Oblikovanje i vrednovanje ciklodekstrinskih terapijskih sustava za oralnu primjenu zaleplona

Jablan, Jasna

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:755257

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Jasna Jablan

OBLIKOVANJE I VREDNOVANJE CIKLODEKSTRINSKIH TERAPIJSKIH SUSTAVA ZA ORALNU PRIMJENU ZALEPLONA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Jasna Jablan

FORMULATION AND EVALUATION OF CYCLODEXTRIN-BASED DRUG DELIVERY SYSTEM FOR ORAL APPLICATION OF ZALEPLON

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Jasna Jablan

OBLIKOVANJE I VREDNOVANJE CIKLODEKSTRINSKIH TERAPIJSKIH SUSTAVA ZA ORALNU PRIMJENU ZALEPLONA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Doc. dr. sc. Mario Jug Prof.
dr. sc. Nikola Kujundžić

Zagreb, 2014



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Jasna Jablan

FORMULATION AND EVALUATION OF CYCLODEXTRIN-BASED DRUG DELIVERY SYSTEM FOR ORAL APPLICATION OF ZALEPLON

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Doc. dr. sc. Mario Jug Prof.
dr. sc. Nikola Kujundžić

Zagreb, 2014

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za analitičku kemiju i Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

I see the morning light
I see the morning light
Well, it’s not because
I’m an early riser
I didn’t go to sleep last night
(Walkin' Down The Line by Bob Dylan)

Zahvale:

Prof. dr. sc. Nikoli Kujundžiću veliko hvala na ukazanom povjerenju, nesebičnoj pomoći, savjetima i potpori tijekom svih godina rada. Uvijek je bio šef kakvog bi mnogi voljeli imati. Profesore, hvala Vam za sve!

Doc. dr. sc. Mariju Jugu na svim savjetima, idejama, i znanju koje mi je nesebično prenio. Osim što je bio izniman mentor, na prvom mjestu je iskren i predivan prijatelj i na tome mu veliko hvala.

Mojim prijateljicama, Nensi, Ivani, Maji i Ani, najiskrenije hvala na bezrezervnoj pomoći u svakoj prilici kada sam ih trebala i na svim našim "babinjacima" koji su bili od velike pomoći i u izradi ovog rada.

Mojim svim suradnicima sa Zavoda za analitičku kemiju hvala na podršci, savjetima i ugodnim druženjima.

Svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju zahvaljujem se na pomoći i susretljivosti.

Iskreno zahvaljujem prof. dr. sc. Miri Bećirević na brojnim savjetima i velikoj potpori.

Hvala Mariju i Tinu na bezrezervnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Prof. dr. sc. Katalin Köver, prof. dr. sc. Paoli Muri, prof. dr. sc. Gáboru Szalontai, dr. sc. Ivici Điloviću, dr.sc. Vilku Smrečkom na ukazanoj prilici i suradnji.

Mojoj dragoj prijateljici Sanji hvala na dugogodišnjem prijateljstvu i za sve SEM-ove koji su uljepšali ovaj rad.

Veliko hvala Iveku na svakoj toploj riječi, na svakom savjetu što si podijelio samnom, ponosna sam što sam radila s tobom, što si mi bio prijatelj.

Svojoj obitelji, na beskrajnom razumijevanju i strpljenju, bezuvjetnoj i stalnoj potpori bez koje ne bi ni bilo ovog rada.

Najviše od svega hvala mojim roditeljima, koji iako kilometrima daleko su uvijek bili uz mene, na njihovoj bezrezervnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju od najranijih dana. Mama i tata, hvala vam za sve, volim vas!

SAŽETAK

Nesanica je jedan od najčešćih poremećaja spavanja koji zahvaća oko 30% odrasle populacije, a značajno je češći kod starije populacije i psihičkih bolesnika. Zahvaljujući svojim farmakološkim svojstvima, zaleplon je hipnotik izbora za kratkotrajno liječenje nesanice. No, slaba topljivost i razgradnja u jetri ograničavaju mu oralnu bioraspoloživost na samo 30%. Stoga je cilj ovog rada pripremom inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima poboljšati topljivost lijeka u vodi, a uklapanjem u oblik s kontroliranim oslobađanjem razviti novi terapijski sustav koji bi mogao znatno unaprijediti terapijsku učinkovitost ovog lijeka.

Spektrofluorimetrijska i solubilizacijska ispitivanja su pokazala da β-ciklodekstrin sa zaleplonom stvara komplekse prikladne stabilnosti, no topljivost nastalog kompleksa je ograničena. Od kemijski modificiranih derivata, nasumično metilirani β-ciklodekstrin se pokazao najprikladnijim, dok je topljivost i stabilnost inkluzijskih kompleksa zaleplona sa sulfobutil-β-ciklodekstrinom i hidroksipropil-β-ciklodekstrinom nešto niža. Nastajanje inkluzijskih kompleksa s navedenim derivatima ciklodekstrina je potvrđeno primjenom ^{1}H NMR spektroskopije, a određena je i njihova struktura. Sustav karakterizira istovremeno postojanje dva načina vezanja. Prvi, dominantni način uključuje inkluziju fenilnog prstena molekule zaleplona u centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina, a drugi inkluziju pirazolo[1,5-a] pirimidinskog prstena molekule lijeka, dok je nastajanje kompleksa višeg reda isključeno. Termodinamička ispitivanja su pokazala da je nastajanje kompleksa zaleplona s β-ciklodekstrinom i njegovim metiliranim i hidroksipropiliranim derivatima entalpijom uvjetovani proces, dok je kompleksiranje lijeka sa sulfobutil-β-ciklodekstrinom entropijom vođen proces. U oba je slučaja riječ o spontanom procesu.

Dodatkom hipromeloze je značajno povećan solubilizacijski potencijal metiliranog β-ciklodekstrina uslijed nastajanja ternarnih kompleksa lijek-ciklodekstrin-polimer, dok hidrofilni polimeri nisu utjecali na topljivost i stabilnost kompleksa zaleplona s β-ciklodekstrinom. Binarni i ternarni kompleski zaleplona s navedenim ciklodekstrinima i hidrofilnim polimerima u čvrstom stanju pripremljeni su tehnikom sušenja raspršivanjem. Diferencijalna pretražna kalorimetrija, difrakcija rentgenskih zraka na prašku te pretražna elektronska mikroskopija su pokazale djelomičnu amorfizaciju lijeka u binarnim i ternarnim kompleksima s β-ciklodekstrinom, dok su kompleksi s metiliranim-β-ciklodekstrinom bili u potpunosti amorfne strukture. Binarni kompleksi s metiliranim-β-ciklodekstrinom te ternarni kompleksi s metiliranim-β-ciklodekstrinom i hipromelozom bili su najučinkovitiji u povećanju topljivosti zaleplona u odnosu na ostale komplekse. Korištenjem manitola kao topljivog punila te ternarnog kompleksa zaleplona s metiliranim β-ciklodekstrinom i hipromelozom, pripremljene su tablete koje omogućuju oslobađanje doze lijeka u samo 5 minuta, osiguravajući brz početak djelovanja lijeka. Topljivi kompleksi zaleplona s u vodi topljivim, polimernim derivatom ciklodekstrina su pripremljeni i tehnikom mljevenja u vibracijskim mikromlinovima. Nakon 90 minuta mljevenja, pri frekvenciji od 24 Hz, dobiven je amorfni produkt koji otapanjem u vodi prelazi u inkluzijski kompleks, što je dokazano ^{1}H-NMR spektroskopijom.

Primjenom tehnike sušenja raspršivanjem pripremljene su mikrosfere s pH ovisnim oslobađanjem zaleplona kao novi terapijski sustav za liječenje nesanice, koju karakterizira prerano buđenje te nemogućnost naknadnog usnivanja. Matriks koji sadrži 80% Eudragita S100 i 20% glicerolmonostearata pokazao se optimalnim u sprječavanju neželjenog oslobađanja lijeka pri nižim pH-vrijednostima medija, dok je uklapanjem 50% doze lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa s metiliranim β-ciklodekstrinom osigurano potpuno oslobađanje lijeka u umjetnom crijevnom mediju, kinetikom nultog reda (k_0=155 μg/min).

Ključne riječi: zaleplon, ciklodekstrini, inkluzijski kompleksi, topljivost, sušenje raspršivanjem, Eudragit, mikrosfere, oslobađanje lijeka

SUMMARY

Insomnia is one of the most common sleep disorders affecting about 30% of adult population, while its prevalence is even higher among elderly and psychiatric patients. Pharmacological properties make zaleplon the drug of choice for the short term treatment of insomnia, but its low aqueous solubility and intensive metabolism in liver are reducing its oral bioavailability to only 30%. Therefore, the aim of this work was to improve aqueous solubility of zaleplon through inclusion complexation and to develop a novel drug delivery system able to enhance its therapeutical efficiency.

Spectrofluorimetric and phase solubility studies showed that parent β-cyclodextrin forms stable inclusion complexes with zaleplon, but aqueous solubility of the complexes formed was limited. Among chemically modified β-cyclodextrin derivatives, randomly methylated derivative was the most efficient, while the solubility and stability of zaleplon complexes with sulphobutyl- and hydroxypropyl-β-cyclodextrin was less pronounced. The inclusion complex formation in all cases was confirmed by ^{1}H-NMR spectroscopy. The structure of the complexes formed was characterised by the presence of two different binding modes which existed simultaneously in the solution. The first and the dominant one occurs through inclusion of phenyl moiety of the drug into central cavity of cyclodextrin molecule, while the other involves the inclusion of the pyrazolo[1,5-a]pyrimidine ring of the drug. The formation of higher order complexes was not demonstrated. Thermodynamic studies showed that complexation of zaleplon with β-cyclodextrin and its randomly methylated and hydroxypropylated derivatives was enthalpy driven, while entropy driven complexation was observed in case of sulphobutyl-β-cyclodextrin. In all cases, inclusion complex formation was a spontaneous process.

Addition of hypromellose enhanced significantly the solubilising and complexing potential of randomly methylated β-cyclodextrin due to ternary complex formation, while hydrophilic polymers had no effect on solubility and stability of zaleplon complexes with parent β-cyclodextrin. Binary and ternary zaleplon complexes with cyclodextrins and polymers tested were prepared by spray-drying. Differential scanning calorimetry, X-ray powder diffractometry and scanning electron microscopy showed only partial drug amorphization of the drug in binary and ternary complexes with β-cyclodextrin, while all complexes with randomly methylated β-cyclodextrin were completely amorphous. The inclusion complex formation in spray-dried products was confirmed by the solid state NMR. Binary and ternary complexes with randomly methylated β-cyclodextrin and hypromellose were the most efficient in increasing the dissolution rate of zaleplon. The use of mannitol as a soluble filler and ternary inclusion complex with randomly methylated β-cyclodextrin and hypromellose allowed formulation of tablets which released the complete drug dose in 5 minutes, providing fast onset of drug action. Highly soluble zaleplon complexes with soluble, polymeric β-cyclodextrin derivative were also prepared by co-grinding in high energy vibrational micromill. Co-grinding at frequency of 24 Hz resulted in an amorphous product which is readily soluble in water, forming inclusion complexes as demonstrated by ^{1}H-NMR spectroscopy.

Spray-drying technique was used to prepare pH-responsive zaleplon microspheres with delayed release properties as a novel drug delivery system for treatment of specific type of insomnia characterised with premature awaking and inability to fall asleep again. Matrix containing 80% of Eudragit S100 and 20% of glycerol monostearate was demonstrated to be optimal, preventing the drug release at high pH-values. The incorporation of 50% of the drug dose in form of binary inclusion complex with randomly methylated β-cyclodextrin ensured complete drug release in simulated intestinal media, with the zero-order release rate (k_0=155 μg/min).

Key words: zaleplon, cyclodextrins, inclusion complexes, solubility, spray-drying, Eudragit, microspheres, pH-dependent drug release

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. TERAPIJSKI SUSTAVI ZA ORALNU PRIMJENU LIJEKA 2

1.1.1. Oralna primjena lijekova 2

1.1.2. Terapijski sustavi za oralnu primjenu 3

1.1.3. Prolazak terapijskih sustava kroz probavni sustav 6

1.1.4. Tehnike za pripremu mikrosfera i mikrokapsula 15

1.2. CIKLODEKSTRINI 19

1.2.1. Struktura i derivati ciklodekstrina 19

1.2.2. Toksikološki i regulatorni status ciklodekstrina 23

1.2.3. Mehanizam nastanka inkluzijskih kompleksa 26

1.3. ZALEPLON 31

1.3.1. Nesanica 31

1.3.2. Kemijska i farmakološka svojstva zaleplona 32

1.3.3. Terapijska učinkovitost zaleplona u odnosu na ostale hipnotike 34

2. OBRAZLOŽENJE TEME 35

3. EKSPERIMENTALNI DIO 39

3.1. MATERIJALI, REAGENSI I KEMIKALIJE 40

3.2. METODE 41

3.2.1. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa solubilizacijskim ispitivanjima 41

3.2.2. Spektrofluorimetrijska ispitivanja 42

3.2.3. ^{1}H – NMR ispitivanja 43

3.2.4. Priprema kompleksa u čvrstom stanju 45

3.2.4.1. Binarni kompleksi pripremljeni tehnikom sušenja raspršivanjem 45

3.2.4.2. Ternarni kompleksi pripremljeni tehnikom sušenja raspršivanjem 45

3.2.4.3. Priprema kompleksa u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima 46

3.2.5. Priprema mikrosfera postupkom sušenja raspršivanjem 46

3.2.5.1. Priprema mikrosfera iz etanolno-vodene otopine 46

3.2.5.2. Priprema mikrosfera iz alkalne vodeno-etanolne otopine 47

3.2.6. Priprema i tehnološka karakterizacija tableta 48

3.2.7. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) 49

3.2.8. Rentdgenska difrakcija praškastog uzorka (XRPD) 49

3.2.9. Infracrvena spektrofotometrija s Fourierovom transformacijom (FTIR) 50

3.2.10. NMR čvrstog stanja (^{13}C CP-MAS) 50

3.2.11. SEM 50

3.2.12. Tehnološko vrednovanje pripremljenih mikrosfera 51

3.2.13. In vitro oslobađanje lijeka 52

3.2.14. Statistička obrada podataka 52

4. REZULTATI I RASPRAVA 53

4.1. TOPLJIVOST I STABILNOST KOMPLEKSA ZALEPLONA S ISPITIVANIM CIKLODEKSTRINIMA 54

4.2. ^{1}H-NMR SPEKTROSKOPSKA ISPITIVANJA 69

4.3. STEHIOMETRIJA INKLUZIJSKIH KOMPLEKSA ZALEPLONA S CIKLODEKSTRINIMA 78

4.4. TERMODINAMIKA NASTAJANJA INKLUZIJSKIH KOMPLEKSA ZALEPLONA S PRIRODNIM I MODIFICIRANIM CIKLODEKSTRINIMA 79

4.4.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje termodinamičkih parametara kompleksacije 81

4.4.2. Određivanje termodinamičkih parametara kompleksacije primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije 85

4.5. NASTAJANJE TERNARNIH KOMPLEKSA U OTOPINI 90

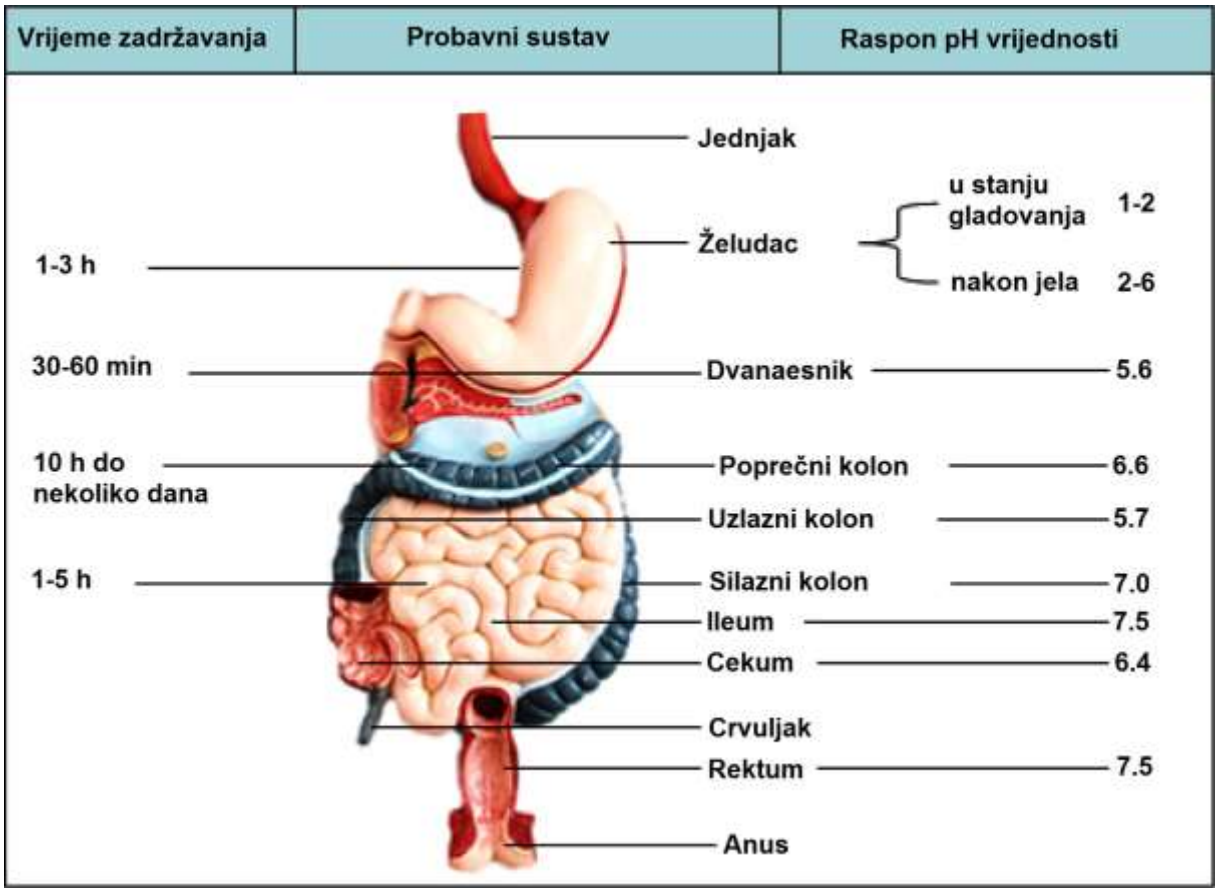
4.6. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA KOMPLEKSA U ČVRSTOM STANJU 93
4.6.1. Kompleksi pripremljeni tehnikom sušenja raspršivanjem 93
4.6.2. Kompleksi pripremljeni mljevenjem u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima 103
4.7. POTENCIJAL PRIMJENE INKLUZIJSKIH KOMPLEKSA ZALEPLONA U RAZVOJU ORALNOG OBLIKA S TRENUTNIM OSLOBAĐANJEM LIJEKA 115
4.8. EUDRAGITNE MIKROSFERE S ODGOĐENIM OSLOBAĐANJEM LIJEKA 118
4.8.1. Optimizacija postupka pripreme mikrosfera 118
4.8.2. Tehnološka svojstva mikrosfera 124
5. ZAKLJUČCI 142
6. LITERATURA 146
7. PRILOG 165
8. ŽIVOTOPIS 167

1. Uvod

1.1. Terapijski sustavi za oralnu primjenu lijeka

1.1.1. Oralna primjena lijekova

Put primjene lijeka ovisi o njegovim biofarmaceutskim svojstvima, terapijskim indikacijama te stanju pojedinog bolesnika. U terapiji se najčešće koristi oralni put primjene lijeka (Ranade i Cannon, 2011). Danas se više od 60% registriranih lijekova primjenjuje oralnim putem, a mnogobrojna ispitivanja nedvojbeno potvrđuju veliku suradljivost pacijenata u provođenju terapije oralnom primjenom lijeka. To možda najbolje pokazuju rezultati studije koja je pokazala da 90% bolesnika bira oralnu primjenu kemoterapeutika tijekom provođenja terapije karcinoma kolona. Slične rezultate pokazala je i studija kod koje je 80% pacijenata odabralo oralnu primjenu kemoterapeutika u liječenju karcinoma dojke dok je svega 3% pacijenata odabralo parenteralnu primjenu lijeka (Lam i Gambari, 2014). Nadalje, danas je dostupan veliki broj farmaceutskih oblika lijekova za oralnu primjenu koji osiguravaju točnost doziranja te omogućuju modificiranje mjesta i brzine oslobađanja lijeka sukladno terapijskim potrebama. Proizvodnja takvih oblika je relativno jednostavna i ekonomski isplativa, ne zahtijeva posebne proizvodne uvjete kao što je slučaj kod parenteralnih pripravaka, a navedeni oblici osiguravaju kemijsku stabilnost lijeka, a time i dugi rok njegove uporabe. Sve to pridonosi tome da je oralna primjena najpopularniji i najčešće korišteni način primjene lijeka (Pinto, 2010). Ograničenja oralne primjene uključuju kemijsku nestabilnost lijeka u probavnom sustavu uslijed enzimatski i pH posredovane razgradnje lijeka te nisku permeabilnost lijeka kroz sluznicu probavnog sustava što može rezultirati niskom oralnom bioraspoloživošću (Mrsny, 2012; Wilson, 2010). Prolazak lijeka kroz probavni sustav karakteriziraju drastične promjene u pH vrijednosti (Slika 1). U želucu je pH izuzetno nizak, u rasponu pH vrijednosti od 1-3, u dvanaesniku pH raste na 5-6 dok u većem dijelu tankog crijeva je neutralan (pH oko 7). Također, valja voditi računa o prisutnosti velikog broja enzima uključujući lipaze i proteaze koje su uključene u proces probave, a mogu značajno utjecati na kemijsku stabilnost lijeka. Osim toga, nakon apsorpcije lijeka može doći i do njegove metaboličke inaktivacije tijekom prvog prolaska kroz jetru te se na taj način dio doze lijeka može eliminirati i prije nego što dođe na mjesto djelovanja.



