the quality of “shake–flask” solubility determinations, *53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, June 10-11, 2016, Kragujevac, Serbia*, Book of Abstracts, 17. ISBN 978-86-7132-056-6
- [95] Alex Avdeef, Jerome J. Bucher, Accurate measurements of the concentration of hydrogen ions with a glass electrode: Calibrations using the pridaux and other universal buffer solutions and a computer–controlled automatic titrator, *Analytical Chemistry*, 50, 2137–2142, (1978).
- [96] F. H. Sweeton, R. E. Mesmer, C. F. Baes Jr, Acidity measurements at elevated temperatures. VII. Dissociation of water, *Journal of Solution Chemistry*, 3, 191–214, (1974).
- [97] Karel Nesměrák, Irena Němcová, Determination of critical micelle concentration by electrochemical means, *Analytical Letters*, 39, 1023–1040, (2006).

- [98] Jelena M. Goronja, Aleksandra M. Janošević Ležaić, Biljana M. Dimitrijević, Anđelija M. Malenović, Dragomir R. Stanisavljev, Nataša D. Pejić, Determination of critical micelle concentration of cetyltrimethylammonium bromide: Different procedures for analysis of experimental data, *Hemijska industrija*, 70(4), 485–492, (2016).
- [99] Meiwei Qi, Yongfeng Zhou, Multimicelle aggregate mechanism for spherical multimolecular micelles: from theories, characteristics and properties to applications, *Materials Chemistry Frontiers*, 3, 1994–2009, (2019).
- [100] Diego Romano Perinelli, Marco Cespi, Nicola Lorusso, Giovanni Filippo Palmieri, Giulia Bonacucina, Paolo Blasi, Surfactant self-assembling and critical micelle concentration: One approach fits all? *Langmuir*, 36 (21), 5745–5753, (2020).
- [101] Elisabet Fuguet, Clara Ràfols, Martí Rosés, Elisabeth Bosch, Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems, *Analytica Chimica Acta*, 548, 95–100, (2005).
- [102] Martín Pérez-Rodríguez, Gerardo Prieto, Carlos Rega, Luis M. Varela, Félix Sarmiento, Víctor Mosquera, A comparative study of the determination of the critical micelle concentration by conductivity and dielectric constant measurements, *Langmuir*, 14, 4422–4426, (1998).
- [103] Elena Junquera, Lourdes Peña, Emilio Aicart, Micellar behavior of the aqueous solutions of dodecylethyldimethylammonium bromide. A characterization study in the presence and absence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Langmuir*, 13, 219–224, (1997).
- [104] Elena Lorente, Alberto Rodríguez, Emilio Aicart, Elena Junquera, Non-ionic and cationic micelle nanostructures as drug solubilization vehicles: spectrofluorimetric and electrochemical studies, *Colloid and Polymer Science*, 285, 1321–1329, (2007).
- [105] José L. Rodríguez, María B. Sierra, Paula V. Messina, Marcela A. Morini, Pablo C. Schulz, Patricia del Burgo, Elena Junquera, Alberto Rodríguez, Emilio Aicart, Surface and bulk properties of aqueous decyltrimethylammonium bromide–hexadecyltrimethylammonium bromide mixed system, *Journal of Colloid and Interface Science*, 314, 699–706, (2007).
- [106] Lidija B. Petrović, Verica J. Sovilj, Jadranka L. Milanović, Jaroslav M. Katona, A conductometric investigation of hydroxypropylmethyl cellulose/sodium dodecyl sulfate/nonionic surfactant systems, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 79 (11), 1421–1432, (2014).
- [107] Chun Hua Tan, Zhen Jian Huang, Xu Guang Huang, Rapid determination of surfactant critical micelle concentration in aqueous solutions using fiber-optic refractive index sensing, *Analytical Biochemistry*, 401, 144–147, (2010).
- [108] Tatjana Verbić, Miloš Pešić, Nikola Obradović, Ilija Cvijetić, Praktikum sa zbirkom zadataka iz instrumentalne analitičke hemije – optičke i elektroanalitičke metode, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, Beograd, 2018. ISBN 978-86-7220-095-9
- [109] P. J. Haines, Thermal Methods of Analysis, Principles, Applications and Problems, Springer, 1995.
- [110] Douglas A. Skoog, James J. Leary, Principles of Instrumental Analysis, Fourth edition, Saunders College Publishing, 1992. ISBN 0-03-023343-7.
- [111] H. N. Deepakumari, K. B. Vinay, H. D. Revanasiddappa, Development and validation of a stability indicating RP-UPLC method for analysis of imipramine hydrochloride in pharmaceuticals, *International Scholarly Research Notices*, 2013, 1–10, (2013).

- [112] A. R. Henwood, Instability of amitriptyline base, *Nature*, 216, 1039–1040, (1967).
- [113] R. P. Enever, A. Li Wan Po, B. J. Millard, E. Shotton, Decomposition of amitriptyline hydrochloride in aqueous solution: Identification of decomposition products, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, 1497–1499, (1975).
- [114] J. Buckles, V. Walters, The stability of amitriptyline hydrochloride in aqueous solution, *Journal of Clinical Pharmacy*, 1, 107–112, (1976)
- [115] Amit J. Vyas, Grishma P. Nathwani, Ajay I. Patel, Nilesh K. Patel, Ashok B. Patel, Validated stability indicating RP–HPLC DAD method for simultaneous determination of amitriptyline hydrochloride and pregabalin in presence of stress degradation products in tablet dosage form, *Chemical Methodologies*, 3, 494–508, (2019).

VII PRILOG 1 Desipramin – pomoćni materijal

U **Tabelama P1 – P7**, prikazana je rastvorljivost desipramina u zavisnosti od pH vrednosti, određena u okviru setova 1 – 7. Na **Slici P1**, dati su hromatogrami uzoraka desipramina iz seta 3, a na **Slici P2**, kalibraciona prava, korišćena za određivanje rastvorljivosti desipramina u uzorcima seta 3.

Tabela P1. Set 1 (titracija od visoke ka niskoj pH vrednosti) – rastvorljivost desipramina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [7]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	4,42	$1,48 \times 10^{-2}$	-1,83
2	6,00	$2,59 \times 10^{-3}$	-2,59
3	6,51	$1,86 \times 10^{-3}$	-2,73
4	7,39	$1,29 \times 10^{-3}$	-2,89
5	7,97	$1,27 \times 10^{-3}$	-2,90
6	8,55	$1,22 \times 10^{-3}$	-2,91
7	8,72	$1,27 \times 10^{-3}$	-2,90
8	9,46	$1,25 \times 10^{-3}$	-2,90
9	9,81	$1,11 \times 10^{-3}$	-2,95
10	10,10	$6,74 \times 10^{-4}$	-3,17
11	10,62	$3,06 \times 10^{-4}$	-3,51
12	11,26	$1,98 \times 10^{-4}$	-3,70
13	11,55	$1,71 \times 10^{-4}$	-3,77

Tabela P2. Set 2 (titracija od visoke ka niskoj pH vrednosti) – rastvorljivost desipramina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [7]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	4,78	$9,71 \times 10^{-3}$	-2,01
2	5,36	$5,29 \times 10^{-3}$	-2,28
3	6,03	$2,79 \times 10^{-3}$	-2,55
4	6,58	$1,87 \times 10^{-3}$	-2,73
5	7,50	$1,34 \times 10^{-3}$	-2,87
6	7,78	$1,15 \times 10^{-3}$	-2,94
7	8,12	$1,13 \times 10^{-3}$	-2,95
8	8,47	$1,14 \times 10^{-3}$	-2,94
9	9,71	$1,22 \times 10^{-3}$	-2,91
10	10,06	$5,81 \times 10^{-4}$	-3,24
11	10,56	$2,62 \times 10^{-4}$	-3,58
12	11,02	$1,80 \times 10^{-4}$	-3,74
13	11,34	$2,66 \times 10^{-4}$	-3,58

