

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Andrea Pleić
Sara Vranko

**TABLETE POBOLJŠANIH SVOJSTAVA ZA LIJEČENJE LEUKEMIJE
– ZELENA PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA**

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Krunoslava Žižeka te neposrednim voditeljstvom Katarine Sokač, mag. ing. cheming. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

POPIS SIMBOLA I AKRONIMA

Simboli korišteni u radu:

A	- apsorbancija (-)
c	- množinska koncentracija (mM)
d	- udaljenost između ravnina rešetke u kristalu (nm)
h_f	- specifična entalpija taljenja ($J\ g^{-1}$)
K_H	- konstanta brzine oslobađanja u Higuchi modelu ($\% \min^{-0,5}$)
K_{KP}	- konstanta brzine oslobađanja u Korsmeyer-Peppas modelu ($\% \min^{-n}$)
K_0	- konstanta prividne brzine oslobađanja u modelu nultog reda ($\% \min^{-1}$)
K_1	- konstanta brzine oslobađanja u modelu prvog reda ($\% \min^{-1}$) - konstanta brzine oslobađanja u Peppas-Sahlin modelu, Fickov difuzijski doprinos ($\% \min^{-m}$)
K_2	- konstanta brzine oslobađanja u Peppas-Sahlin modelu, doprinos erozije ($\% \min^{-2}$)
m	- masa tablete (mg) - parametar Peppas-Sahlin modela (-)
n	- eksponent oslobađanja u Korsmeyer-Peppas modelu (-) - pozitivan cijeli broj u jednačbi Braggovog zakona (-)
R_p^2	- prilagođena vrijednost srednjeg kvadratnog odstupanja kod matematičkih modela (-)
s	- standardna devijacija s centrom tendencije na aritmetičkoj srednjoj vrijednosti mase (mg)
T	- temperatura ($^{\circ}C$)
t	- vrijeme oslobađanja djelatne tvari (min)

Grčki simboli:

α	- parametar skale koji opisuje vremensku ovisnost; parametar Weibull modela (-)
β	- oblik krivulje topljivosti; parametar Weibull modela (-)
θ	- Braggov kut ($^{\circ}$)
2θ	- kut raspršenja ($^{\circ}$)
λ	- valna duljina zračenja (nm)

Akronimi korišteni u radu:

<i>ALL</i>	- <i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i> , akutna limfoblastična leukemija
<i>BCS</i>	- <i>Biopharmaceutical Classification System</i> , Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari
<i>CML</i>	- <i>Chronic Myelogenous Leukemia</i> , kronična mijeloična leukemija
<i>DAS</i>	- dasatinib
<i>DSC</i>	- <i>Differential Scanning Calorimetry</i> , diferencijalna pretražna kalorimetrija
<i>FDA</i>	- <i>Food and Drug Administration</i> , američka regulatorna agencija za hranu i lijekove
<i>FTIR</i>	- <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> , infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama
HP- β -CD	- hidroksipropil- β -ciklodekstrin
<i>NMR</i>	- <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , nuklearna magnetska rezonancija
PEG	- poli(etilen-glikol)
PTFE	– poli(tetrafluoretilen)
<i>RDC</i>	- <i>Relative Degree of Crystallinity</i> , relativni stupanj kristalnosti (-)
TMS	- tetrametilsilan
<i>XRPD</i>	- <i>X-ray Powder Diffraction</i> , rendgenska difrakcijska analiza praha

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	3
3. OPĆI DIO	4
3.1. Izazovi u farmaceutskoj industriji	4
3.2. Zelena rješenja	6
3.3. Inkluzijski kompleksi	9
3.4. Ciklodekstrini	10
4. METODIKA	12
4.1. Materijali	12
4.1.1. Djelatna tvar – aktivni sastojak lijeka	12
4.1.2. Makrociklički receptor – hidroksipropil- β -ciklodekstrin	13
4.1.3. Pomoćne tvari	14
4.2. Metodologija istraživanja	15
4.3. Mehanokemijska priprava	18
4.4. Metode karakterizacije mehanokemijski pripremljenih uzoraka	19
4.4.1. Toplinske metode analize	19
4.4.1.1 Diferencijalna pretražna kalorimetrija – DSC analiza	19
4.4.2. Difrakcijske metode analize	21
4.4.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza praha – XRPD analiza	21
4.4.3. Spektroskopske metode analize	24
4.4.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama – FTIR analiza	24
4.4.3.2. Nuklearna magnetska rezonancija	25
4.5. <i>In-situ</i> granuliranje taljenjem u fluidiziranom sloju	27
4.6. Tabletiranje	30
4.7. Metode karakterizacije tableta	32
4.7.1. Ispitivanje ujednačenosti masa tableta	32
4.7.2. Ispitivanje sadržaja djelatne tvari u tabletama	32
4.7.3. Ispitivanje oslobađanja dasatiniba iz tableta – <i>in vitro</i> testovi otapanja	33
4.7.4. Matematički opis oslobađanja dasatiniba iz tableta	35
5. REZULTATI I RASPRAVA	38
5.1. Rezultati karakterizacije inkluzijskih kompleksa	38
5.1.1. Podatci DSC analize	38
5.1.2. Podatci XRPD analize	41
5.1.3. Podatci FTIR analize	42

5.1.4.	Podatci NMR analize	43
5.2.	Karakterizacija pripremljenih tableta	48
5.2.1.	Podatci ispitivanja ujednačenosti masa tableta	48
5.2.2.	Podatci ispitivanja sadržaja dasatiniba u tabletama	49
5.2.3.	Podatci ispitivanja oslobađanja dasatiniba	51
5.2.4.	Podatci matematičkog opisa oslobađanja djelatne tvari.....	52
6.	ZAKLJUČAK	56
7.	ZAHVALE.....	57
8.	LITERATURA	58
	SAŽETAK.....	65
	ABSTRACT	66

1. UVOD

Leukemija je zloćudna bolest krvotvornih organa. Prema brzini razvoja simptoma i napredovanju bolesti, dijele se na akutne i kronične, a prema zahvaćenoj krvnoj lozi na limfocitne (limfoblastične) i mijeloične leukemije. Kronična mijeloična leukemija (engl. *Chronic Myelogenous Leukemi, CML*) (također se naziva granulocitna kronična leukemija) je bolest kod koje se u koštanoj srži stvara preveliki broj bijelih krvnih stanica. Kod većine oboljelih od kronične mijeloične leukemije postoji genetički poremećaj kromosoma, tzv. Philadelphia kromosom, koji obično ne nestaje, čak ni nakon terapije. Ako se ne liječi, ova bolest je smrtonosna. Prosječno vrijeme preživljenja je 3 do 4 godine. Kod akutne limfoblastične leukemije (ALL), limfociti u razvoju ne sazrijevaju i postaju prekobrojni. Stanice se množe brzo i zamjenjuju normalne stanice. Do propadanja koštane srži dolazi kad maligne stanice zamjene normalne elemente koštane srži. Liječenje varira ovisno o vrsti leukemije, stadiju bolesti, dobi bolesnika i općem zdravstvenom stanju. Neke od glavnih metoda liječenja su kemoterapija, radioterapija, imunoterapija, transplatacija matičnih stanica, kortikosteroidi, potporno liječenje te ciljana terapija koja za ciljanje specifičnih abnormalnih proteina koristi lijekove imatinib, nilotinib i dasatinib.^{1,2}

Dasatinib (DAS) je inhibitor tirozin kinaze koji se koristi u liječenju kronične mijeloične leukemije i akutne limfoblastične leukemije.³ Prvi odobreni inhibitor tirozin kinaze za kliničku uporabu bio je imatinib, no zbog pacijenata koji su razvili otpornost na imatinib koja može biti urođena ili stečena, uočena je potreba za sintezom novog lijeka. Kako bolest napreduje, otpornost na imatinib postaje sve češća, zahvaćajući oko 40-66 % bolesnika s uznapredovalom fazom CML-a i 38 % bolesnika s kroničnom fazom CML-a.⁴ DAS se komercijalno isporučuje kao Sprycel®-filmom obložene tablete koje proizvodi Bristol Myers Squibb i dostupne su u različitim dozama. Pripada II. skupini Biofarmaceutskog klasifikacijskog sustava (engl. *Biopharmaceutical Classification System, BCS*) što znači da se usprkos njegovoj dobroj farmakološkoj aktivnosti suočava s problemom niske topljivosti u vodi, što ograničava njegovu bioraspoloživost koja iznosi 14-34 %. Niskoj bioraspoloživosti doprinosi i izraženi efekt prvog prolaza DAS-a (*first pass metabolism*) zbog kojeg na mjesto djelovanja dolazi znatno manja koncentracija lijeka.³ Povećanje topljivosti DAS-a može značajno poboljšati njegov farmakoterapijski učinak te kliničke rezultate. Mehanokemijska sinteza inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima predstavlja obećavajuću strategiju za poboljšanje topljivosti slabo topljivih lijekova. Biorazgradivi i biokompatibilni ciklodekstrini, zbog svoje jedinstvene strukturne

sposobnosti da formiraju inkluzijske komplekse, mogu značajno povećati topljivost hidrofobnih lijekova kao što je DAS.^{3,4,5}

Stoga, u ovom istraživanju nastoje se pripremiti inkluzijski kompleksi ove specifične djelatne tvari (dasatiniba, DAS) s makrocikličkim receptorom (hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, HP- β -CD) i na taj način povećati topljivost djelatne tvari te postići ciljani profil oslobađanja DAS-a (produljeno oslobađanje). U pripravi inkluzijskih kompleksa koristit će se mehanokemijski postupak koji je ekološki prihvatljiviji i energetski učinkovitiji od tradicionalnih metoda pripreme.

Bit će provedena detaljna analiza mehanokemijski pripremljenih uzoraka. U karakterizaciji koristit će se metode analize koje mogu ukazati i objasniti pomak u topljivosti djelatne tvari, ali i dokazati nastajanje specifičnih *host-guest* interakcija pri inkluziji djelatne tvari u šupljinu makrocikličkog receptora.

U pripravi tableta koristit će se mehanokemijski pripremljeni uzorci djelatne tvari i granulat pomoćnih tvari. Dobivene tablete analizirat će se metodama karakterizacije koje ukazuju na mehanička svojstva tableta, ali i profil i kinetiku oslobađanja djelatne tvari. Očekuju se tablete s povećanom topljivosti DAS-a i dodatno modificiranog profila oslobađanja koja doprinosi boljoj apsorpciji u organizmu i na taj način povećava bioraspoloživost. Dodatno, testirat će se primjenjivost postojećih matematičkih modela u opisu profila oslobađanja djelatne tvari (DAS) iz pripremljenih tableta. Izvrsna primjenjivost poluempirijskih i mehanističkih modela u opisu oslobađanja djelatne tvari može ukazati na mehanizam oslobađanja dasatiniba iz inkludiranog kompleksa i matrice lijeka što može biti dodatno i važno saznanje u ovom istraživanju.

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Pripravom inkluzijskih kompleksa pomoću makrocikličkih receptora moguće je povećati topljivost i postići ciljano oslobađanje specifične djelatne tvari dasatiniba te potencijalno doprinijeti njenoj boljoj apsorpciji u organizmu.

Zeleni postupci pripreme mogu značajno doprinijeti dostavi lijeka i osigurati željeno/ciljano oslobađanje djelatne tvari iz konačnog dozirnog oblika.

OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Mehanokemijski pripremiti inkluzijske komplekse specifične djelatne tvari pomoću makrocikličkih receptora.

Primjenom principa zelene kemije te načela supramolekulske kemije pripremiti tablete poboljšanih primjenskih svojstava i ciljanog profila oslobađanja djelatne tvari.

3. OPĆI DIO

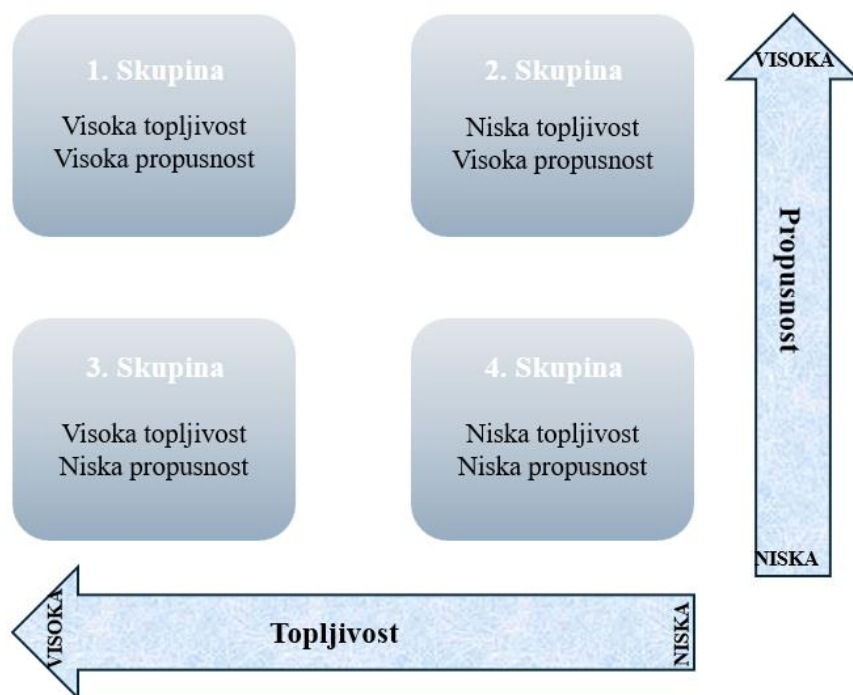
3.1. Izazovi u farmaceutskoj industriji

Slaba topljivost djelatnih tvari u vodi glavni je ograničavajući faktor za uspješno plasiranje mnogih novih lijekova na tržište, unatoč njihovoj potencijalnoj farmakološkoj aktivnosti.⁶ Oralna primjena je najprikladnije i najčešće korišteni put isporuke lijeka zbog jednostavnosti primjene, isplativosti, najmanje ograničenja u sterilnosti i fleksibilnosti u dizajnu dozirnog oblika. Naime, glavni izazov s dizajnom oralnog dozirnog oblika leži u njihovoj slaboј bioraspoloživosti. Bioraspoloživost se odnosi na mjeru u kojoj tvar ili lijek postaje potpuno dostupan svom biološkom odredištu, odnosno mjestu djelovanja. Preciznije, bioraspoloživost je mjera brzine i udjela početne doze lijeka koja uspješno doseže mjesto djelovanja. U većini slučajeva, bioraspoloživost se definira kao udio aktivnog oblika lijeka koji dospijeva u sistemsku cirkulaciju nepromijenjen. Oralna bioraspoloživost ovisi o nekoliko čimbenika uključujući topljivost u vodi, intestinalnu propusnost lijeka, brzinu otapanja, metabolizam prvog prolaska, presistemički metabolizam i osjetljivost na mehanizme efluksa. Najčešći uzroci niske oralne bioraspoloživosti pripisuju se slaboј topljivosti u vodenom mediju i niskoj intestinalnoj propusnosti.

Drugi važan parametar, propusnost lijeka, opisuje se kao sposobnost transporta molekule lijeka kroz biološku membranu. Prema BCS-u, ljeikovita tvar naziva se visoko propusnom kada se više od 90 % primijenjene doze apsorbira u ljudskom tijelu. Molekule lijeka prolaze kroz biološke membrane bilo pasivnom difuzijom ili transportom posredovanim nosačem. Fenomen prvog prolaska lijeka odnosi se na metabolizam kojem lijek podliježe pri oralnoj primjeni. Nakon oralnog unosa, lijek prije dospijevanja u krvotok podliježe metaboličkim procesima razgradnje pomoću enzima u jetri što može rezultirati njegovom inaktivacijom ili smanjenim djelovanjem.^{7,8,9,10} Ako se lijek primjenjuje oralno u čvrstom dozirnog obliku, onda se obavezno prije apsorpcije mora otopiti u gastrointestinalnoj tekućini. U suprotnom lijek neće postići traženi terapijski učinak. Gotovo 70 % nadolazećih djelatnih tvari karakterizira niska topljivost u vodi. Topljivost definira bioraspoloživost i apsorpciju lijeka. Terapijska učinkovitost lijeka ovisi o njegovoj bioraspoloživosti i topljivosti.¹¹

BCS je znanstveni okvir za klasifikaciju ljeikovitih tvari u četiri kategorije na temelju njihove topljivosti u vodi i propusnosti kroz crijevnu membranu kako je vidljivo iz slike 1.¹² Prema BCS-u, lijek se smatra visoko topljivim kada je njegova najveća doza topljiva u manje od 50 ml vode s pH rasponom od 1 do 7,5.⁹

Za povećanje topljivosti slabo topljivih lijekova koriste se različite tehnike koje uključuju fizičke i kemijske modifikacije lijeka i druge metode poput smanjenja veličine čestica, kristalnog inženjerstva, stvaranja soli, priprave čvrstih disperzija, upotrebe površinski aktivnih tvari, kompleksiranja itd. Odabir metode ovisi o svojstvu lijeka, mjestu apsorpcije i karakteristikama dozirnog oblika.⁸



Slika 1. Podjela djelatnih tvari u oralnim dozirnim oblicima:
BCS klasifikacija djelatnih tvari temeljem njihovih svojstava topljivosti i propusnosti

U tablici 1 dane su neke od metoda kojima se mogu pripremiti lijekovi poboljšanih svojstava

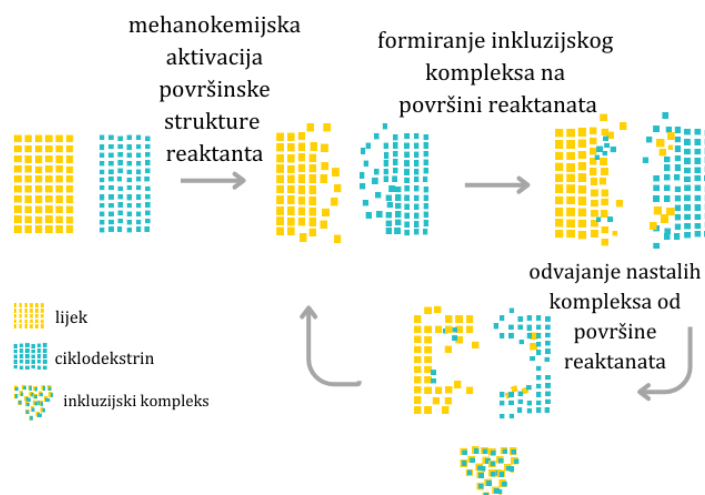
Tablica 1. Primjeri metoda za pripravu lijekova poboljšanih svojstava

Metoda	Način priprave	Referenca
Priprava čvrstih disperzija	Taljenje	13
	Elektroispredanje	14
	Isparavanje otapala	15
	Liofilizacija	16
	Mehanokemijska priprava	17
	Sušenje raspršivanjem	18
Redukcija veličine čestica	Pulsna laserska ablacija	19
	Tehnologija superkritičnih fluida	20
	Elektrosprejanje	21
	Mokro mljevenje	22
Inkluzijski kompleksi	Mehanokemijska priprava	23
	Liofilizacija	24,25,26
	Isparavanje otapala	26,27
Tvorba soli	Izmjena iona	28

3.2. Zelena rješenja

Zelene i održive tehnologije, njihova primjena u različitim granama industrije, razvoj novih, sigurnijih i energetski učinkovitijih procesa proizvodnje i primjene kemikalija privlače sve veću pozornost unutar znanstvene zajednice. Dospijevanje organskih otapala u okoliš donosi brojne negativne učinke na okoliš poput promjena klime na globalnoj razini, onečišćenja zraka, narušavanja ozonskog omotača, bolesti u ljudi i sl. Većina konvencionalnih organskih otapala posjeduje štetna toksična, zapaljiva i korozivna svojstva, a njihovo recikliranje i ponovna uporaba energetski je zahtjevan proces.²⁹ Unutar ovog rada zelene tehnologije usmjerene su na postupke koji zadovoljavaju postulat zelene kemije s naglaskom na važnost razvoja i pronalaska odgovarajuće zamjene za štetna organska otapala.

Mehanokemija se smatra alternativnim, atraktivnim, zelenijim pristupom za pripravu različitih molekularnih spojeva i postala je važan alat za sintezu i formulaciju u različitim poljima (fizika, kemija i znanost o materijalima). Može se provesti u uvjetima bez otapala ili u prisutnosti minimalnih količina otapala i stoga je ekološki prihvatljivija od konvencionalnih metoda. Takvim načinom pripreme potencijalno može doći do kemijske promjene tvari koja je potaknuta mehaničkom energijom prilikom mljevenja ili drobljenja.³⁰ Na slici 2 prikazana je pojednostavljena shema mehanizma formiranja inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju. Pretpostavljeni mehanizam polazi od generalnog mehanizma mehanokemijskih reakcija koji se odvija u nekoliko koraka. Kada se mješavina reaktanata podvrgne mljevenju, prima puls mehaničke energije. Ako je takav utjecaj dovoljnog intenziteta, rezultira lokalnom akumulacijom energije te se formira struktura veće slobodne energije. Glavni dio dovedene energije oslobađa se pretvorbom u toplinu, što olakšava interakcije u čvrstom stanju. Nadalje, naprezanja u određenim kristalnim zonama uzrokuju razaranje kristala, čime se povećava ukupna specifična površina tvari i otvara se prostor dostupan za interakcije u čvrstom stanju. Opskrba energijom dovodi do amorfizacije kristalnih materijala prisutnih u tretiranoj smjesi, a proces obično počinje na tankom površinskom sloju koji se širi prema unutrašnjosti. Ovaj proces može uključivati nekoliko međufaza, poput stvaranja čvrste disperzije, koja postupno može prijeći u pravi inkluzijski kompleks u krutini.³¹



Slika 2. Shematski prikaz mehanizma nastajanja inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju

Mehanokemijske reakcije obično se odvijaju u čvrstom stanju, a inducirane su mehaničkom energijom koja potiče reakciju sinteze između dva neaktivna reaktanta bez korištenja otapala. Ručno mljevenje korištenjem tarionika s tučkom, mehaničko mljevenje korištenjem planetarnih kugličnih, oscilirajućih ili vibracijskih mlinova, najčešći su procesi pogodni za induciranje mehanokemijske transformacije. Mehanokemijski procesi koriste se u razvoju farmaceutski važnih polimorfa, kokristala, polimernih disperzija i inkluzijskih kompleksa.³¹ U tablici 2 dani su primjeri uspješne mehanokemijske pripreve uzoraka.

