



Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Kinga Lange

**Badanie trwałości α - tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych
z cyklodekstrynami**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: prof. dr hab. Teresa Gierlach-Hładoń

Poznań 2012

Słowa kluczowe: α -tokoferol, cyklodekstryny, kompleksy inkluzyjne, trwałość w fazie stałej, parametry kinetyczne i termodynamiczne

Podziękowania

*dla **Pani Prof. dr hab. Teresy Gierlach-Hladoń**
za pomoc w czasie realizacji i redagowania pracy*

*dla **Pani Dr Barbary Ćwiertnia**
za ogromną życzliwość i cenne wskazówki
podczas realizacji pracy*

Pracę dedykuję Moim Rodzicom

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	9
2.1. Witamina E	9
2.1.1. Budowa chemiczna	9
2.1.2. Biosynteza i występowanie witaminy E.....	11
2.1.3. Wchłanianie i metabolizm.....	12
2.1.4. Zapotrzebowanie i niedobory witaminy E	14
2.1.5. Funkcje witaminy E w organizmie ludzkim	15
2.1.6. Wybrane metody analityczne stosowane do analizy tokoferolu	18
2.2. Cyklodekstryny	22
2.2.1. Budowa chemiczna i właściwości.....	23
2.2.2. Kompleksy inkluzyjne.....	25
2.2.3. Zastosowanie kompleksów inkluzyjnych.....	28
2.2.4. Przyszłość cyklodekstryn	30
3. CEL PRACY	33
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	35
4.1. Substancje do badań.....	35
4.2. Odczynniki.....	35
4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy.....	36
4.4. Metoda analityczna stosowana w ocenie trwałości α -tokoferolu oraz α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną oraz 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej.....	36
4.4.1. Selektywność metody.....	37
4.4.2. Liniowość metody.....	38
4.4.3. Precyzja metody	39
4.4.4. Granica detekcji i oznaczalności	40
4.4.5. Zakres i czułość metody	40
4.4.6. Dokładność metody.....	40
4.5. Otrzymywanie kompleksów inkluzyjnych α -tokoferolu z β -cyklodekstryną oraz 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej.....	42
4.5.1. Przygotowanie kompleksu inkluzyjnego z β -cyklodekstryną.....	42

4.5.2. Przygotowanie kompleksu inkluzyjnego z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną.....	42
4.6. Identyfikacja kompleksów inkluzyjnych α -tokoferolu z β -cyklodekstryną oraz 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej.....	42
4.6.1. Analiza metodą spektroskopii w podczerwieni (IR).....	42
4.6.2. Analiza metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC).....	43
4.6.3. Analiza metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ($^1\text{H-NMR}$) w fazie stałej.....	43
4.7. Ocena trwałości α -tokoferolu oraz α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną oraz z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną oraz α -tokoferolu w mieszaninach fizycznych w fazie stałej.....	48
4.7.1. Parametry kinetyczne reakcji.....	49
4.8. Analiza metodą LC-ESI-MS/MS produktów rozkładu α -tokoferolu oraz α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną.....	103
5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW.....	111
6. WNIOSKI.....	128
7. STRESZCZENIE.....	129
Summary.....	131
8. PIŚMIENNICTWO.....	133

1. WSTĘP

Witaminy to grupa organicznych związków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania wyższych organizmów żywych zarówno ludzi jak i zwierząt. Mechanizm działania witamin jest zróżnicowany, jednak wszystkie wpływają w sposób bezpośredni lub pośredni na procesy metaboliczne komórek, najczęściej jako koenzymy lub biologicznie aktywne składniki o charakterze hormonów. Zapotrzebowanie organizmów na witaminy, w zależności od ich rodzaju, wynosi od kilku- do kilkunastu mili- bądź mikrogramów na dzień, co w przeciwieństwie do niezbędnych w diecie nieorganicznych substancji, mikro- i makroelementów, jest stosunkowo małą ilością. Jednak nawet tak nieznaczny brak witamin w organizmie wiąże się z zaburzeniami procesów metabolicznych, czego efektem mogą być choroby układu sercowo-naczyniowego, reumatoidalne zapalenia stawów, zaburzenia reprodukcji oraz nowotwory [1, 2]. Ludzki organizm, ze względu na brak możliwości syntezy witamin, wymaga dostarczenia ich naturalnych postaci z pożywieniem, bądź suplementacji za pomocą produktów farmaceutycznych. Istotne jest przede wszystkim uzupełnianie poziomów witamin z grupy B, witamin C oraz P (witamin rozpuszczalnych w wodzie), gdyż w przeciwieństwie do witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, nie są one magazynowane w wątrobie. Konsekwencją tego zjawiska jest częstsza hipowitaminoza (niedobór) bądź awitaminoza (całkowity brak) witamin rozpuszczalnych w wodzie, natomiast z niedoborami witamin A, D, E bądź K mamy do czynienia, w przypadku wrodzonych bądź nabytych schorzeń wątroby czy pęcherzyka żółciowego [3]. Różnice w rozpuszczalności witamin wynikają przede wszystkim z ich odmiennej budowy chemicznej, która ma również wpływ na ich trwałość. Witaminy są narażone na destrukcję zarówno wewnątrz ludzkiego organizmu, jak i poza nim. Zewnętrznymi czynnikami uszkadzającymi cząsteczki są najczęściej światło słoneczne oraz temperatura [4]. Nietrwałość witamin zmusiła przemysł farmaceutyczny do poszukiwania metod zmieniających ich podatność na czynniki destrukcyjne. Początkowo najczęściej wykorzystywaną metodą było otrzymywa-

nie pochodnych estrowych witamin, które w organizmie ulegały hydrolizie do pierwotnej substancji. Jednak od czasu odkrycia cząsteczek cyklicznych oligosacharydów, rozpoczęto próby modyfikacji właściwości różnych substancji, m.in. witamin, poprzez kompleksowanie z cyklodekstrynami. Wbudowanie nietrwałej substancji do wnętrza cyklodekstryny, skutkuje otrzymaniem połączenia o odmiennych właściwościach. Utworzony kompleks inkluzyjny z daną substancją może wpływać na nią stabilizująco, zwiększać jej rozpuszczalność oraz biodostępność, co zostało wykorzystane w przypadku kompleksowania m. in. kwasu retinowego [5] czy witaminy K₃ [6].

Wszystkie nowo otrzymane połączenia muszą zostać przebadane m. in. pod względem biodostępności czy trwałości. Procedury prowadzenia badań trwałości leków oraz wymogi trwałości muszą być zgodne z postanowieniami Międzynarodowej Konferencji Harmonizacji Wymagań dla Leków (ICH Q1) [7]. Wg ICH Q1A testy przyspieszonego starzenia powinny być przeprowadzane w warunkach podwyższonej temperatury (min. trzy różne temperatury z przyrostem o 10°C), podwyższonej wilgotności względnej (75% lub więcej), hydrolizy w szerokim zakresie pH, utleniania (3 - 30% H₂O₂), fotolizy. W ocenie trwałości substancji leczniczej istotny jest także wybór metody analitycznej (powinna być odpowiednio selektywna, czuła oraz dokładna). Dodatkowo musi ona zostać zwalidowana zgodnie z wytycznymi ICH Q2A i Q2B oraz FDA (Food and Drug Administration) i USP (United States Pharmacopeia) [8].

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

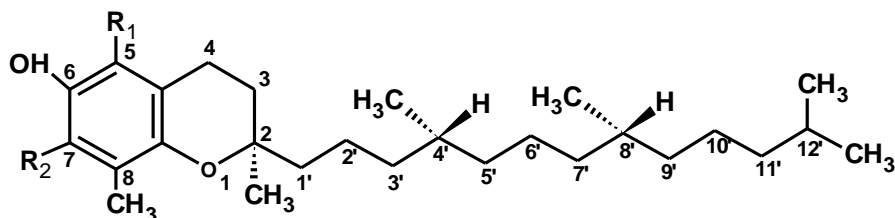
2.1. Witamina E

W 1922 r. H. Evans i K. Bishop odkryli witaminę E obserwując wpływ diety na rozmnażanie szczurów. Pomimo pożywienia bogatego w składniki odżywcze, szczury cechowała bezpłodność. Uzupełnienie diety w tłuszcze przywróciło prawidłową reprodukcję. Sposób odkrycia witaminy ściśle koreluje z jej drugą nazwą ‘ tokoferol ’, pochodzący od greckich słów ‘ thokos ’ - potomstwo i ‘ phero ’ – rodzeństwo [9, 10]. Obecnie termin witamina E jest generyczną nazwą grupy związków, która obejmuje osiem różnych substancji o zbliżonej budowie strukturalnej. Następnym budowy jest zdolność tokoferolu do przerywania rodnikowych łańcuchowych reakcji utleniających, co w konsekwencji pozwala chronić integralność tkanek. W efekcie pełni on znaczącą rolę w procesach życiowych wpływając wszechstronnie na żywe organizmy.

2.1.1. Budowa chemiczna

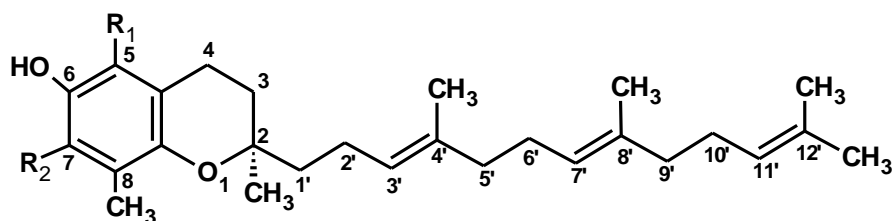
Struktura chemiczna całej grupy to tokochromanole [11]. W cząsteczce można wyróżnić polarną ‘ głowę ’ składającą się z układu chromanu (zbudowaną z dwóch pierścieni: fenolowego i heterocyklicznego) oraz fitylowy łańcuch boczny. Taka budowa cechuje zarówno tokoferole, jak i tokotrienole. Nasycenie 16-węglowego łańcucha bocznego rozróżnia tokoferole od tokotrienoli. Druga grupa posiada trzy izolowane wiązania podwójne w pozycjach 3’, 7’ i 11’ łańcucha. Natomiast podstawienie grup metylowych w różnych pozycjach pierścienia chromanu decyduje o podziale na α , β , γ i δ pochodne tokoferoli oraz tokotrienoli. Wszystkie pochodne posiadają grupy CH_3 w pozycjach 2 i 8 pierścienia, różnica dotyczy pozycji 5 i 7, które to warunkują aktywność biologiczną. Dodatkowo w cząsteczce tokoferolu istnieją trzy centra chiralne (2’, 4’ i 8’), których konsekwencją jest wy-

stępowanie ośmiu możliwych form stereoizomerów [3, 9, 10, 11]. Izomeryzacja wraz z liczbą podstawionych grup metylowych w pierścieniu, mają zdecydowany wpływ na czas półtrwania danej pochodnej. Okres trwałości oraz powinowactwo do białek wiążących tokoferol warunkuje największą aktywnością biologiczną RRR- α -tokoferolu [12, 13].



Tokoferole	R ₁	R ₂	Nazwa chemiczna
α -Tokoferol (α -T)	CH ₃	CH ₃	3,4-dihydro-2,5,7,8-tetrametylo-2-(4',8',12'-trimetylo-tridecylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,5,7,8-tetrametylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-6-chromanol
β -Tokoferol	CH ₃	H	3,4-dihydro-2,5,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,5,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-6-chromanol
γ -Tokoferol	H	CH ₃	3,4-dihydro-2,7,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,7,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-6-chromanol
δ -Tokoferol	H	H	3,4-dihydro-2,8-dimetylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-6-chromanol

Ryc. 1. Budowa strukturalna oraz nazwa chemiczna tokoferoli.



Tokotrienole	R ₁	R ₂	Nazwa chemiczna
α-Tokotrienol	CH ₃	CH ₃	3,4-dihydro-2,5,7,8-tetrametylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11'-tridekatrienylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,5,7,8-tetrametylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11',-tridekatrienylo)-6-chromanol
β-Tokotrienol	CH ₃	H	3,4-dihydro-2,5,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11'-tridekatrienylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,5,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11',-tridekatrienylo)-6-chromanol
γ-Tokotrienol	H	CH ₃	3,4-dihydro-2,7,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11'-tridekatrienylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,7,8-trimetylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11',-tridekatrienylo)-6-chromanol
δ-Tokotrienol	H	H	3,4-dihydro-2,8-dimetylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11'-tridekatrienylo)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,8-dimetylo-2-(4',8',12'-trimetylo-3',7',11',-tridekatrienylo)-6-chromanol

Ryc. 2. Budowa strukturalna oraz nazwa chemiczna tokotrienoli.

2.1.2. Biosynteza i występowanie witaminy E

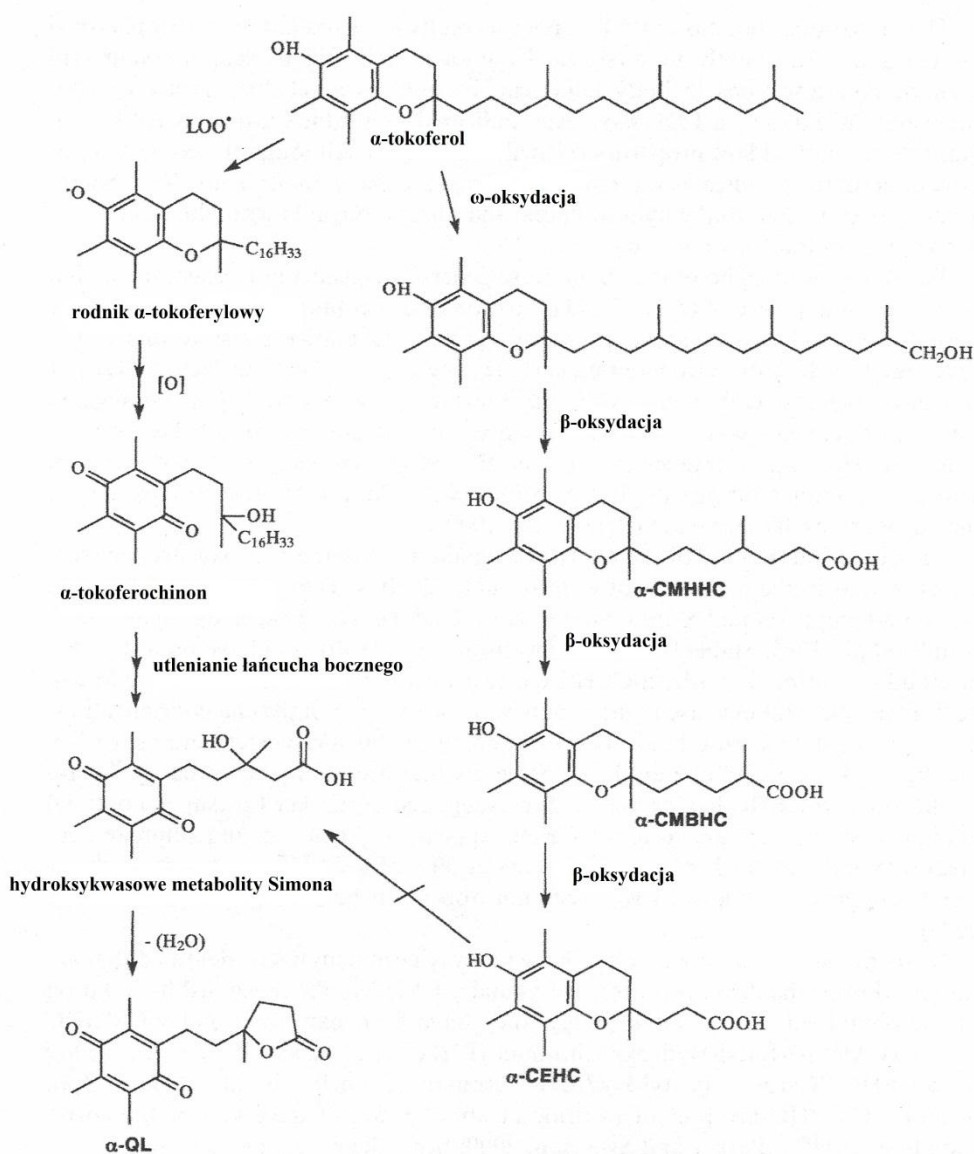
Tokoferole są syntezowane wyłącznie przez rośliny oraz fotosyntetyzujące mikroorganizmy. Początkowy etap syntezy przebiega dwutorowo i składa się ze szlaku szikimowego oraz niemewalonowego. Skutkuje to powstaniem 2-metylo-6-fitylohydrochinonu, który jest wspólnym prekursorem wszystkich tokoferoli. Następnym etapem jest cyklizacja

pierścienia oraz reakcja metylacji, w wyniku której powstają α , β , γ i δ pochodne [14, 15]. W roślinach α -tokoferol dominuje w tkankach fotosyntetyzujących, dzięki temu pomaga w utrzymaniu optymalnego poziomu fotosyntezy w warunkach stresu oksydacyjnego, natomiast w tkankach nefotosyntetyzujących obecny jest głównie γ -tokoferol, który chroni przed autooksydacją nienasycone kwasy tłuszczowe [16, 17]. Produkty roślinne bogate w witaminę E to ziarna zbóż, nasiona i orzechy [18]. W porównaniu do tokoferoli, tokotrienole są zdecydowanie mniej rozpowszechnione w świecie roślinnym [19]. Głównym źródłem tokotrienoli jest olej palmowy, z kolei najwyższą zawartością α -tokoferolu charakteryzuje się oliwa z oliwek, pozostałe pochodne jak β -, γ -, δ -tokoferol znajdują się odpowiednio w oleju pszenicznym, oleju z rzepaku, oraz sojowym [18, 20].

2.1.3. Wchłanianie i metabolizm

Witamina E jest niezbędnym składnikiem odżywczym dla ludzkiego organizmu, stąd konieczność dostarczania jej z pożywieniem bądź z suplementami diety [21]. Mechanizm wchłaniania w organizmie jest uwarunkowany znikomą rozpuszczalnością witaminy w polarnych rozpuszczalnikach. Resorpcja odbywa się w dwunastnicy w postaci czystej formy alkoholowej, bez preferencji w stosunku do rodzaju izomeru. Kinetyka absorpcji jest porównywalna dla wolnego tokoferolu i jego estrów. Estrы tokoferolu są rozkładane przez hydrolazę w jelicie w obecności kwasów żółciowych i enzymów trzustki [22, 23]. Wchłonięte z jelita cienkiego tokoferole zostają połączone z chylomikronami. Następnie są one transportowane przez krew bądź układ limfatyczny w kierunku wątroby oraz innych tkanek. Katabolizm chylomikronów przez lipazę lipoproteinową umożliwia przedostanie się tokoferolu do wątroby i tkanek obwodowych, ewentualnie do innych lipoprotein. W wątrobie ma miejsce preferencyjne wiązanie izomerycznej formy RRR-tokoferolu z lipoproteinami o bardzo niskiej gęstości (VLDL), za co odpowiedzialne jest białko przenoszące α -tokoferol (α -TTP) [24, 25, 26]. W wyniku metabolizmu frakcji VLDL tokoferol znajduje się również w lipoproteinach o niskiej oraz o wysokiej gęstości (LDL i HDL) [27, 28]. W efekcie ponad połowa całego α -tokoferolu jest obecna we frakcji o niskiej gęstości (LDL), która jest głównym przenośnikiem tokoferolu we krwi. Z kolei lipoproteiny VLDL są odpowiedzialne za przenoszenie tokoferolu do tkanek obwodowych [25]. Wydzielanie witaminy E do krwi przez wątrobę oraz jej zdolność do metabolizowania tokoferoli i tokotrienoli, przeciwieństwo do innych witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, zapobiega ich kumulacji do toksycznego poziomu. Istnieją dwa typy metabolitów witaminy E powstające w

zależności od sposobu przemiany substancji. Pierwszy mechanizm rozkładu jest związany z działaniem antyoksydacyjnym tokoferoli wskutek otwarcia hydroksychromanowego pierścienia - powstaje chinonowy lakton. Drugi sposób powstawania metabolitów, zależny od cytochromu P - 450, ma miejsce w wątrobie, gdzie w wyniku ω-oksydacji fitylowego łańcucha bocznego a następnie β-oksydacji następuje jego skrócenie. Powstające produkty odpowiednio z α-tokoferoli i α-tokotrienoli oraz γ-tokoferoli i γ-tokotrienoli to α-CECH (2,5,7,8-tetrametylo-2-(2'-karboksyetylo)-6-hydroksychroman) oraz γ-CECH (2,7,8-trimetylo-2-(2'karboksyetylo)-6-hydroksychroman), są następnie poddawane glukuronidacji i sulfonowaniu oraz zostają wydalone z moczem bądź żółcią [25, 29, 30, 31].



Ryc. 3. Metabolity tokoferolu: α-CMHHC - karboksy-metylo-hydroksy-chroman; α-CMBHC - karboksy-metylo-butylo-hydroksy-chroman; α-QL – chinonowy lakton.

2.1.4. Zapotrzebowanie i niedobory witaminy E

Określenie ilości witaminy E, jaka powinna być dostarczana do ludzkiego organizmu, zmienia się na przestrzeni ostatnich 20 - 30 lat. Jest to spowodowane przede wszystkim zdefiniowaniem różnic w aktywności biologicznej konkretnych pochodnych tokoferoli. Pierwotnie ilości witaminy E mierzono wg miligramów ekwiwaleńtów tokoferoli (α -TE), w których skład były wliczane, oprócz naturalnego i syntetycznego tokoferolu, również takie pochodne jak β -, γ -, δ -tokoferole. Od 2000 r. rozpoczęto określanie zapotrzebowania biorąc pod uwagę przede wszystkim naturalny α -tokoferol oraz 2R-streoizomer formy syntetycznej, ze względu na ich najwyższą aktywność biologiczną. Zawartość witaminy E w naturalnych i wzbogacanych źródłach jest podawana w jednostkach międzynarodowych (IU) [32]. Obecnie jedna międzynarodowa jednostka witaminy E jest zdefiniowania, jako 1 mg all-rac-octanu- α -tokoferolu, 0.74 mg RRR-octanu- α -tokoferolu oraz 0.67 mg RRR- α -tokoferolu [33, 34]. Zalecane dzienne spożycie witaminy E waha się od 10 mg określonych przez Europejską Radę Informacji o Żywności (EUFIC) dla Europejczyków [35], do 15 mg wg Zarządu Żywności i Żywienia Instytutu Medycyny Narodowej Akademii Nauk w Stanach Zjednoczonych (FNB of IOM) [36]. Istnieją również źródła sugerujące dzienną dawkę na poziomie 80 - 100 mg na dzień [37], jednak nawet tak duża ilość nie przekracza górnego tolerowanego poziomu spożycia, który dla osób dorosłych wynosi 300 mg ekwiwaleńtów α -tokoferolu/dzień [38].

Mechanizmy regulujące ilość witaminy E w organizmie, zdolność organizmu do jej magazynowania oraz znacząca ilość pożywienia bogatego w jej naturalną formę, chronią przed niedoborem tokoferolu, który bardzo rzadko objawia się u ludzi. Jednakże w szczególnych przypadkach, w wyniku zespołu złego wchłaniania, przewlekłym zapaleniu jelit, marskości wątroby, w przypadku skrajnego niedożywienia oraz w wyniku autosomalnej choroby recesywnej – ataksji z izolowanym brakiem witaminy E, mamy do czynienia z niedostateczną ilością tokoferolu w organizmie [39, 40]. Pacjentów dotkniętych ataksją cechuje niezdolność do wbudowywania cząsteczek tokoferolu do lipoprotein, co następnie skutkuje bardzo niskim poziomem tokoferolu we krwi [41, 42]. Daleko idące skutki niedoboru to przede wszystkim zaburzenia funkcjonowania i osłabienie mięśni szkieletowych (dystrofia), zaburzenia neurologiczne, niedokrwistość oraz bezpłodność. Suplementacja tokoferolem na poziomie terapeutycznym wpływa znacząco na stabilizację lub poprawę neurologicznej sprawności organizmu lub niwelowanie neurologicznych zaburzeń powstałych w wyniku choroby. Z kolei profilaktyczne uzupełnianie diety jest w stanie całkowicie

zapobiec rozwojowi choroby neurologicznej wynikającej z niedoboru składnika [43, 44, 45].

2.1.5. Funkcje witaminy E w organizmie ludzkim

Początkowo witamina E była uważana jedynie za składnik dietetyczny, który jest niezbędny do prawidłowej reprodukcji ludzi i zwierząt. Jej znaczenie zwiększyło się diametralnie po odkryciu właściwości antyoksydacyjnych, dzięki którym chroniona jest integralność tkanek, co w konsekwencji wpływa na wszystkie procesy życiowe organizmów. Dalsze badania dowiodły również, że witamina E może w odpowiednich warunkach zahamowywać wzrost komórek mięśni gładkich, wpływać na aktywność kinazy C, na transkrypcję niektórych genów [10], a także nawet charakteryzować się właściwościami prooksydacyjnymi [46]. Efekty wywoływane przez witaminę E w organizmie różnią się w zależności od działającej pochodnej. Najnowsze badania wykazały, że największą wydajność działania w organizmie, w porównaniu do samego naturalnego α -tokoferolu, posiada mieszanka naturalnych tokoferoli [47]. Główne działanie witaminy E opiera się na:

- 1) Właściwościach antyoksydacyjnych [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59]
Istotą działania antyoksydacyjnego tokoferoli, w przeciwieństwie do innych antyutleniaczy usuwających tylko reaktywne cząsteczki tlenu, jest przerwanie łańcuchowej reakcji autooksydacji lipidów. Reakcja ta jest enzymoniezależna oraz bardzo efektywna. Na jej wysoką wydajność wpływa szybkość, z jaką zachodzi (tokoferol szybciej reaguje z rodnikiem nadtlenkowym niż sam rodnik jest w stanie wykonać jakąkolwiek inną reakcję) oraz możliwość ponownego przywrócenia aktywności cząsteczce tokoferolu (przez redukcję witaminą C lub ubichinonem). Ponadto podczas tej reakcji powstaje stabilny, nieszkodliwy, nierodnikowy produkt (tokoferol w postaci rodnikowej reaguje tylko z innym rodnikiem tworząc stabilny produkt nierodnikowy). Mechanizm zmiatania wolnych rodników zależy od atakującego czynnika, tokoferol inaczej reaguje z tlenem singletowym aniżeli z rodnikami alkilowymi. Za przeciwutleniające właściwości chemicznie odpowiedzialny jest głównie wodór z grupy wodorotlenowej przy węglu C6. W przypadku α -tokoferolu podstawienie trzech elektrono-donorowych grup metylowych do pierścienia chromanu, skutkuje łatwiejszym oderwaniem wodoru z grupy $-OH$, w efekcie α -tokoferol działa najefektywniej. Oprócz działania antyutleniającego to-

koferoli polegającego na hamowaniu peroksydacji lipidów, wywołanej przez reaktywne formy tlenu, tokoferole i tokotrienole mają również zdolność do wylapywania reaktywnych form tlenu azotu. Zdecydowanie największe zdolności detoksykujące nadtlenu azotu wykazuje γ -tokoferol, co jest spowodowane obecnością nukleofilowego węgla C5 w pierścieniu niepodstawionym grupą metylową. Zdecydowany wzrost ilości 5-nitro- γ -tokoferolu, produktu powstającego w wyniku nitracji lipidów, został zaobserwowany w obszarach mózgu osób dotkniętych chorobą Alzheimera, co potwierdza protekcyjne działanie γ -tokoferolu wobec związków azotu.

2) Działaniu antykancerogennemu

Przeciwnowotworowe działanie witaminy E przebiega dwutorowo, jest pośrednio związane z efektem przeciwutleniającym oraz bezpośrednio z hamowaniem podziału komórek nowotworowych. Pośrednio niedobory tokoferolu powodują wzrost ilości reaktywnych form tlenu przyczyniających się do mutacji komórek, co w konsekwencji skutkuje rozwojem nowotworu. Odpowiednia suplementacja tokoferolu zapewnia działanie protekcyjne, dlatego przyjmuje się, że spadek liczby raków sutka, czy przerzutów do płuc jest związany z aktywnością przeciwutleniającą witaminy E [60]. Bezpośrednie działanie przeciwnowotworowe tokoferoli i tokotrienoli wynika z ich zdolności do indukowania apoptozy komórek nowotworów złośliwych [18, 61]. Poprzez estryfikację fenolowej grupy pierścienia chromanu kwasami np. bursztynowym czy maleinowym, zostają zmniejszone właściwości antyoksydacyjne molekule, za które odpowiedzialna jest wolna grupa hydroksylowa, a zestryfikowana cząsteczka α -tokoferolu zyskuje silne właściwości apoptogenne. Wyjątkiem nie wymagającym modyfikacji jest γ -tokotrienol [62]. Porównując przeciwnowotworowe działanie α -tokoferolu [63, 64, 65, 66, 67] w stosunku do mieszaniny tokoferoli [18] i tokotrienoli [68, 69, 70] jest ono znacznie większe w przypadku mieszaniny [18]. Zaobserwowano również synergistyczne zwiększone działanie tokoferolu z selenem skutkujące redukcją liczby raków sutka czy wydłużeniem czasu uśpienia nowotworu [71, 72, 73, 74]. Zdecydowana przewaga tokoferoli i tokotrienoli, jako leków przeciwnowotworowych wynika z ich zdolności do zahamowania proliferacji tylko komórek rakowych, bez wpływu na zdrowe komórki i tkanki [75, 76]. Mechanizm działania przeciwnowotworowego jest związany z pochodzeniem gatunkowym tkanki (ludzka czy ptasia) oraz typem ko-

mórek (piersń, żołądek, prostata) [77, 78, 79]. Indukcja apoptozy głównie ma miejsce poprzez zahamowanie szlaku kinazy białkowej C/fosfatazy 2 [80, 81]. W przypadku raka prostaty niszczenie komórek nowotworowych zachodzi poprzez modyfikacje ścieżki w mitochondrium - rozłam polimeraz oraz aktywację kaspaz [82], w przypadku raka sutka tokotrienole hamują proliferację poprzez modyfikacje ludzkiego pozytywnego i negatywnego receptora estrogenowego [66, 67, 83].

3) Działaniu przeciwmiażdżycowemu, przeciwnadciśnieniowemu oraz przeciwzapalnemu

Poszczególne pochodne z rodziny tokoferoli wpływają różnorodnie na przyczyny odpowiedzialne za rozwój miażdżycy oraz nadciśnienia. Początkowo działanie przeciwmiażdżycowe wiązano z protekcyjnym wpływem przeciwutleniającym tokoferoli na cząsteczki LDL [84, 85]. Obecnie znany jest blokujący wpływ tokoferoli na mechanizmy indukujące rozwój miażdżycy tętnic czy nadciśnienia. Przyczyniające się do rozwoju choroby nadmierna adhezja i agregacja płytek do ścian naczyń krwionośnych, jest hamowana przy nawet tak niskiej dawce tokoferolu jak 75 IU/dzień [86]. γ -Tokoferol w zdecydowanie większym stopniu hamuje adhezję niż α -tokoferol [87]. Miażdżycą tętnic jest chorobą zapalną, dlatego też w jej trakcie dochodzi do powstawania mediatorów stanu zapalnego prostaglandyn i leukotrienów, w wyniku działania enzymów takich jak cyklooksyzgenazy (COX-2) i lipooksyzgenazy (5-LOX) [88, 89]. Tokoferole, zwłaszcza γ -tokoferol, hamując aktywność wymienionych oksygenaz zmniejszają ilość mediatorów stanu zapalnego pogłębiających arteriosklerozę [90, 91, 92]. Dalsze działanie przeciwmiażdżycowe tokoferoli jest związane ze zdolnością blokowania przez α -tokoferol poboru utlenionych cząsteczek LDL przez makrofagi. Modyfikując receptory wychwytyjące frakcję LDL (SR-A i CD36) na ich powierzchni, zapobiega on przekształcaniu makrofagów w komórki gąbczaste i odkładaniu ich na ścianach tętnic, w konsekwencji chroni to przed zwężeniem światła naczyń i zapobiega miażdżycy [93, 94, 95, 96]. Nadmierny podział komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych jest także jednym z głównych mechanizmów rozwoju miażdżycy i nadciśnienia. Zahamowanie proliferacji komórek naczyń mięśni gładkich poprzez inaktywację kinazy białkowej C, przyczynia się do normalizacji ścian naczyń i zapobiega zmianom miażdżycowym. Działanie hamujące kinazę białkową C jest charakterystyczne dla α -tokoferolu w przeciwieństwie do β -tokoferolu [46, 97, 98, 99].

2.1.6. Wybrane metody analityczne stosowane do analizy tokoferolu

Oznaczanie witamin w preparatach farmaceutycznych i w płynach ustrojowych wymaga wysokoselektywnych technik analitycznych charakteryzujących się wysoką czułością i selektywnością. Należą do nich m.in. metody chromatograficzne. W badaniach trwałości tokoferolu najczęściej używaną metodą jest wysokosprawną chromatografią cieczową w odwróconym układzie faz. Farmakopealna metoda oznaczania tokoferolu wykorzystuje jednak metodę chromatografii gazowej [100]. Charakterystyka RRR- α -tokoferolu wg Farmakopei Polskiej VIII została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka RRR- α -tokoferolu wg Ph. Eur. 6.0 i Farmakopei Polskiej VIII

Ph. Eur. 6.0 i FP VIII	
Wzór sumaryczny	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
Masa cząsteczkowa	430.7
Definicja	Nazwa chemiczna: (2R)-2,5,7,8-tetrametylo-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimetylodecylo]-3,4-dihydro-2H-1-benzopirany-6-ol Zawartość: od 94.5% do 102.0%
Właściwości	Wygląd: Przezroczysta, bezbarwna lub żółtawobrunatna lepka, oleista ciecz Rozpuszczalność: Substancja praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, łatwo rozpuszczalna w acetonie, bezwodnym etanolu, chlorku metylenu i olejach tłustych
Tożsamość	A. Skręcalność optyczna: od -0.01° do +0.01° Rozpuścić 2.50 g substancji w bezwodnym etanolu OD i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 25.0 ml B. Absorpcyjna spektrofotometria w podczerwieni Porównanie α -tokoferol CSP C. Chromatografia cienkowarstwowa <i>Roztwór badany:</i> Rozpuścić 10 mg substancji badanej w 2 ml cykloheksanu OD <i>Roztwór porównawczy:</i> Rozpuścić 10 mg α -tokoferolu CSP w 2 ml cykloheksanu OD <i>Płytki:</i> płytka TLC z żelazem krzemionkowym F ₂₅₄ OD <i>Faza ruchoma:</i> eter etylowy OD, cykloheksan OD (20:80 V/V) <i>Naniesienie:</i> 10 μ l

	<p><i>Rozwijanie:</i> na odległość 2/3 płytki</p> <p><i>Suszenie:</i> w strumieniu powietrza</p> <p><i>Detekcja:</i> obeerzcę w nadfiolecie przy 254 nm</p> <p><i>Wyniki:</i> plama główna na chromatogramie roztworu badanego wykazuje położenie i wielkość zgodną z plamą główną na chromatogramie roztworu porównawczego</p>
Badania	<p>Substancje pokrewne</p> <p>Chromatografia gazowa</p> <p><i>Roztwór wzorca wewnętrznego:</i> Rozpuścić 1.0 g skwalanu OD w cykloheksanie OD i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 100.0 ml</p> <p><i>Roztwór badany (a):</i> Rozpuścić 0.100 g substancji badanej w 10.0 ml roztworu wzorca wewnętrznego</p> <p><i>Roztwór badany (b):</i> Rozpuścić 0.100 g substancji badanej w 10.0 ml cykloheksanu OD</p> <p><i>Roztwór porównawczy (a):</i> Rozpuścić 0.100 g α-tokoferolu CSP w 10.0 ml roztworu wzorca wewnętrznego</p> <p><i>Roztwór porównawczy (b):</i> Rozpuścić 10 mg α-tokoferolu OD i 10 mg octanu α-tokoferylu OD w cykloheksanie OD i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 100.0 ml</p> <p><i>Kolumna:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> -materiał: stopiona krzemionka -wymiary: długość 30 m; średnica wewnętrzna 0.25 mm; -faza nieruchoma: poli(dimetylo)siloksan OD (grubość warstwy 0.25 μm) <p><i>Gaz nośny:</i> hel do chromatografii OD</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 1 ml/min</p> <p><i>Stosunek strumienia dzielonego:</i> 1:100</p> <p><i>Temperatury:</i> kolumna 280°C, dozownik próbki 290°C, detektor 290°C</p> <p><i>Detekcja:</i> płomieniowo-jonizacyjna</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 1 μl roztworu badanego (b) i roztworu porównawczego (b)</p> <p><i>Przydatność układu:</i> roztwór porównawczy (b)</p> <ul style="list-style-type: none"> -rozdzielczość: nie mniej niż 3.5 pomiędzy pikami α-tokoferolu i octanu α-tokoferylu <p><i>Wartości graniczne:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> -suma zanieczyszczeń: nie więcej niż 4.0% -wartość graniczna pominięcia: 0.1%
Zawartość	<p>Chromatografia gazowa jak podano w badaniu substancji pokrewnych:</p> <ul style="list-style-type: none"> -wprowadzenie: roztwór badany (a) i roztwór porównawczy (a)
Przechowywanie	Pod gazem obojętnym, chroniąc od światła

Zanieczyszczenia	<p>A. 2,8-dimetylo-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimetylotridecylo]-3,4-dihydro-2H-1-benzopiran-6-ol (RRR-δ-tokoferol)</p> <p>B. 2,5,8-trimetylo-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimetylotridecylo]-3,4-dihydro-2H-1-benzopiran-6-ol (RRR-β-tokoferol)</p> <p>C. 2,7,8-trimetylo-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimetylotridecylo]-3,4-dihydro-2H-1-benzopiran-6-ol (RRR-γ-tokoferol)</p>
-------------------------	--

Do oznaczeń witaminy E w preparatach farmaceutycznych stosuje się różne modyfikacje wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej. W tabeli 2 zostały przedstawione wybrane metody analityczne oznaczania α -tokoferolu.

Tabela 2. Porównanie wybranych parametrów metod analitycznych stosowanych w analizie α -tokoferolu

Metoda	Parametry rozdzielu	Zastosowanie metody, Piśmiennictwo
1	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Nova-Pack C18 (150 x 3.9 mm, 4 μm), odwrócony układ faz • Faza ruchoma: metanol - acetonitryl (95:5) • Szybkość przepływu: 2 ml/min • Detekcja UV: 285 nm • Wielkość nastrzyku: 20 μl 	Oznaczenie rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w tłuszczach witamin w preparatach farmaceutycznych [101]
2	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Nucleosil 100 - 5, (250 x 4.6 mm), normalny układ faz • Faza ruchoma: heksan-dioksan-2-propanol (96.7:3:0.3) • Szybkość przepływu: 1.45 ml/min • Detekcja: APCI - MS • Wielkość nastrzyku: 40 μl 	Równoczesne oznaczanie witamin A, D ₃ , E w mieszankach mlecznych dla dzieci [102]
3	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: LiChrospher RP - 18 (250 x 4 mm, 5 μm), plus prekolumna: LiChrospher RP - 18 (4 x 4 mm, 5 μm) • Faza ruchoma metanol - woda (96:4) • Szybkość przepływu: 1.0 ml/min • Detekcja UV: 295 nm • Wielkość nastrzyku: 20 μl 	Oznaczenie witamin A i E w mleku w proszku [103]

4	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Kromasil 100 RP-18 (150 x 4.6 mm, 5 μm) plus prekolumna Perkin Elmer RP-18 (30 x 4.6 mm, 10 μm) • Faza ruchoma: metanol - woda (96:4) • Szybkość przepływu: 2.2 ml/min • Detekcja UV: 292 nm • Wielkość nastrzyku: 20 μl 	Oznaczenie rozpuszczalnych w tłuszczach przeciwutleniających witamin w ludzkiej surowicy [104]
5	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: LiChrospher RP - 18 (250 x 4 mm, 5 μm), plus prekolumna: LiChrospher RP - 18 (4 x 4 mm, 5 μm) • Faza ruchoma: metanol - woda (93:7) • Szybkość przepływu: 1.4 ml/min • Detekcja UV: 292 nm • Wielkość nastrzyku: 20 μl 	Kinetyczny rozkład tokoferolu w hydrofilowych żelach [105]
6	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Tracer Extrasil ODS2 (250 x 4 mm, 5 μm) • Faza ruchoma: metanol - acetonitryl (30:70) • Szybkość przepływu: 1.0 ml/min • Detekcja UV: 205 nm • Wielkość nastrzyku: 20 μl 	Oznaczenie α -tokoferolu w makroalgach [106]
7	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Pinnacle II (50 x 2.1 mm, 3 μm), plus prekolumna (10 x 2 mm) • Faza ruchoma: 0.5% octan etylu: heksan • Szybkość przepływu: 0.4 ml/min • Detekcja (DAD): 284 nm • Wielkość nastrzyku: 20 μl 	Równoczesne oznaczenie witaminy A i E w mieszankach mlecznych dla dzieci [107]
8	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Spheri-5-ODS (100 x 2.1 mm, 5 μm) • Faza ruchoma: gradient acetonitryl - metanol (85:15) przez 5 min, acetonitryl - chlorek metylenu - metanol (70:20:10) przez 20 min • Detekcja UV: 294 nm • Wielkość nastrzyku: 7.5 μl 	Równoczesne oznaczenie witamin A, E, 25-OH-witaminy D, zastosowanie w badaniach klinicznych [108]
9	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Nucleosil 120 (150 x 46 mm, 5 μm) • Faza ruchoma: metanol - woda (96.5:3.5) • Szybkość przepływu: 2 ml/min • Detekcja: fluorymetryczna $\lambda_{wz} = 295$ i $\lambda_{em} = 350$ nm przez 9 min, następnie $\lambda_{wz} = 330$ i $\lambda_{em} = 400$ nm 	Równoczesne oznaczenie witamin A i E w szurzych tkankach [109]

10	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Sep-Pak C18 (220 x 4.6 mm, 5 μm), plus prekolumna RP - 18 (15 x 3.2 mm, 7 μm) • Faza ruchoma: metanol - woda (99:1) • Szybkość przepływu: 1.0 ml/min • Detekcja: elektrochemiczna +1300 mV (Ag/AgCl) oraz UV = 280 nm • Wielkość nastrzyku: 10 μl 	Oznaczenie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach w jogurtach [110]
11	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna analityczna: Zorbax ODS (150 x 4.6 mm), plus kolumna (100 x 4.6 mm) • Faza ruchoma: metanol - woda • Szybkość przepływu: 1.0 ml/min • Detekcja UV: 280 nm • Wielkość nastrzyku: 10 μl 	Porównanie rozdzielności witamin rozpuszczalnych w tłuszczach metodami: wysokosprawnej chromatografii cieczowej i micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej [111]

2.2. Cyklodekstryny

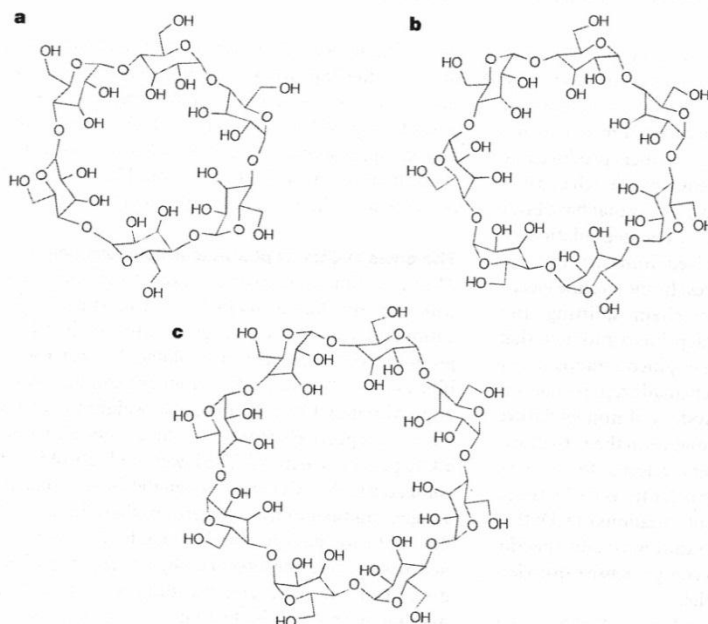
Odkrycie przez Villersa w 1891 r. cząsteczek o właściwościach kompleksujących zrewolucjonizowało rynek farmaceutyczny [112]. Substancje trudno rozpuszczalne w wodzie, lotne czy też nietrwałe chemicznie poprzez kompleksowanie zyskują zupełnie nowe, poprawione właściwości [113, 114]. Makrocycliczne węglowodory charakteryzujące się tak pożądanymi właściwościami kompleksującymi nazywane są cyklodekstrynami (CD) [115, 116]. Obecnie cykliczne dekstrozy są stosowane w wielu dziedzinach m.in. w przemyśle kosmetycznym [117], tekstylnym [118], żywieniowym [119], są również wykorzystywane do ochrony środowiska [120]. W przemyśle farmaceutycznym cyklodekstryny stosuje się w celach modyfikacji leków, co skutkuje zwiększeniem biodostępności np. prednizolonu [121], zwiększeniem stabilności w fazie stałej np. quinalaprilu [122], zwiększeniem absorpcji po podaniu doustnym, doodbytniczym [123] czy transdermalnym [124], zredukowaniem lokalnych podrażnień dermalnych [123] oraz zwiększeniem rozpuszczalności w wodzie substancji lipofilnych [125].

2.2.1. Budowa chemiczna i właściwości

Cyklodekstryny są grupą cyklicznych oligocukrów powstających podczas enzymatycznej degradacji skrobi. W wyniku działania enzymu glukotransferazy następuje rozrywanie wiązań α -1,6-glukozylowych i przestrzenna modyfikacja cząsteczek skrobi. W efekcie, za pomocą wiązań α -1,4-glukozylowych, powstaje cykliczne połączenie jednostek D-glukopiranoz [126]. Stopień polimeryzacji jest oznaczany greckimi literami α , β , γ , δ co odpowiada analogicznie cyklodekstrynie zbudowanej z 6, 7, 8, 9 jednostek glukozy [127, 128].