Tabela P3. Set 3 (titracija od niske ka visokoj pH vrednosti) – rastvorljivost desipramina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [7]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	3,99	$4,51 \times 10^{-2}$	-1,35
2	4,73	$1,13 \times 10^{-2}$	-1,95
3	5,19	$9,24 \times 10^{-3}$	-2,03
4	6,04	$3,30 \times 10^{-3}$	-2,48
5	6,69	$2,23 \times 10^{-3}$	-2,65
6	7,14	$1,78 \times 10^{-3}$	-2,75
7	7,79	$1,70 \times 10^{-3}$	-2,77
8	9,64	$1,69 \times 10^{-3}$	-2,77
9	10,08	$4,68 \times 10^{-4}$	-3,33
10	11,00	$1,55 \times 10^{-4}$	-3,81
11	11,47	$1,35 \times 10^{-4}$	-3,87

Tabela P4. Set 4 – rastvorljivost desipramina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [7]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,42	0,281	-0,55
2	3,59	0,288	-0,54
3	2,02	0,245	-0,61

Tabela P5. Set 5 – rastvorljivost desipramina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže hloride [7]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	1,31	$2,78 \times 10^{-2}$	-1,56
2	2,38	$3,00 \times 10^{-2}$	-1,52
3	3,02	$3,88 \times 10^{-2}$	-1,41
4	4,93	$4,32 \times 10^{-2}$	-1,36
5	7,59	$8,24 \times 10^{-2}$	-1,08
6	8,98	$3,79 \times 10^{-3}$	-2,42
7	10,04	$5,02 \times 10^{-4}$	-3,30

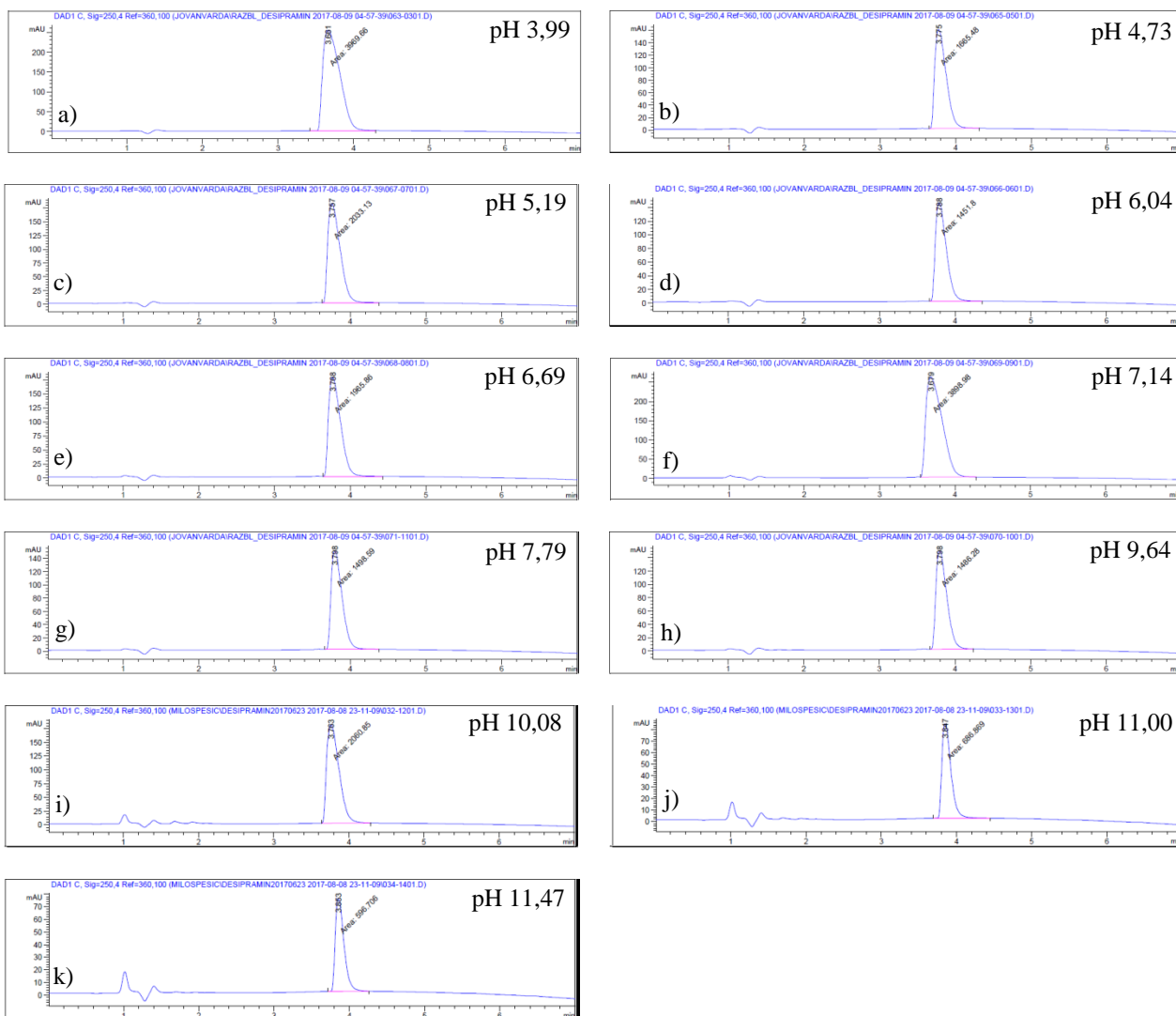
Tabela P6. Set 6 – rastvorljivost desipramina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [7]

uzorak	pH	S (M)	logS
OM11	2,09	0,200	-0,70
OM12	3,86	0,228	-0,64
OM13	7,41	$2,65 \times 10^{-3}$	-2,58
OM14	9,57	$1,80 \times 10^{-3}$	-2,75
OM15	11,10	$9,37 \times 10^{-5}$	-4,03

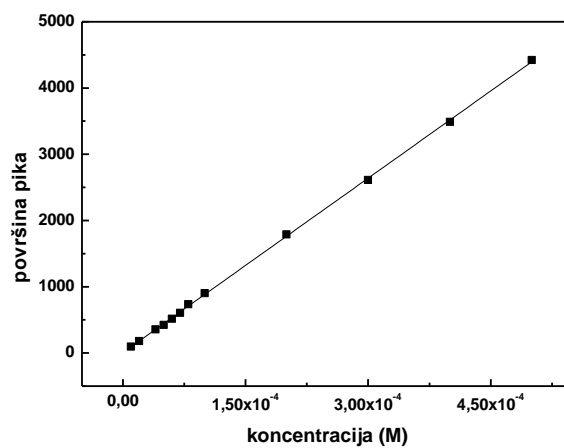
Tabela P7. Set 7 – rastvorljivost desipramina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride (osim uzorka OM21) [7]

uzorak	pH	S (M)	logS
OM21 ^a	2,13	$2,87 \times 10^{-2}$	-1,54
OM22	3,84	$2,37 \times 10^{-1}$	-0,63
OM23	8,03	$3,34 \times 10^{-3}$	-2,48
OM24	9,44	$2,66 \times 10^{-3}$	-2,57
OM25	11,10	$1,50 \times 10^{-4}$	-3,82

^a Talog dobijen u suspenziji koja sadrži samo fosfate.