Tablica 2. Prikaz istraživanja s mehanokemijskim postupcima pripreve u formulaciji lijekova i preparata

Uzorak	Makrociklički receptor i omjer	Poboljšano svojstvo	Metoda pripreve i procesni uvjeti	Literaturni navod
1,2,4-tiadiazol - potencijalni lijek za Alzheimerovu bolest	β -CD HP- β -CD 1:1	inkluzijski kompleks poboljšane bioraspoloživosti	planetarni kuglični mlin, ahatna posuda s kuglicama promjera 5 mm, 60 min, 600 min ⁻¹ , s pauzama kako bi se spriječilo pregrijavanje uzorka	32
indometacin kokristali nikotinamida	β -CD HP- β -CD 1:1	amorfni sustav poboljšanog profila oslobađanja djelatne tvari	visokoenergetski vibracijski mlin, 15 min	33
bisakodil - lijek za liječenje konstipacije	β -CD 1:1	amorfni proizvod s većom topljivošću	planetarni kuglični mlin, ahatna posuda s kuglicama različitih dimenzija, 5 h, 400 min ⁻¹ s pauzama kako bi se spriječilo pregrijavanje uzorka	34
rutin - prirodni antioksidans	β -CD HP- β -CD 1:1	inkluzijski kompleks poboljšanih svojstava	tarionik od ahata i tučak, 30 min	35
astaksantin - biljni dodatak prehrani	HP- β -CD 1:30	inkluzijski kompleks pojačanog antioksidativnog djelovanja	kuglični mlin s valjcima, čelična posuda s kuglicama dimenzija 15 mm, 100 min ⁻¹ , 24 h	36
oktinoksat, avobenzon - kozmetički sastojci koji blokiraju UV zračenje	β -CD 1:1 1:2	inkluzijski kompleks poboljšane fotostabilnosti	vibracijski mlin, 60 min, 20 Hz, uz dodatak nekoliko kapljica vode	37
kurkumin - vitamin	β -CD 1:1 1:2	inkluzijski kompleks poboljšane topljivosti	planetarni kuglični mlin, 60 minuta, 200 min ⁻¹ , posuda od cirkonijevog oksida i čelična posuda s kuglicama	38
triamteren - diuretik	SBE- β -CD 1:1	inkluzijski kompleks poboljšane topljivosti	planetarni kuglični mlin, posuda od cirkonijevog dioksida sa 7 kuglica, 400 min ⁻¹ , 60 min	23

3.3. Inkluzijski kompleksi

Inkluzijski kompleks predstavlja kemijski kompleks u kojem se jedna kemijska komponenta, gost, nalazi unutar šupljine druge molekule, domaćina. Za formiranje kompleksa molekula domaćina mora posjedovati odgovarajuću veličinu šupljine koja će biti prikladna za smještanje molekule gosta. Formiranje i stabilnost kompleksa osim o veličini šupljine ovisi i o termodinamičkim interakcijama, odnosno jačini pokretačke sile procesa kompleksiranja. Prilikom formiranja kompleksa sa ciklodekstrinima ne stvaraju se kovalentne veze, već se molekule povezuju van der Waalsovima privlačnim silama ili drugim oblikom interakcije kao što su vodikove veze. Ukoliko je inkluzijski kompleks formiran unutar otapala, molekule koje formiraju kompleks u ravnoteži su sa slobodnim molekulama u mediju koji ih okružuje.³⁹

Formiranje inkluzijskih kompleksa s hidrofobnim spojevima odvija se uglavnom hidrofobnim interakcijama između stijenke šupljine ciklodekstrina i molekule gosta, a osim hidrofobnih, na vezanje utječu i van der Waalsove i dipol-dipol interakcije između molekula. Molekule ciklodekstrina su zbog svoje strukture i dobrih kemijskih i fizikalnih svojstava pogodne za formiranje inkluzijskih kompleksa. Postoji veliki izbor metoda za pripremu kompleksa s ciklodekstrinima.⁴⁰ Tehnike za pripremu inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima su sljedeće:

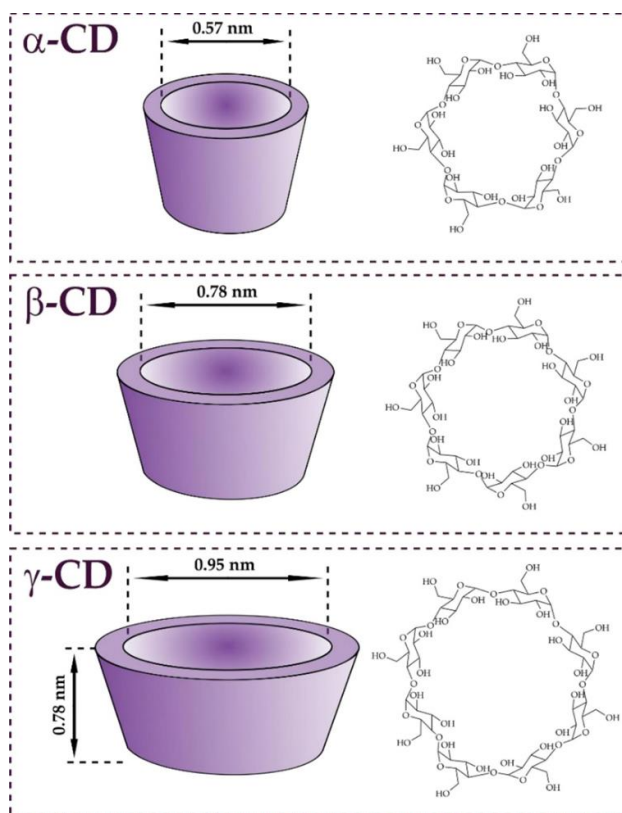
1. Lijek i ciklodekstrin otapaju se u vodi ili mješavini organskog otapala/vode, s pH i temperaturom prilagođenom za postizanje maksimalne interakcije između komponenti, produkt se izdvaja kristalizacijom ili odgovarajućom tehnikom sušenja pod smanjenim tlakom, sušenje raspršivanjem ili sušenje smrzavanjem. Drugi način pripreme kompleksa unutar otapala je korištenje tehnologije superkritičnog fluida koja zahtjeva dostupnost specifične i skupe opreme.
2. Metode u polučvrstom stanju, gdje se fizikalna smjesa lijeka i ciklodekstrina miješa s malim volumenom vode ili smjese etanol/voda kako bi se dobila homogena mješavina koja se zatim suši kako bi se potpuno uklonilo otapalo. Takva metoda često rezultira samo djelomičnim stvaranjem kompleksa lijek/ciklodekstrin.
3. Priprava kompleksa u čvrstom stanju, gdje se kompleksacija ciklodekstrina postiže mikrovalnim zračenjem ili blagim zagrijavanjem na temperaturama ispod točke taljenja spojeva u zatvorenoj posudi, eventualno uz prisustvo minimalne količine vode, prema tzv. “*sealed-heating*” metodi ili mehanokemijskom aktivacijom mljevenjem ili drobljenjem u različitim tipovima mlinova. Mehanokemijska priprava nudi prednosti jednostavnih, brzih, vrlo učinkovitih, ekonomičnih i ekološki poželjnih načina pripreme inkluzijskih kompleksa

lijek/ciklodekstrin u krutom stanju, općenito ne zahtijevajući upotrebu organskih otapala koja zahtijevaju dodatnu obradu i zbrinjavanje.³¹

3.4. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su netoksični, nereduktivni oligopolimeri glukoze konusnog oblika čija se molekula sastoji od vanjskog dijela koji je hidrofilan i unutrašnje šupljina hidrofobnog karaktera. Upravo zato što su ovi makrociklički receptori biorazgradivi i biokompatibilni mogu se opravdano koristiti u formulaciji lijekova i moguć je pripravi tableta poboljšanih primjenskih svojstava.

Ciklodekstrine možemo podijeliti na α , β i γ ciklodekstrine koji se međusobno razlikuju prema broju glukopiranoznih prstena koji su povezani α -1,4-glikozidnim vezama. Glukopiranozni prstenovi zauzimaju sedlastu konformaciju što molekuli omogućuje strukturno oblikovanje krnjeg stošca (slika 3) umjesto formiranja oblika ravnog simetričnog cilindra. Konformacija ima značajan utjecaj na povećanje stabilnosti molekule te se velike kisikove skupine (hidroksilna, glikozidna skupina) postavljaju u ekvatorijalnu ravninu. Formiranje oblika krnjeg stošca uzrokuje promjenu orijentacije slobodnih hidroksilnih skupina pri čemu se one usmjeravaju prema van što omogućava ciklodekstrinima stvaranje vodikovih veza s molekulama vode.^{3,41}



Slika 3. Strukture molekule ciklodekstrina⁴⁰

Ciklodekstrini se u farmaceutskoj industriji koriste za poboljšanje svojstava djelatne tvari formiranjem inkluzijskih kompleksa, čime se osigurava poboljšana topljivost tvari lipofilnog karaktera u vodi, a ciklodekstrini djeluju kao stabilizatori i poboljšavaju bioraspoloživost lijeka koji dopire u sistemsku cirkulaciju.

Veličina šupljine ciklodekstrina utječe na jačinu molekularnog vezanja i stvaranja kompleksa, β -ciklodekstrini stvaraju jače veze od α i γ ciklodekstrina, jer je šupljina α -ciklodekstrina premala, a γ -ciklodekstrina prevelika za smještanje molekule. β -ciklodekstrin se najviše koristi u industriji i istraživanjima upravo zbog prikladne veličine šupljine. Molekule ciklodekstrina stabilne su u alkalnom mediju (pK_a ciklodekstrina varira između 12,1-13,5). U uvjetima nižeg pH molekule su sklone hidrolizi koja rezultira otvaranjem prstena i uzrokuje formiranje linearnih oligosaharida koji gube mogućnost inkapsulacije.³

Svojstva nativnih ciklodekstrina poput povećanja topljivosti u vodi, povećanja kapaciteta uključivanja ili smanjenja toksičnosti mogu se poboljšati sintezom derivata. 80 % povećanja topljivosti dobiva se kada se hidroksilna skupina zamijeni 2-hidroksipropilnom skupinom, a pritom nastaje derivat ciklodekstrina HP- β -CD. Ciklodekstrini i njihovi derivati imaju važnu ulogu u tekstilnoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji, a izrazitu zanimljivost imaju u domeni farmakologije zbog svoje jedinstvene strukture, kemijskih i fizikalnih svojstava. Osim povećanja topljivosti u vodenom mediju, ciklodekstrini mogu utjecati i na ostala svojstva, npr. povećanje propusnosti lijeka kroz crijevnu membranu ili maskiranje neugodnih mirisa i okusa.^{36,37,38}

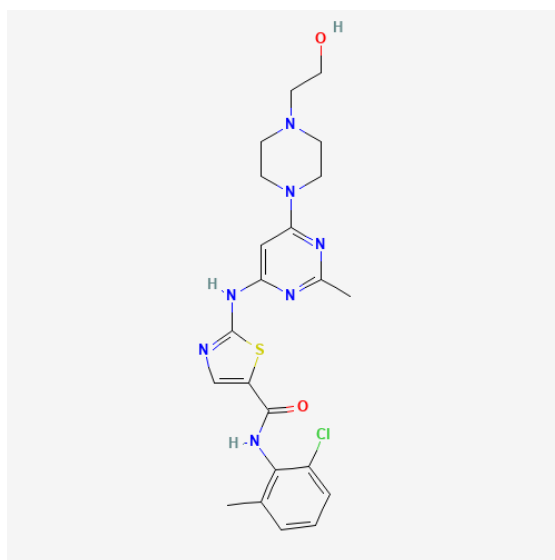
Ciklodekstrini također utječu na produljeno oslobađanje lijeka, koje se očituje njegovim produljenim djelovanjem, djeluju na povećanje mukoadhezivnih svojstava i stanični unos lijeka. Klinička ispitivanja pokazala su razne nove metode primjene ciklodekstrina kao što formiranje nanočestica na bazi ciklodekstrina koje zbog svojih svojstava služe za stabilizaciju proteinskih lijekova ili razvoj inovativnih sustava ubrizgavanja koja omogućuju parentalnu primjenu.⁴²

4. METODIKA

4.1. Materijali

4.1.1. Djelatna tvar – aktivni sastojak lijeka

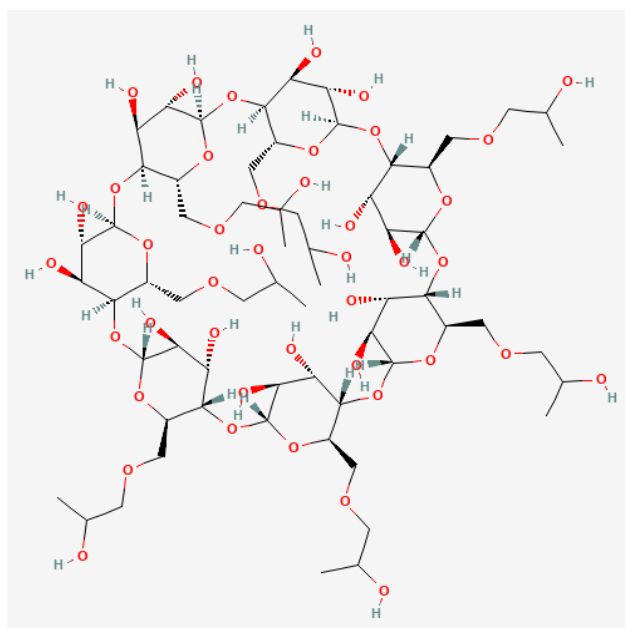
Dasatinib (DAS) čija je strukturna formula prikazana na slici 4, vrsta je oralnog inhibitora tirozin kinaze za liječenje kronične mijeloične leukemije i akutne limfoblastične leukemije s pozitivnim Philadelphia kromosomom. Na tržištu je dostupan za upotrebu u obliku filmom obloženih tableta i praška za oralnu suspenziju.⁴³ Pripada drugoj skupini BCS-a. Karakterizira ga niska topljivost u vodenom mediju i visoka propusnost kroz cijevnu membranu. Niska topljivost u vodenom mediju ima utjecaj na apsorpciju, stoga je lijek podložan visokom efektu prvog prolaska lijeka zbog čega primijenjena doza nije istovjetna dozi koja dopijeva u sistemsku cirkulaciju. Njegova topljivost usko je povezana s pH vrijednosti. Podatci raznih istraživanja pokazuju da DAS pokazuje veću topljivost pri pH nižem od 4. Njegova topljivost je $205 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri pH 4,28, dok je manja od $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri pH 6,99. Bioraspoloživost DAS-a iznosi samo 14-34 % u sisavaca zbog nepotpune apsorpcije i visokog učinka prvog prolaska uzrokovano slabom topljivošću u tankom crijevu.⁴⁴ Upravo niska topljivost koja uzrokuje slabu apsorpciju, a posljedično i bioraspoloživost motivacija su ovog istraživanja kojemu je cilj poboljšanje svojstava DAS-a kako bi njegov farmakološki učinak bio što bolji.⁴²



Slika 4. Strukturna formula DAS-a ⁴⁵

4.1.2. Makrociklički receptor – hidroksipropil- β -ciklodekstrin

Najvažniji ciklodekstrini, modificirani reakcijama kondenzacije, su 2-hidroksipropilirani ciklodekstrini. Među njima, 2-hidroksipropil- β -CD (HP- β -CD) čija je strukturna formula prikazana na slici 5 najviše je istražena varijanta zbog svoje visoke topivosti u vodi, niske toksičnosti i visokog profila kompleksiranja. Hidroksipropilirani ciklodekstrini se sintetiziraju reakcijom kondenzacije između izvornih ciklodekstrina i propilen oksida, a stupanj modifikacije može jednostavno prilagoditi omjerom reaktanata.⁴² Niska topljivost ciklodekstrina u vodi predstavlja veliki izazov kako za industrijsku tako i za farmaceutsku primjenu. Za prevladavanje ove prepreke, hidroksilne skupine ciklodekstrina (sekundarne i/ili primarne) mogu biti kemijski modificirane. Na taj način poboljšava se i topljivost organskih lijekova u ciklodekstrinima, čime se povećava njihova primjenjivost. Na primjer, topljivost ciklodekstrina u vodi raste na >1200 mg/mL (>80 puta) kada se 2-hidroksilna skupina zamijeni s 2-hidroksipropilnom i nastaje HP- β -CD.³



Slika 5. Strukturna formula HP- β -CD⁴⁶

4.1.3. Pomoćne tvari

Pomoćna tvar je sastojak lijeka koji se uz djelatnu tvar dodaje u formulaciju za određenu namjenu.⁴⁷ Pomoćne tvari omogućuju da se djelatna tvar primijeni u pravom obliku, a da same nisu aktivne.⁴⁸ U tablici 3 navedene su pomoćne tvari i pripadajući maseni udjeli korišteni prilikom provedbe istraživanja.

Manitol se osim drugih primjena koristi i kao punilo za pripravu čvrstih dozirnih oblika u farmaceutskoj industriji. Punila dodaju volumen formulaciji te utječu na mehanička svojstva koja povećavaju fluidnost i kompresibilnost. Navedeno olakšava proizvodnju te povećava robusnost i ujednačenost sadržaja konačne formulacije. Manitol ima povoljne fizikalno-kemijske karakteristike kao što su niska higroskopnost, inertnost u odnosu na djelatne tvari, nema poznatih štetnih učinaka kod ljudi, ali ima dobru kompatibilnost i sposobnost proizvodnje iznimno robusnih tableta.⁴⁹

Hidrofobnim djelatnim tvarima niske topljivosti u vodenom mediju je potrebno brzo raspadanje kako bi se pospješila topljivost. Naime, poznato je da hidrofobnost ima negativan učinak na raspadljivost zbog loših svojstava vlaženja. U tom slučaju djelatna tvar može ostati neotopljena, a time i potpuno nedostupna za apsorpciju dok se tableta ne raspadne.⁵⁰ Kao sredstvo za raspadanje korištena je natrijeva kroskarmeloza. Natrijeva kroskarmeloza je netopljivi, hidrofilni, iznimno upijajući materijal, koji rezultira izvanrednim svojstvima bubrenja, dok mu vlaknasta priroda daje iznimnu sposobnost upijanja vode. Natrijeva kroskarmeloza pospješuje topljivost i razgradnju, čime se povećava bioraspoloživost djelatnih tvari.⁵¹

Veziva imaju važnu ulogu u procesu tabletiranja lijekova. Koriste se za poboljšanje kohezije i plastičnosti praškaste smjese, čime se poboljšavaju mehanička svojstva tablete i smanjuje se rizik od loma tablete tijekom proizvodnje.⁵² Kao vezivo korišten je poli(etilen-glikol) 4000 (PEG).