Tabela 3. Charakterystyka wybranych cyklodekstryn [129]

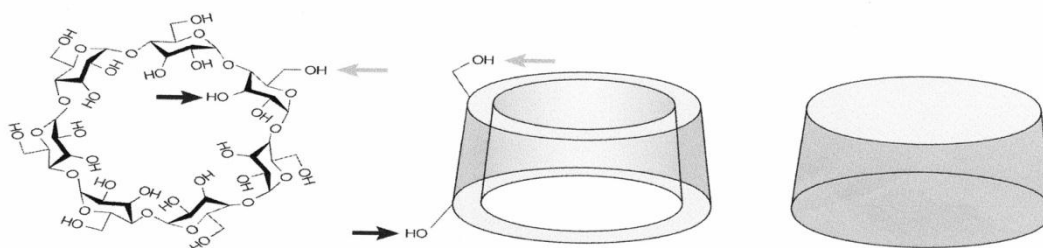
	α	β	γ	Δ
Liczba jednostek glukopiranoz	6	7	8	9
Masa cząsteczkowa	972	1135	1297	1459
Rozmiar wnęki cyklodekstryny (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3	10.3-11.2
Rozpuszczalność w wodzie 25°C(g/100 ml)	14.50	1.85	23.20	8.19



Ryc. 4. Schemat strukturalnej budowy wybranych cyklodekstryn: a – α -cyklodekstryna (α -CD); b – β -cyklodekstryna (β -CD); c - γ -cyklodekstryna (γ -CD) [126].

Pomimo powszechnego przekonania, że ze względów sterycznych cyklodekstryny z większą liczbą piranoz niż 6 nie powinny występować, istnieją doniesienia o cząstecz-

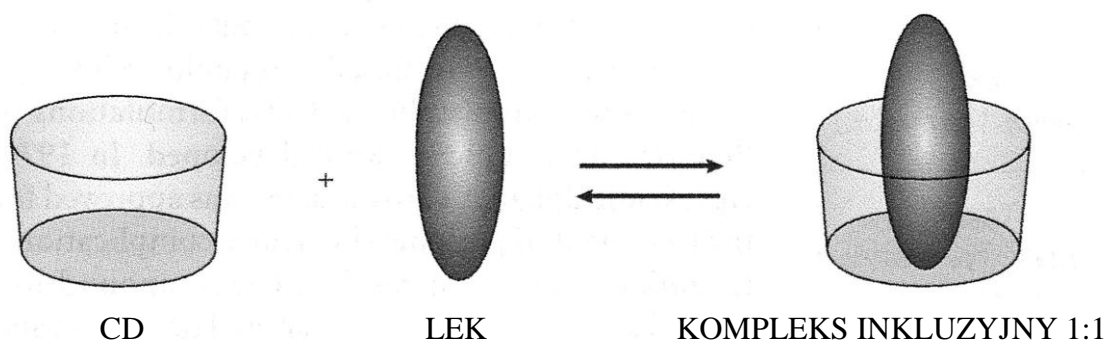
kach zbudowanych z 9, 10, 11, 12 elementów, sygnowane odpowiednio δ -, ϵ -, ζ -, η -cyklodekstrynami [130, 131, 132]. Macierzyste α -, β -, γ -CD są jednak najbardziej rozpowszechnione. Najczęściej stosowaną, ze względu na korzystną cenę i szeroką użyteczność, jest β -CD [133]. Jednakże słaba rozpuszczalność w wodzie (β -CD) [129] czy toksyczność po podaniu pozajelitowym (α -, β -CD) [134] wymaga stosowania rozgałęzionych pochodnych. Charakteryzują się one zwiększoną rozpuszczalnością np.: 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryna (2-HP- β -CD) [135], zmniejszoną toksycznością po podaniu pozajelitowym np.: suflobutyroeterowana- β -cyklodekstryna (SBE- β -CD) [113] oraz zdolnością do kontrolowania przemian krystalizacyjnych i polimorficznych innych substancji np.: 2,6-dime-tylo- β -cyklodekstryna (DM- β -CD), 2-hydroksybutylo- β -cyklodekstryna (HB- β -CD) [136] jednak przy takiej samej zdolności kompleksowania. Wymienione pochodne można podzielić na trzy grupy o różnych właściwościach hydrofilowych, hydrofobowych i jonizujących. Do pierwszej grupy należą: 2-HP- β -CD, DM- β -CD, 2,3,6-trimetylo- β -cyklodekstryna (TM- β -CD), do drugiej 2,6-dietylo- β -cyklodekstryna (DE- β -CD), natomiast jonizujące pochodne to karboksymetylo- β -cyklodekstryna (CM- β -CD), karboksymetyloetylo- β -cyklodekstryna (CME- β -CD), SBE- β -CD [137]. Cyklizacja w procesie tworzenia zamienia właściwości redukujące cząsteczek glukozy na właściwości kompleksujące oraz prowadzi do powstania cząsteczki o kształcie ściętego stożkowatego cylindra o szerszej górnej części, a zwężającego się ku dołowi, określanego mianem torusa. Jego cechą charakterystyczną jest lipofilowe wnętrze w przeciwieństwie do hydrofilowej części zewnętrznej [127, 138]. Budowa cyklodekstryn determinuje ich właściwości. Powierzchniową hydrofilność zapewniają I-rzędowe i II-rzędowe grupy hydroksylowe. Wszystkie drugorzędowe grupy OH są umiejscowione na szerszej stronie stożka, natomiast pierwszorzędowe znajdują się po stronie przeciwnej. Z kolei niewiążące pary elektronowe mostków tlenowych skierowane do środka wnęki są odpowiedzialne za jej lipofilność [139].



Ryc. 5. Schematyczna budowa cząsteczki cyklodekstryny [126].

2.2.2. Kompleksy inkluzyjne

Kompleksowanie molekuł przez cyklodekstryny następuje poprzez niekowalencyjne wiązania pomiędzy inkorporowaną cząsteczką a wnęką CD. W trakcie powstawania połączenia ‘gość’-‘gospodarz’ (mianem gospodarza jest określana kompleksująca cyklodekstryna) nie tworzą się i nie zostają rozerwane żadne wiązania o charakterze kowalencyjnym [140]. Proces tworzenia kompleksu jest procesem dynamicznej równowagi, podczas którego wbudowywana molekula jest ciągle asocjowana i dysocjowana z cząsteczki cyklodekstryny [141]. Zdolność kompleksowania można scharakteryzować za pomocą stałej równowagi chemicznej K (stała wiązania) oraz korespondujących z nią parametrów termodynamicznych, jak zmiana entalpii (ΔH), entropii (ΔS) oraz przez potencjał termodynamiczny (ΔG) [142, 128]. Zdecydowana większość substancji leczniczych tworzy połączenia z różnymi cyklodekstrynami w stosunku stechiometrycznym 1:1,



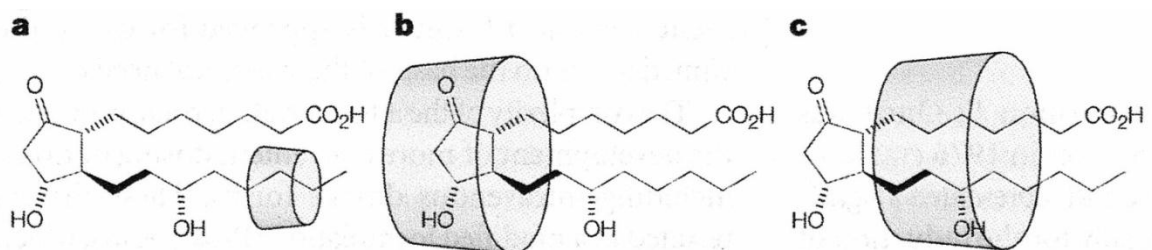
Ryc. 6. Schemat powstawania połączenia inkluzyjnego w stosunku 1:1 [126].

wówczas stała wiązania $K_{1:1}$ jest zdefiniowana według równania:

$$K_{1:1} = \frac{[Lek]_{kompleks}}{[Lek]_{wolny}[Cyklodekstryna]_{wolna}}$$

gdzie: $[Lek]_{kompleks}$ odpowiada stężeniu leku skompleksowanego, $[Lek]_{wolny}$ oraz $[Cyklodekstryna]_{wolna}$ reprezentują odpowiednio stężenia leku nieskompleksowanego oraz cyklodekstryny nieskompleksowanej [113, 135, 143]. Właściwości kompleksujące różnych cyklodekstryn zależą od rozmiaru pierścienia, molekularnego kształtu cząsteczki oraz hydrofobowości wnęki cyklodekstryny [142]. Ze względu na rozmiar wnęki α -CD kompleksuje alifatyczne łańcuchy, natomiast β -CD jest odpowiednia dla cząsteczek zawierających

pierścienie aromatyczne. Utworzenie kompleksu jest możliwe z całą cząsteczką ‘gościa’ lub tylko z jej fragmentem [126].



Ryc. 7. Proponowane modele kompleksu inkluzyjnego CD z cząsteczką prostaglandyny [126].

Powstały kompleks jest przestrzennym dopasowaniem pomiędzy wnęką CD a wbudowaną cząsteczką [138]. Wg Szejtlego silnie hydrofilowe lub silnie hydrofobowe cząsteczki nie poddają się kompleksowaniu z cyklodekstrynami, aby powstał kompleks musi zostać spełnione 5 niezbędnych warunków [144]:

- cząsteczka gościa powinna liczyć więcej niż pięć atomów,
- jej rozpuszczalność w wodzie winna być mniejsza niż 10 mg/ml,
- jej temperatura topnienia nie powinna przekraczać 250°C,
- jej cząsteczka nie może się składać z więcej niż pięciu skondensowanych pierścieni,
- jej masa molowa winna się mieścić w granicach 100-400.

Połączenia kompleksowe mogą powstawać zarówno w roztworach wodnych, jak i w fazie stałej. Główną siłą powodującą powstanie kompleksu w roztworze jest ‘chęć’ uwolnienia bogatych energetycznie wodnych cząsteczek rozpuszczalnika z wnęki cyklodekstryny i zastąpienie ich poprzez bardziej hydrofobowe cząsteczki inkorporowanej substancji. W efekcie otrzymujemy połączenia apolarno-apolarne, spadek naprężeń w pierścieniu cyklodekstryny oraz zdecydowanie bardziej stabilny niższy stan energetyczny [145]. Według wymienionego wyżej mechanizmu zachodzi także powstawanie kompleksów w fazie stałej. Różnica dotyczy rodzaju wody, jaka występuje w cyklodekstrynie. W fazie stałej zamieniona, na hydrofobowe cząsteczki wbudowywanej molekuly, jest woda inkluzyjna (znajdująca się we wnęce CD) oraz krystalizacyjna (związana pomiędzy sąsiadującymi

cząsteczkami CD). Proces tworzenia kompleksów w fazie stałej jest w związku z tym znacznie wolniejszy niż w roztworze [114, 146]. Oprócz kompleksów inkluzyjnych, w nasyconych roztworach wodnych możliwe jest powstanie również połączeń nieinkluzyjnych [147]. Wówczas mamy do czynienia z koegzystencją dwóch rodzajów połączeń [148]. To zjawisko wyjaśnia, dlaczego wartość stałej tworzenia kompleksu jest czasami zależna od stężenia oraz potwierdza, że zależy ona od zastosowanej metody kompleksowania [149]. Istnieją różne metody otrzymywania kompleksów inkluzyjnych najbardziej popularne to:

- a) koprecypitacja - szeroko rozpowszechniona w laboratorium, polega na rozpuszczeniu w wodzie cyklodekstryny i dodaniu podczas wstrząsania cząsteczek substancji inkorporowanej, rozpuszczonej w etanolu. Często oba roztwory muszą zostać ochłodzone zanim zostanie utworzony precypitat, który następnie można zdekantować bądź odfiltrować [150, 151],
- b) kompleksowanie przez tworzenie papki - tworzenie zawiesiny poprzez nasycenie wodnego roztworu CD w stężeniu 50 - 60% i następnie dodawaniu porcjami do roztworu cząsteczek włączanej substancji, wówczas powstają kompleksy nasycające fazę wodną i krystalizujące z tej fazy [114],
- c) ugniatanie, inaczej kompleksowanie poprzez tworzenie pasty – tutaj wykorzystuje się małą ilość wody, otrzymując pastę poprzez ugniatanie w młynku agatowym [133],
- d) ekstruzja – mieszanina cyklodekstryny, ‘gościa’ i wody jest zmielona lub zmieszana poprzez dodanie jej do ekstrudera, następnie suszona np. poprzez ochładzanie [133],
- e) mieszanie na sucho – niektóre cząsteczki mogą zostać skompleksowane poprzez proste dodanie ich do cyklodekstryny i staranne wymieszanie, metoda do wykorzystania tylko przy olejowych bądź płynnych substancjach [133],
- f) suszenie rozpyłowe (spray-drying) lub liofilizacja - uprzednio wytrząsane roztwory cyklodekstryny i ‘gościa’, zostają przeprowadzone w postaci proszku wykorzystując suszenie rozpyłowe (metoda nieodpowiednia dla lotnych i wrażliwych na temperaturę substancji) bądź liofilizację (pozbycie się rozpuszczalnika poprzez zamrożenie pod zmniejszonym ciśnieniem) [114, 133].

2.2.3. Zastosowanie kompleksów inkluzyjnych

Możliwość dostosowania metody otrzymywania kompleksu do konkretnej substancji oraz zdolność cyklodekstryn do kompleksowania tak wielu różnorodnych związków skutkuje niezmiernie szerokim zakresem zastosowań połączeń inkluzyjnych. Kompleksy inkluzyjne są wykorzystywane w celach [115, 133]:

- stabilizacji substancji wrażliwych na światło i tlen,
- modyfikacji chemicznej reaktywności cząsteczek wbudowanych,
- utrwalenia bardzo lotnych substancji,
- poprawienia rozpuszczalności substancji słabo rozpuszczalnych,
- przekształcenia płynnych substancji w fazę stałą,
- ochrony przed rozkładem substancji przez mikroorganizmy,
- maskowania nieprzyjemnego smaku i zapachu.

W przemyśle kosmetycznym zmiana lotności substancji włączanej poprzez kompleksowanie pozwala zachować na dłużej zapach np. płynów do kąpieli. Dodatek cyklodekstryn pozwala kontrolować nieprzyjemne zapachy w pieluszkach czy wkładkach higienicznych [152]. Połączenie z HP- β -CD skutkuje polepszeniem właściwości antybakteryjnych innych substancji np. triklosanu (środek przeciwbakteryjny stosowany w pastach do zębów zawierających krzem), który charakteryzuje się wówczas 3-krotnie większym działaniem [153, 154].

W przemyśle chemicznym i agrokulturze również docenione zostały zdolności kompleksujące CD dla takich substancji jak insektycydy, fungicydy, repelenty oraz hormon wzrostu. CD wykorzystuje się do opóźnienia kiełkowania nasion. Efektem jest początkowo powolny wzrost rośliny, ale dużo wydajniejszy plon i lepsze żniwa [145]. W inżynierii środowiskowej CD ułatwiają usuwanie zanieczyszczeń organicznych i metali ciężkich z gleby, wody i powietrza oraz ścieków przemysłowych [155, 156, 157]. Z kolei w przemyśle chemicznym wykorzystuje się zdolność CD do separacji enancjomerów w wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej oraz chromatografii gazowej [133].

W przemyśle farmaceutycznym wykorzystywane są przede wszystkim predyspozycje CD do transportowania lipofilnych cząsteczek przez kompartmenty wodne w komórce. Cyklodekstryny dostarczają rozpuszczalne w tłuszczach molekule do powierzchni błony,

gdzie substancja łatwo penetruje przez jej powierzchnię. Podczas działania cyklodekstryn, jako nośniki, nie zostaje zaburzona struktura bariery biologicznej. Dodatkowym atutem CD, wykorzystywanym w farmacji, jest możliwość zwiększenia poprzez kompleksowanie rozpuszczalności substancji trudno rozpuszczalnych. Daje to korzystniejszy efekt farmakologiczny, ponieważ poprawiając biodostępność umożliwia obniżenie dawki [133]. Przykładowe obecnie stosowane produkty farmaceutyczne, posiadające w swoim składzie cyklodekstryny, przedstawiono poniżej w tabeli 4.

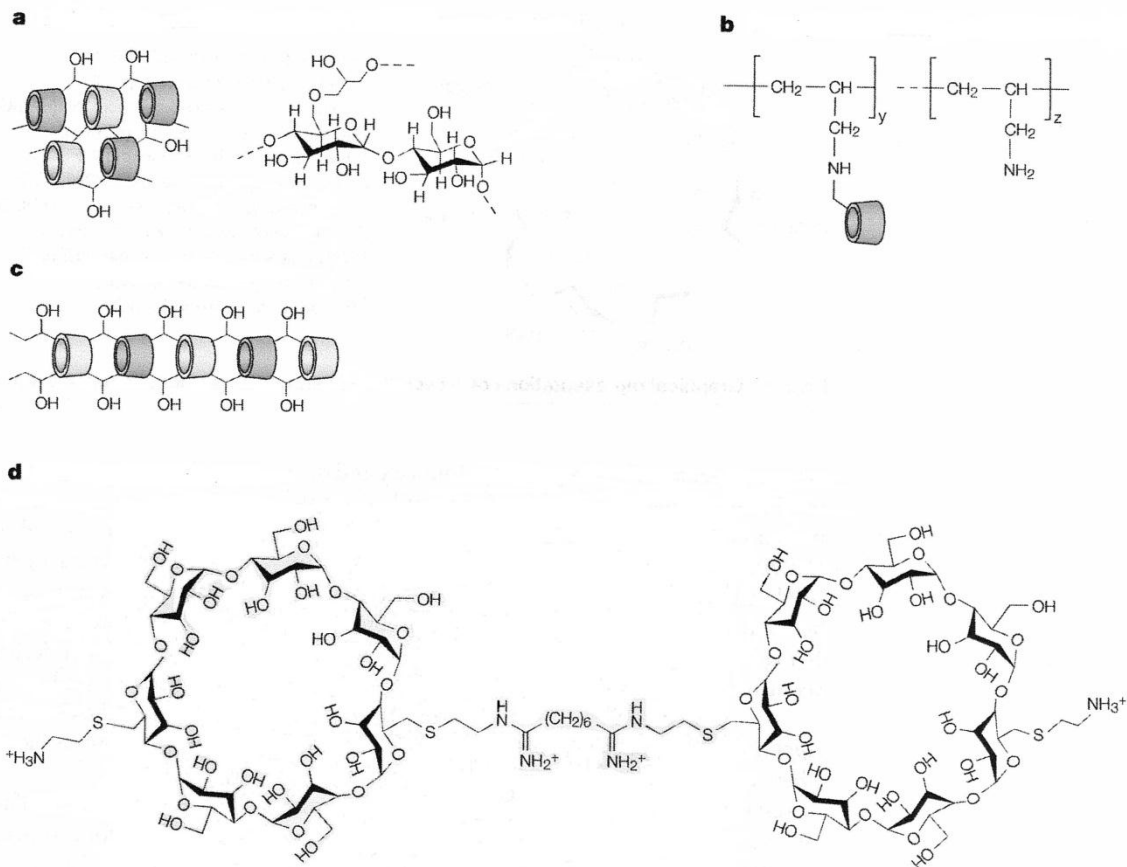
Tabela 4. Produkty farmaceutyczne wykorzystujące cyklodekstryny, znajdujące się obecnie w sprzedaży na światowym rynku farmaceutycznym [126, 128]

Substancja lecznicza	Nazwa handlowa	Postać farmaceutyczna	Rynek
α-Cyklodekstryna			
Alprostadil	Caverject, Provastatin	Roztwór dożylny	Europa, Japonia
Limaprost	Opalmon	Tabletki	Japonia
β-Cyklodekstryna			
Cefalosporyna	Meiact	Tabletki	Japonia
Cetyryzyna	Cetirizin	Tabletki do żucia	Niemcy
Etynyloestradiol i drospirenon	Yaz	Tabletki	Europa, USA
Nikotyna	Nicorette	Tabletki podjęzykowe	Europa
Nimesulid	Nimedex	Tabletki	Europa
Nitrogliceryna	Nitropen	Tabletki podjęzykowe	Japonia
Omeprazol	Omebeta	Tabletki	Europa
2-Hydroksypropylo-β-cyklodekstryna			
Mitocyna	MitoExtra, Mitozytrex	Roztwór dożylny	Europa
Sól sodowa sulfobutyloteteru-β-cyklodekstryny			
Arypiprazol	Abilify	Roztwór domięśniowy	USA
Worykonazol	Vfend	Roztwór dożylny	USA, Europa
Szeroko metylowana β-cyklodekstryna			
17 β -Estradiol	Aerodiol	Aerozol donosowy	Europa
2-Hydroksypropylo-γ-cyklodekstryna			
Sól sodowa diklofenaku	Voltaren	Krople oczne	Europa

2.2.4. Przyszłość cyklodekstryn

Obecnie produkowane są liczne formułacje farmaceutyczne zawierające w swoim składzie kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn z różnorodnymi substancjami leczniczymi. Niektóre przykłady takich połączeń zostały zestawione w tabeli 4. Dotychczas tworzenie połączeń kompleksowych było ograniczone do cząsteczek z niską masą molekularną, co było zgodne z założeniami Szejtliego [144]. Jednakże modyfikacja cyklodekstryn, poprzez tworzenie nowych pochodnych macierzystych dekstryn, przyniosła nieoczekiwany skutek w postaci zdolności kompleksowania z proteinami, białkami oraz nukleotydami [158, 159]. Pochodne cyklodekstryn mogą zostać wykorzystane do zabezpieczania białek przed agregacją w roztworze, przykładem może być ludzki hormon wzrostu [160]. Można je wykorzystać również do stabilizacji roztworów, chroniąc substancję czynną przed chemiczną i fizyczną degradacją, na przykład roztwór insuliny [126] oraz jako sztuczne chaperony (tzw. białka opiekuńcze oddziałujące z fałdującym białkiem i zapobiegające nieprawidłowym wiązaniom oraz eliminujące błędne struktury białek) [161]. Pochodne cyklodekstryn charakteryzują się również zdolnością do poprawy komórkowego transportu oligonukleotydów. Dodatkowo takie połączenia skutkują zmniejszeniem immunogenności oligonukleotydów oraz redukcją efektów ubocznych podczas ich podawania [159]. Niezmiernie ciekawe jest zastosowanie hydroksypropylowej pochodnej β -cyklodekstryny do redukcji transmisji wirusa HIV po podaniu dopochwowym. Taki efekt działania cyklodekstryny jest związany z jej zdolnością do zmian *in vivo* dystrybucji lipidów wirusa. Konkretnie HP- β -CD jest w stanie modulować cząsteczki cholesterolu związane z wirionami, co w efekcie zdecydowanie zmniejsza uwalnianie wirusa oraz ogranicza jego zdolność do infekcji [162].

Poza powszechnie znanymi hydroksypropylowymi, sulfobutyroeterowymi, szerokometylowanymi pochodnymi cyklodekstryn, istnieją również polimerowe odmiany dekstryn. Charakteryzują się różnym przestrzennym kształtem cząsteczek, pierścienie CD mogą zostać połączone krzyżowo, liniowo oraz cylindrycznie. Przykładowe połączenia zostały przedstawione na ryc. 8.



Ryc. 8. Polimery cyklodekstryn: a - połączone krzyżowo, b - z wiszącą cyklodekstryną, c - połączone cylindrycznie, d - połączone liniowo [126].

Różnorodność polimeryzacji daje możliwość otrzymywania polimerów o różnych masach cząsteczkowych, rozpuszczalności, ładunku oraz o diametralnie różnym powinowactwie do konkretnych leków. Tak duże możliwości modyfikacji cząsteczek samych polimerów CD oraz ich zróżnicowany wpływ na skompleksowany lek, zostały przede wszystkim wykorzystane w celowanym dostarczaniu oraz kontrolowanym uwalnianiu substancji leczniczej [126]. Zdolność do tworzenia przez polimer zarówno kompleksu inkluzyjnego z substancją leczniczą oraz żelu, po połączeniu z innym polimerem, skutkuje spowolnieniem uwalniania substancji czynnej [163]. Przykładowo żelowa forma polimeru, powstała przez połączenie alkilowo-łańcuchowej – pochodnej dekstranu, z krzyżowo-połączoną przez epichlorohydrynę cyklodekstryną z wbudowanym tamoksifenem, zaowocowała uwalnianiem tamoksifenu wg kinetyki zerowego rzędu [163]. Wśród polimerowych pochodnych CD na uwagę zasługują również kationowe oraz anionowe pochodne.

Liniowe połączenie β -cyklodekstryny z polimerem anionowym, a następnie otrzymanie koniugatu z małowczątkową kamptotecyną, zaowocowało zdecydowanym zwiększeniem efektywności działania tego leku [164]. Spolimeryzowane cyklodekstryny, zawierające polikationy, zasługują jednak na uwagę przede wszystkim ze względu na możliwość ich wykorzystania, jako nośniki kwasów nukleinowych w terapii genowej, z potwierdzoną zmniejszoną toksycznością *in vitro* i *in vivo* [165, 166].

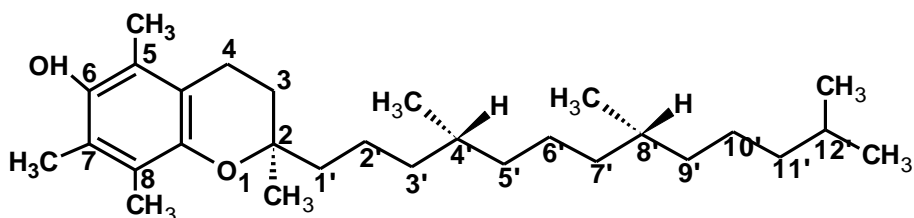
3. CEL PRACY

Wrażliwość chemicznej formy α -tokoferolu na tlen, temperaturę oraz czynniki utleniające [167, 168] wymusiła konieczność otrzymania odmiany witaminy odpornej na wszystkie wymienione czynniki. Estryfikacja tokoferolu kwasem octowym prowadzi do zwiększenia jego chemicznej stabilności, co zostało szeroko wykorzystane w przemyśle kosmetycznym w lotionach, kremach czy balsamach [169]. Jednakże octan α -tokoferolu pozostaje nadal pod postacią nierozpuszczalnego w wodzie, gęstego oleju. Alternatywną strategią poprawy właściwości α -tokoferolu, zarówno chemicznych jak i fizycznych, jest połączenie z cyklodekstrynami. Kompleksowanie z cyklodekstrynami wpływa w zróżnicowany sposób na właściwości wbudowywanych substancji leczniczych. CD mogą zarówno zwiększać stabilność nietrwałych substancji np. azaksantyny [170], poprawiać rozpuszczalność związków słabo rozpuszczalnych w wodzie, zwiększając ich biodostępność np. bropirimina [171], jak również zupełnie przeciwnie wzmacniać efekt fotodegradacji na przykład bis-(4-hydroksyfenyl)-etanu [172]. Diametralnie różny efekt działania cyklodekstryn powoduje konieczność przebadania każdej substancji leczniczej po kompleksowaniu z cyklodekstrynami. Potwierdzona została już zdolność cyklodekstryn do zwiększania rozpuszczalności α -tokoferolu w wodzie [173], przyspieszania rozkładu pod wpływem światła [168] oraz stabilizacji tokoferolu w roztworach o pH 4 - 7 w temp 5 - 25°C [174]. Ze względu na brak preparatu farmaceutycznego α -tokoferolu w postaci stałej oraz znikome liczby danych charakteryzujących kompleksy inkluzyjne witaminy E z cyklodekstrynami w fazie stałej w niniejszej pracy podjęto badania mające wyjaśnić powyższe zagadnienia. Celem pracy była ocena zdolności kompleksowania β -cyklodekstryny oraz jej 2-hydroksypropylowej pochodnej w stosunku do α -tokoferolu z wykorzystaniem metod liofilizacji oraz ugniatania. Następnie analizowano wpływ wyżej wymienionych cyklodekstryn na trwałość badanej substancji. Do oceny zmian stężenia tokoferolu zasto-

sowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz z detekcją w nadfiolecie. Określono kinetyczny mechanizm rozkładu tokoferolu in substantia i w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną. Wyznaczone obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu tokoferolu w fazie stałej stanowią podstawę do wyznaczenia parametrów termodynamicznych reakcji rozkładu w suchym powietrzu oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej i w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu. Ponadto postanowiono określić liczbę produktów rozkładu tokoferolu w analizowanych warunkach oraz dokonać ich identyfikacji metodą LC-ESI-MS/MS.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Substancje do badań



- α -Tokoferol, Sigma Aldrich Chemie (Niemcy)

Postać: żółty gęsty olej

- Kompleks inkluzyjny α -tokoferolu z β -cyklodekstryną

Postać: miazki proszek o biało-kremowej barwie

- Kompleks inkluzyjny α -tokoferolu z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną

Postać: miazki proszek o biało-kremowej barwie

4.2. Odczynniki

- β -Cyklodekstryna (β -CD) firmy Fluka Sigma - Aldrich Chemie (Japonia)
- Hydroksypropylo- β -cyklodekstryna (2-HP- β -CD) firmy Fluka Sigma – Aldrich Chemie (USA)
- Alkohol etylowy do spektroskopii firmy Merck KGaA (Niemcy)
- Alkohol metylowy Lichrosolv firmy Merck KGaA (Niemcy)

4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy

- Wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Agilent Technologies seria 1200
 - detektor DAD Agilent Technologies
 - oprogramowanie integratora ChemStation dla systemu LC 3D
 - pompa Agilent Technologies seria 1200
 - termostat Agilent Technologies seria 1200
- Spektrofotometr FT-IR Bruker IFS 66v/S
- Różnicowy kalorymetr skaningowy DSC – TO Shimadzu
- Spektrometr NMR Bruker Avance III 400 MHz
- Waga mikroanalityczna firmy Sartorius
- Komora cieplna KBC G – 65/250 Premed
- Liofilizator laboratoryjny Alpha 1-2 firmy Christ, Osterode am Harz (Niemcy)
- Filtry strzykawkowe nylonowe średnica porów 0.45 μm Sigma-Aldrich
- Strzykawki o pojemności 5 i 10 ml Romed
- Pakiet programów MsOffice 2010
- Chromatograf cieczowy LC Agilent Technologies seria 1260 Infinity z detektorem mas QTRAP 4000

4.4. Metoda analityczna stosowana w ocenie trwałości α -tokoferolu, α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną oraz z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną

Do oceny trwałości α -tokoferolu wykorzystano metodę HPLC, która umożliwia oznaczanie zmian stężenia substancji w czasie reakcji rozkładu. Zastosowano następujące parametry rozdziału chromatograficznego:

- *kolumna*: LiChroCART o wymiarach 250 x 4 mm z wypełnieniem LiChrospher 100 RP-18 (5 μm), Merck (Niemcy),
- *faza ruchoma*: metanol 100%,
- *szybkość przepływu fazy ruchomej*: 1.3 ml/min,
- *detektor*: spektrofotometr UV, $\lambda = 292 \text{ nm}$,
- *nastrzyk*: 20 μl .

Metodę HPLC zwalidowano w celu potwierdzenia jej przydatności do oceny trwałości α -tokoferolu. Walidacji poddano następujące parametry:

- selektywność,
- liniowość,
- precyzję,
- granicę detekcji i oznaczalności.

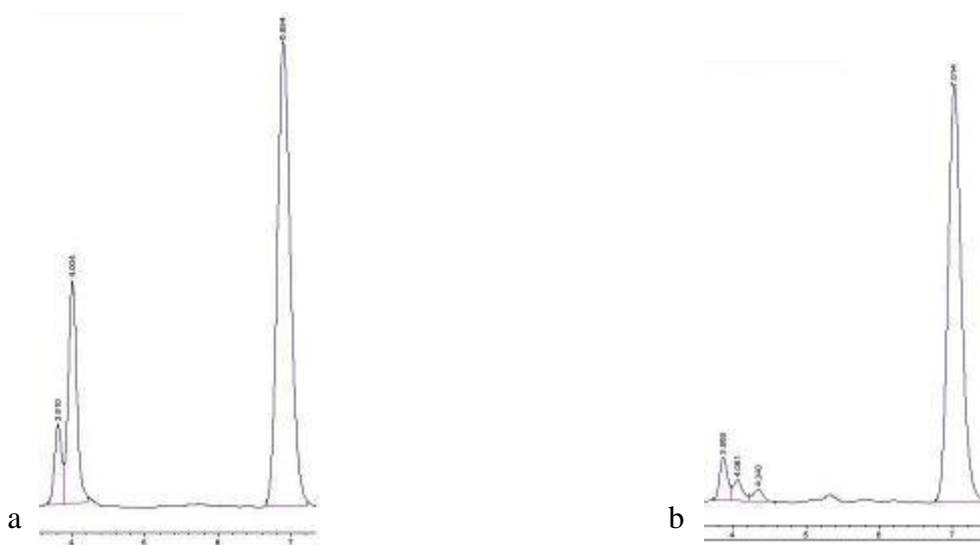
Do walidacji metody HPLC użyto próbkę α -tokoferolu oraz próbki α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -CD oraz 2-HP- β -CD przed nastrzykiem rozpuszczone w metanolu. Zbadano próbkę nierozłożoną oraz poddaną rozkładowi w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza, w temperaturze 338 K w atmosferze powietrza o wilgotności względnej RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%, w temperaturze pokojowej ok. 298 K w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

4.4.1. Selektywność metody

W przedziale czasu 0 - 15 minut na chromatogramach rejestrowano następujące piki:

- substancji badanej $t_R \sim 7.0$ min,
- produktów rozkładu $t_R \sim 3.8$; 4.0; 4.3 min,
- brak pików pochodzących od cyklodekstryn.

Metoda jest selektywna dla α -tokoferolu w obecności produktów rozkładu oraz α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z cyklodekstrynami.



Ryc. 9. Chromatogramy HPLC: a - α -tokoferol, b - kompleks inkluzyjny z CD.

4.4.2. Liniowość metody

Krzywą wzorcową dla α -tokoferolu wyznaczono w zakresie stężeń od 0.150 do 0.375 mg/ml.

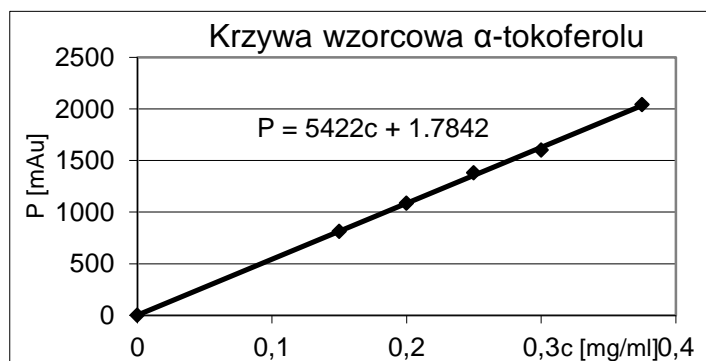
Roztwór badanej substancji

Odważono dokładnie 25.0 mg substancji badanej, rozpuszczono w metanolu i uzupełniono w kolbce miarowej metanolem do 10.0 ml. Następnie pobrano odpowiednio 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 ml roztworu i uzupełniono metanolem do 10.0 ml. Tak przygotowane roztwory kolejno nastrzyknięto na kolumnę i zarejestrowano chromatogramy. Wyniki przedstawiono w tabeli 5 i na ryc. 10.

Tabela 5. Zależność $P = f(c)$ i ocena statystyczna prostych $y = ax + b$ i $y = ax$

Lp.	C [mg/ml]	P = f(c)	Ocena statystyczna prostych	
			$y = ax + b$	$y = ax$
1	0.15	790.6; 825.5; 823.7	$a = 5422 \pm 204.16$ $b = 1.7842 \pm 49.7$ $S_a = 64.1580$ $S_b = 15.6196$ $S_y = 18.6707$ $t_a = 84.5$ $t_b = 0.11$ $r = 0.9994$	$a = 5428.385 \pm 89.26$ $S_a = 28.0489$ $S_y = 16.73$ $r = 0.9990$
2	0.2	1071.0; 1095.0; 1093.0		
3	0.25	1383.6; 1381.8; 1380.6		
4	0.3	1592.3; 1608.3; 1602.8		
5	0.375	2043.2; 2039.8; 2039.9		

Wykres zależności $P = f(c)$ jest prostoliniowy w badanym zakresie stężeń. Obliczono parametry prostych $y = ax + b$ i $y = ax$ (Tabela 5). Stwierdzono, że wyznaczona z powyższej zależności wartość $t_b = 0.11$, jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0.05}(3) = 3.182$, stąd wartość współczynnika $b = 1.7842 \pm 49.7$ jest nieistotna ($b=0$).



Ryc. 10. Wykres zależności $P = f(c)$.

4.4.3. Precyzja metody

W celu wyznaczenia precyzji metody odważono dokładnie 125.0 mg α -tokoferolu, rozpuszczono w metanolu i uzupełniono w kolbce miarowej metanolem do 50.0 ml. Następnie pobrano dziewięciokrotnie po 0.6, 1.0, 1.5 ml i uzupełniono w kolbkach miarowych metanolem do 10.0 ml, uzyskując po 9 roztworów o stężeniach odpowiednio 0.150, 0.250, 0.375 mg/ml. Wyniki przestawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Wyniki oznaczania α -tokoferolu

Wyniki oznaczania α -tokoferolu w roztworach			
Lp.	Pole powierzchni pików	Zawartość α -tokoferolu	Parametry statystyczne
c = 0.150 mg/ml			
1	762.77	0.1404	n = 9 $\bar{x}_{sr} = 0.1390$ $S^2 = 9.297 \cdot 10^{-7}$ $S = 9.642 \cdot 10^{-4}$ $S_x = 3.214 \cdot 10^{-4}$ $W_z = 0.032\%$
2	761.21	0.1401	
3	755.29	0.1390	
4	749.33	0.1379	
5	758.07	0.1395	
6	758.00	0.1395	
7	754.34	0.1388	
8	746.84	0.1374	
9	753.07	0.1386	
c = 0.250 mg/ml			
1	1260.65	0.2322	n = 9 $\bar{x}_{sr} = 0.2286$ $S^2 = 2.904 \cdot 10^{-6}$ $S = 1.704 \cdot 10^{-3}$ $S_x = 5.680 \cdot 10^{-4}$ $W_z = 0.057\%$
2	1243.26	0.2290	
3	1234.91	0.2274	
4	1237.41	0.2279	
5	1238.74	0.2281	
6	1245.95	0.2295	
7	1243.55	0.2290	
8	1226.67	0.2259	
9	1240.02	0.2284	
c = 0.375 mg/ml			
1	1858.66	0.3425	n = 9 $\bar{x}_{sr} = 0.3400$ $S^2 = 2.047 \cdot 10^{-3}$ $S = 4.190 \cdot 10^{-6}$ $S_x = 6.82 \cdot 10^{-4}$ $W_z = 0.068\%$
2	1857.07	0.3422	
3	1825.78	0.3364	
4	1839.09	0.3389	
5	1853.43	0.3415	
6	1846.57	0.3402	
7	1843.53	0.3397	
8	1848.66	0.3406	
9	1832.35	0.3376	

S^2 - wariancja; S - odchylenie pojedynczego wyniku; S_x - odchylenie średniej arytmetycznej; W_z - współczynniki zmienności

Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją pośrednią. Oznaczona wartość względnego odchylenia standardowego wynosi 0.057% i jest mniejsza od wartości krytycznej 3% (wg AOAC).

4.4.4. Granica detekcji i oznaczalności

Granice detekcji obliczono z wzoru $3.3 S_y/a$ i w podanych warunkach wynosi ona $4.55 \cdot 10^{-6}$ mg/ml, co odpowiada $9.10 \cdot 10^{-5}$ µg tokoferolu w 20 µl roztworu nanoszonego na kolumnę. Granicę oznaczalności wyznaczono z wzoru $10 S_y/a$ i w podanych warunkach wynosi ona $1.38 \cdot 10^{-5}$ mg/ml, co odpowiada $2.80 \cdot 10^{-3}$ µg tokoferolu w 20 µl roztworu nanoszonego na kolumnę.

4.4.5. Zakres i czułość metody

Zakres metody jest określany, jako przedział pomiędzy najwyższym i najniższym stężeniem substancji badanej, przy którym oznaczenie jest prowadzone z odpowiednią precyzją w liniowym zakresie stężeń substancji. W zastosowanych parametrach rozdziału, zakres metody wynosi od 0.150 do 0.375 mg/ml.

Metoda jest czuła, gdyż przy niewielkiej zmianie wartości oznaczanej obserwowano znaczący przyrost wartości mierzonej. Miarą czułości metody jest nachylenie krzywej wzorcowej, które wynosi 5428.385 ± 89.26 .

4.4.6. Dokładność metody

Zbadano odzysk α -tokoferolu oraz α -tokoferolu skompleksowanego z β -CD i 2-HP- β -CD. Dokładność metody zbadano wykorzystując roztwór α -tokoferolu o stężeniu 2.50 mg/ml (roztwór podstawowy), z którego następnie pobrano 0.6, 1.0, 1.5 ml i uzupełniono w kolbach miarowych metanolem do 10.0 ml. Dla każdego rozcieńczenia wykonano po pięć oznaczeń. Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że odzysk α -tokoferolu jest zgodny z wytycznymi FDA, średnia wartość mieści się na poziomie $100 \pm 2\%$.

Tabela 7. Odzysk α -tokoferolu

Lp.	Objętość [ml] roztworu podstawowego w 10.0 [ml]	Pole powierzchni piku [mAU·s]	Zawartość α -tokoferolu [mg/ml]	Odzysk [%]	Średni odzysk [%]
1	0.6	794.09	0.1461	100.68	100.85
2	0.6	809.41	0.1489	102.13	
3	0.6	798.39	0.1469	100.75	
4	0.6	797.72	0.1467	100.69	
5	0.6	801.15	0.1474	100.00	
1	1.0	1293.48	0.2382	98.02	98.49
2	1.0	1303.52	0.2400	98.80	
3	1.0	1297.14	0.2389	98.31	
4	1.0	1298.95	0.2392	98.44	
5	1.0	1304.77	0.2403	98.89	
1	1.5	1941.75	0.3578	98.16	98.15
2	1.5	1942.78	0.3579	98.22	
3	1.5	1939.59	0.3574	98.05	
4	1.5	1940.32	0.3575	98.08	
5	1.5	1943.49	0.3581	98.24	

Następnie sporządzono kompleksy inkluzyjne witaminy E z β -CD i 2-HP- β -CD w stosunku molowym 1:1 oraz zbadano dokładność oznaczenia zawartości tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych. Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Odzysk α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -CD oraz z 2-HP- β -CD

Lp.	Odważka kompleksu z β -CD [mg/10.0ml]	Pole powierzchni piku [mAU·s]	Zawartość α -tokoferolu [mg/ml]	Odzysk [%]	Średni odzysk [%]
1	10.41	1511.38	0.2784	100.18	99.53
2	10.37	1486.26	0.2738	98.88	
Lp.	Odważka kompleksu z 2-HP- β -CD [mg/10.0ml]	Pole powierzchni piku [mAU·s]	Zawartość α -tokoferolu [mg/ml]	Odzysk [%]	Średni odzysk [%]
1	10.78	1309.59	0.2412	95.75	92.81
2	10.52	1199.73	0.2209	89.87	

4.5. Otrzymywanie kompleksów inkluzyjnych α -tokoferolu z β -cyklodekstryną oraz 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej

Kompleksy inkluzyjne tokoferolu z cyklodekstrynami sporządzono dwiema metodami. Kompleks z β -cyklodekstryną został otrzymany metodą liofilizacji, natomiast kompleks z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną otrzymano metodą ugniatania. W celach porównawczych przygotowano również mieszaniny fizyczne z obiema cyklodekstrynami.

4.5.1. Przygotowanie kompleksu inkluzyjnego z β -cyklodekstryną

Odważkę β -cyklodekstryny o masie 1.1350 g rozpuszczono w wodzie, następnie dodano do niej 0.4307 g α -tokoferolu rozpuszczonego w etanolu (760 g/l). Powstałą zawiesinę wytrząsano w temperaturze 25°C przez 24 h, zawiesinę chroniono przed dostępem światła. Następnie koprecypitat przefiltrowano przez sączone nylonowy, zamrożono w -55 °C na okres 1 h i poddano liofilizacji. Warunki liofilizacji - kondensator lodu: ciśnienie 0.024 mbar, temp. -54 °C, komora próżniowa: ciśnienie 0.220 mbar, temp. -35 °C. Czas liofilizacji 2 doby.

4.5.2. Przygotowanie kompleksu inkluzyjnego z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną

Odważkę 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryny o masie 1.380 g rozpuszczono w wodzie destylowanej i przeniesiono ilościowo do moździerza agatowego. Następnie dodano porcjami 0.4307 g α -tokoferolu rozpuszczonego w etanolu (760 g/l) i mieszano aż do odparowania rozpuszczalników. Stałą pozostałość ugniatano ok. 2.5 h, aż do otrzymania suchego proszku. Następnie otrzymany produkt suszono do stałej masy.