Slika 1. Građa probavnog sustava s prikazanim vremenom zadržavanja lijeka i pH vrijednosti u pojedinim dijelovima probavnog sustava (prilagođeno prema Talei i sur., 2013).

1.1.2. Terapijski sustavi za oralnu primjenu

Za lijekove peptidne i proteinske strukture te različite makromolekule i biopolimere, koji su u fokusu interesa farmaceutske i biotehnološke industrije s ciljem unapređenja liječenja različitih bolesti za koje do sada ne postoji adekvatna terapija, oralni put primjene nije prikladan. Mnogi od tih potencijalno novih lijekova, uslijed velike molekulske mase, naboja i hidrofilnosti slabo prolaze sluznicu probavnog sustava te su podložni enzimatskoj razgradnji što rezultira niskom bioraspoloživošću i nedostatnim terapijskim učinkom. S druge strane, mnogi lijekovi imaju iznimno nisku topljivost, što također ograničava njihovu oralnu bioraspoloživost, a time i terapijski potencijal (Lam i Gambari, 2014).

Iz svega navedenog proizlazi potreba za razvojem novih terapijskih sustava za peroralnu primjenu. Terapijski sustavi mogu dopremiti djelatnu tvar na željeno mjesto u potrebnoj dozi i trajanju, s predvidljivom i reproducibilnom kinetikom. Osim toga,

osiguravaju odgovarajuću stabilnost lijeka u probavnom sustavu, olakšavaju njegovu apsorpciju kroz sluznicu crijeva i tako povećavaju oralnu bioraspoloživost i terapijsku učinkovitost lijeka. Pri tome, često je nužno modificirati fizičko-kemijska svojstva djelatne tvari kako bi se brzina i mjesto oslobađanja lijeka uskladili s terapijskom namjenom te tako optimirala farmakoterapija. Prednosti primjene oralnih terapijskih sustava s kontroliranim oslobađanjem djelatne tvari su nedvojbeno dokazane te danas postoji veliki interes za razvojem takvih oblika lijekova. Oslobađajući lijek kontroliranom brzinom, oralni terapijski sustavi omogućuju postizanje i održavanje terapijske koncentracije lijeka u krvi kroz dulje vrijeme, odnosno osiguravaju produljeni učinak lijeka. Time se smanjuje učestalost doziranja lijeka, što bolesniku olakšava primjenu te povećava njegovu suradljivost u provođenju terapije. Osim toga, primjenom oralnih oblika s kontroliranim oslobađanjem smanjuje se fluktuacija koncentracije lijeka u krvi što rezultira smanjenjem učestalosti nuspojava. Nadalje, ljekoviti oblici s kontroliranim oslobađanjem mogu specifično oslobađati lijek u pojedinim dijelovima probavnog sustava, osiguravajući njegovu apsorpciju ili lokalni učinak u želucu, tankom crijevu ili kolonu. Time se također poboljšava učinkovitost terapije i smanjuje učestalost nuspojava lijeka. U odnosu na konvencionalne oblike s trenutnim oslobađanjem lijeka, terapijski sustavi štite djelatnu tvar od razgradnje pod utjecajem enzima i pH u probavnom sustavu (Pinto, 2010; Varum i sur., 2010). Prema profilu oslobađanja lijeka, terapijski sustavi se mogu podijeliti na oblike s trenutačnim i modificiranim oslobađanjem. Oblici s modificiranim oslobađanjem uključuju terapijske sustave s kontroliranom brzinom oslobađanja (produženo i kontrolirano) te one s vremenom kontroliranim oslobađanjem (pripravci s odgođenim oslobađanjem) (Hirayama i Uekama, 1999; Uekama i sur., 1998).

Za postizanje navedenih ciljeva potrebno je ugraditi ljekovitu tvar u ili na odgovarajući nosač. Nosači ljekovite tvari se mogu podijeliti na one kod kojih je lijek kemijski vezan na nosač (prolijekovi), zatim na makromolekule koje stvaraju supramolekulske komplekse s molekulom lijeka (ciklodekstrini, konjugati polimera i dendimeri) te nano i mikro terapijske sustave (nanočestice, liposomi, polimerne micele, mikroemulzije te mikročestice i mikrosfere), koji najčešće fizički uklapaju lijek a obuhvaćaju širok raspon veličina, od molekule do nano- i mikrometarskih nosača (Perrie i Rades, 2012; Mathiowitz, 2008). Na izbor nosača utječu fizičko-kemijska svojstva samog lijeka, terapijska doza lijeka, put primjene, te kinetika, mehanizam i mjesto oslobađanja lijeka. Osim toga, nosači ljekovitih tvari trebaju korigirati neugodan okus lijeka, spriječiti iritaciju želuca, modificirati topljivost, bioraspoloživost i kemijsku stabilnost lijeka (Hillery i sur., 2001).

Kod oblika s trenutnim oslobađanjem nastoji se postići što je moguće veća brzina oslobađanja lijeka. To je naročito bitno kod lijekova za koje je potreban brz nastup djelovanja kao što su analgetici, koronarni vazodilatatori, antimigrenici i sl. Profil oslobađanja lijeka najčešće slijedi kinetiku prvog reda te omogućava postizanje visokih plazmatskih koncentracija lijeka u relativno kratkom vremenu. Pri tome parametri koji ograničavaju brzinu nastupa djelovanja lijeka su topljivost lijeka u vodi te njegova permeabilnost kroz sluznice probavnog sustava. Topljivost lijeka u vodi najčešće je ograničena lipofilnošću molekule te stabilnom strukturom kristalne rešetke, koja je naročito izražena kod komponenata s talištem višim od 200 ºC. Problemi vezani uz nisku topljivost lijeka se uglavnom rješavaju primjenom suotapala (glicerol, propilenglikol i sl.) i ulja kao otapala (uljne otopine lijeka u mekim želatinoznim kapsulama), pripremom odgovarajućih soli lijeka ili sintezom prolijeka (uvođenjem hidrofilnih skupina), modifikacijom pH vrijednosti pripravka, dodatkom površinski aktivnih tvari te formulacijom supramolekulskih inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima, o čemu će više govora biti u sljedećem poglavlju. Također, moguće je povećati topljivost lijeka uklapanjem u različite koloidno disperzne sustave, kao što su emulzije i mikroemulzije te u micele ili tekuće kristale, što je tehnološki često vrlo zahtjevno. Permeabilnost lijeka kroz sluznicu probavnog sustava povećava se primjenom pospješivača apsorpcije lijeka, kao što su različiti kelatori koji uzrokuju otvaranje čvrstih međustaničnih veza sluznice probavnog sustava (EDTA, kitozan, Carbopoli), te tako olakšavaju intestinalnu apsorpciju lijeka. Osim toga, kao transcelularni pospješivači apsorpcije koriste se i različite površinski aktivne tvari kao što je natrijev kaprilat, Cremophor EL® i Tween 80, no njihova uporaba može rezultirati iritacijom sluznice probavnog sustava te različitim toksičnim učincima budući da ti spojevi narušavaju barijerna svojstva sluznice. U novije vrijeme često se primjenjuju farmaceutski oblici nanoveličine, čime se istovremeno pridonosi boljoj topljivosti lijeka u probavnim sokovima te njegovoj permeaciji kroz intestinalnu sluznicu (Perrie i Rades, 2012).

Pripravci s odgođenim oslobađanjem se uglavnom koriste s ciljem zaštite lijeka od razgradnje u kiselom mediju želuca ili s ciljem zaštite sluznice želuca od iritirajućeg učinka lijeka, a postiže se najčešće primjenom polimera koji su netopljivi u kiselom mediju želuca. U tu se svrhu od polimera najčešće koriste ftalatni esteri celuloza acetata, hipromeloze i polivinilacetata kao i različiti polimetakrilati (Eudragit L, Eudragit S). Primjenom takvih oblika moguće je postići selektivno oslobađanje lijeka u tankom crijevu i/ili kolonu. Oslobađanje lijeka u kolonu omogućuje lokalnu terapiju različitih bolesti, uključujući kolorektalni karcinom i Chronovu bolest, te sistemsku apsorpciju lijeka čime se zaobilazi

njegova metabolička razgradnja u jetri. Kolon kao mjesto oslobađanja lijeka karakterizira neutralna pH vrijednost te značajno niža enzimatska aktivnost u usporedbi s tankim crijevom, pružajući potencijal za sistemsku primjenu lijekova peptidne i proteinske strukture.

Terapijski sustavi s produljenim oslobađanjem otpuštaju lijek konstantnom brzinom tijekom duljeg vremenskog perioda. Oblikuju se upotrebom odgovarajućih polimera ili lipidnih komponenata i to kao spremišni sustavi (lijek je smješten unutar polimerne/lipidne ovojnice) ili kao matriksni sustavi u kojima je lijek jednolično dispergiran unutar polimernog/lipidnog matriksa. Profil oslobađanja lijeka iz takvih sustava najčešće slijedi kinetiku nultog reda ili kinetiku prema Higuchiju. Posebnu skupinu oblika s modificiranim oslobađanjem čine terapijski sustavi s kontroliranim oslobađanjem lijeka. Oni su dizajnirani tako da osiguraju konstantnu koncentraciju lijeka u krvi, neovisno o promjenama unutar probavnog sustava. Najčešće sadržavaju inicijalnu dozu lijeka koja se oslobađa trenutačno te dozu održavanja koja se oslobađa kontroliranom brzinom, najčešće slijedeći kinetiku nultog reda. Sve to rezultira konstantnom koncentracijom lijeka u krvi kroz dulji vremenski period (Perrie i Rades, 2012).

1.1.3. Prolazak terapijskih sustava kroz probavni sustav

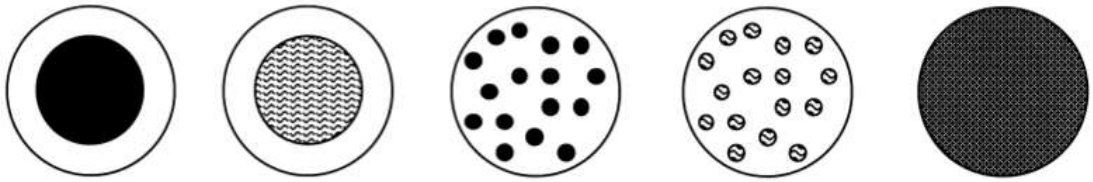
Terapijski sustavi s modificiranim oslobađanjem ljekovite tvari su tijekom prolaska kroz probavni sustav izloženi različitim uvjetima, pri čemu znatno varira volumen, pH vrijednost medija i enzimska aktivnost. Sve to može značajno utjecati na oslobađanje lijeka i terapijski učinak takvog naprednog ljekovitog oblika. Na učinkovitost terapijskih sustava će utjecati i brzina njegovog prolaska, odnosno vrijeme zadržavanja u pojedinim dijelovima probavnog sustava. Brzina prolaska ljekovitog oblika kroz probavni sustav u prvom redu ovisi o motilitetu crijeva te prisustvu hrane. Zadržavanje terapijskog sustava u želucu je izrazito varijabilno, a ovisi o veličini samog terapijskog sustava te prisutnosti hrane. Bilo bi za očekivati da će terapijski sustavi većih dimenzija, kao što su tablete i kapsule, pokazivati sklonost duljem zadržavanju u želucu, budući da probava u želucu ima za cilj usitniti komade hrane na odgovarajuću veličinu, kako bi se povećala njihova izloženost probavnim sokovima te tako olakšala probava. U prilog toj pretpostavci govore rezultati studije koju su proveli Davis i sur. (1984) koja je pokazala da je vrijeme zadržavanja peleta u želucu koji su primijenjeni uz lagani obrok, znatno kraće u odnosu na jednodozirni oblik (tableta). Taj trend je bio naročito naglašen nakon primjene peleta zajedno s visoko kalorijskim obrokom. Pri tome je vrijeme zadržavanja tableta (promjer 9 mm) bilo 3 sata dulje u odnosu na ono peleta

(promjer 0,7 mm) (Abrahamsson i sur., 1996). Do sličnih rezultata je došao Waterman, (2007), koji je pokazao da vrijeme zadržavanja tableta u želucu koje su konzumirane zajedno s visoko kaloričnim obrokom iznosi i do 10 sati. Choe i sur., (2001) su pokazali da veličina čestica značajno utječe na gastričku retenciju peleta u prisutnosti hrane. Pri tome manji peleti (promjer 0,7 mm) napuštaju želudac čak pola sata prije u odnosu na one većeg promjera (3,6 mm). Također su farmakokinetička ispitivanja pokazala veću predvidljivost i reproducibilnost koncentracije lijeka u plazmi nakon primjene više-jediničnih terapijskih sustava u usporedbi s jediničnim oblikom. Npr. enterički obloženi peleti didanozina, pokazuju manju varijabilnost biorapoloživosti u odnosu na enterički obložene tablete i brži nastup djelovanja. To je rezultiralo komercijalizacijom didanozina u obliku enterički obloženih granula, dok je oblik enterički obložene tablete napušten. Također, farmakokinetička varijabilnost uzrokovana uzimanjem hrane je značajno niža kod eritromicina oblikovanog u obliku enterički obloženih peleta u odnosu na enterički obložene tablete, a primjenom peleta postiže se 48,7% veća bioraspoloživost eritromicina nego nakon primjene tablete (Varum i sur., 2010).

Vrijeme uzimanja lijeka također značajno utječe na prolaz oblika kroz probavni sustav. Primjena jediničnih oblika lijeka, kao što su tablete, tijekom noći, znatno produljuje zadržavanje oblika u želucu dok takav učinak nije uočen primjenom više-jediničnih ljekovitih oblika kao što su peleti i mikrosfere (Varum i sur., 2010). Vrijeme prolaska kroz tanko crijevo u pravilu iznosi 3-4 sata i uglavnom se ne razlikuje za pelete, tablete ili tekuće ljekovite oblike. Pri tome primjena oblika prije hrane u pravilu rezultira bržim prolaskom kroz tanko crijevo. Iz toga proizlazi da više-jedinični, mikročestični terapijski sustavi imaju predvidljiviji prolaz kroz probavni sustav u odnosu na jedinične oblike. U isto vrijeme mikročestični ljekoviti oblici pokazuju dulje vrijeme zadržavanja u kolonu (Abrahamsson i sur., 1996). Osim veličine ljekovitog oblika, na vrijeme prolaska terapijskog sustava kroz probavni sustav utječe i zdravstveno stanje bolesnika, pa će tako u bolesnika s akutnim ulcerativnim kolitisom terapijski sustav značajno brže proći kroz tanko crijevo i kolon u odnosu na zdrave ispitanike (Varum i sur., 2010). I neki lijekovi mogu utjecati na brzinu prolaska terapijskog sustava kroz probavni sustav. Istovremena primjena terapijskog sustava s modificiranim oslobađanjem i prokinetičkih lijekova kao što su itopirid, domperidon, velusetrag (td-5108) i tegaserod, rezultira bržim prolazom ljekovitog oblika kroz probavni sustav posljedično ograničavajući njegov in vivo učinak. U isto vrijeme i neke pomoćne tvari mogu utjecati na tranzit kroz probavni sustav. Pri tome mukoadhezivni polimeri produljuju vrijeme prolaza, dok ekscipijensi, kao što su polietilenglikol 400, sorbitol, manitol i natrijev hidrogen fosfat, skraćuju vrijeme prolaza zbog stimulacije motiliteta probavnog sustava (Varum i sur., 2010).

1.1.4. Mikrosfere i mikrokapsule kao terapijski sustav za oralnu primjenu lijeka

Pojam mikrosfere i mikrokapsule obuhvaća različite terapijske sustave najčešće sferičnog oblika čija veličina čestica varira od 1 do 1000 μm. Mikrosfere su matriksni sustav sferičnog oblika u kojem je lijek homogeno dispergiran unutar polimernog, odnosno lipidnog matriksa, a mikrokapsule su spremišni sustav u kojem je lijek obavijen polimernom i/ili lipidnom ovojnicom (Slika 1) (Birnbaum i Brannon-Peppas, 2004).



Mikrokapsula s čvrstom jezgrom | Mikrokapsula s tekućom jezgrom | Mikrokapsula s čvrstim mikro- i nanočesticama | Mikrokapsula s mikro i nanoemulzijom | Mikrosfere

Slika 2. Različiti oblici mikrosfera i mikrokapsula (prilagođeno prema Birnbaum i Brannon-Peppas, 2004).

Danas je na svjetskom farmaceutskom tržištu dostupno više oralnih formulacija koje se temelje na mikrosferama i mikrokapsulama. Njihov pregled prikazan je u Tablici 1. Bayer Inc. razvio je CIPRO® oralnu suspenziju ciprofloksacina formuliranog u obliku mikrokapsula za oralnu primjenu s ciljem liječenja mikrobnih infekcija. Microfarma Ltd. razvila je proizvod Cardioviva™ koja sadrži mikrokapsulirani probiotik *Lactobacillus reuteri* NCIMB za oralnu primjenu. Probiotik je uklopljen u alginatno-poli-$_L$-lizinske mikrosfere, a klinička ispitivanja su pokazala njegovu učinkovitost u snižavaju serumske koncentracije kolesterola nakon primjene od 6 tjedana. KV Pharmaceutical Co. razvila je Micro-K® Extentcaps®, mikrokapsulirani oblik kalijeva klorida za oralnu primjenu s ciljem liječenja hipokalemije. Mayne Pharma International razvila je Nopap™ prašak i tablete paracetamola u kojima je primjenom tehnike mikrokapsuliranja uklonjen neugodan okus lijeka, povećana njegova kemijska stabilnost i osigurano produljeno oslobađanje nakon oralne primjene. Novartis Int. AG razvila je Sandimmun Neoral® oralni oblik ciklosporina A u obliku mikroemulzije za

liječenje reumatoidnog artritisa. Kliničke studije su pokazale da je formulacija mikroemulzije značajno poboljšala bioraspoloživost lijeka, rezultirajući smanjenom učestalošću doziranja lijeka. Roche je razvio mikroemulzijsku formulaciju za oralnu primjenu Saquinavir (Fortovase®), Abbott Laboratories je razvio Norvir®, oralnu mikroemulziju ritonavira za liječenje AIDS-a.

Tablica 1. Komercijalno dostupni lijekovi s mikrokapsulama za oralnu primjenu (prilagođeno prema Lam i Gambari, 2014).