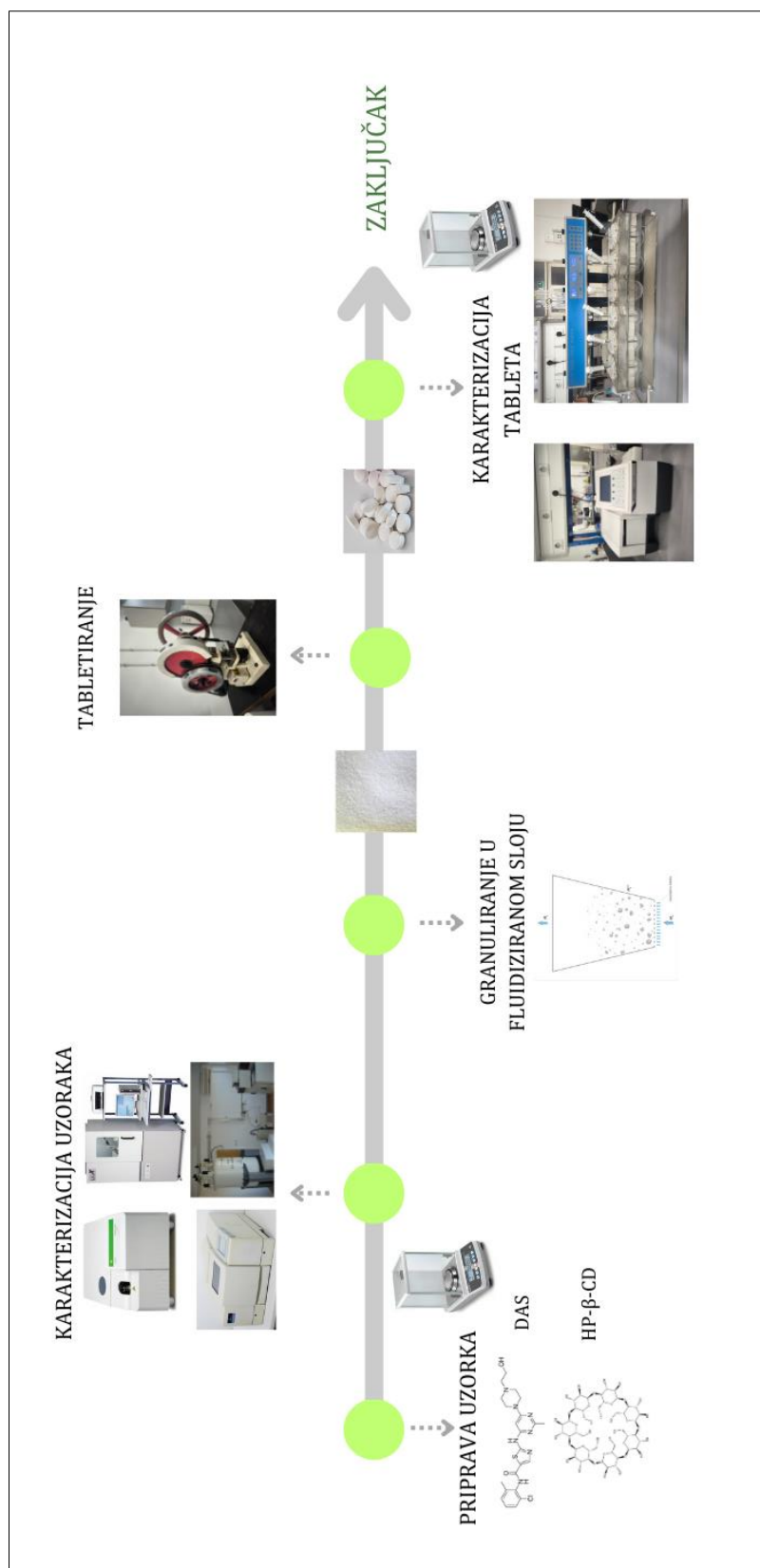
Naknadno, netom prije tabletiranja, u smjesu je dodan magnezijev staerat koji služi kao mazivo i dodaje se formulacijama tableta kako bi poboljšao protok prašaka tijekom proizvodnje tableta. Maziva smanjuju trenje te sprječavaju lijepljenje materijala tablete za površinu opreme i smanjuju habanje opreme za tabletiranje.⁵²

Tablica 3. Pomoćne tvari korištene u istraživanju s pripadajućim masenim udjelima

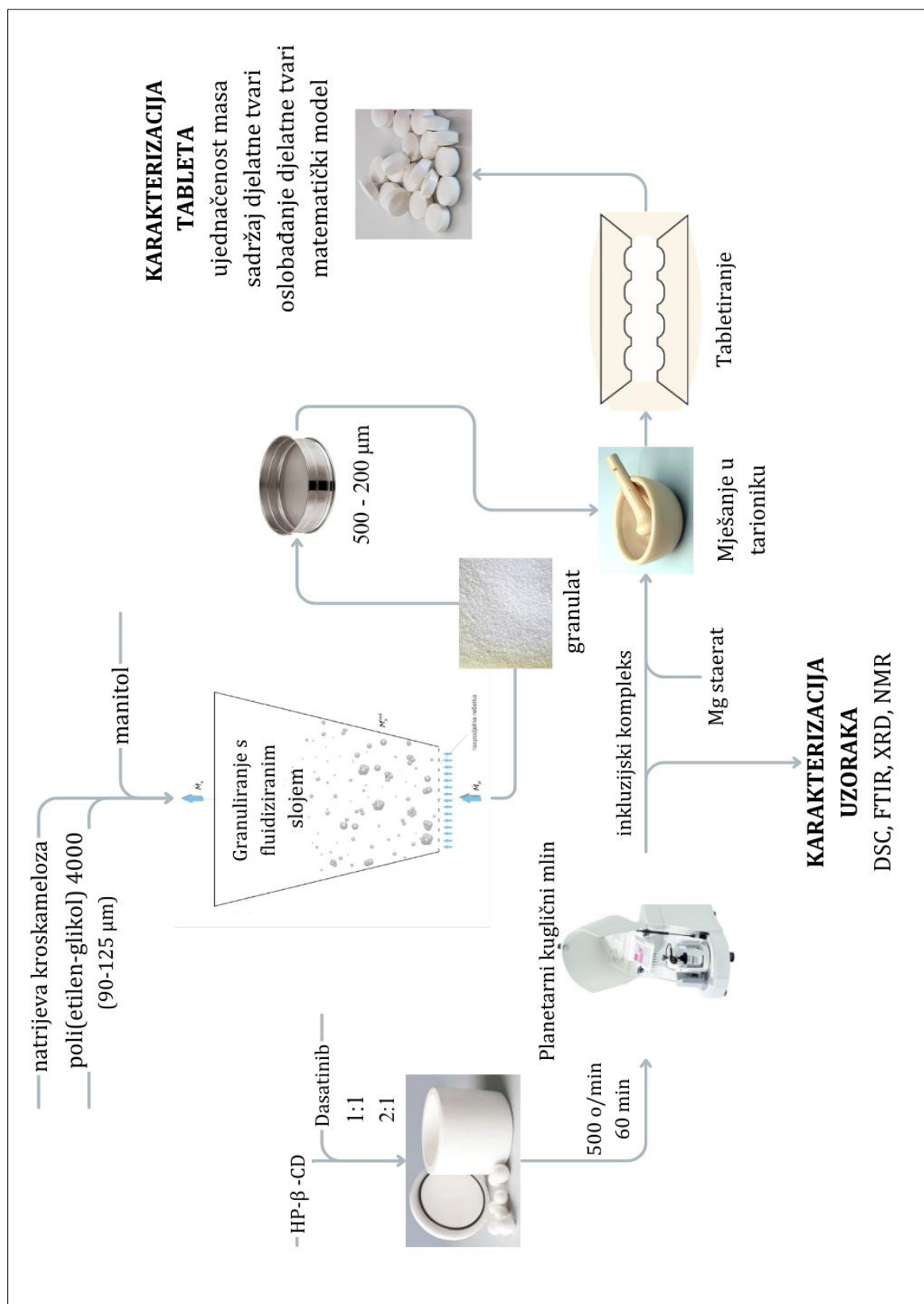
Grupa	Granuliranje	Tabletiranje	Dobavljač	Maseni udio, %
Mazivo sredstvo	-	Magnezijev staerat	Teva Pharmaceutical Industries (Zagreb, Hrvatska)	1
Punilo	Manitol	-	VWR Chemicals (Pennsylvania, SAD)	89
Vezivo	PEG 4000	-	VWR Chemicals (Pennsylvania, SAD)	5
Sredstvo za raspadanje	Natrijeva kroskarmeloza	-	Teva Pharmaceutical Industries (Zagreb, Hrvatska)	5

4.2. Metodologija istraživanja

Metodologija istraživanja prikazana je slikama 6 i 7. U prvoj fazi istraživanja pripremljeni su i karakterizirani inkluzijski kompleksi DAS i HP- β -CD. Druga faza podrazumijeva pripravu i karakterizaciju čvrstog oralnog dozirnog oblika, odnosno tableta s ugrađenim inkluzijskim kompleksima i granulatom pomoćnih tvari.



Slika 6. Shematski prikaz metodologije istraživanja^a



Slika 7. Shematski prikaz metodologije istraživanja^b

4.3. Mehanokemijska priprava

Za mehanokemijsku pripravu inkluzijskih kompleksa u ovom istraživanju korišten je planetarni kuglični mlin prikazan na slici 8. Planetarni mlin sastoji se od kružnog temelja koji pridržava posudu za mljevenje koja se okreće oko svoje glavne osi simetrije, putanjom ekscentrične kružnice. Zbog razlika u brzinama između kuglica i posude za mljevenje oslobađa se energija visokog intenziteta koja rezultira smanjenjem veličine čestica i mehanokemijsku aktivaciju uzorka. Zbog toga se dobiva visok i vrlo učinkovit stupanj mehanokemijske aktivacije tretiranog uzorka.³¹

Prilikom provedbe istraživanja u posudu za mlin od cirkonijeva dioksida stavljeno je približno 1 g smjese za pripravu inkluzijskih kompleksa u omjerima 1:1 i 1:2 djelatne tvari DAS-a i makrocikličkog receptora HP- β -CD. Deset kuglica cirkonijevog dioksida približno istih veličina također je dodano u posudu zajedno sa djelatnom tvari i makrocikličkim receptorom. Uzorci su stavljeni u mlin na mljevenje u trajanju od 60 minuta pri 500 okretaja u minuti.



Slika 8. Fotografija planetarnog kugličnog mlina Pulverisette 6 (FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, SR Njemačka)

U tablici 4 prikazane su izvagane mase komponenata potrebnih za pripravu približno 1 g smjese uzorka djelatne tvari DAS-a i HP- β -CD.

Tablica 4. Mase komponenata za pripravu uzoraka u kugličnom mlinu

Uzorak	m (DAS), mg	m (HP- β -CD), mg	m (ukupno), mg	m (kuglice), mg
1:1	540	510	1050	15280
1:2	340	670	1010	15390

4.4. Metode karakterizacije mehanokemijski pripremljenih uzoraka

4.4.1. Toplinske metode analize

Metode toplinske analize definiraju se kao skupina tehnika kojima se proučava odnos svojstava uzorka i njegove temperature dok se uzorak kontrolirano grije ili hladi. Koriste za proučavanje termičkih svojstava materijala i omogućuju analizu promjena fizikalnih i kemijskih svojstava materijala u funkciji temperature.⁵³

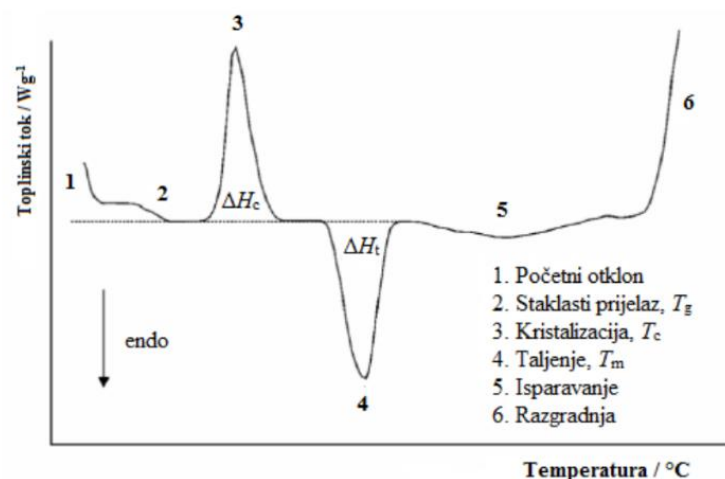
4.4.1.1 Diferencijalna pretražna kalorimetrija – DSC analiza

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) je metoda kojom se određuju toplinska svojstva testiranog uzorka, odnosno mjeri se toplina koja je oslobođena ili utrošena zbog promjene u strukturi materijala te temperatura pri kojoj je promjena nastala.⁵³

U ovom istraživanju ispitana su toplinska svojstva mehanokemijski pripremljenih uzoraka pomoću diferencijalnog pretražnog kalorimetra Mettler Toledo 823e na slici 9. Između 5 i 10 mg uzoraka DAS-a i HP- β -CD u omjerima 1:1 i 1:2 vagano je u aluminijske posudice s probušenim poklopcem. Mjerenja su provedena u struji dušika protoka $60 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, brzinom zagrijavanja uzorka od $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, a uzorci su podvrgnuti jednom ciklusu zagrijavanja u temperaturnom rasponu od $0 \text{ }^\circ\text{C}$ do $360 \text{ }^\circ\text{C}$. Rezultati mjerenja su DSC termogrami (slika 10) koji prikazuju ovisnost signala proporcionalnog razlici dovedene topline između ispitivanog i referentnog uzorka o temperaturi i vremenu.



Slika 9. Fotografija diferencijalnog pretražnog kalorimetra Mettler Toledo 822e (Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska)



Slika 10. Shematski prikaz općeg DSC termograma s pripadajućim toplinskim promjenama u uzorku

DSC analiza pruža kvalitativne i kvantitativne informacije o termalnim svojstvima čvrstih materijala kao što su temperatura taljenja i razgradnje, temperatura staklastog prijelaza, entalpija taljenja i kristalizacije, specifična i latentna toplina, polimorfizam i čistoća materijala. Mjeri se toplina koja je dovedena ili oslobođena u odnosu na referentni uzorak uz linearan porast temperature. Ispitivani i referentni uzorak u isto se vrijeme podvrgavaju ispitivanju pri kontroliranoj temperaturi, a mjeri se diferencijalna toplina potrebna za održavanje uzorka na istoj temperaturi. Primjerice, kako temperatura raste, materijal dobiva dovoljno energije i dolazi do preraspodjele mikrostrukture, a potom do kristalizacije. Povećavanjem temperature sustav dobiva dovoljnu količinu energije da razmak između molekula prekine potrebne međumolekularne interakcije za držanje molekula zajedno, sustav smanjuje svoju viskoznost i dolazi do taljenja. Dodatak daljnje energije na višim temperaturama dovodi do oksidativne razgradnje uzorka.⁵⁴

4.4.2. Difrakcijske metode analize

Difrakcijske metode analize su tehnike koje koriste fenomen difrakcije za proučavanje strukture materijala na atomskom ili molekularnom nivou. Difrakcija je proces promjene smjera širenja valova (poput svjetlosti, rendgenskih zraka, neutrona ili elektrona) kada naiđu na prepreke ili prolaze kroz otvore čije su dimenzije usporedive s valnom duljinom tih valova.

4.4.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza praha – XRPD analiza

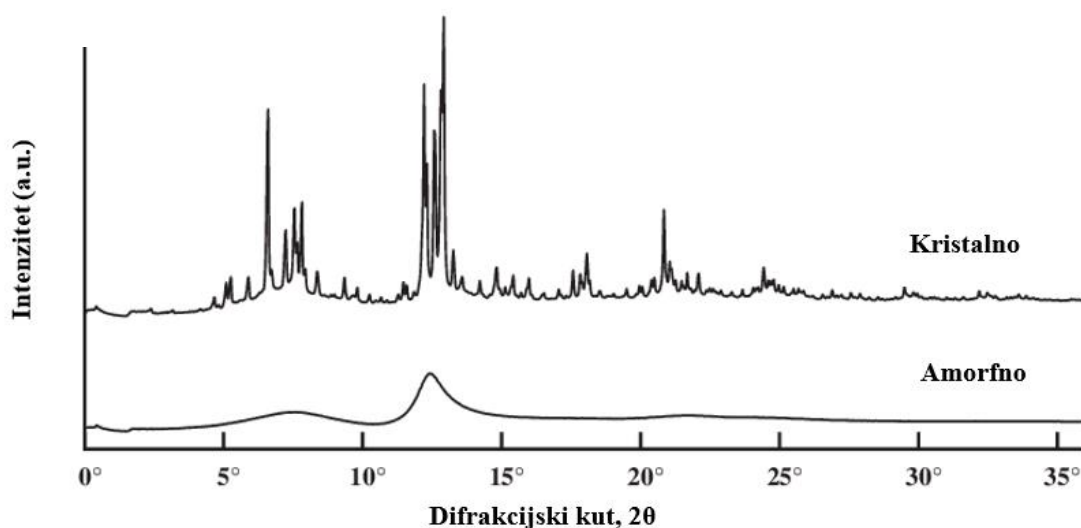
Rendgenska difrakcijska analiza praha (engl. *X-ray Powder Diffraction*, *XRPD*) pripremljenih uzoraka na slici 11 provedena je na uređaju Shimadzu XRD-6000 (slika 12). Osnovni dijelovi uređaja su visokonaponski generator, širokofokusna rendgenska cijev s Cu- K_{α} zračenjem i Ni filtrom, okomiti goniometar visoke preciznosti, grafitni monokromator, scintilacijski detektor te računalo sa sistemskim softverom. Rezultat analize su difraktogrami (slika 13) koji pokazuju difrakcijske maksimume karakteristične za kristalne oblike određene tvari koji nisu vidljivi u slučaju amorfne tvari.



Slika 11. Fotografija pripreme uzoraka za *XRPD* analizu



Slika 12. Fotografija uređaja za rendgensku difrakciju XRD 600 (Shimadzu, Kyoto, Japan)



Slika 13. Prikaz općeg XRPD difraktograma

XRPD je nedestruktivna analitička metoda koja daje informacije o mikrostrukturi i svojstvima uzorka, a zasniva se na mjerenju rendgenskih zraka raspršenih na uzorku prema funkciji kuta raspršenja.⁵⁵ Metoda se primjenjuje za identifikaciju faza, kvantitativnu analizu i određivanje nesavršenosti strukture u obliku praha.⁵⁶ Kada se kristalni uzorak ozrači rendgenskim zrakama, one se difraktiraju u određenim smjerovima na temelju rasporeda atoma unutar kristalne rešetke. Mjerenjem kutova i intenziteta tih difraktiranih zraka, moguće je izvesti zaključak o kristalnoj strukturi. Za razumijevanje fenomena difrakcije rendgenskih zraka na kristalnim čvrstim tijelima, osnovno je poznavanje kristalne strukture i Braggovog zakona:⁵⁷

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

gdje je n pozitivan cijeli broj, λ valna duljina upadnog rendgenskog zračenja, d je udaljenost između ravnina rešetke u kristalu, a θ je Braggov kut (koji je polovica kuta raspršenja 2θ).

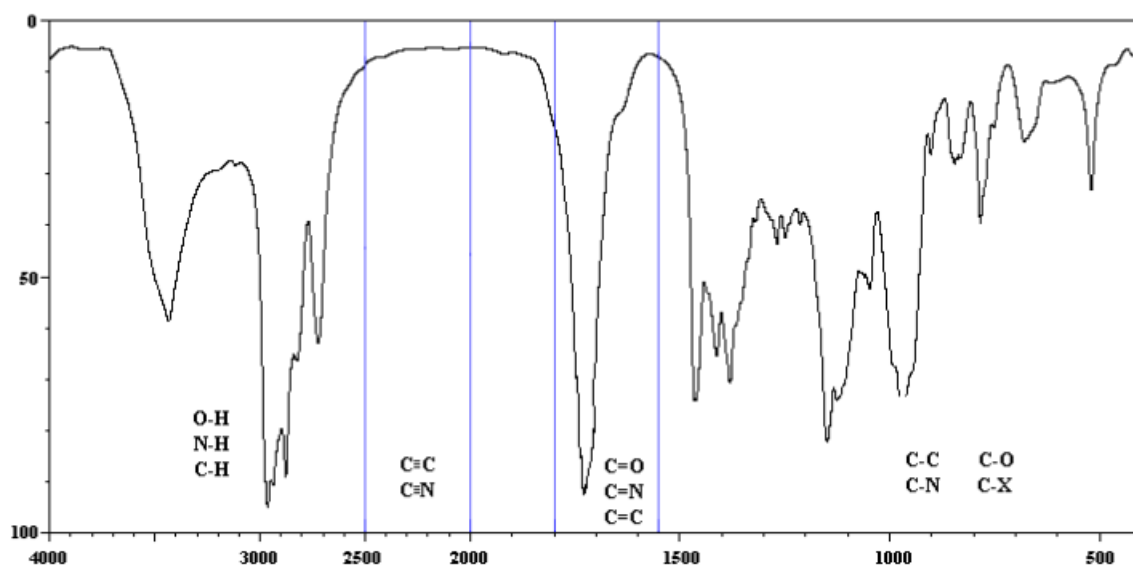
Rendgenske zrake su visokoenergetski elektromagnetski valovi valne duljine između 10^3 i 10^1 nm. Njihovo generiranje općenito se postiže uporabom zatvorenih cijevi, rotirajućih anoda ili izvora sinkrotronskog zračenja. Elektroni koji nastaju zagrijavanjem volframove niti u vakuumu se ubrzavaju, prolaze kroz polje visokog potencijala i zatim se usmjeravaju na metu koja zatim emitira rendgenske zrake. XRPD metode koriste samo karakteristično zračenje s najvećim intenzitetom, K_α zračenje, i pritom se nastoji ukloniti većinu preostalog zračenja korištenjem odgovarajućih filtera ili monokromatora. Goniometar je središnji dio difraktometara koji omogućuje pomicanje izvora rendgenskih zraka, uzorka ili detektora ovisno o njihovom položaju. Dvije glavne osnovne izvedbe goniometra su: θ/θ goniometri, gdje je uzorak fiksiran dok se izvor zraka i detektor pomiču i $\theta/2\theta$ goniometri u kojima je izvor zraka u fiksnom položaju dok se uzorak i detektor pomiču. Detektori se koriste za detekciju intenziteta difraktirane zrake, a njihov princip rada temelji se na pretvorbi sudara fotona rendgenskih zraka u drugi signal koji se može analizirati.⁵⁸

4.4.3. Spektroskopske metode analize

Spektrometrija ili spektroskopske metode (engl. *spectrometry*), analitičke su tehnike koje pružaju informacije o kemijskome sastavu i strukturi tvari na temelju odjeljivanja, otkrivanja i mjerenja energetske promjene u atomskim jezgrama, atomskom elektronskom omotaču ili u molekulama nakon njihove interakcije s česticama, toplinskom ili električnom energijom te elektromagnetskim zračenjem.⁵⁹

4.4.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama – FTIR analiza

Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) je instrumentalna metoda za detekciju, odnosno identifikaciju funkcionalnih skupina prisutnih u molekuli. Ova vrsta spektroskopije podrazumijeva područje spektra elektromagnetskog zračenja u rasponu od 2,5-15,0 mm. FTIR spektar predstavlja snimku apsorbiranog svjetla u funkciji valne duljine. Svjetlost se apsorbira samo ako se njezina frekvencija podudara s frekvencijom vibracija veze u molekuli. Dakle, frekvencije radijacije i vibracije moraju biti iste da dođe do apsorpcije. Na apsorpcijski položaj utječu sljedeći faktori: jačina veze koja se određuje iz energije disocijacije, masa atoma u vezi i vrsta vibracije. FTIR spektar (slika 14) prikazuje karakteristične vrpce funkcionalnih skupina u točno unaprijed definiranim područjima valnih brojeva, prilikom čega je na apscisi valni broj (cm^{-1}), a na ordinati apsorbanca (%).⁶⁰



Slika 14. Primjer FTIR spektra

U okviru ovog istraživanja, FTIR spektroskopija korištena je za analizu potencijalnog nastanka novih interakcija među molekulama, npr. vodikovih veza. U slučaju nastanka novih interakcija, doći će do pomaka apsorpcijskih vrpce specifičnih za funkcionalne skupine koje sudjeluju u toj interakciji. FTIR spektri čistih komponenti i uzoraka u omjerima DAS i HP- β -CD 1:1 i 1:2 snimljeni su ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spektrofotometrom opremljenim platinskim detektorom (Bruker, Billerica, SAD) (slika 15) u rasponu valnih brojeva od 500 do 4500 cm^{-1} uz spektralnu rezoluciju 2 cm^{-1} .