4.6. Identyfikacja kompleksów inkluzyjnych α -tokoferolu z β -cyklodekstryną oraz 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej

4.6.1. Analiza metodą spektroskopii w podczerwieni (IR)

Widma IR wykonano za pomocą spektrofotometru FT-IR Bruker IFS 66v/S. Próbkę substancji stałych (cyklodekstryny, kompleksy inkluzyjne oraz mieszaniny fizyczne) dokładnie wymieszano z bromkiem potasu (KBr), a następnie poprzez kompresję w prasie

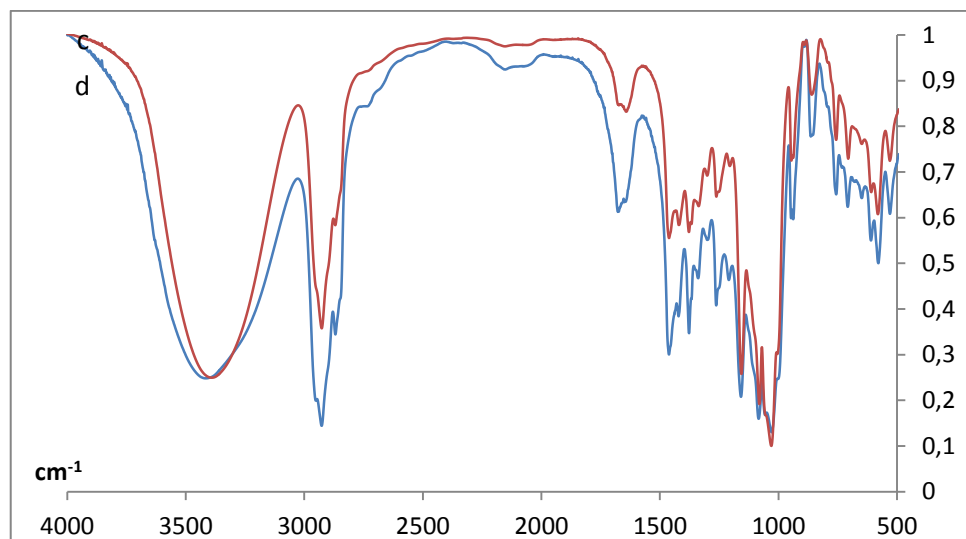
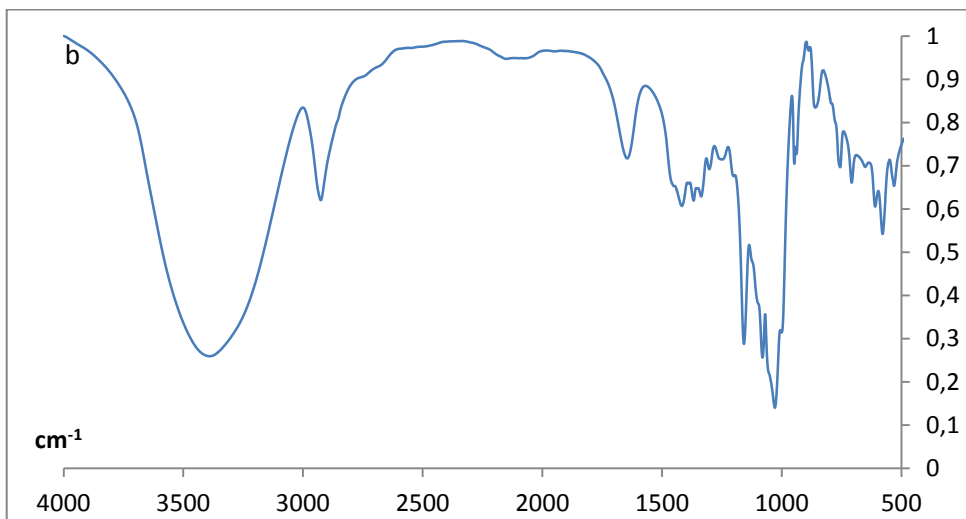
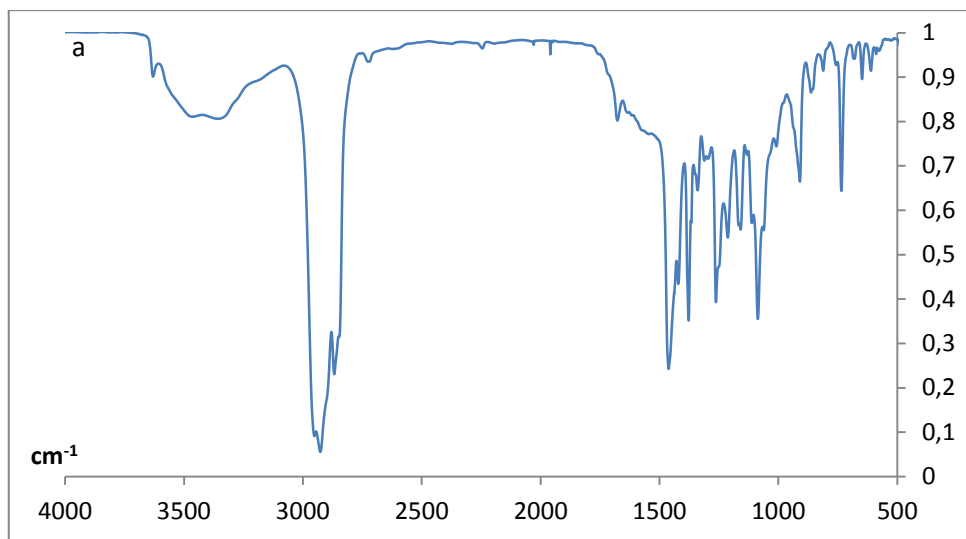
hydraulicznej pod naciskiem o sile 10 ton, sporządzono tabletki. Do pomiaru α -tokoferolu wykorzystano płytki z KBr ze względu na olejową postać substancji. Widma otrzymano z rozdzielczością 2 cm^{-1} , w zakresie od 4000 cm^{-1} do 500 cm^{-1} . Otrzymane widma przedstawiono na ryc. 11 – 12, str. 44 - 45.

4.6.2. Analiza metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)

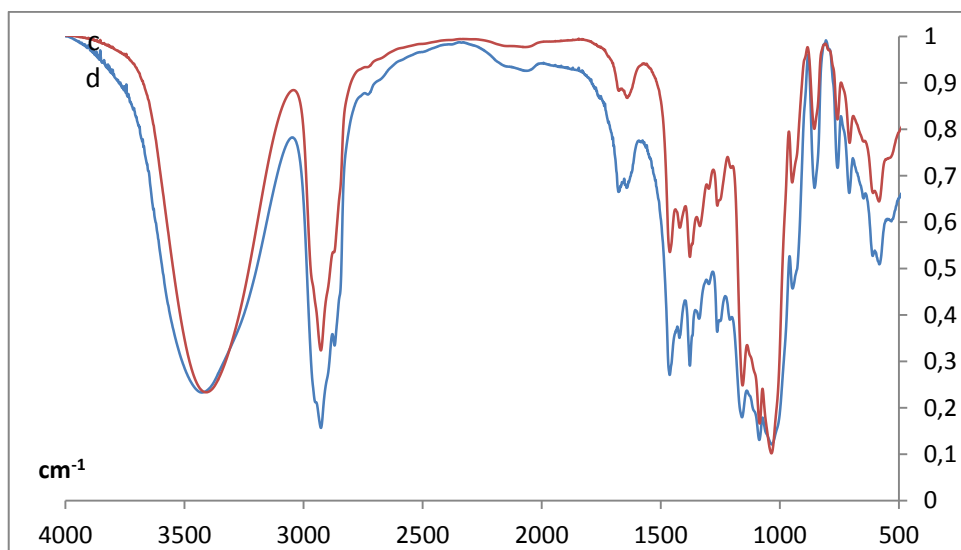
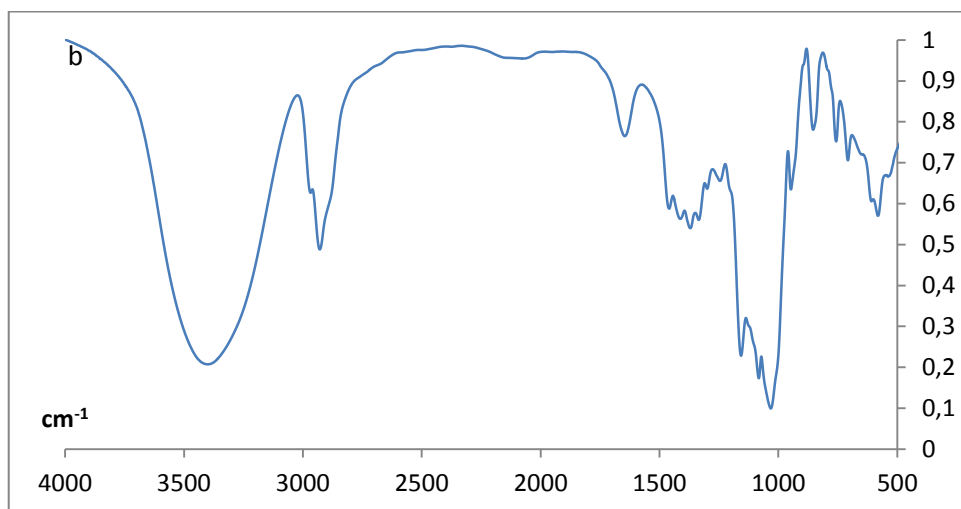
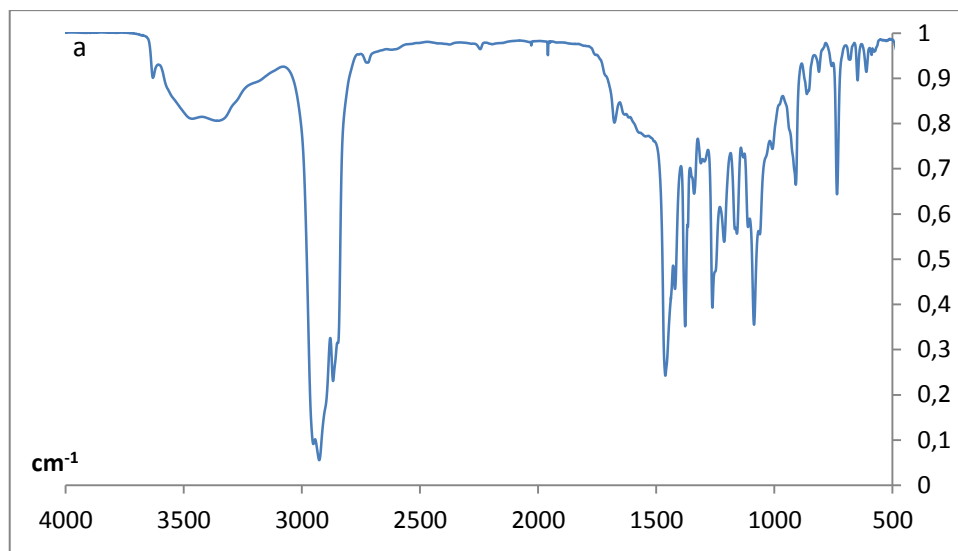
α -Tokoferol, β -CD, 2-HP- β -CD, kompleksy inkluzyjne oraz mieszaniny fizyczne badano za pomocą kalorymetrii różnicowej. Dokładnie odważone poszczególne próbki (2.0 mg) umieszczono w tygielkach aluminiowych, jako odnośnik wykorzystano tlenek glinu Al_2O_3 (2.0 mg). Badanie prowadzono w atmosferze azotu w zakresie temperatur od 20°C do 400°C , szybkość przyrostu temperatury wynosiła $10^\circ/\text{min}$. Wyniki pomiarów DSC przedstawiono graficznie jako zależność temperatury od czasu przy wykorzystaniu programu komputerowego Windows 2010. Termogramy DSC przedstawiono na ryc. 13 – 14.

4.6.3. Analiza metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H -NMR) w fazie stałej

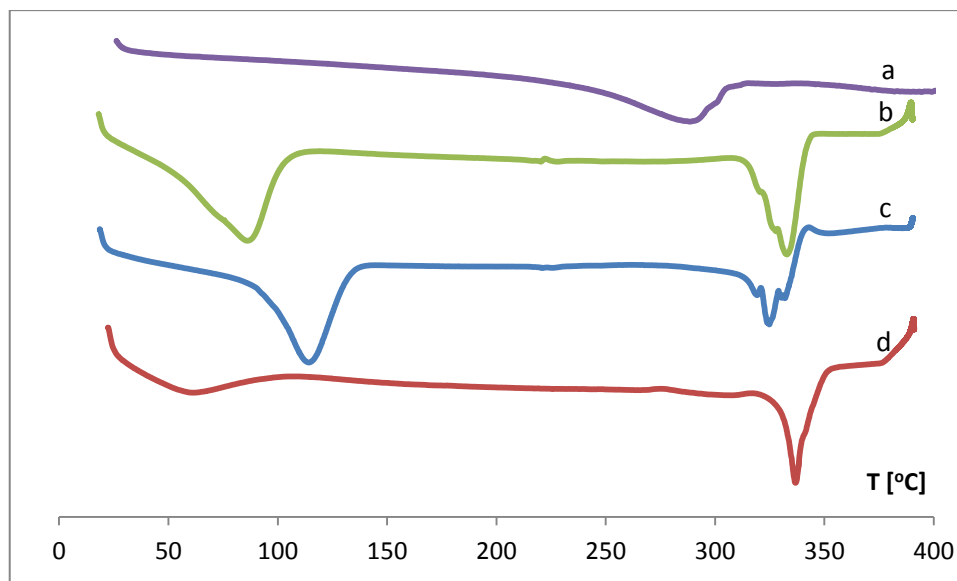
Pomiar NMR został wykonany dla β -CD, 2-HP- β -CD, dla kompleksów inkluzyjnych oraz mieszanin fizycznych. α -Tokoferolu nie uwzględniono w badaniu próbek w fazie stałej, ze względu na olejową postać. Celem pomiaru było porównanie oddziaływań tokoferolu z cyklodekstrynami w przypadku kompleksowania i w przypadku fizycznego zmieszania substancji badanych. Pomiaru dokonano w fazie stałej z wykorzystaniem kombinacji technik polaryzacji skośnej z rotacją próbki pod kątem magicznym względem linii pola magnetycznego (CP/MAS) NMR. Badania wykonano spektrofotometrem Bruker Avance III o częstotliwości roboczej dla ^1H 400 MHz, wyposażonym w sondę MAS, z rotorem ZrO_2 4 mm. Konwencjonalne widma ^1H MAS otrzymano stosując szybkość wirowania próbki 8 kHz, impuls 90° o długości dla protonu $5\mu\text{s}$, czas repetycji impulsów 3 s, szerokość spektralna 40 kHz, 16 k punktów pomiarowych (gdzie $1\text{k} = 1024$) oraz w temperaturze 296 K. Widma NMR przedstawiono na ryc. 15 – 16, str. 47.



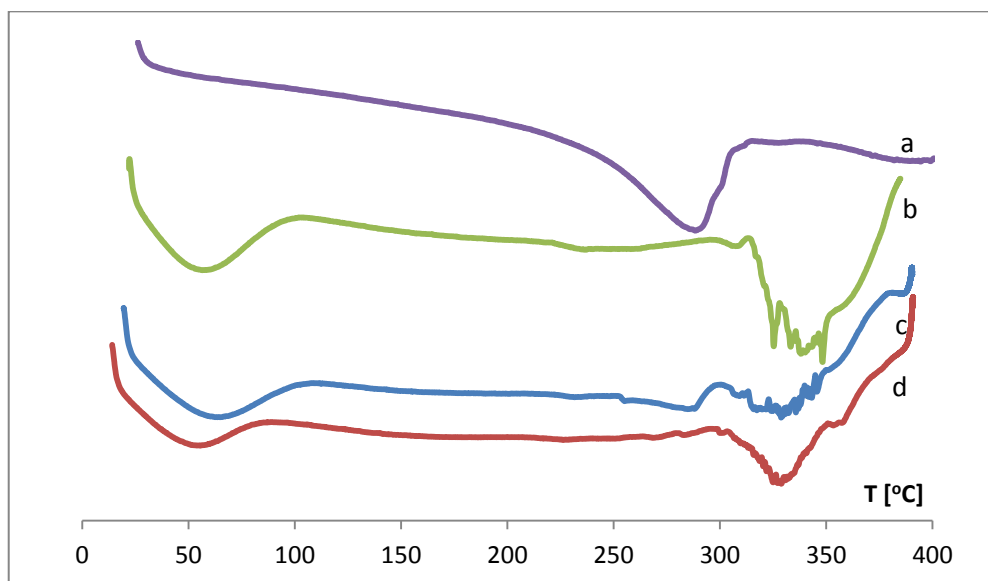
Ryc. 11. Widma IR: a - α -tokoferol, b - β -CD, c - kompleks inkluzyjny α -T i β -CD, d - mieszanina fizyczna α -T i β -CD.



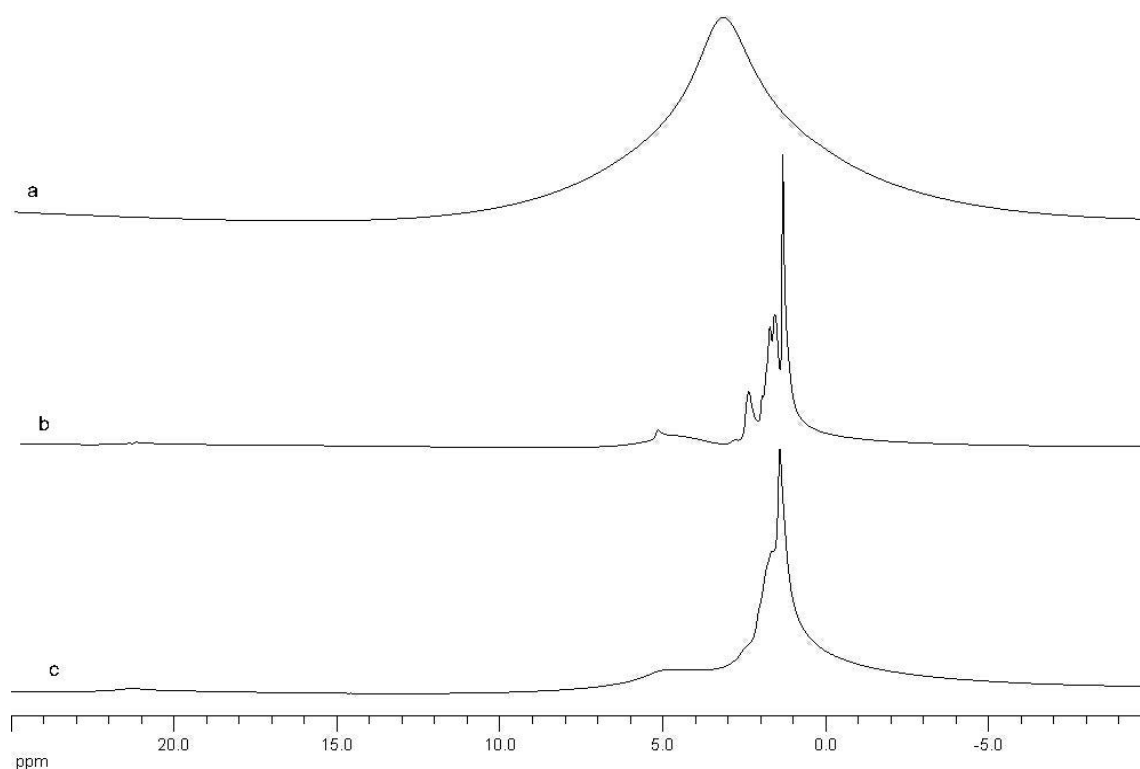
Ryc. 12. Widma IR: a - α -tokoferol, b - 2-HP- β -CD, c - kompleks inkluzyjny α -T i 2-HP- β -CD, d - mieszanina fizyczna α -T i 2-HP- β -CD.



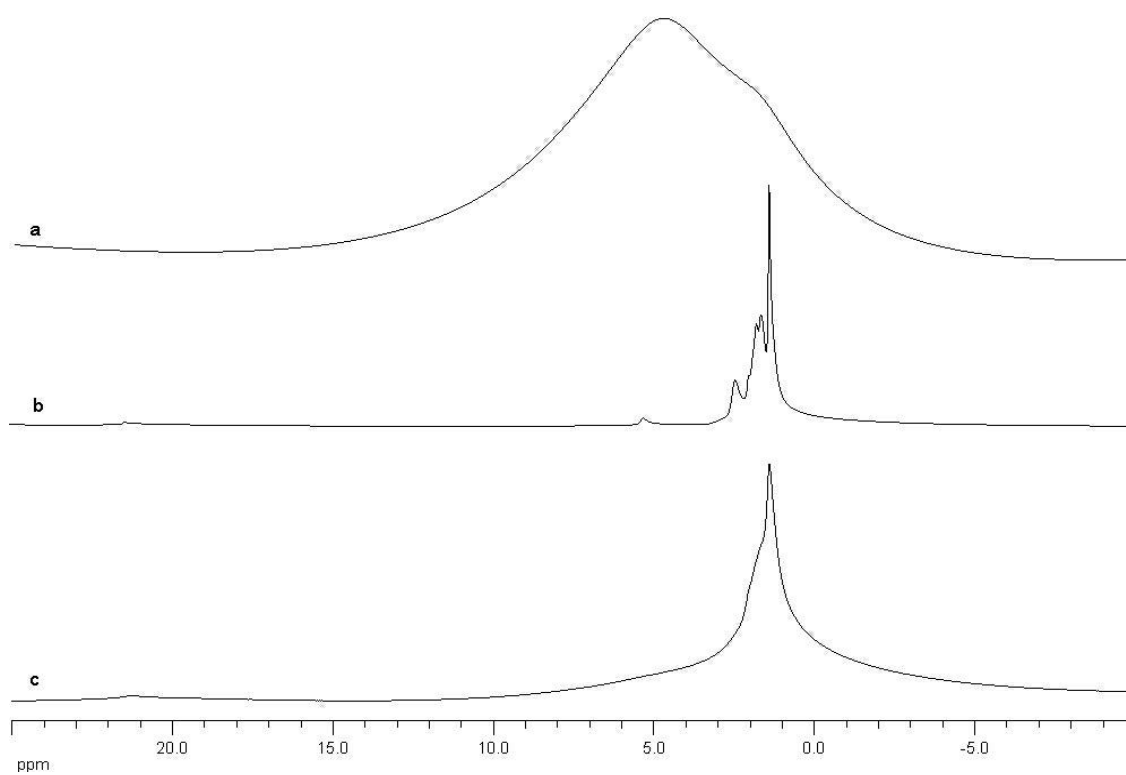
Ryc. 13. Termogramy DSC: a - α -tokoferol, b - β -CD, c - mieszanina fizyczna α -T i β -CD, d - kompleks inkluzyjny α -T i β -CD.



Ryc. 14. Termogramy DSC: a - α -tokoferol, b - 2-HP- β -CD, c - mieszanina fizyczna α -T i 2-HP- β -CD, d - kompleks inkluzyjny α -T i 2-HP- β -CD.



Ryc. 15. Widma $^1\text{H-NMR}$: a - $\beta\text{-CD}$, b - mieszanina fizyczna $\alpha\text{-T}$ i $\beta\text{-CD}$, c - kompleks inkluzyjny $\alpha\text{-T}$ i $\beta\text{-CD}$.



Ryc. 16. Widma $^1\text{H-NMR}$: a - 2-HP- $\beta\text{-CD}$, b - mieszanina fizyczna $\alpha\text{-T}$ i 2-HP- $\beta\text{-CD}$, c - kompleks inkluzyjny $\alpha\text{-T}$ i 2 HP- $\beta\text{-CD}$.

4.7. Ocena trwałości α - tokoferolu, α - tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną i z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną oraz mieszanin fizycznych

Do oceny trwałości badanych substancji wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). Parametry metody podano w rozdziale 4.4. Trwałość tokoferolu w analizowanych próbkach badano oceniając wpływ następujących warunków:

- podwyższonej temperatury 343 K, 338 K, 333 K, 323 K,
- podwyższonej wilgotności względnej 33.0%, 76.4%, 92.0% w temperaturze 338 K,
- atmosfery powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

Dokładnie odważone próbki po 2.5 mg α -tokoferolu oraz po 10.0 mg kompleksów inkluzyjnych oraz mieszanin fizycznych umieszczono we fiolkach o pojemności 10.0 ml. Fiolki przeznaczone do badań w atmosferze suchego powietrza wstawiono do łaźni piaskowej i umieszczono w komorach cieplnych o odpowiednich temperaturach. Przed umieszczeniem fiolek, łaźnie piaskowe utrzymywano w analizowanych temperaturach przez jedną dobę. Fiolki przeznaczone do badań wpływu wilgoci wstawiono do eksykatorów zawierających następujące nasycone roztwory soli nieorganicznych: wodorowęglan sodu (RH ~ 92.0%), chlorek sodu (RH ~ 76.4%), sześciowodny chlorek magnezu (RH ~ 33.0%). Następnie eksykatory umieszczono w komorze badań cieplnych o temperaturze 338 K. Przed umieszczeniem próbek, eksykatory z nasyconymi roztworami soli utrzymywane były w podwyższonej temperaturze przez jedną dobę. Fiolki do badania wpływu tlenu na trwałość tokoferolu umieszczono w eksykatorze z perhydrolem (H_2O_2 30%), który w wyniku rozkładu wzbogacał atmosferę komory w tlen.

W określonych odstępach czasu, zależnych od szybkości rozkładu, próbki wyjmowano z eksykatorów. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, próbki z substancją badaną uzupełniano 10 ml metanolu. Otrzymane roztwory mieszano na łaźni ultradźwiękowej, filtrowano oraz nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną i rejestrowano chromatogramy.

Zarejestrowano następujące sygnały:

- α -tokoferol o czasie retencji $t_R \sim 6.9$ min,
- produkty rozkładu o czasach retencji $t_R \sim 3.8; 4.0; 4.3$ min.

Wyniki przedstawiono graficznie w postaci półlogarytmicznych wykresów zależności $c = f(t)$ na ryc. 17 – 67.

4.7.1. Parametry kinetyczne reakcji

Na podstawie zmian stężenia α -tokoferolu w czasie stwierdzono, że w badanych warunkach rozkład substancji zachodzi zgodnie z reakcją pierwszego rzędu względem stężenia substratu. W reakcji tej półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$ są prostoliniowe o nachyleniu ujemnym ($a = -k$).

Stałą szybkości reakcji rozkładu obliczono ze wzoru:

$$\ln c = \ln c_0 - kt$$

gdzie:

c – stężenie substratu w czasie t

c_0 – stężenie substratu w czasie t_0

k – stała szybkości reakcji pierwszego rzędu

Obliczono także okres półtrwania i czas rozkładu 10% substancji, korzystając ze wzorów:

$$t_{0.5} = 0.693/k$$

$$t_{0.1} = 0.1054/k$$

Dla prostoliniowych wykresów $\ln c = f(t)$, wykorzystując metodę najmniejszych kwadratów, obliczono następujące parametry statystyczne równań $y = ax + b$: $a \pm \Delta a$, $b \pm \Delta b$, błędy standardowe: S_a , S_b , S_y oraz współczynniki korelacji liniowej r . Wartości $\pm \Delta a$ oraz $\pm \Delta b$ obliczono dla $f = n-2$ stopni swobody dla $\alpha = 0.05$.

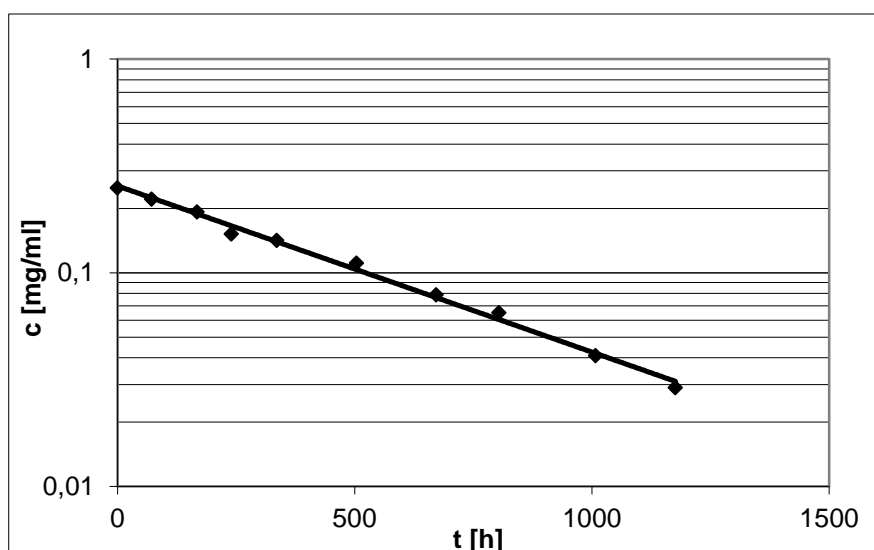
Prostoliniowe wykresy posłużyły do obliczenia parametrów kinetycznych i termodynamicznych reakcji. Do obliczeń matematycznych wykorzystano arkusz kalkulacyjny MsExcel.

Wyniki badań przedstawiono na ryc. 17 - 67 i w tabelach 9 - 61.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w podwyższonej temperaturze w atmosferze suchego powietrza

Tabela 9. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 343 K

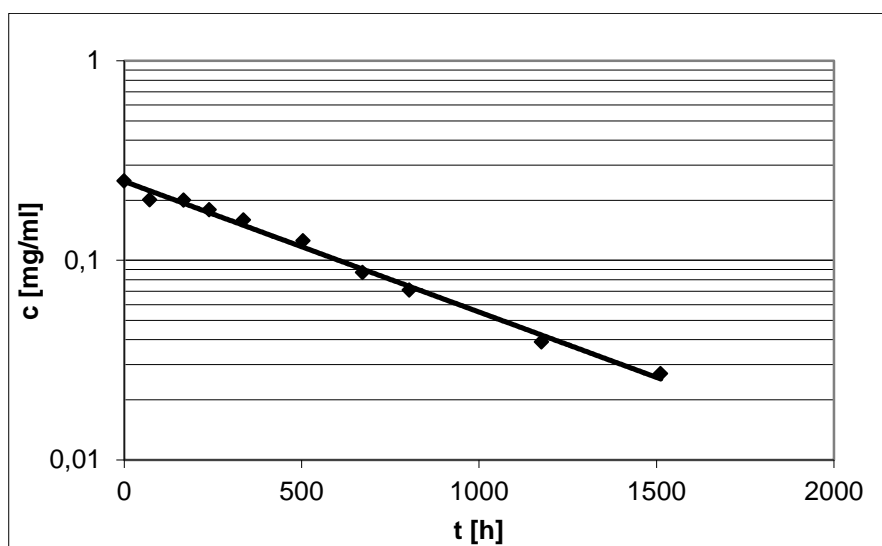
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.79 \pm 0.11) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 4.65 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.36 \pm 0.07$ $S_b = 0.03$ $(k \pm \Delta k) = (4.976 \pm 0.298) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.997$ $S_y = 0.056$ $t_{0,5} = 386.9 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 58.8 [\text{h}]$ $n = 10$
2	72	0.221	
3	168	0.193	
4	240	0.152	
5	336	0.142	
6	504	0.111	
7	672	0.079	
8	804	0.065	
9	1008	0.041	
10	1176	0.029	



Ryc. 17. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 343 K.

Tabela 10. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K

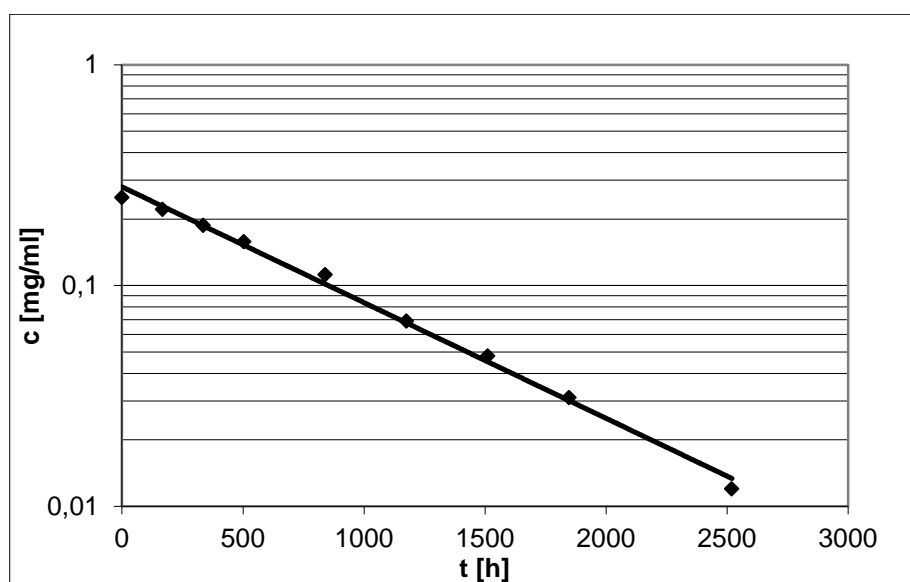
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.51 \pm 0.12) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 4.43 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.39 \pm 0.09$ $S_b = 0.03$ $(k \pm \Delta k) = (4.189 \pm 0.342) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.997$ $S_y = 0.066$ $t_{0.5} = 459.5 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 69.9 [\text{h}]$ $n = 10$
2	72	0.201	
3	168	0.200	
4	240	0.179	
5	336	0.159	
6	504	0.125	
7	672	0.087	
8	804	0.071	
9	1176	0.039	
10	1512	0.027	



Ryc. 18. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K.

Tabela 11. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 333 K

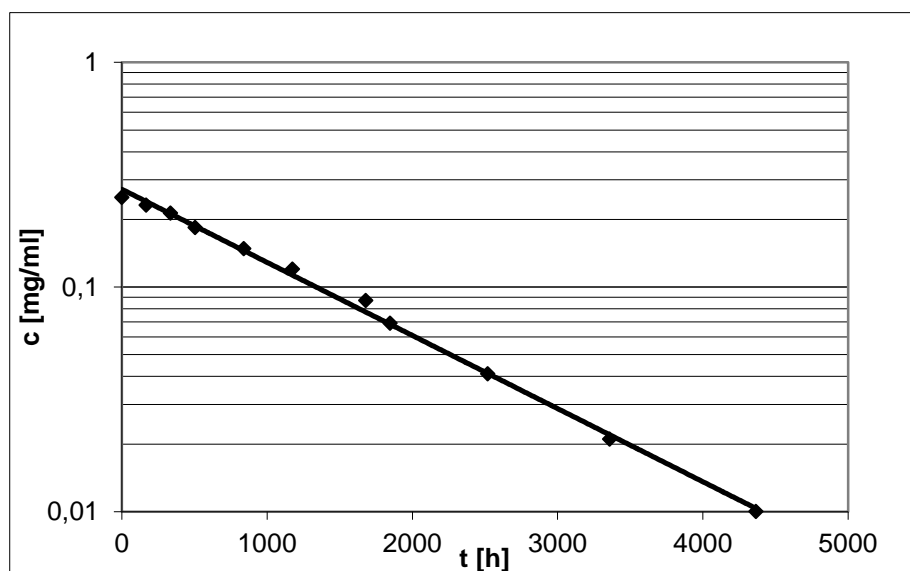
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.21 \pm 0.08) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 3.22 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.27 \pm 0.10$ $S_b = 0.04$ $(k \pm \Delta k) = (3.352 \pm 0.219) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.077$ $t_{0.5} = 574.5 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 87.4 [\text{h}]$ $n = 9$
2	168	0.221	
3	336	0.187	
4	504	0.158	
5	840	0.112	
6	1176	0.069	
7	1512	0.048	
8	1848	0.031	
9	2520	0.012	



Ryc. 19. Półlogarymiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K.

Tabela 12. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 323 K

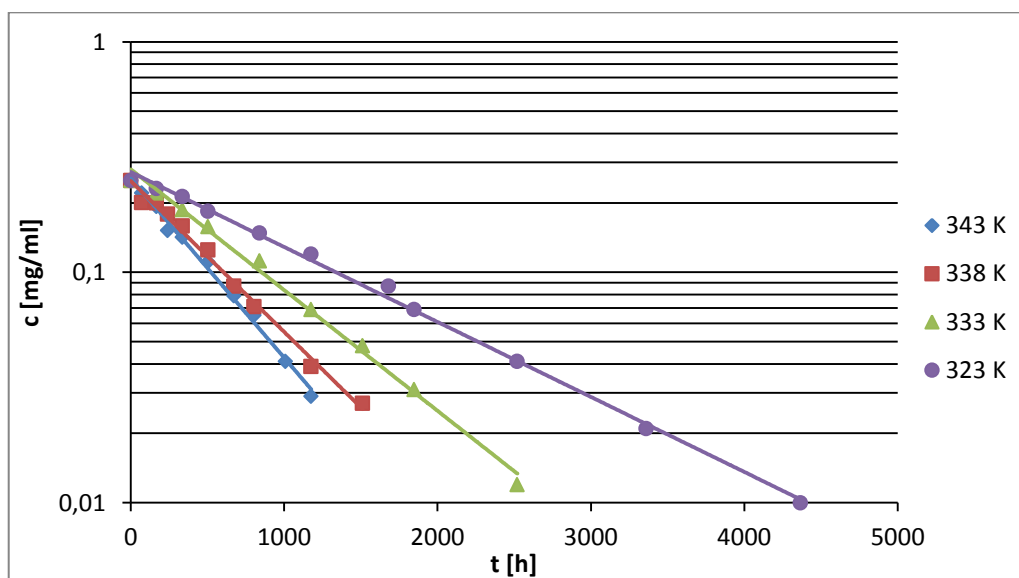
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-7.49 \pm 0.29) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.30 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.30 \pm 0.06$ $S_b = 0.03$ $(k \pm \Delta k) = (2.081 \pm 0.082) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.058$ $t_{0.5} = 924.6 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 140.6 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.231	
3	336	0.213	
4	504	0.184	
5	840	0.148	
6	1176	0.120	
7	1680	0.087	
8	1848	0.069	
9	2520	0.041	
10	3360	0.021	
11	4368	0.010	



Ryc. 20. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 323 K.

Tabela 13. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza

Temp. [K]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	N
343	$(4.976 \pm 0.298) \cdot 10^{-7}$	$(-1.79 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$	$4.65 \cdot 10^{-5}$	0.997	10
338	$(4.189 \pm 0.342) \cdot 10^{-7}$	$(-1.51 \pm 0.12) \cdot 10^{-3}$	$4.43 \cdot 10^{-5}$	0.997	10
333	$(3.352 \pm 0.219) \cdot 10^{-7}$	$(-1.21 \pm 0.08) \cdot 10^{-3}$	$3.22 \cdot 10^{-5}$	0.998	9
323	$(2.081 \pm 0.082) \cdot 10^{-7}$	$(-7.49 \pm 0.29) \cdot 10^{-4}$	$1.30 \cdot 10^{-5}$	0.998	11

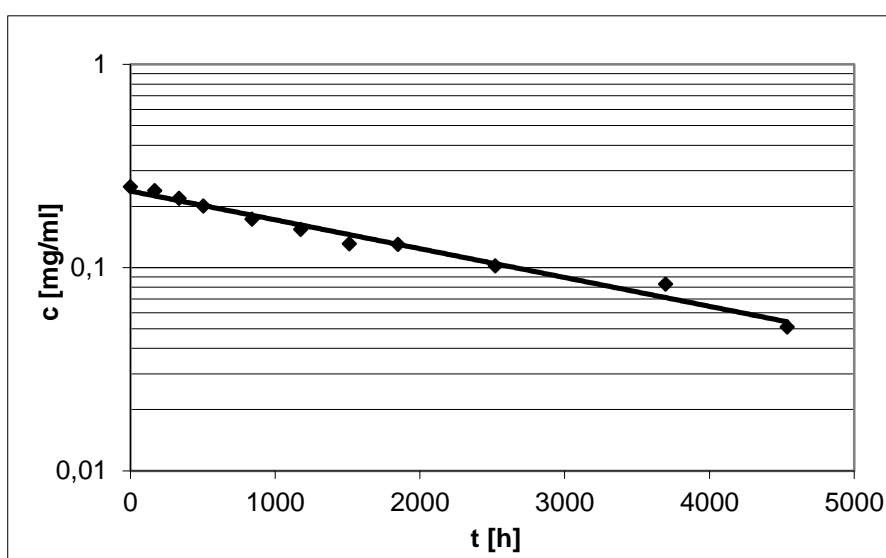


Ryc. 21. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze w atmosferze suchego powietrza

Tabela 14. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K

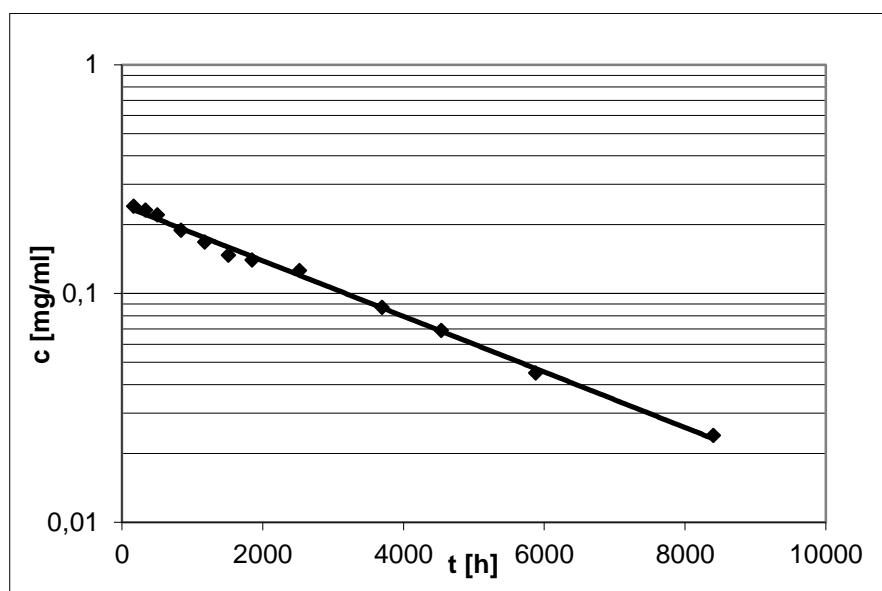
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-3.67 \pm 0.25) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.13 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.39 \pm 0.09$ $S_b = 0.04$ $(k \pm \Delta k) = (1.019 \pm 0.069) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.995$ $S_y = 0.100$ $t_{0.5} = 1891.0 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 287.6 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.239	
3	336	0.219	
4	504	0.201	
5	840	0.173	
6	1176	0.154	
7	1512	0.131	
8	1848	0.130	
9	2520	0.102	
10	3696	0.083	
11	4536	0.051	
12	5880	0.025	
13	8400	0.011	



Ryc. 22. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K.

Tabela 15. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K

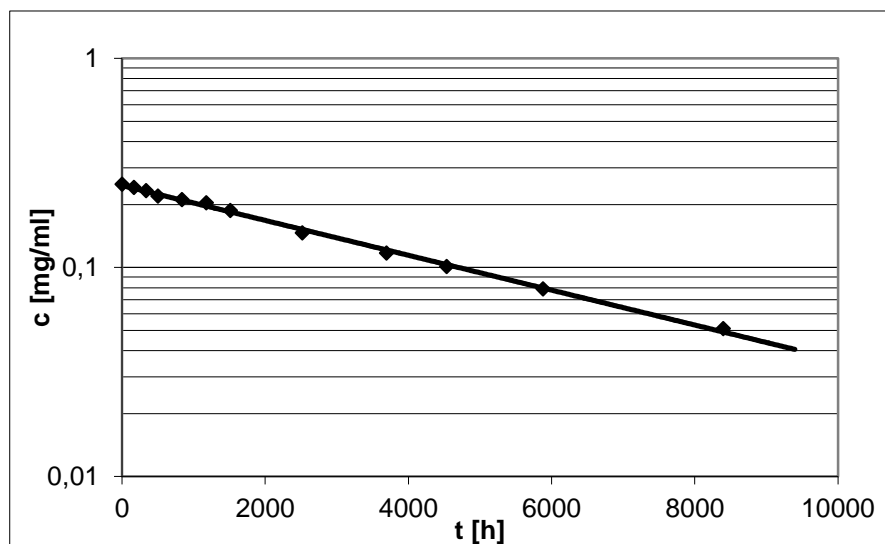
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-2.80 \pm 0.11) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 4.97 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = -1.41 \pm 0.04$ $S_b = 0.017$ $(k \pm \Delta k) = (7.798 \pm 0.304) \cdot 10^{-8} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.044$ $t_{0,5} = 2468.9 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 375.5 [\text{h}]$ $n = 13$
2	168	0.241	
3	336	0.232	
4	504	0.221	
5	840	0.189	
6	1176	0.168	
7	1512	0.147	
8	1848	0.140	
9	2520	0.126	
10	3696	0.087	
11	4536	0.069	
12	5880	0.045	
13	8400	0.024	



Ryc. 23. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K.

Tabela 16. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 333 K

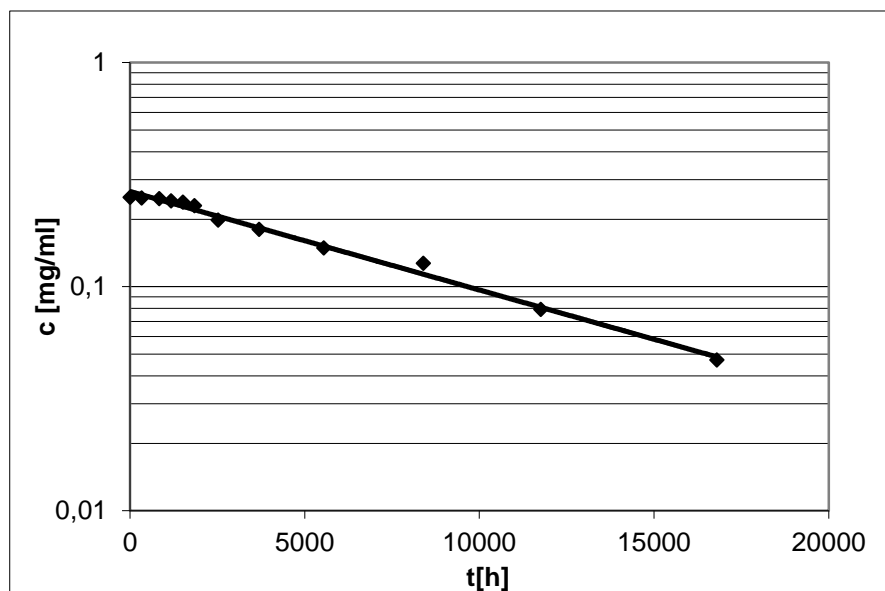
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.92 \pm 0.06) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 3.04 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = -1.40 \pm 0.02$ $S_b = 0.011$ $(k \pm \Delta k) = (5.334 \pm 0.188) \cdot 10^{-8} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.027$ $t_{0.5} = 3608.9 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 548.9 [\text{h}]$ $n = 12$
2	168	0.241	
3	336	0.233	
4	504	0.219	
5	840	0.211	
6	1176	0.204	
7	1512	0.187	
8	1848	0.146	
9	2520	0.117	
10	3696	0.101	
11	4536	0.079	
12	5880	0.051	



Ryc. 24. Półlogarymiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 333 K.

Tabela 17. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 323 K

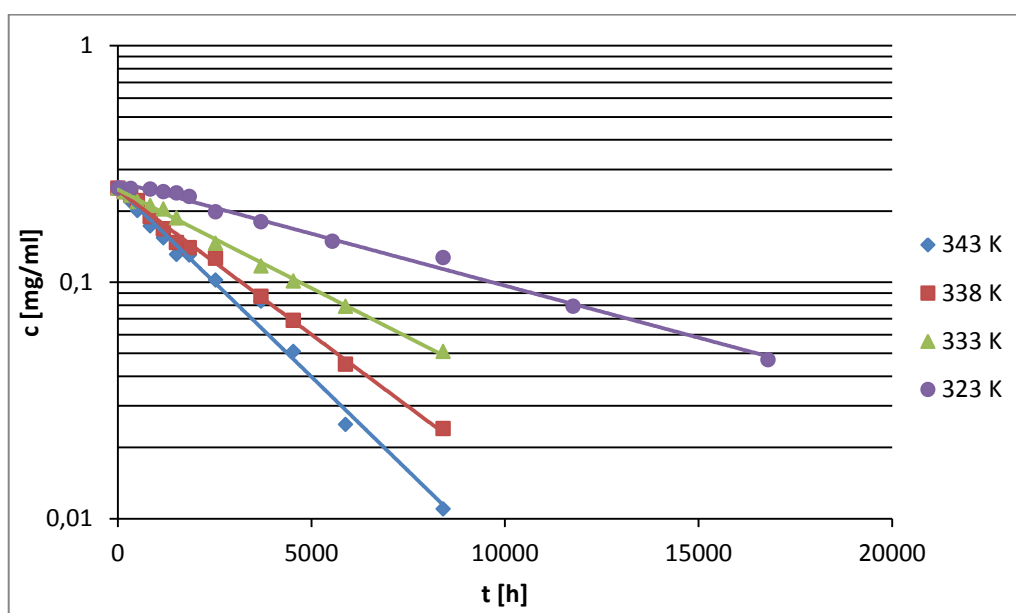
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.01 \pm 0.06) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.87 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = -1.32 \pm 0.04$ $S_b = 0.019$ $(k \pm \Delta k) = (2.812 \pm 0.174) \cdot 10^{-8} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.996$ $S_y = 0.050$ $t_{0.5} = 6845.7 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 1041.2 [\text{h}]$ $n = 12$
2	336	0.249	
3	840	0.247	
4	1176	0.241	
5	1512	0.238	
6	1848	0.230	
7	2520	0.198	
8	3696	0.180	
9	5544	0.149	
10	8400	0.127	
11	11760	0.079	
12	16800	0.047	



Ryc. 25. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 323 K.