Ime proizvoda	Nositelj terapijskog učinka	Proizvođač	Indikacija
CIPRO®	Ciprofloxacin	Bayer Inc.	Mikrobna infekcija
Cardioviva™	Lactobacillus reuteri NCIMB 30242	Micropharma Ltd.	Hiperkolesterolemija
Micro-K®, Extencaps®	Kalijev klorid	KV Pharmaceutical Co.	Hipokalemija
Nopap™	Paracetamol	Mayne Pharma International	Analgetik i antipiretik
Sandimmun Neoral®	Ciklosporin A	Novartis Int. AG	Reumatoidni artritis
Fortovase®	Saquinavir	Roche	HIV
Norvir®	Ritonavir	Abbott Laboratories	HIV

Mikrosfere i mikrokapsule se već dugo vremena intenzivno razvijaju kao terapijski sustavi. Povećanje kemijske stabilnosti različitih lijekova mikrokapsuliranjem nedvojbeno je dokazano (Lam i Gambari, 2014). Kurkumin, tvar izrazito podložna oksidaciji i razgradnji utjecajem svjetla i topline, stabiliziran je uklapanjem u porozne želatinozno-škrobne mikrokapsule. Time je izbjegnuta razgradnja kurkumina tijekom procesa proizvodnje, pri čemu je mikrokapsulirani kurkumin zadržao antimikrobni učinak protiv cijelog niza patogenih mikroorganizama, kao što su *Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Aspergillus niger, Penicillium notatum* i *Saccharomyces cerevisiae* (Wang i sur., 2009). Askorbinska kiselina kao antioksidans neutralizira slobodne radikale koji uzrokuju cijeli niz degenerativnih bolesti, kao što su

kardiovaskularne bolesti, dijabetes i karcinom. No, askorbinska kiselina je izrazito kemijski nestabilna pa se brzo razgrađuje. U svrhu njezinog stabiliziranja primijenjena je tehnika mikrokapsuliranja uz korištenje različitih polimernih materijala. Ispitivanja su pokazala da mikrokapsule koje su sadržavale škrob i β-ciklodekstrin značajno poboljšavaju kemijsku stabilnost askorbinske kiseline pri 38 ºC (Uddin i sur., 2001). Osim toga, postignuto je njezino produljeno oslobađanje te je prikriven neugodan okus koji askorbinska kiselina ima. Korekcija neugodnog okusa lijekova uspješno se provodi primjenom tehnike mikrokapsuliranja. Tako je, primjerice, uklapanjem berberina u mikročestice načinjene od hidroksipropilmetilceluloze, te oblaganjem čestica s Eudragitom E100, uspješno prikriven gorak okus lijeka. Primjenom tehnike mikrokapsuliranja moguće je izbjeći probleme vezane uz kompatibilnost lijekova i ostalih pomoćnih tvari u formulaciji, a u isto je vrijeme moguće povećati bioraspoloživost lijekova te prilagoditi njihovo oslobađanje terapijskim potrebama. Razvijen je cijeli niz terapijskih sustava primjenom tehnike mikrokapsuliranja koji osiguravaju produljeno oslobađanje nakon parenteralne primjene (Hu i sur., 2013; Mao i sur; 2012; Tran i sur., 2011), a u isto vrijeme osiguravaju postizanje terapijskih koncentracija lijeka na ciljanom mjestu u organizmu tijekom duljeg vremenskog perioda s minimalnom sistemskom izloženošću što je naročito bitno za liječenje karcinoma (Birnbaum i Brannon-Peppas, 2004). Detaljan prikaz takvih terapijskih sustava nije predmet ovog istraživanja. Doktorski rad je usredotočen na mikrosfere i mikročestice za postizanje kontroliranog oslobađanja lijeka unutar probavnog sustava s posebnim osvrtom na oslobađanje lijeka u kolonu (Talaei i sur., 2013; Lautenschläger i sur., 2013; Collnot, 2012; Shukla i sur., 2012; Ali Asgher i Chandren, 2006).

Ketoprofen je nesteroidni protuupalni lijek niske topljivosti u vodi koji se uglavnom koristi kao analgetik te za akutnu i kroničnu terapiju reumatoidnog artritisa. Ima izraženi iritirajući učinak na sluznicu probavnog sustava zbog čega su razvijani različiti oblici koji bi osigurali njegovo ciljano oslobađanje u kolonu. Smatra se da bi specifično oslobađanje ketoprofena u kolonu moglo biti naročito prikladno za liječenje bolesti koje su pod utjecajem cirkadijskog ritma kao što je reumatoidni artritis. U tu je svrhu razvijen mikročestični terapijski sustav koji istovremeno koristi kompleksiranje ketoprofena s ciklodekstrinima, s ciljem povećanja njegove topljivosti te njegovo oblikovanje u mikrosfere načinjene od kalcijevog pektinata i kitozana, koje će specifično oslobađati lijek u kolonu. Oblikovane mikrosfere pokazale su selektivno oslobađanje lijeka pri pH 7,4, dok su *in vitro* ispitivanja permeacije lijeka na *Caco-2* staničnom modelu pokazale da kitozan i ciklodekstrin imaju

sinergijski učinak na permeabilnost lijeka. Ispitivanja citotoksičnosti su potvrdila sigurnost primjene takvog terapijskog sustava (Maestrelli, 2008). Mikročestice kao terapijski sustav za primjenu lijeka u kolon naveliko se istražuju s ciljem liječenja upalnih bolesti crijeva (eng. *Inflamatory bowel disease*, *IBD*). Lamprecht i sur. (2003) razvili su mikrosfere s 5-fluorouracilom i takrolimusom koristeći Eudragit p4135-F polimer, novi polimer osjetljiv na pH koji se otapa pri pH vrijednosti iznad 7,2. Time se može izbjeći ranije oslobađanje lijeka u terminalnom ileumu koje je uočeno za starije tipove Eudragita (L i S) koji su topljivi u pH području od 6-7. Nakase i sur. (2003) pokazali su prednosti primjene mikrosfera poli-$_{DL}$-mliječne kiseline (PDLLA) i želatinskih mikrosfera s imunomodulatornim lijekovima u ciljanoj dostavi djelatnih tvari u makrofage. PDLLA mikrosfere sadržavale su deksametazon i diklorometilendifosfonat, a želatinske mikrosfere su sadržavale interleukin 10 i primijenjene su kako bi se djelovalo na imunoregulatorne stanice sluznice crijeva, koje su odgovorne za razvoj kroničnog kolitisa (Okazaki i sur., 2002). Time je otvorena mogućnost unapređenja postojeće terapije IBD. Kako bi se smanjio rizik nakupljanja polimera u upaljenom tkivu, neki istraživači razvijali su biorazgradive mikrosfere polimliječne kiseline (PLA), s uklopljenim deksametazonom. One su pokazale izražen protuupalni učinak na eksperimentalnom modelu kolitisa (Nakase i sur., 2000). Također su pripremljene mikrosfere etilceluloze i želatine s uklopljenom 5-acetilsalicilnom kiselinom koje su pokazale zadovoljavajuća svojstva selektivnim oslobađanjem lijeka u kolonu. Rezultati navedenih ispitivanja nedvojbeno su potvrdili da mikrosfere nakon oralne primjene uspješno dostavljaju lijek u kolon bez njegove sistemske apsorpcije (Talaei i sur., 2013). Ispitivanja su pokazala da se mikročestice selektivno nakupljaju u upaljenom tkivu kolona, a odlaganje mikrosfera ovisi o njihovoj veličini. Pri tome mikrosfere u rasponu veličina od 100-1000 nm pokazuju opsežno nakupljanje u upaljenom tkivu, dok se velike čestice (10 μm) nalaze samo u tragovima. Specifično zadržavanje mikrosfera u kolonu može se dodatno pojačati modifikacijom površine mikrosfera oblaganjem mukoadhezivnim polimerima (Lauterschläger, 2013). Primjena polisaharida koji se specifično razgrađuju u kolonu može omogućiti uspješan razvoj terapijskog sustava zadovoljavajućih svojstava. U tu svrhu koriste se različiti polisaharidi kao što su guar guma, pektin i kitozan. Pri tome se specifično oslobađanje lijeka u kolonu uglavnom ne može postići primjenom samo jedne vrste polisaharida. Kombinacijom polisaharida i kemijski modificiranih polimera, kao što su različiti derivati celuloze, Carbopoli te poliakrilatni polimeri (Eudragit), mogu se uspješno izbjeći nedostatci koji su uočeni kod pripravaka oblikovanih uporabom samo jednog polisaharida (Shukla i Tiwari, 2012).

Eudragiti su skupina strukturno sličnih kopolimera pripremljenih polimerizacijom akrilnih i metakrilnih kiselina ili njihovih estera (Kadian i Harikumar, 2009). Zahvaljujući brojnim kombinacijama različitih monomera i komonomera, razvijena je široka paleta biokompatibilnih polimera staklaste strukture i izraženih filmogenih svojstava koji su danas važni ekscipijensi u farmaceutskoj tehnologiji.

Akrilni polimeri pokazuju veliku stabilnost u prisutnosti svjetla, kisika i vode kao i kompatibilnost s biološkim tekućinama i tkivima. Metakrilatni monomeri osiguravaju Eudragitima kemijsku i fizičku stabilnost, no istovremeno pridonose tvrdoći i krtosti polimera, dok su akrilni derivati odgovorni za mekoću i fleksibilnost. Zbog odsutnosti hidrofobne metilne skupine u akrilnim monomerima, oni su hidrofilniji i reaktivniji u odnosu na metakrilne monomere. Metakrilna kiselina je slaba kiselina (pKa = 4,66) te nije topljiva u vodi pri niskim pH vrijednostima, a otapa se uslijed ionizacije u neutralnom ili bazičnom mediju gdje je prisutna u obliku karboksilatnog polianiona (Dittgen i sur., 1997). Pregled komercijalno dostupnih derivata Eudragita te njihova primjena u farmaceutskoj tehnologiji prikazana je u Tablici 2. U razvoju mikročestica s ciljanim oslobađanjem djelatne tvari u nižim dijelovima probavnog sustava (terminalni dio ileuma i kolon), najčešće se koriste Eudragiti L i S, pojedinačno ili u kombinaciji (Rizi i sur., 2011a, 2011b;; Alhnan i sur., 2011; Kohane i sur., 2003).

Tablica 2. Svojstva različitih komercijalno dostupnih Eudragita®.

Uporaba	**Komercijalni naziv**	**Oblik**	**Prosječna molekulska masa**	**Kemijski naziv prema IUPAC-u**	**Topljivost**
Zaštitna formulacija					
Oslobađanje djelatne tvari u želucu, pH 1-1,15, zaštitna membrana, prekriva neugodan okus, miris, štiti od svjetla i vlage	E PO	Prašak	150 000	Poli(butilmetakrilat-ko-(2-dimetilaminoetil)metakrilat-ko-metilmetakrilat) 1:2:1	Kationski terpolimer s DMAEMA funkcionalnim skupinama Topljiv u želučanom soku do pH 5, a bubri i propusan je pri pH > 5,0
	E 100	Granule			
	E 12,5%	12,5% otopina u organskom otapalu			
Oblici s modificiranim oslobađanjem					
U oblicima s vremenom kontroliranim, pH neovisnim oslobađanjem djelatne tvari	RL PO	Prašak	150 000	Poli(etilakrilat-ko-metilmetakrilat-ko-trimetilamonium etilmeta-krilat klorid) 1:2:0.2	Kationski met/akril terpolimer s TMAEMA funkcionalnim skupinama Netopljiv, ali s visokom (RL) i niskom (RS) permeabilnošću
	RL 100	Granule			
	RL 12,5	12,5% otopina u organskom otapalu			
	RL 30D	30% vodena disperzija			
	RS PO	Prašak	150 000		
	RS 100	Granule			
	RS 12,5	12,5% otopina u organskom otapalu			
	RS 30D	30% vodena disperzija			

Enterički oblici					
Oslobađanje lijeka u duodenumu (pH > 5,5)	L 100-55	Prašak	250 000	Poli (metakrilna kiselina-ko-etil-akrilat) 1:1	Anionski kopolimer s MAA funkcionalnim skupinama/topljiv pri pH > 5,5
	L 30D-55	30% vodena disperzija			
Oslobađanje lijeka u jejenumu (pH 6-7)	L 100	Prašak	135 000	Poli(metakrilna kiselina-ko-metilmetakrilat) 1:1	Anionski kopolimer s MAA funkcionalnim skupinama/topljiv pri pH > 6
	L 12,5	12,5% otopina u organskom otapalu			
Oslobađanje lijeka u kolonu (pH 6-7)	S 100	Prašak	135 000	Poli(metakrilna kiselina-ko-metilmetakrilat) 1:2	Anionski kopolimer s MAA funkcionalnim skupinama/topljiv pri pH > 7
	S 12,5	12,5% otopina u organskom otapalu			
Oslobađanje lijeka u kolonu (pH 7,5)	FS 30D	30% vodena disperzija	220 000	Poli(metilakrilat-ko-metilmetakrilat-ko-metakrilna kiselina) 7:3:1	Anionski kopolimer s MAA funkcionalnim skupinama/topljiv pri pH > 7,2

DMAEMA- dimetilaminoetilmetakrilat

TMAEMA- trimetilamonium etilmetakrilat

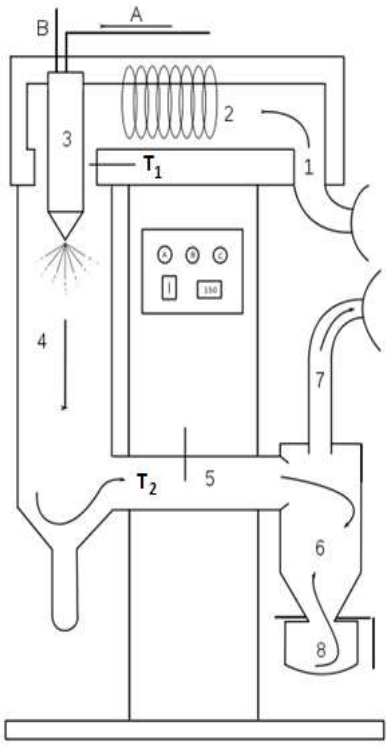
MAA- metakrilna kiselina

1.1.4. Tehnike za pripremu mikrosfera i mikrokapsula

Dostupan je cijeli niz tehnika za pripremu mikrosfera i mikrokapsula. Kemijski postupci mikrokapsuliranja obuhvaćaju polimerizaciju na granici faza između dvije tekućine. Stijenka mikrokapsule se formira na površini kapljice ili čestice polimerizacijom monomera. Polimerizacija slobodnih radikala uključuje inicijator i monomer. Inicijator se najprije prenosi u oblik slobodnog radikala, zagrijavanjem, fotolizom ili elektrolizom, a visoko reaktivni radikali reagiraju s monomerima te mikročestice nastaju kroz rast polimernih lanaca koji je posljedica transfera elektrona između reaktivnih monomera. Uklapanje lijeka vrši se uranjenjem mikrosfera u otopinu lijeka. Fizičko-kemijski postupci pripreme mikrokapsula i mikrosfera obuhvaćaju metodu koacervacije (odvajanje faza) i metodu ionotropnog geliranja. Koacervacija se definira kao parcijalna desolvacija homogene otopine polimera u fazu koja je bogata polimerom (koacervat) i fazu s niskim sadržajem polimera (koacervatni medij). Pri tome, lijek se najprije suspendira ili dispergira u otopini polimera, a do koacervacije dolazi uslijed dodatka kiseline ili soli, dodatka lošeg otapala u disperziju ili promjenom temperature pri čemu dolazi do odlaganja polimera na površini suspendiranih čestica. Nastali polimerni sloj može se stabilizirati umrežavanjem polimera ili promjenom temperature. Metoda ionotropnog geliranja temelji se na sposobnosti umrežavanja polielektrolita suprotno nabijenih iona pri čemu nastaju sferične umrežene čestice. Pri tome se najčešće otopina anionskog polimera dodaje u kapima u vodenu otopinu polivalentnih kationa. Difuzija kationa u polimerne kapi rezultira uspostavom trodimenzionalne strukture ionski umreženih polimera. Mehanički postupci pripreme mikrosfera i mikrokapsula obuhvaćaju postupke oblaganja u vrtložnom stroju te sušenje raspršivanjem. Postupci oblaganja u vrtložnom stroju podrazumijevaju vrtloženje praškastih komponenata u struji zagrijanog zraka na koje se raspršivanjem nanosi otopina polimera i lijeka. Isparavanjem otapala u struji zagrijanog zraka dolazi do formiranja polimerne ovojnice (De La Vega i sur., 2013; Tran i sur., 2011; Liu i sur., 2011). Komercijalno su dostupne različite izvedbe uređaja za oblaganje u vrtložnom sloju.

Sušenje raspršivanjem je postupak prikladan za pripremu različitih mikrosfera i mikrokapsula. Postupak je jednostavan, reproducibilan te ga je lako prilagoditi eventualnoj industrijskoj proizvodnji. Osnova postupka je u transformaciji otopine ili disperzije polimera i ljekovite tvari iz tekućeg stanja u čvrsti oblik raspršivanjem u zagrijanom mediju za sušenje.

Shematski prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem prikazan je na Slici 3. Prilagodbom tehnoloških parametara postupka moguće je pripraviti čestice traženih svojstava.



Slika 3. Shematski prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem: 1-ulaz zraka, 2-grijač, 3-sapnica, 4-kolona za raspršivanje, 5-spojnica, 6-ciklon, 7-ispuh, 8-posuda za sakupljanje uzorka, T_1-temperatura ulaznog zraka, T_2- temperatura izlaznog zraka.

Raspršivanje otopine ili disperzije polimera i lijeka vrši se primjenom različitih tipova atomizatora, kao što su rotirajući atomizator, tlačne mlaznice, pneumatske mlaznice i ultrasonične mlaznice, a transport otopine ili disperzije za raspršivanje do atomizatora osigurava se primjenom peristaltičke crpke. Pri tome je viskoznost otopine/disperzije za raspršivanje ograničavajući čimbenik jer izrazito viskozni sustavi mogu dovesti do začepljenja cijevi (Call i Sollohub, 2010). Detaljan opis dostupnih vrsta atomizatora te potencijali i ograničenja njihove primjene u razvoju farmaceutskih oblika lijekova je dostupan u publikacijama Calla i Sollohuba (2010) te Nandiyanta i sur., (2011). Raspršivanjem otopine/disperzije polimera i lijeka značajno se povećava površina kontakta s medijem za sušenje, a time se olakšava transport topline što rezultira evaporacijom otapala u roku od nekoliko sekundi. Pri tome temperatura mikrosfera nikad ne dosegne temperaturu ulaznog zraka, što omogućava sušenje termolabilnih tvari. Kao medij za sušenje se najčešće koristi zagrijani zrak, a u slučaju kemijski nestabilnih tvari, moguće je koristiti i inertne plinove kao što je dušik. Primjenom HEPA filtera moguće je osigurati aseptičke uvjete rada. Najsitnije

kapi otopine/disperzije za raspršivanje, promjera manjeg od 5 μm suše se trenutno u kontaktu sa zagrijanim zrakom na samom početku kolone za raspršivanje. Kapi srednje veličine, od 5-30 μm, imaju značajnu brzinu, ali brzo gube na masi uslijed procesa sušenja. To im produljuje vrijeme zadržavanja u gornjim dijelovima kolone za raspršivanje osiguravajući potpuno sušenje. Čestice veće od 30 μm imaju značajnu brzinu i brzo napuštaju zonu sušenja te se hvataju na stijenke kolone za raspšivanje, što dovodi do gubitaka u postupku sušenja raspršivanjem. S obzirom na smjer raspršivanja otopine i smjer strujanja zagrijanog zraka, razlikujemo istosmjerne i protustrujne tipove uređaja. Istosmjerni tip je najčešće korišteni tip uređaja u farmaceutskoj industriji (oko 95%). Uređaj s protusmjernim strujanjem zagrijanog zraka izlaže već formirane čestice relativno visokoj temperaturi, što je prikladno za pripremu produkata izrazito niske vlažnosti. To istovremeno može rezultirati problemima s kemijskom stabilnošću lijeka, a to limitira njihovu primjenu u farmaceutskoj industriji (Cal i Sollohub, 2010).

Po završetku procesa sušenja, čestice padaju prema dnu kolone za sušenje te napuštaju kolonu uslijed aerodinamičkog transporta. Samo strujanje zagrijanog zraka često nije dostatno za transport većih čestica iz kolone za sušenje pa se on često pospješuje primjenom aspiratora. Osušeni praškasti produkt se odvaja primjenom ciklona i/ili različitih filtera. Cikloni su uređaji koji se najčešće koriste za odvajanje praškastog produkta iz smjese sa zrakom. U ciklonu dolazi do vrtloženja zraka, a nastala centrifugalna sila usmjerava čvrste čestice prema stijenkama ciklona te se one tako izdvajaju iz struje zraka. Filteri su najčešće načinjeni od tkanine definirane veličine pora, a služe za odvajanje čestica promjera manjeg od 1 μm. Sitnije čestice moguće je odvojiti elektrostatski, no taj tip uređaja se rijetko koristi zbog visoke cijene (Cal i Sollohub, 2010).

Kod procesa sušenja raspršivanjem, moguće je kontrolirati ulaznu temperaturu i brzinu strujanja zagrijanog zraka, brzinu protoka uzorka te brzinu strujanja zraka kroz mlaznicu. Na temperaturu izlaznog zraka utječe temperatura ulaznog zraka, brzina strujanja zraka, entalpija isparavanja otapala i koncentracija čvrstih čestica u otopini za raspršivanje. U pravilu, izlazna temperatura je posljedica izmjene topline u sustavu zagrijani zrak/otopina za raspršivanje, a predstavlja najvišu temperaturu kojoj je produkt bio izložen. Ostali parametri, kao što je sadržaj vlage u uzorku, veličina čestica produkta te prinos samog postupka, ovise o međudjelovanju niza parametara, koji su prikazani u Tablici 3.