Slika 15. Fotografija FTIR spektrometra Vartex 70 s platinastim detektorom (Bruker, Billerica, SAD)

4.4.3.2. Nuklearna magnetska rezonancija

Metoda na kojoj se temelje današnji instrumenti za nuklearnu magnetsku rezonanciju (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) je metoda nuklearne indukcije, odnosno praćenja tzv. relaksacijskog efekta na osnovi emitirane energije. Za ovu metodu dovoljna je količina uzorka od nekoliko miligrama. Radi se o tzv. FT NMR metodi, pri kojoj se jezgra pobuđuje radiofrekventnim pulsiranjem, apsorbira frekvenciju te dolazi do rezonancije. Nakon toga jezgra se relaksira, odnosno vraća se u niži energetski nivo, a mjeri se upravo taj fenomen koristeći Fourierovu transformaciju kao matematičku podlogu. Pomoću Fourierove transformacije, signal se prevodi iz vremenske domene u frekvencijsku domenu. Radiofrekventni puls, koji obuhvaća širok spektar frekvencija, pobuđuje ne samo jednu jezgru već sve jezgre istovremeno koje rezoniraju u tom području. Određena rezonancija odgovara specifičnom energetskom nivou jezgre, a svaka jezgra, ovisno o svojoj kemijskoj okolini, ima različitu energiju rezonancije. Kao rezultat, pojavljuju se signali različitih frekvencija. ^1H i ^{13}C NMR spektri mjere se u otapalima bez vodika ili u otapalima gdje je vodik u obliku koji se ne registrira. Takva otapala su: CCl_4 , CDCl_3 , D_2O , C_6D_6 , DMSO-d_6 . Prilikom snimanja NMR spektara ne troši se uzorak, već se samo otapa. Nakon snimanja otapalo se može upariti i

ponovno se može dobiti vrijedna količina uzorka. Integral površine signala u protonskom spektru proporcionalan je broju protona.⁶⁰



Slika 16. Fotografija NMR spektrometra Bruker Avance 600 (Bruker, Billerica, SAD)

U ovom istraživanju snimani su protonski, odnosno ^1H NMR spektri. Za snimanje spektara korišteni su spektrometri Bruker Avance od 600 i 300 MHz. Spojevi analizirani NMR tehnikama otopljeni su u deuteriranoj vodi. Kao standard korišten je tetrametilsilan (TMS). Kemijski pomaci izraženi su u jedinicama ppm (dijelovi na milijun).

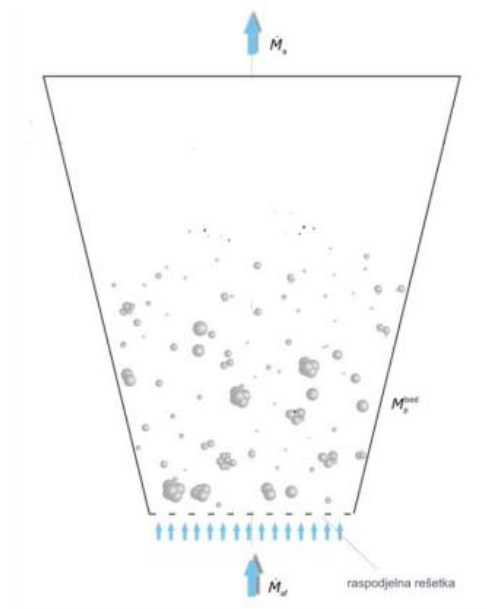
Prvo je pokušano otapanje 10 mg uzorka u 600 μL deuterirane vode, međutim nije bilo moguće u potpunosti otopiti uzorak te su primijećeni samo signali HP- β -CD i mali dio signala DAS-a zbog slabe topljivosti u vodi. Sličnu problematiku opisuju T. K. Špehar i sur. s djelatnom tvari prazikvantel. Po uzoru na objavljenu proceduru pripremljen je uzorak koncentracije $c = 3,52 \text{ mM}$ te je 600 μL otopine korišteno za snimanje NMR spektara.⁶¹

4.5. *In-situ* granuliranje taljenjem u fluidiziranom sloju

Granuliranje se tumači kao proces okrupnjavanja u kojem je rast primarnih čestica potaknut nepravilnim stohastičkim kretanjem praškaste tvari. Svrstava se u procese fizičke pretvorbe tvari. Granuliranjem je moguće dizajnirati sustav čestica i pripremiti formulu željenih primjenskih svojstava. Propusnost, tecivost, poroznost, nasipna gustoća, tvrdoća, topljivost, trošivost, mogućnost kompaktiranja, pogodnost pri rukovanju, ujednačenost sadržaja samo su neka od svojstava sustava čestica koje je moguće poboljšati i kontrolirati granuliranjem. Ulazni procesni tok sastoji se od praškaste tvari koju treba okrupniti i veziva čija je uloga osigurati neophodna kapljevita premoštenja između sudarajućih čestica. U izlaznom procesnom toku nalaze se granule željenih svojstava i, nerijetko, neokrupnjeni materijal. Ovisno o principu miješanja razlikuju se: granuliranje prevrtanjem, smično granuliranje i granuliranje u fluidiziranom sloju. Prema vrsti i načinu dodavanja veziva postoje: mokro granuliranje, suho granuliranje i granuliranje taljenjem.⁶²

Proizvodnja čvrstih dozirnih oblika kao što su tablete i kapsule obično zahtijeva granulaciju kako bi se poboljšala protočnost, kompresibilnost i kompaktilnost smjese pomoćnih tvari i djelatne tvari. Granuliranje taljenjem temelji se na primjeni polimernog veziva niskog tališta. Za razliku od mokrog granuliranja, granuliranje taljenjem ne zahtijeva upotrebu otapala što proces čini prikladnim za djelatne tvari osjetljive na vodu te također prihvatljivijim s ekonomske i ekološke strane. Štoviše, odabirom prikladnog veziva, ova tehnika može se primijeniti za pripremu dozirnih oblika s produljenim ili trenutnim oslobađanjem, a također i poboljšati bioraspoloživost slabo topljivih lijekova i maskirati okus.⁶² Granuliranje taljenjem u fluidiziranom sloju može se provesti pomoću raspršivanja otopljenog veziva na fluidizirane čvrste čestice (*spray-on* postupak) ili dodavanjem diskretnih čestica veziva (*in situ*) (slika 17), koje se fluidiziraju zajedno s drugim pomoćnim tvarima i česticama djelatne tvari i prelaze u kapljevito stanje s porastom temperature zraka.⁶³ Granuliranje taljenjem ima nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne metode. Kao što je iznad navedeno, proces ne uključuje upotrebu otapala, čime su izbjegnuti problemi povezani s hidrolizom tijekom procesa i uklanjanjem vode zagrijavanjem kada se koriste vodene granulacijske tekućine. Također, proces je jednostavan i brz i može se provesti u jednom koraku, za razliku od konvencionalne mokre granulacije pri kojoj je potrebno prenijeti materijal iz granulatora do opreme za sušenje. U tom koraku može doći do problema povezanih s gubitcima pri prijenosu, kontaminacijom opreme, duljom obradom i povećanom razinom prašine. Kada je riječ o prirodi proizvoda, valja spomenuti još neke prednosti kao što su odsutnost dodatne tekućine zbog koje se dobiva povoljniji omjer vezivo/supstrat te također može rezultirati većom gustoćom granula i smanjenom poroznošću.⁶⁴

U ovom istraživanju provodi se *in-situ* granuliranje taljenjem u fluidiziranom sloju pomoću procesne jedinice prikazane na slici 19. Kao vezivo korišten je PEG 4 kDa u rasponu veličina čestica 90-125 μm . Kada taljenjem nastanu kapljice upravo te veličine, pomoću njih će doći do stvaranja granula čije dimenzije odgovaraju dimenzijama čestica ostalih komponenti. PEG i tvari koje se nastoje okrupniti dodane su izravno u procesni prostor granulatora na slici 18. Sve tvari navedene u tablici 3 dodane su u granulator pri sobnoj temperaturi. Dodano je 300 g tvari jer je pri toj masi osigurana uspješna fluidizacija. S donje strane uređaja upuhuje se komprimirani zrak zagrijan na 90 °C kako bi se osiguralo postizanje temperature tališta PEG-a koja iznosi 63 °C. Zagrijavanjem mase na temperaturu tališta karakterističnu za korišteno vezivo omogućuje se nastanak kapljevutih premoštenja koja su neophodna za rast čestica. Nakon toga, sustav se hladi na temperaturu očvršćivanja kapljevutih premoštenja veziva, tj. nastajanja granula.



Slika 17. Shematski prikaz procesne tehnologije granuliranja

Dobiveni granulati (slika 18) prosijani su mehaničkim sitima, a korišten je uzorak 200-500 μm koji je pogodan za uspješno tabletiranje što je pokazano u istraživanju koje su provodili K. Sokač i sur.⁶⁵



Slika 18. Dobiveni granulat



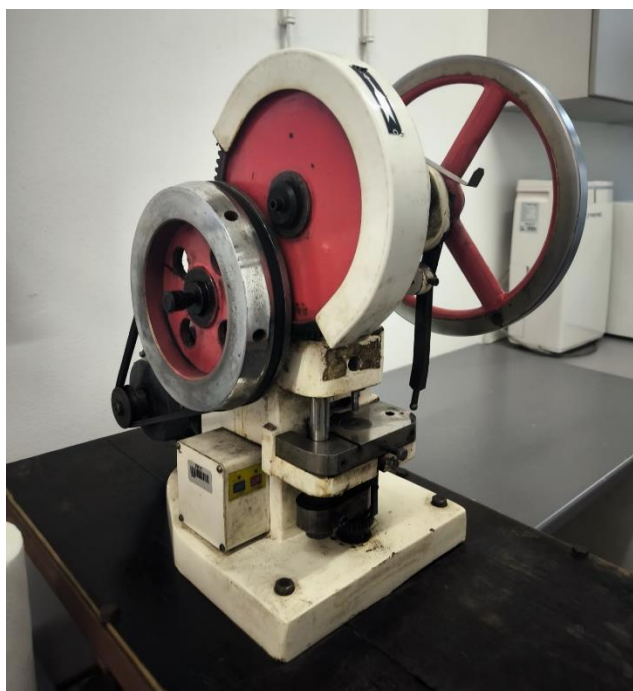
Slika 19. Fotografija granulatora s fluidiziranim slojem Uni-Glatt
(Glatt GmbH, Binzen, SR Njemačka)

4.6. Tabletiranje

Granulat i mehanokemijski pripravljeni uzorci s masenim udjelima prikazanim u tablici 5 fizikalno su pomiješani do postizanja homogenosti. Tako se osigurava mješavina za tabletiranje koja sadržava 20 % DAS-a. Mješavina je tabletirana na uređaju prikazanom na slici 20, a procesni uvjeti dani su u tablici 6 Prije tabletiranja u pripremljeni granulat dodaje se 0,1 g mazivog sredstva magnezijevog stearat koji sprječava lijepljenje mješavine za dijelove tabletirke. U postupku tabletiranja koristi se okrugla matrica promjera 8 mm, a ciljana masa tableta iznosi 200 mg. Na slici 21 prikazane su dobivene tablete.

Tablica 5. Sastav tableta

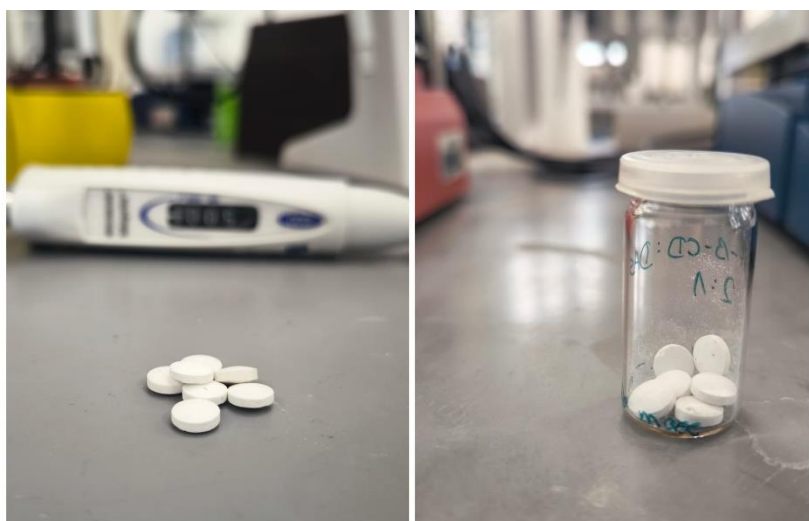
Uzorak	Komponente	Masa (mg)	Maseni udio, %
DAS:HP- β -CD 1:1	DAS	40	20
	HP- β -CD	40	20
	Granulat + Mg stearat	120	60
DAS:HP- β -CD 1:2	DAS	40	20
	HP- β -CD	80	40
	Granulat + Mg stearat	80	40



Slika 20. Fotografija uređaja za tabletiranje TDP-5T
(Zhejiang Wisley Machinery Co. Ltd. Zhejiang, Ruian, NR Kina)

Tablica 6. Procesni karakteristike/uvjeti tabletiranja

Maksimalni pritisak, kN	50
Maksimalni promjer tableta, mm	20
Maksimalna dubina punjenja, mm	18
Kapacitet, tableta/h	4500
Snaga motora, kW	0,47



Slika 21. Fotografija pripremljenih uzoraka tableta

4.7. Metode karakterizacije tableta

4.7.1. Ispitivanje ujednačenosti masa tableta

Masa tableta od 200 mg određena je prema dimenzijama matrice i volumenu punjenja. Ujednačenost mase testirana je na 10 uzoraka tableta DAS:HP- β -CD 1:1 i 10 uzoraka tableta DAS:HP- β -CD 1:2 vaganjem na analitičkoj vagi KERN ALJ 220-4NM (slika 22).



Slika 22. Fotografija analitičke vage KERN ALJ 220-4NM
(KERN, Balingen, Savezna Republika Njemačka)

4.7.2. Ispitivanje sadržaja djelatne tvari u tabletama

Sadržaj djelatne tvari određuje se kako bi se ispitao sastav tableta, odnosno kako bi se provjerilo sadrži li tableta u svom sastavu zaista 40 mg djelatne tvari. Na slici 23 prikazan je spektrofotometar UV-1280 (Shimadzu, Kyoto, Japan) na kojem je provedeno testiranje. Ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija (eng. *UV/Vis spectroscopy*) bavi se interakcijama između elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom/vidljivom području i tvari. UV/Vis spektroskopija povezana je s pobuđivanjem najudaljenijih elektrona atoma, koji su uključeni u formiranje molekula. Spektroskopskim metodama mjeri se količina svjetlosti koju je mjereni uzorak apsorbirao. Ultraljubičasto područje pokriva područje elektromagnetskog spektra od otprilike 10 do 380 nm. Obično se dijeli na tri glavne podskupine, koje su: UVA u 320-380 nm, UVB u 280-320 nm i UVC u 100-280 nm. Vidljivo područje obuhvaća spektralni raspon 380-750 nm.⁶⁶

Ispitivanje je provedeno na 10 uzoraka tableta DAS:HP- β -CD 1:1 i 10 uzoraka tableta DAS:HP- β -CD 2:1. Mjerenja su provedena pri $\lambda=322$ nm. Temeljna standardna otopina pripravljena je otapanjem 5,0 mg djelatne tvari u 50 mL metanola. Radne standardne otopine

koncentracija 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 mg L⁻¹ pripravljene su radi određivanja umjernog pravca na osnovu kojeg je određena koncentracija djelatne tvari u uzorcima tableta.



Slika 23. Fotografija spektrofotometra UV-1280 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Prije provedbe testiranja sadržaja tablete su usitnjene u tarioniku, a potom kvantitativno prenesene u volumetrijsku tikvicu od 50 mL uz nadopunu metanola do 2/3 volumena tikvice. Uzorci su potom premješteni u ultrazvučnu kupelj na 60 minuta do potpunog otapanja djelatne tvari. Tikvice su potom do oznake napunjene metanolom, a sadržaj je filtriran PTFE membranskim filterom s promjerom pora 0,45 µm. 0,5 mL svakog uzorka zatim je razrijeđeno 10 puta do koncentracije 40 mg L⁻¹.

4.7.3. Ispitivanje oslobađanja dasatiniba iz tableta – *in vitro* testovi otapanja

Farmakokinetičko djelovanje DAS-a varira prema razini izloženosti pacijenta. Pacijenti mogu biti izloženi riziku od terapijski relevantne toksičnosti zbog visoke razine izloženosti, dok se kod drugih javlja suboptimalna učinkovitost proizašla iz niske razine izloženosti. Iz tog razloga je profil oslobađanja djelatne tvari koji daje podatke o promjena koncentracije otopljene tvari u vremenu od iznimne važnosti.⁶⁷

Primjena *in vitro* testa ispitivanja oslobađanja djelatne tvari predviđa *in vivo* bioraspoloživost lijeka. Ovim testom moguće je ispitati otapanje različitih oblika doziranja poput onih s odgođenim oslobađanjem, trenutnim oslobađanjem, produljenim oslobađanjem, zatim prašaka, tableta za žvakanje, transdermalnih sustava za primjenu, mekih želatinskih kapsula, guma za žvakanje, supozitorija, aerosola i drugih polukrutina. Moguće je odrediti stopu otapanja (eng. *Dissolution rate*) koja se definira kao količina lijeka koja ulazi u otopinu u jedinici vremena pri konstantnim uvjetima sučelja kapljevina/krutina, temperature i sastava otapala. Može se smatrati specifičnom vrstom heterogenih reakcija u kojoj je prijenos mase

rezultat učinka između otapanja i taloženja molekula otopljene tvari na čvrstoj površini. Otapanje je proces u kojem se čvrsta tvar otapa u određenom otapalu, tj. masa prelazi iz čvrste u kapljevitu fazu.⁶⁸

Ispitivanje oslobađanja DAS-a provedeno je *in vitro* testom otapanja, službenim testom za procjenu oslobađanja lijeka u formi krutih ili polukrutih dozirnih oblika. Korišten je uređaj za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari RC-6D (Zhengzhou Nanbei Instrument, Henan, NR Kina) prikazan na slici 24.

Uvjeti ispitivanja odabrani su na temelju preporuka Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). Testiranje je provedeno prema metodi *USP Apparatus II Paddle*. Kao medij koji oponaša fiziološke uvjete korišteno je 1000 mL acetatnog pufera (NaAc + HAc) pri pH=4,0 uz dodatak 1% Triton X-100. Otapanje je provedeno pri kontroliranoj temperaturi $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, a brzina okretaja miješala postavljena je na 60 o/min. Testiranje je trajalo 120 minuta, a uzorci od 5 mL prikupljeni su u 1., 5., 10., 15., 20., 30., 45., 60., 75., 105., i 120. minuti. Uzorci su filtrirani kroz PTFE membranski filter s promjerom pora 0,45 μm , a koncentracija DAS-a u uzorcima potom je određena UV/Vis spektrofotometrijom.

Korištenje acetatnog pufera (pH = 4,0) simulira duodenalni fluid. DAS kao slabu bazu s topljivošću ovisnom o pH karakterizira veća topljivost u kiseloj sredini želuca, ali manja topljivost u području tankog crijeva. Na prijelazu iz želuca u tanko crijevo teži prezasićenju i/ili taloženju.⁶⁹



Slika 24. Fotografija uređaja za određivanje profila oslobađanja djelatne tvari RC-6D (Zhengzhou Nanbei Instruments, Zhengzhou, NR Kina)

4.7.4. Matematički opis oslobađanja dasatiniba iz tableta

Matematičko modeliranje ostvarilo je značajan napredak u razvoju područja isporuke dozirnih oblika s kontroliranim oslobađanjem. Oslobađanje lijeka važno je terapijsko svojstvo koje prikazuje stupanj opsega aktivne bioraspoloživosti. Obrasci oslobađanja mogu se opisati kinetikama nultog i prvog reda, a postoje i primjeri u kojima se početna doza oslobađa brzo, a zatim slijedi oslobađanje kontinuirane komponente nultog ili prvog reda. Dobro definirano kinetika oslobađanja lijeka može osigurati održavanje učinkovite razine koncentracije lijeka. Matematički modeli omogućuju farmaceutima i inženjerima jednostavnije dizajniranje sustava kontrolirane isporuke lijekova. Također, važan su alat za dizajniranje farmaceutskih formulacija, procjenu procesa oslobađanja lijeka *in vitro* i *in vivo* i općenito optimalan dizajn za nove sustave. Korištenje *in vitro* podataka o otapanju lijeka poželjno je za predviđanje *in vivo* bioraspoloživosti dozirnog oblika. Matematičke jednadžbe omogućuju kvantitativnu interpretaciju vrijednosti dobivenih provedbom testova otapanja ili ispitivanjem oslobađanja lijeka. Kvalitativne i kvantitativne promjene u sustavu mogu promijeniti način oslobađanje lijeka i *in vivo* učinak, stoga je poželjan razvoj alata koji olakšavaju razvoj proizvoda i smanjuju potrebu za provedbom kompleksnih bioloških ispitivanja. Matematički modeli su jednadžbe temeljene na različitim matematičkim funkcijama. Nakon što je odgovarajuća funkcija postavljena, profili oslobađanja procjenjuju se ovisno o parametrima izvedenog modela. Razumijevanje jednadžbi važno je za uspješno predviđanje bitnih čimbenika koji mogu utjecati na brzinu oslobađanja i uvjeta pri kojima oslobađanje može varirati i utjecati na učinkovitost ili terapijski režim pacijenata. Jednadžba mora imati sposobnost transformacije krivulje oslobađanja u funkciji nekog drugog parametra koji se odnosi na oblik doziranja. Stoga su modeli korišteni uglavnom za predviđanje oslobađanja inkapsulirane molekule u funkciji vremena. Kada su analitička rješenja eksplicitna, moguće je povezati zavisne i nezavisne varijable. Međutim, ova ovisnost nije očita u slučaju implicitnih analitičkih rješenja. Fizički realističniji modeli su matematički kompleksniji, a vrlo često je teško pronaći analitička rješenja za skupove jednadžbi. Razumijevanje učinka određenih nezavisnih varijabli na određenim ovisnim varijablama mnogo je lakše u usporedbi s numeričkim rješenjima.^{70,71}

Glavni kinetički modeli koji opisuju oslobađanje dozirnih oblika navedeni su u tablici 7. U njih ubrajamo model kinetike nultog reda, model kinetike prvog reda, Higuchi model, Weibull model, Korsmeyer–Peppas model i Peppas-Sahlin model.