Tabela 18. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza

Temp. [K]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
343	$(1.019 \pm 0.069) \cdot 10^{-7}$	$(-3.67 \pm 0.25) \cdot 10^{-4}$	$1.13 \cdot 10^{-5}$	0.995	11
338	$(7.798 \pm 0.304) \cdot 10^{-8}$	$(-2.80 \pm 0.11) \cdot 10^{-4}$	$4.97 \cdot 10^{-6}$	0.998	13
333	$(5.334 \pm 0.188) \cdot 10^{-8}$	$(-1.92 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$	$3.04 \cdot 10^{-6}$	0.998	12
323	$(2.812 \pm 0.174) \cdot 10^{-8}$	$(-1.01 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$	$2.87 \cdot 10^{-6}$	0.996	12

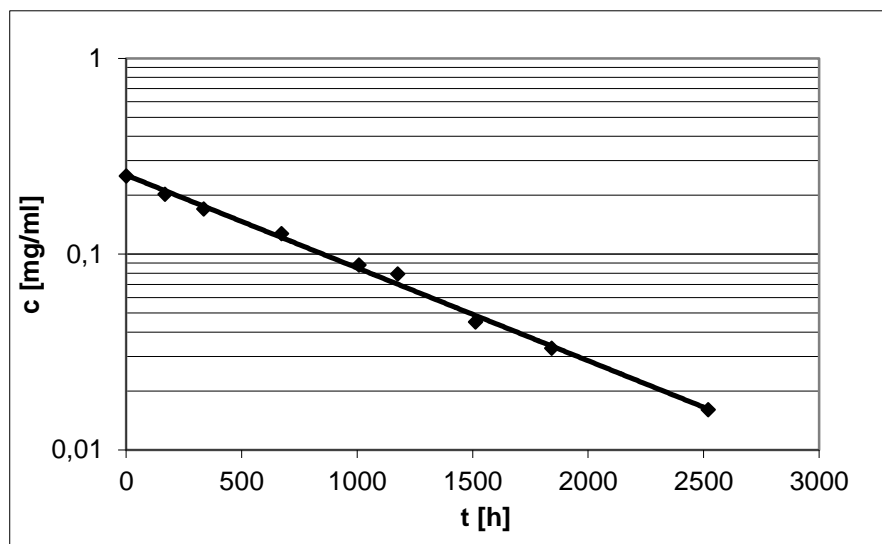


Ryc. 26. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze w atmosferze suchego powietrza

Tabela 19. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 343 K

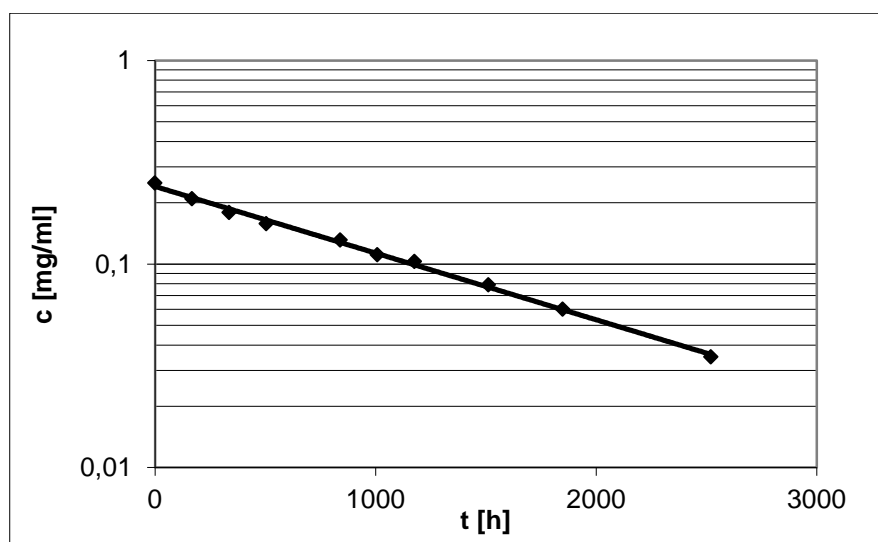
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.09 \pm 0.06) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.67 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.37 \pm 0.08$ $S_b = 0.034$ $(k \pm \Delta k) = (3.033 \pm 0.175) \cdot 10^{-8} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.063$ $t_{0.5} = 634.7 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 96.6 [\text{h}]$ $n = 9$
2	168	0.249	
3	336	0.247	
4	672	0.241	
5	1008	0.238	
6	1176	0.230	
7	1512	0.198	
8	1842	0.180	
9	2520	0.149	



Ryc. 27. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 343 K.

Tabela 20. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K

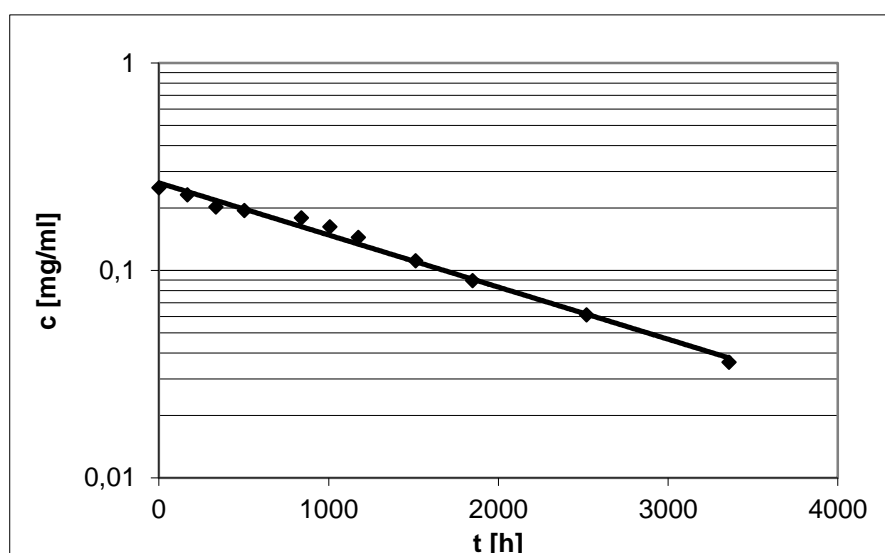
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-7.54 \pm 0.32) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.39 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.43 \pm 0.04$ $S_b = 0.017$ $(k \pm \Delta k) = (2.095 \pm 0.089) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.033$ $t_{0.5} = 918.9 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 139.8 [\text{h}]$ $n = 10$
2	168	0.209	
3	336	0.179	
4	504	0.158	
5	840	0.131	
6	1008	0.111	
7	1176	0.103	
8	1512	0.079	
9	1848	0.060	
10	2520	0.035	



Ryc. 28. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K.

Tabela 21. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 333 K

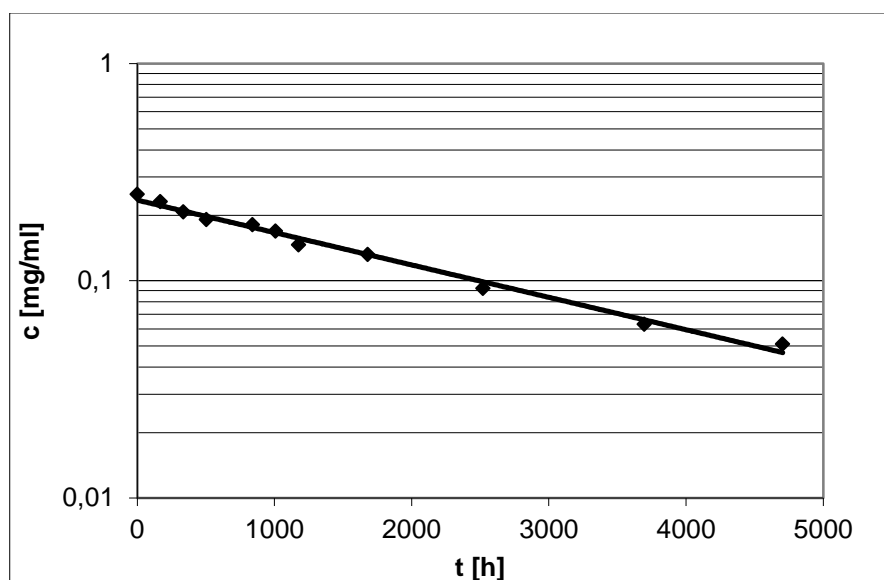
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-5.78 \pm 0.43) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.94 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.33 \pm 0.07$ $S_b = 0.030$ $(k \pm \Delta k) = (1.607 \pm 0.121) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.995$ $S_y = 0.063$ $t_{0.5} = 1197.9 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 182.2 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.231	
3	336	0.202	
4	504	0.194	
5	840	0.179	
6	1008	0.162	
7	1176	0.144	
8	1512	0.111	
9	1848	0.089	
10	2520	0.061	
11	3360	0.036	



Ryc. 29. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 333 K.

Tabela 22. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K

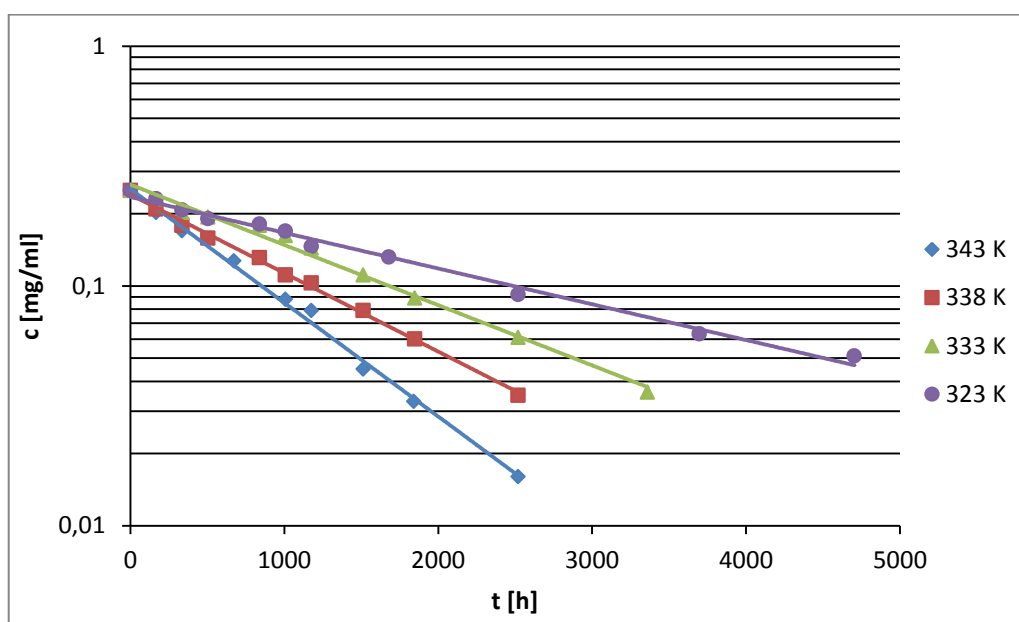
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-3.43 \pm 0.27) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.16 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.45 \pm 0.06$ $S_b = 0.024$ $(k \pm \Delta k) = (9.538 \pm 0.742) \cdot 10^{-8} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.995$ $S_y = 0.056$ $t_{0.5} = 2018.5 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 307.0 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.231	
3	336	0.207	
4	504	0.191	
5	840	0.181	
6	1008	0.169	
7	1176	0.146	
8	1680	0.132	
9	2520	0.092	
10	3696	0.063	
11	4704	0.051	



Ryc. 30. Półlogarymiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K.

Tabela 23. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza

Temp. [K]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
343	$(3.033 \pm 0.175) \cdot 10^{-8}$	$(-1.09 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	$2.67 \cdot 10^{-5}$	0.998	9
338	$(2.095 \pm 0.089) \cdot 10^{-7}$	$(-7.54 \pm 0.32) \cdot 10^{-4}$	$1.39 \cdot 10^{-5}$	0.998	10
333	$(1.607 \pm 0.121) \cdot 10^{-7}$	$(-5.78 \pm 0.43) \cdot 10^{-4}$	$1.94 \cdot 10^{-5}$	0.995	11
323	$(9.538 \pm 0.742) \cdot 10^{-8}$	$(-3.43 \pm 0.27) \cdot 10^{-4}$	$1.16 \cdot 10^{-5}$	0.995	11

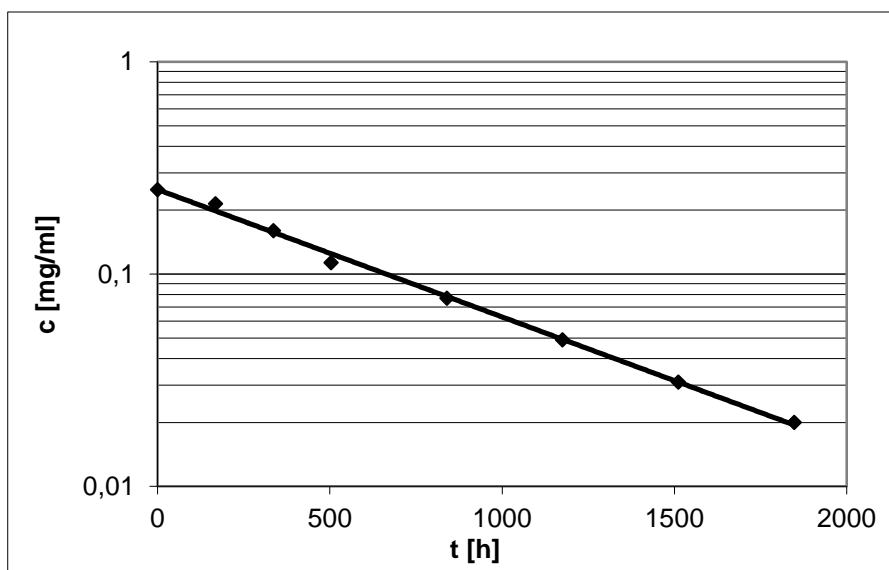


Ryc. 31. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze w atmosferze suchego powietrza

Tabela 24. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 343 K

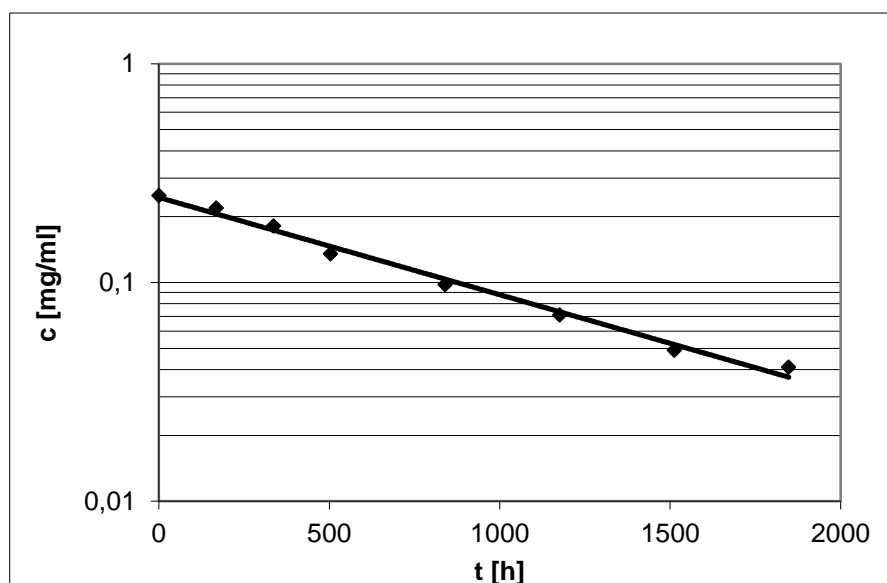
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.38 \pm 0.07) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 3.01 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.39 \pm 0.07$ $S_b = 0.030$ $(k \pm \Delta k) = (3.838 \pm 0.205) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.053$ $t_{0,5} = 501.6 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 76.3 [\text{h}]$ $n = 8$
2	168	0.214	
3	336	0.160	
4	504	0.113	
5	840	0.077	
6	1176	0.049	
7	1512	0.031	
8	1848	0.020	



Ryc. 32. Półlogarymiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 343 K.

Tabela 25. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K

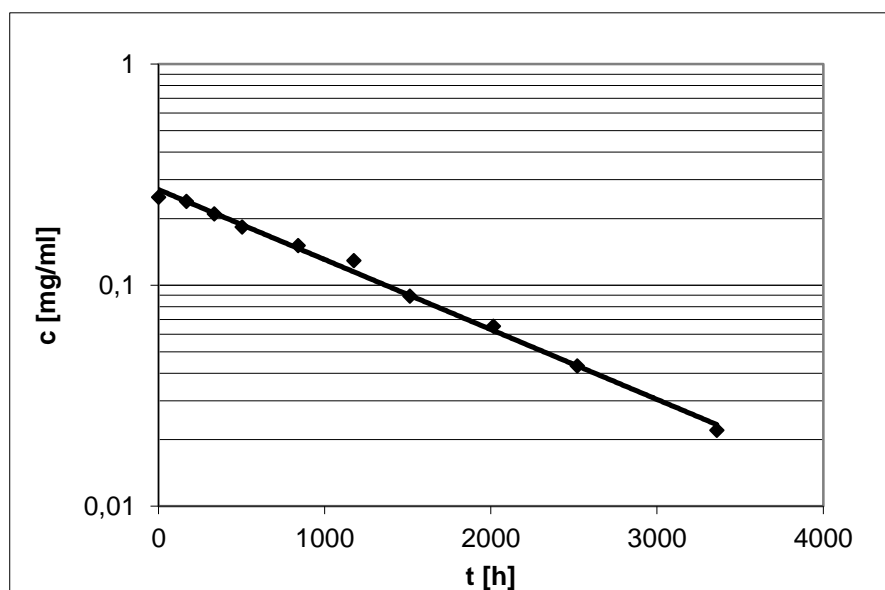
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.02 \pm 0.10) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 4.09 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.41 \pm 0.10$ $S_b = 0.041$ $(k \pm \Delta k) = (2.843 \pm 0.278) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.995$ $S_y = 0.072$ $t_{0.5} = 677.1 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 102.9 [\text{h}]$ $n = 8$
2	168	0.219	
3	336	0.181	
4	504	0.135	
5	840	0.098	
6	1176	0.071	
7	1512	0.049	
8	1848	0.041	



Ryc. 33. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K.

Tabela 26. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 333 K

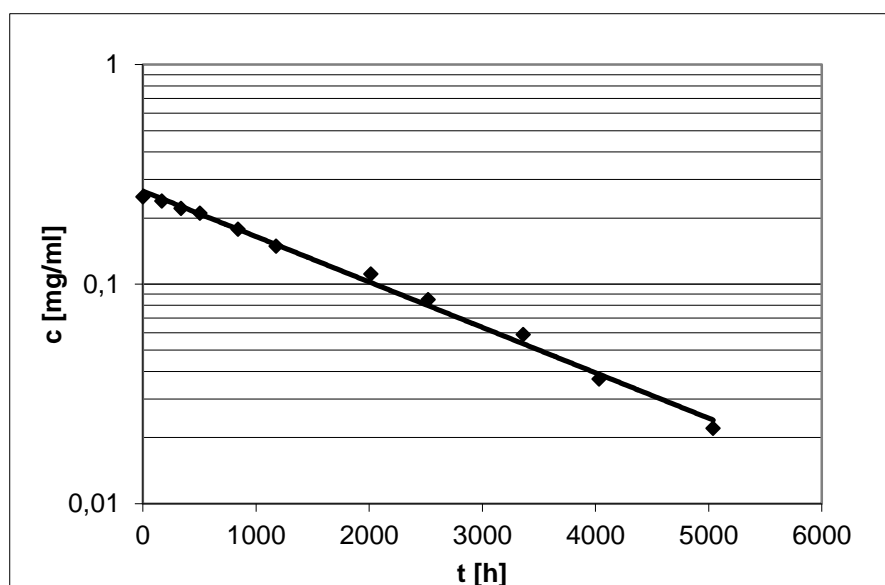
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-7.28 \pm 0.40) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.75 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.31 \pm 0.07$ $S_b = 0.028$ $(k \pm \Delta k) = (2.023 \pm 0.112) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.058$ $t_{0.5} = 951.6 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 144.7 [\text{h}]$ $n = 10$
2	168	0.239	
3	336	0.210	
4	504	0.183	
5	840	0.151	
6	1176	0.129	
7	1512	0.089	
8	2016	0.065	
9	2520	0.043	
10	3360	0.022	



Ryc. 34. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 333 K.

Tabela 27. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K

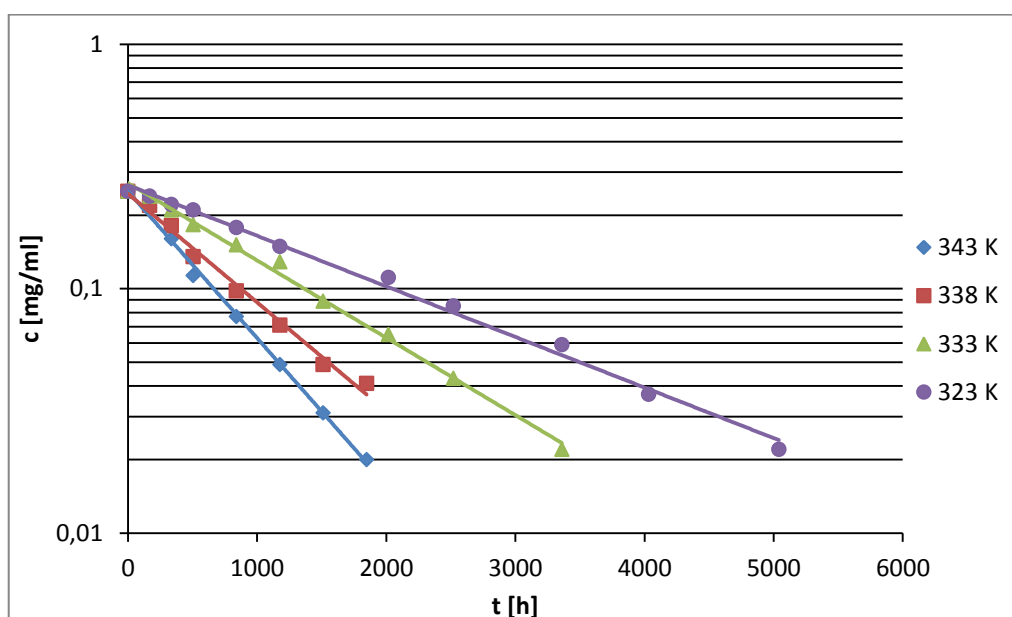
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-4.76 \pm 0.27) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.17 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.33 \pm 0.06$ $S_b = 0.029$ $(k \pm \Delta k) = (1.323 \pm 0.073) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.997$ $S_y = 0.064$ $t_{0,5} = 1455.0 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 221.3 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.239	
3	336	0.221	
4	504	0.210	
5	840	0.178	
6	1176	0.149	
7	2016	0.111	
8	2520	0.085	
9	3360	0.059	
10	4032	0.037	
11	5040	0.022	



Ryc. 35. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K.

Tabela 28. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza

Temp. [K]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
343	$(3.838 \pm 0.205) \cdot 10^{-7}$	$(-1.38 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	$3.01 \cdot 10^{-5}$	0.998	8
338	$(2.843 \pm 0.278) \cdot 10^{-7}$	$(-1.02 \pm 0.10) \cdot 10^{-3}$	$4.09 \cdot 10^{-5}$	0.995	8
333	$(2.023 \pm 0.112) \cdot 10^{-7}$	$(-7.28 \pm 0.40) \cdot 10^{-4}$	$1.75 \cdot 10^{-5}$	0.998	10
323	$(1.323 \pm 0.073) \cdot 10^{-7}$	$(-4.76 \pm 0.27) \cdot 10^{-4}$	$1.17 \cdot 10^{-5}$	0.997	11

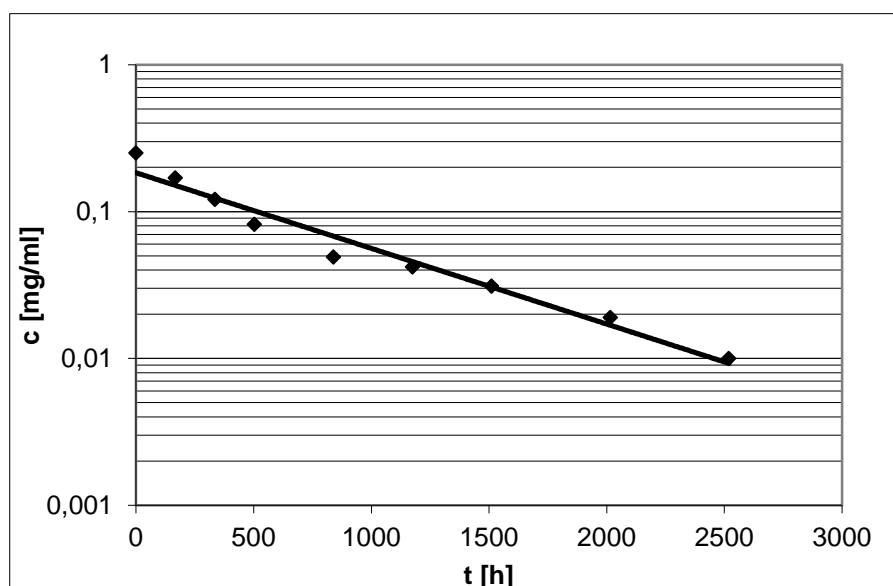


Ryc. 36. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze w atmosferze suchego powietrza

Tabela 29. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 343 K

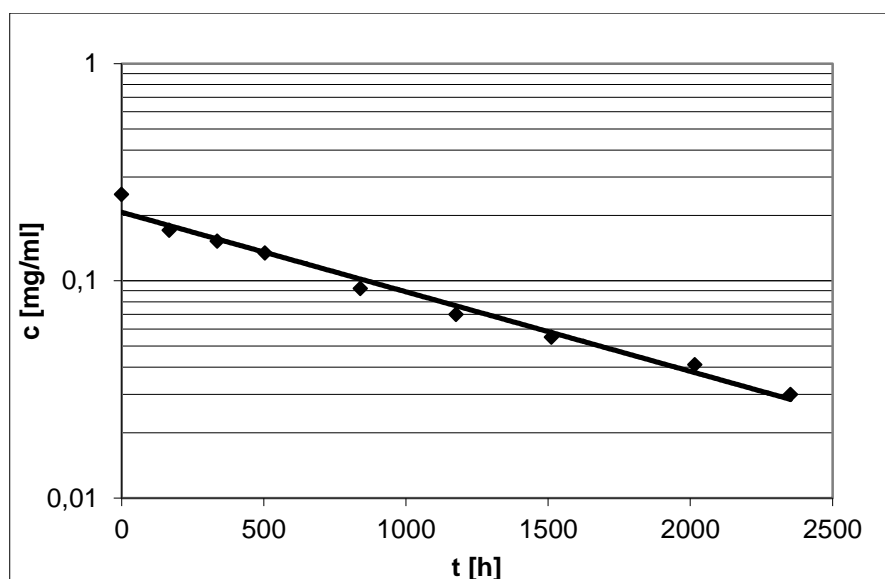
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.19 \pm 0.19) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 8.22 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.69 \pm 0.25$ $S_b = 0.106$ $(k \pm \Delta k) = (3.295 \pm 0.540) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.984$ $S_y = 0.202$ $t_{0.5} = 584.2 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 88.9 [\text{h}]$ $n = 9$
2	168	0.169	
3	336	0.121	
4	504	0.082	
5	840	0.049	
6	1176	0.042	
7	1512	0.031	
8	2016	0.019	
9	2520	0.010	



Ryc. 37. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 343 K.

Tabela 30. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K

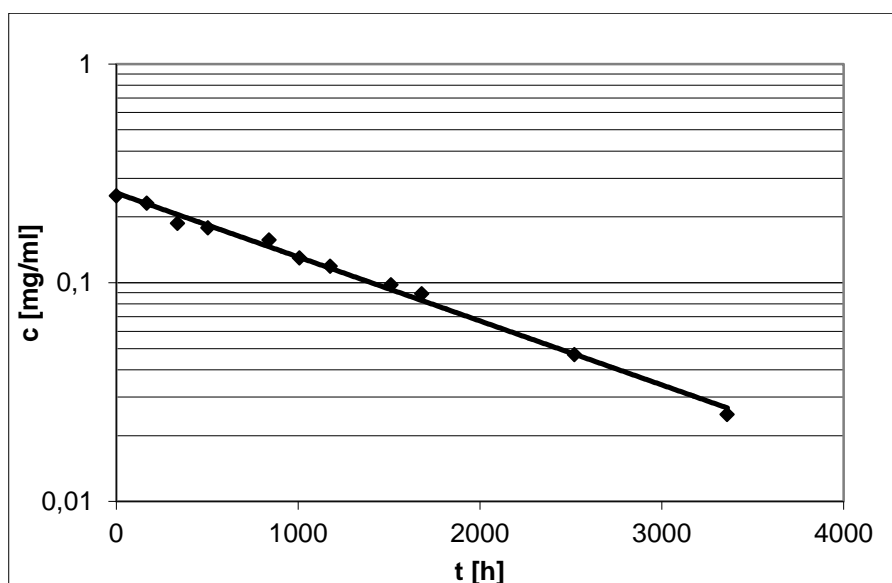
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-8.43 \pm 1.00) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 4.23 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.58 \pm 0.13$ $S_b = 0.053$ $(k \pm \Delta k) = (2.342 \pm 0.278) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.991$ $S_y = 0.100$ $t_{0.5} = 822.0 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 125.0 [\text{h}]$ $n = 9$
2	168	0.171	
3	336	0.152	
4	504	0.134	
5	840	0.092	
6	1176	0.070	
7	1512	0.055	
8	2016	0.041	
9	2352	0.030	



Ryc. 38. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K.

Tabela 31. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 333 K

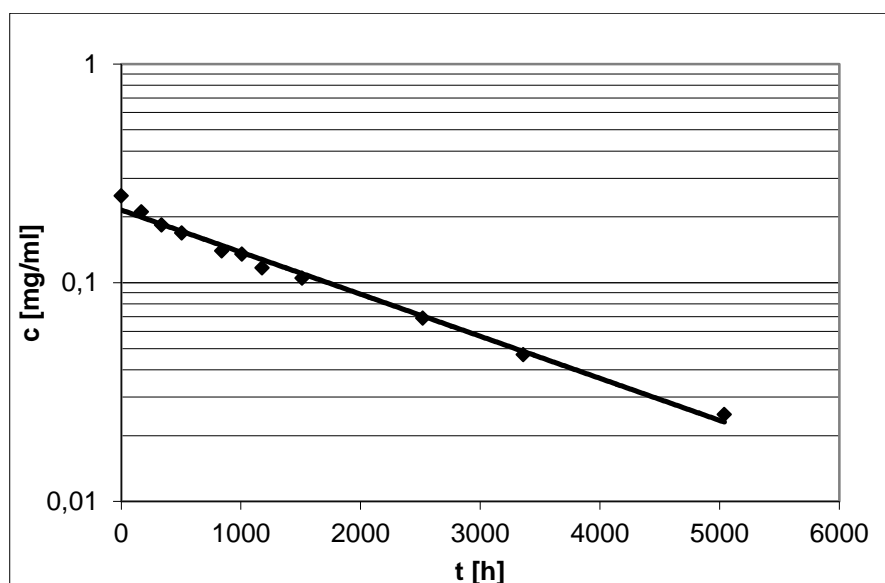
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-6.73 \pm 0.39) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.72 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.36 \pm 0.06$ $S_b = 0.027$ $(k \pm \Delta k) = (1.870 \pm 0.108) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.997$ $S_y = 0.056$ $t_{0.5} = 1029.4 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 156.6 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.231	
3	336	0.187	
4	504	0.178	
5	840	0.157	
6	1008	0.130	
7	1176	0.119	
8	1512	0.098	
9	1680	0.089	
10	2520	0.047	
11	3360	0.025	



Ryc. 39. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 333 K.

Tabela 32. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K

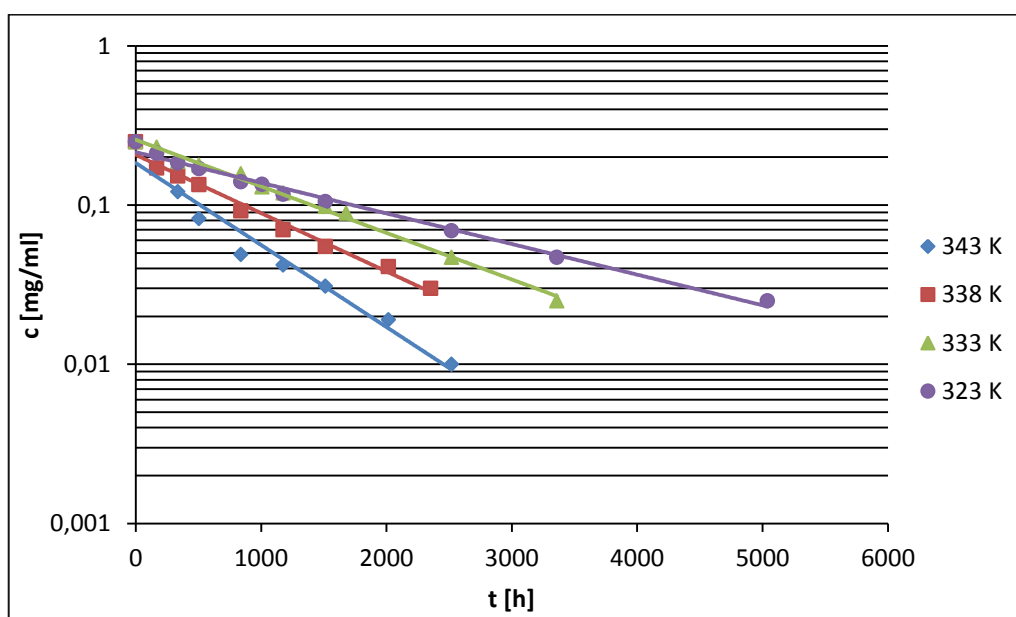
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-4.42 \pm 0.35) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.48 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.54 \pm 0.07$ $S_b = 0.031$ $(k \pm \Delta k) = (1.230 \pm 0.097) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.995$ $S_y = 0.073$ $t_{0.5} = 1566.3 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 238.2 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.211	
3	336	0.184	
4	504	0.169	
5	840	0.140	
6	1008	0.135	
7	1176	0.117	
8	1512	0.105	
9	2520	0.069	
10	3360	0.047	
11	5040	0.025	



Ryc. 40. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K.

Tabela 33. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza

Temp. [K]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
343	$(3.295 \pm 0.540) \cdot 10^{-7}$	$(-1.19 \pm 0.19) \cdot 10^{-3}$	$8.22 \cdot 10^{-5}$	0.984	9
338	$(2.342 \pm 0.278) \cdot 10^{-7}$	$(-8.43 \pm 1,00) \cdot 10^{-4}$	$4.23 \cdot 10^{-5}$	0.991	9
333	$(1.870 \pm 0.108) \cdot 10^{-7}$	$(-6.73 \pm 0.39) \cdot 10^{-4}$	$1.72 \cdot 10^{-5}$	0.997	11
323	$(1.230 \pm 0.097) \cdot 10^{-7}$	$(-4.42 \pm 0.35) \cdot 10^{-4}$	$1.48 \cdot 10^{-5}$	0.995	11



Ryc. 41. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K.

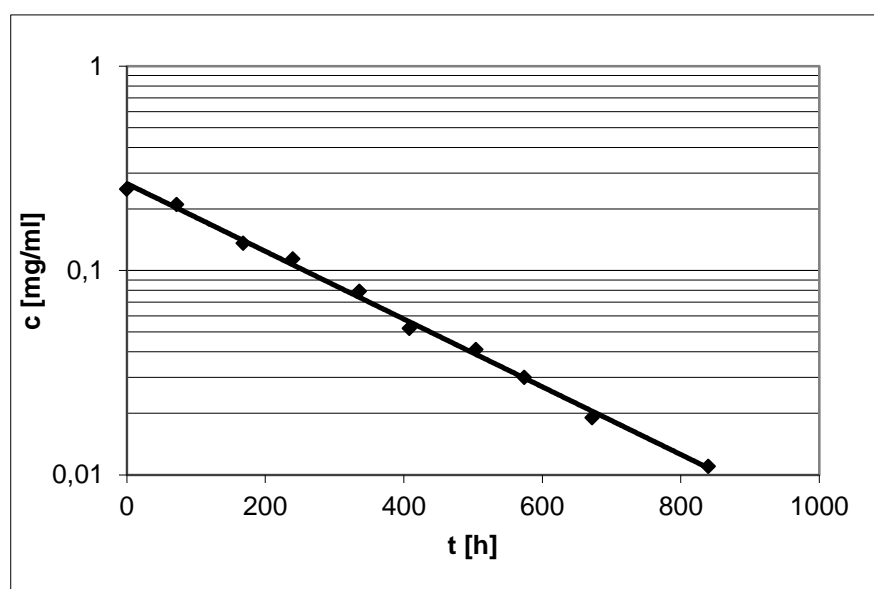
Tabela 34. Zbiornicze zestawienie parametrów kinetycznych reakcji rozkładu w temp. 343 K, 338 K, 333 K, 323 K

Badane próbki	Parametry kinetyczne w temperaturze 343 K			
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	$t_{0,1} [h]$	$t_{0,5} [h]$
α -Tokoferol	$(4.976 \pm 0.298) \cdot 10^{-7}$	$(-1.79 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$	58.8	386.9
α -T w kompleksie inkluzyjnym z β -CD	$(1.019 \pm 0.069) \cdot 10^{-7}$	$(-3.67 \pm 0.25) \cdot 10^{-4}$	287.6	1891.0
α -T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP- β -CD	$(3.033 \pm 0.175) \cdot 10^{-8}$	$(-1.09 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	96.6	634.7
α -T w mieszaninie fizycznej z β -CD	$(3.838 \pm 0.205) \cdot 10^{-7}$	$(-1.38 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	76.3	501.6
α -T w mieszaninie fizycznej z 2-HP- β -CD	$(3.295 \pm 0.540) \cdot 10^{-7}$	$(-1.19 \pm 0.19) \cdot 10^{-3}$	88.9	584.2
Badane próbki	Parametry kinetyczne w temperaturze 338 K			
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	$t_{0,1} [h]$	$t_{0,5} [h]$
α -Tokoferol	$(4.189 \pm 0.342) \cdot 10^{-7}$	$(-1.51 \pm 0.12) \cdot 10^{-3}$	69.9	459.5
α -T w kompleksie inkluzyjnym z β -CD	$(7.798 \pm 0.304) \cdot 10^{-8}$	$(-2.80 \pm 0.11) \cdot 10^{-4}$	375.5	2468.9
α -T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP- β -CD	$(2.095 \pm 0.089) \cdot 10^{-7}$	$(-7.54 \pm 0.32) \cdot 10^{-4}$	139.8	918.9
α -T w mieszaninie fizycznej z β -CD	$(2.843 \pm 0.278) \cdot 10^{-7}$	$(-1.02 \pm 0.10) \cdot 10^{-3}$	102.9	677.1
α -T w mieszaninie fizycznej z 2-HP- β -CD	$(2.342 \pm 0.278) \cdot 10^{-7}$	$(-8.43 \pm 1,00) \cdot 10^{-4}$	125.0	822.0
Badane próbki	Parametry kinetyczne w temperaturze 333 K			
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	$t_{0,1} [h]$	$t_{0,5} [h]$
α -Tokoferol	$(3.352 \pm 0.219) \cdot 10^{-7}$	$(-1.21 \pm 0.08) \cdot 10^{-3}$	87.4	574.5
α -T w kompleksie inkluzyjnym z β -CD	$(5.334 \pm 0.188) \cdot 10^{-8}$	$(-1.92 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$	548.9	3608.9
α -T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP- β -CD	$(1.607 \pm 0.121) \cdot 10^{-7}$	$(-5.78 \pm 0.43) \cdot 10^{-4}$	182.2	1197.9
α -T w mieszaninie fizycznej z β -CD	$(2.023 \pm 0.112) \cdot 10^{-7}$	$(-7.28 \pm 0.40) \cdot 10^{-4}$	144.7	951.6
α -T w mieszaninie fizycznej z 2-HP- β -CD	$(1.870 \pm 0.108) \cdot 10^{-7}$	$(-6.73 \pm 0.39) \cdot 10^{-4}$	156.6	1029.4
Badane próbki	Parametry kinetyczne w temperaturze 323 K			
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	$t_{0,1} [h]$	$t_{0,5} [h]$
α -Tokoferol	$(2.081 \pm 0.082) \cdot 10^{-7}$	$(-7.49 \pm 0.29) \cdot 10^{-4}$	140.6	924.6
α -T w kompleksie inkluzyjnym z β -CD	$(2.812 \pm 0.174) \cdot 10^{-8}$	$(-1.01 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$	1041.2	6845.7
α -T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP- β -CD	$(9.538 \pm 0.742) \cdot 10^{-8}$	$(-3.43 \pm 0.27) \cdot 10^{-4}$	307.0	2018.5
α -T w mieszaninie fizycznej z β -CD	$(1.323 \pm 0.073) \cdot 10^{-7}$	$(-4.76 \pm 0.27) \cdot 10^{-4}$	221.3	1455.0
α -T w mieszaninie fizycznej z 2-HP- β -CD	$(1.230 \pm 0.097) \cdot 10^{-7}$	$(-4.42 \pm 0.35) \cdot 10^{-4}$	238.2	1566.3

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w podwyższonej temperaturze oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej

Tabela 35. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K, RH ~ 92.0%

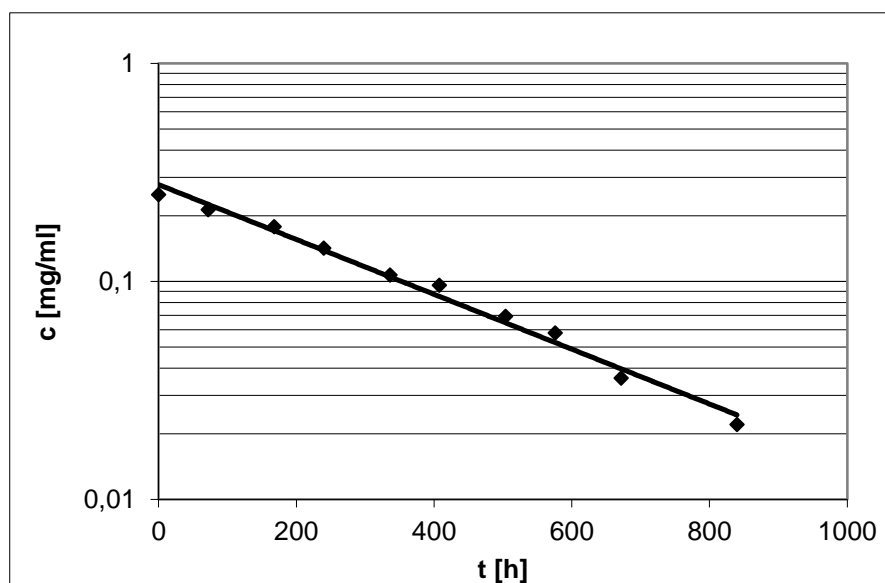
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-3.82 \pm 0.17) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 7.57 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.32 \pm 0.08$ $S_b = 0.04$ $(k \pm \Delta k) = (1.060 \pm 0.048) \cdot 10^{-6} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.061$ $t_{0.5} = 181.5 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 27.6 [\text{h}]$ $n = 10$
2	72	0.210	
3	168	0.136	
4	240	0.114	
5	336	0.079	
6	408	0.052	
7	504	0.041	
8	574	0.030	
9	672	0.019	
10	840	0.011	



Ryc. 42. Półlogarymiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K, RH ~ 92.0%.

Tabela 36. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temp. 338 K, RH ~ 76.4%

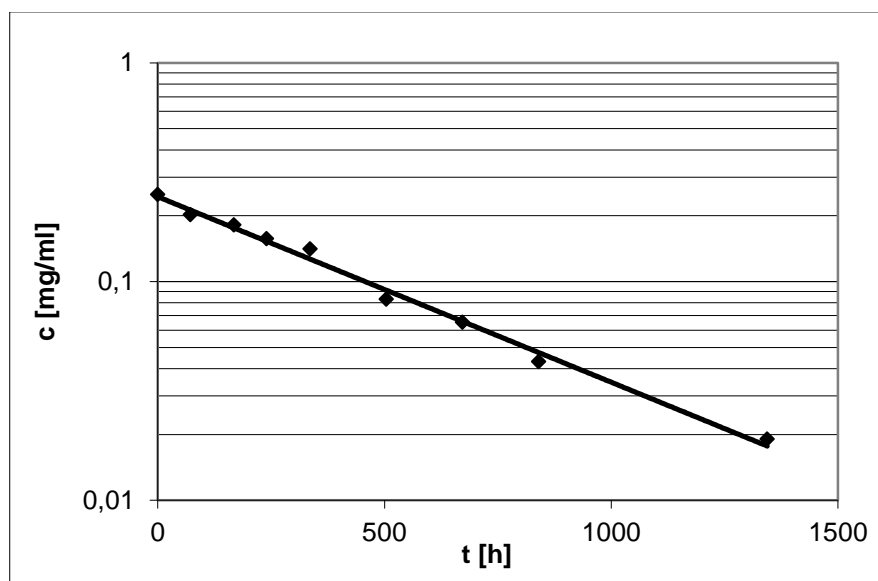
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-2.90 \pm 0.26) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.12 \cdot 10^{-4}$ $b \pm \Delta b = -1.28 \pm 0.12$ $S_b = 0.052$ $(k \pm \Delta k) = (8.043 \pm 0.718) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.994$ $S_y = 0.090$ $t_{0.5} = 239.3 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 36.4 [\text{h}]$ $n = 10$
2	72	0.213	
3	168	0.178	
4	240	0.142	
5	336	0.107	
6	408	0.096	
7	504	0.069	
8	576	0.058	
9	672	0.036	
10	840	0.022	



Ryc. 43. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K, RH ~ 76.4%.