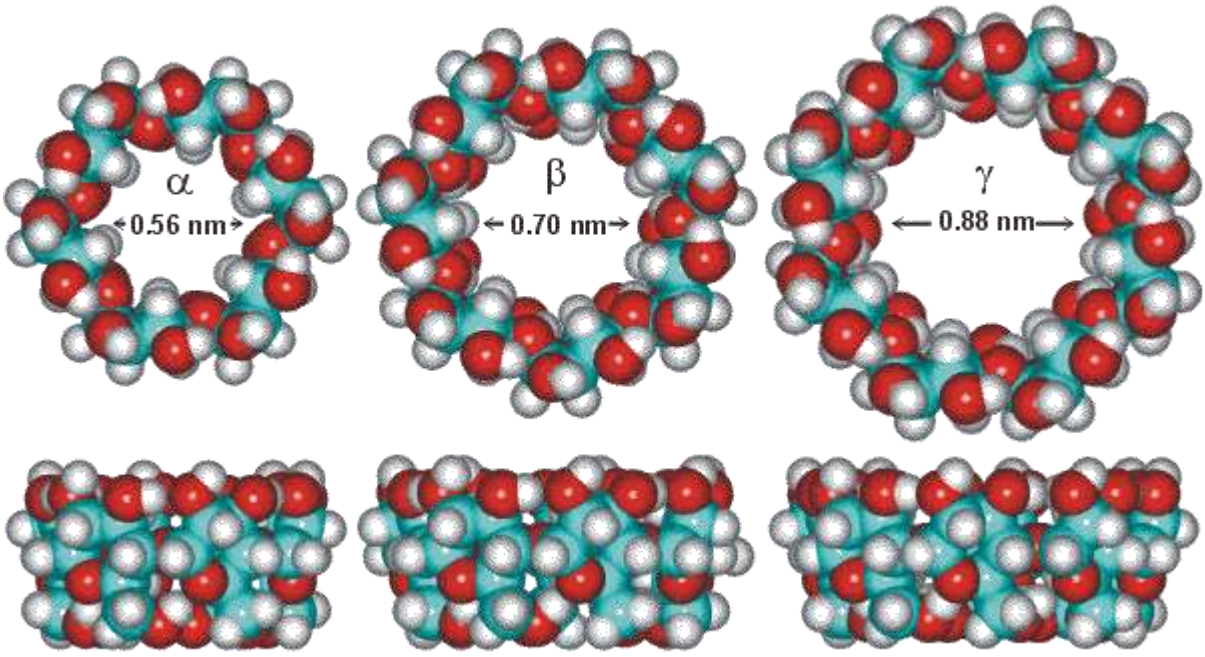
Tablica 3. Utjecaj tehnoloških parametara na postupak sušenja raspršivanjem (prilagođeno prema Cal i Sollohub, 2010).

Parametri	Protok zraka za sušenje (↑)	Vlažnost zraka (↑)	Ulazna temperatura (↑)	Protok atomiziranog zraka (↑)	Brzina protoka uzorka (↑)	Organsko otapalo umjesto vode (↑)	Koncentracija čvrstih čestica (↑)
Izlazna temperatura	↑↑ snižena toplina gubitak osnovne energije	↑ više energije sadržano u vlazi	↑↑↑ jednostavan odnos	↓ veća količina hladnog zraka za zagrijavanje	↓↓ više otapala za isparavanje	↑↑↑ manje energije potrebno za isparavanje	↑↑ manje vode za isparavanje
Veličina čestica	-	-	-	↓↓↓ veća količina energije za atomizaciju	↑ više tekućine za disperziju	↓ niža površinska napetost	↑↑↑ više čvrste tvari dostupno za formiranje čestica
Konačni produkt vlage	↓↓ niži parcijalni tlak vodene pare	↑↑ viši parcijalni tlak zraka za sušenje	↓↓ niža relativna vlažnost zraka	-	↑↑ veća količina vode uslijed višeg parcijalnog tlaka	↓↓↓ nedostatak vode u uzorku nastaje veoma suh produkt	↓ manje isparavanje vode, niži parcijalni tlak
Učinkovitost	↑↑ bolja separacija u ciklonu	↓više vlage dovodi do prianjanja produkta za stijenke	↑eventualno osušeni produkt prevenira prianjanje	-	↑↓ ovisi o primjeni	↑↑nedostatak higroskopnosti rezultira lakšim sušenjem	↑ veće čestice lakše se separiraju u ciklonu

1.2. CIKLODEKSTRINI

1.2.1. Struktura i derivati ciklodekstrina

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji imaju veliku primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i tekstilnoj idustriji. Građeni su od 6, heksamer, (α-ciklodekstrin); 7, heptamer, (β-ciklodekstrin); 8, oktamer, (γ-ciklodekstrin); (Slika 4) ili više glukopiranoznih jedinica vezanih α-1-4-glikozidnom vezom. Ciklodekstrini s manje od 6 glukopiranoznih jedinica ne mogu nastati zbog steričkih razloga, dok ciklodekstrini s više od 8 glukopiranoznih jedinica nemaju farmaceutski značaj (Frömming i Szejtli, 1994). S porastom broja glukopiranoznih jedinica u strukturi povećava se i promjer centralne šupljine molekule ciklodekstrina (Martin del Valle, 2004).

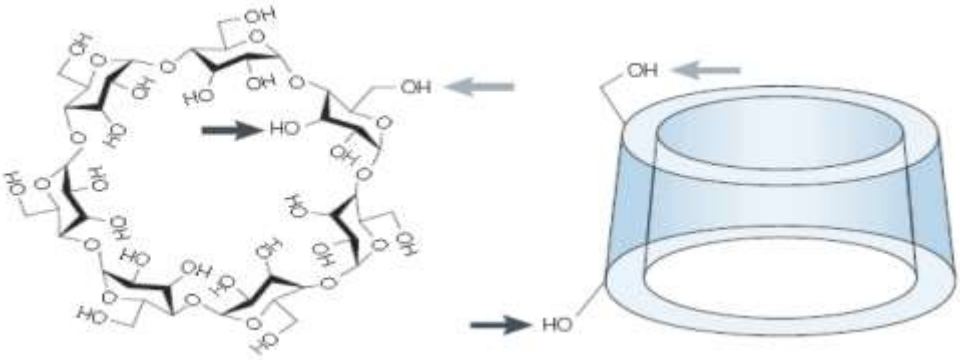


Slika 4. Struktura i dimenzije prirodnih derivata ciklodekstrina (α, β i γ ciklodekstrini; preuzeto iz Martin del Valle, 2004).

Ciklodekstrini nastaju razgradnjom škroba uz enzim ciklodekstrin-glukoziltransferazu (CGT) , kojeg proizvode mikroorganizmi roda *Bacillus*, pri čemu dolazi do intramolekularne reakcije primarnog produkta razgradnje škroba bez prisutnosti vode. Razgradnjom škroba uz

enzim CGT nastaje smjesa α-, β-, γ-ciklodekstrina, međutim, sinteza se može usmjeriti prema željenom derivatu dodatkom određenih tvari (npr., toluen za nastajanje β-ciklodekstrina; dekan za nastajanje α-ciklodekstrina, α-naftol i metilketon za nastajanje γ-ciklodekstrina) te kontrolom pH i temperature reakcijskog medija (Frömming i Szejtli, 1994).

Najstabilnija konfiguracija ciklodekstrina je konfiguracija krnjeg stošca s centralnom šupljinom. Takva struktura je posljedica konformacije glukopiranoznih jedinica koje se nalaze u konformaciji stolice. Zbog rigidne strukture kao i nemogućnosti slobodne rotacije oko α-1,4 veze, primarne i sekundarne hidroksilne skupine nalaze se na suprotnim krajevima šupljine te su orijentirane prema vanjskoj strani molekule i to sekundarne na velikom, a primarne na malom otvoru molekule. Zbog slobodne rotacije primarnih hidroksilnih grupa smanjuje se promjer šupljine na strani primarnih hidroksilnih skupina pa nastaje oblik krnjeg stošca (Slika 5) (Davis i Brewster, 2004; Martin del Valle, 2004).



Slika 5. Orijentacija hidroksilnih skupina unutar molekule ciklodekstrina (preuzeto iz Davis i Brewster, 2004).

Unutrašnjost molekule ciklodekstrina omeđena je atomima ugljika i kisika eterskih veza glukopiranoznih jedinica (C-C, C-H i C-O-C veze), što daje lipofilni karakter šupljini i sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa s različitim hidrofobnim molekulama (molekularno kapsuliranje). Površina ciklodekstrina je dovoljno hidrofilna, zbog velikog broja hidroksilnih skupina, što omogućava relativno dobru topljivost ciklodekstrina u vodi, a samim tim i kompleksa (Davis i Brewster, 2004). Topljivost prirodnih ciklodekstrina u vodi značajno je manja od analognih linearnih dekstrina, što je posljedica stvaranja intramolekulskih vodikovih veza između hidroksilnih skupina susjednih glukopiranoznih jedinica u molekuli ciklodekstrina (stvara se prsten vodikovih veza između C_2-OH i susjedne C_3-OH

glukopiranozne jedinice). Ovakvim se vezanjem dodatno stabilizira kristalna rešetka molekule ciklodekstrina te se smanjuje potencijal hidroksilnih skupina za stvaranje vodikovih veza s okolnim molekulama vode. Nastankom većeg broja intermolekulskih vodikovih veza, smanjuje se broj hidroksilnih skupina slobodnih za interakciju s molekulama vode, a to smanjuje topljivost molekule. Topljivost prirodnih ciklodekstrina nije srazmjerna broju prisutnih hidroksilnih skupina. Tako je topljivost α-ciklodekstrina u vodi nešto viša nego topljivost β-ciklodekstrina, iako on sadrži više hidroksilnih skupina. U molekuli β-ciklodekstrina stvara se prsten od 7 vodikovih veza koje uzrokuju veću rigidnost molekule i relativno nisku topljivost β-ciklodekstrina u odnosu na ostale prirodne ciklodekstrine te iznosi 1,85 g/100 mL vode. U molekuli α-ciklodekstrina zbog steričkih razloga nastaje samo 5 vodikovih veza pa se time objašnjava njegova bolja topljivost (7,8 puta topljiviji od β-ciklodekstrina). γ-ciklodekstrin je najtopljiviji derivat prirodnih ciklodekstrina zbog svoje neplanarne i manje rigidne, odnosno fleksibilnije strukture (20,6 g/100 mLvode). Tališta α- , β- i γ-ciklodekstrina iznose između 240 i 265 °C, što je posljedica stabilne strukture kristalne rešetke (Tablica 4.) .

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih ciklodekstrina (Szejtli, 1998).

	α-ciklodekstrin	β-ciklodekstrin	γ-ciklodekstrin
broj glukopiranoznih jedinica po molekuli	6	7	8
M ($gmol^{-1}$)	972	1135	1297
promjer centralne šupljine (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
topljivost u vodi na sobnoj temperaturi (%)	14,5	1,85	23,2

Zbog veličine centralne šupljine, jednostavnog načina dobivanja te ekonomskih razloga, najčešće se koristi β-ciklodekstrin ograničene topljivosti koja je najčešće uzrokovana

visokom energijom kristalne rešetke te intramolekularnim vodikovim vezama. Uslijed njegove slabe topljivosti u vodi i sklonosti stvaranja kompleksa ograničene topljivosti, sintetiziran je cijeli niz derivata ovog ciklodekstrina. Najčešće se dobivaju aminacijom, esterifikacijom i eterifikacijom primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina. Uvođenjem novih supstituenata u strukturu ciklodekstrina, mijenja se volumen hidrofobne šupljine, a samim time i njihova fizičko-kemijska svojstva, kao što su topljivost u vodi, kemijska stabilnost te sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa (Martin del Valle, 2004). Kemijskim modifikacijama prirodnih ciklodekstrina sprječava se stvaranje intramolekulskih vodikovih veza pa nastaje velik broj stereoizomera čime kristalni ciklodekstrin poprima amorfnu strukturu te se značajno povećava topljivost derivata. Supstitucijom hidroksilne skupine čak i lipofilnim supstituentom kao što je metilna skupina, može se znatno povećati topljivost derivata jer uzrokuje pucanje intramolekulskih vodikovih veza (Davis i Brewster, 2004). Hidrofilni derivati ciklodekstrina značajni u farmaciji obuhvaćaju metilirane, hidroksialkilirane te razgranate derivate. Najčešće se koriste nasumično metilirani β-ciklodekstrin (RAMEB), dimetil-β-ciklodekstrin (DMβCD), hidroksipropil-β-ciklodekstrin (HPβCD) te maltozil- i glukozil-β-ciklodekstrin (Loftsson i Brewster, 2004; Szente i Szejtli, 1999).

Uvođenjem izrazito lipofilnih supstituenata, kao što su alkilne i acetilalkilne skupine, dobiven je niz lipofilnih derivata ciklodekstrina, slabije topljivosti u vodi, prikladnih za izradu pripravaka s produljenim oslobađanjem hidrofilnih lijekova te polipeptida i proteina (Hirayama i Uekama, 1999). Uvođenjem ionizirajućih skupina, dobiveni su derivati ciklodekstrina čija topljivost ovisi o pH-vrijednosti medija, a među njima su najznačajniji karboksilirani, karboksialkilirani te alkilsulfonirani derivati, npr. sulfobutileter-β-ciklodekstrin (SBEβCD). Nadalje, vezanjem molekule ciklodekstrina na neki polimerni nosač ili međusobnim umrežavanjem ciklodekstrinskih monomera, mogu nastati polimerni derivati ciklodekstrina. Polimeri niže molekulske mase koji u strukturi imaju do 5 molekula ciklodekstrina su dobro topljivi u vodi, dok polimeri više molekulske mase (više od 5 molekula ciklodekstrina) su netopljivi u vodi. Oni u vodi bubre stvarajući gelove (Davis i Brewster, 2004; Frömming i Szejtli, 1994). U komercijalno dostupnim lijekovima s ciklodekstrinima prevladava uporaba β-ciklodekstrina (54,8%), a nakon njega HPβCD s 1,1%, α-CD s 9,6%, a RAMEB, SBEβCD i HPγCD zastupljeni su s 6,5% (Kurkov i Loftsson, 2013).

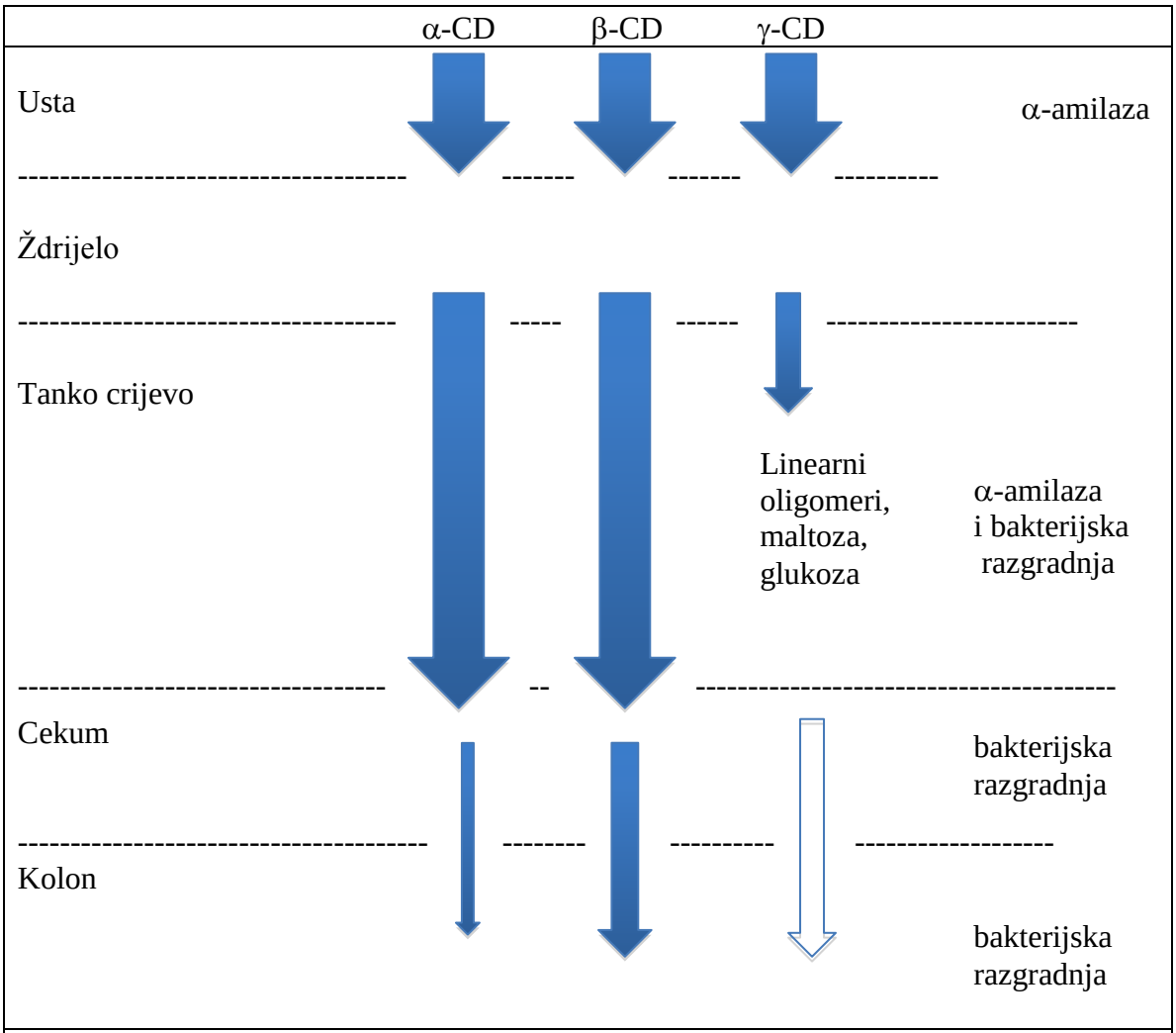
Tablica 5. Fizičko-kemijska svojstva nekih farmaceutski važnih derivata ciklodekstrina.

	2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin	Natrijeva sol sulfobutileter-β-ciklodekstrina	Nasumično metilirani-β-ciklodekstrin
Broj glukopiranoznih jedinica	7	7	7
M ($gmol^{-1}$)	1400	1312	2163
R	$-CH_2CHOHCH_3$	$-(CH_2)_4SO_3^-Na^+$	$-CH_3$
Prosječan broj supstituenata po glukopiranoznoj jedinici	0,65	1,8	0,9
Topljivost u čistoj vodi pri 25 °C (mg/mL)	>600	>500	>500

1.2.2. Toksikološki i regulatorni status ciklodekstrina

Ciklodekstrini su u potpunosti biokompatibilne molekule koje ne potiču imunoreakcije u organizmu te su relativno niske toksičnosti (Uekama i sur., 1998; Irie i Uekama, 1997). Zbog velike molekulske mase i hidrofilnog karaktera, apsorpcija u probavnom sustavu im je ograničena, a oralna bioraspoloživost iznosi svega 1 do 3%. Apsorbirana doza ciklodekstrina, kao i doza primijenjena parenteralno, nepromijenjena se izlučuje putem bubrega. Moguća je topikalna i oralna primjena α-, β- i γ-ciklodekstrina, te njihovih hidrofilnih derivata, kao što su 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin, sulfobutil-β-ciklodekstrin i maltozil-β-ciklodekstrin. Nakon oralne primjene (Tablica 6), metaboliziraju se u debelom crijevu utjecajem crijevne mikroflore u maltodekstrin, maltozu i glukozu, koji se uključuju u metabolizam ugljikohidrata te se izlučuju u obliku CO_2 i vode (Frömming i Szejtli 1994).

Tablica 6. Shematski prikaz metaboličke razgradnje prirodnih ciklodekstrina u probavnom traktu nakon oralne primjene. Ciklodekstrini se sporo hidroliziraju utjecajem α-amilaze, a brzo se razgrađuju utjecajem bakterijskih enzima (prilagođeno prema Kurkov i Loftsson, 2013).