Tablica 7. Matematički modeli za opis oslobađanja djelatnih tvari

Model	Matematički zapis	Parametri	Vrsta modela
Model kinetike nultog reda	$M_t = M_0 + K_0 t$	$K_0, \% \text{ min}^{-1}$	empirijski
Model kinetike prvog reda	$\ln M_t = \ln M_0 + K_1 t$	$K_1, \% \text{ min}^{-1}$	empirijski
Higuchi model	$M_t = M_0 + K_H t^{1/2}$	$K_H, \% \text{ min}^{-0,5}$	empirijski
Weibull model	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp \left[\frac{-(t^\beta)}{\alpha} \right]$	$\alpha, -$ $\beta, -$	empirijski
Korsmeyer-Peppas model	$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{M_0}{M_\infty} + K_{KP} t^n$	$K_{KP}, \% \text{ min}^{-n}$ $n, -$	poluempirijski
Peppas-Sahlin model	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$	$K_1, \% \text{ min}^{-m}$ $K_2, \% \text{ min}^{-2m}$ $m, -$	poluempirijski

Za kinetiku nultog reda, oslobađanje djelatne tvari je funkcija samo vremena i proces se odvija konstantnom brzinom neovisno o koncentraciji djelatne tvari. Parametar K_0 je konstanta prividne brzine otapanja. Kako je jednadžba modela linearna, K_0 odgovara nagibu pravca. Ovaj model prikladan je za produljeno oslobađanje lijeka.

Higuchi je objavio vjerojatno najpoznatiju i najčešće korištenu matematičku jednadžbu za opisivanje brzine oslobađanja lijekova iz matričnih sustava. Matematički odnosi koje je razvio povezani su s aktivnim česticama raspršenim u homogenim matricama podvrgnutim difuzirajućem mediju. K_H je Higuchijeva konstanta oslobađanja. Higuchijev model omogućio je razvoj različitih matematičkih pristupa koji su bili važni za klasifikaciju mogućeg profila oslobađanja djelatnih tvari iz dozirnih oblika. Postoje pretpostavke koje treba slijediti korištenjem Higuchijevog modela:

- (1) Matrica sadrži početnu koncentraciju lijeka mnogo veću od topljivosti lijeka;
- (2) Difuzija je jednosmjerna jer su rubni efekti zanemarivi;
- (3) Debljina dozirnog oblika mnogo je veća od veličine molekula lijeka;
- (4) Bubrenje ili otapanje matrice je zanemarivo;
- (5) Difuznost lijeka je konstantna i
- (6) Postignuti su specifični uvjeti tijekom ispitivanja oslobađanja lijeka prilikom kojih je koncentracija oslobođene tvari u otopini dovoljno niska da ne utječe na brzinu daljnjeg oslobađanja tvari iz čvrstog dozirnog oblika.

Weibullov model je empirijski. Parametar skale (α) definira vremensku skalu procesa. Parametar oblika (β) karakterizira vrstu krivulje:

- (1) $\beta=1$ (eksponencijalno);
- (2) $\beta>1$ (sigmoid, s uzlaznom zakrivljenošću omeđenom točkom infleksije) i
- (3) $\beta<1$ (parabolično, prikazuje veliki početni nagib i dosljedan eksponencijalni karakter).

Ovaj model smatra se korisnijim za usporedbu profila oslobađanja lijeka kod matričnih sustava. Premda se radi o empirijskom modelu bez kinetičke osnove, on je deskriptivan i iz njega se ne mogu dobiti zaključci o kinetici otapanja lijeka.

Korsmeyer-Peppas model je opsežnija poluempirijska jednadžba za opisivanje oslobađanja lijeka iz polimernih sustava. K_{KP} je konstanta ugradnje strukturnih modifikacija i geometrijskih karakteristika sustava (također se smatra konstantom brzine oslobađanja), a n je eksponent oslobađanja (povezano s mehanizmom oslobađanja lijeka) u funkciji vremena. Ovaj model, kao i ostali modeli zakona snage, koristan je za proučavanje oslobađanja lijeka iz polimernih sustava kada mehanizam oslobađanja nije poznat ili kada je uključeno više od jedne vrste fenomena oslobađanja. Ovisno o vrijednosti n moguće je uspostaviti klasifikaciju prema vrsti promatranog ponašanja:

- modeli koji prate Fickov zakon (slučaj I)
- modeli koji ne prate Fickov zakon (slučaj II, anomalni slučaj i super slučaj II)

U modelu koji prati Fickov zakon, parametar n iznosi 0,5 i oslobađanje lijeka je regulirano difuzijom. Brzina transporta otapala ili difuzije mnogo je veća od procesa relaksacije polimernog lanca. Kinetiku ovog fenomena karakterizira difuzivnost. Kada je $n = 1$, model ne prati Fickov zakon (slučaj II), stopa oslobađanja lijeka odgovara kinetici nultog reda, a mehanizam koji pokreće oslobađanje je bubrenje ili relaksacija polimernih lanaca. Ovo je još jedan ekstremni tip ponašanja. Štoviše, kada je $0,5 < n < 1$, model ne prati Fickov zakon ili anomalni slučaj, i mehanizmom oslobađanja lijeka upravljaju difuzija i bubrenje. Polako dolazi do preuređivanja polimernih lanaca i proces difuzije istovremeno uzrokuje vremenski ovisne anomalne učinke. Konačno, model super slučaj II karakteriziran je kada je $n > 1$, predstavljajući ekstremni oblik prijenosa. Tijekom procesa sorpcije dolazi do napetosti i lomljenja polimera.

Peppas-Sahlin model kinetike oslobađanja posljedica je indikacije da je moguće izračunati dva mehanizma doprinosa (difuzijski i relaksacijski) u procesu oslobađanja lijeka. K_1 , K_2 i m su konstante. K_1 predstavlja Fickov difuzijski doprinos, F , dok K_2 predstavlja relaksacijski slučaj. Koeficijent m je Fickov eksponent difuzije za bilo koji sustav koji pokazuje kontrolirano oslobađanje.⁷¹

5. REZULTATI I RASPRAVA

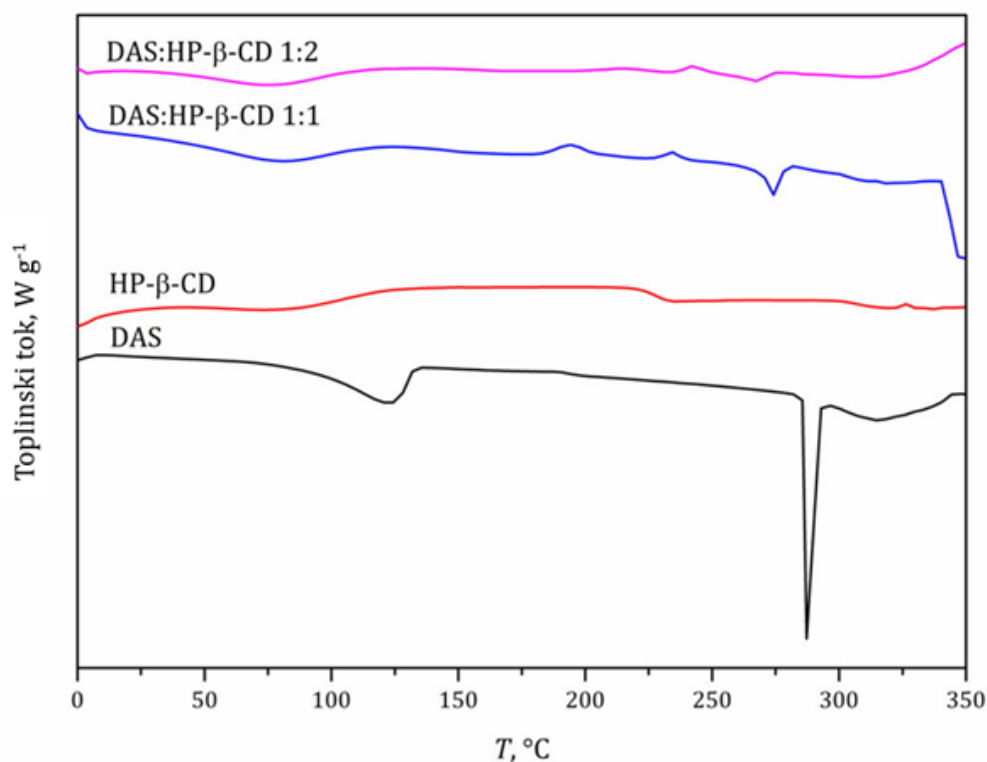
5.1. Rezultati karakterizacije inkluzijskih kompleksa

5.1.1. Podatci DSC analize

Na slici 25 prikazan je DSC termogram ishodnog DAS-a, HP- β -CD-a te pripremljenih inkluzijskih kompleksa DAS:HP- β -CD 1:1 i DAS:HP- β -CD 1:2. Termogram ishodnog DAS-a pokazuje širok endotermni prijelaz u temperaturnom rasponu 90 °C do 130 °C, a odgovara oslobađanju vode koja se nalazila unutar kristalne rešetke DAS-a koji je dostupan u obliku monohidrata. Uzak endotermni prijelaz u području 287 - 292 °C s oštrim maksimumom pri 287 °C odgovara taljenju DAS te ukazuje na visoku čistoću uzorka djelatne tvari. Endotermni prijelaz taljenja karakterističan je za kristalne strukture. Rezultati su u skladu s rezultatima pronađenim u literaturi.⁷²

Termogrami HP- β -CD-a i DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2 pri 80 °C prikazuju prijelaze koji odgovaraju oslobađanju vode iz uzoraka. Analizom termograma HP- β -CD-a pri 230 °C može se uočiti karakterističan staklasti prijelaz koji se očituje promjenom bazne linije, a karakterističan je za amorfne strukture.

Kod uzoraka DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2 nije uočen prijelaz koji odgovara taljenju, stoga takvo svojstvo ukazuje na amorfizaciju uzoraka uslijed mehanokemijske aktivacije u planetarnom kugličnom mlinu. Na termogramima inkluzijskih kompleksa DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2 moguće je uočiti egzotermne prijelaze koji odgovaraju hladnoj kristalizaciji. Hladna kristalizacija je proces kristalizacije koji se odvija prilikom zagrijavanja, a karakteristična je za amorfne tvari. Prilikom procesa mljevenja u mlinu oslobađa se određena količina toplinske energije, ponovnim zagrijavanjem uzorka prilikom DSC analize dolazi do preraspodjele unutar strukture i pojave hladne kristalizacije. Pri temperaturama višim od 325 °C u termogramima DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2 uočeni su prijelazi koji ukazuju na toplinsku degradaciju uzorka.



Slika 25. DSC termogrami ishodnog DAS-a, HP-β-CD-a te pripremljenih inkluzijskih kompleksa u omjerima 1:1 i 1:2

Korištenjem standardnih entalpija taljenja moguće je izračunati relativni stupanj kristalnosti djelatne tvari u inkluzijskom kompleksu.

Izračun relativnog stupnja kristalnosti RDC iz standardne entalpije taljenja h^f :

- Uzorak DAS:HP-β-CD 1:1

$$h^f(\text{DAS}) = -95,16 \text{ J g}^{-1}$$

$$h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{eksp.}} = -26,80 \text{ J g}^{-1}$$

$$\text{RDC}_{\text{teor.}} = 50 \%$$

$$\text{RDC}_{\text{eksp.}} = ?$$

$$h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{teor.}} = ?$$

$$h^f(\text{DAS}) : 100 \% = h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{teor.}} : 50 \%$$

$$h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{teor.}} = \frac{\text{RDC}_{\text{teor.}} \cdot h^f(\text{DAS})_{100 \%}}{\text{RDC}_{\text{teor.}}} = \frac{50 \% \cdot (-95,16) \text{ J g}^{-1}}{100 \%} = -47,58 \text{ J g}^{-1}$$

$$h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{teor.}} : 50 \% = h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{eksp.}} : \text{RDC}_{\text{eksp.}}$$

$$\text{RDC}_{\text{eksp.}} = \frac{\text{RDC}_{\text{teor.}} \cdot h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{eksp.}}}{h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})_{\text{teor.}}} = \frac{50 \% \cdot (-26,80) \text{ J g}^{-1}}{(-47,58) \text{ J g}^{-1}} = 28,16 \%$$

- Uzorak DAS:HP- β -CD 1:2

$$h^f(\text{DAS}) = -95,16 \text{ J g}^{-1}$$

$$h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:2})_{\text{eksp.}} = -23,30 \text{ J g}^{-1}$$

$$\text{RDC}_{\text{teor.}} = 33,3 \%$$

$$h^f(\text{DAS}) : 100 \% = h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:2})_{\text{teor.}} : 33,3 \%$$

$$h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:2})_{\text{teor.}} = -31,69 \text{ J g}^{-1}$$

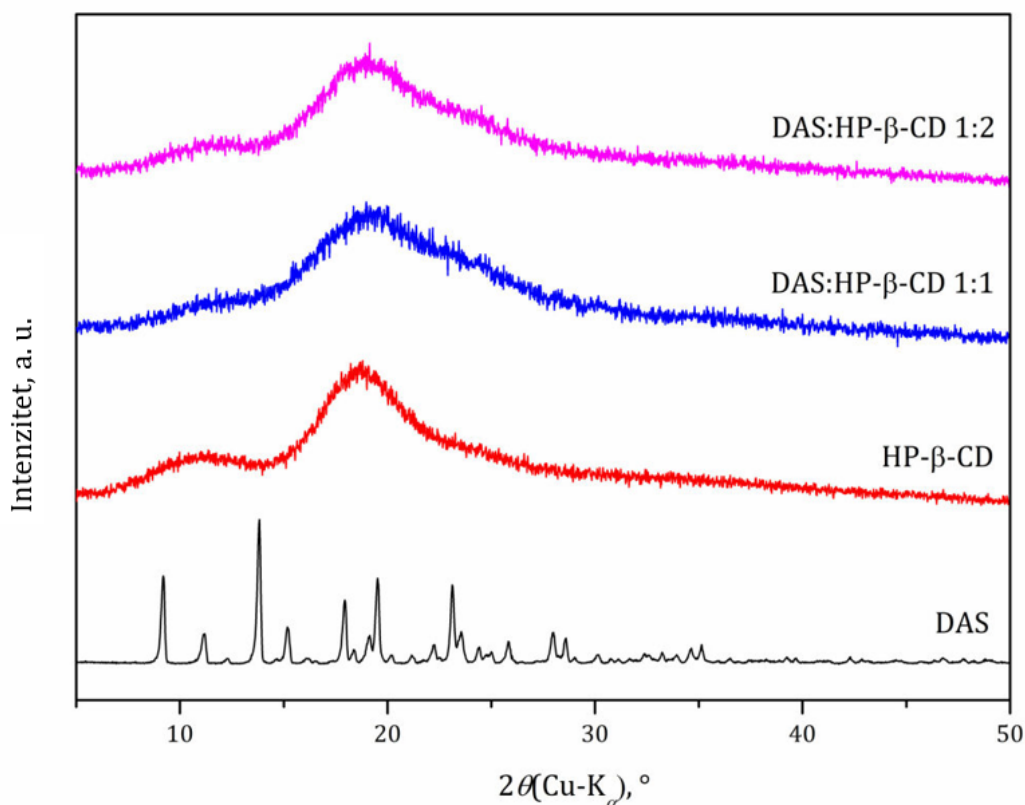
$$h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:2})_{\text{teor.}} : 33,3 \% = h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:2})_{\text{eksp.}} : \text{RDC}_{\text{eksp.}}$$

$$\text{RDC}_{\text{eksp.}} = 24,48 \%$$

Član $h^f(\text{DAS})$ predstavlja standardnu entalpiju taljenja uzorka koji sadržava 100 % DAS-a, a $h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:1})$ i $h^f(\text{DAS:HP-}\beta\text{-CD 1:2})$ su standardne entalpije taljenja DAS-a u inkluzijskim kompleksima različitog omjera DAS-a i derivata β -ciklodekstrina.

5.1.2. Podatci XRPD analize

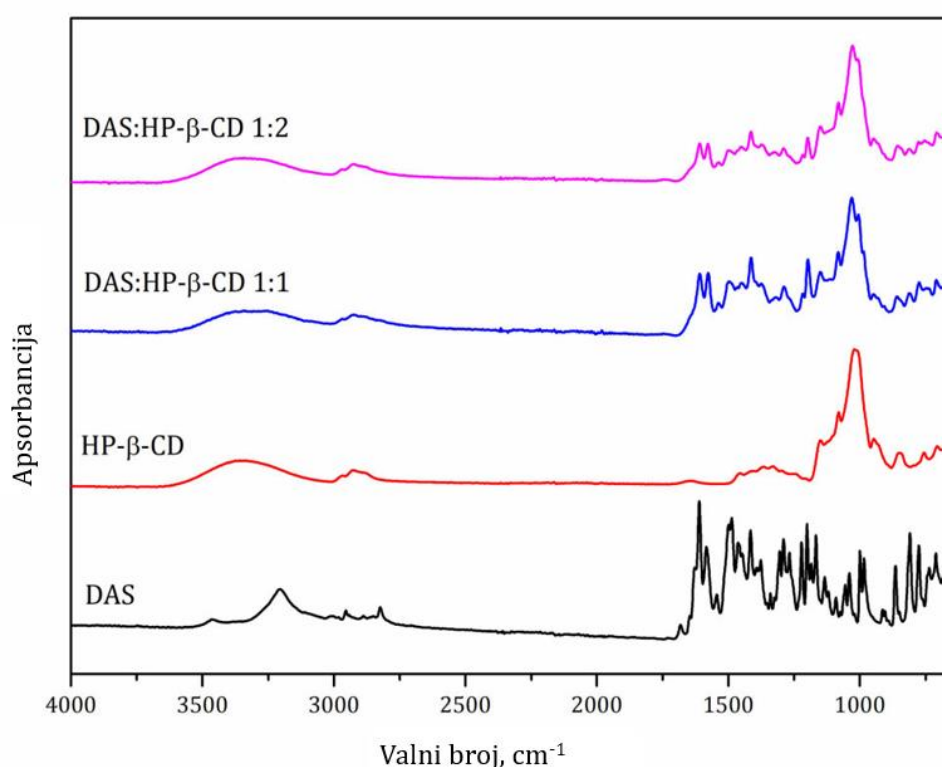
Difraktogrami su poput otiska prsta, za svaku tvar su specifični, a njihovom analizom možemo okarakterizirati tvari prema fazi u kojoj se nalaze. Na slici 26 prikazan je difraktogram ishodnog DAS-a, HP- β -CD-a te pripremljenih inkluzijskih kompleksa u omjerima 1:1 i 1:2. Difraktogram ishodnog DAS-a identificira njegovu kristalnu strukturu s karakterističnim oštrim difrakcijskim maksimumima pri vrijednosti kuta difrakcije 2θ pri 9,2 °, 11,2 °, 13,8 °, 15,2 °, 17,9 °, 19,5 °, 23,1 ° i 28,0 °. Difraktogrami HP- β -CD-a i kompleksa DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2 ne pokazuju karakteristične difrakcijske maksimume što potvrđuje uspješnu amorfizaciju djelatne tvari u prisustvu HP- β -CD-a koji je ishodno amorfne strukture. Navedeno je u skladu s rezultatima DSC analize.



Slika 26. XRD difraktogram ishodnog DAS-a, HP- β -CD-a te pripremljenih inkluzijskih kompleksa u omjerima 1:1 i 1:2

5.1.3. Podatci FTIR analize

FTIR analiza korištena je za detekciju potencijalnih interakcija između djelatne tvari i makrocikličkog receptora ciklodekstrina. Ako su tijekom pripreve inkluzijskih kompleksa nastale interakcije između pojedinih komponenti, FTIR analizom bi se mogla vidjeti određena podudarnost spektara inkluzijskog kompleksa i ishodnog ciklodekstrina jer se u ovom slučaju očekuju interakcije unutar šupljine ciklodekstrina. I lijek i makrociklički receptor sadrže specifične funkcionalne skupine u svojim molekularnim strukturama, između kojih može doći do nastajanja vodikovih veza, ali i drugih interakcija kao što su Wan der Waalsove sile, čime je moguće povećati topljivost lijeka.