Slika P1. HPLC hromatogrami uzoraka desipramina iz seta 3 na različitim pH vrednostima [7]: a) Uzorak 1 – razblažen 100×; b) Uzorak 2 – razblažen 60×; c) Uzorak 3 – razblažen 40×; d) Uzorak 4 – razblažen 20×; e) Uzorak 5 – razblažen 10×; f) Uzorak 6 – razblažen 4×; g) Uzorak 7 – razblažen 10×; h) Uzorak 8 – razblažen 10×; i) Uzorak 9 – razblažen 2×; j) Uzorak 10 – razblažen 2×; k) Uzorak 11 – razblažen 2×.



Slika P2. Kalibraciona prava korišćena za određivanje koncentracije desipramina u uzorcima iz seta 3. Opseg koncentracija $1,00 \times 10^{-5}$ – $5,00 \times 10^{-4}$ M. Linearna zavisnost: $\text{Površina} = 8,7829 \times 10^6 c + 4,4574$; $r^2 = 0,9998$ [7]

VIII PRILOG 2 Nortriptilin – pomoćni materijal

Rastvorljivost nortriptilina u zavisnosti od pH vrednosti u setovima 1 – 12, prikazana je u **Tabelama P8 – P19**. Hromatogrami uzoraka nortriptilina iz seta 3 i kalibraciona prava na osnovu koje su izračunate rastvorljivosti nortriptilina u uzorcima seta 3, dati su na **Slikama P3 i P4**.

Tabela P8. Set 1 (titracija od niske ka visokoj pH vrednosti) – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	1,76	$2,13 \times 10^{-2}$	-1,67
2	5,36	$1,35 \times 10^{-2}$	-1,87
3	8,78	$3,43 \times 10^{-3}$	-2,47

Tabela P9. Set 2 (titracija od niske ka visokoj pH vrednosti) – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,12	$4,26 \times 10^{-2}$	-1,37
2	3,00	$5,84 \times 10^{-2}$	-1,23
3	3,94	$5,21 \times 10^{-2}$	-1,28
4	5,17	$1,49 \times 10^{-2}$	-1,83
5	5,69	$1,31 \times 10^{-2}$	-1,88
6	7,61	$5,15 \times 10^{-3}$	-2,29
7	8,82	$2,58 \times 10^{-3}$	-2,59
8	9,30	$8,99 \times 10^{-4}$	-3,05

Tabela P10. Set 3 (titracija od niske ka visokoj pH vrednosti) – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,14	$3,01 \times 10^{-2}$	-1,52
2	3,11	$3,97 \times 10^{-2}$	-1,40
3	4,16	$4,35 \times 10^{-2}$	-1,36
4	5,19	$1,11 \times 10^{-2}$	-1,96
5	5,94	$8,21 \times 10^{-3}$	-2,09
6	7,41	$3,91 \times 10^{-3}$	-2,41
7	8,92	$2,28 \times 10^{-3}$	-2,64
8	9,77	$2,41 \times 10^{-4}$	-3,62
9	10,34	$9,19 \times 10^{-5}$	-4,04
10	11,35	$6,59 \times 10^{-5}$	-4,18

Tabela P11. Set 4 (titracija od niske ka visokoj pH vrednosti) – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,99	$5,77 \times 10^{-2}$	-1,24
2	6,81	$5,07 \times 10^{-3}$	-2,30
3	11,33	$6,12 \times 10^{-5}$	-4,21
4	12,04	$6,93 \times 10^{-5}$	-4,16
5	12,41	$7,76 \times 10^{-5}$	-4,11

Tabela P12. Set 5 (titracija od visoke ka niskoj pH vrednosti) – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	1,47	$5,73 \times 10^{-3}$	-2,24
2	2,39	$5,54 \times 10^{-3}$	-2,26
3	4,92	$5,69 \times 10^{-3}$	-2,24
4	5,94	$5,58 \times 10^{-3}$	-2,25
5	7,04	$5,66 \times 10^{-3}$	-2,25
6	8,12	$6,20 \times 10^{-3}$	-2,21
7	8,79	$2,28 \times 10^{-3}$	-2,64
8	10,11	$1,04 \times 10^{-4}$	-3,98
9	11,86	$3,81 \times 10^{-5}$	-4,42
10	12,49	$3,52 \times 10^{-5}$	-4,45

Tabela P13. Set 6 (titracija od visoke ka niskoj pH vrednosti) – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	1,48	$6,08 \times 10^{-3}$	-2,22
2	2,40	$7,37 \times 10^{-3}$	-2,13
3	3,23	$8,21 \times 10^{-3}$	-2,09
4	4,49	$7,33 \times 10^{-3}$	-2,14
5	6,26	$6,93 \times 10^{-3}$	-2,16
6	7,83	$4,77 \times 10^{-3}$	-2,32
7	8,93	$2,33 \times 10^{-3}$	-2,63
8	9,45	$5,46 \times 10^{-4}$	-3,26
9	10,10	$1,42 \times 10^{-4}$	-3,85
10	10,75	$7,59 \times 10^{-5}$	-4,12

Tabela P14. Set 7 (titracija od visoke ka niskoj pH vrednosti) – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,25	$7,30 \times 10^{-3}$	-2,14
2	3,21	$6,87 \times 10^{-3}$	-2,16
3	5,19	$6,38 \times 10^{-3}$	-2,20
4	6,32	$6,24 \times 10^{-3}$	-2,21
5	8,77	$2,84 \times 10^{-3}$	-2,55
6	9,44	$6,11 \times 10^{-4}$	-3,21
7	10,03	$1,52 \times 10^{-4}$	-3,82
8	11,48	$6,26 \times 10^{-5}$	-4,20

Tabela P15. Set 8 – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	1,80	$1,14 \times 10^{-2}$	-1,94
2	2,45	$1,35 \times 10^{-2}$	-1,87
3	6,68	$1,29 \times 10^{-2}$	-1,89
4	7,12	$1,30 \times 10^{-2}$	-1,89
5	7,77	$1,33 \times 10^{-2}$	-1,88
6	7,80	$1,22 \times 10^{-2}$	-1,91
7	7,93	$8,74 \times 10^{-3}$	-2,06
8	8,49	$3,25 \times 10^{-3}$	-2,50
9	10,64	$7,61 \times 10^{-5}$	-4,12
10	12,05	$6,14 \times 10^{-5}$	-4,21

Tabela P16. Set 9 – rastvorljivost nortriptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže hloride [10, 11, 13]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,00	$1,18 \times 10^{-2}$	-1,93
2	3,05	$1,22 \times 10^{-2}$	-1,91
3	3,56	$1,18 \times 10^{-2}$	-1,93
4	4,19	$1,26 \times 10^{-2}$	-1,90
5	5,81	$1,20 \times 10^{-2}$	-1,92
6	7,58	$1,21 \times 10^{-2}$	-1,92
7	7,73	$9,05 \times 10^{-3}$	-2,04
8	9,06	$1,86 \times 10^{-3}$	-2,73
9	11,13	$6,81 \times 10^{-5}$	-4,17
10	12,37	$7,45 \times 10^{-5}$	-4,13

Tabela P17. Set 10 – rastvorljivost nortiptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate [10, 13]