Metaboliti	CO_2 , H_2, CH_4	CO_2 , H_2, CH_4	CO_2 , H_2, CH_4
Nemetabolizirani ciklodekstrini u fecesu	0,3%	> 4%	0% (čak i kod jako visokih doza)
Oralna bioraspoloživost	2-3%	oko 0,3%	< 0,1%

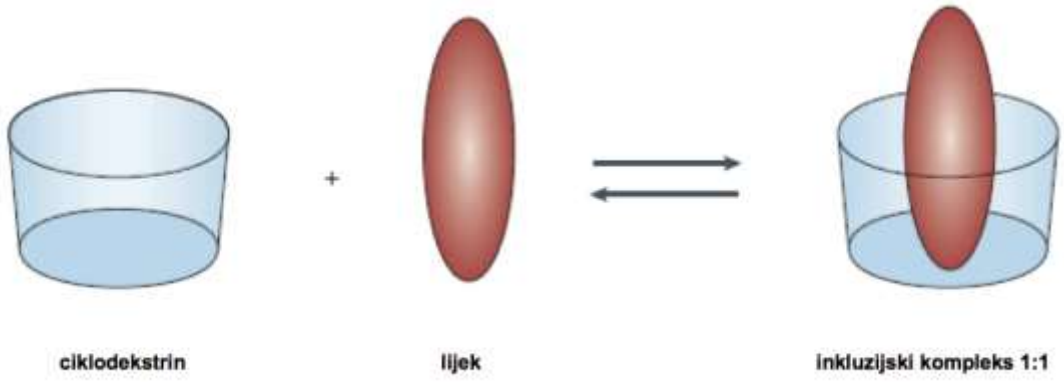
Hidrofilni derivati ciklodekstrina slabo prolaze lipofilne biološke membrane, zbog čega imaju zanemarivo nisku oralnu, dermalnu ili okularnu bioraspoloživost, pa ne uzrokuju lokalne iritacije i/ili kontaktne alergije. Čak i relativno lipofilni derivati, kao što je nasumično metilirani-β-ciklodekstrin, imaju izrazito ograničenu permeabilnost kroz biološke membrane tijela. Zbog slabe permeabilnosti, oralno primijenjeni ciklodekstrini se gotovo ne apsorbiraju u sistemsku cirkulaciju pa stoga ne pokazuju nikakve toksične učinke. γ-ciklodekstrin i hidrofilni derivati β-cikodekstrina, kao što su 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin, sulfobutil-β-ciklodekstrin, mogu se koristiti i u parenteralnim pripravcima zbog njihove dokazane intravenozne netoksičnosti te brze eliminacije u nepromijenjenom obliku putem bubrega. Zbog toksikoloških učinaka, β-ciklodekstrin se ne može primjenjivati parenteralno, dok je uporaba α-ciklodekstrina ograničena na izrazito niske koncentracije (Loftsson i Duchene, 2007). Prirodni derivati ciklodekstrina lako stupaju u interakciju s lipidnim komponentama staničnih membrana, pri čemu nastaju teško topljivi kompleksi (kompleksi β- ciklodekstrina i kolesterola) koji se talože u tubulima bubrega. γ-ciklodekstrin ne pokazuje ta svojstva te je zbog toga prikladan za parenteralnu primjenu (Munro i sur., 2004). Metilirani derivati β-ciklodekstrina destabiliziraju biološke membrane zbog interakcije s kolesterolom te pokazuju hemolitički učinak koji je ovisan o dozi, stoga ni ovi derivati nisu prikladni za paranteralnu primjenu (Martin del Valle, 2004; Irie i Uekama, 1997). Intramuskularna primjena se ne preporuča zbog iritacije tkiva koja može nastati, a naročito kod α- i β-ciklodekstrina uslijed njihove niske topljivosti (Carrier i sur., 2007).

Regulatorni status ciklodekstrina se stalno mijenja. β-ciklodekstrin se koristi u nizu ljekovitih oblika u velikom broju zemalja te se uz određena ograničenja smatra sigurnim za primjenu (GRAS- *Generally Recognized as Safe*). Pojedini derivati ciklodekstrina uključeni su i u različite farmakopeje pa tako Europska farmakopeja navodi monografije za α-ciklodekstrin, β-ciklodekstrin i 2 hidroksipropil β-ciklodekstrin dok je izrada monografije za sulfobutil-β-ciklodekstrin i γ-ciklodekstrin u postupku (Kurkov i Loftsson, 2013).

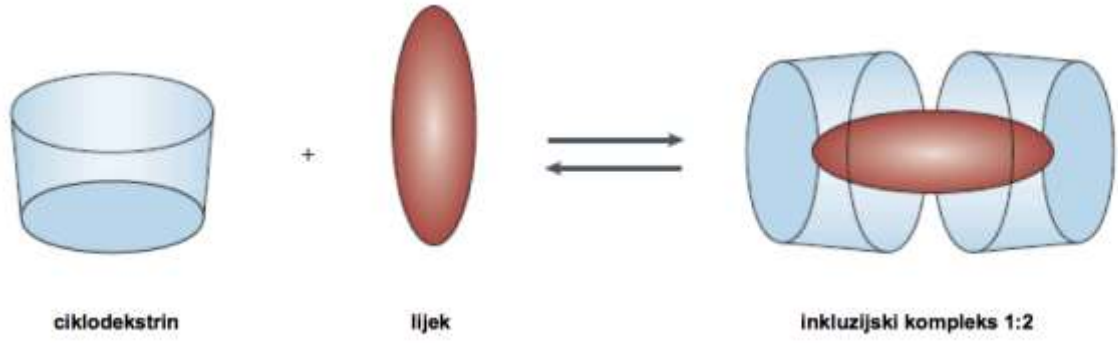
1.2.3. Mehanizam nastanka inkluzijskih kompleksa

Ciklodekstrini se mogu smatrati praznim kapsulama molekularne veličine (”domaćin”) koje mogu u svoju lipofilnu šupljinu uklopiti slabo polarnu molekulu lijeka ili neki njezin dio (”gost”) (Davis i Brewster, 2004). Ciklodekstrini stvaraju inkluzijske komplekse s velikim brojem lijekova različite kemijske strukture i agregatnog stanja. Na nastajanje inkluzijskih kompleksa najveći utjecaj imaju lipofilnost i geometrija same molekule lijeka. Inkluzijski kompleksi nastaju sa tvarima koje su kompatibilne s veličinom hidrofobne šupljine. No, moguće je i stvaranje kompleksa s molekulama značajno većim od centralne šupljine. Tada se u šupljinu ciklodekstrina uklapaju neki dijelovi molekula ili njezini pokrajnji lanci. Ako je ipak molekula prevelika da se kompletno uklopi u jednu šupljinu, moguće je uklapanje molekule u dvije centralne šupljine, kao što je prikazano na Slici 6.

A



B



Slika 6. Shematski prikaz nastajanja ekvimolarnog inkluzijskog kompleksa (A) te kompleksa višeg reda (B) (prilagođeno prema Davis i Brewster, 2004).

Najčešće nastaju kompleksi molarnog odnosa 1:1, ali su mogući i odnosi 2:1, 1:2 ili 2:2, ovisno o molekularnoj masi molekule gosta i steričkim razlozima. Sklonost nastajanja kompleksa opisuje konstanta stabilnosti kompleksa, a njezina vrijednost može varirati od 0 M^{-1}, što upućuje da molekula gost nema afiniteta prema molekuli ciklodekstrina, pa do 10 000 M^{-1}, što je do sada najviša eksperimentalno određena vrijednost (Loffsson i Brewster, 1997).

Ciklodekstrini stvaraju inkluzijske komplekse u otopini i u čvrstom stanju s velikim brojem lijekova, pri čemu se molekule vode smještene u centralnoj šupljini molekule ciklodekstrina zamjenjuju molekulom lijeka, ili češće samo nekim njezinim dijelom. Stvaranje kompleksa ovisi o polarnosti molekule gosta. Samo molekule koje su manje polarnosti od vode stvaraju komplekse s ciklodekstrinima. Pri nastajanju inkluzijskih kompleksa ne dolazi do nastajanja niti do kidanja postojećih kemijskih veza u molekuli lijeka. Glavna pokretačka sila nastajanja kompleksa je u oslobađanju entalpijom bogatih molekula vode iz centralne šupljine molekule ciklodekstrina, čime se smanjuje entalpija sustava, a entropija sustava se povećava, što je termodinamički povoljnije. Nastankom inkluzijskog kompleksa dolazi do van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija između molekule gosta i šupljine ciklodekstrina, a u slučaju nekih molekula i do nastajanja vodikovih veza, pri čemu se smanjuje napetost samog prstena. Važno je naglasiti da je proces stvaranja kompleksa (CD-G) između ciklodekstrina (CD) i gosta (G) reverzibilan, posebice u vodenim otopinama gdje postoji stalna i brza izmjena između vezanog i nevezanog oblika (1).

$$CD + G \underset{K_d}{\overset{K_s}{\rightleftharpoons}} CD\text{-}G \qquad (1)$$

Takav reverzibilan proces opisuje se konstantom stabilnosti (K_S) i konstantom disocijacije (K_d) kao njezinom recipročnom vrijednošću, pri čemu za molarni omjer lijeka i ciklodekstrina 1:1 vrijedi:

$$K_S = \frac{[CD-G]}{[CD][G]}, \ M^{-1} \qquad (2)$$

$$K_d = \frac{[CD][G]}{[CD-G]}, \ M \qquad (3)$$

Prihvatljive vrijednosti konstante stabilnosti kreću se u rasponu od 50-5000 M^{-1}. Niže vrijednosti ukazuju na neznatan afinitet lijeka prema stvaranju inkluzijskog kompleksa dok izrazito stabilni kompleksi s visokim vijednostima konstanti stabilnosti mogu značajno ograničiti bioraspoloživost lijeka (Loffsson i Brewster, 2011; Carrier i sur., 2007).

Nastajanjem inkluzijskog kompleksa mijenjaju se fizička, kemijska i biološka svojstva uklopljene molekule lijeka. U tom kontekstu, ciklodekstrini mogu povećati bioraspoloživost lijekova, kemijski stabilizirati lijek te spriječiti njegovu enzimatsku razgradnju, a u nekim slučajevima mogu utjecati i na permeabilnost lijekova kroz biološke membrane. Stoga se ciklodekstrini koriste za modifikaciju svojstava lijeka, kao što je agregatno stanje, topljivost, brzina oslobađanja iz ljekovitog oblika, stabilnost te bioraspoloživost.

Rezultati mnogobrojnih istraživanja ukazuju da je kombinacija molekularnog inkapsuliranja s različitim transportnim sustavima učinkovita metoda za razvoj novih terapijskih sustava. Primjena tehnika molekularnog modeliranja u razvoju lijekova rezultirala je značajnim povećanjem lipofilnosti novosintetiziranih lijekova, od kojih oko 70% ima nisku topljivost u vodi (Ku i Dulin, 2010). Istovremeno, od trenutno dostupnih lijekova na tržištu, čak 40% se ubraja u skupinu tvari praktički netopljivih u vodi, s topljivošću u vodi nižom od 100 μgmL^{-1} (Kawabata i sur., 2011). Pripremom inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima, netopljive kristalinične tvari se prevode u amorfne, lako topljive produkte, a uslijed toga se povećava i bioraspoloživost tih lijekova u rasponu od 1,1 do 46 puta, neovisno o putu primjene (Kawabata i sur., 2011; Brewster i Loftsson, 2007). Solubilizirajući potencijal ciklodekstrina se može dodatno poboljšati dodatkom odgovarajuće ternarne komponente. U tu se svrhu mogu koristiti različite pomoćne tvari, kao što su metalni ioni, organski ioni, polimeri i neke druge tvari. Dodatkom magnezija u koncentraciji od 0,5% u otopinu lijeka i HP-β-CD znatno se povećava topljivost doksiciklina u vodi, koja je čak 4 puta veća u odnosu na onu opaženu za ekvimolarni kompleks doksiciklina HP-β-CD (He i sur., 2008). U takvom se sustavu značajno smanjila i hidrolitička razgradnja lijeka. Osim metalnih iona za povećavanje solubilizirajućeg učinka ciklodekstrina, mogu se koristiti različite organske ionizirajuće tvari. Taj pristup se naročito primjenjuje s ciljem povećanja topljivosti ionizirajućih molekula lijeka. U pravilu, ako je lijek slaba baza, kao ternarna komponenta se koristi slaba kiselina, kao što su polikarboksilne i polihidrične kiseline, primjerice limunska, vinska i glukonska kiselina. Pokharkar i sur. (2009) su pokazali da karvediol, β-blokator, stvara ternarni kompleks s βCD i limunskom kiselinom u stehiometrijskom omjeru 1:2:2, čime su znatno poboljšane topljivost i permeabilnost lijeka kroz biološke membrane. Smatra

se da ioni zbog svoje hidrofilnosti ne ulaze u centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina, već stabiliziraju nastali kompleks stvaranjem koordinativnih (metalni ioni) ili vodikovih veza s hidroksilnim skupinama molekule ciklodekstrina (organski ioni) i odgovarajućim skupinama molekule lijeka (Kurkov i Loftsson, 2013; Dodziuk, 2006). Sve to pridonosi većoj stabilnosti nastalih ternarnih kompleksa kao i boljoj topljivosti u vodi u odnosu na binarne komplekse, kao što je pokazano u nizu publikacija (Jug i sur., 2014; Loftsson i Brewster, 2012; Gladys i sur. 2003; Mura i sur., 2003; Mura i sur., 2001). Kao najučinkovitije ternarne komponente pokazali su se hidrofilni polimeri, kao što su polivinilpirolidon, hipromeloza, karboksimetilceluloza i polietilenglikol 400 (PEG 400). Iako navedeni polimeri mogu sami stvarati topljive komplekse s lipofilnim lijekovima, u kombinaciji s ciklodekstrinima pokazuju sinergistički solubilizacijski učinak, pri čemu je povećanje topljivosti uzrokovano nastajanjem ternarnog kompleksa često nekoliko puta više od same topljivosti lijeka u zasebnim sustavima koji sadržavaju samo polimer ili ciklodekstrin (Loftsson i Brewster, 2012; Jug i sur. 2011; Loftsson i Masson, 2004).

Osim nastajanja inkluzijskih kompleksa, na porast topljivosti lijekova u prisutnosti ciklodekstrina utječu i neki drugi mehanizmi. Ciklodekstrini, te inkluzijski kompleksi lijeka i ciklodekstrina, pokazuju izraženo svojstvo aglomeracije te stvaranja agregata nanometarskih veličina. Pri relativno niskim koncentracijama ciklodekstrina, udio agregata je relativno nizak (manje od 0,01%), no pri koncentracijama ciklodekstrina od 5 do 10% agregati su dominantan oblik u sustavu. Srednji promjer nastalih agregata varira u rasponu od 10 do 100 nm, a opaženi su i veći agregati od 200 nm koji nastaju nakupljanjem manjih agregata (Jansook i sur., 2010). Nastajanje takvih agregata utječe na solubilizacijski potencijal ciklodekstrina, jer osim nastajanja inkluzijskih kompleksa, uklapanje molekule lijeka u strukture slične micelama dodatno povećava topljivost lijeka u sustavu (Messner i sur., 2010).

Nastajanje inkluzijskih kompleksa može značajno utjecati i na kemijsku stabilnost lijekova. Uklapanjem u centralnu šupljinu ciklodekstrina lijek je najčešće zaštićen od vanjskih utjecaja, što pridonosi njegovoj kemijskoj stabilnosti, a to je dokazano na nizu molekula, posebice onih prirodnog podrijetla (Pinho i sur., 2014). Osim toga, promjene u konformaciji molekule nastale uslijed stvaranja inkluzijskog kompleksa može smanjiti njezinu kemijsku reaktivnost, a u isto vrijeme nastajanje inkluzijskih kompleksa može štititi lijek od enzimske razgradnje u probavnom sustavu. Primjerice, kompleksiranjem salbutamola s β-ciklodekstrinom i terc-butil-β-ciklodekstrinom, smanjuje se metabolizam lijeka u tankom crijevu, što povećava njegovu oralnu bioraspoloživost 1,7 odnosno 4,6 puta (Carrier i sur.,

2007). Povećana topljivost i kemijska stabilnost lijekova uslijed stvaranja inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima značajno povećava bioraspoloživost lijekova neovisno o putu primjene (Kawabata i sur., 2011; Carrier i sur., 2007). U pravilu, primjenom lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa dolazi do značajnog povećanja maksimalne plazmatske koncentracije i bioraspoloživosti lijeka, uz značajno smanjeno t_{max} (vrijeme potrebno za postizanje vršne koncentracije lijeka u krvi), a pri tome ciklodekstrini uglavnom ne utječu na brzinu eliminacije lijeka iz organizma (Buggins i sur., 2007). Uz to, ciklodekstrini mogu povećati permeabilnost lijekova kroz biološke membrane interakcijom s lipofilnim komponentama bioloških membrana, mijenjajući tako njihovu permeabilnost. U isto vrijeme, ciklodekstrini djeluju kao nosači lipofilnih lijekova kroz hidrofilni medij organizma do staničnih membrana, osiguravajući tako visoki kemijski potencijal lijeka na membrani, što značajno pridonosi njegovoj apsorpciji. Loftsson i Brewster (2011) su u svojoj publikaciji dali detaljan pregled mehanizama kojima ciklodekstrini pridonose transportu lijekova kroz stanične membrane.

Ciklodekstrini imaju veliki potencijal u razvoju oralnih oblika s modificiranim oslobađanjem lijeka (Salustio i sur., 2011). Primjenom hidrofilnih derivata moguće je postići trenutno oslobađanje u vodi teško topljivih lijekova te tako osigurati brzo djelovanje lijekova kao što su analgetici, antimigrenici i koronarni vazodilatatori. Pripremom inkluzijskog kompleksa hidrofilnog lijeka s netopljivim derivatima ciklodekstrina moguće je postići produljeno oslobađanje lijeka iz takvog sustava. U tu se svrhu najčešće koriste hidrofobni, alkilirani i acetilirani derivati β-ciklodekstrina te peracetilirani ciklodekstrini s alkilnim lancem srednje duljine (4-6 ugljikovih atoma). Uklapanjem inkluzijskih kompleksa u polimerne matrikse moguće je razviti terapijske sustave s kontroliranom brzinom oslobađanja lijeka. Primjena ciklodekstrina osigurava preciznu kontrolu brzine oslobađanja lijeka te njenu prilagodbu terapijskim potrebama, neovisno o topljivosti lijeka u vodi. Detaljan pregled mehanizama kojima ciklodekstrini utječu na oslobađanje lijeka iz polimernog matriksa dali su u svom radu Bibby i sur. (2000).

Primjenom ciklodekstrina može se prekriti neugodan okus lijeka (Szejtli i Szente, 2005), prevesti tekuće, lako hlapljive i plinovite lijekove u čvrsto stanje (Marques, 2010), kao i spriječiti inkompatibilnosti lijekova s drugim pomoćnim tvarima u formulaciji (Loftsson i Brewster, 2010). Sve navedeno nedvojbeno pokazuje da su ciklodekstrini multifunkcionalni ekscipijensi koji omogućuju modificiranje nepovoljnih biofarmaceutskih svojstava lijekova te razvoj suvremenih ljekovitih oblika.

1.3. Zaleplon

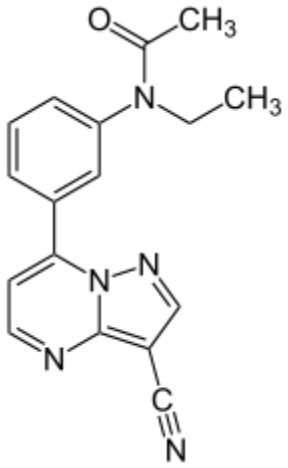
1.3.1. Nesanica

Nesanica je jedan od najčešćih poremećaja spavanja, a rezultira neprikladnom duljinom ili kvalitetom sna. Nesanica uključuje poteškoće kod usnivanja, spavanja te ponovnog usnivanja nakon preranog buđenja, a rezultira značajnim smanjenjem kvalitete života bolesnika te nepovoljno utječe na njegove kognitivne i mentalne sposobnosti. Nesanica je jedan od simptoma koji prate različite psihičke bolesti, kao što su manija i depresija, a može biti povezana i s drugim bolestima, kao što su astma i kronična bol (Sie, 2010). Također, nesanica je povezana s uporabom nekih lijekova, alkohola ili opojnih droga (Heydorn, 2000), a zahvaća oko 30% odrasle populacije. Po svom trajanju, nesanica može biti prolazna, koja traje do 2 tjedna, a povezana je s nekim emocionalnim stanjima; kratkotrajna (od 2 do 4 tjedna), uzrokovana nekom psihičkom traumom ili bolešću, te kronična (trajanje više od 4 tjedna). Osim kod psihičkih bolesnika, kronična nesanica je izraženi problem starije populacije, s prevalencijom od 20 do 50% (Yang i sur., 2011).

Od svog otkrića sredinom prošlog stoljeća, benzodiazepinski hipnotici bili su dominantni lijekovi za liječenje nesanice. Pojava ovisnosti, tolerancije te zlouporaba tih lijekova potaknula je razvoj novih tipova hipnotika, nebenzodiazepinske strukture, koji pokazuju bolja svojstva pri primjeni. Nebenzodiazepinski hipnotici nazivaju se još i Z-lijekovi jer u tu skupinu spadaju zaleplon, zopiklon te zolpid, a kasnije je uveden i ezopiklon. Zaleplon je u terapiju uveden 1997. godine za kratkoročnu terapiju primarne nesanice (Tariq i Pulisetty, 2008).