Tabela 37. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%

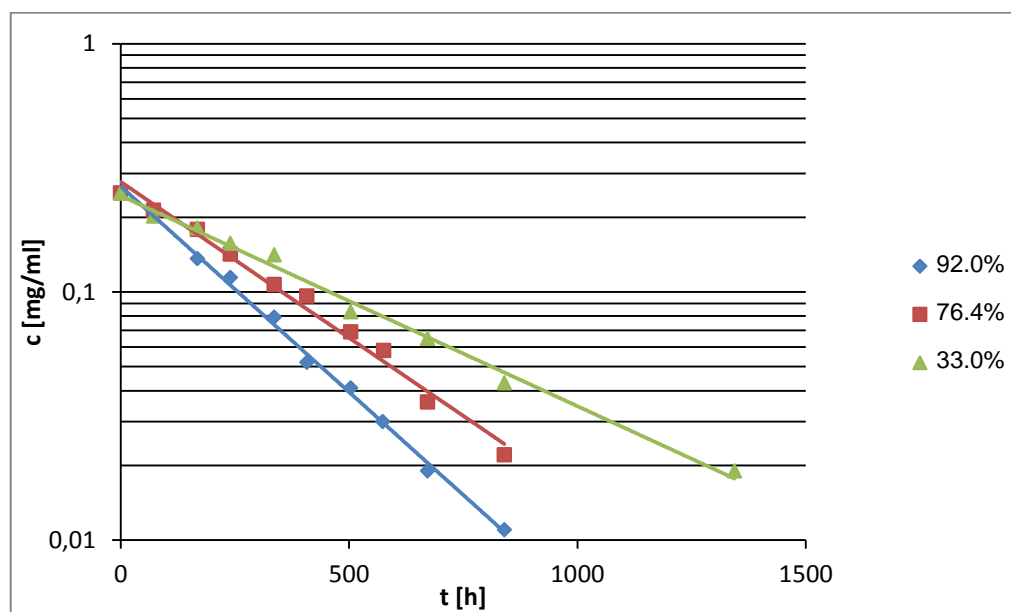
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.95 \pm 0.20) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 6.16 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.41 \pm 0.12$ $S_b = 0.040$ $(k \pm \Delta k) = (5.424 \pm 0.545) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.997$ $S_y = 0.075$ $t_{0.5} = 354.9 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 54.0 [\text{h}]$ $n = 9$
2	72	0.202	
3	168	0.181	
4	240	0.157	
5	336	0.141	
6	504	0.083	
7	672	0.065	
8	840	0.043	
9	1344	0.019	



Ryc. 44. Półlogarymiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%.

Tabela 38. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w temperaturze 338 K oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%

Wilgotność względna [%]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(a \pm \Delta a)$ [h^{-1}]	S_a	r	n
92.0	$(1.060 \pm 0.048) \cdot 10^{-6}$	$(-3.82 \pm 0.17) \cdot 10^{-3}$	$7.57 \cdot 10^{-5}$	0.998	10
76.4	$(8.043 \pm 0.718) \cdot 10^{-7}$	$(-2.90 \pm 0.26) \cdot 10^{-3}$	$1.12 \cdot 10^{-4}$	0.994	10
33.0	$(5.424 \pm 0.545) \cdot 10^{-7}$	$(-1.59 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	$6.16 \cdot 10^{-5}$	0.997	9

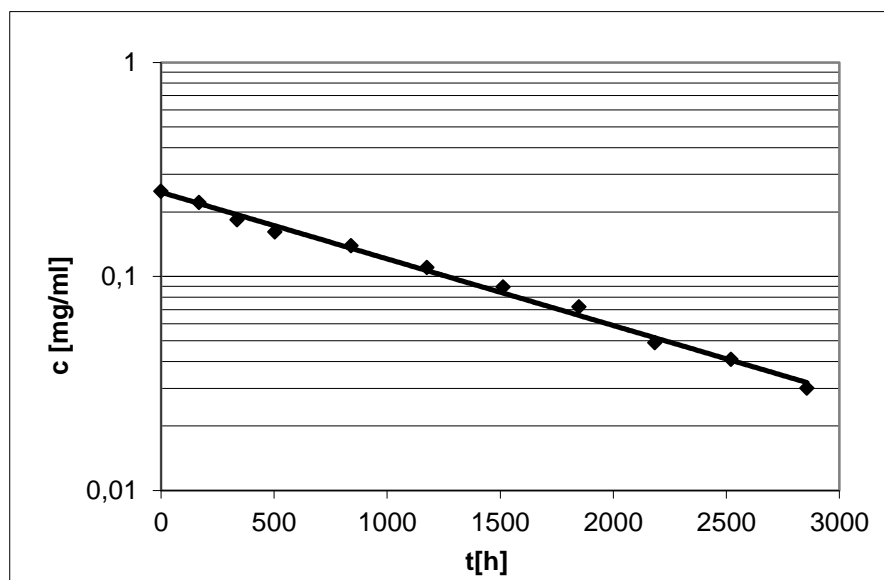


Ryc. 45. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej

Tabela 39. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 92.0%

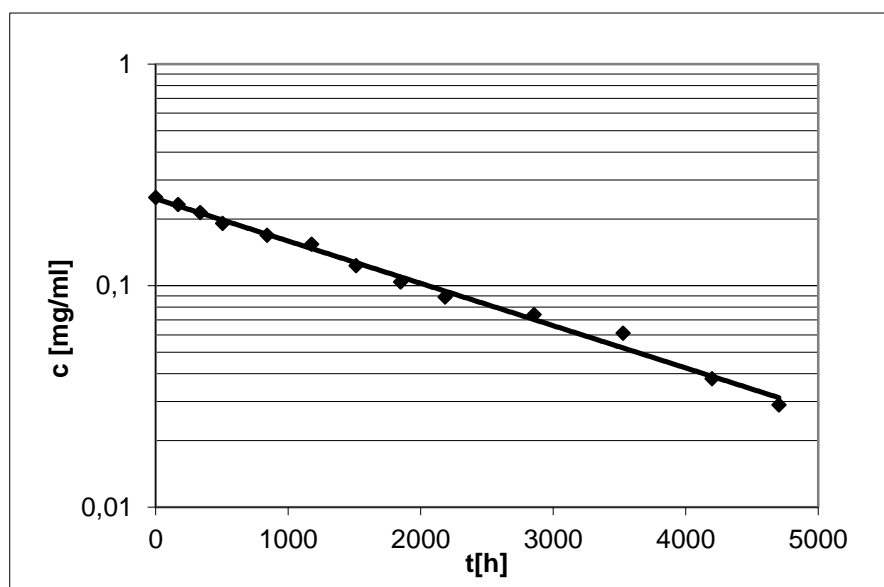
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-7.17 \pm 0.41) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.80 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.40 \pm 0.06$ $S_b = 0.028$ $(k \pm \Delta k) = (1.991 \pm 0.113) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.997$ $S_y = 0.056$ $t_{0.5} = 966.5 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 147.0 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.221	
3	336	0.184	
4	504	0.161	
5	840	0.139	
6	1176	0.110	
7	1512	0.089	
8	1848	0.072	
9	2184	0.049	
10	2520	0.041	
11	2856	0.030	



Ryc. 46. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 92.0%.

Tabela 40. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH \sim 76.4%

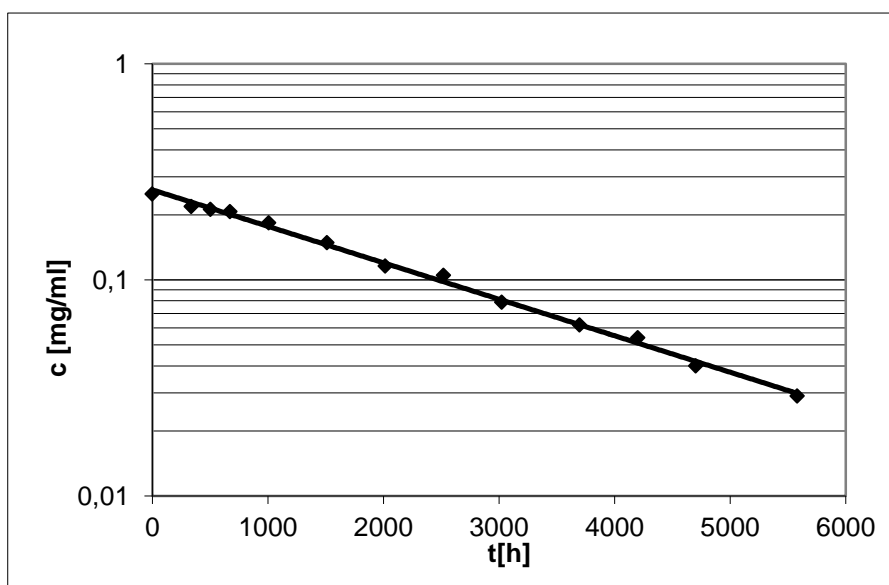
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-4.39 \pm 0.25) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.15 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.40 \pm 0.06$ $S_b = 0.027$ $(k \pm \Delta k) = (1.221 \pm 0.070) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.996$ $S_y = 0.063$ $t_{0,5} = 1577.1 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 239.9 [\text{h}]$ $n = 13$
2	168	0.241	
3	336	0.232	
4	504	0.221	
5	840	0.189	
6	1176	0.168	
7	1512	0.147	
8	1848	0.140	
9	2184	0.126	
10	2856	0.087	
11	3528	0.069	
12	4200	0.045	
13	4704	0.024	



Ryc. 47. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH \sim 76.4%.

Tabela 41. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%

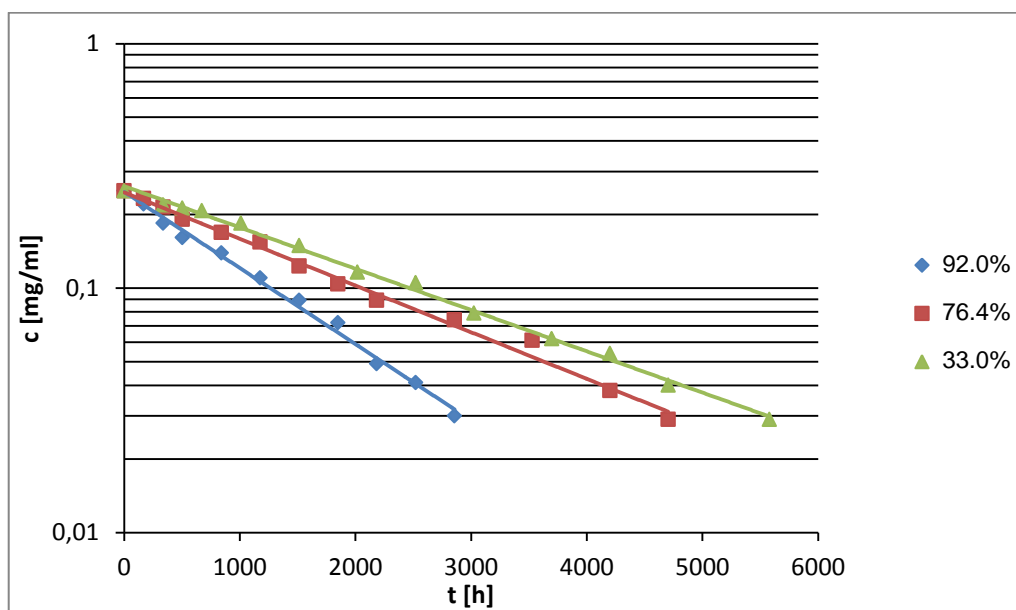
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.25	$(a \pm \Delta a) = (-3.88 \pm 0.15) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 6.66 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = -1.34 \pm 0.04$ $S_b = 0.019$ $(k \pm \Delta k) = (1.080 \pm 0.040) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.042$ $t_{0,5} = 1782.3 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 271.1 [\text{h}]$ $n = 13$
2	336	0.219	
3	504	0.212	
4	672	0.207	
5	1008	0.184	
6	1512	0.149	
7	2016	0.116	
8	2520	0.105	
9	3024	0.079	
10	3696	0.062	
11	4200	0.054	
12	4704	0.04	
13	5580	0.029	



Ryc. 48. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%.

Tabela 42. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%

Wilgotność względna [%]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
92.0	$(1.991 \pm 0.113) \cdot 10^{-7}$	$(-7.17 \pm 0.41) \cdot 10^{-4}$	$1.80 \cdot 10^{-5}$	0.997	11
76.4	$(1.221 \pm 0.070) \cdot 10^{-7}$	$(-4.39 \pm 0.25) \cdot 10^{-4}$	$1.15 \cdot 10^{-5}$	0.996	13
33.0	$(1.080 \pm 0.040) \cdot 10^{-7}$	$(-3.88 \pm 0.15) \cdot 10^{-4}$	$6.66 \cdot 10^{-6}$	0.998	13

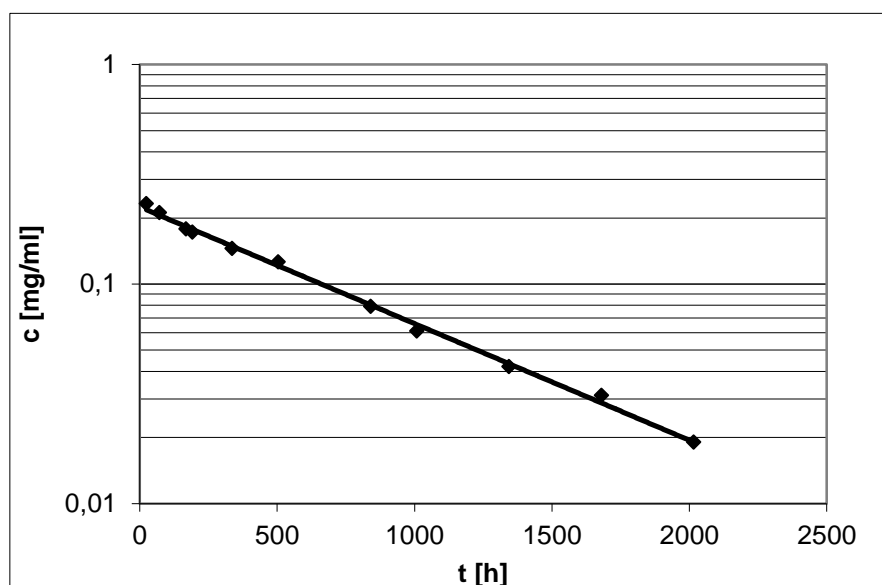


Ryc. 49. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej

Tabela 43. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K, RH ~ 92.0%

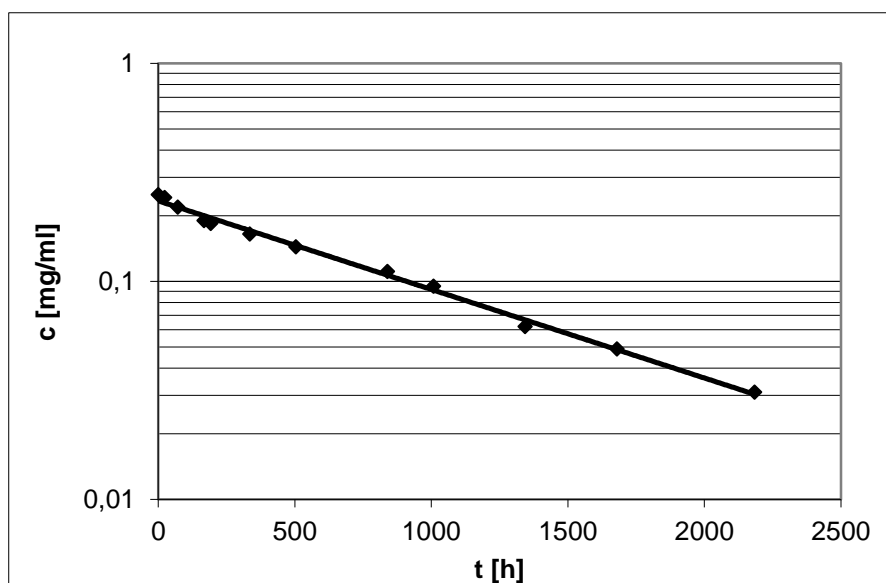
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.24 \pm 0.05) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.38 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.48 \pm 0.05$ $S_b = 0.024$ $(k \pm \Delta k) = (3.438 \pm 0.148) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.055$ $t_{0.5} = 560.0 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 85.2 [\text{h}]$ $n = 12$
2	24	0.232	
3	72	0.211	
4	168	0.178	
5	192	0.172	
6	336	0.145	
7	504	0.126	
8	840	0.079	
9	1008	0.061	
10	1344	0.042	
11	1680	0.031	
12	2016	0.019	



Ryc. 50. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 92.0%.

Tabela 44. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K, RH ~ 76.4%

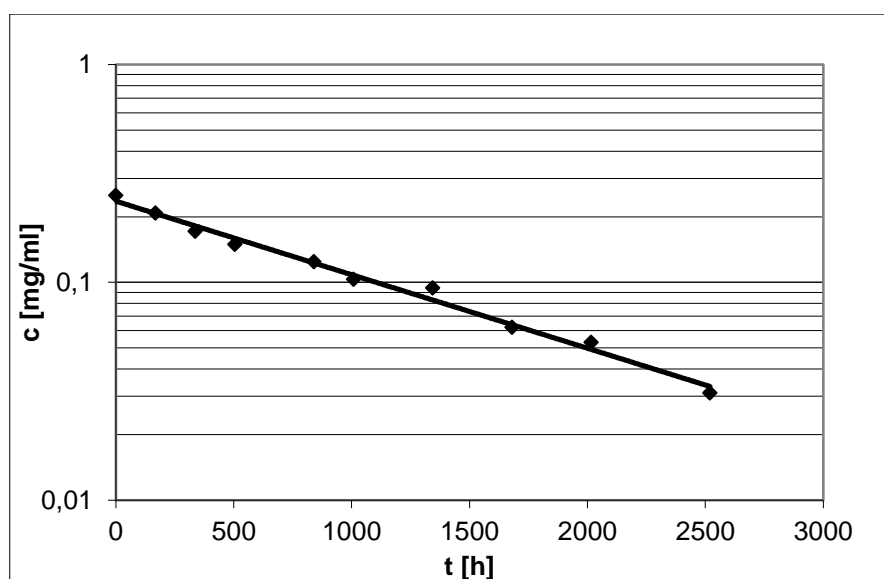
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-9.35 \pm 0.46) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.05 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.45 \pm 0.05$ $S_b = 0.020$ $(k \pm \Delta k) = (2.598 \pm 0.127) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.049$ $t_{0.5} = 741.0 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 112.7 [\text{h}]$ $n = 12$
2	24	0.242	
3	72	0.219	
4	168	0.190	
5	192	0.184	
6	336	0.165	
7	504	0.144	
8	840	0.111	
9	1008	0.095	
10	1344	0.062	
11	1680	0.049	
12	2184	0.031	



Ryc. 51. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 76.4%.

Tabela 45. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 323 K, RH ~ 33.0%

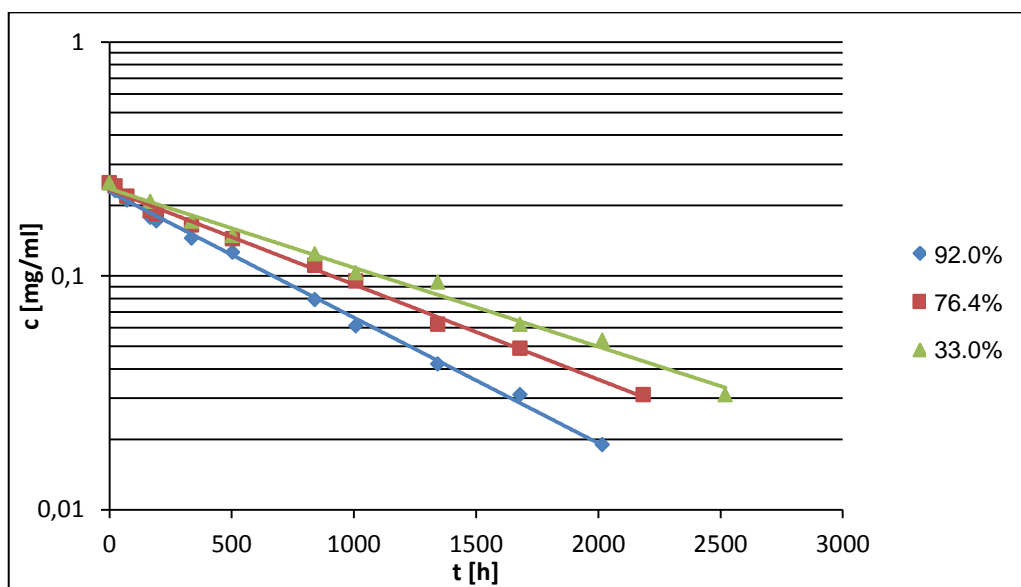
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-7.77 \pm 0.65) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.84 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.44 \pm 0.09$ $S_b = 0.037$ $(k \pm \Delta k) = (2.159 \pm 0.182) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.995$ $S_y = 0.071$ $t_{0,5} = 891.5 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 135.6 [\text{h}]$ $n = 10$
2	168	0.208	
3	336	0.171	
4	504	0.149	
5	840	0.124	
6	1176	0.103	
7	1512	0.094	
8	1848	0.062	
9	2184	0.053	
10	2520	0.031	



Rycina 52. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%.

Tabela 46. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%

Wilgotność względna [%]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
92.0	$(3.438 \pm 0.148) \cdot 10^{-7}$	$(-1.24 \pm 0.05) \cdot 10^{-3}$	$2.38 \cdot 10^{-5}$	0.998	12
76.4	$(2.598 \pm 0.127) \cdot 10^{-7}$	$(-9.35 \pm 0.46) \cdot 10^{-4}$	$2.05 \cdot 10^{-5}$	0.998	12
33.0	$(2.159 \pm 0.182) \cdot 10^{-7}$	$(-7.77 \pm 0.65) \cdot 10^{-4}$	$2.84 \cdot 10^{-5}$	0.995	10

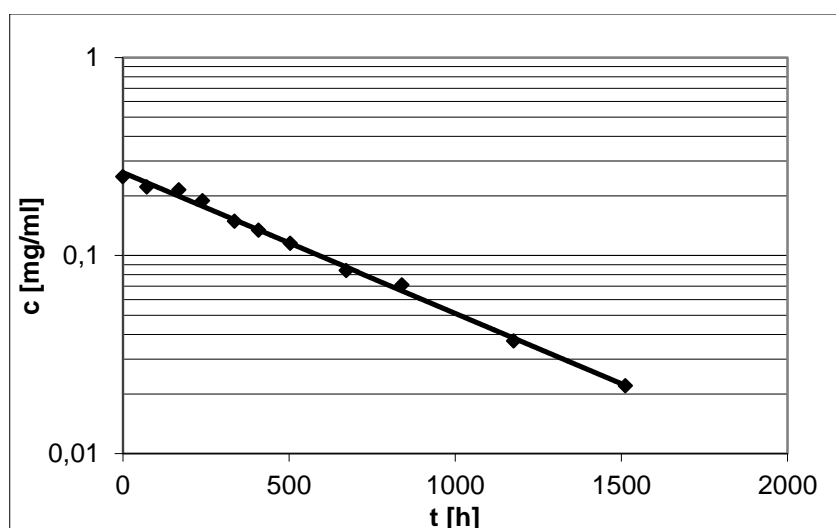


Ryc. 53. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej

Tabela 47. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K, RH ~ 92.0%

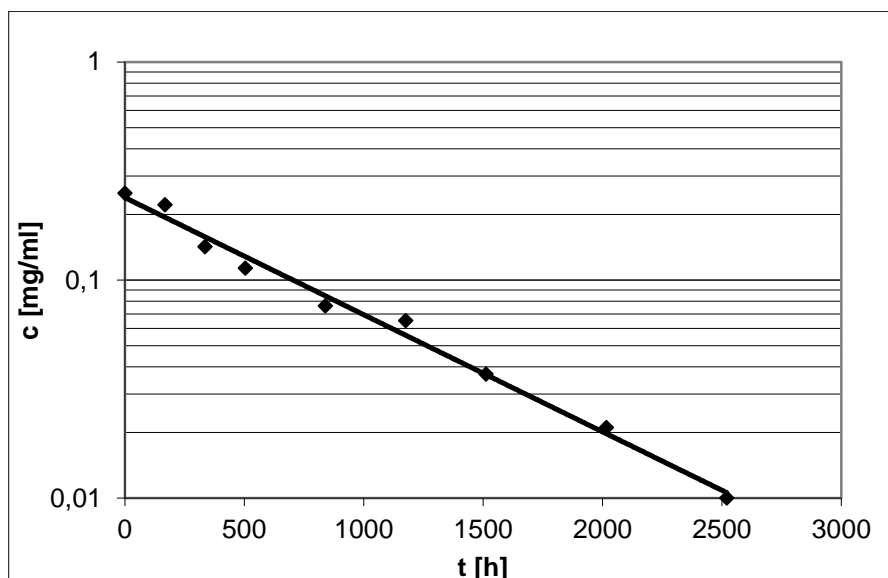
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.64 \pm 0.07) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 3.26 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.34 \pm 0.05$ $S_b = 0.023$ $(k \pm \Delta k) = (4.551 \pm 0.205) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.049$ $t_{0,5} = 423.0 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 64.3 [\text{h}]$ $n = 11$
2	72	0.222	
3	168	0.214	
4	240	0.189	
5	336	0.149	
6	408	0.134	
7	504	0.115	
8	672	0.084	
9	840	0.071	
10	1176	0.037	
11	1512	0.022	



Ryc. 54. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 92.0%.

Tabela 48. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 76.4%

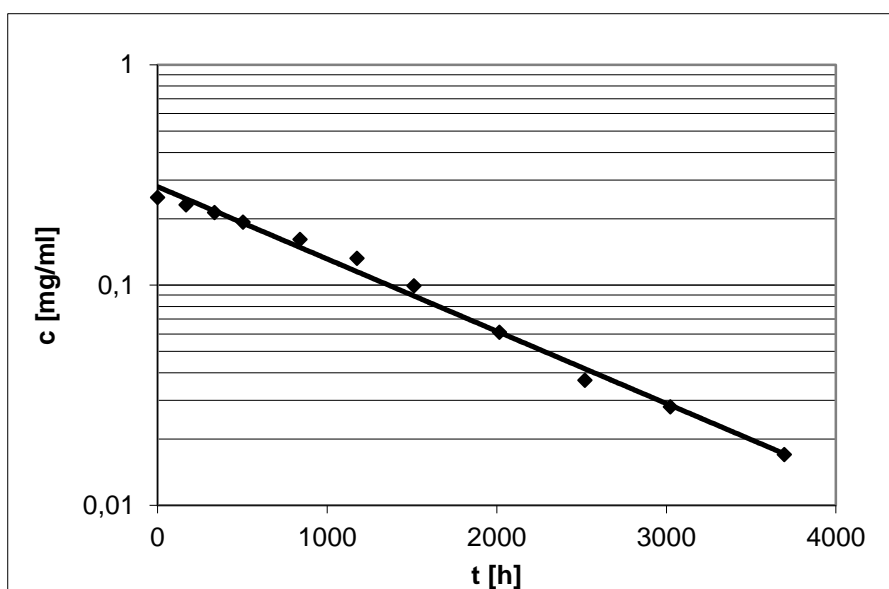
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.24 \pm 0.11) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 4.54 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.43 \pm 0.14$ $S_b = 0.059$ $(k \pm \Delta k) = (3.435 \pm 0.298) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.995$ $S_y = 0.112$ $t_{0.5} = 560.4 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 85.2 [\text{h}]$ $n = 9$
2	168	0.221	
3	336	0.142	
4	504	0.113	
5	840	0.076	
6	1176	0.065	
7	1512	0.037	
8	2016	0.021	
9	2520	0.010	



Ryc. 55. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 76.4%.

Tabela 49. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K, RH ~ 33.0%

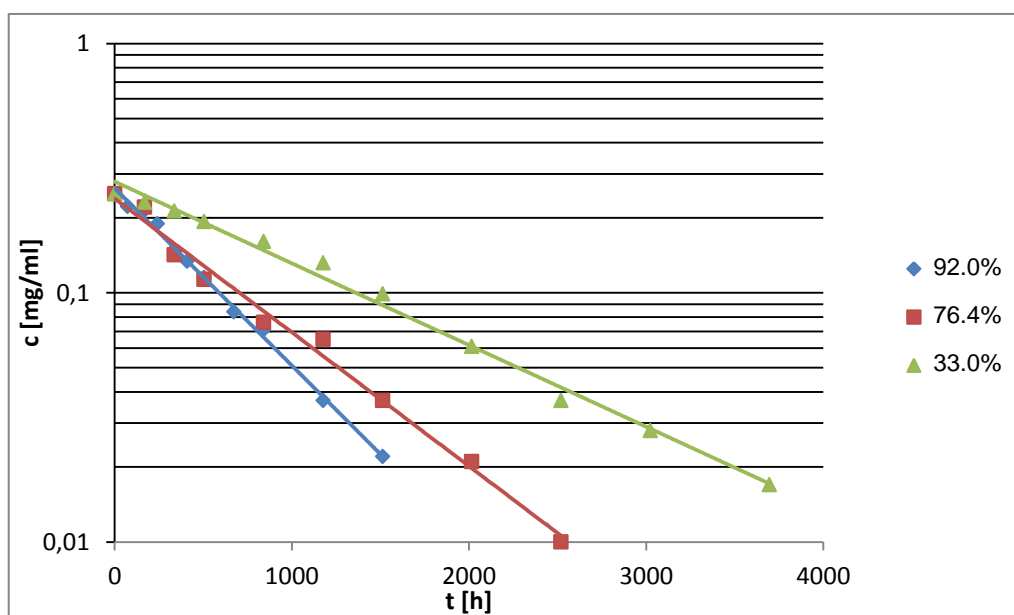
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-7.55 \pm 0.50) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.22 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.27 \pm 0.09$ $S_b = 0.041$ $(k \pm \Delta k) = (2.098 \pm 0.140) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.996$ $S_y = 0.087$ $t_{0.5} = 917.5 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 139.5 [\text{h}]$ $n = 11$
2	168	0.231	
3	336	0.213	
4	504	0.193	
5	840	0.161	
6	1176	0.132	
7	1512	0.099	
8	2016	0.061	
9	2520	0.037	
10	3024	0.028	
11	3696	0.017	



Ryc. 56. Półlogarymiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%.

Tabela 50. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%

Wilgotność względna [%]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
92.0	$(4.551 \pm 0.205) \cdot 10^{-7}$	$(-1.64 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	$3.26 \cdot 10^{-5}$	0.998	11
76.4	$(3.435 \pm 0.298) \cdot 10^{-7}$	$(-1.24 \pm 0.11) \cdot 10^{-3}$	$4.54 \cdot 10^{-5}$	0.995	9
33.0	$(2.098 \pm 0.140) \cdot 10^{-7}$	$(-7.55 \pm 0.50) \cdot 10^{-4}$	$2.22 \cdot 10^{-5}$	0.996	11

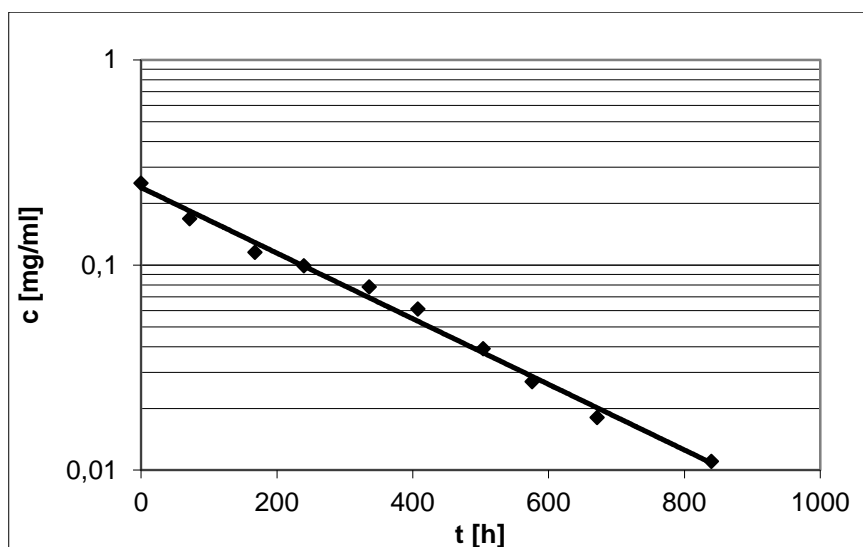


Ryc. 57. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w podwyższonej temperaturze oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej

Tabela 51. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K, RH ~ 92.0%

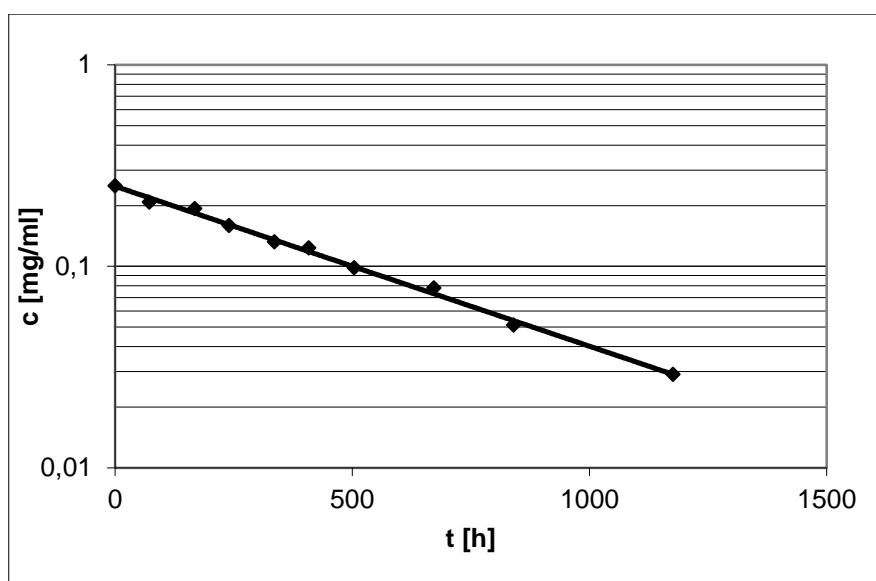
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-3.68 \pm 0.27) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 1.17 \cdot 10^{-4}$ $b \pm \Delta b = -1.43 \pm 0.12$ $S_b = 0.054$ $(k \pm \Delta k) = (1.023 \pm 0.075) \cdot 10^{-6} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.996$ $S_y = 0.096$ $t_{0.5} = 188.2 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 28.6 [\text{h}]$ $n = 10$
2	72	0.168	
3	168	0.115	
4	240	0.099	
5	336	0.078	
6	408	0.061	
7	504	0.039	
8	576	0.027	
9	672	0.018	
10	840	0.011	



Ryc. 58. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temp. 338 K, RH ~ 92.0%.

Tabela 52. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~76.4%

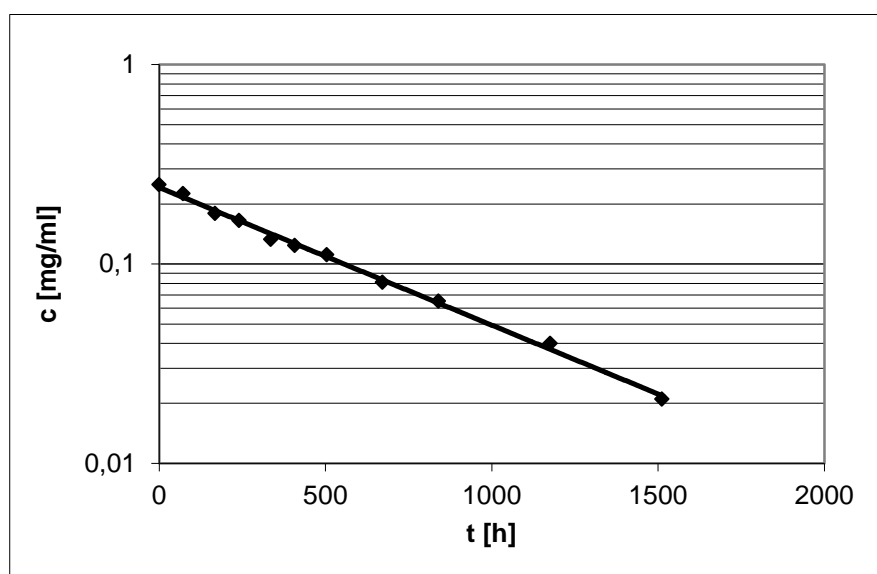
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.83 \pm 0.09) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 3.85 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.39 \pm 0.05$ $S_b = 0.02$ $(k \pm \Delta k) = (5.080 \pm 0.247) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.042$ $t_{0.5} = 379.0 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 57.6 [\text{h}]$ $n = 10$
2	72	0.208	
3	168	0.193	
4	240	0.159	
5	336	0.132	
6	408	0.123	
7	504	0.098	
8	672	0.078	
9	840	0.051	
10	1176	0.029	



Ryc. 59. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 76.4%.

Tabela 53. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%

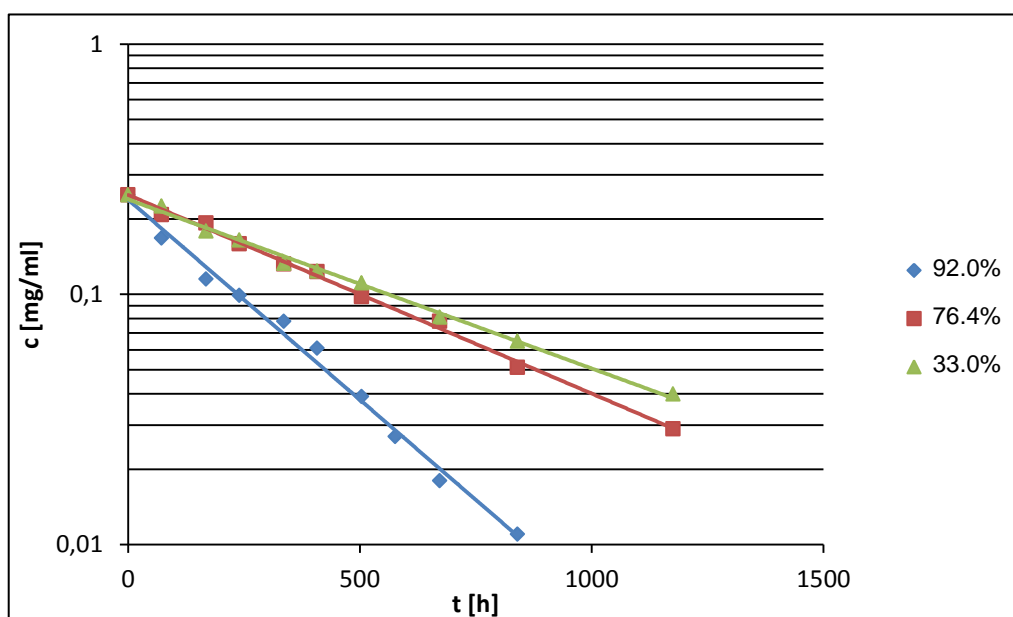
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.59 \pm 0.06) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.86 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.42 \pm 0.05$ $S_b = 0.02$ $(k \pm \Delta k) = (4.418 \pm 0.180) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.043$ $t_{0.5} = 435.8 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 66.3 [\text{h}]$ $n = 11$
2	72	0.225	
3	168	0.179	
4	240	0.165	
5	336	0.133	
6	408	0.124	
7	504	0.111	
8	672	0.081	
9	840	0.065	
10	1176	0.040	
11	1512	0.021	



Ryc. 60. Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%.

Tabela 54. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%

Wilgotność względna [%]	Parametry kinetyczne				
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	S_a	r	n
92.0	$(1.023 \pm 0.075) \cdot 10^{-6}$	$(-3.68 \pm 0.27) \cdot 10^{-3}$	$1.17 \cdot 10^{-4}$	0.996	10
76.4	$(8.043 \pm 0.718) \cdot 10^{-7}$	$(-1.83 \pm 0.09) \cdot 10^{-3}$	$3.85 \cdot 10^{-5}$	0.998	10
33.0	$(4.418 \pm 0.180) \cdot 10^{-7}$	$(-1.59 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	$2.86 \cdot 10^{-5}$	0.998	9



Ryc. 61. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej w temperaturze 338 K, RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0%.

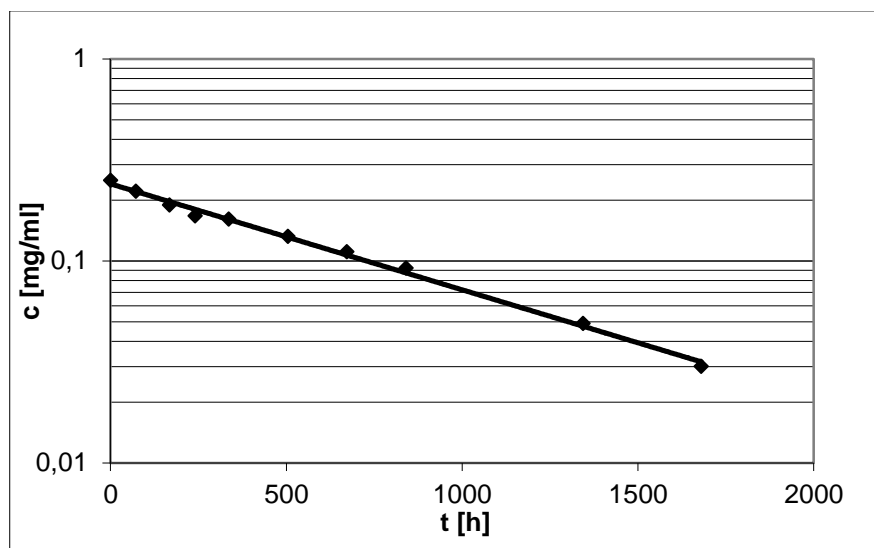
Tabela 55. Zbiorcze zestawienie parametrów kinetycznych reakcji rozkładu w temperaturze 338 K oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 92.0%, 76.4%, 33.0%

Badane próbki	Parametry kinetyczne RH ~ 92.0%			
	k [s ⁻¹]	a [h ⁻¹]	t _{0,1} [h]	t _{0,5} [h]
α-Tokoferol	(1.060 ± 0.048) • 10 ⁻⁶	(-3.82 ± 0.17) • 10 ⁻³	27.6	181.5
α-T w kompleksie inkluzyjnym z β-CD	(1.991 ± 0.113) • 10 ⁻⁷	(-7.17 ± 0.41) • 10 ⁻⁴	147.0	966.5
α-T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP-β-CD	(3.438 ± 0.148) • 10 ⁻⁷	(-1.24 ± 0.05) • 10 ⁻³	85.2	560.0
α-T w mieszaninie fizycznej z β-CD	(4.551 ± 0.205) • 10 ⁻⁷	(-1.64 ± 0.07) • 10 ⁻³	64.3	423.0
α-T w mieszaninie fizycznej z 2-HP-β-CD	(1.023 ± 0.075) • 10 ⁻⁶	(-3.68 ± 0.27) • 10 ⁻³	28.6	188.2
Badane próbki	Parametry kinetyczne RH ~ 76.4%			
	k [s ⁻¹]	a [h ⁻¹]	t _{0,1} [h]	t _{0,5} [h]
α-Tokoferol	(8.043 ± 0.718) • 10 ⁻⁷	(-2.90 ± 0.26) • 10 ⁻⁷	36.4	239.3
α-T w kompleksie inkluzyjnym z β-CD	(1.221 ± 0.070) • 10 ⁻⁷	(-4.39 ± 0.25) • 10 ⁻⁴	239.9	1577.1
α-T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP-β-CD	(2.598 ± 0.127) • 10 ⁻⁷	(-9.35 ± 0.46) • 10 ⁻⁴	112.7	741.0
α-T w mieszaninie fizycznej z β-CD	(3.435 ± 0.298) • 10 ⁻⁷	(-1.24 ± 0.11) • 10 ⁻³	85.2	560.4
α-T w mieszaninie fizycznej z 2-HP-β-CD	(5.080 ± 0.247) • 10 ⁻⁷	(-1.83 ± 0.09) • 10 ⁻³	57.6	379.0
Badane próbki	Parametry kinetyczne RH ~ 33.0%			
	k [s ⁻¹]	a [h ⁻¹]	t _{0,1} [h]	t _{0,5} [h]
α-Tokoferol	(5.424 ± 0.545) • 10 ⁻⁷	(-1.95 ± 0.20) • 10 ⁻³	54.0	354.9
α-T w kompleksie inkluzyjnym z β-CD	(1.080 ± 0.040) • 10 ⁻⁷	(-3.88 ± 0.15) • 10 ⁻⁴	271.1	1782.3
α-T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP-β-CD	(2.159 ± 0.182) • 10 ⁻⁷	(-7.77 ± 0.65) • 10 ⁻⁴	135.6	891.5
α-T w mieszaninie fizycznej z β-CD	(2.098 ± 0.140) • 10 ⁻⁷	(-7.55 ± 0.50) • 10 ⁻⁴	139.5	917.5
α-T w mieszaninie fizycznej z 2-HP-β-CD	(4.418 ± 0.180) • 10 ⁻⁷	(-1.59 ± 0.06) • 10 ⁻³	66.3	435.8

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu, w temperaturze pokojowej ok. 298 K

Tabela 56. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu

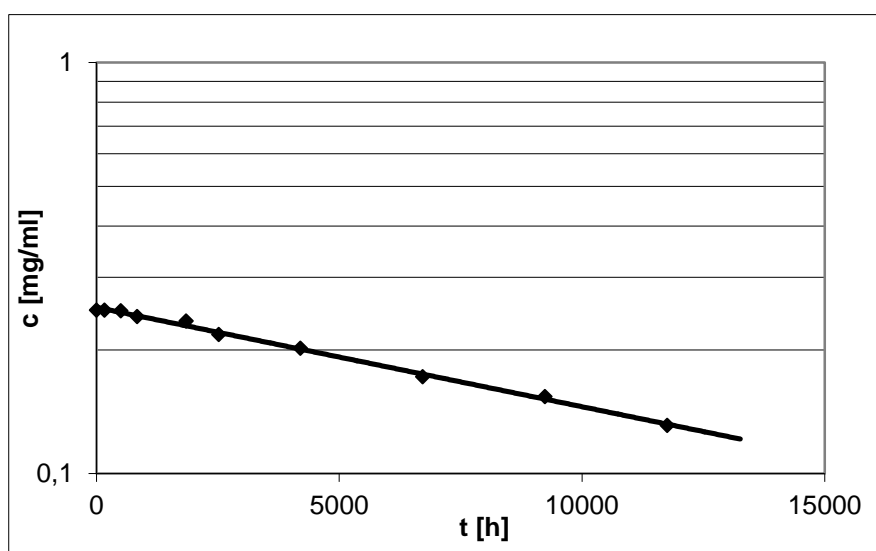
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.21 \pm 0.06) \cdot 10^{-3} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.73 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.43 \pm 0.05$ $S_b = 0.022$ $(k \pm \Delta k) = (3.355 \pm 0.17) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.046$ $t_{0.5} = 573.8 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 87.3 [\text{h}]$ $n = 10$
2	72	0.221	
3	168	0.189	
4	240	0.167	
5	336	0.161	
6	504	0.132	
7	672	0.111	
8	840	0.092	
9	1344	0.049	
10	1680	0.030	



Ryc. 62. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

Tabela 57. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu

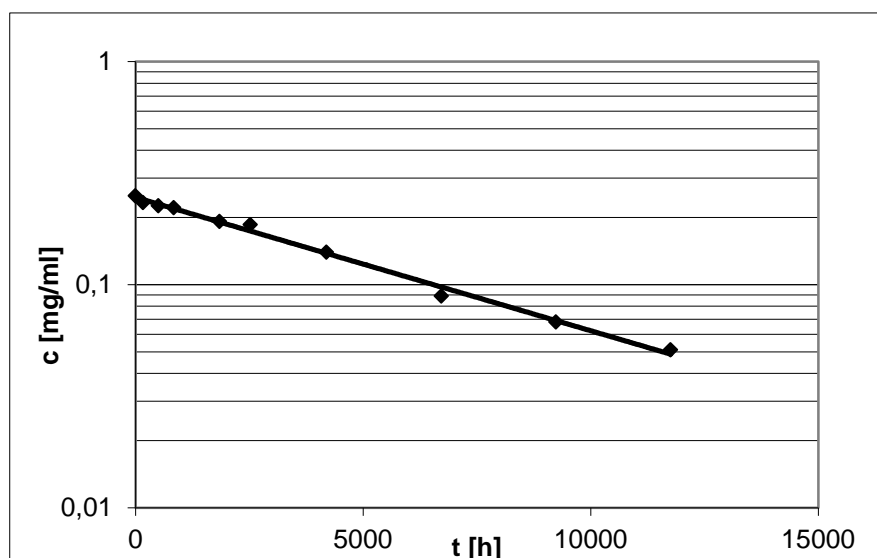
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-5.56 \pm 0.50) \cdot 10^{-5} \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $S_a = 1.17 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = -1.37 \pm 0.02$ $S_b = 0.006$ $(k \pm \Delta k) = (1.544 \pm 0.14) \cdot 10^{-8} \text{ [s}^{-1}\text{]}$ $r = 0.998$ $S_y = 0.015$ $t_{0.5} = 12467.6 \text{ [h]}$ $t_{0.1} = 1896.2 \text{ [h]}$ $n = 10$
2	168	0.250	
3	504	0.249	
4	840	0.241	
5	1848	0.235	
6	2520	0.218	
7	4200	0.202	
8	6720	0.172	
9	9240	0.154	
10	11760	0.131	



Ryc. 63. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -cyklodekstryną w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

Tabela 58. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu

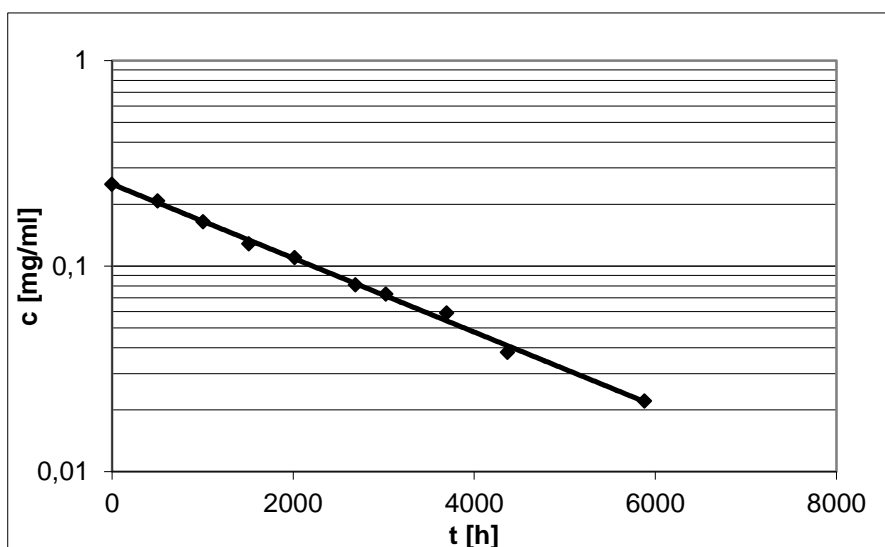
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-1.37 \pm 0.09) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 3.70 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = -1.40 \pm 0.05$ $S_b = 0.020$ $(k \pm \Delta k) = (3.823 \pm 0.24) \cdot 10^{-8} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.997$ $S_y = 0.046$ $t_{0,5} = 5035.3 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 765.8 [\text{h}]$ $n = 10$
2	168	0.233	
3	504	0.226	
4	840	0.221	
5	1848	0.192	
6	2520	0.186	
7	4200	0.140	
8	6720	0.089	
9	9240	0.068	
10	11760	0.051	



Ryc. 64. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w powietrza o podwyższonej zawartości atmosfery tlenu.