Slika 27. FTIR spektri ishodnog DAS-a, HP-β-CD-a te pripremljenih inkluzijskih kompleksa u omjerima 1:1 i 1:2

Slika 27 prikazuje karakteristične apsorpcijske vrpce rastezanja i savijanja veza u funkcionalnim skupinama koje su prisutne u ishodnim komponentama i pripremljenim kompleksima. U FTIR spektru DAS-a primijećene su karakteristične apsorpcijske vrpce, osobito istezanje N-H skupine na 3456 cm⁻¹ i rastezanje -OH skupine na 3203 cm⁻¹. Vidljiva je i apsorpcijska vrpca na 1609 cm⁻¹ koja odgovara istezanju karbonilne skupine u amidnoj vezi i dvije apsorpcijske vrpce na 2945 i 2930 cm⁻¹ zbog istezanja C-H istezanja metilenske i alkilne skupine. Istodobno, vrpce na 1583, 1498 i 1417 cm⁻¹ odgovaraju istezanju C-C veze

aromatskog prstena. Dobiveni rezultati usporedivi su s rezultatima prethodnog istraživanja koje su provodili A. Cutrignelli i sur.⁷²

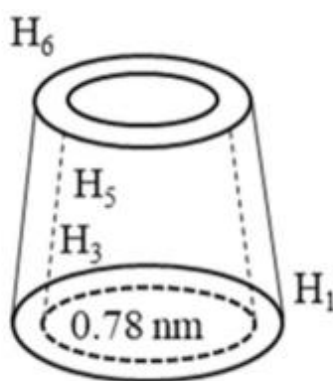
U spektru HP- β -CD-a vidljive su istaknute apsorpcijske vrpce istezanja –OH skupine na 3350 cm^{-1} , rastezanja C–H veze na 2929 cm^{-1} , savijanja H–O–H veze na 1645 cm^{-1} , rastezanja C–O veze pri 1157 cm^{-1} i istezanja C–O–C veze na 1023 cm^{-1} . Dobiveni rezultati bliski su rezultatima dobivenim u istraživanju koje su provodili D. Han i sur.⁷³

Spektri kompleksa nalikuju na spektar ishodnog HP- β -CD-a. Također, vidljiv je znatno manji intenzitet ili potpuni nestanak određenih apsorpcijskih vrpce DAS-a u kompleksima dok je intenzitet HP- β -CD-a ostao identičan. Te činjenice ukazuju na potencijalnu ugradnju DAS-a u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina.

5.1.4. Podatci NMR analize

NMR analiza korištena je kako bi se utvrdilo dolazi li do kemijskih pomaka u strukturi HP- β -CD-a i DAS-a kao posljedica nastajanja inkluzijskih kompleksa. Za analizu spektara korišten je program SpinWorks 3. Na slikama 29-34 prikazani su NMR spektri DAS-a i HP- β -CD-a dobiveni u deuteriranoj vodi, D_2O . Tijekom prvih provedenih analiza praćeni su samo kemijski pomaci ciklodekstrina. Iako signali ishodnog DAS-a nisu bili vidljivi (slika 29) zbog slabe topljivosti u vodenom mediju, pojava signala koji odgovaraju djelatnoj tvari u inkluzijskim kompleksima ukazuje na povećanje topljivosti kao posljedicu nastanka kompleksa. U slučaju HP- β -CD-a došlo je do veoma malog kemijskog pomaka svih protona.

Slika 28 prikazuje molekulu HP- β -CD-a i protone vidljive u NMR spektru. Protoni označeni brojevima 1, 2, 4 i 6 su oni koji se nalaze na vanjskoj površini ciklodekstrina. Nasuprot tome, proton 3 (kod većeg otvora) i proton 5 (kod manjeg otvora) nalaze se u unutarnjem dijelu šupljine ciklodekstrina te se očekuju njihovi kemijski pomaci.⁷⁴



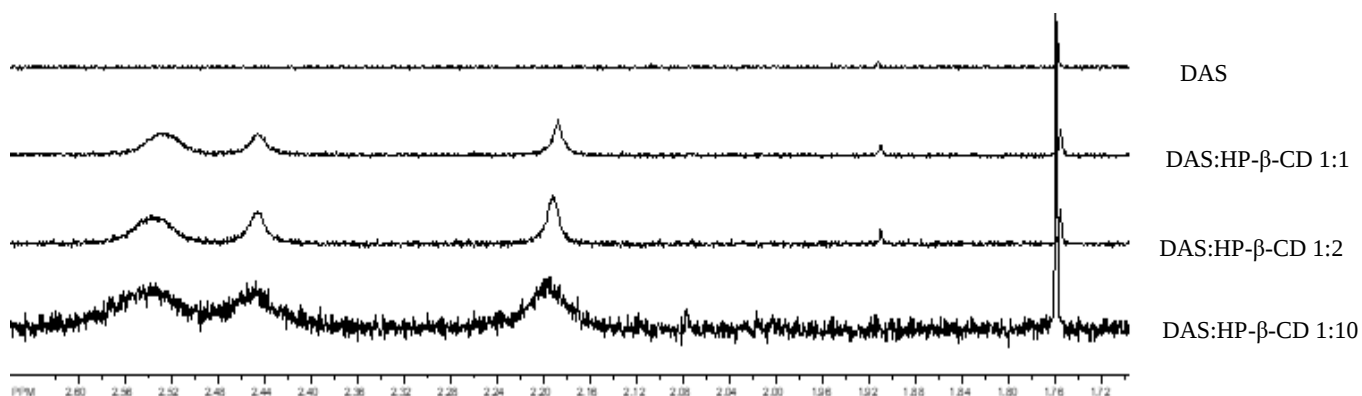
Slika 28. Prikaz HP- β -CD-a i protona vidljivih u NMR spektru⁷⁴

U tablici 8 prikazani su položaji protona HP- β -CD-a u spektrima koji su u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju A. Naeem i sur.⁷⁵

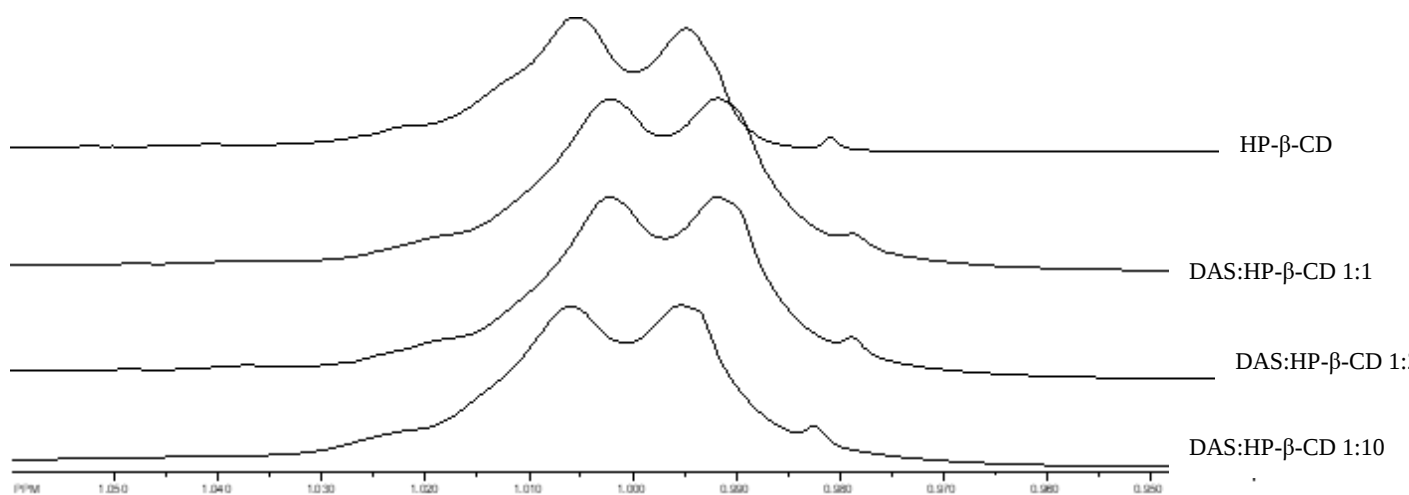
Tablica 8. Položaji vidljivih protona u spektru HP- β -CD-a⁷⁵

Proton	Pomak, ppm
H1	4,982
H2	3,550
H3	3,933
H4	3,509
H5	3,643
H6	3,793

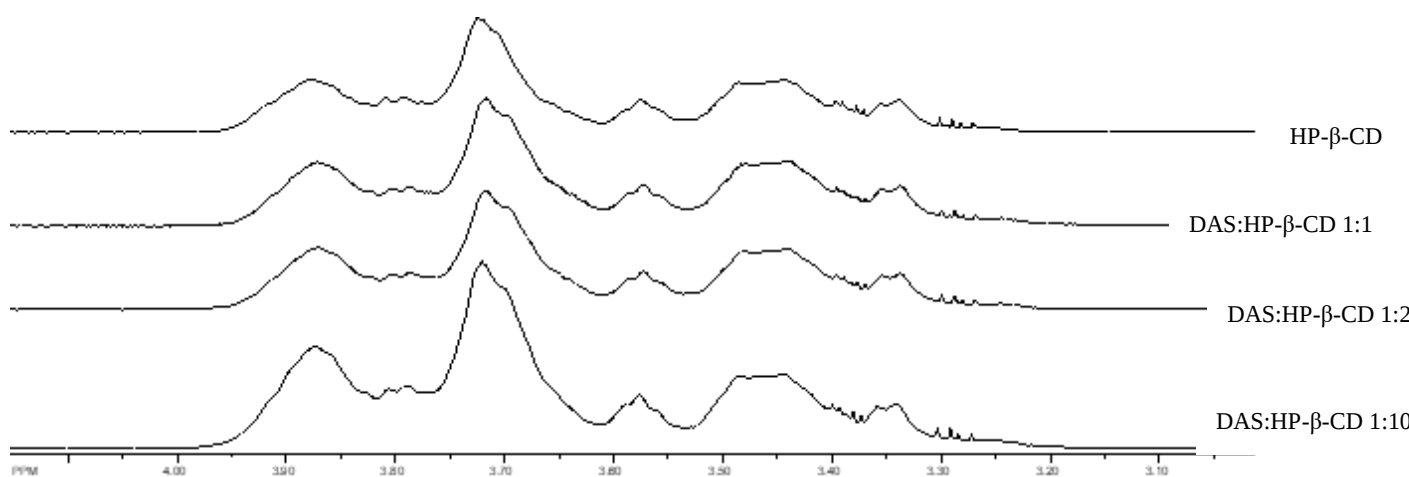
Kod protona H3 i H5 koji se nalaze u unutarnjoj šupljini HP- β -CD-a uočeni su veći pomaci nego kod protona H1, H2, H4 i H6 koji pak pripadaju vanjskom djelu molekule HP- β -CD-a. Navedeno ukazuje da dominiraju interakcije DAS-a nastale u unutrašnjosti HP- β -CD-a, dok su površinske interakcije neznatne.



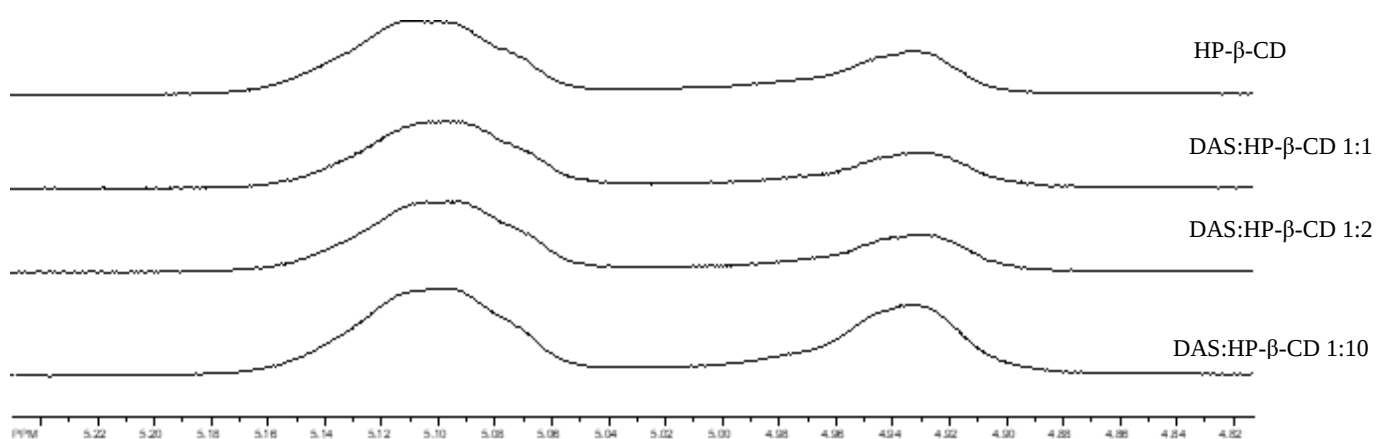
Slika 29. NMR spektri sa kemijski pomacima od 2,60 do 1,72 ppm za DAS, DAS:HP- β -CD 1:1, DAS:HP- β -CD 1:2 i DAS:HP- β -CD 1:10



Slika 30. NMR spektri sa kemijski pomacima od 1,050 do 0,950 ppm za HP-β-CD, DAS:HP-β-CD 1:1, DAS:HP-β-CD 1:2 i DAS:HP-β-CD 1:10

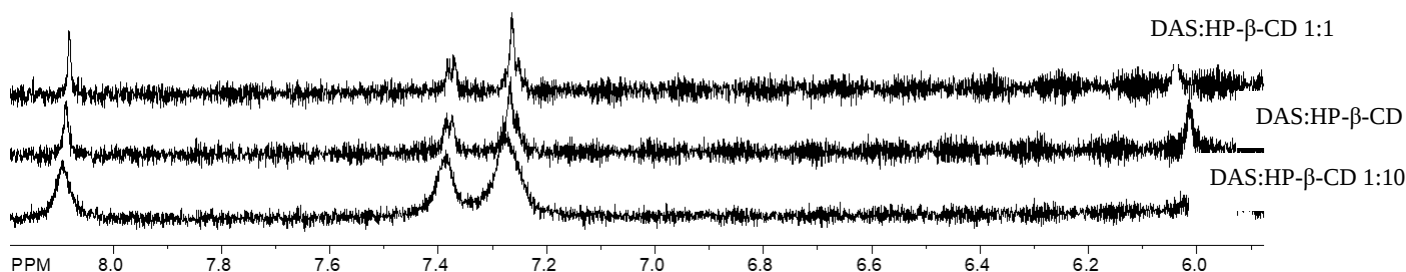


Slika 31. NMR spektri sa kemijski pomacima od 4,00 do 3,10 ppm za DAS, DAS:HP-β-CD 1:1, DAS:HP-β-CD 1:2 i DAS:HP-β-CD 1:10



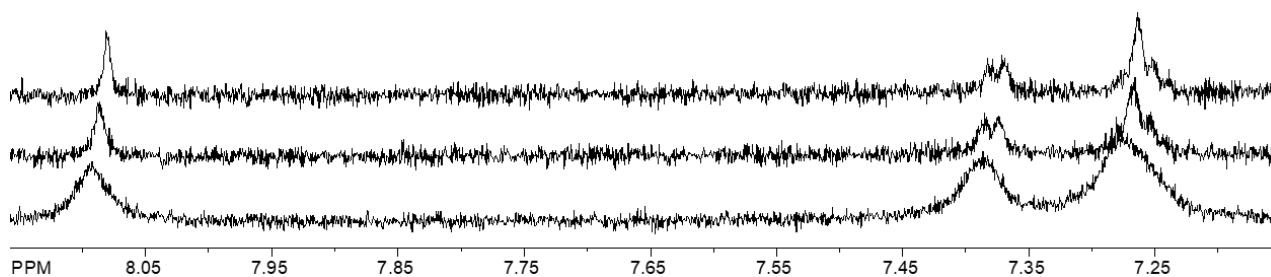
Slika 32. NMR spektri sa kemijski pomacima od 5,22 do 4,82 ppm za DAS, DAS:HP-β-CD 1:1, DAS:HP-β-CD 1:2 i DAS:HP-β-CD 1:10

Uzorci su ponovno pripremljeni te je koncentracija DAS-a u svakom uzorku za analizu iznosila 3,52 mM prema istraživanju T. K. Špehar i sur. Signali DAS-a pri toj koncentraciji su vidljivi (slike 33-35) i prikazani u nastavku.⁶⁰



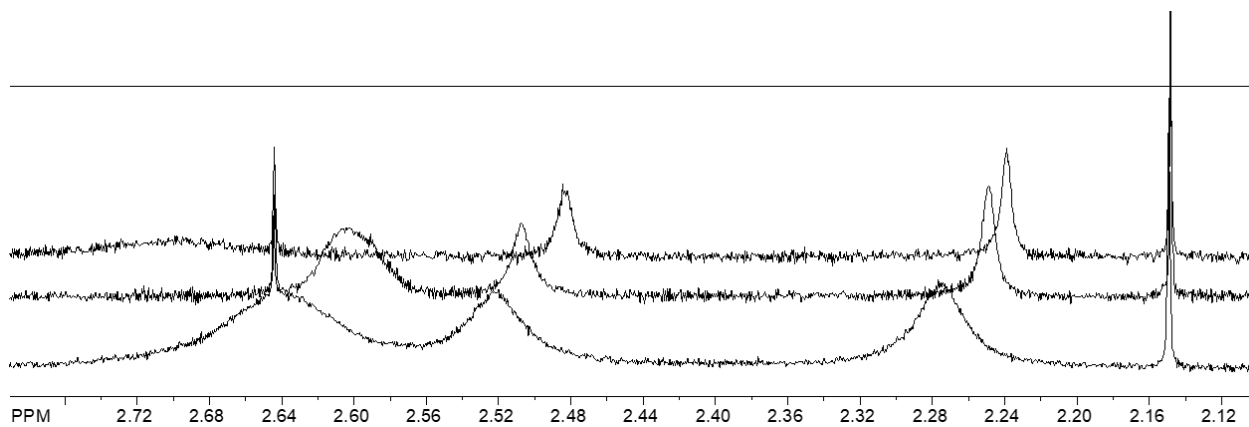
Slika 33. NMR spektri sa kemijski pomacima od 8,0 do 6,0 ppm za DAS:HP-β-CD 1:1, DAS: HP-β-CD 1:2 i DAS: HP-β-CD 1:10

Slika 34 prikazuje usporedbu pomaka kod kompleksa DAS: HP-β-CD 1:1 i DAS: HP-β-CD 1:10. Može se vidjeti kako se signali -NH skupina DAS-a pomiču uglavnom s lijeva u desno za sljedeće kemijske pomake: 0,014, 0,017, 0,015 ppm te pomak od -0,067 ppm.



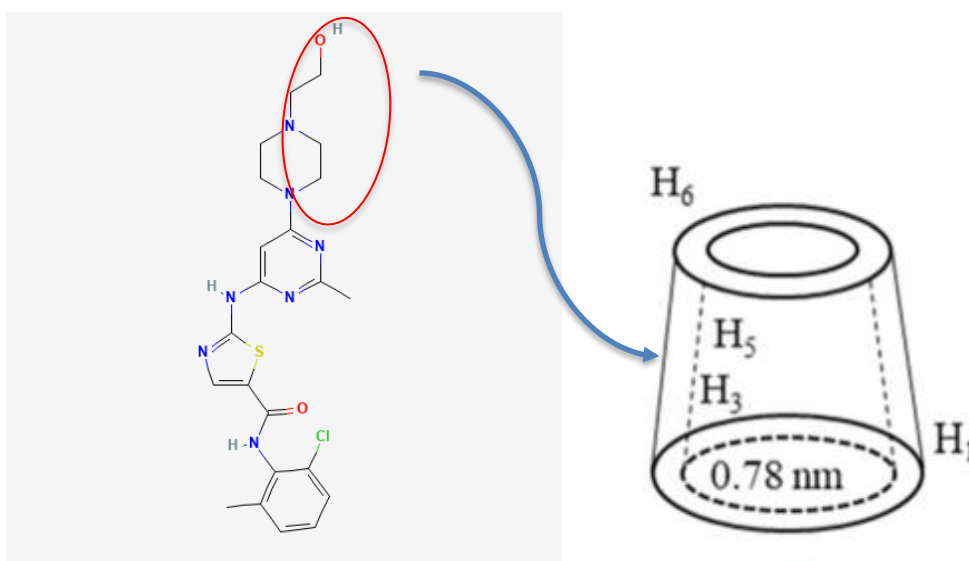
Slika 34. Usporedba pomaka DAS: HP-β-CD 1:1 i DAS: HP-β-CD 1:10 za amino skupinu

Slika 35 također prikazuje usporedbu pomaka kod kompleksa DAS: HP-β-CD 1:1 i DAS: HP-β-CD 1:10. Prikazani su pomaci signala -OH skupine s lijeva u desno za sljedeće razlike u kemijskim pomacima: 0,161 ppm (-OH, između 1:10 i 1:2 jer je za 1:1 na drugoj strani), 0,039 te 0,037 ppm. Kod metilna skupine DAS-a koja se nalazi na 2,14 ppm-a nije uočen pomak što ukazuje da ona ne ulazi u interakciju s HP-β-CD-om.



Slika 35. Usporedba pomaka DAS: HP- β -CD 1:1 i DAS: HP- β -CD 1:10 za hidroksilnu i metilnu skupinu

Iz dobivenih rezultata zaključeno je kako je alifatski dio molekule DAS-a (slika 36) ušao u strukturu HP- β -CD-a. Vidljivo je da se signali kompleksa omjera 1:10 s velikim suviškom ciklodekstrina vraćaju na početne položaje signala ishodnog spoja, dok su pri manjim udjelima vidljivi pomaci. Te promjene u kemijskim pomacima kod hidroksilne i amino daju naslutiti da dolazi do interakcije između DAS-a s protonima H3 i H5 koji se nalaze unutrašnjosti HP- β -CD-a što potvrđuje nastajanje inkluzijskog kompleksa.



Slika 36. Alifatski dio molekule DAS-a koji stupa u interakciju s HP- β -CD-om

5.2. Karakterizacija pripremljenih tableta

5.2.1. Podatci ispitivanja ujednačenosti masa tableta

Ispitivanje ujednačenosti mase provedeno je na 10 uzoraka tableta DAS:HP- β -CD 1:1 i 10 uzoraka tableta DAS:HP- β -CD 1:2. U tablici 8 prikazani su rezultati ispitivanja, a ciljane masa tableta iznosi 200 mg. Za uzorke omjera 1:1 zabilježena je i bolja ujednačenost mase, srednja vrijednost mase tableta iznosi 194,4 mg, a prosječno odstupanje od ciljane vrijednosti iznosi 2,8 %. Izraženija neujednačenost masa dobivena je za uzorke omjera 1:2 srednje vrijednosti mase 175,2 mg i prosječnog odstupanja od ciljane vrijednosti u iznosu 12,38 %. Za omjer 1:2 uočen je pojačan efekt prijanjanja čestica praha za elemente procesne jedinice što je rezultiralo tabletama manje mase i veličine.