1.3.2. Kemijska i farmakološka svojstva zaleplona

Zaleplon (N-[3-(3-cijanopirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)fenil]-N-etilacetamid) (Slika 7) kao nebenzodiazepinski hipnotik pripada skupini pirazolopirimidina koji se svojom strukturom razlikuje od ostalih lijekova iz te skupine (benzodiazepini, barbiturati). To je bijeli prah molekulske mase 305,34 g/mol koji ima sedativno i hipnotičko, te djelomično anksiolitičko i antikonvulzivno djelovanje (Doiphode i sur., 2008). Zbog svoje strukture, zaleplon je praktički netopljiv u vodi, a teško je topljiv u alkoholu i propilenglikolu. Koeficijent razdjeljenja zaleplona u sustavu oktanol/voda je konstantan (logP = 1,23) u rasponu pH vrijednosti od 1 do 7 (Sweetman, 2009).



Slika 7. Kemijska struktura zaleplona.

Po svom djelovanju zaleplon je sličan benzodiazepinima i koristi se u kratkotrajnom liječenju nesanice (2-4 tjedna), većinom u odraslih pacijenata. Primijenjen oralno, zaleplon je učinkovit u dozama od 5 i 10 mg uzetim prije spavanja, koje se po potrebi mogu povisiti do 20 mg na dan (Waghmare i sur., 2008). Moguća je i intravenska primjena lijeka, međutim zbog neprikladnosti takvog načina uzimanja hipnotika kao i učestalijih nuspojava to se izbjegava (Rosen i sur., 1999). Zaleplon ostvaruje svoj mehanizam djelovanja na razini GABA receptora u mozgu. Osnovni endogeni agonist GABA receptora je gama-aminomaslačna kiselina koja je glavni inhibicijski transmitor u mozgu. Vezanjem za jednu od podjedinica GABA receptora gama-aminomaslačna kiselina povećava propusnost kloridnih kanala koji su vezani za receptor ($GABA_A$) ili inhibira voltažno-vezane kalcijeve kanale, smanjujući oslobađanje transmitora uz povećano otvaranje kalijskih kanala, čime smanjuje

postsinaptičku podražljivost ($GABA_B$) (Rang i sur., 2007). Zaleplon, kao i benzodiazepini, svoj agonistički učinak ostvaruje preko $GABA_A$ receptora, a veže se za specifično mjesto na Ω-podjedinici receptorskog kompleksa. Uslijed vezanja ovog agonista, olakšava se vezanje gama-aminomaslačne kiseline te njezin inhibitorni učinak. Za razliku od benzodiazepina, zaleplon djeluje specifično na samo jedan tip $GABA_A$ receptora (Ω-1 receptor koji se nalazi na α-podjedinici $GABA_A$ receptorskog kompleksa), pa stoga izaziva manje nuspojava od njih. Nakon primjene, zaleplon ne uzrokuje retrogradnu amneziju, pospanost tijekom dana, respiratornu depresiju, ortostatsku hipotenziju koje su karakteristične za benzodijazepinske lijekove. U uobičajenim dozama, zaleplon ne izaziva razvoj tolerancije i ovisnost, te se stoga ne može zloupotrijebiti. Specifično vezanje zaleplona na Ω-1 receptor je relativno slabo pa dolazi do njegove brže eliminacije s receptora. Uslijed toga, trajanje hipnotičkog učinka zaleplona iznosi 2-4 h, a uslijed toga je i terapijski indeks povoljniji nego kod drugih hipnotika (Heydorn, 2000). Za razliku od ostalih hipnotika, zaleplon u manjoj mjeri pojačava sedacijski učinak istodobno primijenjenog etanola. Također, za razliku od benzodiazepina, zaleplon i ostali nebenzodiazepinski hipnotici ne remete REM fazu sna niti narušavaju ukupni tijek spavanja (Tariq i Pulissety, 2008), što mu daje prednost u liječenju nesanice u usporedbi s ostalim lijekovima koji se koriste u istu svrhu.

Kao posljedica slabe topljivosti zaleplona, a samim time i ograničene apsorpcije lijeka iz probavnog sustava, bioraspoloživost lijeka iznosi svega 30%. Osim toga, lijek se intenzivno metabolizira u jetri u farmakološki nedjelotvorne produkte što dodatno ograničava njegov učinak nakon oralne primjene (Heydorn, 2000). Vrijeme postizanja vršne koncentracije lijeka u plazmi kao i vrijeme polueliminacije iznosi približno 1 h. Otopljena frakcija lijeka se iz probavnog sustava apsorbira unutar jednog sata. Većina doze zaleplona (više od 99%) primarno se metabolizira u jetri pomoću aldehid oksidaze pri čemu nastaje 5-okso-zaleplon kao najvažniji metabolit. Sekundarno, lijek se metabolizira pomoću enzima citokrom P 450 (CYP 450, supstrat 3A4) pri čemu nastaje N-desetil-zaleplon koji se brzo konvertira u 5-okso-desetil-zaleplon. Svi nastali metaboliti se nadalje metaboliziraju reakcijama konjugacije u farmakološki neaktivne metabolite koji se izlučuju urinom. Samo 1% doze lijeka se izluči u nepromijenjenom obliku (Ebbens i Verster, 2010; Rosen i sur., 1999).

1.3.3. Terapijska učinkovitost zaleplona u odnosu na ostale hipnotike

Različiti lijekovi za liječenje nesanice postaju dostupni još sredinom 19. stoljeća. Prvi korišteni sedativni hipnotik je bromid, a zatim su se koristili kloralhidrat, paraldehid i uretan. Njihov glavni nedostatak bio je brz razvoj tolerancije, kao i vrlo uska terapijska širina.

Barbiturati su prvi put sintetizirani početkom 20. stoljeća, a 50 godina kasnije postaju lijekovi izbora u terapiji nesanice. Djeluju tako da produljuju ukupno vrijeme spavanja, skraćuju vrijeme uspavljivanja, kao i trajanje REM faze sna. Kao i prvi poznati hipnotici, barbiturati također pokazuju brz razvoj tolerancije. Nakon prestanka terapije kod većine bolesnika javljaju se ”*rebound*” simptomi, pri čemu se inicijalni simptomi nesanice vraćaju u pojačanom obliku, a moguće su i druge reakcije, kao što su promjene raspoloženja, anksioznost, poremećaji spavanja, uznemirenost i noćne more. U 70-im godinama 20. stoljeća benzodiazepini postaju lijekovi izbora u terapiji nesanice, a neki od njih se koriste i danas.

Idealan hipnotik trebao bi djelovati brzo nakon uzimanja i brzo se iz organizma eliminirati. To bi omogućilo brz početak, održavanje i veću kvalitetu sna, a omogućilo bi bolje funkcioniranje bolesnika tijekom dana i smanjilo potencijalnu interakciju hipnotika s drugim lijekovima koje bolesnik uzima. Poželjno je i odsustvo mamurluka, razvoja tolerancije, mogućnosti zloupotrebe, ovisnosti i ”*rebound*” simptoma (Tariq i Pulisetty, 2008). Zaleplon je po svojim svojstvima najbliži idealnom hipnotiku. Za razliku od benzodiazepinskih hipnotika ne uzrokuje retrogradnu amneziju, dnevnu pospanost, respiratornu depresiju kao i ortostatsku hipotenziju, u običajenim dozama ne izaziva razvoj tolerancije i ovisnost, a ima nizak potencijal zlouporabe. Zaleplon i ostali lijekovi iz skupine se selektivno vežu za GABA receptore što dovodi do brže eliminacije lijeka s receptora, skraćivanja vremena djelovanja i povoljnijeg terapijskog indeksa. Za razliku od ostalih lijekova iz skupine nebenzodiazepinskih hipnotika, zaleplon ima najkraće vrijeme polueliminacije ($t_{½(zaleplon)}$=1 sat, $t_{½(zolpidem)}$= 2,5-2,8 sati, $t_{½(ezopiklon)}$= 5-7 sati), kraće se zadržava u organizmu pa je manja mogućnost nastanka nuspojava. Prednost mu je i to što, za razliku od zolpidema ne izaziva toleranciju i ovisnost. Za razliku od ezopiklona, koji je odobren za dugotrajno liječenje nesanice, zaleplon se koristi u kratkotrajnom liječenju, ne izaziva neugodne nuspojave koje uzrokuje ezopiklon, poput suhoće usta, te nema neugodan okus (Tariq i Pulistty, 2008). Iako u manjoj mjeri u odnosu na benzodiazepine, zaleplon može izazvati nuspojave poput pospanosti, slabosti, glavobolje, amnezije, parestezije, vrtoglavice, halucinacija, naročito ako se primijeni u dozama većim od terapijskih (Heydorn, 2000).

2. Obrazloženje teme

Nesanica je jedan od najčešćih poremećaja spavanja koji zahvaća oko 30% odrasle populacije (Sie, 2010), a znatno je češći kod starije populacije i psihičkih bolesnika (Yang i sur., 2011). Nesanica uključuje poteškoće kod usnivanja, spavanja te ponovnog usnivanja nakon preranog buđenja, a rezultira značajnim smanjenjem kvalitete života bolesnika te nepovoljno utječe na njegove kognitivne, mentalne i radne sposobnosti. Nesanica se liječi primjenom hipnotika iz skupine benzodiazepina, a koriste se i hipnotici nebenzodiazepinske strukture, kao što su zaleplon, zopiklon, zolpid i ezopiklon (Tariq i Pulisetty, 2008). Po svojim farmakološkim svojstvima zaleplon se može smatrati lijekom izbora za liječenje kratkotrajne nesanice, jer ne uzrokuje retrogradnu amneziju, dnevnu pospanost, respiratornu depresiju kao i ortostatsku hipotenziju, a u običajenim dozama ne izaziva razvoj tolerancije i ovisnost, te stoga ima nizak potencijal zlouporabe. Selektivno se veže za GABA receptore te brzo eliminira ($t_{½}$=1 h) što rezultira kraćim vremenom djelovanja i manjom učestalošću nuspojava (Heydorn, 2000). Zaleplon se primjenjuje u obliku konvencionalnih tableta, a zbog niske topljivosti u vodi i intenzivnog metabolizma u jetri pokazuje oralnu bioraspoloživost od samo 30% (Doiphoide i sur., 2008). Stoga je, cilj ovog istraživanja razviti nove ljekovite oblike za oralnu primjenu zaleplona u kojima će brzina oslobađanja lijeka biti usklađena s terapijskim zahtjevima. U tu će se svrhu prirediti inkluzijski kompleksi zaleplona s različitim derivatima ciklodekstrina te će se provesti njihova detaljna fizičko-kemijska karakterizacija, s ciljem vrednovanja utjecaja ciklodekstrina na biofarmaceutska svojstva lijeka. Pripremljeni kompleksi uklopit će se u različite farmaceutske oblike lijekova, s krajnjim ciljem razvoja novog oblika s kontroliranim oslobađanjem zaleplona u probavnom sustavu. Detaljno će se istražiti moguće interakcije u kompleksnom matriksu lijek-ciklodekstrin-polimer te objasniti njihov utjecaj na mehanizme kojima ciklodekstrini utječu na kinetiku oslobađanja lijeka iz oblika.

Specifični ciljevi prve faze ovoga doktorskog rada su detaljno ispitati interakciju zaleplona s prirodnim i kemijski modificiranim derivatima ciklodekstrina u otopini i u čvrstom stanju, te odrediti konstante stabilnosti nastalih kompleksa, kao i termodinamičke parametre koji uvjetuju njihovo nastajanje. Pri tome će se vrednovati učinak ciklodekstrina različite strukture na topljivost zaleplona u vodi, a istražit će se i parametri koji mogu dodatno poboljšati solubilizacijski učinak ciklodekstrina kao i stabilnost nastalih kompleksa. Primjenom 1D i 2D tehnika ^{1}H-NMR spektroskopije analizirat će se struktura nastalih kompleksa.

Specifični ciljevi druge faze istraživanja uključuju pripremu binarnih i ternarnih kompleksa zaleplona i ispitivanih ciklodekstrina u čvrstom stanju korištenjem različitih tehnoloških postupaka kao što su sušenje raspršivanjem i mljevenje u visokoenergetskim mikromlinovima. Provest će se detaljna analiza pripremljenih produkata korištenjem diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) i difrakcije rentgenskih zraka na prahu (XRPD), a pratit će se i morfološke promjene uzorka uslijed kompleksiranja primjenom pretražne elektronske mikroskopije (SEM). Nastajanje inkluzijskih kompleksa u pripremljenim uzorcima analizirat će se primjenom NMR spektroskopije čvrstog stanja. Topljivost i brzina otapanja pripremljenih produkata ispitat će se korištenjem farmakopejske metode, oponašajući prolaz lijeka kroz probavni sustav, s ciljem upoznavanja utjecaja ciklodekstrina na biofarmaceutska svojstva lijeka. Krajnji cilj druge faze istraživanja je razviti optimalan tehnološki postupak za pripremu inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju, koji bi bio brz i jednostavan, ekološki prihvatljiv te pogodan za industrijsku primjenu.

Specifični ciljevi treće faze istraživanja uključuju uklapanje zaleplona i pripremljenih inkluzijskih kompleksa u različite terapijske sustave za oralnu primjenu lijeka te njihovo tehnološko vrednovanje. Pri tome će se razviti dva tipa pripravaka. Prvi tip pripravka uključuje tablete s trenutnim oslobađanjem lijeka koje bi bile prikladne za liječenje nesanice karakterizirane problemima s usnivanjem, dok će drugi tip pripravka biti polimerne mikrosfere s odgođenim oslobađanjem lijeka koje bi mogle poslužiti kao novi terapijski sustav za liječenje nesanice karakterizirane preranim buđenjem i nemogućnošću naknadnog usnivanja. Cilj je optimirati postupak sušenja raspršivanjem za pripremu mikrosfera zaleplona s pH ovisnim oslobađanjem lijeka, načinjenih od različitih derivata Eudragita®. Proučit će se utjecaj vrste otapala korištenog za pripremu otopine za raspršivanje, kao i njezinog polimernog sastava, na svojstva pripremljenih mikrosfera. Primjenom svjetlosne i elektronske mikroskopije odredit će se veličina te morfološke karakteristike mikročestica. Prilagodbom tehnoloških parametara postupka sušenja raspršivanjem optimirat će se uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere, te osigurati postizanje njihove optimalne veličine i oblika. Osim toga, pratit će se utjecaj tehnoloških parametara postupka sušenja raspršivanjem na kristaliničnost lijeka te stabilnost kompleksa u pripremljenim mikrosferama. Primjenom termičkih (DSC) i spektroskopskih (FTIR) metoda studirat će se i potencijalne interakcije među komponentama mikrosfera te procijeniti njihov utjecaj na svojstva ljekovitog oblika. Variranjem polimernog sastava mikrosfera optimirat će se *in vitro* profil oslobađanja lijeka u uvjetima koji oponašaju prolaz oblika kroz probavni sustav. Standardne metode će se dodatno modificirati kako bi se

što vjernije oponašali *in vivo* uvjeti, a primjenom različitih matematičkih modela odredit će se mehanizmi koji kontroliraju brzinu oslobađanja lijeka iz mikrosfera. U svim fazama istraživanja kritički će se procjenjivati utjecaj ciklodekstrina i korištenih polimera na tehnološke i biofarmaceutske karakteristike mikrosfera, a prikladne formulacije će se dodatno optimirati s ciljem razvoja novog terapijskog sustava s kontroliranim oslobađanjem, prikladnog za oralnu primjenu teško topljivih lijekova u vodi.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali, reagensi i kemikalije

Kao djelatna tvar korišten je zaleplon (ZAL, 99,70% čistoće), N-[3-(3-cijanopirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ilfenil]-N-etilacetamid (Belupo, Hrvatska).

Za pripravu inkluzijskih kompleksa upotrijebljeni su prirodni derivati, α-, β-, γ-ciklodekstrin (αCD, βCD, γCD Wacker Chemie GMBH, Germany), a od polusintetskih derivata korišteni su hidroksipropil-β-ciklodekstrin (HPβCD), nasumično metilirani-β-ciklodekstrin (RAMEB) te natrijeva sol sulfobutileter-β-ciklodekstrina (SBEβCD). Prosječna molarna supstitucija za HPβCD i RAMEB (Wacker Chemie GMBH, Germany) iznosila je 0,9 odnosno 1,8, dok je za SBEβCD prosječna molarna supstitucija iznosila 0,9 (CyDex Inc USA). Molekulske mase korištenih ciklodekstrina iznosile su 972 $gmol^{-1}$ za αCD (Cavamax® W6), 1135 $gmol^{-1}$ za βCD (Cavamax® W7), 1297 $gmol^{-1}$ za γCD (Cavamax® W8), 1500 $gmol^{-1}$ za HPβCD, 1331 $gmol^{-1}$ za RAMEB te 2146 $gmol^{-1}$ za SBEβCD (Captisol®).

U istraživanju je korišten i u vodi topljivi β-ciklodekstrin-epiklorohidrinski polimer (PβCD, Cyclolab R&D Ltd, Hungary), molekulske mase od 3500 do 5500 $gmol^{-1}$. Kao hidrofilni polimeri primijenjeni su hidroksipropil metilceluloza (HPMC, Methocel® E5 Premium LV, Colorcon, England) i polivinilpirolidon (PVP, Kollidon 30®, BASF The Chemical Company, Germany).

U razvoju ljekovitog oblika korišteni su mikrokistalinična celuloza (Avicel® PH 101, Sigma-Aldrich GmbH, Germany), raspršivanjem osušeni manitol (Mannogem™ EZ, SPI Pharma, Germany) i magnezijev stearat (Sigma-Aldrich, Germany). Eudragit® S100 (E_{S100}), anionski kopolimer metakrilne kiseline i metilmetakrilata u stehiometrijskom omjeru 1:1, molekulske mase 125 000 $gmol^{-1}$ i Eudragit® NE30D (E_{NE30D}), 30% vodena disperzija neutralnog kopolimera etilakrilata i metilmetakrilata u stehiometrijskom omjeru 1:1, molekulske mase 750 000 $gmol^{-1}$, dobiveni su kao donacija tvrtke Evonik Industries (Republika Mađarska). Glicerolmonostearat (GMS) i amonijev hidrogenkarbonat nabavljeni su od Sigme (Njemačka).

U svim pokusima korištena je deionizirana i dva puta destilirana voda. D_2O (Sigma-Aldrich, Germany), metanol (Sigma-Aldrich, Germany) i sve ostale tvari i otapala upotrijebljeni u izradi ovog rada bile su analitičkog stupnja čistoće.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa solubilizacijskim ispitivanjima

Konstante stabilnosti kompleksa ZAL s ispitivanim ciklodekstrinima određene su ispitivanjem promjene topljivosti lijeka utjecajem ciklodekstrina, prema postupku kojeg su opisali Higuchi i Connors (1965). Ispitivanje je provedeno na prirodnim derivatima, αCD, βCD, γCD, te nizu polusintetskih derivata βCD kao što su HPβCD, RAMEB i SBEβCD (binarni sustavi). Osim toga, ispitan je utjecaj različitih hidrofilnih polimera (HPMC i PVP) na solubilizacijski učinak odabranih derivata ciklodekstrina (ternarni sustavi).

U niz Erlenmayerovih tikvica odvagano je po 50 mg lijeka te dodano 20 mL vodene otopine ispitivanih ciklodekstrina u različitim koncentracijama (binarni sustavi). Raspon koncentracija ispitivanih ciklodekstrina ovisio je o topljivosti pojedinog derivata. Zbog relativno niske topljivosti u vodi, solubilizacijski učinak βCD ispitivan je pri koncentracijama u rasponu od 0 do 12,5 mmol L^{-1}. Ostali derivati ciklodekstrina, zahvaljujući boljoj topljivosti u vodi, primijenjeni su u koncentracijskom rasponu od 0 do 48 mmol L^{-1}. Pripremljeni uzorci u dobro zatvorenim tikvicama miješani su magnetskom mješalicom (500 okretaja/min) pri konstantnoj temperaturi (25,0 ± 0,5 ^{o}C) do uspostavljanja ravnotežne topljivosti (72 sata). Nakon toga, alikvoti uzoraka su profiltrirani (Millipore membranski filtar, 0,45 μm) te je sadržaj lijeka u uzorcima određen spektrofotometrijski (λ=335 nm, Ultrospect Plus Spectrophotometar, LKB, Pharmacia, Švedska). Preliminarna ispitivanja su pokazala da se lijek ne adsorbira na membrane korištenih filtara te da prisutnost ispitivanih ciklodekstrina ni na koji način ne utječe na apsorbanciju lijeka pri 335 nm. Radni raspon metode za određivanje zaleplona u uzorcima iznosio je od 4,00 do 40,00 μgmL^{-1} uz linearnost od 0,9999. Granice dokazivanja i određivanja zaleplona iznosile su 0,10 i 0,55 μgmL^{-1}.