Tabela 59. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z β -cyklodekstryną w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu

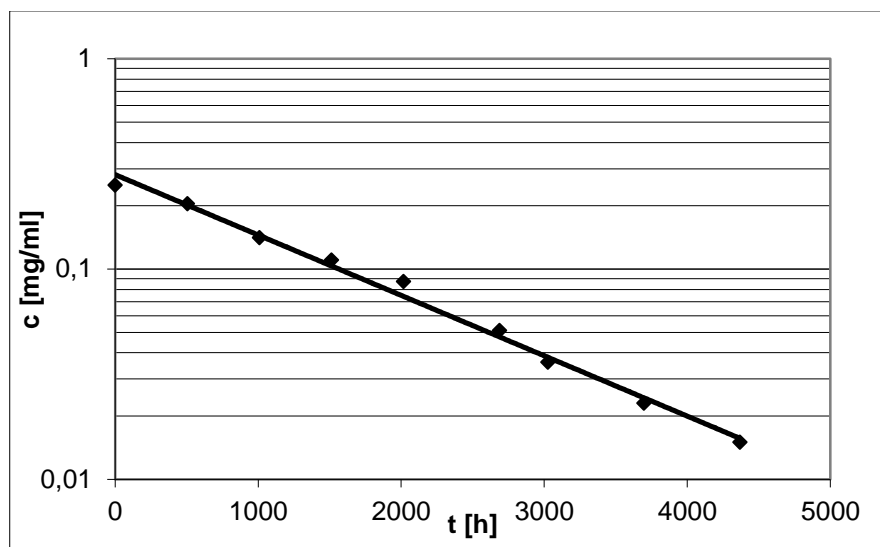
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-4.14 \pm 0.19) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 8.19 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = -1.38 \pm 0.06$ $S_b = 0.025$ $(k \pm \Delta k) = (1.151 \pm 0.05) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.998$ $S_y = 0.045$ $t_{0,5} = 1672.5 [\text{h}]$ $t_{0,1} = 254.4 [\text{h}]$ $n = 10$
2	504	0.207	
3	1008	0.164	
4	1512	0.128	
5	2016	0.110	
6	2688	0.081	
7	3024	0.073	
8	3696	0.059	
9	4368	0.038	
10	5880	0.022	



Ryc. 65. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej β -cyklodekstryną w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

Tabela 60. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu

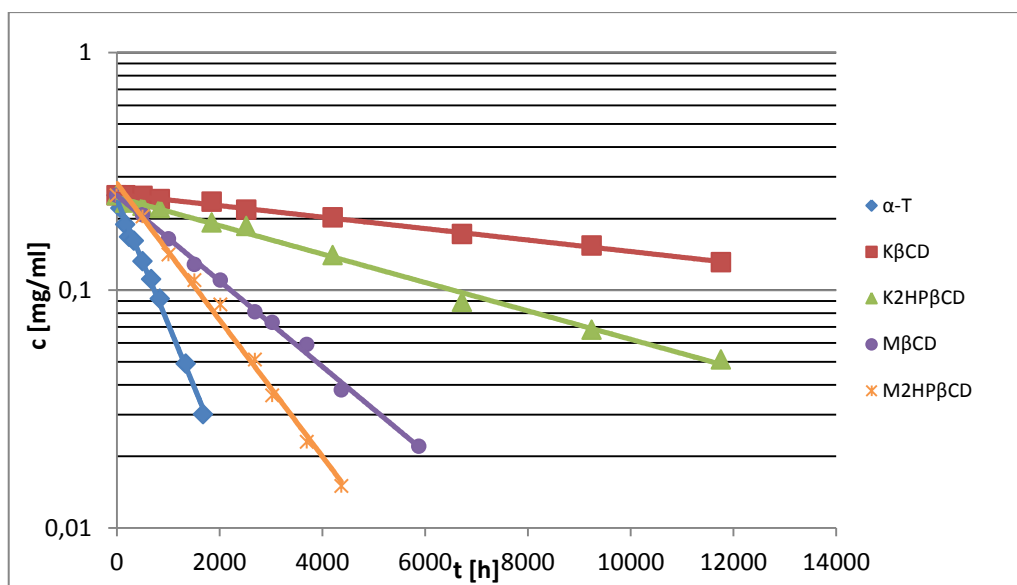
Lp.	t [h]	c [mg/ml]	Parametry kinetyczne reakcji
1	0	0.250	$(a \pm \Delta a) = (-6.61 \pm 0.51) \cdot 10^{-4} [\text{h}^{-1}]$ $S_a = 2.17 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = -1.27 \pm 0.13$ $S_b = 0.054$ $(k \pm \Delta k) = (1.837 \pm 0.14) \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$ $r = 0.996$ $S_y = 0.090$ $t_{0.5} = 1047.9 [\text{h}]$ $t_{0.1} = 159.4 [\text{h}]$ $n = 9$
2	504	0.204	
3	1008	0.141	
4	1512	0.110	
5	2016	0.087	
6	2688	0.051	
7	3024	0.036	
8	3696	0.023	
9	4368	0.015	



Ryc. 66. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu α -tokoferolu w mieszaninie fizycznej z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

Tabela 61. Zbiorcze zestawienie parametrów kinetycznych reakcji rozkładu badanych próbek w fazie stałej w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu w temperaturze 298 K

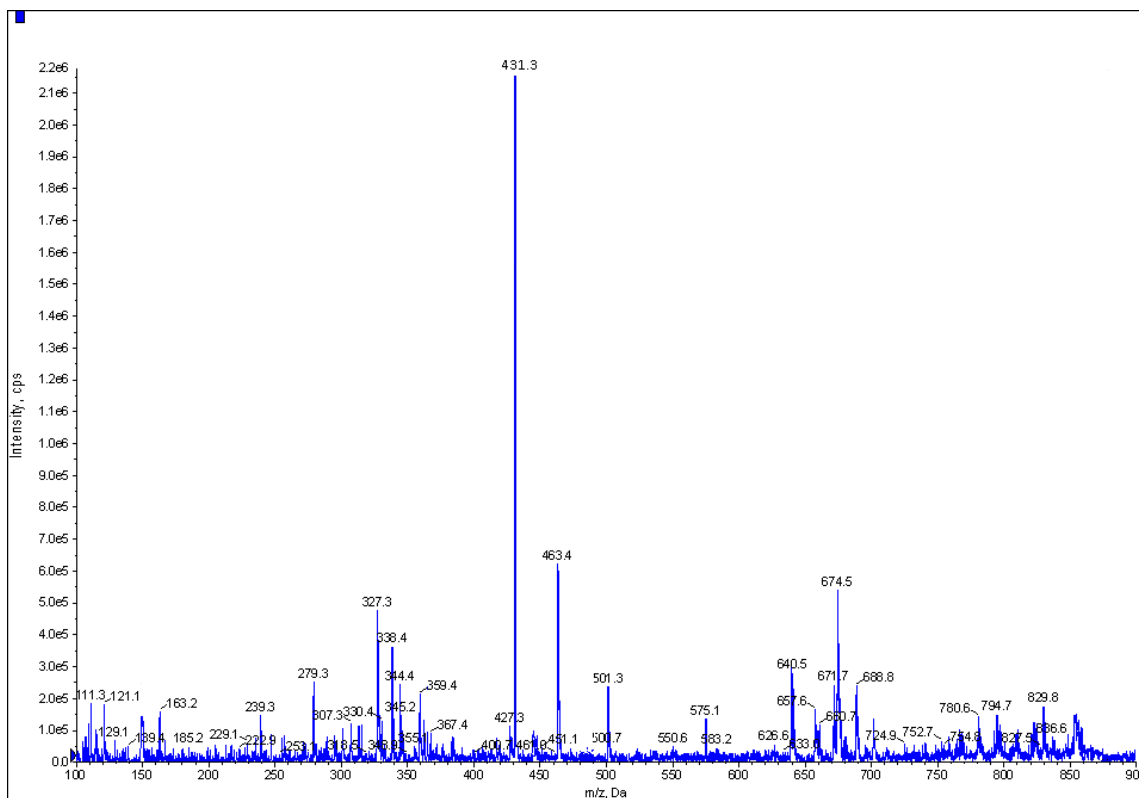
Próbki	Parametry kinetyczne					
	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	$t_{0,1} [h]$	$t_{0,5} [h]$	r	n
α -Tokoferol	$(3.355 \pm 0.17) \cdot 10^{-7}$	$(-1.21 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	87.3	573.8	0.998	10
α -T w kompleksie inkluzyjnym z β -CD	$(1.544 \pm 0.14) \cdot 10^{-8}$	$(-5.56 \pm 0.50) \cdot 10^{-5}$	1896.2	12467.6	0.998	10
α -T w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP- β -CD	$(3.823 \pm 0.24) \cdot 10^{-8}$	$(-1.37 \pm 0.09) \cdot 10^{-4}$	765.8	5035.3	0.997	10
α -T w mieszaninie fizycznej z β -CD	$(1.151 \pm 0.05) \cdot 10^{-7}$	$(-4.14 \pm 0.19) \cdot 10^{-4}$	254.4	1672.5	0.998	10
α -T w mieszaninie fizycznej z 2HP- β -CD	$(1.837 \pm 0.14) \cdot 10^{-7}$	$(-6.61 \pm 0.51) \cdot 10^{-4}$	159.4	1047.9	0.996	9



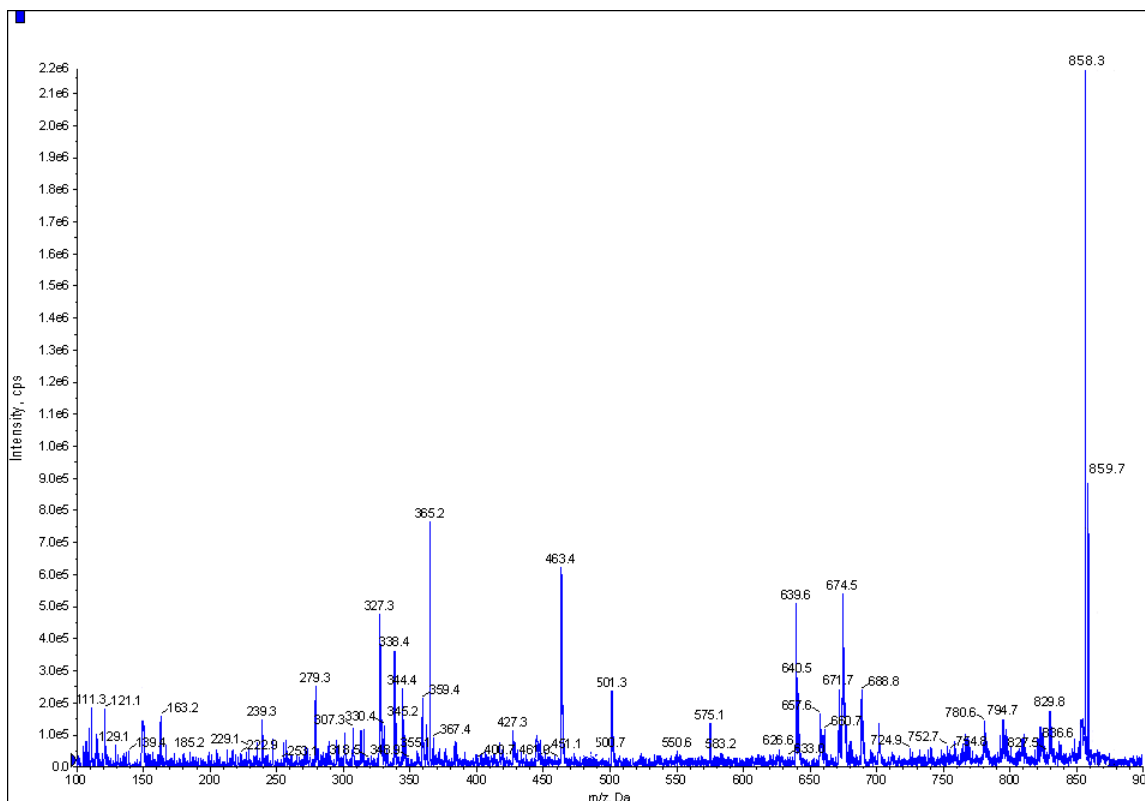
Ryc. 67. Półlogarytmiczne wykresy zależności $c = f(t)$, reakcji rozkładu w fazie stałej w temperaturze pokojowej ok. 298 K, w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu (α -T – α -tokoferol, K β CD – kompleks inkluzyjny α -T z β -CD, K2HP β CD – kompleks inkluzyjny α -T z 2-HP- β -CD, M β CD – mieszanina fizyczna α -T z β -CD, M2HP β CD – mieszanina fizyczna α -T z 2-HP- β -CD).

4.8. Analiza metodą LC-ESI-MS/MS produktów rozkładu α -tokoferolu oraz α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną

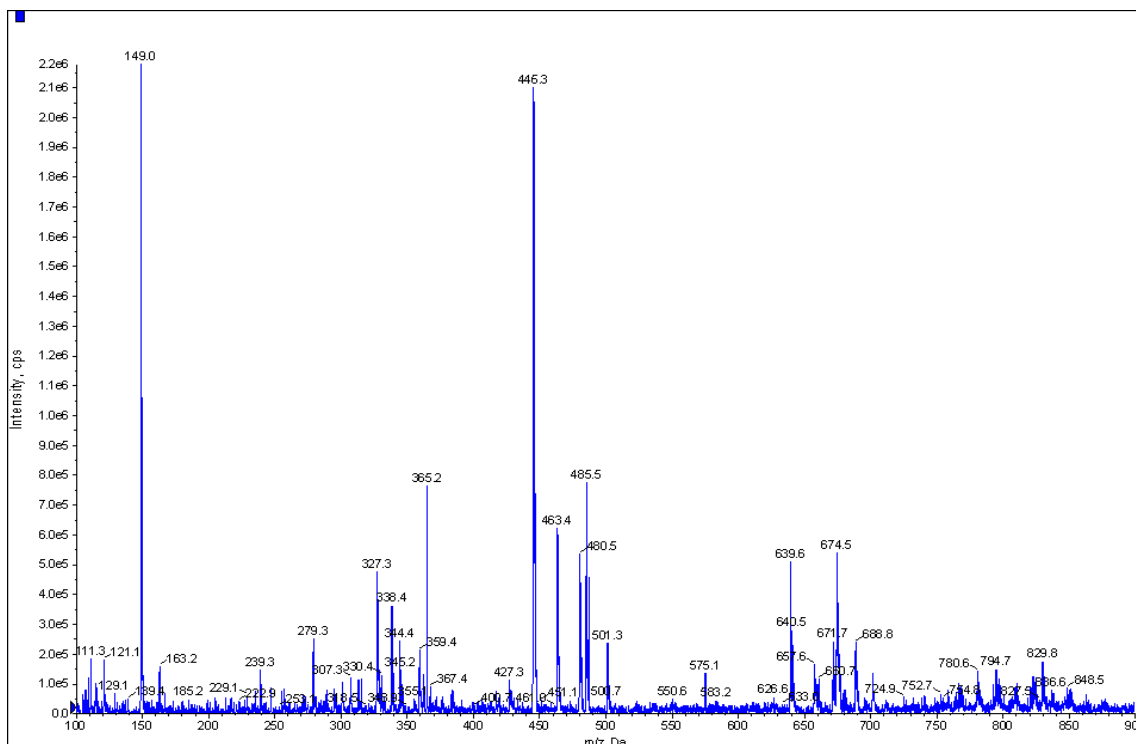
W celu identyfikacji związków powstałych w warunkach podwyższonej temperatury, wilgotności oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu próbki poddano analizie metodą chromatografii cieczowej połączonej z detektorem mas. Pomiaru dokonano wykorzystując system LC/MS/MS składający się z chromatografu cieczowego Agilent seria 1260 Infinity połączonego z tandemowym spektrometrem mas z układem trzech kwadrupoli QTRAP 4000. Badanie przeprowadzono wykorzystując tryb skanowania w całym zakresie mas (tzw. full-scan mode) oraz tryb monitorowania wielokrotnych reakcji fragmentacji (tzw. MRM mode). Rozdział chromatograficzny osiągnięto wykorzystując, jako fazę ruchomą, 5 mmol mrówczanu amonu w 100% metanolu, przy przepływie 0.1 ml/min. Nastrzykiwana objętość próbki, na termostatowaną kolumnę (25°C) o wymiarach 250 x 4 mm LiChroCART z wypełnieniem LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m), wynosiła 10 μ l (autosampler). Po rozdziale chromatograficznym próbki analizowano spektrometrem mas z wykorzystaniem elektrorozpylania (tzw. electrospray-ESI), jako techniki jonizacji w trybie pozytywnym. Warunki badania spektrometrem mas zoptymalizowano, aby otrzymać najwyższą czułość poprzez bezpośredni nastrzyk roztworu α -tokoferolu (1.0 μ g/ml). Parametry badania spektrometrem mas były następujące: napięcie kapilary - 5.5 kV, temperatura desolvatacji - 350°C, jako gaz kurtynowy - 30 psi oraz jako gaz desolvatujący - 70 psi zastosowano azot. Przygotowanie próbek do badań obejmowało rozpuszczenie ich w metanolu. α -Tokoferol w postaci olejowej po rozpuszczeniu został bezpośrednio wykorzystany do badań. Natomiast próbki kompleksów inkluzyjnych, po rozpuszczeniu w metanolu, przesączono przed nastrzykiem. W badaniach, jako wzorzec wykorzystano α -tokoferol o takim samym stężeniu, ale nie poddany działaniu podwyższonej temperatury, podwyższonej wilgotności względnej czy atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu. Widma masowe analizowanych produktów rozkładu przedstawiono na ryc. 68 - 76.



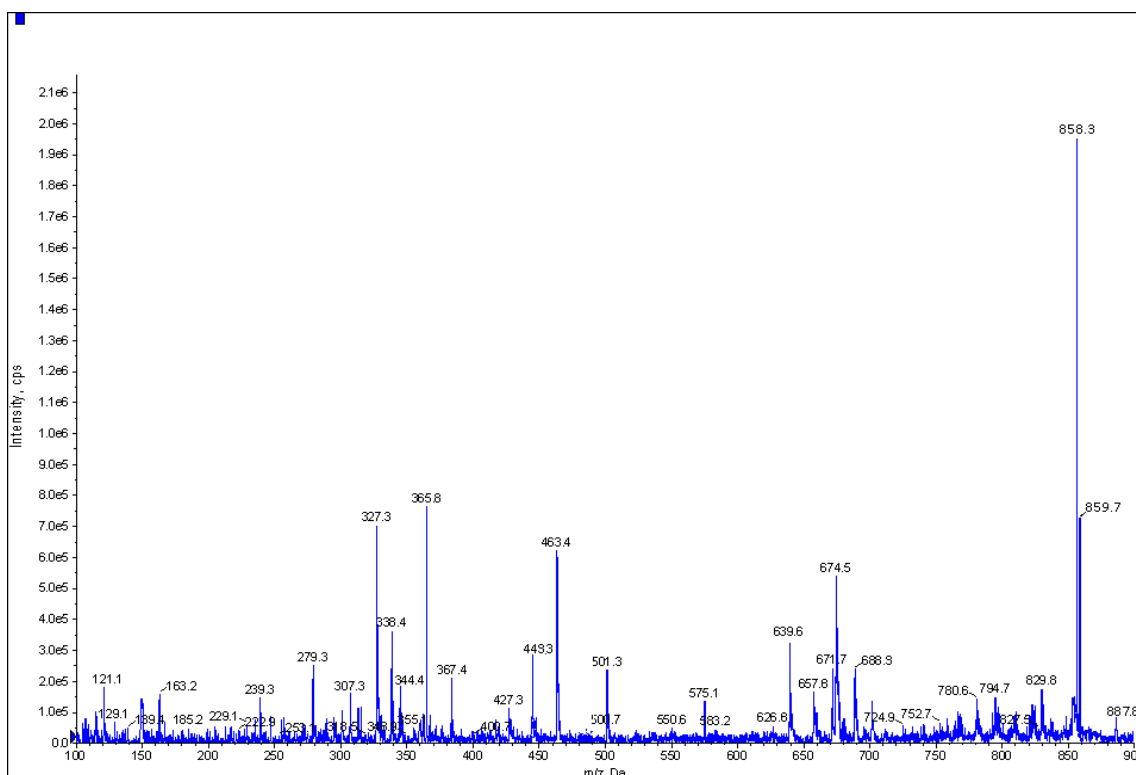
Ryc. 68. Widmo masowe α -tokoferolu (tryb full scan).



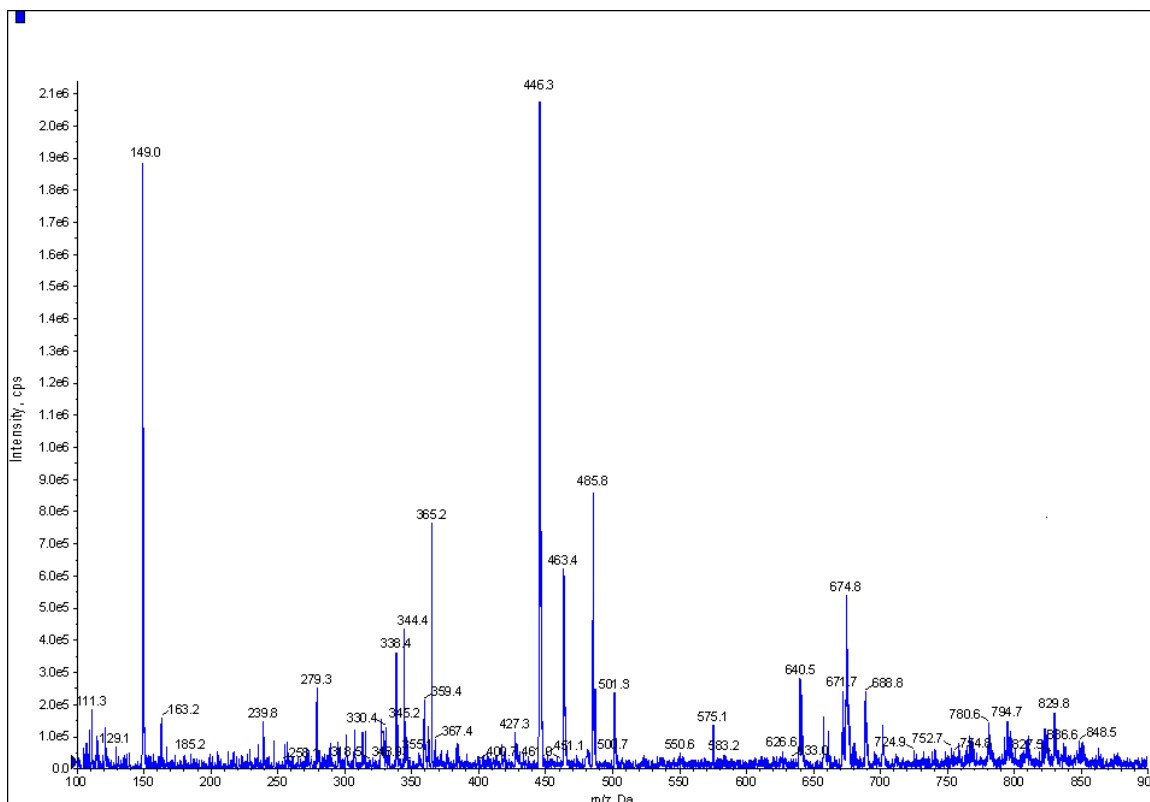
Ryc. 69. Widmo masowe produktów rozkładu α -tokoferolu powstających w warunkach podwyższonej temperatury (338 K) oraz podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 92.0% (tryb full scan).



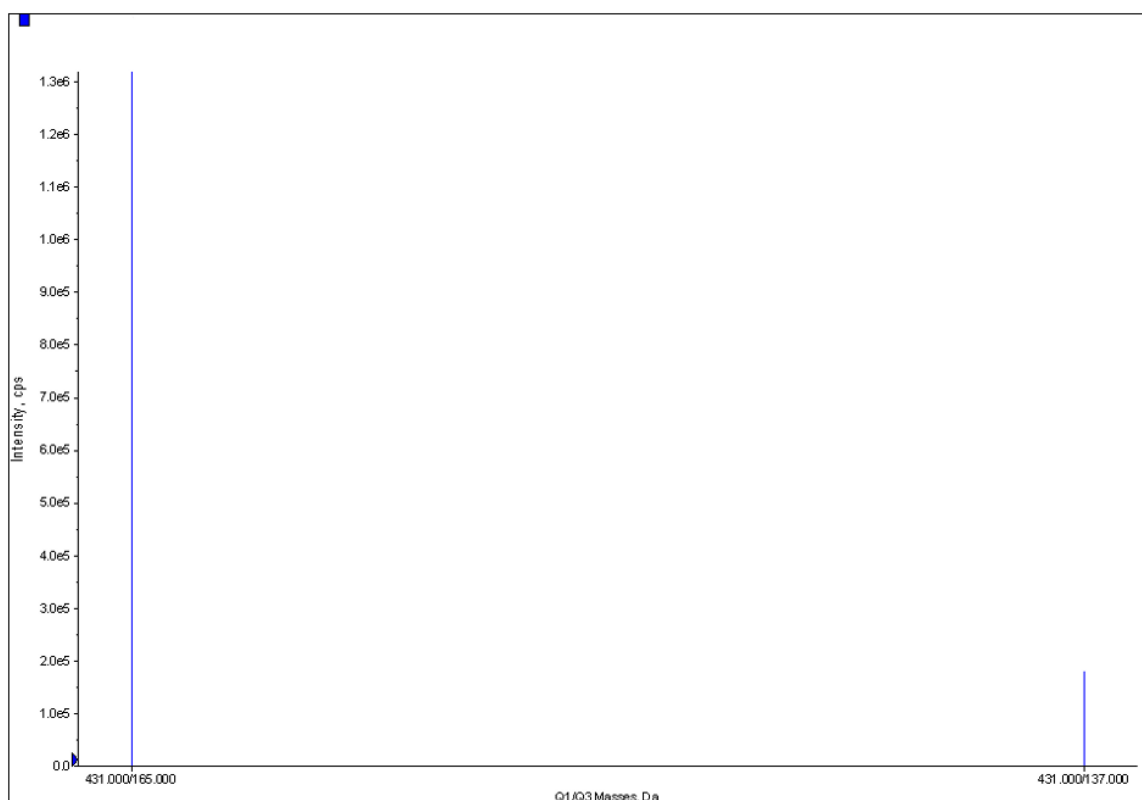
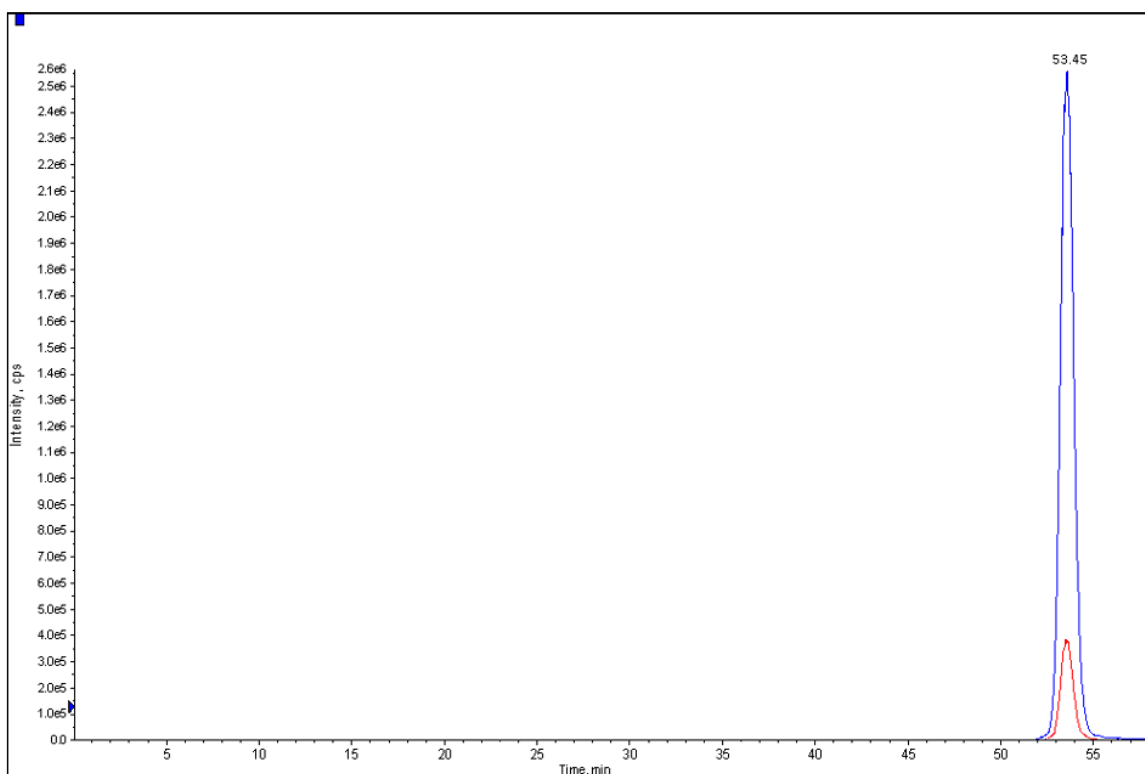
Ryc. 70. Widmo masowe produktów rozkładu α -tokoferolu powstających w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu (tryb full scan).



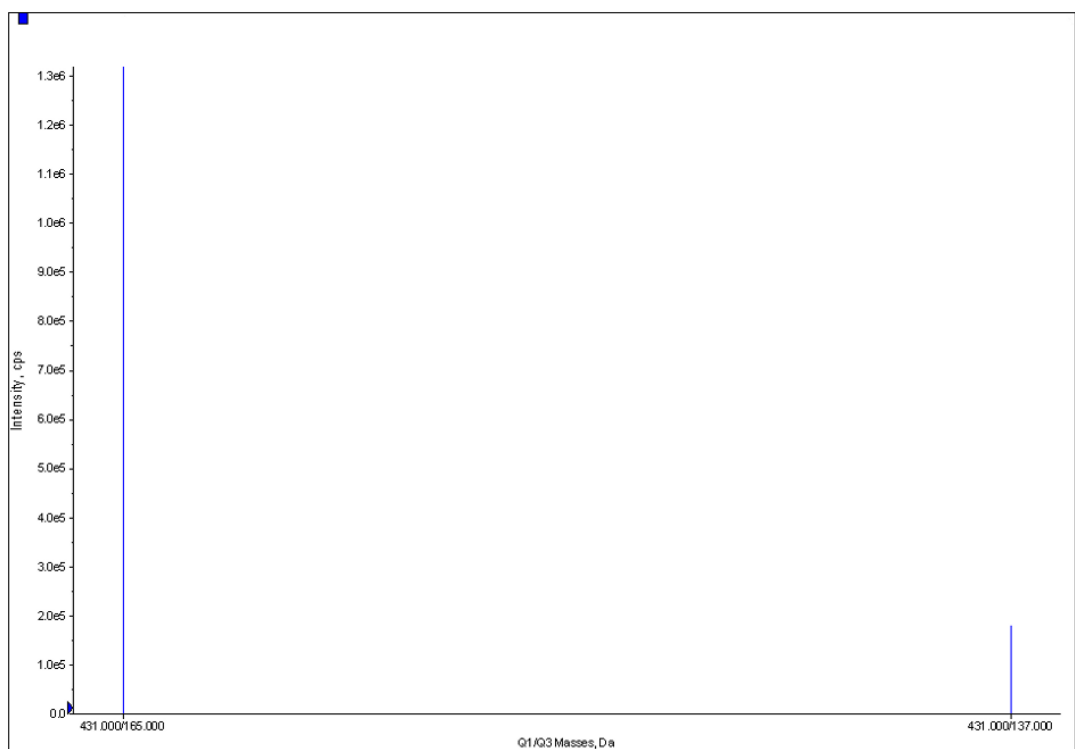
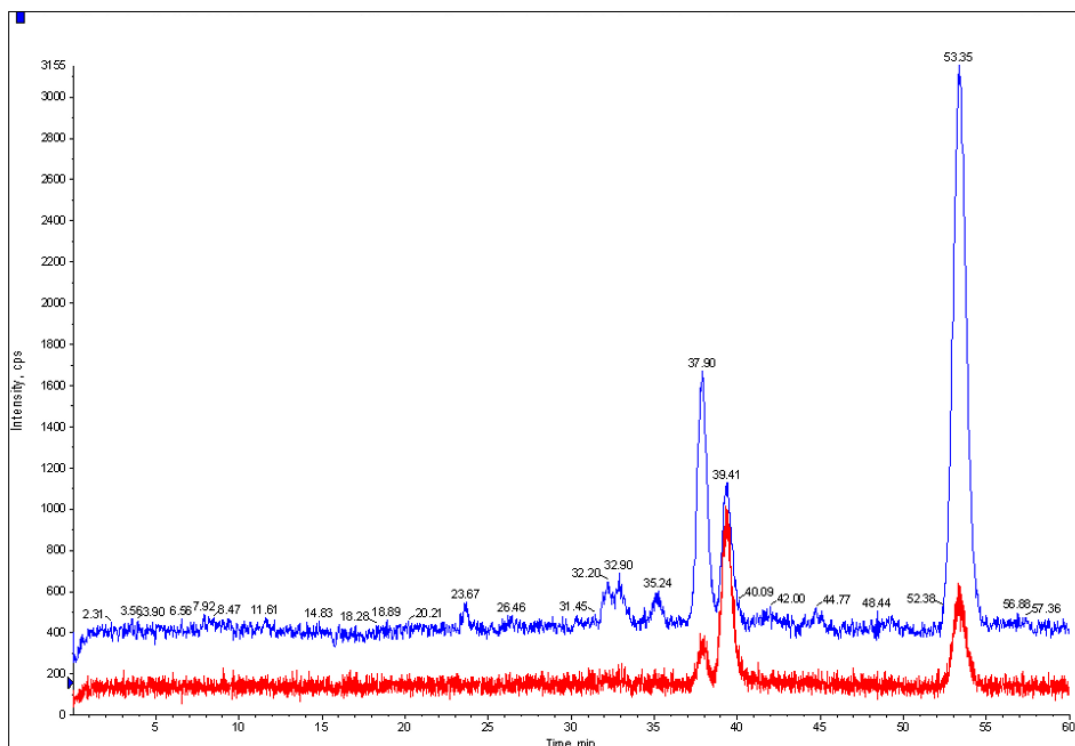
Ryc. 71. Widmo masowe produktów rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z cyklodekstrynami (β -CD) powstających w temp. 338 K i RH ~ 92.0% (tryb full scan).



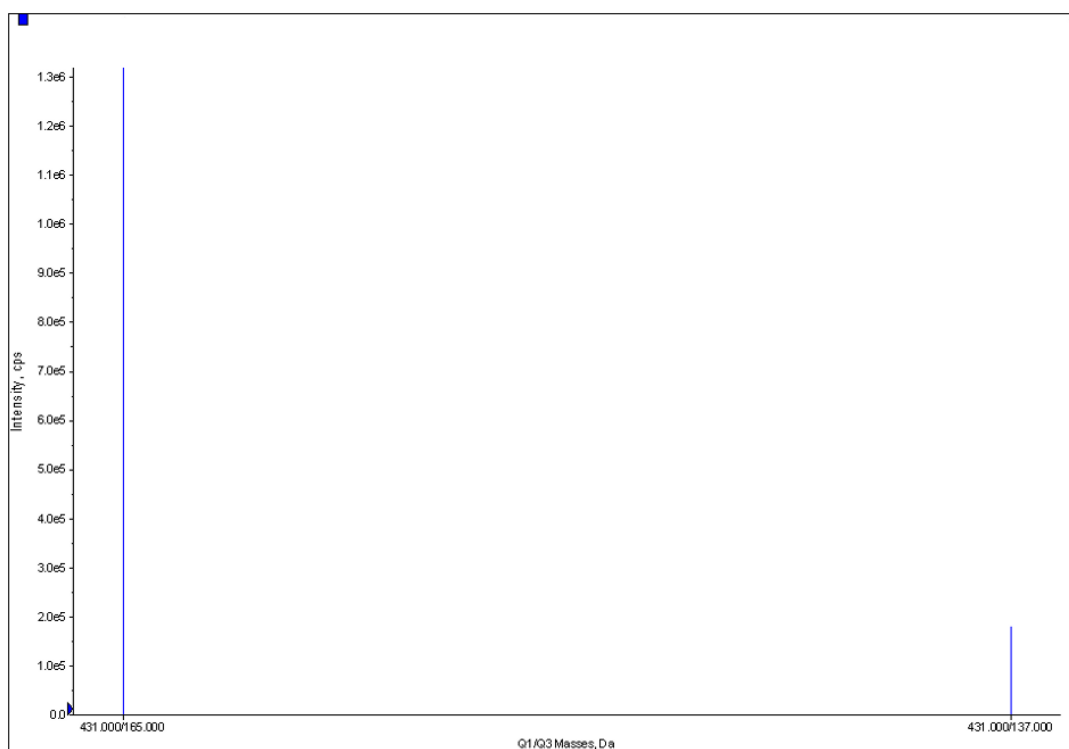
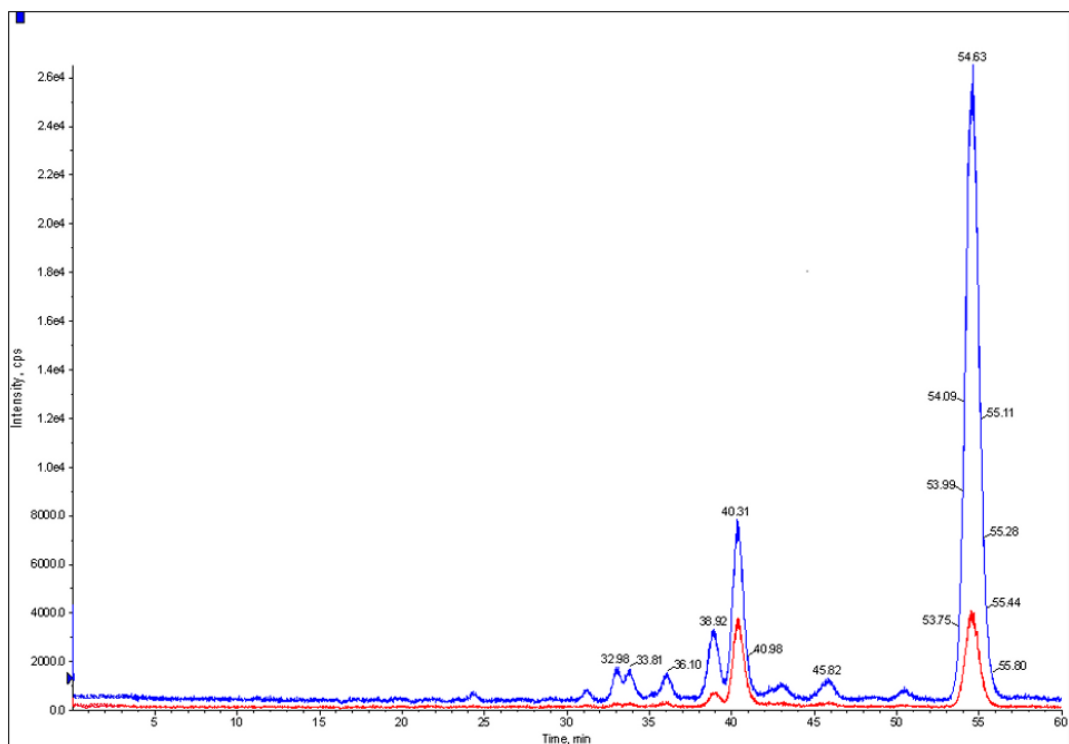
Ryc. 72. Widmo masowe produktów rozkładu α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z cyklodekstrynami (β -CD) powstających w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu (tryb full scan).