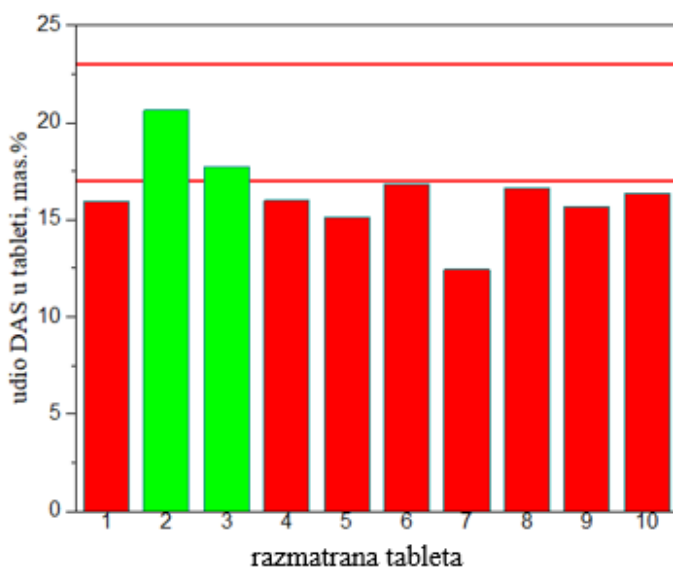
Tablica 9. Rezultati ispitivanja ujednačenosti masa tableta za uzorke DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2

tableta DAS:HP- β - CD 1:1	masa tablete, <i>m</i> [mg]	standardna devijacija <i>s</i> [mg]	tableta DAS:HP- β - CD 1:2	masa tablete, <i>m</i> [mg]	standardna devijacija, <i>s</i> [mg]
1	195,0	2,50	1	176,8	11,60
2	197,2	1,40	2	169,7	15,15
3	194,0	3,00	3	179,2	10,40
4	194,3	2,85	4	173,1	13,45
5	195,7	2,15	5	173,0	13,50
6	196,6	1,70	6	181,6	9,20
7	196,4	1,80	7	172,8	13,60
8	197,6	1,20	8	171,7	14,15
9	190,7	4,65	9	175,9	12,05
10	186,7	6,65	10	178,6	10,70
Srednja vrijednost	194,4	2,80	Srednja vrijednost	175,2	12,38

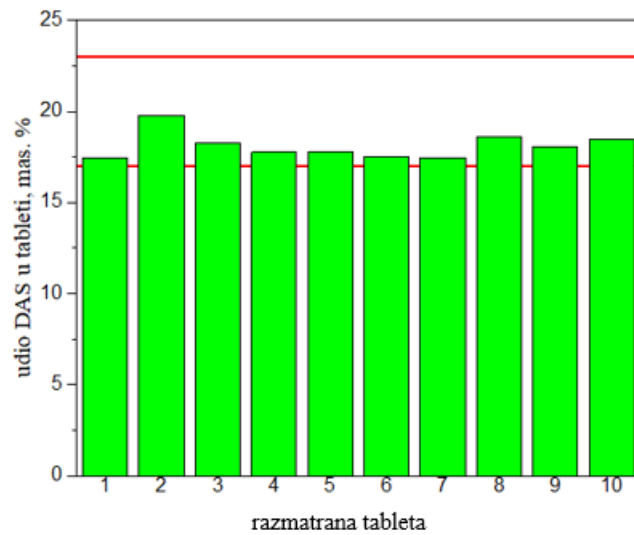
5.2.2. Podatci ispitivanja sadržaja dasatiniba u tabletama

Sadržaj djelatne tvari određen je UV/Vis spektrofotometrijom, a rezultati su prikazani na slici 37 i 38. Ciljani udio djelatne tvari u tabletama iznosi 20 % od ukupne mase tablete, a prema Europskoj farmakopeji dozvoljeno je odstupanje ± 15 % od idealog postotka. Obzirom na odstupanja masa realnih tableta, očekivani udio djelatne tvari prilagođen je srednjoj vrijednosti realnih uzoraka tableta. Na slici 39 prikazan je umjerni pravac iz kojeg je određena koncentracija djelatne tvari u tabletama.

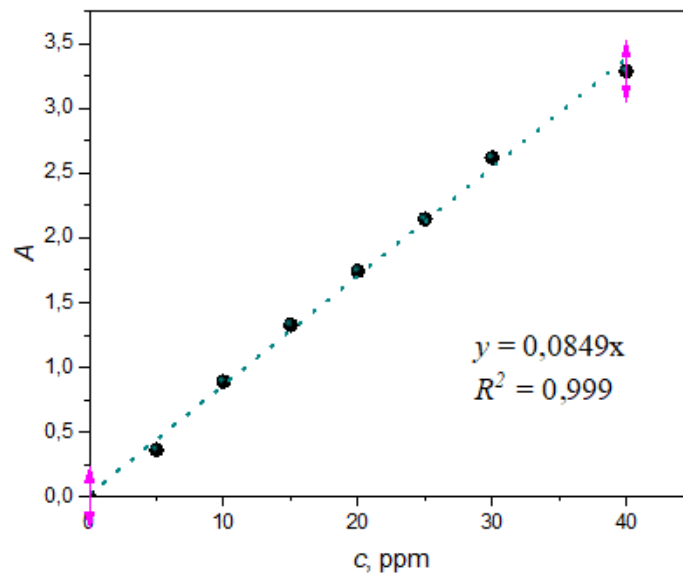
Kod tableta s većim udjelom ciklodekstrina dobivena je manja masa, a mase tableta s manjim udjelom ciklodekstrina prikazuju manje odstupanje od ciljane mase. Rezultati dobiveni za DAS:HP- β -CD 1:1 prikazuju odstupanje od ciljanog sadržaja djelatne tvari te 8 od 10 nasumično odabranih tableta ima manji maseni udio DAS-a od očekivanog. Rezultati dobiveni za DAS:HP- β -CD 1:2 prikazuju puno bolju ujednačenost sadržaja. Svih 10 uzoraka ispitanih tableta ima odgovarajući sadržaj djelatne tvari.



Slika 37. Sadržaj djelatne tvari u uzorcima DAS:HP- β -CD 1:1



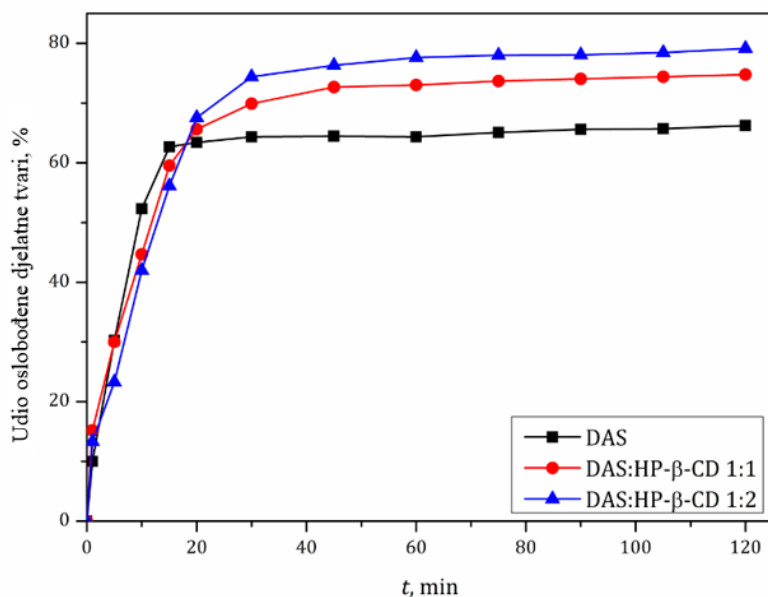
Slika 38. Sadržaj djelatne tvari u uzorcima DAS:HP- β -CD 1:2



Slika 39. Umjerni pravac

5.2.3. Podatci ispitivanja oslobađanja dasatiniba

Profili oslobađanja DAS-a iz pripremljenih tableta određeni su *in vitro* testovima otapanja. Na slici 40 prikazana je usporedba profila oslobađanja djelatne tvari iz tableta koje sadrže ishodni DAS te tableta koje sadrže mehanokemijski pripravljene komplekse u omjerima 1:1 i 1:2. Vidljivo je da kod tableta s ishodnim DAS-om dolazi do rapidnog oslobađanja djelatne tvari. U prvih 15 minuta oslobođen je maksimalni udio djelatne tvari. DAS ima izražen učinak prvog prolaza u kojem se lijek metabolizira na određenom mjestu u tijelu. Tako se smanjuje koncentracija djelatne tvari nakon što dopiye na mjesto djelovanja što nikako nije poželjno, osobito za antitumorske lijekove. Učinak prvog prolaza često je povezan s jetrom, glavnim mjestom metabolizma lijeka. Kada se uzimaju oralno, takvi se lijekovi brzo metaboliziraju putem učinka prvog prolaska, što zahtijeva da njihove oralne doze budu puno veće od intravenskih doza. Ovaj učinak utječe i na maksimalne koncentracije lijeka i to na način da se pojave puno ranije nego što bi to bilo korištenjem parenetralnog dozirnog oblika što je i vidljivo iz dobivenih rezultata za ishodni DAS.⁷⁶ U slučaju kompleksa, konačni udio oslobođene djelatne tvari povećan je s otprilike 60 % na 80 %. Može se zaključiti da tablete koje sadrže komplekse pokazuju povećanu topljivost, a samim time i povećan udio oslobođene djelatne tvari što doprinosi oralnoj apsorpciji i potencijalno bioraspoloživosti. Maksimalni udio oslobođen je nakon približno sat vremena. Iz navedenoga je vidljivo da osim povećanja udjela oslobođene tvari dolazi i do produljenja vremena oslobađanja. Produljeno vrijeme oslobađanja od velike je važnosti jer DAS ima izražen efekt prvog prolaska lijeka. Konačni udio oslobođene djelatne tvari u vremenu $t=120$ minuta dan je u tablici 9.



Slika 40. Usporedni prikaz profila oslobađanja djelatne tvari iz tableta koje sadrže: ishodnu djelatnu tvar, kompleks u omjeru 1:1 i kompleks u omjeru 1:2

Tablica 10. Konačni udio oslobođene djelatne tvari u vremenu $t=120$ min

Uzorak	Konačni udjel oslobođene djelatne tvari, %
DAS	66,22
DAS:HP- β -CD 1:1	74,76
DAS:HP- β -CD 1:2	79,12

5.2.4. Podatci matematičkog opisa oslobađanja djelatne tvari

Matematičkim modelima dodatno su opisani prethodno dobiveni profili oslobađanja djelatne tvari iz tableta koje sadrže ishodni DAS te inkluzijske komplekse DAS:HP- β -CD 1:1 i DAS:HP- β -CD 1:2.

Za obradu podataka korišten je *DDSolver*, programski dodatak za Microsoft Excel. DDSolver koristi se za farmakokinetičke i farmakodinamičke analize. Osmišljen je kako bi omogućio istraživačima i stručnjacima u području biomedicine, farmacije i srodnih znanosti jednostavan način za analizu i modeliranje podataka vezanih uz distribuciju, metabolizam, izlučivanje i djelovanje lijekova. U okviru ovog istraživanja korišten je za analizu kinetike oslobađanja djelatne tvari s prethodno ugrađenim modelima koji se koriste u farmaceutskoj industriji. Eksperimentalno dobiveni podaci uspoređeni su sa sljedećim modelima: model nultog reda, model prvog reda, Higuchi model, Weibull model, Korsmeyer-Peppas model i Peppas-Sahlin model.

U tablicama 11-14 prikazani su parametri navedenih modela iz kojih je vidljivo da je najmanje odstupanje od eksperimentalnih podataka dobiveno je u slučaju Weibull i Peppas-Sahlin modela. Upravo ti modeli najbolje opisuju oslobađanje djelatne tvari iz pripremljenih dozirnih oblika.

Tablica 11. Parametri Higuchi modela za ispitivane uzorke

Uzorak	Parametri modela	
	$K_H, \% \text{ min}^{-0,5}$	$R_p^2, -$
DAS	12,33	0,8318
Kompleks 1:1	12,84	0,9285
Kompleks 1:2	12,99	0,9522

Tablica 12. Parametri Korsmeyer-Peppas modela za ispitivane uzorke

Uzorak	Parametri modela		
	$K_{KP}, \% \text{ min}^{-n}$	$n, -$	$R_p^2, -$
DAS	12,34	0,52	0,8049
Kompleks 1:1	15,71	0,44	0,9438
Kompleks 1:2	12,69	0,51	0,9418

Tablica 13. Parametri Peppas-Sahlin modela za ispitivane uzorke

Uzorak	Parametri modela			
	$K_1, \% \text{ min}^{-m}$	$K_2, \% \text{ min}^{-2m}$	$m, -$	$R_p^2, -$
DAS	22,44	-1,82	0,45	0,9189
Kompleks 1:1	19,73	-1,07	0,45	0,9651
Kompleks 1:2	16,50	-0,29	0,45	0,9427

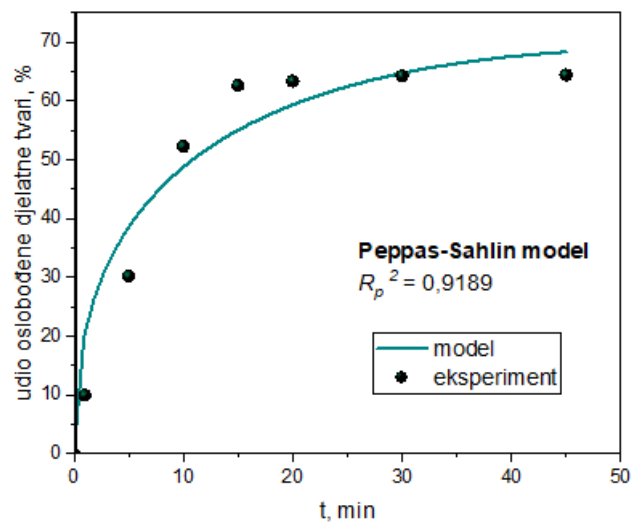
Tablica 14. Parametri Weibull modela za ispitivane uzorke

Uzorak	Parametri modela		
	$\alpha, -$	$\beta, -$	$R_p^2, -$
DAS	7,77	0,64	0,9066
Kompleks 1:1	6,23	0,59	0,9032
Kompleks 1:2	8,08	0,67	0,9718

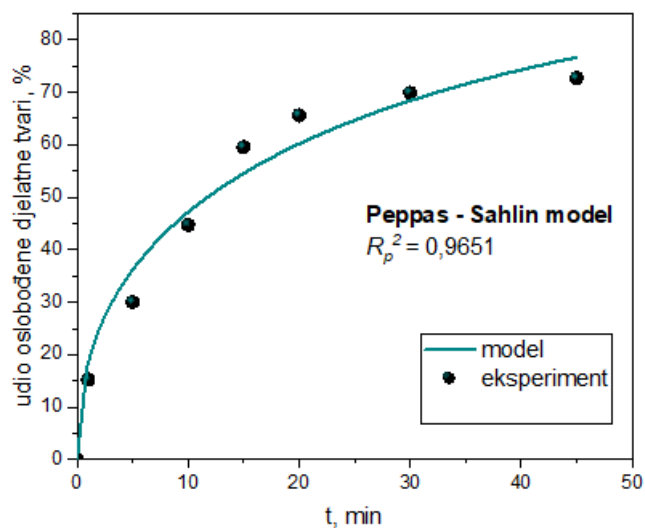
Dobivene vrijednosti R_p^2 ukazuju da Peppas-Sahlin model najbolje opisuje otpuštanje djelatne tvari iz tableta koje sadrže ishodni DAS i inkluzijski kompleks u omjeru 1:1. Otpuštanje djelatne tvari iz kompleksa omjera 1:2 ima pak najbolje poklapanje s Weibull modelom. Vrijednosti R_p^2 najmanje su za kinetiku 0. reda.

Iz tablice 14 vidljivo je da je otpuštanje djelatne tvari iz tableta koje sadrže ishodni DAS i tableta koje sadrže kompleks u omjeru 1:1 opisano difuzijom koja ne prati Fickov zakon, model je nefikovski jer je vrijednost parametra $n > 0,5$. Za tablete koje sadrže kompleks omjera 1:2 vrijednost parametra $n > 0,5$ pa se prema tome otpuštanje djelatne tvari iz tih tableta može opisati difuzijom koja prati Fickov zakon.

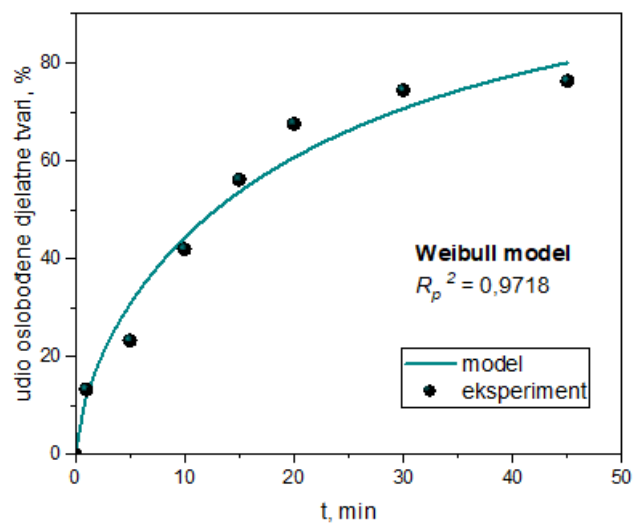
Negativni predznaci konstanti K_2 ukazuju na usporavanje procesa erozije s vremenom. Usporedbom apsolutnih vrijednosti konstanti K_1 i K_2 iz tablice 13 vidljivo je da kod svih uzoraka dominira process difuzije.



Slika 41. Testiranje primjenjivosti Peppas-Sahlin modela u opisu profila oslobađanja DAS-a iz tableta koje sadrže netretirani DAS



Slika 42. Testiranje primjenjivosti Peppas-Sahlin modela u opisu profila oslobađanja DAS-a iz tableta koje sadrže kompleks u omjeru 1:1



Slika 43. Testiranje primjenjivosti Weibull modela u opisu profila oslobađanja DAS-a iz tableta koje sadrže kompleks u omjeru 1:2

6. ZAKLJUČAK

Mehanokemijski su pripremljeni inkluzijski kompleksi dasatiniba i hidroksipropil- β -ciklodekstrina u različitim masenim omjerima. Pripremljeni uzorci karakterizirani su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom, rendgenskom difrakcijskom analizom praha, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama te nuklearnom magnetskom rezonancijom.

Termogrami DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2 poprimaju karakteristike termograma HP- β -CD-a što može potencijalno ukazati da je došlo do stvaranja inkluzijskog kompleksa. Relativni stupanj kristalnosti DAS-a u uzorcima inkluzijskih kompleksa manji je u odnosu na teorijsku vrijednost.

Difraktogrami HP- β -CD-a i kompleksa DAS:HP- β -CD 1:1 i 1:2 ne pokazuju karakteristične difrakcijske maksimume kao što je slučaj kod kristalne strukture DAS-a. Rendgenska difrakcijska analiza ukazuje da je došlo do uspješne amorfizacije djelatne tvari koja pogoduje ulasku hidrofobnog lijeka u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina.

FTIR analizom DAS-a dobiveni su spektri kompleksa koji nalikuju na spektar ishodnog HP- β -CD-a. Intenzitet vrpce DAS-a u kompleksima je vidljivo smanjen dok je intenzitet HP- β -CD-a ostao isti što ukazuje na potencijalnu ugradnju DAS-a u ciklodekstrin.

NMR spektrima detektirane su promjene u kemijskim pomacima. NMR analiza ukazuje na ulazak alifatskog djela molekule DAS-a u strukturu ciklodekstrina odnosno na uspješno nastajanje kompleksa HP- β -CD-a i DAS-a. Ostale metode analize potvrđuju ovo saznanje.

Uzorci DAS:HP- β -CD u omjeru 1:2 pokazuju puno bolju ujednačenost sadržaja djelatne tvari u odnosu na DAS:HP- β -CD 1:1. Pripravom inkluzijskih kompleksa povećan je konačni udjel oslobođene djelatne tvari s otprilike 60 % na 80 %. Postignuto je i produljeno vrijeme oslobađanja čime se smanjuje efekt mehanizma prvog prolaska djelatne tvari.

Primjenom programskog dodatka *DDSolver* testirana je primjenjivost matematičkih modela za opis oslobađanja djelatne tvari iz pripremljenih tableta. Peppas-Sahlin poluempirijski i Weibull empirijski modeli pokazuju najbolje slaganje s eksperimentalnim podacima topljivosti.

Rezultati istraživanja dokazuju mehanokemijsku pripravu inkluzijskih kompleksa. Tablete s inkludiranim dasatinibom pokazuju poboljšanu topljivost, ali i modifikaciju k ciljanom profilu oslobađanja. Ove promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima mogu značajno poboljšati terapijsku učinkovitost dasatiniba, a samim time otvaraju se nove mogućnosti za razvoj učinkovitijih i sigurnijih farmaceutskih formulacija.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo mentoru prof. dr. sc. Krunoslavu Žižeku na prenesenom znanju, uloženom trudu, radu, vremenu, dobroj volji i susretljivosti tijekom izrade ovog rada.

Također, puno hvala asistentici Katarini Sokač, mag. ing. cheming. koja je svojim znanjem, strpljenjem i uložnim vremenom uvelike doprinjela izradi ovog rada.

Na kraju zahvaljujemo obitelji i prijateljima koji su nam bili podrška tijekom cijelog studiranja.