Ternarni sustavi pripremljeni su dodavanjem 1% *(m/V)* hidrofilnog polimera u odabrane binarne sustave. Kako bi se potaklo nastajanje ternarnih kompleksa, uzorci su podvrgnuti zagrijavanju na 70 ^{o}C uz soniciranje tijekom 30 min (Branson B1210E-DTH, Danbury, USA). Nakon toga su uzorci miješani magnetskom mješalicom pri konstantnoj temperaturi 25,0 ± 0,5 ^{o}C tijekom 72 sata, do uspostavljanja ravnotežne topljivosti. Neotopljene krutine odvojene su centrifugiranjem na 3500 okretaja/min tijekom 10 min (Heraus Megafuge 1,0, Njemačka). Alikvoti supernatanta su zatim filtrirani (Millipore

membranski filtar, 0,45 μm), a koncentracija lijeka u filtratu određena je spektrofotometrijski na ranije opisani način. Preliminarna ispitivanja su pokazala da hidrofilni polimeri također ne interferiraju sa spektrofotometrijskim određivanjem ZAL.

Konstante stabilnosti kompleksa (K_S) su određene iz grafičkog prikaza topljivosti ZAL kao funkcije molarne koncentracije ispitivanih ciklodekstrina, prema jednadžbi (4):

$$K_S = \frac{tg\alpha}{So \times (1 - tg\alpha)} \quad (4)$$

gdje $tg\alpha$ predstavlja koeficijent smjera pravca izoterme topljivosti, a s_0 je odsječak na ordinati koja govori o topljivosti lijeka u sustavu bez ciklodekstrina.

3.2.2. Spektrofluorimetrijska ispitivanja

Konstante stabilnosti, termodinamički parametri, kao i stehiometrija nastalih kompleksa ZAL s različitim ciklodekstrinima određeni su primjenom spektrofluorimetrijske titiracije. Osnovna otopina ZAL, koncentracije 0,1 mmol L^{-1} pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine lijeka u malom volumenu metanola te naknadnim razrjeđivanjem s vodom. Ukupna koncentracija metanola u osnovnoj otopini iznosila je 1% (*V/V*). Osnovne otopine ciklodekstrina pripremljene su otapanjem ispitivanih derivata u vodi. Uzorci su pripremljeni miješanjem osnovne otopine ZAL i odgovarajućeg ciklodekstrina, varirajući koncentraciju ciklodekstrina, ovisno o topljivosti pojedinog derivata. Koncentracija lijeka u pripremljenim uzorcima iznosila je 1×10^{-5} mol L^{-1}, a koncentracija ciklodekstrina varirala je od 1×10^{-4} mol L^{-1} do 4×10^{-2} mol L^{-1}. Pripremljeni uzorci miješani su na sobnoj temperaturi 1 sat do uravnoteženja sustava. Za određivanje termodinamičkih parametara, uzorci su termostatirani na određenim temperaturama 30 minuta do uravnoteženja sustava. Fluorescencijski emisijski spektar ZAL u pripremljenim uzorcima snimljen je uz ekscitacijsku svjetlost valne duljine od 393 nm, a emisijski intenziteti snimljeni su u području valnih duljina od 450 do 590 nm, koristeći Olis RSM 1000 spektrofluorimetar (Bogart, Georgia, SAD) opremljen sustavom za termostatiranje. Alikvoti termostatiranih uzoraka koji su korišteni za određivanje termodinamičkih parametara stavljeni su u spektrofluorimetrijsku kivetu i nakon 3 minute izmjereni su fluorescencijski spektri. Svaki snimljeni titracijski spektar predstavlja srednju vrijednost 10 000 pojedinih spektara koji su snimljeni tijekom 10

s. Konstante stabilnosti nastalih kompleksa ZAL s ispitivanim ciklodekstrinima izračunate su koristeći *Specfit*® programski paket.

3.2.3. ^{1}H – NMR ispitivanja

Svi monodimenzionalni ^{1}H – NMR spektri snimljeni su pri 300 K na Bruker DRX 400 spektrometru (Karlsruhe, Njemačka), koristeći inverznu 5 mm probu sa širokopojasnim kanalom i z-gradijentom. Uzorci su pripremljeni otapanjem 0,5 mg lijeka i 5 mg ciklodekstrina ili otapanjem ekvimolarne količine kompleksa lijek/ciklodekstrin u 0,5 mL D_2O. Signal otapala (vode) na 4,80 ppm je korišten kao unutarnji standard.

Dvodimenzionalna tehnika, DOSY, provedena je u vrtložnoj struji korištenjem ledbpgp2s standardne pulsne sekvence iz Brukerove baze. Intenzitet gradijenta varirao je u 64 koraka od 2 do 95% maksimuma snage gradijenta od 50 G cm^{-1}. Trajanje gradijentnog pulsa je 4 ms, a vrijeme difuzije je namješteno na 50 ms. 16 tisuća točaka je prikupljeno u f_2 dimenziji dok su 64 skena prikupljena za svaki porast gradijenta. Difuzijska konstanta je dobivena prilagodbom (eng. fitting) eksponencijalnom padajućom funkcijom opaženih intenziteta signala primjenom relaksacijskog modula Bruker TopSpin 2,5 programa.

Dvodimenzionalna tehnika, ROESY, provedena je korištenjem standardnog Brukerovog pulsnog programa roesytp, s relaksacijskim vremenom odgode od 1,7 s i vremenom miješanja od 300 ms pod uvjetima cw *spinlocka*. ROESY spektri su snimljeni s 2048 točaka u f_2, 400 točaka u f_1, a 64 skena za svaki porast gradijenta.

Za određivanje stehiometrije nastalog kompleksa primijenjena je metoda kontinuirane promjene (Job's plot). Osnovne otopine ZAL i različitih ciklodekstrina, koncentracije 0,65 mmol L^{-1} pripremljene su otapanjem odgovarajuće količine lijeka u određenom volumenu D_2O. Niz otopina pripremljeno je varirajući volumene lijeka i ciklodekstrina da se dobije molni omjer od 9:1 do 1:9 pri čemu ukupna koncentracija lijeka i ciklodekstrina ostaje konstantna ([ZAL] + [CD] = 0,65 mM). Promjene kemijskih pomaka izračunate su prema izrazu (5):

$$\Delta\delta = \delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{slobodni}} \quad (5)$$

Molarni omjer ZAL:CD određen je iz grafičkog prikaza umnoška promjena kemijskih pomaka i koncentracije zaleplona, $(\Delta\delta) \times$ [ZAL], u funkciji molnog udjela čistog zaleplona

(*r*).

Za određivanje konstanti vezanja lijeka i ispitivanih ciklodekstrina pripremljen je niz uzoraka s koncentracijom lijeka od 0,65 mmol L^{-1} dok je koncentracija ciklodekstrina bila u rasponu od 0 do 10 mmol L^{-1}. Konstanta vezanja (K_a) za dobivene komplekse određena je nelinearnom regresijskom analizom najmanjih kvadrata koristeći Matlab 6,0 programski paket. Opaženi kemijski pomaci protona lijeka i K_a opisani su sljedećim izrazima:

$$\mathrm{ZAL} + \mathrm{CD} \overset{K_a}{\leftrightarrow} \mathrm{kompleks} \tag{6}$$

$$\delta = \delta_{\mathrm{ZAL}} \times (1 - \lambda) + \delta_{\mathrm{kompleks}} \text{ , gdje je } \lambda = \frac{[\mathrm{kompleks}]}{[\mathrm{ZAL}]_{\mathrm{uk}}} \tag{7}$$

$$[\mathrm{ZAL}] \times (\delta - \delta_{\mathrm{CD}}) = [\mathrm{kompleks}] \times \left(\delta_{\mathrm{kompleks}} - \delta_{\mathrm{ZAL}}\right) \tag{8}$$

$$K_a = \frac{[\mathrm{kompleks}]}{[\mathrm{ZAL}] \times [\mathrm{CD}]} \tag{9}$$

$$[\mathrm{CD}]_{\mathrm{uk}} = [\mathrm{CD}] + [\mathrm{kompleks}] \tag{10}$$

$$[\mathrm{ZAL}]_{\mathrm{uk}} = [\mathrm{ZAL}] + [\mathrm{kompleks}] \tag{11}$$

gdje je [CD] koncentracija ciklodekstrina, [ZAL] koncentracija lijeka, a [kompleks] koncentracija nastalog kompleksa. $[\mathrm{ZAL}]_{\mathrm{uk}}$ i $[\mathrm{CD}]_{\mathrm{uk}}$ su početne koncentracije, a [ZAL], [CD] i [kompleks] konačne. δ_{CD}, $\delta_{\mathrm{kompleks}}$ su kemijski pomaci protona CD i ZAL. *Ka* se može izračunati prema izrazu (12):

$$K_a = \frac{[\mathrm{kompleks}]}{([\mathrm{CD}]_{\mathrm{uk}} - [\mathrm{kompleks}]) \times ([\mathrm{ZAL}]_{\mathrm{uk}} - [\mathrm{kompleks}]} \tag{12}$$

$$[\text{kompleks}] = \frac{([\text{CD}]_{\text{uk}}+[\text{ZAL}]_{\text{uk}}+{}^{1}/_{\text{K}_\text{a}})\pm\sqrt{([\text{CD}]_{\text{uk}}+[\text{ZAL}]_{\text{uk}}+{}^{1}/_{\text{K}_\text{a}})^{2}-4[\text{CD}]_{\text{uk}}[\text{ZAL}]_{\text{uk}}}}{2} \quad (13)$$

Tada,

$$\delta - \delta_{ZAL} = \frac{-\delta_{ZAL}}{\delta_{\text{kompleks}}{}^{2}} \times \left\{ \frac{[\text{ZAL}]_{\text{uk}}}{[\text{CD}]_{\text{uk}}} + 1 + \frac{1}{K_\text{a}[\text{CD}]_{\text{uk}}} \pm \sqrt{\left(\frac{[\text{ZAL}]_{\text{uk}}}{[\text{CD}]_{\text{uk}}} + 1 + \frac{1}{K_\text{a}[\text{CD}]_{\text{uk}}} \right)^{2} - 4\frac{[\text{ZAL}]_{\text{uk}}}{[\text{CD}]_{\text{uk}}}} \right\} \quad (14)$$

Za određivanje termodinamičkih parametara nastajanja inkluzijskih kompleksa s odabranim derivatima ciklodekstrina, snimljeni su 1D ^{1}H-NMR spektri na različitim temperaturama u rasponu od 295 do 320 K, uz prethodno termostatiranje uzoraka na odgovarajućoj temperaturi tijekom 30 minuta.

3.2.4. Priprema kompleksa u čvrstom stanju

3.2.4.1. Binarni kompleksi pripremljeni tehnikom sušenja raspršivanjem

Binarni kompleksi ZAL s βCD i s RAMEB pripremljeni su metodom sušenja raspršivanjem. 0,5 g lijeka otopljeno je uz soniciranje u 100 mL 96% etanola (*V/V*), dok je ekvimolarna količina ciklodekstrina otopljena u 200 mL vode. Otopine lijeka i ciklodekstrina su međusobno pomiješane, a zatim je otapalo uklonjeno metodom sušenja raspršivanjem koristeći uređaj Büchi 190 Mini Spray Dryer (Flawil, Švicarska). Sušenje raspršivanjem provedeno je pri brzini protoka zraka 700 NLh^{-1}, ulaznoj temperaturi 160 ºC, izlaznoj temperaturi 90 ºC i brzini protoka otopine 10 mL min^{-1}. Kako bi se ispitao utjecaj metode sušenja raspršivanjem na fizičko-kemijska svojstva lijeka, pripremljena je i vodeno-etanolna otopina čistog zaleplona koja je osušena pri istim uvjetima kao što je ranije opisano.

3.2.4.2. Ternarni kompleksi pripremljeni tehnikom sušenja raspršivanjem

Ternarni kompleksi pripremljeni su dodatkom hidrofilnih polimera (HPMC ili PVP) u količini od 10% (*m/m*) u odnosu na sadržaj lijeka u ekvimolarnoj vodeno-etanolnoj otopini ZAL i ciklodekstrina. Sve su otopine sušene raspršivanjem kako je opisano kod pripreme

binarnih kompleksa.

3.2.4.3. Priprema kompleksa u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima

Binarni kompleksi ZAL s βCD ili PβCD pripremljeni su mljevenjem ekvimolarnih količina tvari u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima (Mixer Mill MM 200, Retch, GmbH, Njemačka). Prvo je smjesa tvari pripremljena miješanjem u tarioniku sa špatulom, a zatim je stavljena u posude za mljevenje od 25 mL izrađene od nehrđajućeg čelika. U njima su se nalazile kuglice od istog materijala promjera 10 mm i 5 mm koje služe za mljevenje. Smjesa je mljevena u različitim vremenskim intervalima (10, 20, 30, 45, 60 i 90 min) pri 24 Hz. Dobiveni produkti karakterizirani su primjenom termičke (DSC) i spektralne (XRPD) analize, a morfološke karakteristike primjenom pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM). Da se odredi utjecaj mljevenja u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima na fizičko-kemijska svojstva zaleplona, istoj proceduri je podvrgnut i lijek, bez dodatka ciklodekstrina.

3.2.5. Priprema mikrosfera postupkom sušenja raspršivanjem

3.2.5.1. Priprema mikrosfera iz etanolno-vodene otopine

Otopina za raspršivanje pripremljena je otapanjem 2 g E_{S100} u 62 mL koncentriranog etanola. Nakon potpunog otapanja polimera, u otopinu je dodano 0,2 g ZAL koji je otopljen uz soniciranje i miješanje, a nakon toga je dodano još 38 mL pročišćene vode. Pripremljena otopina podvrgnuta je sušenju raspršivanjem korištenjem laboratorijskog uređaja za raspršivanje (Büchi 190 Mini Spray Dryer, Flawil, Švicarska), uz sljedeće parametre: protok zraka 450 NLh^{-1}, brzinu protoka uzorka od 5 $mLmin^{-1}$, temperaturu ulaznog zraka od 100 °C i izlaznog zraka od 60 °C te intenzitet rada aspiratora od 50% maksimalne vrijednosti.

3.2.5.2. Priprema mikrosfera iz alkalne vodeno-etanolne otopine

Otopina za raspršivanje pripremljena je otapanjem 2 g E_{S100} u 70 mL 0,96% otopine NH_4HCO_3 uz miješanje i zagrijavanje na 50 °C tijekom 15 minuta. Posebno je pripremljena otopina lijeka otapanjem 0,2 g ZAL u 30 mL koncentriranog etanola. Te dvije otopine su pomiješane te osušene raspršivanjem na ranije opisani način (3.2.5.1.). Prazne mikrosfere pripremljene su slijedeći opisanu proceduru, uz izostavljanje lijeka iz postupka. Prilikom izrade mikrosfera s E_{NE30D}, komercijalno dostupna vodena disperzija polimera dodana je izravno u alkalnu otopinu E_{S100}, a nakon toga je dodana etanolna otopina lijeka, kao što je već opisano. Omjeri E_{S100} i E_{NE30D} u formulaciji su iznosili 80:20, 70:30, 60:40 i 50:50, a ukupna količina Eudragita je uvijek iznosila 2 g. Za izradu mikrosfera s GMS, najprije je pripravljena otopina GMS (0,2 g) i ZAL (0,2 g) u koncentriranom etanolu uz zagrijavanje na 50 °C, koja je pomiješana s alkalnom otopinom E_{S100} i podvrgnuta sušenju raspršivanjem. Pritom je temperatura otopine za raspršivanje održavana na 50 °C. Pri izradi mikrosfera s inkluzijskim kompleksom ZAL i RAMEB, primjenjivao se postupak koji je uključivao *in situ* nastajanje inkluzijskog kompleksa. Pritom je potrebna količina RAMEB otopljena u alkalnoj otopini E_{S100}, te je dodana etanolna otopina ZAL. Nakon miješanja tijekom 20 minuta, pripremljena otopina podvrgnuta je sušenju raspršivanjem na ranije opisani način (3.2.5.1.). Na taj su način pripremljene mikrosfere koje su sadržavale 25, 50 i 100% doze lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa s RAMEB. Detaljan sastav pripremljenih mikrosfera prikazan je u Tablici 7.

Nakon sušenja raspršivanjem, sve pripremljene mikrosfere podvrgnute su dodatnoj termičkoj obradi na 85 °C tijekom 210 minuta. Pri tome se pratila promjena mase uzorka utjecajem termičkog programa koristeći KERN MLS analizator vlage (Njemačka). Svi uzorci čuvani su u eksikatoru, zaštićeni od svjetla do daljnje analize.

Tablica 7. Sastav pripremljenih mikrosfera.

Uzorak	ZAL (g)	E_{S100} (g)	E_{NE30D} (g)	GMS (g)	RAMEB (g)
MS_1	0,20	2,00	-	-	-
MS_2			-	-	-
MS_3		1,60	0,40	-	-
MS_4		1,40	0,60	-	-
MS_5		1,20	0,80	-	-
MS_6		1,00	1,00	-	-
MS_7		2,00	-	0,20	-
MS_8			-		0,21
MS_9			-		0,42
MS_{10}			-		0,84

3.2.6. Priprema i tehnološka karakterizacija tableta

Tablete zaleplona pripremljene su postupkom direktnog komprimiranja na tabletnom stroju, model Korsch EK/O (Njemačka), koristeći žigove promjera 10 mm. Pripremljene tablete su sadržavale čisti ZAL, binarni kompleks ili ternarni kompleks. Pripremljene su koristeći dva različita ekscipijensa za direktno tabletiranje i to u vodi netopljiva mikrokristalinična celuloza (TBL – MC, Avicel®) ili raspršivanjem osušeni manitol (TBL-MN Mannogem®). Određena količina lijeka, laktoze i ekscipijensa prosijana je kroz sito otvora 170 μm i miješana u Turbula mikseru (Willy A. Backhofen Maschinenfabrik, Švicarska) tijekom 10 min. Doza lijeka u svim pripremljenim tabletama iznosila je 10 mg. Kako bi se kompenzirala količina hidrofilnih komponenata prisutna u binarnim i ternarnim kompleksima, uzorcima koji su sadržavali čisti lijek dodana je ekvivalentna količina laktoze.

Kao sredstvo za kliženje korišten je magnezijev stearat u količini od 1% (*m/m*) u odnosu na masu tablete. Svojstva oslobođanja lijeka *in vitro* iz pripremljenih tableta ispitana su u umjetnom želučanom mediju bez enzima (pH 1,2), kao što je kasnije opisano.

3.2.7. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

DSC termogrami snimljeni su korištenjem uređaja Perkin-Elmer DSC 7 (SAD) i Mettler TA 4000 Star^{e} (Švicarska). Mjerenja su provedena u atmosferi dušika nakon kalibracije uređaja indijem (čistoća 99,98%; talište 156,61 °C i ΔH_{fus}=28,71 Jg^{-1}). Uzorci (2-5 mg) su odvagnuti u aluminijskim posudicama, a termogram je snimljen pri brzini zagrijavanja od 10 °C min^{-1} u temperaturnom rasponu od 30-300 °C. Sadržaj kristalinične frakcije lijeka u uzorcima (*RDC*) izračunat je prema jednadžbi (15):

$$RDC = \frac{\Delta H_{uzorak}}{\Delta H_{lijek}} \text{ x } 100\% \qquad (15)$$

gdje su ΔH_{uzorak} i ΔH_{lijek} izmjerene vrijednosti entalpije taljenja lijeka za uzorak i kristalinični lijek, normirane s obzirom na sadržaj lijeka u uzorku. Mjerenja su rađena u triplikatu, a relativna standardna devijacija kristaliničnosti je manja od 2,5%.

3.2.8. Rentdgenska difrakcija praškastog uzorka (XRPD)

Rentdgenska difrakcijska analiza praškastih uzoraka provedena je na sobnoj temperaturi korištenjem Philips difraktometra PW1750 (Philips Electronic Instruments, Nizozemska) s okomitim goniometrom u području kutova 2Θ=5-40 ° uz karakteristično zračenje bakra valne duljine $\lambda_{CuK\alpha}$=0,15418 nm. Radni napon generatora iznosio je 40 kV, struja 30 mA, uz brzinu skeniranja od 0,02 $°s^{-1}$.

3.2.9. Infracrvena spektrofotometrija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri snimljeni su korištenjem uređaja Spectrum 100, Perkin Elmer, SAD u rasponu valnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1}, uz rezoluciju od 2 cm^{-1}. Uzorci za analizu pripremljeni su miješanjem 2 mg mikročestica s 298 mg spektroskopski čistog KBr. Nakon usitnjavanja i homogenizacije, uzorci su komprimirani u pastilu korištenjem hidrauličke preše uz tlak 10 kN cm^{-2}.