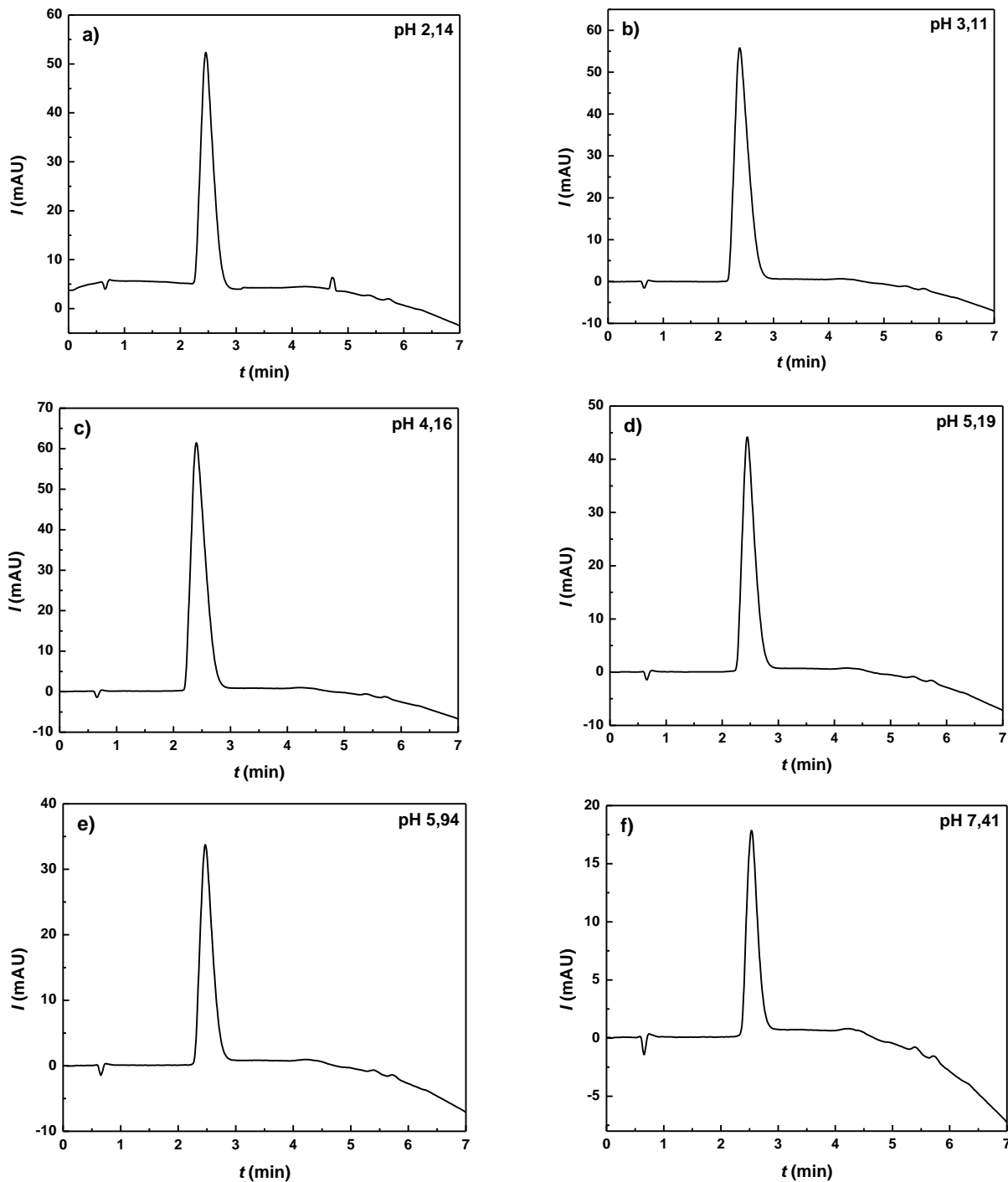
uzorak	pH	S (M)	logS
1	1,82	$1,14 \times 10^{-2}$	-1,94
2	2,11	$1,03 \times 10^{-2}$	-1,99
3	2,54	$9,02 \times 10^{-3}$	-2,04
4	3,12	$8,48 \times 10^{-3}$	-2,07
5	3,65	$8,80 \times 10^{-3}$	-2,06
6	4,02	$8,64 \times 10^{-3}$	-2,06
7	4,92	$9,94 \times 10^{-3}$	-2,00
8	4,98	$9,21 \times 10^{-3}$	-2,04
9	5,74	$4,19 \times 10^{-3}$	-2,38
10	6,07	$3,30 \times 10^{-3}$	-2,48

Tabela P18. Set 11 – rastvorljivost nortiptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže fosfate [10, 13]

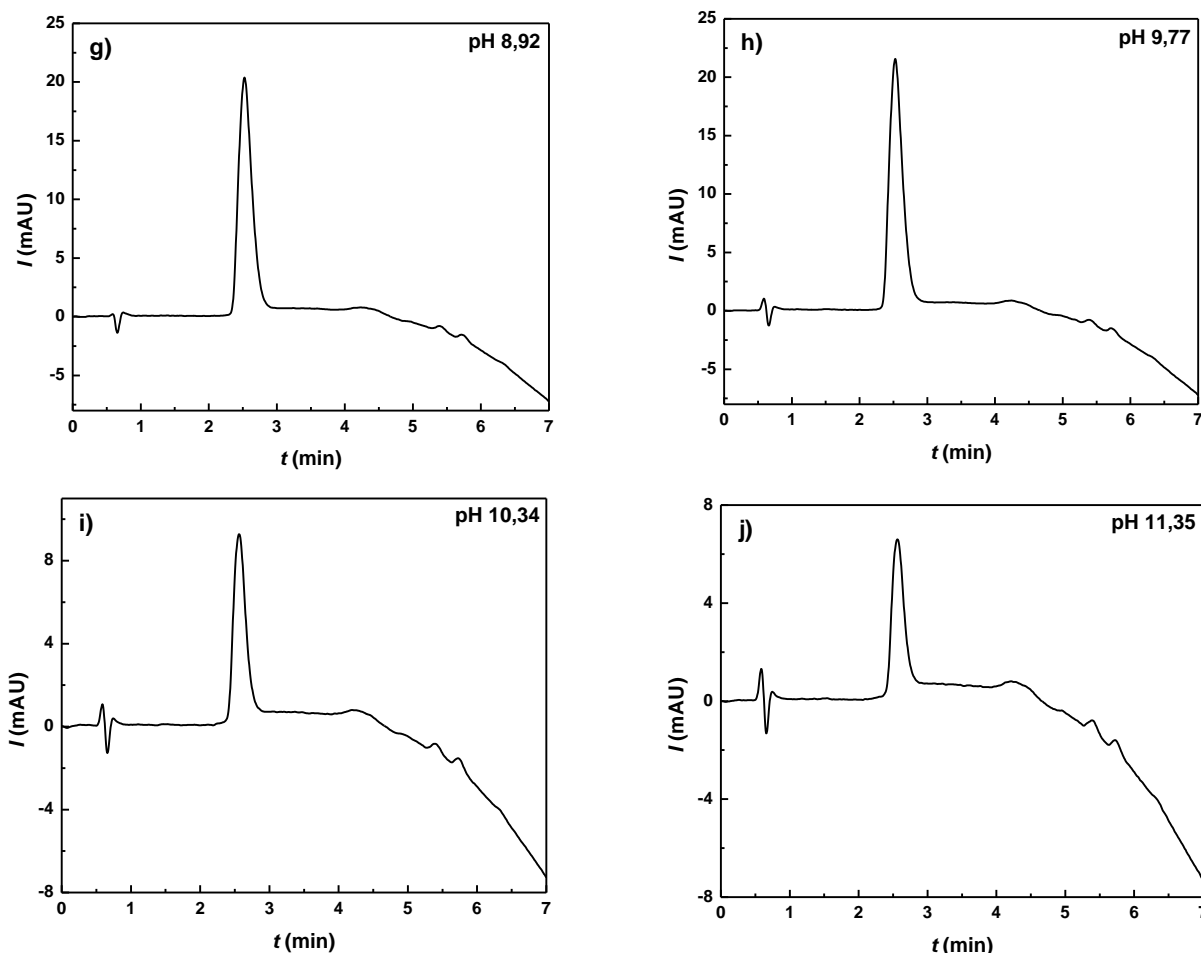
uzorak	pH	S (M)	logS
1	1,82	$1,50 \times 10^{-2}$	-1,82
2	1,99	$1,27 \times 10^{-2}$	-1,90
3	2,40	$1,03 \times 10^{-2}$	-1,99
4	2,87	$9,72 \times 10^{-3}$	-2,01
5	3,60	$9,22 \times 10^{-3}$	-2,04
6	5,36	$6,18 \times 10^{-3}$	-2,21
7	5,93	$3,73 \times 10^{-3}$	-2,43