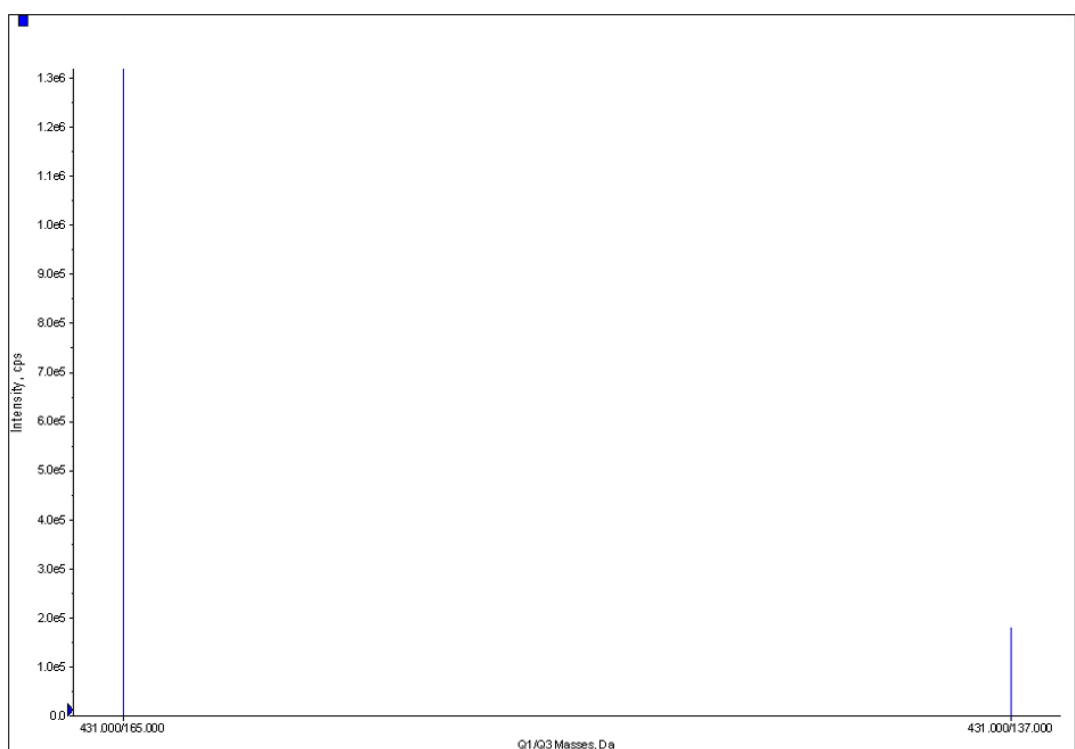
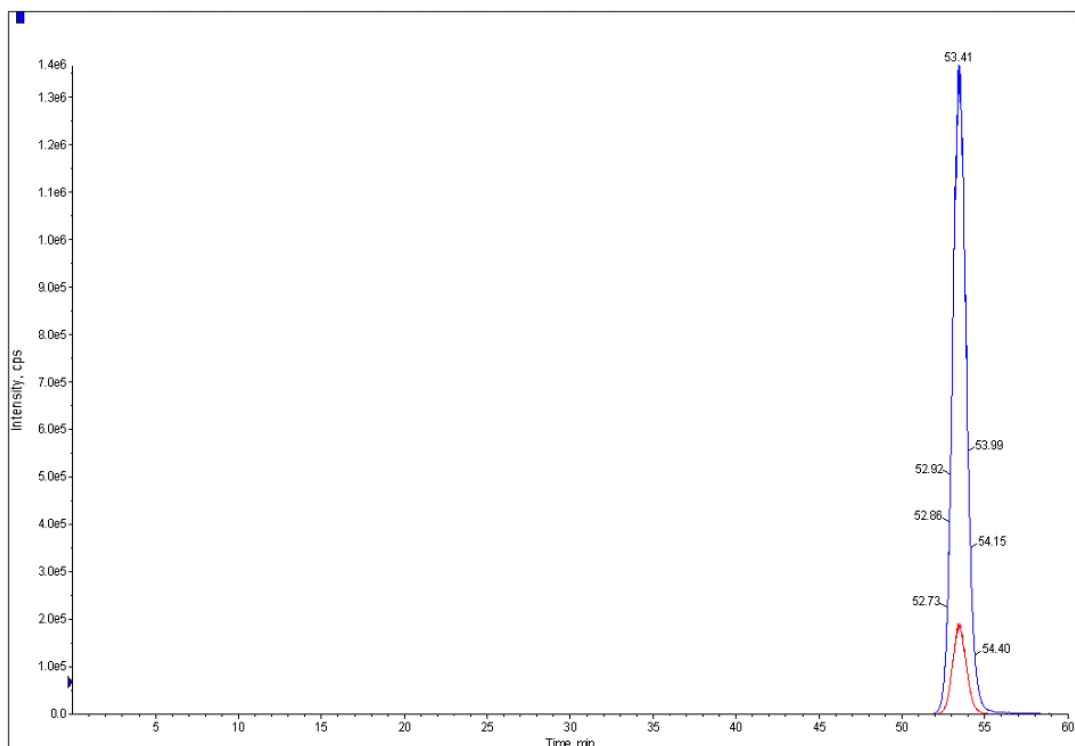
Ryc. 73. Chromatogram HPLC oraz widmo masowe α -tokoferolu obrazujące przejście jonu molekularnego o stosunku m/z 431 w jony fragmentacyjne o stosunku m/z 165 i m/z 137 (tryb MRM).



Ryc. 74. Chromatogram HPLC oraz widmo masowe produktów α - tokoferolu powstających w warunkach podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 92.0% w temp. 338 K obrazujące przejście jonu molekularnego o stosunku m/z 431 w jony fragmentacyjne o stosunku m/z 165 i m/z 137 (tryb MRM).



Ryc. 75. Chromatogram HPLC oraz widmo masowe produktów α -tokoferolu powstających w warunkach wilgotności względnej RH \sim 92.0% w temp. 338 K obrazujące przejście jonu molekularnego o stosunku m/z 431 w jony fragmentacyjne o stosunku m/z 165 i m/z 137 (tryb MRM).



Ryc. 76. Chromatogram HPLC oraz widmo masowe produktów α -tokoferolu powstających w atmosferze powietrza o zwiększonej zawartości tlenu obrazujące przejście jonu molekularnego o stosunku m/z 431 w jony fragmentacyjne o stosunku m/z 165 i m/z 137 (tryb MRM).

5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania trwałości substancji leczniczych, jak i ich preparatów farmaceutycznych, są niezbędne do prowadzenia prawidłowej, skutecznej i bezpiecznej farmakoterapii. Testy przyspieszonego starzenia pozwalają określić podatność substancji na zmiany w warunkach stresowych (utlenianie, hydroliza w środowisku o różnych zakresach pH, wilgotność względna powietrza, temperatura oraz fotoliza), co w konsekwencji umożliwia określenie mechanizmu jej rozkładu oraz pozwala ocenić liczbę powstających produktów rozkładu i dokonać ich identyfikacji. Otrzymane wyniki dostarczają informacji o warunkach, w jakich winna być przechowywana dana substancja oraz umożliwiają określenie terminu ważności gwarantującego skuteczność działania leku.

Powszechnie pożądane przeciwutleniające działanie α - tokoferolu jest związane z grupą fenolową przy węglu C6. Cząsteczka tokoferolu poddana promieniowaniu UV, czy działaniu tlenu jest podatna na rozkład i modyfikacje, dochodzi wówczas do utlenienia grupy OH oraz pęknięcia pierścienia chromanu, co w konsekwencji niweluje przeciwutleniającą aktywność cząsteczki.

Celem pracy było otrzymanie kompleksów inkluzyjnych α - tokoferolu z naturalną β -cyklodekstryną oraz jej 2-hydroksypropylową pochodną oraz ocena trwałości powstałych połączeń w podwyższonej temperaturze, podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz w atmosferze powietrza o zwiększonej zawartości tlenu. Do celów porównawczych wykorzystano α - tokoferol in substantia oraz mieszaniny fizyczne α - tokoferolu z β -cyklodekstryną oraz 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną.

Przeprowadzenie badań trwałości substancji leczniczej, narażonej na działanie zmiennych czynników fizycznych i chemicznych, wymaga przed wszystkim uzyskania selektywnej, czułej, dokładnej i precyzyjnej metody analitycznej. Wykorzystywana metoda ponadto, ze względu na dużą liczbę oznaczeń niezbędnych do interpretacji wyników, win-

na być tania i szybka. W badaniach kinetycznych metodą z wyboru jest wysokosprawna chromatografia cieczowa. Do oceny trwałości α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylową pochodną zastosowano metodę HPLC, którą wcześniej opracowano i poddano walidacji [175]. Stosowana metoda HPLC charakteryzuje się następującymi parametrami:

- *kolumna*: LiChroCART o wymiarach 250 x 4 mm z wypełnieniem LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m),
- *faza ruchoma*: metanol 100%,
- *szybkość przepływu fazy ruchomej*: 1.3 ml/min,
- *detektor UV*: $\lambda = 292$ nm.

W obliczeniach wykorzystano wielkość pola powierzchni piku badanej substancji. Przeprowadzona walidacja wykazała, że metoda jest:

- selektywna dla α -tokoferolu w obecności cyklodekstryn i produktów rozkładu,
- liniowa w zakresie stężeń 0.15 mg/ml do 0.375 mg/ml, a zależność opisuje równanie $P = 5422c + 1.7842$,
- precyzyjna, o czym świadczą niskie wartości współczynników zmienności (do 3%),
- czuła, bowiem można rejestrować widoczny przyrost wartości mierzonej przy małej zmianie wartości oznaczanej,
- dokładna, odzysk na poziomie $100 \pm 2\%$.

Zakres badań w pierwszej kolejności obejmował otrzymanie kompleksów inkluzyjnych α -tokoferolu z cyklodekstrynami. α -Tokoferol, istniejący w temperaturze pokojowej w postaci oleistej cieczy, w wyniku kompleksowania oraz fizycznego zmieszania z cyklodekstrynami przeprowadzono w fazę stałą, o postaci suchego proszku. Zastosowane metody otrzymywania kompleksów, poprzez ugniatanie oraz liofilizację, zostały opisane w rozdziale 4.5. Otrzymany w wyniku kompleksowania z cyklodekstrynami biały proszek, praktycznie nie różnił się wyglądem od samej cyklodekstryny. Natomiast sporządzone mieszaniny fizyczne posiadały jasnożółtą barwę, co wskazuje na adsorpcję tokoferolu na powierzchni cząsteczek cyklodekstryn. Wizualne obserwacje stopnia dekoloryzacji substancji leczniczej podczas kompleksowania są pierwszym dowodem na włączenie barwnej substancji do wnęki cyklodekstryny. W celu analitycznego potwierdzenia wyników kompleksowania otrzymane połączenia zbadano trzema metodami analitycznymi: kalorymetrii róż-

nicowej (DSC), spektroskopii w podczerwieni (IR), spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ($^1\text{H-NMR}$). Do celów porównawczych wykorzystano α -tokoferol oraz mieszaniny fizyczne α -tokoferolu z cyklodekstrynami.

Analizie kalorymetrycznej poddano α -tokoferol, kompleksy inkluzyjne α -tokoferolu z cyklodekstrynami oraz ich mieszaniny fizyczne. Termogram α -tokoferolu charakteryzuje się jednym endotermicznym pikiem przy około 268.6°C . Na termogramach β -CD i 2-HP- β -CD zaobserwowano odpowiednio po dwa piki endotermiczne przy 91.6°C , 329.9°C oraz 56.6°C , 339.9°C . Piki widoczne przy niższych temperaturach są związane z procesem dehydratacji cyklodekstryn [176], z kolei piki $>300^\circ\text{C}$ korespondują z rozkładem glukopiranoz. Na termogramach kompleksów inkluzyjnych niewidoczny jest pik przy 268°C przypisany do α -tokoferolu, uwidaczniają się piki odpowiadające cyklodekstrynom, które są dodatkowo przesunięte w kierunku wyższych temperatur. Brak pików pochodzącego od α -tokoferolu sugeruje jego włączenie do wnętrza cyklodekstryn. W przeciwieństwie do termogramów kompleksów inkluzyjnych, na termogramach mieszanin fizycznych ujawniają się zarówno piki korespondujące z cyklodekstrynami, jak i z α -tokoferolem. Wyniki badania kalorymetrycznego potwierdzają występowanie fizykochemicznych interakcji pomiędzy badanymi cyklodekstrynami, a α -tokoferolem, jakie towarzyszą kompleksowaniu w fazie stałej. Wyniki badania DSC graficznie zostały przedstawione na ryc. 13 - 14.

Otrzymane poprzez liofilizację oraz ugniatanie produkty zbadano również za pomocą spektroskopii w podczerwieni. Widma IR kompleksów inkluzyjnych, mieszanin fizycznych, cyklodekstryn i α -tokoferolu były standaryzowane na drgania rozciągające wiązania drugorzędowej grupy OH (ν C-O 1038 cm^{-1}) oraz analizowane w zakresie $4000 - 500\text{ cm}^{-1}$. Porównanie widm kompleksów inkluzyjnych i mieszanin fizycznych uwidacznia przesunięcie pików korespondujących z drganiami rozciągającymi wiązań grup OH cyklodekstryn. W mieszaninach fizycznych odpowiednio dla β -CD, 2-HP- β -CD znajdują się one przy $3451, 3457\text{ cm}^{-1}$, natomiast w kompleksach inkluzyjnych przy $3442, 3438\text{ cm}^{-1}$. Powstałe przesunięcie wskazuje na utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy fenolową grupą OH tokoferolu oraz pierwszorzędową grupą OH cyklodekstryn. Widma kompleksów inkluzyjnych charakteryzują się również zdecydowanie niższą intensywnością pików odpowiadających drganiom rozciągającym łańcucha alifatycznego ($2950 - 2720\text{ cm}^{-1}$) oraz drganiom rozciągającym pierścienia benzopirano ($1500 - 1000\text{ cm}^{-1}$) ujawniających się na

widmie tokoferolu. Zanik charakterystycznych dla α -tokoferolu pików i przesunięcie pików grupy hydroksylowej wskazują na włączenie tokoferolu do wnęki cyklodekstryn, co jest jednoznaczne z otrzymaniem kompleksu inkluzyjnego. Wyniki zobrazowano graficznie na ryc. 11 - 12.

Dodatkowe potwierdzenie otrzymania kompleksów inkluzyjnych uzyskano wykorzystując metodę magnetycznego rezonansu jądrowego w fazie stałej. Substancje proszkowe tj. kompleksy inkluzyjne, mieszaniny fizyczne oraz cyklodekstryny badano w fazie stałej, natomiast α -tokoferol, ze względu na jego oleistą postać, w deuterowanym chloroformie. Widma kompleksów inkluzyjnych są bardzo podobne do widm cyklodekstryn. Widma mieszanin fizycznych charakteryzują się dobrze rozdzielonymi pięcioma sygnałami przy δ 1.39; 1.63; 1.78; 2.45; 5.26 ppm dla mieszaniny fizycznej z β -CD oraz przy 1.39; 1.64; 1.78; 2.45; 5.31 ppm dla mieszaniny fizycznej z 2-HP- β -CD. Dobrze rozdzielone sygnały widoczne na widmach mieszanin fizycznych wydają się pochodzić od protonów tokoferolu, które nie biorą udziału w tworzeniu wiązania wodorowego. Uwidocznienie się tokoferolu w badaniu NMR w fazie stałej, pomimo jego olejowej formy, jest odstępstwem od powszechnej reguły badań magnetycznego rezonansu jądrowego. Proponowanym wyjaśnieniem tego zjawiska jest adsorpcja tokoferolu na powierzchni cyklodekstryn, stąd uwidocznienie tokoferolu na spektrach mieszanin. Interesującym jest fakt, że na widmach kompleksu inkluzyjnego z β -CD widoczny jest jeden sygnał singletowy przy δ 1.39 ppm i dwa rozmyte szerokie sygnały przy δ 1.69; 5.02 ppm, natomiast widmo kompleksu z 2-HP- β -CD charakteryzuje się jednym rozmytym szerokim sygnałem przy 1.39 ppm. Zaangażowanie protonów reszt tokoferolu i cyklodekstryn w interakcje wpływa znacząco na multipletowość sygnałów. Im większa interakcja tym mniejsza ilość wolnych protonów. Dlatego też zanik sygnałów i ich zdecydowane nakładanie się sugeruje powstanie kompleksów inkluzyjnych pomiędzy α -tokoferolem a β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylową pochodną. Widma ^1H NMR przedstawiono na ryc. 15 - 16.

Następnie, po potwierdzeniu otrzymania kompleksów inkluzyjnych tokoferolu z cyklodekstrynami w fazie stałej, badaniom trwałości poddano:

- α -tokoferol,
- kompleks inkluzyjny α -tokoferolu z β -cyklodekstryną,
- kompleks inkluzyjny α -tokoferolu z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną,
- mieszaninę fizyczną α -tokoferolu z β -cyklodekstryną,

- mieszaninę fizyczną α -tokoferolu z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną.

Badania trwałości w fazie stałej obejmowały ocenę:

- wpływu temperatury na trwałość wyżej wymienionych substancji w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, badania prowadzono w temperaturze 323 K, 333 K, 338 K, 343 K oraz w warunkach podwyższonej wilgotności względnej (>33.0%, w temperaturze 338 K),
- wpływu atmosfery powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

W celu oceny trwałości wyżej wymienionych związków wyznaczono:

- obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu w temperaturze 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza, w temperaturze 338 K w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 33.0%, 76.4%, 92.0% oraz w temperaturze pokojowej w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu,
- parametry termodynamiczne reakcji cząstkowych.

Obserwowane stałe szybkości reakcji pierwszego rzędu, wyznaczone metodą HPLC, obliczono z równania:

$$\ln c = \ln c_0 - kt$$

Z kolei wartości stałych szybkości posłużyły do wyznaczenia zależności Arrheniusa – zależność między stałą szybkości reakcji a odwrotnością temperatury bezwzględnej:

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Równanie powyższe po zlogarytmowaniu przyjmuje postać

$$\ln k = \ln A - E_a / RT$$

gdzie:

k - stała szybkości reakcji rozkładu,

A - współczynnik częstotliwości; jego wymiar jest taki sam jak stałej szybkości reakcji;

E_a - energia aktywacji,

R - uniwersalna stała gazowa 8.3144 [J • K⁻¹ • mol⁻¹],

T - temperatura bezwzględna [K].

Energję aktywacji (E_a), entalpię (ΔH^\ddagger) i entropię (ΔS^\ddagger) obliczono z podanych poniżej wzorów:

$$E_a = -aR \text{ [J} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \text{ [J} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$$

$$\Delta S^\ddagger = R [\ln A - \ln (kT/h)] \text{ [J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$$

gdzie:

a - nachylenie wykresu $\ln k = f(1/T)$, ma wartość ujemną $-a = E_a/R$,

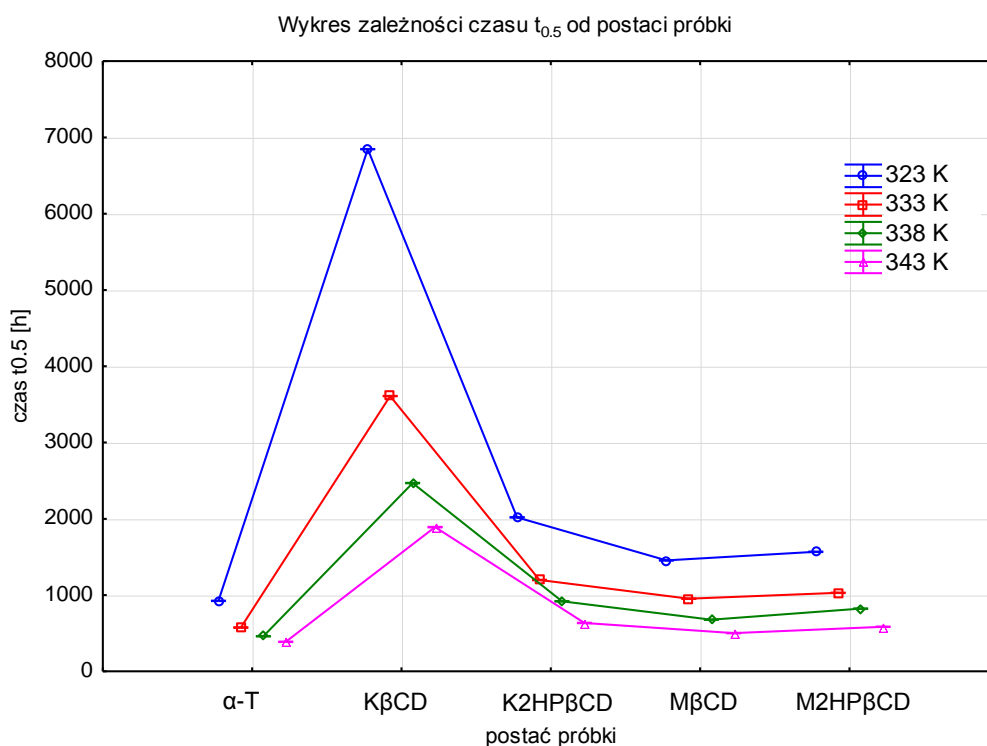
k - stała Boltzmanna $1.381 \cdot 10^{-23} \text{ [J} \cdot \text{K}^{-1}\text{]}$,

h - stała Plancka $6.626 \cdot 10^{-34} \text{ [J} \cdot \text{s}\text{]}$.

Trwałość α -tokoferolu, α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -CD i 2-HP- β -CD oraz α -tokoferolu w mieszaninach fizycznych z β -CD i 2-HP- β -CD w podwyższonej temperaturze w atmosferze suchego powietrza

Analizując półlogarytmiczne zależności zmian stężenia od czasu zaobserwowano, że w warunkach podwyższonej temperatury rozkład α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych (ryc. 22-31) oraz w mieszaninach fizycznych (ryc. 32 - 41) zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu, analogicznie do rozkładu α -tokoferolu (ryc. 17 - 21). Rozkładowi analizowanych substancji towarzyszy zmiana zabarwienia, w przypadku tokoferolu z żółtej do brązowej, a w przypadku kompleksów inkluzyjnych i mieszanin fizycznych z barwy białej i kremowej do jasnożółtej. Porównując wartości stałych szybkości reakcji rozkładu próbek oraz czasy $t_{0.5}$ i $t_{0.1}$ (tabela 34) w badanych warunkach, stwierdzono, że najszybszy rozkład zachodzi w przypadku α -tokoferolu, a otrzymane kompleksy inkluzyjne z badanymi cyklodekstrynami zwiększają trwałość włączonej substancji. W przypadku mieszanin fizycznych obserwujemy również zmniejszenie szybkości rozkładu α -tokoferolu, jednak w zdecydowanie mniejszym stopniu niż ma to miejsce w przypadku kompleksów inkluzyjnych. Działanie ochronne cyklodekstryn w stosunku do α -tokoferolu potwierdza wzrost czasu, w którym rozłożyło się 10% substancji czynnej. W temp. 343 K $t_{0.1}$ α -tokoferolu w kompleksie inkluzyjnym z β -CD wzrosło ok. 5-krotnie, a w kompleksie z 2-HP- β -CD ok. 1.5-krotnie w stosunku do $t_{0.1}$ α -tokoferolu in substantia. W mieszaninach fizycznych z cyklodekstrynami $t_{0.1}$ α -tokoferolu jest również

wyższe w porównaniu do $t_{0,1}$ tokoferolu in substantia, ale o niezbyt dużą wartość. W przypadku przechowywania próbek w niższych temperaturach, wydłużenie czasu rozkładu 10% substancji leczniczej, jest jeszcze większe aniżeli w temp. 343 K. Proporcjonalnie do $t_{0,1}$ analizowanych próbek, we wszystkich czterech badanych temperaturach, wzrasta $t_{0,5}$. Najbardziej znaczący wzrost $t_{0,1}$ i $t_{0,5}$ obserwuje się zawsze, bez względu na temperaturę przechowywania próbki, w przypadku gdy α -tokoferol związany jest w kompleksie inkluzyjnym z β -CD, mniejszy w kompleksie z 2-HP- β -CD, a najmniejszy w mieszaninach fizycznych. Statystyczną ocenę wyników przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA wykorzystując test t-Studenta dla pojedynczego wyniku. Do oceny statystycznej wybrano parametr $t_{0,5}$. W przeprowadzonym teście poziom prawdopodobieństwa p jest mniejszy od przyjętego arbitralnie poziomu istotności $p = 0.05$, co wskazuje na różnice istotne statystycznie oraz potwierdza wpływ temperatury na szybkość rozkładu badanych substancji oraz wskazuje, że rozkład jest determinowany również przez postać próbki, analogicznie we wszystkich czterech badanych temperaturach.



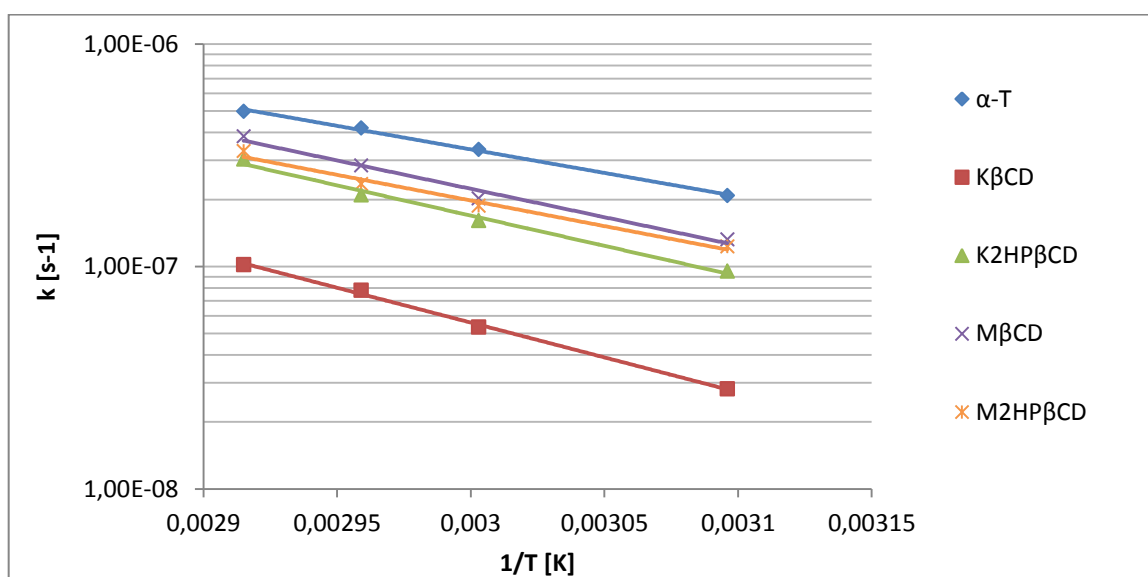
Ryc. 77. Wykres zależności zmiennej czas $t_{0,5}$ od postaci próbki w podwyższonej temperaturze. (α -T – α -tokoferol, K β CD – kompleks inkluzyjny α -T z β -CD, K2HP β CD – kompleks inkluzyjny α -T z 2-HP- β -CD, M β CD – mieszanina fizyczna α -T z β -CD, M2HP β CD - mieszanina fizyczna α -T z 2-HP- β -CD).

Tabela 62. Ocena istotności statystycznej parametru $t_{0,5}$ w temperaturze 338 K.

Test t-studenta średnich $t_{0,5}$ w warunkach $T=338$ K						
Analizowane próbki	$t_{0,5}$ Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	$t_{0,5}$ α -T Odniesienie	df	p
K β CD	2469.050	2.460732	1.74000	459.5400	1	0.000551
K2HP β CD	918.8500	1.824335	1.29000	459.5400	1	0.001788
M β CD	677.1000	1.555635	1.10000	459.5400	1	0.003219
M2HP β CD	821.9500	1.852620	1.31000	459.5400	1	0.002301

df – liczba stopni swobody; p - prawdopodobieństwo

Analizując stałe szybkości reakcji oraz wykorzystując równanie Arrheniusa określono zależność między temperaturą a trwałością α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych, w mieszaninach fizycznych oraz α -tokoferolu in substantia. Analizując wykres zależności $k = f(1/T)$ stwierdzono, że zależność między trwałością badanych substancji a temperaturą jest prostoliniowa ryc. 78.



Ryc. 78. Półlogarymiczna zależność $k = f(1/T)$ rozkładu badanych substancji w podwyższonej temperaturze w atmosferze suchego powietrza.

Wykorzystując parametry prostej równania Arrheniusa obliczono energię aktywacji i zmianę entalpii i entropii. Energia aktywacji dla α -tokoferolu w kompleksie z β -CD wzrosła o ok. 49%, a w kompleksie z 2-HP- β -CD o ok. 28% w stosunku do α -tokoferolu in substantia oraz o ok. 20% dla tokoferolu w kompleksie β -CD i o ok. 8% w kompleksie z 2-HP- β -CD w stosunku do analogicznych mieszanin fizycznych. Wzrost wartości energii

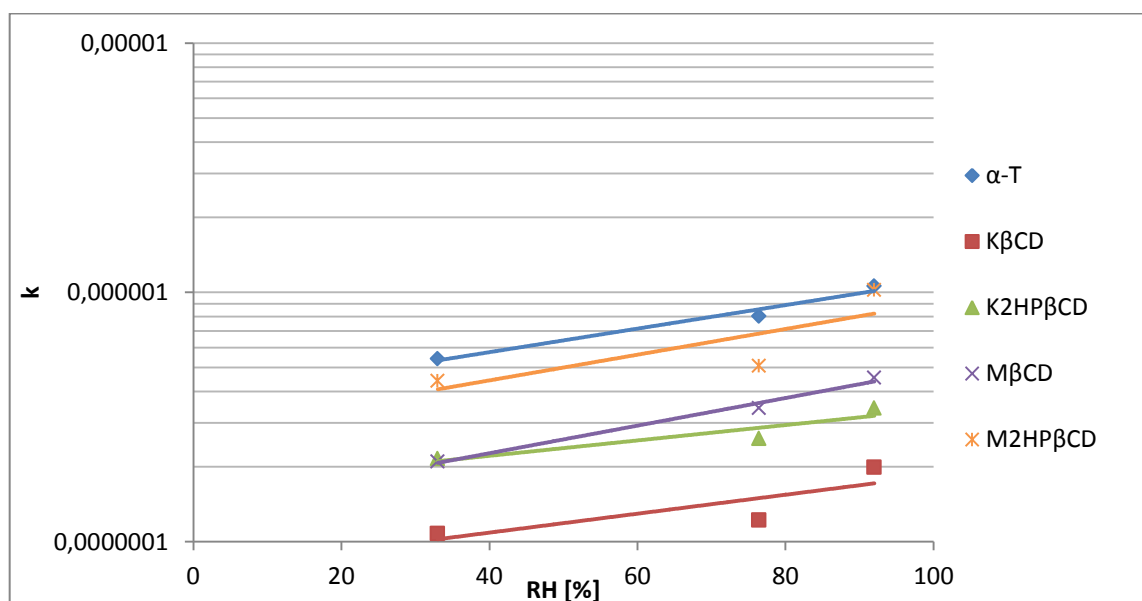
aktywacji jest widoczny dla α -tokoferolu zarówno w kompleksach inkluzyjnych, jak i mieszaninach fizycznych, jednakże zdecydowanie większe różnice wartości E_a w stosunku do α -tokoferolu występują w przypadku α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych niż w mieszaninach fizycznych. Z kolei porównując trwałość substancji czynnej w kompleksach inkluzyjnych, w zależności od użytej pochodnej cyklodekstryny, zdecydowanie większymi właściwościami protekcyjnymi w stosunku do α -tokoferolu w fazie stałej charakteryzuje się β -CD niż jej 2-hydroksypropylowa pochodna. Wysokie wartości energii aktywacji świadczą o konieczności dostarczenia dużej energii do zapoczątkowania reakcji rozkładu. Dodatkowo dodatnie wartości entalpii i ujemne entropii potwierdzają, że reakcje rozkładu tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych, w mieszaninach fizycznych, jak i α -tokoferolu są reakcjami endotermicznymi.

Tabela 63. Ocena statystyczna zależności $\ln k = f(1/T)$ oraz parametry termodynamiczne reakcji rozkładu substancji analizowanych.

α -Tokoferol			
Ocena statystyczna zależności $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a$	-4874.10 ± 770.81	E_a [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta H^\#$ [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta S^\#$ [J \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$]	40.53 ± -6.41 38.09 ± 8.84 -247.14 ± 19.19
S_a	179.13		
$b \pm \Delta b$	-0.28 ± 2.31		
S_b	0.54		
r	-0.9987		
α -Tokoferol w kompleksie inkluzyjnym z β -CD			
Ocena statystyczna zależności $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a$	-7207.10 ± 1070.00	E_a [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta H^\#$ [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta S^\#$ [J \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$]	59.92 ± 8.90 57.49 ± 11.32 -203.85 ± 26.64
S_a	248.66		
$b \pm \Delta b$	4.92 ± 3.20		
S_b	0.74		
r	-0.9988		
α -Tokoferol w kompleksie inkluzyjnym z 2-HP- β -CD			
Ocena statystyczna zależności $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a$	-6262.17 ± 1808.57	E_a [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta H^\#$ [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta S^\#$ [J \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$]	52.07 ± 15.04 49.63 ± 17.47 -218.21 ± 45.02
S_a	420.30		
$b \pm \Delta b$	3.20 ± 5.41		
S_b	1.26		
r	-0.9955		

α -Tokoferol w mieszaninie fizycznej z β -CD					
Ocena statystyczna zależności $\ln k = f(1/T)$			Parametry termodynamiczne		
$a \pm \Delta a$	-5872.24 ± 2272.34	E_a [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta H^\#$ [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta S^\#$ [J \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$]	48.82 ± 18.89 46.39 ± 21.33 -225.63 ± 56.57		
S_a	528.08				
$b \pm \Delta b$	2.30 ± 6.80				
S_b	1.58				
r	-0.9920				
α -Tokoferol w mieszaninie fizycznej z 2-HP- β -CD					
Ocena statystyczna zależności $\ln k = f(1/T)$			Parametry termodynamiczne		
$a \pm \Delta a$	-5301.91 ± 2108.36	E_a [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta H^\#$ [kJ \cdot mol $^{-1}$] $\Delta S^\#$ [J \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$]	44.08 ± 17.53 41.65 ± 11.33 -240.86 ± 52.48		
S_a	489.98				
$b \pm \Delta b$	0.47 ± 6.31				
S_b	1.47				
r	-0.9916				

Trwałość α -tokoferolu, α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -CD i 2-HP- β -CD oraz α -tokoferolu w mieszaninach fizycznych z β -CD i 2-HP- β -CD w temperaturze 338 K w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej



Ryc. 79. Wykres zależności $\ln k = f(RH)$.

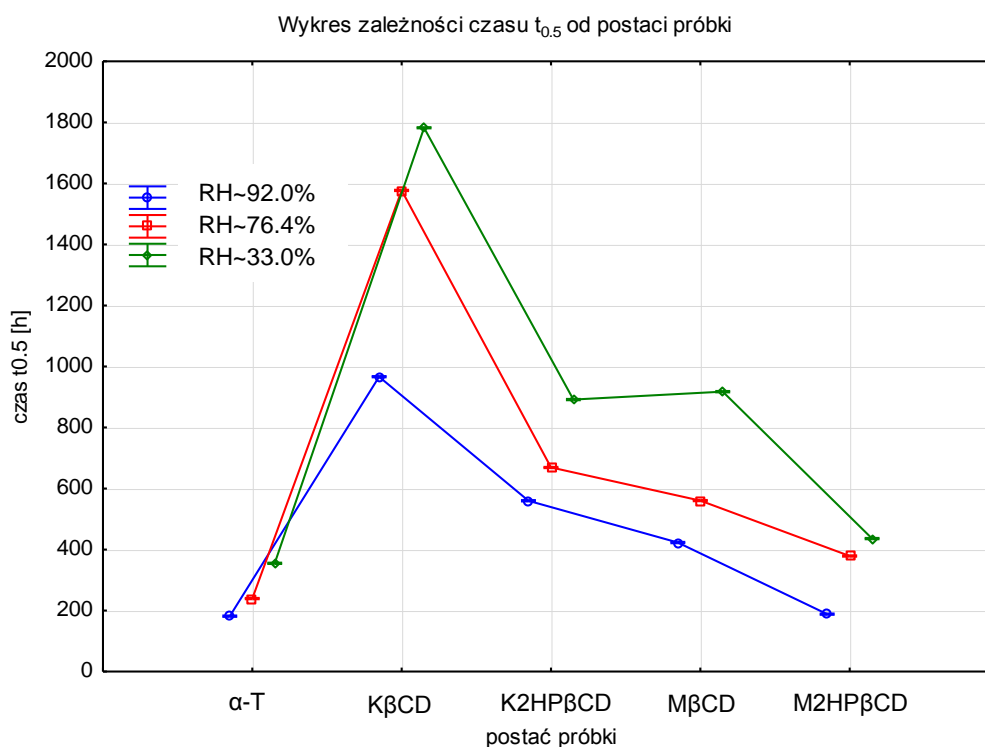
Analizując zależność $\ln k = f(RH)$ można stwierdzić, że rozkład badanych substancji w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej i w temperaturze 338 K

zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem substratu, podobnie jak w przypadku rozkładu w warunkach podwyższonej temperatury. Rozkładowi również towarzyszy zmiana zabarwienia z żółtego tokoferolu na brązowy oraz z kremowego na żółty w przypadku kompleksów inkluzyjnych i mieszanin fizycznych. Porównując wartości stałych szybkości reakcji rozkładu próbek oraz czasy $t_{0.5}$ i $t_{0.1}$ (tabela 55) w badanych warunkach stwierdzono, że spadek szybkości rozkładu α -tokoferolu jest proporcjonalny do zmniejszenia poziomu wilgotności względnej powietrza. Z kolei wartości stałych szybkości reakcji oraz czasy $t_{0.1}$ i $t_{0.5}$ zmieniają się analogicznie do warunków podwyższonej temperatury w suchym powietrzu. Jest to jednoznaczne z tym, że najszybszy rozkład zachodzi w przypadku α -tokoferolu in substantia, a otrzymane kompleksy inkluzyjne zwiększają trwałość włączonej substancji. Jej trwałość zwiększa się również w przypadku mieszanin fizycznych, lecz w zdecydowanie mniejszym stopniu. Potwierdzają to wyniki wskazujące na wzrost czasu, w którym rozłożyło się 10% substancji czynnej, w przypadku kompleksu inkluzyjnego z β -CD ok. 4-krotnie, dla kompleksu z 2-HP- β -CD ok. 2.5-krotnie w stosunku do α -tokoferolu. Proporcjonalnie do wzrostu $t_{0.1}$ wzrasta $t_{0.5}$ w trzech badanych wilgotnościach względnych powietrza. Znaczący wzrost $t_{0.5}$ i $t_{0.1}$ zaobserwowano dla kompleksu inkluzyjnego z β -CD. Statystyczna ocena wyników potwierdza, że szybkość reakcji rozkładu jest determinowana przez postać próbki oraz temperaturę i wilgotność.

Tabela 64. Ocena istotności statystycznej parametru $t_{0.5}$ w temperaturze 338 K i wilgotności względnej powietrza RH ~ 92.0%

Test t-studenta średnich $t_{0.5}$ w warunkach RH~92.0% / T=338 K						
Analizowane próbki	$t_{0.5}$ Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	$t_{0.5}$ alfa-T Odniesienie	df	p
K β CD	967.3500	1.202082	0.85000	180.3000	1	0.000688
K2HP β CD	560.1500	0.212132	0.15000	180.3000	1	0.000251
M β CD	423.0000	1.979899	1.40000	180.3000	1	0.003672
M2HP β CD	188.2000	1.838478	1.30000	180.3000	1	0.103830

df – liczba stopni swobody, p - prawdopodobieństwo

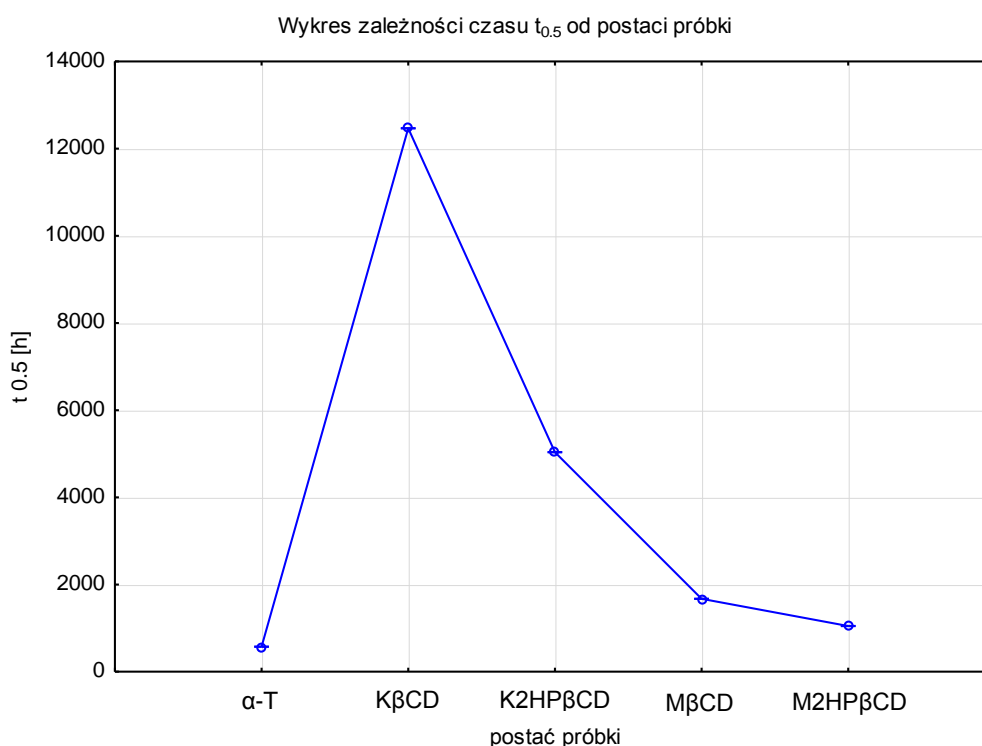


Ryc. 80. Wykres zależności zmiennej czas $t_{0.5}$ od postaci próbki w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza w temp. 338 K

Trwałość α -tokoferolu, α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -CD i 2-HP- β -CD oraz w mieszaninach fizycznych z β -CD i 2-HP- β -CD w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu

Analizując półlogarytmiczną zależność zmian stężenia od czasu (ryc. 67) próbek poddanych działaniu tlenu stwierdzono, że rozkład α -tokoferolu pod wpływem tlenu, zachodzi zgodnie z równaniem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Wartości stałych szybkości reakcji rozkładu wskazują, że dodatek cyklodekstryn spowalnia rozkład α -tokoferolu. Istotne statystycznie różnice obserwujemy zarówno dla α -tokoferolu w mieszaninach fizycznych, jak i w kompleksach inkluzyjnych. Spowolnienie szybkości reakcji rozkładu jest zdecydowanie mniejsze w przypadku mieszanin fizycznych badanej substancji. Natomiast kompleksowanie α -tokoferolu, zwłaszcza z macierzystą cyklodekstryną, spowalnia szybkość rozkładu α -tokoferolu 21-krotnie i jest najbardziej istotną statystycznie różnicą. Kompleksowanie z 2-hydroksypropylową pochodną również spowalnia rozkład ok. 8-krotnie. Przeprowadzone badania potwierdzają występowanie

zależności pomiędzy szybkością reakcji rozkładu a postacią próbek w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu (ryc. 81).



Ryc. 81. Wykres zależności zmiennej czas $t_{0.5}$ od postaci próbki w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

Tabela 65. Ocena istotności statystycznej parametru $t_{0.5}$ w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu.

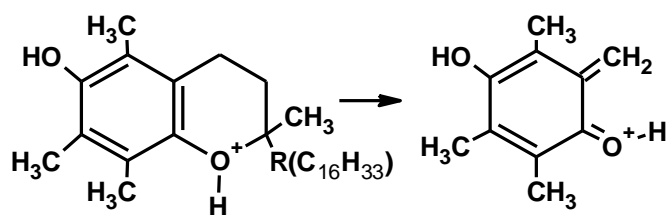
Test t-studenta średnich $t_{0.5}$ w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu						
Analizowane próbki	$t_{0.5}$ Średnia	Ochylenie standardowe	Błąd standardowy	$t_{0.5}$ α -T Odniesienie	df	p
K β CD	12467.60	1.272792	0.90000	573.8000	1	0.000048
K2HP β CD	5035.300	0.565685	0.40000	573.8000	1	0.000057
M β CD	1672.500	1.555635	1.10000	573.8000	1	0.000637
M2HP β CD	1047.900	1.272792	0.90000	573.8000	1	0.001209

df – liczba stopni swobody; p-prawdopodobieństwo

Identyfikacja produktów rozkładu za pomocą LC-ESI-MS/MS

Analiza za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem masowym pozwala na określenie mas produktów rozkładu badanych związków. Wybór sposobu joni-

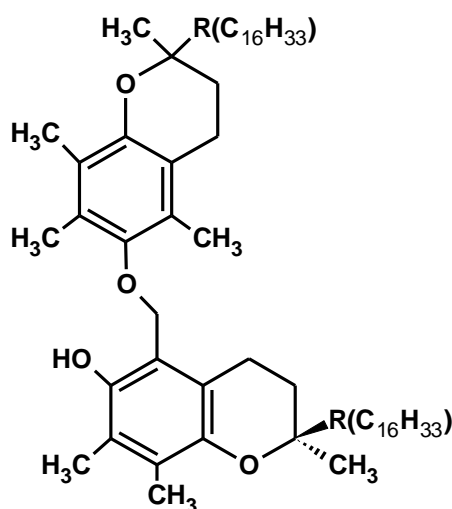
zacji determinuje uwidocznienie na widmie szukanych mas. Zastosowana metoda jonizacji poprzez elektrorozpylanie, należy oprócz jonizacji powietrzem pod ciśnieniem atmosferycznym, do najsłabszych metod warunkujących powstawanie jonów. Ze względu na zastosowany w badaniach ‘delikatny’ sposób tworzenia jonów oraz na niepolarny charakter badanych cząsteczek (brak silnych miejsc protonowania), dla zwiększenia efektu jonizacji, zastosowano prekolumnowy dodatek substancji jonizującej, w postaci mrówczanu amonu. Literaturowy rozpad cząsteczki wiąże się zazwyczaj z uwolnieniem węglowodorowego bocznego łańcucha w wyniku perycyclicznej reakcji retro Dielsa-Aldera, która jest częstą reakcją zachodzącą w spektrometrii mas [177, 178]. Po eliminacji łańcucha fitylowego w zależności od sposobu jonizacji powstają różne produkty. Wg jonizacji pozytywnej powstaje, poprzez protonowanie atomu tlenu w pierścieniu chromanu, jon $[M+H]^+$ o masie 165 lub wg. jonizacji negatywnej, na skutek uwolnienia atomu wodoru od grupy fenolowej, powstaje jon $[M-H]^-$ o masie 163.



Ryc. 82. Reakcja retro Dielsa Aldera α -tokoferolu.

Jednakże produkt o stosunku m/z 165, powstający w wyniku fragmentacji cząsteczki α -tokoferolu, nie został uwidoczniiony na widmach badanych próbek, w przeciwieństwie do S. Al-Malaiki i S. Issenhutha [179], którzy zaobserwowali szukaną masę badając przeciwutleniające właściwości witaminy E w polimerach. Proponowanym wyjaśnieniem tego zjawiska jest różnorodność warunków, jakim została poddana cząsteczka α -tokoferolu. S. Al-Malaika i S. Issenhuth przeprowadzili utlenianie za pomocą czynnika chemicznego ditlenku ołowiu (PbO_2), w przeciwieństwie do badanego w niniejszej pracy wpływu czynników fizycznych, takich jak podwyższona temperatura, podwyższona wilgotność względna powietrza oraz chemicznych - tlen. W trakcie badań z wykorzystaniem detekcji UV oraz trybu MRM, znaleziono produkt, otrzymany w wyniku działania podwyższonej temperatury i podwyższonej wilgotności. Charakteryzuje się on, analogicznie jak α -tokoferol, absorpcją przy λ_{max} 292 nm oraz jonem macierzystym o stosunku m/z 431, który ulega rozpadowi na jony fragmentacyjne o stosunku m/z 165; 137. Pomimo dokładnie takich samych właściwości powstały w badanych warunkach produkt różni się znacznie czasem

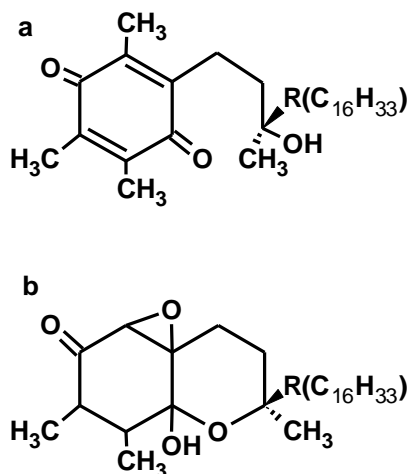
retencji od macierzystego α -tokoferolu (ryc. 74-75). Na widmie masowym ryc. 72 uwi-
 doczniony jest pik o stosunku m/z 859, który odpowiada dimerowi cząsteczki α -tokoferolu.
 Powstający pod wpływem podwyższonej temperatury oraz podwyższonej wilgotności
 względnej powietrza dimer jest wcześniej eluowany z kolumny. Następnie już na etapie
 elektrorozpraszania zostaje on rozbity, powstają jony o stosunku m/z 431, dlatego jest wy-
 krywany w trybie MRM pomimo pierwotnej znacznie większej masy. Powstanie ponownie
 jonu dokładnie o masie 431 sugeruje, że z możliwych proponowanych w literaturze [180]
 struktur dimerycznych najbardziej prawdopodobna jest struktura podana poniżej.