8. LITERATURA

1. Mrežna stranica <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26716/Leukemije.html> (pristup 17. 6. 2024.)
2. Mrežna stranica <https://www.onkologija.hr/leukemija/leukemija-lijecenje/> (pristup 17. 6. 2024.)
3. K. Sokač, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, K. Žižek, Polymeric Amorphous Solid Dispersions of Dasatinib: Formulation and Ecotoxicological Assessment, *Pharmaceutics* (2024) 16(4), 551.
4. J. Li, C. Gong, H. Zhou, J. Liu, X. Xia, W. Ha, Y. Jiang, Q. Liu, H. Xiong, Kinase Inhibitors and Kinase-Targeted Cancer Therapies: Recent Advances and Future Perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* (2024) 25(10), 5489.
5. B. G. Poulson, Q. A. Alsulami, A. Sharfalddin, E. F. El Agammy, F. Mouffouk, A.-H. Emwas, L. Jaremko, M. Jaremko, Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications, (2022)
6. F. L. O. Da Silva, M. B. F. Marques, K. C. Kato, G. Carneiro, Nanonization techniques to overcome poor water-solubility with drugs, *Expert. Opin. Drug. Discov.* (2020) 15(4), 1-12.
7. S. Patel, S. Chopra, S. Chaurasia, M. Sarwat, Plant based Bioavailability Enhancers, *Curr. Pharm. Des.* (2022) 28(8), 642-654.
8. A. Budiman, A. Rusdin, D.L. Aulifa, Current Techniques of Water Solubility Improvement for Antioxidant Compounds and Their Correlation with Its Activity: Molecular Pharmaceutics, *Antioxidants* (2023) 12(2), 378.
9. N. Nainwal, R. Singh, S. Jawla, V.A. Saharan, The Solubility-Permeability Interplay for Solubility-Enabling Oral Formulations, *Curr. Drug Targets.* (2019) 20(14), 1434-1446.
10. D. Levêque, G. Becker, K. Bilger, S. Natarajan-Amé, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dasatinib, *Clin. Pharmacokinet.* (2020) 59(7), 849-856.
11. K. Jindal, Review on solubility: A mandatory tool for pharmaceuticals, *Int. Res. J. Pharm.* (2017) 8(11), 11-15.
12. Center for Drug Evaluation and Research, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a

- Biopharmaceutics Classification System, Research, Food and Drug Administration (FDA) (2007).
13. L. Chen, E. Hu, P. Shen, S. Qian, W. Heng, J. Zhang, Y. Gao, Y. Wei, Development of Amorphous Solid Dispersion Sustained-Release Formulations with Polymer Composite Matrix-Regulated Stable Release Plateaus, *Pharm. Res.* (2024) 41(6), 1233-1245.
 14. A. Ziaee, S. O'Dea, A. Howard-Hildige, L. Padrela, C. Potter, J. Iqbal, E. J. O'Reilly, Amorphous Solid Dispersion of Ibuprofen: A Comparative Study on the Effect of Solution Based Techniques, *Int. J. Pharm.* (2019) 527, 118816.
 15. R. B. Chavan, A. Lodagekar, B. Yadav, N. R. Shastri, Amorphous solid dispersion of nisoldipine by solvent evaporation technique: preparation, characterization, in vitro, in vivo evaluation, and scale up feasibility study, *Drug Deliv. Transl. Res.* (2020) 10(4), 903-918.
 16. H. Almeida H, B. Ferreira, C. Fernandes-Lopes, F. Araújo, M. J. Bonifácio, T. Vasconcelos, B. Sarmento, Third-Generation Solid Dispersion Through Lyophilization Enhanced Oral Bioavailability of Resveratrol, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* (2024) 7(3), 888-898.
 17. Q. Zhang, Z. Feng, W. Ren, Y. Zhao, A. V. Dushkin, W. Su, Preparation of olmesartan medoxomil solid dispersion with sustained release performance by mechanochemical technology, *Drug Deliv. Transl. Res.* (2022) 12(3), 589-602.
 18. L. Patil, U. Verma, R. Rajput, P. Patil, A. Chatterjee, J. Naik, Development of olanzapine solid dispersion by spray drying technique using screening design for solubility enhancement, *ADMET. DMPK.* (2023) 11(4), 615-627.
 19. T. Gera, E. Nagy, T. Smausz, J. Budai, T. Ajtai, F. Kun-Szabó, B. Hopp, Application of pulsed laser ablation (PLA) for the size reduction of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), *Sci. Rep.* (2020) 10(1), 15806.
 20. T. Sosna, M. Mikeska, O. Dutko, G.S. Martynková, K. Škrlová, K. Č. Barabaszová, K. Dčedková, P. Peikertová, D. Plachá, Micronization of Ibuprofen Particles Using Supercritical Fluid Technology, *J. Nanosci. Nanotechnol.* (2019) 19(5), 2814-2820.
 21. R. Sun, C. Shen, S. Shafique, O. Mustapha, T. Hussain, I. U. Khan, Y. Mehmood, K. Answer, Y. Shahzad, A. M. Yousaf, Electrosprayed Polymeric Nanospheres for Enhanced Solubility, Dissolution Rate, Oral Bioavailability and Antihyperlipidemic Activity of Bezafibrate, *Int. J. Nanomedicine* (2020) 15, 705-715.

22. S. Sharif, S. Muneer, T. Wang, E. L. Izake, N. Islam, Robust Wet Milling Technique for Producing Micronized Ibuprofen Particles with Improved Solubility and Dissolution, *AAPS PharmSciTech* (2022) 24(1), 16.
23. H. Maeda, R. Shiobara, M. Tanaka, A. Kajinami, H. Nakayama, Effect of mechanochemical inclusion of triamterene into sulfobutylether- β -cyclodextrin and its improved dissolution behavior, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2020) 47(4) 1-25.
24. X. Li, M. Yang, Y. Li, W. Gong, Y. Wang, L. Shan, S. Shao, C. Gao, W. Zhong, Formulation and Characterization of a Ternary Inclusion Complex Containing Hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Meglumine for Solubility Enhancement of Poorly Water-Soluble ST-246, an Anti-Smallpox Drug, *Curr. Drug Deliv.* (2017) 14(8), 1130-1143.
25. B. D. S Lima, C. A. Campos, A. C. R. da Silva Santos, V. C. N. Santos, G. D. G. G. Trindade, S. Shanmugam, E. W. M. Pereira, R. N. Marreto, M. C. Duarte, J. R. G. D. S. Almeida, J. S. S. Quintans, L. J. Jr Quintans, A. S. S. Araújo, Development of morin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects, *Food Chem. Toxicol.* (2019) 126, 15-24.
26. S. Awais, N. Farooq, S. A. Muhammad, H. A. El-Serehy, F. Ishtiaq, M. Afridi, H. Ahsan, A. Ullah, T. Nadeem, K. Sultana, Enhanced Solubility and Stability of Aripiprazole in Binary and Ternary Inclusion Complexes Using Hydroxy Propyl Beta Cyclodextrin (HP β CD) and L-Arginine, *Molecules* (2023) 28(9), 3860.
27. M. Bashir, H. K. Syed, S. Asghar, M. Irfan, N. Aslam, M. S. Iqbal, I. U. Khan, P. A. Shah, N. R. Khan, J. Ahmad, M. Saleem, M. Asif, Binary inclusion complexes of diflunisal with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and characterization, *Pak. J. Pharm. Sci.* (2020) 33(5), 2307-2315.
28. O. Dwichandra Putra, D. Umeda, E. Fujita, T. Haraguchi, T. Uchida, E. Yonemochi, H. Uekusa, Solubility Improvement of Benexate through Salt Formation Using Artificial Sweetener, *Pharmaceutics* (2018) 10(2), 64.
29. I. Radojčić Redovniković, Zelena otapala, Osvježimo znanje, *Kem. Ind.* (2020) 69(11-12), 670-671.
30. M. Solares-Briones, G. Coyote-Dotor, J.C. Páez-Franco, M.R. Zermeño-Ortega, C.M. de la O Contreras, D. Canseco-González, A. Avila-Sorrosa, D. Morales-Morales, J.M. Germán-Acacio, Mechanochemistry: A Green Approach in the Preparation of Pharmaceutical Cocrystals, *Pharmaceutics* (2021) 13(6), 790.

31. M. Jug, P. A. Mura, Grinding as Solvent-Free Green Chemistry Approach for Cyclodextrin Inclusion Complex Preparation in the Solid State, *Pharmaceutics* (2018) 10(4), 189.
32. M. Promzeleva, T. Volkova, A. Proshin, O. Siluykov, A. Mazur, P. Tolstoy, S. Ivanov, F. Kamilov, I. Terekhova, Improved Biopharmaceutical Properties of Oral Formulations of 1,2,4-Thiadiazole Derivative with Cyclodextrins: In Vitro and in Vivo Evaluation, *ACS Biomater. Sci. Eng.* (2018) 4, 491-501.
33. H. R. H. Ali, I. Y. Saleem, H. M Tawfeek, Insight into inclusion complexation of indomethacin nicotinamide cocrystals, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* (2016) 84, 179-188.
34. S. Li, Y. Zhai, J. Yan, L. Wang, K. Xu, H. Li, Effect of preparation processes and structural insight into the supermolecular system: Bisacodyl and β -cyclodextrin inclusion complex, *Mater. Sci. Eng. C* (2016) 58, 224-232.
35. M. Paczkowska, A. F. McDonagh, K. Bialek, L. Tajber, J. Cielecka-Piontek, Mechanochemical activation with cyclodextrins followed by compaction as an effective approach to improving dissolution of rutin, *Int. J. Pharm.* (2020) 581, 119294.
36. W. Su, N. E. Polyakov, W. Xu, W. Su, Preparation of astaxanthin micelles self-assembled by a mechanochemical method from hydroxypropyl β -cyclodextrin and glyceryl monostearate with enhanced antioxidant activity, *Int. J. Pharm.* (2021) 605, 120799.
37. S. d'Agostino, A. Azzali, L. Casali, P. Taddei, F. Grepioni, Environmentally Friendly Sunscreens: Mechanochemical Synthesis and Characterization of β -CD Inclusion Complexes of Avobenzone and Octinoxate with Improved Photostability, *ACS Sustain. Chem. Eng.* (2020) 8 (35), 13111-13526.
38. N. C. Cabrera-Quñones, L. J. López-Méndez, P. Guadarrama, Inclusion and Non-Inclusion Complexes between Curcumin and β -Cyclodextrin with High-Curcumin Loading and Enhanced Aqueous Solubility Obtained by Mechanochemistry, *ChemistrySelect* (2023) 8(45), e202303254.
39. E. Shahrazad, UV-Vis Spectroscopic Characterization of β -Cyclodextrin-Vanillin Inclusion Complex, *Mediterr. J. Chem.* (2022) 12(2), 175-183
40. A. Cid-Samamed, J. Rakmai, J.C. Mejuto, J. Simal-Gandara, G. Astray, Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications, *Food Chem.* (2022) 384(3), 132467.

41. Á. Haimhoffer, Á. Rusznyák, K. Réti-Nagy, G. Vasvári, J. Váradi, M. Vecsernyés, I. Bácskay, P. Fehér, Z. Ujhelyi, F. Fenyvesi, Cyclodextrins in Drug Delivery Systems and Their Effects on Biological Barriers, *Sci. Pharm.* (2019) 87(4), 33.
42. G. Kali, S. Haddadzadegan, A. Bernkop-Schnürch, Cyclodextrins and derivatives in drug delivery: New developments, relevant clinical trials, and advanced products, (2024)
43. Mrežna stranica
https://halmed.hr/upl/lijekovi/PIL/Dasatinib-Teva-PIL_3.pdf (pristup 12. 3. 2024.)
44. C. Wang, M. Wang, P. Chen, J. Wang, Y. Le, Dasatinib Nanoemulsion and Nanocrystal for Enhanced Oral Drug Delivery, *Pharmaceutics* (2022) 14(1), 197.
45. Mrežna stranica
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dasatinib>. (pristup 17. 3. 2024.)
46. Mrežna stranica
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/HP-beta-CD>. (pristup 18. 3. 2024.)
47. Mrežna stranica
<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/marketing-authorisation/product-information-requirements/excipients-labelling> (pristup 20. 4. 2024.)
48. Mrežna stranica
<https://www.pharmaexcipients.com/pharmaceutical-excipients-some-definition/> (pristup 20. 4. 2024.)
49. Mrežna stranica
<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/pharmaceutical-and-biopharmaceutical-manufacturing/solid-formulation-strategies/mannitol-excipient-solid-drug-formulation#mannitol> (pristup 20. 4. 2024.)
50. S. Bauhuber, G. Warnke, A. Berardi, Disintegrant Selection in Hydrophobic Tablet Formulations, *J. Pharm. Sci.* (2021) 110(5), 2028-2037.
51. D. Kapoor, R. Maheshwari, K. Verma, S. Sharma, P. Ghode, R. K. Tekade, Chapter 14 - Coating technologies in pharmaceutical product development, *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Drug Delivery Systems*, (2020) 665-719.
52. Mrežna stranica
<https://www.pharmaexcipients.com/binders/> (pristup 19. 5. 2024.)

53. J. Macan, nastavni tekst, Metode toplinske analize
[file:///C:/Users/sarav/OneDrive/Pictures/TA_skripta_V01s\[3\].pdf](file:///C:/Users/sarav/OneDrive/Pictures/TA_skripta_V01s[3].pdf)
54. C. Leyva-Porras, P. Cruz-Alcantar, V. Espinosa-Solís, E. Martínez-Guerra, C. I. Piñón-Balderrama, I. Compean Martínez, M. Z. Saavedra-Leos, Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries, *Polymers* (2020) 12(1), 5.
55. Mrežna stranica
<http://www.xrpd.eu/> (pristup 6. 6. 2024.)
56. D. Louër, Powder X-Ray Diffraction, Applications, Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (2017) 723-731.
57. N. K. Thakral, R. Zanon, R. C. Kelly, S. Thakral, Applications of Powder X-ray diffraction in small molecule pharmaceuticals: achievements and aspirations, *J. Pharm. Sci.* (2018) 107(12), 2969-2982.
58. J. Epp, X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization, Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods, (2016) 81-124.
59. A. J. M. Horvat, O nazivima spektrometrija i spektroskopija, Imenje i nazivlje u kemiji i kemijskom inženjerstvu, *Kem. Ind.* (2015) 64 (9-10), 530-531.
60. I. Škorić, nastavni tekst, Molekulska spektroskopija
https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf
61. T. K. Špehar, M. Pocrnić, D. Klarić, B. Bertoša, A. Čikoš, M. Jug, J. Padovan, S. Dragojević, N. Galić, Investigation of Praziquantel/Cyclodextrin Inclusion Complexation by NMR and LC-HRMS/MS: Mechanism, Solubility, Chemical Stability, and Degradation Products, *Mol. Pharm.* (2021) 18(11), 4210-4223.
62. K. Žižek, Granuliranje, Osvježimo znanje, *Kem. Ind.* (2021) 70(5-6), 329-330.
63. I. Mašić, I. Ilić, R. Dreu, S. Ibrić, J. Parojčić, S. Srčić, Melt granulation in fluidized bed: a comparative study of spray-on versus in situ procedure, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2014) 40(1) 23-32.
64. J. C. Lobos de Ponga, J. Piña, I. M. Cotabarren, Fluidized Bed Co-Melt Granulation: New Insights in the Influence of Process Variables and Validation of Regime Map Theory, *Powders* (2023) 2(3), 639-658.
65. K. Sokač, T. Prebeg, J. Barbarić, K. Žižek, Improving the release rate of lurasidone hydrochloride from fast disintegrating tablets using green solvent evaporation technique. *J. Dispers. Sci. Technol.* (2023) 1-10.

66. M. Picollo, M. Aceto, T. Vitorino, UV-Vis spectroscopy, *Phys. Sci. Rev.* (2018) 4(4), 20180008.
67. S. He, J. Bian, Q. Shao, Y. Zhang, X. Hao, X. Luo, Y. Feng, L. Huang, Therapeutic Drug Monitoring and Individualized Medicine of Dasatinib: Focus on Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *Front. Pharmacol.* (2021) 12(6), 797881.
68. P. M. Salve, S. V. Sonawane, M. B. Patil, R. K. Surawase, Dissolution and Dissolution Test Apparatus: A Review, *Asian J. Res. Pharm. Sci.* (2021) 11(3), 229-236.
69. K. Sokač, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, K. Žižek, Polymeric Amorphous Solid Dispersions of Dasatinib: Formulation and Ecotoxicological Assessment, *Pharmaceutics* (2024) 16(4), 551.
70. M. L. Bruschi, Mathematical models of drug release, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, (2015), 63-86.
71. A. Elmas, G. Akyuz, A. Bergal, M. Andac, O. Andac, Mathematical Modelling of Drug Release, *Res. Eng. Struct. Mater.* (2020) 6(4), 327-350.
72. A. Cutrignelli, F. Sanarica, A. Lopalco, A. Lopedota, V. Laquintana, M. Franco, B. Boccanegra, P. Mantuano, A. De Luca, N. Denora, Dasatinib/HP- β -CD Inclusion Complex Based Aqueous Formulation as a Promising Tool for the Treatment of Paediatric Neuromuscular Disorders, *Int. J. Mol. Sci.* (2019) 20(3), 591.
73. D. Han, Z. Han, L. Liu, Y. Wang, S. Xin, H. Zhang, Z. Yu, Solubility Enhancement of Myricetin by Inclusion Complexation with Heptakis-O-(2-Hydroxypropyl)- β -Cyclodextrin: A Joint Experimental and Theoretical Study, *Int. J. Mol. Sci.* (2020) 21(3), 766.
74. Huang, H. Guo, Q. Xie, W. Jin, R. Zeng, Z. Hong, Yi. Zhang, Yu. Zhang, Preparation and Embedding Characterization of Hydroxypropyl- β -cyclodextrin/Menthyl Acetate Microcapsules with Enhanced Stability, *Pharmaceutics* (2023) 15(7), 1979.
75. A. Naeem, C. Yu, Z. Zang, W. Zhu, X. Deng, Y. Guan, Synthesis and Evaluation of Rutin-Hydroxypropyl β -Cyclodextrin Inclusion Complexes Embedded in Xanthan Gum-Based (HPMC-g-AMPS) Hydrogels for Oral Controlled Drug Delivery, *Antioxidants* (2023) 12(3), 552.
76. T. F. Herman, C. Santos, First-Pass Effect, StatPearls, (2023)

SAŽETAK

Andrea Pleić i Sara Vranko

TABLETE POBOLJŠANIH SVOJSTAVA ZA LIJEČENJE LEUKEMIJE – ZELENA PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA

Dasatinib je antikancerogeni lijek koji se koristi u liječenju kronične mijeloične i akutne limfoblastične leukemije. Zbog svoje slabe topljivosti u vodenom mediju ima ograničenu bioraspoloživost. S ciljem povećanja njegove topljivosti te postizanja ciljanog profila oslobađanja pripravljeni su inkluzijski kompleksi s hidroksipropil- β -ciklodekstrinom mljevenjem u planetarnom kugličnom mlinu. Mehanokemijska aktivacija omogućuje pripravu bez primjene otapala poštujući načela zelene kemije, a istovremeno poboljšavaju topljivost i bioraspoloživost dasatiniba.

Pripravljeni uzorci karakterizirani su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom, rendgenskom difrakcijom na praškastom uzorku, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama i nuklearnom magnetskom rezonancijom. Detaljna analiza potvrdila je mehanokemijsku sintezu inkluzijskog kompleksa dasatiniba. Inkluzijski kompleksi i granulati pomoćnih tvari korišteni su u pripravi tableta.

Dobivene tablete karakterizirane su pomoću standardiziranih farmaceutskih testova u skladu s preporukama Europske farmakopeje. Rezultati testiranja pokazali su poboljšanje topljivosti i oslobađanja djelatne tvari u usporedbi s čistim dasatinibom, što ukazuje na potencijalno poboljšanje bioraspoloživosti i terapijske učinkovitosti lijeka. Rezultati matematičkog modeliranja pokazuju profil oslobađanja koji slijedi Peppas-Sahlinov i Weibullov model.

Ovo istraživanje jasno ukazuje na potencijal inkluzijskih kompleksa s hidroksipropil- β -ciklodekstrinom za poboljšanje bioraspoloživosti i efikasnosti dasatiniba, što može pridonijeti boljem ishodu liječenja leukemije.

Ključne riječi:

dasatinib, inkluzijski kompleksi, makrociklički receptori, mehanokemijska aktivacija, oslobađanje djelatne tvari

ABSTRACT

Andrea Pleić and Sara Vranko

TABLETS WITH IMPROVED PROPERTIES FOR THE TREATMENT OF LEUKEMIA – GREEN PREPARATION AND CHARACTERIZATION

Dasatinib is an anticancer drug used in the treatment of chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia. Due to its poor solubility in aqueous medium, it has limited bioavailability. To increase its solubility and to achieve the aimed release profile, inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin were prepared by milling in a planetary ball mill. Mechanochemical activation allows for preparation without the use of solvents, following the principles of green chemistry while simultaneously improving the solubility and bioavailability of dasatinib.

Prepared samples were characterized by differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, Fourier-transform infrared spectroscopy, and nuclear magnetic resonance. Detailed analysis confirmed mechanochemical synthesis of the inclusion complex of dasatinib. The inclusion complexes and granulates of excipients were used in the preparation of tablets.

Obtained tablets were characterized using standardized pharmaceutical tests in accordance with the European Pharmacopoeia recommendations. Testing results showed an improvement in solubility and drug release compared to pure dasatinib, indicating a potential enhancement in bioavailability and therapeutic efficacy of drug product. Results of mathematical modelling demonstrated a release profile following Peppas-Sahlin and Weibull model.

This research clearly indicates the potential of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes to enhance the bioavailability and efficiency of dasatinib, which may contribute to better treatment outcomes for leukemia.

Keywords:

dasatinib, inclusion complexes, macrocyclic receptors, mechanochemical activation, drug release