Tabela P19. Set 12 – rastvorljivost nortiptilina na različitim pH vrednostima u suspenzijama koje sadrže hloride (uzorak 2) ili fosfate (uzorci 6 i 7) [13]

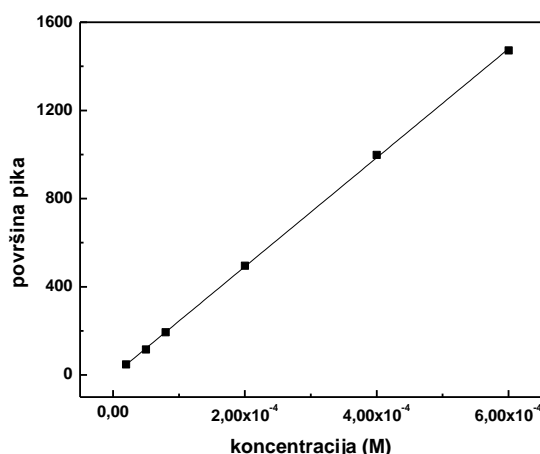
uzorak	pH	S (M)	logS
2	6,33	$1,67 \times 10^{-2}$	-1,78
5	4,46	0,296	-0,53
6	8,23	$1,03 \times 10^{-2}$	-1,99



Slika P3. HPLC hromatogrami uzoraka nortriptina iz seta 3 na različitim pH vrednostima [10, 11, 13]: a) Uzorak 1 – razblažen 100×; b) Uzorak 2 – razblažen 100×; c) Uzorak 3 – razblažen 100×; d) Uzorak 4 – razblažen 40×; e) Uzorak 5 – razblažen 40×; f) Uzorak 6 – razblažen 40×; g) Uzorak 7 – razblažen 20×; h) Uzorak 8 – razblažen 2×; i) Uzorak 9 – razblažen 2×; j) Uzorak 10 – razblažen 2×.



Slika P3. (nastavak) HPLC hromatogrami uzoraka nortriptina iz seta 3 na različitim pH vrednostima [10, 11, 13]: a) Uzorak 1 – razblažen 100×; b) Uzorak 2 – razblažen 100×; c) Uzorak 3 – razblažen 100×; d) Uzorak 4 – razblažen 40×; e) Uzorak 5 – razblažen 40×; f) Uzorak 6 – razblažen 40×; g) Uzorak 7 – razblažen 20×; h) Uzorak 8 – razblažen 2×; i) Uzorak 9 – razblažen 2×; j) Uzorak 10 – razblažen 2×.



Slika P4. Kalibraciona prava korišćena za određivanje koncentracije nortriptilina u uzorcima iz seta 3. Opseg koncentracija $2,00 \times 10^{-5}$ – $6,00 \times 10^{-4}$ M. Linearna zavisnost: Površina= $2,4698 \times 10^6 c - 2,3423$; $r^2=0,9998$ [10, 11, 13]

IX PRILOG 3 Imipramin – pomoćni materijal

U **Tabelama P20 – P26**, prikazane su rastvorljivosti imipramina u uzorcima iz setova 1 – 7. Na **Slikama P5. i P6.** dati su hromatogrami uzorka imipramina iz seta 1 i kalibraciona prava za određivanje rastvorljivosti imipramina u uzorcima seta 1.

Tabela P20. Set 1 (titracija iz kisele ka baznoj sredini) – rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	pH	S (M)	logS
1 ^a	4,06	$9,50 \times 10^{-2}$	-1,02
2	4,99	$1,44 \times 10^{-2}$	-1,84
3	5,81	$8,77 \times 10^{-3}$	-2,06
4	6,85	$4,29 \times 10^{-3}$	-2,37
5	8,09	$2,23 \times 10^{-3}$	-2,65
6	8,11	$2,21 \times 10^{-3}$	-2,66
7	8,15	$1,68 \times 10^{-3}$	-2,78
8	8,17	$1,61 \times 10^{-3}$	-2,79
9 ^b	10,77	$2,75 \times 10^{-5}$	-4,56
10 ^b	11,43	$2,76 \times 10^{-5}$	-4,56

^a Rastvorljivost iznad KMK imipramin-hidrohlorida (KMK= $3,55 \times 10^{-2}$ M; određena konduktometrijski u 0,10 M NaH₂PO₄ na 25,0±0,1 °C, pH=4,45 – 4,33). [12]

^b Degradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.

Tabela P21. Set 2 (titracija iz kisele ka baznoj sredini) – rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	pH	S (M)	logS
1 ^a	3,82	$1,09 \times 10^{-1}$	-0,96
2	4,51	$1,69 \times 10^{-2}$	-1,77
3	5,74	$8,39 \times 10^{-3}$	-2,08
4	6,90	$4,62 \times 10^{-3}$	-2,34
5	7,78	$3,01 \times 10^{-3}$	-2,52
6	8,26	$2,21 \times 10^{-3}$	-2,66
7	8,87	$2,85 \times 10^{-4}$	-3,54
8 ^b	10,35	$2,27 \times 10^{-5}$	-4,64

^a Rastvorljivost iznad KMK imipramin-hidrohlorida (KMK= $3,55 \times 10^{-2}$ M; određena konduktometrijski u 0,10 M NaH₂PO₄ na 25,0±0,1 °C, pH=4,45 – 4,33). [12]

^b Degradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.

Tabela P22. Set 3 – rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže hloride [9]

uzorak	pH	S (M)	logS
1 ^a	7,37	$7,34 \times 10^{-2}$	-1,13
2	8,11	$1,85 \times 10^{-3}$	-2,71
3 ^b	8,98	$2,97 \times 10^{-4}$	-3,53
4 ^b	10,16	$3,67 \times 10^{-5}$	-4,44
5 ^b	11,87	$2,22 \times 10^{-5}$	-4,65

^a Rastvorljivost iznad KMK imipramin-hidrohlorida (KMK= $2,62 \times 10^{-2}$ M; određena konduktometrijski u 0,15 M NaCl na $25,0 \pm 0,1$ °C, pH=5,92 – 5,17). [12]

^b Degradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.