Ryc. 83. Dimer α -tokoferolu.

Dimery α -tokoferolu powstają w warunkach podwyższonej temperatury, podwyższonej
 wilgotności względnej w próbkach α -tokoferolu in substantia oraz w próbkach komplek-
 sów inkluzyjnych α -tokoferolu z cyklodekstrynami. Powodowany przez cyklodekstryny
 zwolniony rozkład α -tokoferolu w kompleksach determinuje odpowiednio mniejszą liczbę
 powstałych w próbkach dimerów, jednakże cyklodekstryny nie wpływają na rodzaj po-
 wstałych produktów rozkładu w badanych warunkach. Myląca może okazać się analiza
 chromatogramu z detekcją UV α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych, gdzie obserwu-
 jemy powstanie trzech pików, czyli o jeden więcej niż w przypadku chromatogramu α -
 tokoferolu. Jednakże wynik badania spektroskopią mas w trybie MRM jednoznacznie po-
 twierdza, że powstające piki pochodzą od jednego produktu rozkładu - dimeru α -
 tokoferolu. Utlenianie α -tokoferolu zachodzi według różnych mechanizmów i jest uzależ-
 nione od rozpuszczalnika, w którym jest przechowywana próbka [181], oraz czynnika
 utleniającego (rodnik peroksyłowy, rodnik alkilowy czy tlen). W wyniku działania tlenu,

poprzez reakcję chemiczną oraz proces fizycznego zmiatania cząsteczki tlenu, możliwe jest powstanie produktów takich jak np. chinon α -tokoferolu oraz epoksyd hydroksychinonu α -tokoferolu [182] (ryc. 84.).



Ryc. 84. a - chinon α -tokoferolu, b - epoksyd tokoferolochinonu

Widma masowe próbek poddanych działaniu tlenu uwidaczniają jon molekularny o stosunku m/z 446 oraz jon fragmentacyjny o stosunku m/z 149. Znaleziony jon molekularny odpowiada utlenionej cząsteczce α -tokoferolu do chinonu α -tokoferolu (ryc. 70), natomiast jon fragmentacyjny jest częścią powstałego chinonu. Widma próbek kompleksów inkluzyjnych nie różniły się od widma α -tokoferolu in substantia, co wskazuje na taki sam mechanizm reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksach z cyklodekstrynami, jak α -tokoferolu in substantia.

Podsumowując przeprowadzone badania stwierdzono, że rozkład α -tokoferolu w warunkach podwyższonej temperatury, zwiększonej wilgotności względnej powietrza oraz podwyższonej temperatury a także w warunkach powietrza o zwiększonej zawartości tlenu w temperaturze pokojowej zachodzi zgodnie z półlogarytmiczną zależnością zmian stężeń od czasu wg równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Rozkład wg równania reakcji pierwszego rzędu ma miejsce zarówno w przypadku α -tokoferolu in substantia, jak i α -tokoferolu w mieszaninach fizycznych oraz α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z cyklodekstrynami.

W badanych przypadkach wartości $t_{0,1}$ i $t_{0,5}$ wskazują na występowanie statystycznie istotnych różnic w trwałości α -tokoferolu po skompleksowaniu z β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną. W mieszaninach fizycznych cyklodekstryny również

wpływają modulująco na trwałość badanej substancji, jednakże w zdecydowanie mniejszym stopniu. W przypadku mieszaniny fizycznej z 2-HP- β -CD, w warunkach podwyższonej wilgotności i temperaturze 338 K, różnica ta jest wręcz statystycznie nieistotna. Zdecydowanie większymi właściwościami protekcyjnymi charakteryzuje się naturalna β -cyklodekstryna, w stosunku do jej hydroksylowej pochodnej. Na obniżone właściwości protekcyjne 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryny w stosunku do α -tokoferolu, wywierają wpływ zwiększone właściwości higroskopijne cyklodekstryny, co w efekcie w mniejszym stopniu wpływa na poprawę trwałości substancji czynnej w kompleksie podczas przechowywania.

Wykonane badania spektroskopią mas potwierdzają powstawanie różnych produktów rozkładu w zależności od warunków przechowywania próbki, natomiast kompleksowanie z badanymi cyklodekstrynami nie wpływa na rodzaj powstałych produktów rozkładu. Zaobserwowane produkty rozkładu α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych są analogiczne do produktów rozkładu α -tokoferolu in substantia.

6. WNIOSKI

1. α -Tokoferol tworzy kompleksy inkluzyjne z β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej. Metoda otrzymywania kompleksu zależy od rodzaju cyklodekstryny.
2. W wyniku tworzenia kompleksów inkluzyjnych α -tokoferolu z cyklodekstrynami następuje przejście substancji czynnej ze stanu ciekłego w stały.
3. Kinetyczny mechanizm rozkładu α -tokoferolu nie zależy od warunków przechowywania. W atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, o podwyższonej wilgotności względnej, zwiększonej zawartości tlenu i podwyższonej temperaturze α -tokoferol ulega rozkładowi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.
4. Cyklodekstryny, zarówno naturalna β -cyklodekstryna, jak i jej 2-hydroksypropylowa pochodna, nie wpływają na kinetyczny mechanizm rozkładu α -tokoferolu.
5. Analizowane cyklodekstryny zwiększają trwałość α -tokoferolu w badanych warunkach. Większe właściwości ochronne, w stosunku do analizowanej substancji, wykazuje naturalna β -cyklodekstryna.
6. Rodzaj produktów rozkładu α -tokoferolu zależy od warunków przechowywania próbek. W podwyższonej temperaturze oraz podwyższonej wilgotności względnej powietrza α -tokoferol dimeryzuje tworząc produkt o masie 858 Da, natomiast w atmosferze tlenu powstaje chinon α -tokoferolu o masie 446 Da. Kompleksowanie nie wpływa na rodzaj powstałych produktów rozkładu.

7. STRESZCZENIE

Celem badań była ocena trwałości α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -cyklodekstryną i 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w fazie stałej. Dla celów porównawczych badano również α -tokoferol in substantia oraz mieszaniny fizyczne α -tokoferolu z cyklodekstrynami.

Kompleksy inkluzyjne z β -CD otrzymano metodą liofilizacji, natomiast kompleks inkluzyjny z 2-HP- β -CD otrzymano metodą ugniatania.

Tożsamość otrzymanych produktów potwierdzono metodą kalorymetrii różnicowej (DSC), spektroskopii w podczerwieni (IR) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ($^1\text{H-NMR}$).

Do oceny zmian stężenia α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych zastosowano metodę HPLC. W metodzie wykorzystano podane poniżej parametry rozdzielania, które umożliwiały śledzenie zmian substratu w obecności produktów rozkładu: kolumna LiChroCART o wymiarach 250 x 4 mm z wypełnieniem LiChrospher 100 RP-18 (5 μm), faza ruchoma metanol 100%, szybkość przepływu fazy ruchomej 1.3 ml/min, detektor UV $\lambda = 292$ nm. Metodę HPLC poddano walidacji, określając następujące parametry: selektywność, liniowość, precyzję, granicę wykrywalności i granicę oznaczalności.

Badania kinetyczne reakcji rozkładu α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych z β -CD i 2-HP- β -CD, w mieszaninach fizycznych oraz α -tokoferolu in substantia przeprowadzono w fazie stałej, a α -tokoferolu in substantia w postaci oleju w warunkach podwyższonej temperatury 343 K, 338 K, 333 K, 323 K w atmosferze suchego powietrza, w temperaturze 338 K w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej RH ~ 33.0, 76.4, 92.0% oraz w temperaturze pokojowej w atmosferze powietrza o podwyższonej

zawartości tlenu. Rozkład α -tokoferolu w kompleksach inkluzyjnych, w mieszaninach fizycznych oraz α -tokoferolu in substantia w badanych warunkach zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu i opisany jest następującym równaniem: $\ln c = \ln c_0 - kt$. Wykorzystując współczynniki kierunkowe prostych $\ln k = f(1/T)$ wyznaczono energię aktywacji oraz entropię i entalpię reakcji rozkładu. Wyznaczone energie aktywacji w warunkach podwyższonej temperatury oraz obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza w temperaturze 338 K oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu w temperaturze pokojowej pozwalają określić wpływ kompleksowania na trwałość α -tokoferolu. W badanych przypadkach wartości $t_{0,1}$ i $t_{0,5}$ wskazują na występowanie statystycznie istotnych różnic w trwałości α -tokoferolu po skompleksowaniu z β -cyklodekstryną i z 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryną. We wszystkich warunkach przechowywania analizowanych próbek α -tokoferol znacząco zwiększył swoją trwałość w kompleksach inkluzyjnych z β -CD, mniej w kompleksach z 2-HP- β -CD. Dodatek cyklodekstryn do α -tokoferolu (mieszanina fizyczna) również wpływa modulująco na trwałość badanej substancji, jednak w zdecydowanie mniejszym stopniu niż miało to miejsce w przypadku kompleksów inkluzyjnych. W przypadku mieszaniny fizycznej z 2-HP- β -CD w warunkach podwyższonej wilgotności i temperaturze 338 K, różnica ta jest wręcz statystycznie nieistotna.

Do zidentyfikowania produktów rozkładu α -tokoferolu in substantia oraz w kompleksach inkluzyjnych z β -CD i 2-HP- β -CD wykorzystano metodę LC/MS/MS. W wyniku przeprowadzonych analiz oznaczono po jednym produkcie rozkładu takim samym dla α -tokoferolu nieskompleksowanego, jak i w kompleksach inkluzyjnych z β -CD i 2HP- β -CD. Rodzaj powstałego produktu rozkładu jest zależny od warunków przechowywania próbki. W warunkach podwyższonej temperatury i podwyższonej wilgotności względnej powietrza zaobserwowano dimeryzację cząsteczki α -tokoferolu, natomiast w atmosferze powietrza o podwyższonej zawartości tlenu utlenienie cząsteczki α -tokoferolu do chinonu tokoferolu.

Summary

Investigation of stability of α -tocopherol in inclusion complexes with cyclodextrins

The aim of these studies was to evaluate the stability of α -tocopherol in inclusion complexes with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in a solid state. For comprehension α -tocopherol in substantia and physical mixtures of α -tocopherol with cyclodextrins were used.

The inclusion complex with β -CD was prepared by the lyophilization, whereas the inclusive complex with 2-HP- β CD was synthesized by the kneading method.

The interaction of α -tocopherol with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin was studied by several analytical techniques, including thermal analyzer (DSC), infrared spectroscopy (IR), ^1H nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$), which confirm the formation of the inclusive complexes.

An HPLC method was used to determine the changes in the concentration of the α -tocopherol in inclusion complexes with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The separation of α -tocopherol, in the presence of its degradation products in the HPLC method, was obtained using the following parameters: column LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) 250 x 4 mm, Merck (Germany), mobile phase 100% methanol, flow rate 1.3 ml/min; detector spectrophotometer UV $\lambda = 292$ nm. The method was validated with regard to selectivity, linearity, precision, limit of detection and limit of quantitation.

The kinetics of the α -tocopherol in inclusion complexes with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, in the physical mixtures and of the α -tocopherol in substan-

tia was studied in a solid state, in dry air (RH ~ 0%) at 343 K, 338 K, 333 K, 323 K, at increased relative humidity RH ~ 33.0, 76.4, 92.0% at 338 K, in an atmosphere of air enriched in oxygen at room temperature. The degradation of α -tocopherol in the inclusion complexes, in the physical mixtures and α -tocopherol in substantia in the studied conditions, was a first-order reaction described by the following equation $\ln c = \ln c_0 - kt$. Using the coefficient of the straight-line relationship $\ln k = f(1/T)$, the thermodynamic parameters E_a , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger of the samples were indicated. The determined values of activation energy at elevated temperature and the observed rate constant for the reaction of degradation at elevated humidity at 338 K and in an atmosphere of air enriched in oxygen at room temperature allow to, determine the influence of cyclodextrin complexation on α -tocopherol. In the examined cases the value of $t_{0.1}$ and $t_{0.5}$ pointed at statistically significant differences in stability of α -tocopherol in inclusion complex with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in relation to the α -tocopherol. In the all storage conditions of analyzed samples α -tocopherol in the greater extent increased its stability in the inclusive complexes with β -CD, less in inclusive complexes with 2-HP- β -CD. The addition of cyclodextrins to α -tocopherol (physical mixtures) also influenced the stability of examined substance although in a significantly lower degree. In the condition of elevated humidity at 338 K the difference between $t_{0.5}$ of α -tocopherol and the physical mixture of α -tocopherol with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin is statistically irrelevant.

In order to investigate the products of decomposition of the α -tocopherol, and α -tocopherol in inclusion complexes with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin the LC/MS/MS method was used. As a result of carrying out the analysis, the one product of the decomposition of α -tocopherol and for the inclusion complexes was obtained. The resulting product depends on the storage condition. As a result of elevated temperature and elevated humidity, the dimerization of α -tocopherol was observed, while in the atmosphere of oxygen the oxidation of the α -tocopherol to α -tocopherol-chinon was observed.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Bender D. A., *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, Cambridge University Press, New York 2003.
2. Hulea S. A., *An Introduction to Vitamins, Minerals and Oxidative Stress: The Role of Micronutrients and Reactive Oxygen Species in Normal and Pathological Processes*, Universal-Publishers Boca-Raton, Florida 2008.
3. Zając M., Pawełczyk E., *Chemia leków*, Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego, Poznań 2000.
4. Ternus M., Broihier K., *The Everything Vitamins, Minerals, and Nutritional Supplements Book*, Adams Media Corporation, Holbrook 2001.
5. Yap K.L., Liu X., Thenmozhiyal J.C., Ho P.C., *Characterization of the 13-cis-retinoic acid/cyclodextrins inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis*, Eur J Pharm Sci 2005, 25: 49-56.
6. Berzas Nevado J.J., Murillo Pulgarin J.A., Gómez Laguna M.A., *Spectrofluorimetric study of the β -cyclodextrin: vitamin K₃ complex and determination of vitamin K₃*, Talanta 2000, 53: 951-959.
7. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.htm>).
8. Bakshi M., Singh S., *Development of validated stability-indicating assay methods- critical review*, J Pharm Biomed Anal 2002, 28: 1011-1040.
9. Kamal-Eldin A., Appelqvist L-Å., *The chemistry and antioxidant properties of tocopherol and tocotrienols*, Lipids 1996, 31 (7): 671-693.
10. Azzi A., Stocker A., *Vitamin E: non –antioxidant roles*, Prog Lipid Res 2000, 39: 231-255.
11. Dormann P., *Functional diversity of tocochromanols in plants*, Planta 2007, 225(2): 269-76.
12. Zimmer S., Stocker A., Sarbolouki M.N., Spycher S.E., Sassoon J., Azzi A., *A novel human tocopherol associated protein: cloning, in-vitro expression and characterization*, J Biol Chem 2000, 275: 25672-25680.

13. Bast A., Haenen R.M.M.G., *The toxicity of antioxidants and their metabolites* Environ Toxicol Phar 2002, 11: 251-258.
14. Hofius D., Sonnewald U., *Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology* Trends Plant Sci 2003, 8(1): 6-8.
15. Venkatesh T.V., Karunanandaa B., Free D.L., Rottnek J.M., Baszis S.R., Valentin H.E., *Identification and characterization of an Arabidopsis homogentisate phytyltransferase paralog*, Planta 2006, 223(16): 1134-1144.
16. Munné-Bosch S., Alegre L., *The function of tocopherols and tocotrienols in plants*, Crit Rev Plant Sci 2002, 21: 31-57.
17. Porfirova S., Bergmuller E., Tropf S., Lemke R., Dormann P., *Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis*, Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99(19): 12495-12500.
18. Schwenke C.D., *Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer?*, J Nutr Biochem 2002, 13: 2-20.
19. Horvath G., Wessjohann L., Bigirimana J., Jansen M., Guisez Y., Caubergs R., Horemans N., *Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues*, Phytochemistry 2006, 67 (12): 1185-1195.
20. Sundram K., Sambanthamurthi R., Tan Y.A., *Palm fruit chemistry and nutrition*, Asia Pac J Clin Nutr 2003, 12(3): 355-362.
21. Combs F.G. Jr, *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 4th edition Elsevier Inc. 2012.
22. Cheeseman K.H., Holley A.E., Kelly F.J., Wasil M. Hughes L., Burton G., *Biokinetics in humans of RRR- α -tocopherol: the free phenol, acetate ester and succinate ester forms of vitamin E*, Free Radic Biol Med 1995, 19: 591-598.
23. Lauridsen C., Hedemann M.S., Jensen S.K., *Hydrolysis of tocopheryl and retinyl esters by porcine carboxyl ester hydrolase is affected by their carboxylate moiety and bile acids*, J Nutr Biochem 2001, 12: 219-224.
24. Wang X., Quinn J.P., *Vitamin E and its function in membranes*, Prog Lipid Res 1999, 38: 309-336.
25. Stahl W., Van den Berg H., Arthur J., Bast A., Dainty J., Faulks M.R., Gärtner C., Haenen G., Hollman P., Holst B., Kelly J.F., Polidori M.C., Rice-Evans C., Southon S., Van Vliet T., Viña-Ribes J., Williamson G., Astley S.B., *Bioavailability and metabolism Chapter 2*, Mol Aspects Med 2002, 23: 39-100.
26. Traber M.G., *Determinants of plasma vitamin E concentration*, Free Radical Biol Med 1994, 2: 229-239.
27. Traber M.G., Ingold K.U., Burton G.W., Kayden H.J., *Absorption and transport of deuterium-substituted 2R, 4'R, 8'R- α -tocopherol in human lipoproteins*, Lipids 1988, 23: 791-797.

28. Traber M.G., Lane J.C., Lagmay N.R., Kayden H.J., *Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins*, *Lipids* 1992, 27: 657-663.
29. Birringer M., Pfluger P., Kluth D., Landes N., Brigelius-Flohé R., *Identities and differences in the metabolism of tocotrienols and tocopherols in HepG2 cells*, *J Nutr* 2002, 132: 3113-3118.
30. Traber M.G., *Vitamin E, nuclear receptors and xenobiotic metabolism*, *Arch Biochem Biophys* 2004, 423: 6-11
31. Brigelius-Flohé R., *Vitamin E and drug metabolism*, *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 305(3): 737-40.
32. Schakel F.S., Pettit J., *Expansion of a nutrient database with the 'new' vitamin E*, *J Food Comp Anal* 2004, 17: 371-378.
33. US Pharmacopeia 2010.
34. Scientific opinion on the safety and efficacy of vitamin E as a feed additive for all animal species, *EFSA Journal* 2010 8(6): 1635.
35. [Http://www.eufic.org/article/pl/5/20/artid/Making_Sense_of_Guideline_Daily_Amounts/](http://www.eufic.org/article/pl/5/20/artid/Making_Sense_of_Guideline_Daily_Amounts/).
36. [Http://www.iom.edu/Home/Global/News%20Announcements/~~/media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRI/DRI_Summary_Listing.pdf](http://www.iom.edu/Home/Global/News%20Announcements/~~/media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRI/DRI_Summary_Listing.pdf).
37. Weisburger H.J., *Optimal Daily Intakes of Micronutrients*, *Nutrition* 2000, 16: 243–244.
38. Scientific Opinion of the Panel of Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission on mixed tocopherols, tocotrienol tocopherol, tocotrienols as a sources of vitamin E, *EFSA Journal* 2008, 640:1-34.
39. Gordon N., *Hereditary vitamin-E deficiency*, *Dev Med Child Neurol* 2001, 43: 133-135.
40. Sokol R.J., *Vitamin E deficiency and neurologic disease*, *Annu Rev Nutr*, 1988, 8: 351-373.
41. Traber M.G., Sokol R.J., Burton G.W., Ingold K.U., Papas A.M., Huffaker J.E., Kayden H.J., *Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver*, *J Clin Invest* 1990, 85(2): 397-407.
42. Gotoda T., Arita M., Arai H., Inoue K., Yokota T., Fukuo Y., Yazaki Y., Yamada N., *Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein*, *N Engl J Med*, 1995, 333(20): 1313–1318.
43. Kayden J. H., *The genetic basis of vitamin E deficiency in humans*, *Nutrition* 2001, 17: 797-798.
44. Schuelke M., Mayatepek E., Inter M., Becker M., Pfeiffer E., Speer A., Hübner C., Finckh B., *Treatment of ataxia in isolated vitamin E deficiency caused by alpha-tocopherol transfer protein deficiency*, *J Pediatr* 1999, 134(2): 240-244.

45. Hoshino M., Masuda N., Ito Y., Murata M., Goto J., Sakurai M., Kanazawa I., *Ataxia with isolated vitamin E deficiency: a Japanese family carrying a novel mutation in the alpha-tocopherol transfer protein gene*, *Ann Neurol* 1999, 45: 809-812.
46. Pearson P., Lewis S.A., Britton J., Young I.S., Fogarty A., *The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo*, *BioDrugs* 2006, 20(5): 271-273.
47. Saldeen K., Saldeen T., *Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies*, *Nutrition Research* 2005, 25: 877-889.
48. Burton G.W., Ingold K.U., *Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant*, *Ann N Y Acad Sci* 1989, 570: 7-22.
49. Niki E., Saito T., Kawakami A., Kamiya Y., *Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C*, *J Biol Chem* 1984, 259(7): 4177-4182.
50. Shi H., Noguchi N., Niki E., *Comparative study on dynamics of antioxidative action of α -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation*, *Free Radic Biol Med* 1999, 27: 334-346.
51. D'Ischia M., Costantini C., Prota G., *Dye-sensitized photooxidation of vitamin E revisited. New 7-oxaspiro[4.5]dec-1-ene-3,6-dione products by oxygenation and ring-contraction of α -tocopherol*, *J Am Chem Soc* 1991, 113(22): 8353-8356.
52. Kaiser S., Di Mascio P., Murphy M.E., Sies H., *Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols*, *Arch Biochem Biophys* 1990, 15, 277(1): 101-108.
53. Kohar I., Baca M., Suarna C., Stocker R., Southwell-Keely P.T., *Is alpha-tocopherol a reservoir for alpha-tocopheryl hydroquinone?*, *Free Radic Biol Med* 1995, 19(2): 197-207.
54. Christen S., Woodall A.A., Shigenaga M.K., Southwell-Keely P.T., Duncan M.W., Ames B.N., *γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements α -tocopherol: physiological implications*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3217-3222.
55. Hoglen N.C., Waller S.C., Sipes I.G., Liebler D.C., *Reactions of peroxynitrite with gamma-tocopherol*, *Chem Res Toxicol* 1997, 10(4): 401-407.
56. Conney R.V., Harwood P.J., Franke A.A., Narala K., Sundstrom A.K., Berggren P.O., Mordan L.J., *Products of γ -tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F) cells*, *Free Radic Biol Med* 1995, 19: 259-269.
57. Conney R.V., Franke A.A., Harwood P.J., Hatch-pigott V., Custer L.J., *γ -Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to α -tocopherol*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 1771-1775.
58. Ohkatsu Y., Kajiyama T., Arai Y., *Antioxidant activities of tocopherols*, *Polym Degrad Stabil* 2001, 72: 303-311.
59. Williamson K.S., Gabbita S.P., Mou S., West M., Pye Q.N., Markesbery W.R., Cooney R.V., Grammas P., Reimann-Philipp U., Floyd R.A., Hensley K., *The nitration product 5-nitro-gamma-tocopherol is increased in the Alzheimer brain*, *Nitric Oxide* 2002, 6(2): 221-227.

60. Albright C.D., Salganik R.I., Van Dyke T., *Dietary depletion of vitamin E and vitamin A inhibits mammary tumor growth and metastasis in transgenic mice*, J Nutr 2004, 143: 942-944.
61. Neuzil J., Tomasetti M., Mellick A.S., Alleva R., Salvatore B.A., Birringer M., Fariss M.W., *Vitamin E analogues: a new class of inducers of apoptosis with selective anti-cancer effects*, Curr Cancer Drug Targets 2004, 4(4): 355-372.
62. Wang X.F., Dong L., Zhao Y., Tomasetti M., Wu K., Neuzil J., *Vitamin E analogues as anticancer agents: lessons from studies with alpha-tocopheryl succinate*, Mol Nutr Food Res 2006, 50(8): 675-685.
63. Beth M., Berger M.R., Aksoy M., Schmahl D., *Effects of vitamin A and E supplementation to diets containing two different fat levels on methylnitrosourea-induced mammary carcinogenesis in female SD-rats*, Br J Cancer 1987, 56(4): 445-449.
64. Gould M.N., Haag J.D., Kennan S.W., Tanner M.A., Elson C.E., *A comparison of tocopherol and tocotrienol for the chemoprevention of chemically induced rat mammary tumors*, Am J Clin Nutr 1991, (4 Suppl): 1068-1070.
65. Ip C., *Dietary vitamin E intake and mammary carcinogenesis in rats*, Carcinogenesis 1982, 3(12): 1453-1456.
66. Hirose M., Masuda A., Inoue T., Fukushima S., Ito N., *Modification by antioxidants and p,p'-diaminodiphenylmethane of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis of the mammary gland and ear duct in CD rats*, Carcinogenesis 1986, 7(7): 1155-1159.
67. Horvath P.M., Ip C., *Synergistic effect of vitamin E and selenium in the chemoprevention of mammary carcinogenesis in rats*, Cancer Res 1983, 43(11): 5335-5341.
68. Nesaretnam K., Stephen R., Dils R., Darbre P., *Tocotrienols inhibit the growth of human breast cancer cells irrespective of estrogen receptor status*, Lipids 1998, 33(5): 461-469.
69. Guthrie N., Gapor A., Chambers A.F., Carroll K.K., *Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination*, J Nutr 1997 127(3): 544-548.
70. Nesaretnam K., Dorasamy S., Darbre P.D. *Tocotrienols inhibit growth of ZR-75-1 breast cancer cells*, Int J Food Sci Nutr 2000, (51 Suppl): 95-103.
71. Takada H., Hirooka T., Hatano T., Hamada Y., Yamamoto M., *Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lipid peroxidation and mammary tumor development in rats by vitamin E in conjunction with selenium*, Nutr Cancer 1992, 17(2): 115-122.
72. Ip C., *Feasibility of using lower doses of chemopreventive agents in a combination regimen for cancer protection*, Cancer Lett 1988, 39(3): 239-246.
73. Ip C., White G., *Mammary cancer chemoprevention by inorganic and organic selenium: single agent treatment or in combination with vitamin E and their effects on in vitro immune functions*, Carcinogenesis 1987, 8(12): 1763-1766.
74. Ip. C, *Attenuation of the anticarcinogenic action of selenium by vitamin E deficiency*, Cancer Lett 1985, 25(3): 325-331.

75. Prasad K.N., Kumar B., Yan X.D., Hanson A.J., Cole W.C., *α -Tocopheryl succinate, the most effective form of vitamin E for adjuvant cancer treatment: a review*, J Am Coll Nutr 2003, 22(2): 108-117.
76. Stapelberg M., Tomasetti M., Alleva R., Gellert N., Procopio A., Neuzil J., *α -Tocopheryl succinate inhibits proliferation of mesothelioma cells by selective down-regulation of fibroblast growth factor receptors*, Biochem Biophys Res Commun 2004, 318(3): 636-641.
77. Yu W., Liao O.Y., Hantash F.M., Sanders B.G., Kline K., *Activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH(2)-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein kinases is required for RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells*, Cancer Res 2001, 61(17): 6569-6576.
78. Wu K., Zhao Y., Li G.C., Yu W.P., *c-Jun N-terminal kinase is required for vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer cells*, World J Gastroenterol 2004, 10(8): 1110-1114.
79. Israel K., Yu W., Sanders B.G., Kline K., *Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis*, Nutr Cancer 2000, 36(1): 90-100.
80. Neuzil J., Weber T., Schröder A., Lu M., Ostermann G., Gellert N., Mayne G.C., Olejnicka B., Nègre-Salvayre A., Sticha M., Coffey R.J., Weber C., *Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements*, Faseb J 2001, 15(2): 403-415.
81. Neuzil J., *Vitamin E succinate and cancer treatment: a vitamin E prototype for selective antitumour activity*, Br J Cancer 2003, 89(10): 1822-1826.
82. Zu K., Ip C., *Synergy between selenium and vitamin E in apoptosis induction is associated with activation of distinctive initiator caspases in human prostate cancer cells*, Cancer Res 2003, 63(20): 6988-6995.
83. Nesaretnam K., Guthrie N., Chambers A.F., Carroll K.K., *Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture*, Lipids 1995, 30(12): 1139-1143.
84. Jessup W., Kritharides L., Stocker R., *Lipid oxidation in atherogenesis: an overview*, Biochem Soc Trans 2004, (Pt 1): 134-138.
85. Esterbauer H., Diebeer-Rotheneder M., Striegl G., Waeg G., *Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein*, Am J Clin Nutr 1991, 53(1 Suppl): 314-321.
86. Mabile L., Bruckdorfer K.R., Rive-Evans C., *Moderate supplementation with natural alpha-tocopherol decreases platelet aggregation and low-density lipoprotein oxidation*, Atherosclerosis 1999, 147(1): 177-185.
87. Saldeen T., Li D., Mehta J.L., *Differential effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis*, J Am Coll Cardiol 1999, 34(4): 1208-1215.
88. Spanbroek R., Grabner R., Lotzer K., Hildner M., Urbach A., Ruhling K., Moos M.P., Kaiser B., Cohnert T.U., Wahlers T., Zieske A., Plenz G., Robenek H., Salbach P., Kuhn H.,

- Radmark O., Samuelsson B., Habenicht A.J., *Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis*, Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100(3): 1238-1243.
89. Birleigh M.E., Babaev V.R., Oates J.A., Harris R.C., Gautam S., Riendeau D., Marnett L.J., Morrow J.D., Fazio S., Linton M.F., *Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice*, Circulation 2002, 105(15): 1816-1823.
90. Jiang Q., Elson-Schwab I., Courtemanche C., Ames B.N., *γ -Tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells*, Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97(21): 11494-11499.
91. Devaraj S., Jialal I., *Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase*, Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999, 19(4): 1125-1133.
92. Jiang Q., Ames B.N., *γ -Tocopherol, but not α -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats*, Faseb J. 2003, 17(8): 816-822.
93. Ricciarelli R., Zingg J.M., Azzi A., *Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells*, Circulation 2000, 102(1): 82-87.
94. Teupser D., Thiery J., Seidel D., *α -Tocopherol down-regulates scavenger receptor activity in macrophages*, Atherosclerosis 1999, 144(1): 109-115.
95. Boullier A., Bird D.A., Chang M.K., Dennis E.A., Friedman P., Gillotre-Taylor K., Hörkkö S., Palinski W., Quehenberger O., Shaw P., Steinberg D., Terpstra V., Witztum J.L., *Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis*, Ann N Y Acad Sci 2001, 947: 214-222.
96. Witztum J.L., Steinberg D., *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*, J Clin Invest 1991, 88(6): 1785-1792.
97. Boscoboinik D., Szweczyk A., Hensey C., Azzi A., *Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C*, J Biol Chem 1991, 266(10): 6188-6194.
98. Tasinato A., Boscoboinik D., Bartoli G.M., Maroni P., Azzi A., *d- α -Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties*, Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92(26): 12190-12194.
99. Riciarelli R., Tasinato A., Clement S., Ozer N.K., Boscoboinik D., Azzi A., *α -Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state*, Biochem J 1998, 334(Pt 1): 243-249.
100. European Pharmacopoeia 6.0.
101. Moreno P., Salvadó V., *Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography*, J Chromatogr A 2000, 870(1-2): 207-215.

102. Heudi O., Trisconi M.J., Blake C.J., *Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography–mass spectrometry*, J Chromatogr A 2004, 1022(1-2): 115-123.
103. Turner C, Mathiasson L., *Determination of vitamins A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up*, J Chromatogr A 2000, 874(2): 275-283.
104. Khan I.M., Khan A., Iqbal Z., Ahmad L., Shah Y., *Optimization and Validation of RP-LC/UV–VIS Detection Method for Simultaneous Determination of Fat-Soluble Anti-Oxidant Vitamins, all-trans-Retinol and α -Tocopherol in Human Serum: Effect of Experimental Parameters*, Chromatographia 2010, 71(7/8): 577-586.
105. Lucero J.M., Vigo J., León J.M., *Degradation kinetics of α -tocopherol in hydrophilic gels*, Int J Pharm 1996, 140: 251-255.
106. Sánchez-Machado D.I, López-Hernández J., Paseiro-Losada P., *High-performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macroalgae*, J Chromatogr A 2002, 976(1-2): 277-284.
107. Chávez-Servín J.L., Castellote A.I., López-Sabater M.C., *Simultaneous analysis of Vitamins A and E in infant milk-based formulae by normal-phase high-performance liquid chromatography–diode array detection using a short narrow-bore column*, J Chromatogr A 2006, 1122(1-2): 138-143.
108. Granado-Lorencio F., Olmedilla-Alonso B., Herrero-Barbudo C., Blanco-Navarro I., Blázquez-García S., Pérez-Sacristán B., *Simultaneous determination of vitamins A, E and 25-OH-vitamin D: application in clinical assessments*, Clin Biochem 2006, 39(2): 180-182.
109. Barbas C., Castro M., Bonet B., Viana M., Herrera E., *Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography*, J Chromatogr A 1997, 778(1-2): 415-420.
110. Delgado Zamarreño M.M., Sanchez Perez A., Sanchez Rodriguez M., Gomez Perez M.C., Hernandez Mendez J., *Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection*, Talanta 1996, 43(9): 1555-1563.
111. Spencer J.B., Purdy C.W. *Comparison of the separation of fat-soluble vitamins using β -cyclodextrins in high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography*, J Chromatogr A 1997, 782: 227-235.
112. Villiers A., *Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique*, Compt Rend Acad Sci 1891, 112: 536-538.
113. Stella V.J., He Q., *Cyclodextrins*, Toxicol Pathol 2008, 36: 30-42.
114. Szejtli J., Szenté L., *Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins*, Eur J Pharm Biopharm 2005, 61: 115-125.
115. Singh M, Sharma R, Banerjee U.C., *Biotechnological applications of cyclodextrins*, Biotechnol Adv 2002, 20: 341-59.

116. Duchêne D., Wouessidjewe D., Ponchel G., *Cyclodextrins and carrier systems*, J Control Release 1999, 62: 263-268.
117. Holland L., Rizzi G., Malton P., *Cosmetic composition comprising cyclic oligosaccharides and fragrance*, PCT Int Appl WO 1999, 67, 716.
118. Hedges A.R., *Industrial Applications of Cyclodextrins*, Chem Rev 1998, 98: 2035-2044.
119. Fujishima N., Kusaka K., Umino T., Urushinata T., Terumi K., *Flour based foods containing highly branched cyclodextrins*, Japanese Patent JP 2001, 136, 898.
120. Lezcano M., Al-Soufi W., Novo M., Rodríguez-Núñez E., Tato J.V., *Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins*, J Agric Food Chem 2002, 50: 108-112.
121. Rao V.M., Haslam J.L., Stella V.J., *Controlled and complete release of a model poorly water-soluble drug, prednisolone, from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets using (SBE)(7m)-beta-cyclodextrin as a solubilizing agent*, J Pharm Sci 2001, 90: 807-816.
122. Li J., Guo Y., Zografi G., *The solid-state stability of amorphous quinapril in the presence of beta-cyclodextrins*, J Pharm Sci 2002, 91: 229-243.
123. Uekama K., Hirayama F., Irie T., *Cyclodextrin Drug Carrier Systems*, Chem Rev 1998, 98: 2045-2076.
124. Uekama K., Hieda Y., Hirayama F., Arima H., Sudoh M., Yagi A., Terashima H., *Stabilizing and solubilizing effects of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin on prostaglandin E1 analogue*, Pharm Res 2001, 18: 1578-1585.
125. Okada Y., Tachibana M., Koizumi K., *Solubilization of lipid-soluble vitamins by complexation with glucosyl- β -cyclodextrin*, Chem Pharm Bull 1990, 38: 2047-2049.
126. Davis M.E., Brewster M.E., *Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*, Nat Rev Drug Discov 2004, 3: 1023-1035.
127. Bär A., *Preface. Cyclodextrins*, Regul Toxicol Pharmacol 2004, 39: 1-2.
128. Loftsson T., Brewster M.E., *Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development*, J Pharm Pharmacol 2010, 62: 1607-1621.
129. Loftsson T., Brewster M.E., *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*, J Pharm Sci 1996, 85: 1017-1025.
130. French D., *The Schardinger dextrans*, Adv Carbohydr Chem 1957, 12: 189-260.
131. French D., Pulley A.O., Effenberger J.A., Rougvie M.A., Abdullah M., *Studies on the Schardinger dextrans. XII. The molecular size and structure of the delta-, epsilon-, zeta-, and eta-dextrans*, Arch Biochem Biophys 1965, 111: 153-160.
132. Hirose T., Yamamoto Y., *Hinokitol containing cyclo-olefin polymer composition and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties*, Japanese Patent JP 2001, 55480.

133. Martin Del Valle M.E., *Cyclodextrins and their uses: a review*, *Process Biochem* 2004, 39: 1033-1046.
134. Frank D.W., Gray J.E., Weaver R.N., *Cyclodextrin nephrosis in the rat*, *Am J Pathol* 1976, 83: 367-382.
135. Stella V.J., Rajewski R.A., *Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery*, *Pharm Res* 1997, 14: 556-567.
136. Uekama K., *Novel approach of cyclodextrin-based pharmaceutical formulation*, *Yakugaku Zasshi* 2012, 132: 85-105.
137. Matsuda H., Arima H., *Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery*, *Adv Drug Deliv Rev* 1999, 36: 81-99.
138. Muñoz-Botella S.; Del Castillo B., Martín M.A., *Cyclodextrins: properties and applications of inclusion complex formation*, *Ars Pharm* 1995, 36: 187-198.
139. Frömming K.H., Szejtli J., *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht 1994.
140. Schneiderman E., Stalcup A.M., *Cyclodextrins: a versatile tool in separation science*, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, 745: 83-102.
141. Stella V.J., Rao V.M., Zannou E.A., Zia V., *Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes*, *Adv Drug Deliv Rev* 1999, 36: 3-16.
142. Viernstein H., Köhler G., Wolschann P., *Influence of the ring shape of different cyclodextrins on complexation properties*, *J Incl Phenom Macro* 1996, 25: 129-132.
143. Rajewski R.A., Stella V.J., *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery*, *J Pharm Sci* 1996, 85: 1142-1169.
144. Szejtli J., *Medicinal applications of cyclodextrins*, *Med Res Rev* 1994, 14: 353-386.
145. Szejtli J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*, *Chem Rev* 1998, 98: 1743-1754.
146. Szejtli J., Osa T., *Comprehensive Supramolecular Chemistry: Cyclodextrins vol 3.*, Pergamon 1996.
147. Gabelica V., Galic N., De Pauw E., *On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry*, *J Am Soc Mass Spectrom* 2002, 13: 946-953.
148. Loftsson T., Másson M., Brewster M.E., *Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*, *J Pharm Sci* 2004, 93: 1091-1099.
149. Loftsson T., Magnúsdóttir A., Másson M., Sigurjónsdóttir J.F., *Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs*, *J Pharm Sci* 2002, 91: 2307-2316.
150. Loftsson T., Ólafsdóttira B.J., Friðriksdóttira H., Jónsdóttir S., *Cyclodextrin complexation of NSAIDS's: physicochemical characteristics*, *Eur J Pharm Sci* 1993, 1: 95-101.

151. Pitha J., Hoshino T., *Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange*, Int J Pharm 1992, 80: 243-251.
152. Prasad D., Strauss D., Reichart G., *Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals*, European Patent 1, 1999, 084, 065.
153. Woo R., Trinh T., Cobb S.D., Schneiderman E., Wolff M.A., Rosenbalm L.E., Ward E.T., Chung H.A., Reece S., *Uncomplexed cyclodextrins composition for odour control*, US Patent 5, 1999, 942, 217.
154. Loftsson T., Leeves N., Bjornsdottir B., Duffy L., Masson M., *Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo*, J Pharm Sci 1999, 88(12): 1254-1258.
155. Szejtli J., *The Cyclodextrins and Their Application in Environmental Biotechnology*, Stud Environ Sci 1991, 42: 387-397.
156. Wu C., Fan J., *Applications of cyclodextrins to water treatment*, Shuichuli Jishu 1998, 24: 67-70.
157. Hajdu C., Gruiz K., Fenyvesi E., Magdolna Nagy Z., *Application of cyclodextrins in environmental bioassays for soil*, J Incl Phenom Macrocycl Chem 2011, 70: 307-313.
158. Irie T., Uekama K., *Cyclodextrins in peptide and protein delivery*, Adv Drug Deliv Rev 1999, 36(1): 101-123.
159. Redenti E., Pietra C., Gerloczy A., Szenté L., *Cyclodextrins in oligonucleotide delivery*, Adv Drug Deliv Rev 2001, 53(2): 235-244.
160. Leung D.K., Yang Z., Breslow R., *Selective disruption of protein aggregation by cyclodextrin dimers*, Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97(10): 5050-5053
161. Rozema D., Gellman S.H., *Artificial chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B*, J Biol Chem 1996, 271(7): 3478-3487.
162. Graham D.R., Chertova E., Hilburn J.M., Arthur L.O., Hildreth J.E., *Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts*, J Virol 2003, 77(15): 8237-8248.
163. Daoud-Mahammed S., Couvreur P., Amiel C., Besnard M., Appel M., Gref R., *Original tamoxifen-loaded gels containing cyclodextrins: in situ self-assembling systems for cancer treatment*, J Drug Del Sci Tech 2004, 14: 51-55.
164. Cheng J., Khin K.T., Davis M.E., *Antitumor activity of beta-cyclodextrin polymer-camptothecin conjugates*, Mol Pharm 2004, 1(3): 183-193.
165. Pun S.H., Bellocq N.C., Liu A., Jensen G., Machemer T., Quijano E., Schlupe T., Wen S., Engler H., Heidel J., Davis M.E., *Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery*, Bioconjug Chem 2004, 15(4): 831-840.

166. Davis M.E., Pun S.H., Bellocq N.C., Reineke T.M., Popielarski S.R., Mishra S., Heidel J.D., *Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers*, *Curr Med Chem* 2004, 11(2): 179-197.
167. Kramer K.A., Liebler D.C., *UVB induced photooxidation of vitamin E*, *Chem Res Toxicol* 1997, 10(2): 219-224.
168. Iaconinoto A., Chicca M., Pinamonti S., Casolari A., Bianchi A., Scalia S., *Influence of cyclodextrin complexation on the photodegradation and antioxidant activity of α -tocopherol*, *Pharmazie* 2004, 59: 30-33.
169. Almeida M.M., Alves J.M., Patto D.C., Lima C.R., Quenca-Guillen J.S., Santoro M.I., Kedor-Hackmann E.R., *Determination of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in cosmetic formulations by HPLC*, *Int J Cosmet Sci* 2009, 31(6): 445-450.
170. Yuan Ch., Jin Z., Xu X., Zhuang H., Shen W., *Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, *Food Chemistry* 2008, 109: 264-268.
171. Echezarreta-López M., Torres-Labandeira J.J., Castiñeiras-Seijo L., Santana-Penín L., Vila-Jato J.L., *Complexation of the interferon inducer, bropirimine, with hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, *Eur J Pharm Sci* 2000, 9(4): 381-386.
172. Wang G., Xue X., Lib H., Wua F., Deng N., *β -Cyclodextrin-enhanced photodegradation of bis(4-hydroxyphenyl)ethane under UV irradiation*, *J Mol Catal A: Chem* 2007, 276: 143-149.
173. Koizumi K., Okada Y., Kubota Y., Utamura T., *Inclusion complexes of poorly water-soluble drugs with glucosyl-cyclodextrins*, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1987, 35(8): 3413-3418.
174. Cho H.S., Kim Y.S., Lee I.S., Lee M.Y., *Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes for transdermal delivery: preparation, inclusion properties, stability and release behavior*, *J Ind Eng Chem* 2006, 12(1): 50-59 .
175. Gierlach-Hładoń T., Lange K., *High-performance liquid chromatographic determination of α -tocopherol in inclusion complexes with cyclodextrins*, *Acta Pol Pharm – Drug Research* 2012, 69(4): 591-595.
176. Veiga I.F., Teixeira-Dias J.J.C., Kędzierewicz F., Sousa A., Maincent P., *Inclusion complexation of tolbutamide with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, *I J Pharm* 1996, 129: 63-71
177. Perri E., Mazzotti F., Raffaelli A., Sindona G., *High-throughput screening of tocopherols in natural extracts*, *J. Mass Spectrom* 2000, 35: 1360-1361.
178. Lanina A.S., Toledo P., Sampels S., Kamal-Eldin A., Jastrebova A.J., *Comparison of reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols*, *J Chromatogr A* 2007, 1157: 159-170.

179. Al-Malaika S., Issenhuth S., *The antioxidant role of vitamin E in polymers. IV. Reaction products of DL- α -tocopherol with lead dioxide and with polyolefins*, Polymer 2001, 42: 2915-2939.
180. Krol S.E., Escalante D.J.D., Liebler C.D., *Mechanism of dimer and trimer formation from ultraviolet-irradiated α -tocopherol*, Lipids 2001, 36: 49-55.
181. Suarna C., Baca M., Southwell-Keely P.T., *Oxidation of the α -tocopherol model compound 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol in the presence of alcohols*, Lipids 1992, 27: 447-453.
182. Neely W.C., Martin J.M., Barker S.A., *Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen*, Photochem Photobiol 1988, 48: 423-428.