Tabela P23. Set 4 (titracije od više ka nižoj pH vrednosti) – rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [12]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,67	$5,35 \times 10^{-3}$	-2,27
2	3,46	$3,52 \times 10^{-3}$	-2,45
3	4,13	$3,56 \times 10^{-3}$	-2,45
4	4,85	$3,77 \times 10^{-3}$	-2,42
5	5,40	$2,02 \times 10^{-3}$	-2,69
6	5,95	$8,97 \times 10^{-4}$	-3,05
7	6,27	$5,80 \times 10^{-4}$	-3,24

Tabela P24. Set 5 – rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže hloride [12]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,62	$4,89 \times 10^{-3}$	-2,31
2	2,94	$5,85 \times 10^{-3}$	-2,23
3	5,30	$5,78 \times 10^{-3}$	-2,24
4	6,27	$6,31 \times 10^{-3}$	-2,20
5	7,50	$3,43 \times 10^{-3}$	-2,46
6	7,71	$3,59 \times 10^{-3}$	-2,45
7	8,00	$1,71 \times 10^{-3}$	-2,77

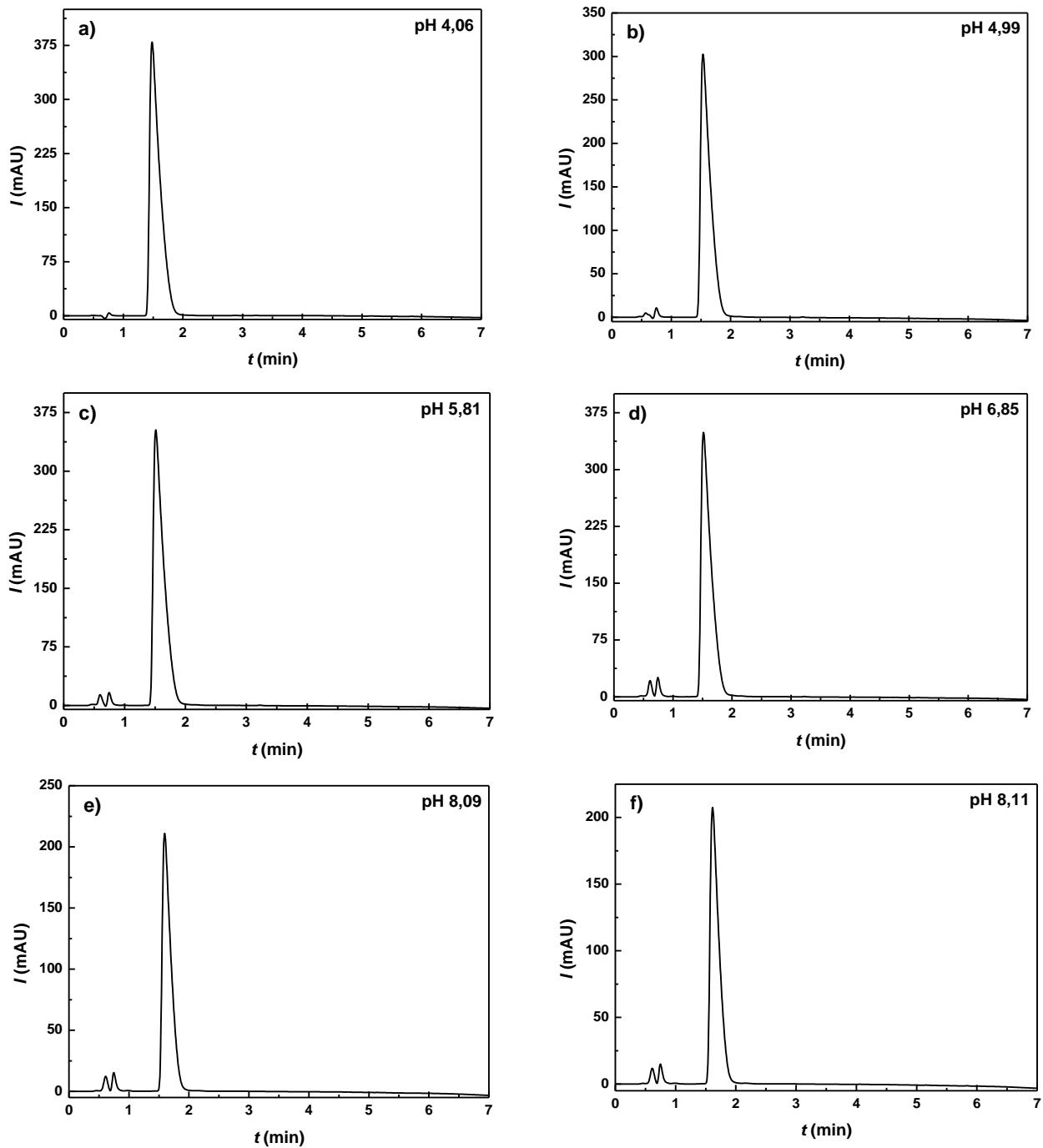
Tabela P25. Set 6 – rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže fosfate [12]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	2,50	$1,33 \times 10^{-3}$	-2,88
2	2,63	$1,11 \times 10^{-3}$	-2,95
3	2,96	$1,90 \times 10^{-3}$	-2,72
4	3,66	$1,79 \times 10^{-3}$	-2,75
5	4,55	$1,69 \times 10^{-3}$	-2,77
6	5,37	$1,67 \times 10^{-3}$	-2,78
7	5,88	$1,39 \times 10^{-3}$	-2,86
8	6,16	$1,35 \times 10^{-3}$	-2,87
9	6,37	$1,21 \times 10^{-3}$	-2,92

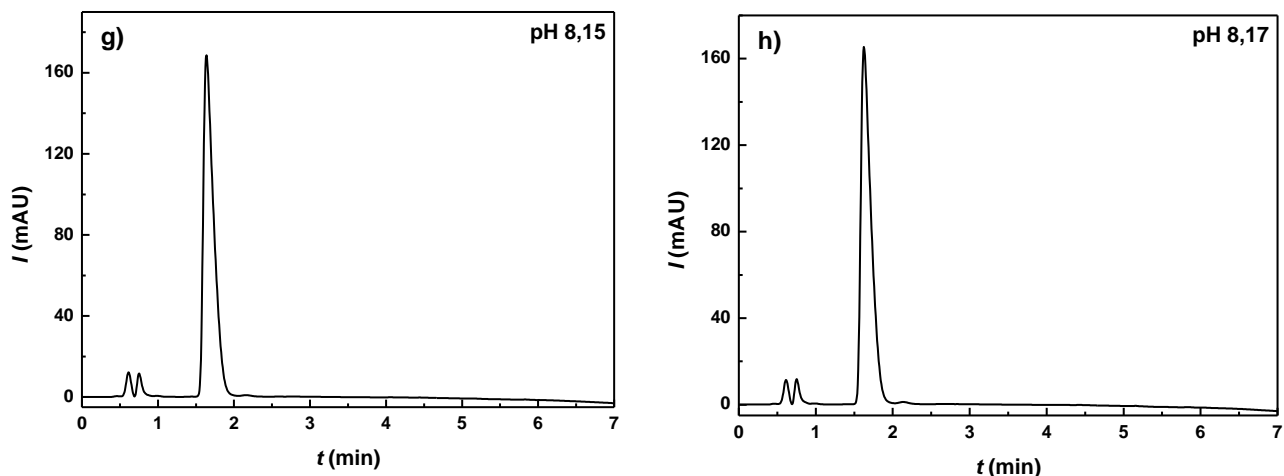
Tabela P26. Set 7 – rastvorljivost imipramina u suspenzijama koje sadrže hloride i fosfate (OM1–OM4), hloride (OM5 i OM6) i fosfate (OM7 i OM8)

oznaka	pH	S (M)	logS
OM1	2,67	$2,54 \times 10^{-3}$	-2,60
OM2	6,21	$4,46 \times 10^{-3}$	-2,35
OM3	8,28	$1,38 \times 10^{-3}$	-2,86
OM4^a	12,55	$1,47 \times 10^{-4}$	-3,83
OM5	1,40	$6,32 \times 10^{-3}$	-2,20
OM6^a	12,87	$1,41 \times 10^{-4}$	-3,85
OM7	1,26	$4,32 \times 10^{-3}$	-2,36
OM8	5,20	$5,46 \times 10^{-4}$	-3,26

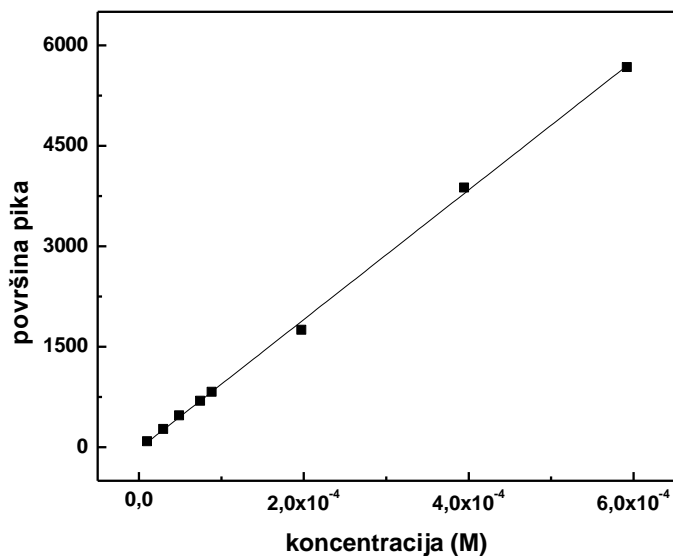
^aDegradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.



Slika P5. HPLC hromatogrami uzoraka imipramina iz seta 1 na različitim pH vrednostima [9]: a) Uzorak 1 – razblažen 200×; b) Uzorak 2 – razblažen 40×; c) Uzorak 3 – razblažen 20×; d) Uzorak 4 – razblažen 10×; e) Uzorak 5 – razblažen 10×; f) Uzorak 6 – razblažen 10×; g) Uzorak 7 – razblažen 10×; h) Uzorak 8 – razblažen 10×.



Slika P5. (nastavak) HPLC hromatogrami uzoraka imipramina iz seta 1 na različitim pH vrednostima [9]: a) Uzorak 1 – razblažen 200×; b) Uzorak 2 – razblažen 40×; c) Uzorak 3 – razblažen 20×; d) Uzorak 4 – razblažen 10×; e) Uzorak 5 – razblažen 10×; f) Uzorak 6 – razblažen 10×; g) Uzorak 7 – razblažen 10×; h) Uzorak 8 – razblažen 10×.



Slika P6. Kalibraciona prava korišćena za određivanje koncentracije imipramina u uzorcima iz seta 1. Opseg koncentracija $9,89 \times 10^{-6}$ – $5,92 \times 10^{-4}$ M. Linearna zavisnost: $\text{Površina} = 9,6655 \times 10^6 c - 25,9765$; $r^2 = 0,9989$ [9]

X PRILOG 4 Amitriptilin – pomoćni materijal

Rastvorljivosti amitriptilina u setovima 1 – 7 prikazane su u **Tabelama P27 – P33**. Na **Slikama P7. i P8.** dati su hromatogrami uzoraka amitriptilina iz seta 4 i kalibraciona prava korišćena za izračunavanje koncentracija u istom setu.

Tabela P27. Set 1 (titracija od niže ka višoj pH vrednosti) – rastvorljivost amitriptilina u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	pH	S (M)	logS
1 ^a	7,66	$1,94 \times 10^{-3}$	-2,71
2 ^a	8,07	$7,25 \times 10^{-4}$	-3,14

^aDegradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.

Tabela P28. Set 2 (titracija od više ka nižoj pH vrednosti) – rastvorljivost amitriptilina u suspenzijama koje sadrže fosfate i hloride [9]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	7,10	$2,24 \times 10^{-2}$	-1,65
2 ^a	10,44	$6,54 \times 10^{-4}$	-3,18

^aDegradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.

Tabela P29. Set 3 – rastvorljivost amitriptilina u suspenzijama koje sadrže hloride [9]

uzorak	pH	S (M)	logS
1 ^a	6,93	$1,17 \times 10^{-1}$	-0,93
2 ^b	7,46	$2,92 \times 10^{-3}$	-2,54
3 ^b	12,38	$5,55 \times 10^{-4}$	-3,26

^aRastvorljivost iznad KMK amitriptilin-hidrohlorida (KMK= $2,02 \times 10^{-2}$ M; određena konduktometrijski u 0,15 M NaCl na $25,0 \pm 0,1$ °C, pH=5,61 – 4,50). [12]

^bDegradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.

Tabela P30. Set 4 – rastvorljivost amitriptilina u suspenzijama koje sadrže fosfate [12]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	6,90	$9,39 \times 10^{-2}$	-1,03
2	7,54	$5,02 \times 10^{-4}$	-3,30

Tabela P31. Set 5 – rastvorljivost amitriptilina u suspenzijama koje sadrže fosfate [12]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	7,09	$1,97 \times 10^{-3}$	-2,71

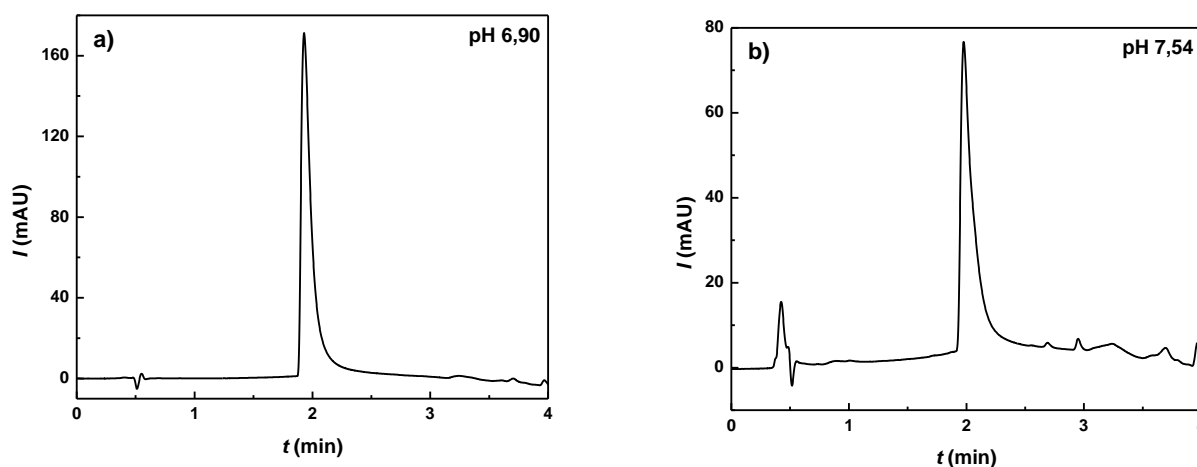
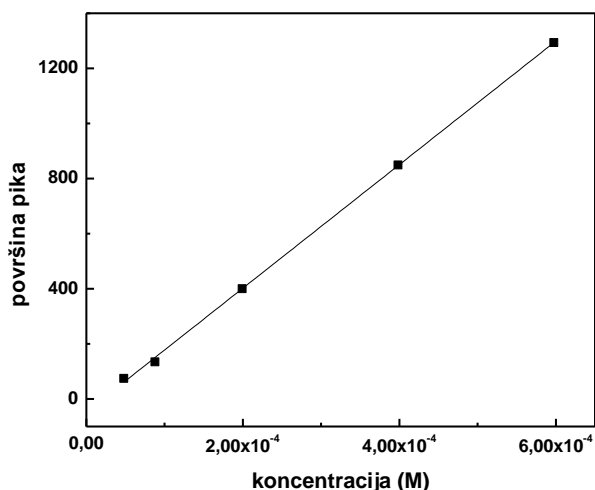
Tabela P32. Set 6 – rastvorljivost amitriptilina u suspenzijama koje sadrže fosfate [12]

uzorak	pH	S (M)	logS
1	6,96	$3,15 \times 10^{-3}$	-2,50
2	7,52	$6,32 \times 10^{-4}$	-3,20

Tabela P33. Set 7 – rastvorljivost amitriptilina u suspenziji koja sadrži hloride (OM10) i suspenziji koja sadrži hloride i fosfate (OM13)

uzorak	pH	S (M)	logS
OM10	7,37	$5,91 \times 10^{-3}$	-2,23
OM13 ^a	11,11	$1,99 \times 10^{-4}$	-3,70

^a Degradacioni proizvodi prisutni u rastvoru.

**Slika P7.** HPLC hromatogrami uzoraka amitriptilina iz seta 4 na različitim pH vrednostima [12]: a) Uzorak 1 – razblažen 200×; b) Uzorak 2 – razblažen 2×.**Slika P8.** Kalibraciona prava korišćena za određivanje koncentracije amitriptilina u uzorcima iz seta 4. Opseg koncentracija $4,78 \times 10^{-5}$ – $5,97 \times 10^{-4}$ M. Linearna zavisnost: Površina= $2,2429 \times 10^6 c - 46,5004$; $r^2=0,9994$ [12]

BIOGRAFIJA

Olivera S. Marković rođena je 21.06.1990. u Čupriji, R Srbija. Osnovnu školu završila je 2005. u Resavici, a gimnaziju (prirodno – matematički smer) 2009. u Čupriji. Osnovne akademske studije na studijskom programu „Hemičar“ na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu (UB – HF) upisala je školske 2009/2010, a diplomirala 2013. sa prosečnom ocenom 9,19 i ocenom 10 na završnom radu, pri Katedri za analitičku hemiju (KAH). Master akademske studije na studijskom programu „Hemija“ na UB – HF pri KAH, upisala je školske 2013/2014, a diplomirala 2014. sa prosečnom ocenom 9,75 i ocenom 10 na završnom radu. Doktorske akademske studije na studijskom program „Hemija“ na UB – HF upisala je 2014. Kao istraživač pripravnik u Centru za hemiju Univerziteta u Beogradu – Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju počela je da radi u novembru 2016. Uključena je na domaći fundamentalni projekat pod nazivom: „Racionalni dizajn i sinteza biološki aktivnih i koordinacionih jedinjenja i funkcionalnih materijala, relevantnih u (bio)nanotehnologiji.“ U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2019. Od 2017. do danas bila je honorarno angažovana u izvođenju vežbu na KAH na UB – HF na sledećim predmetima: Analitička hemija 2 (302H1), Analitička hemija 2 (302B1/302B2), Bioanalitička hemija (341B1), Odabrane oblasti analitičke hemije (349A1/349A2), Odabrane metode instrumentalne analize (351H1/351H2), Analitičke metode u dizajnu i razvoju lekova (356H2). Član je Srpskog hemijskog društva od 2014. i Međunarodne asocijacije fizikohemičara od 2015. Govori srpski (maternji) i engleski jezik. Deo rezultata istraživanja, proisteklih iz ove disertacije, prikazani su u okviru 2 naučna rada (M21), 3 saopštenja na međunarodnim konferencijama i 1 saopštenja na konferenciji nacionalnog značaja.

Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije**I Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)**

1. **Olivera S. Marković**, Miloš P. Pešić, Ankita V. Shah, Abu T. M. Serajuddin, Tatjana Ž. Verbić, Alex Avdeef, Solubility-pH profile of desipramine hydrochloride in saline phosphate buffer: Enhanced solubility due to drug-buffer aggregates, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 133, 264–274, (2019).

ISSN: 0928–0987, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.03.014>,

IF₂₀₁₉ 3,616 (Pharmacology & Pharmacy 77/271)

2. **Olivera S. Marković**, Nirali G. Patel, Abu T. M. Serajuddin, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, Nortriptyline hydrochloride solubility-pH profiles in a saline phosphate buffer: drug-phosphate complexes and multiple pH_{max} domains with a Gibbs phase rule “soft” constraints, *Molecular Pharmaceutics*, 19, 710–719, (2022).

ISSN: 1543–8384, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00919>,

IF₂₀₂₀ 4,939 (Pharmacology & Pharmacy 69/276)

II Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **Olivera S. Marković**, Miloš P. Pešić, Tatjana Ž. Verbić, Alex Avdeef, pH-Dependent solubility profile of desipramine hydrochloride, *6th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery*, September 4–6, 2017, Zagreb, Croatia, Book of Abstracts, 42.

2. **Olivera S. Marković**, Miloš P. Pešić, Ankita V. Shah, Abu T. M. Serajuddin, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, Desipramine solubility studies: enhanced solubility due to drug-buffer aggregates, *8th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery*, September 9–11, 2019, Split, Croatia, Book of Abstracts, 17.

3. **Olivera S. Marković**, Miloš P. Pešić, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, pH-Dependent solubility profiles of imipramine and amitriptyline hydrochlorides, *8th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery*, September 9–11, 2019, Split, Croatia, Book of Abstracts, 51.

III Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Olivera S. Marković**, Nemanja Ž. Marjanović, Nirali Patel, Abu T. M. Serajuddin, Alex Avdeef, Tatjana Ž. Verbić, pH-Dependent solubility profile of nortriptyline hydrochloride, *57th Meeting of the Serbian Chemical Society*, June 18–19, 2021, Kragujevac, Serbia, Book of Abstracts, 32.

ISBN 978-86-7132-077-1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Оливера С. Марковић**

Број индекса **ДХ05/2014**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Проучавање равнотежа у хетерогеним системима трицикличних антидепресива: утицај агрегације и састава чврсте фазе на растворљивост

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 17.5.2022.

Потпис аутора

Оливера Марковић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Оливера С. Марковић
Број индекса	ДХ05/2014
Студијски програм	Хемија
Наслов рада	Проучавање равнотежа у хетерогеним системима трицикличних антидепресива: утицај агрегације и састава чврсте фазе на растворљивост
Ментор	др Татјана Ж. Вербић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 17.5.2022.

Потпис аутора

Оливера Марковић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Проучавање равнотежа у хетерогеним системима трицикличних антидепресива: утицај агрегације и састава чврсте фазе на растворљивост

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 17.5.2022.

Потпис аутора

Оливера Марковић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.