3.2.10. NMR čvrstog stanja (^{13}C CP-MAS)

NMR spektri praškastih uzoraka snimljeni su korištenjem Bruker Avance II NMR spektrometra pri 100,16 MHz za ^{13}C. Uzorci (100 mg) su punjeni u 4 mm cirkonijeve rotore. ^{13}C spektri snimljeni su pri sobnoj temperaturi pomoću unakrsne polarizacije (CP) pri brzini vrtnje između 10,0 i 15,0 kHz i velike snage ^{1}H razdvajanja. Za svaki spektar prikupljeno je 3000-6000 skenova ovisno o omjeru signal-šum. Za sva mjerenja korišteni su sljedeći parametri: vrijeme opuštanja od 5-7 s, CP kontakt vrijeme od 1-2,5 ms, vrijeme upijanja od 50 ms kao i ^{1}H 90° puls od 2,7 μs (rf snage od 100 kHz). Ukupan broj točaka podataka po spektru u svakom eksperimentu iznosi 4096. Svi spektri su kalibrirani prema vanjskoj referenci (α-glicin), postavljanjem karbonilnog pika α-glicina na 176,5 ppm.

3.2.11. SEM

Uzorci za SEM analizu fiksirani su na nosač pomoću dvostrane ljepljive trake. Električna vodljivost uzorka postignuta je oblaganjem sa smjesom zlata i paladija. Slike su dobivene koristeći SEM Zeis Ultra 55 instrument (Carl Zeiss GmbH, Austrija) pri naponu od 5 kV. Raspon širina slika je od 2,934 mm do 7,622 μm.

3.2.12. Tehnološko vrednovanje pripremljenih mikrosfera

Omjer mase mikrosfera nakon termičke obrade i ukupne mase tvari korištenih prilikom pripreme otopina za raspršivanje izražen kao postotak nazivamo prinos. Sadržaj ZAL u mikročesticama određen je spektrofotometrijski nakon potpune ekstrakcije lijeka iz mikrosfera. 10 mg uzorka otopljeno je u 10 mL koncentriranog metanola uz soniciranje i mućkanje. Zatim je otopina nadopunjena do 100 mL destiliranom vodom i miješana magnetskim mješačem 1 sat. Nakon toga uzorci otopine su profiltrirani, a sadržaj lijeka u uzorcima određen spektrofotometrijski na ranije opisani način. Učinkovitost uklapanja lijeka u mikročestice izračunata je prema sljedećoj formuli (16):

$$Učinkovitost\ uklapanja(\%) = \frac{stvarna\ masa\ lijeka\ u\ mikročesticama}{teorijska\ masa\ lijeka\ u\ mikročesticama} \times 100 \quad (16)$$

Srednji promjer i raspodjela veličine čestica određena je pomoću mikroskopa (Olympus BH-2, SAD). Uzorci naneseni u tankom sloju na predmetno staklo su promatrani pod mikroskopom uz povećanje od 400×. Digitalizirana slika je analizirana kompjuterskim sustavom za analizu slike (Optomax V, Velika Britanija).

Svojstva tečenja pripremljenih uzoraka provedena su primjenom modificiranog farmakopejskog testa sukladno smjernicama opisanim u literaturi (Sansone i sur., 2013). 1 g uzorka je stavljen u graduirani cilindar od 10 mL te je očitan nasipni volumen (V_1). Nakon toga je cilindar potresivan udaranjem o čvrstu podlogu s visine od 1 cm 50 puta te je ponovno očitani volumen (V_2). Taj postupak se ponavljao sve dok vrijednost V_2 nije postala konstantna. Indeks kompresibilnosti i Hauserov indeks, kao pokazatelji svojstava tečenja pripremljenih uzoraka, izračunati su prema sljedećim formulama:

$$Indeks\ kompresibilnosti = 100 \times \frac{V_1 - V_2}{V_1} \quad (17)$$

$$Hauserov\ indeks = \frac{V_2}{V_1} \quad (18)$$

3.2.13. *In vitro* oslobađanje lijeka

In vitro oslobađanje lijeka iz pripremljenih čvrstih sustava ispitano je metodom s lopaticom koristeći Pharma Test uređaj (Pharma-test tip PTW S, Njemačka). Pripremljena tableta ili količina uzorka koja je sadržavala 10 mg ZAL dodana je u 250 mL medija za oslobađanje, termostatiranog na 37 °C. Brzina miješanja podešena je na 50 okretaja po minuti. U ispitivanju su korišteni umjetni želučani (pH 1,2), duodenalni (pH 4,5) i crijevni medij (pH 6,8), a pripremljeni su prema uputama 6. izdanja Europske farmakopeje. U određenim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti od 5 mL uzorka koji su odmah bili nadomješteni jednakim volumenom medija za oslobađanje, termostatiranog na istu temperaturu, da bi se volumen održao konstantnim tijekom cijelog pokusa. Alikvoti su profiltrirani (0,45 μm Milipore membranski filtar), te je sadržaj lijeka u uzorcima određen spektrofotometrijski na UV-VIS spektrofotometru (Ultrospec Plus, LKB, Pharmacia, Švedska) pri 335 nm. Za svaki uzorak i za svaki korišteni medij pokus je ponovljen 6 puta. Izračunata je učinkovitost oslobađanja, DE_{90min} (eng. *dissolution efficiency*) koja je definirana omjerom površine ispod krivulje koja prikazuje količinu oslobođenog lijeka (Q) u vremenu (t) i površine pravokutnika čija visina iznosi 100% oslobođene količine lijeka ($Q_{100\%}$) u istom vremenskom intervalu. Učinkovitost oslobađanja izražena je kao postotak i računa se prema izrazu (19):

$$DE_{90\text{min}} = \frac{\int_o^L Q dt}{Q_{100\%}\, x\, t} \text{ x } 100 \qquad (19)$$

3.2.14. Statistička obrada podataka

Sve vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija *n* nezavisnih mjerenja. Podaci su obrađeni primjenom testa analize varijance (ANOVA) uz razinu statističke značajnosti $p<0,05$. Za statističku obradu podataka korišten je programski paket *Prism GraphPad* (*GraphPad Software*, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Topljivost i stabilnost kompleksa zaleplona s ispitivanim ciklodekstrinima

Cilj ove faze istraživanja bio je ispitati afinitet ZAL prema stvaranju inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima različite kemijske strukture, vrednovati njihov solubilizacijski potencijal te odrediti konstante stabilnosti nastalih kompleksa. Temeljem dobivenih podataka odabrao bi se optimalni derivat ciklodekstrina prikladan za izradu kompleksa u čvrstom stanju.

Interakcija ZAL s ispitivanim ciklodekstrinima u vodenim sustavima praćena je spektrofluorimetrijskom titracijom lijeka te solubilizacijskim ispitivanjima. Preliminarna potenciometrijska titracija (podaci nisu prikazani) pokazala je da ZAL ne ionizira u otopinama s fiziološkim rasponom pH vrijednosti, već da je prisutan kao neutralna molekula. Stoga se ne očekuje da bi pH medija na bilo koji način mogao utjecati na intenzitet interakcije između ZAL i ciklodekstrina te su sva mjerenja provedena u vodenim, nepuferiranim medijima (Challa i sur., 2005).

Tablica 8. Solubilizacijski potencijal i konstante stabilnosti inkluzijskih kompleksa ZAL s ispitivanim derivatima ciklodekstrina određene spektrofluorimetrijskom metodom ($K_{S\text{-}FL}$) i solubilizacijskim ispitivanjima ($K_{S\text{-}SOL}$; srednja vrijednost±SD, n=5).

ciklodekstrin	$K_{S\text{-}FL}(M^{-1})$	$K_{S\text{-}SOL}(M^{-1})$	solubilizacijski potencijal*
αCD	141,25±1,70	20,81±2,37	1,99
βCD	331,13±1,17	112,85±0,23	2,24
HPβCD	16,98±1,23	53,58±3,59	3,48
RAMEB	107,15±1,28	156,21±4,61	7,83
SBEβCD	67,61±1,07	84,83±0,44	4,80
γCD	9,33±1,34	41,10±3,03	2,85

* solubilizacijski potencijal izračunat je kao omjer topljivosti lijeka u otopini s najvećom ispitivanom koncentracijom ciklodekstrina te topljivosti lijeka u vodi

Fluorescencija je analitički važan emisijski proces u kojemu se atomi ili molekule pobuđuju apsorpcijom snopa elektromagnetskog zračenja. Apsorpcijom zračenja u molekuli povećava se njena unutrašnja energija, odnosno molekula prelazi u energijski više stanje, tzv. pobuđeno stanje. Vrijeme zadržavanja molekula u pobuđenom stanju je vrlo kratko (10^{-8} s) te se pobuđene vrste tada vraćaju u osnovno singletno stanje pri čemu dolazi do otpuštanja suviška energije u obliku fotona. Valna duljina emitiranog zračenja, a to ujedno znači i energija emitirane svjetlosti, ovisi o energetskom rascjepu između osnovnog i pobuđenog stanja molekule. Energetska bilanca za reakciju fluorescencije može se definirati sljedećim izrazom:

$$E_{fluor} = E_{aps} - E_{vib} - E_{otap.relaks.} \tag{20}$$

Pri čemu je E_{fluor} energija emitiranog svjetla, E_{abs} energija apsorbiranog svjetla prilikom pobude molekule, E_{vib} energija izgubljena prilikom vibracijske relaksacije, a izraz $E_{otap.relaks.}$ je nastao zbog potrebe otapala koje okružuje molekulu da se reorganizira u pobuđenom stanju i ponovo reorganizira kada molekula dođe u osnovno stanje. Učinkovitost fluorescencije se može definirati veličinom kvantnog iskorištenja (21):

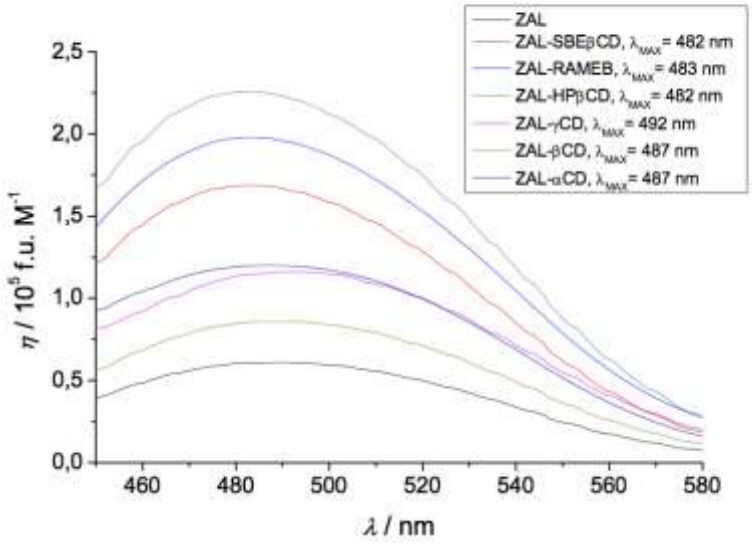
$$\Phi = Ne / Na \tag{21}$$

gdje je *Ne* broj emitiranih fotona, a *Na* broj apsorbiranih fotona.

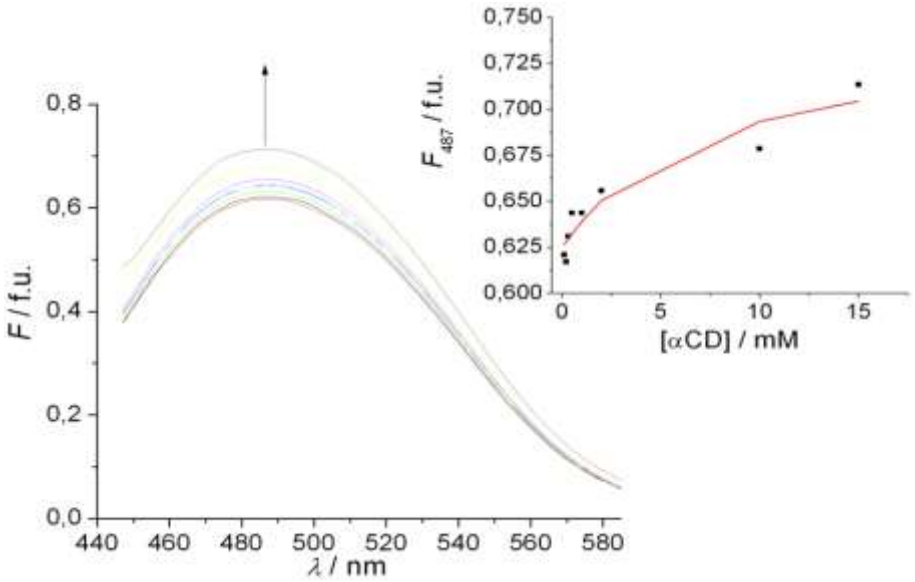
Sposobnost fluorescencije najčešće pripada organskim molekulama koje posjeduju planarnu konfiguraciju, odnosno relativno krutu strukturu u molekuli, konjugirane dvostruke veze ili visoku rezonantnu stabilnost, odnosno elektron donirajuću skupinu (Skoog i sur., 1999). Općenito, tvari koje sadrže arilnu skupinu u svojoj strukturi mogu emitirati svjetlo karakteristične boje. Elektron donirajuća skupina, kao npr. –OH, pojačava intenzitet fluorescencije (Jiang i sur., 2002).

Ranija istraživanja pokazala su da zaleplon fluorescira u vodenim sustavima kad je podražen svjetlom određene valne duljine (Tang i sur., 2003). Stoga je u ovom radu to svojstvo molekule lijeka iskorišteno za određivanje konstante stabilnosti i stehiometrije kompleksa ZAL s ispitivanim derivatima ciklodekstrina. Mjerenja su provedena u vodeno metanolnim otopinama lijeka i ciklodekstrina, a metanol u koncentraciji od 1% (*V/V*) je dodan u uzorke kako bi se osigurala potpuno otapanje lijeka. Snimljeni su spektri pri ekscitacijskom zračenju valne duljine 339 nm, a emisijski spektri su bilježeni pri valnoj duljini od 487 nm.

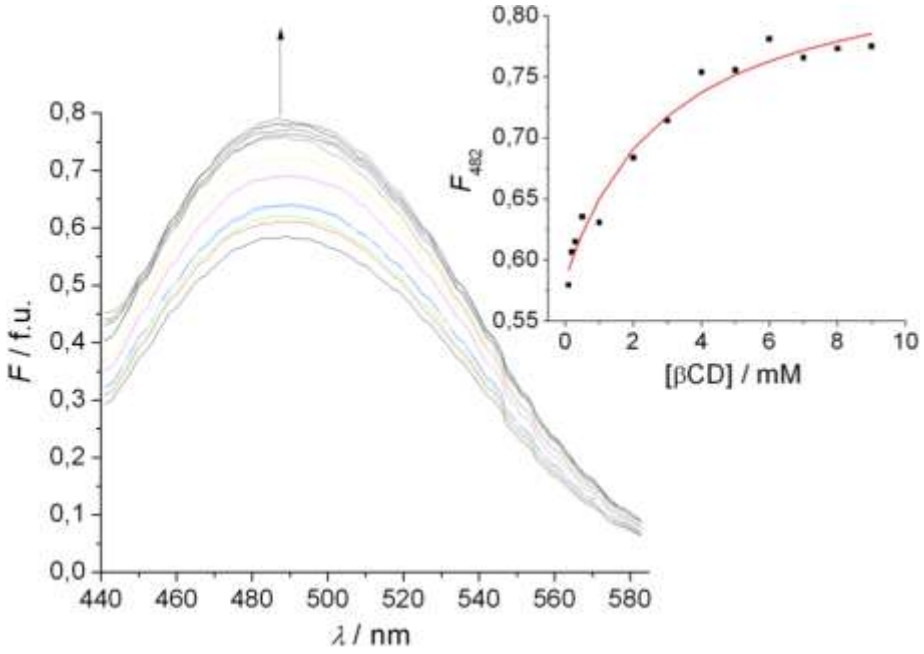
Pri navedenim uvjetima otopine ispitivanih ciklodekstrina ne fluoresciraju. Fluorescencijski emisijski spektri ZAL u otopinama s različitim koncentracijama ispitivanih ciklodekstrina koji su dobiveni spektrofluorimetrijskom metodom prikazani su na slikama 8-14.



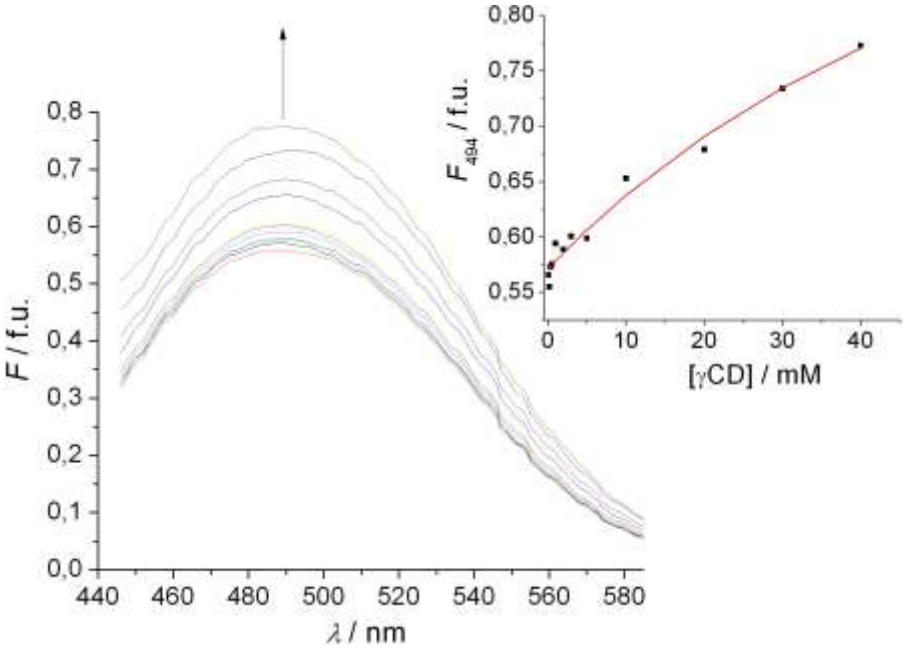
Slika 8. Fluorescentni emisijski spektri dobiveni spektrofluorimetrijskom titracijom ZAL s prirodnim i polusintetskim derivatima ciklodekstrina.



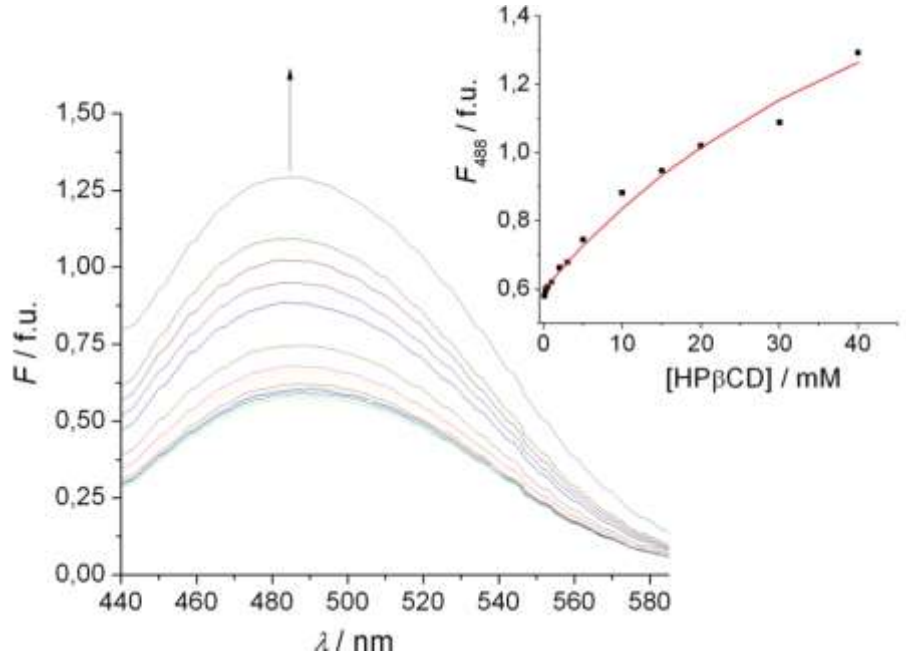
Slika 9. Tipična titracijska krivulja 10 μM otopine ZAL s otopinom αCD (t = 25 °C, *l* = 1 cm). Koncentracija αCD u uzorcima iznosila je od 0 do 15 mM. Umetak: Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 487 nm o koncentraciji αCD.



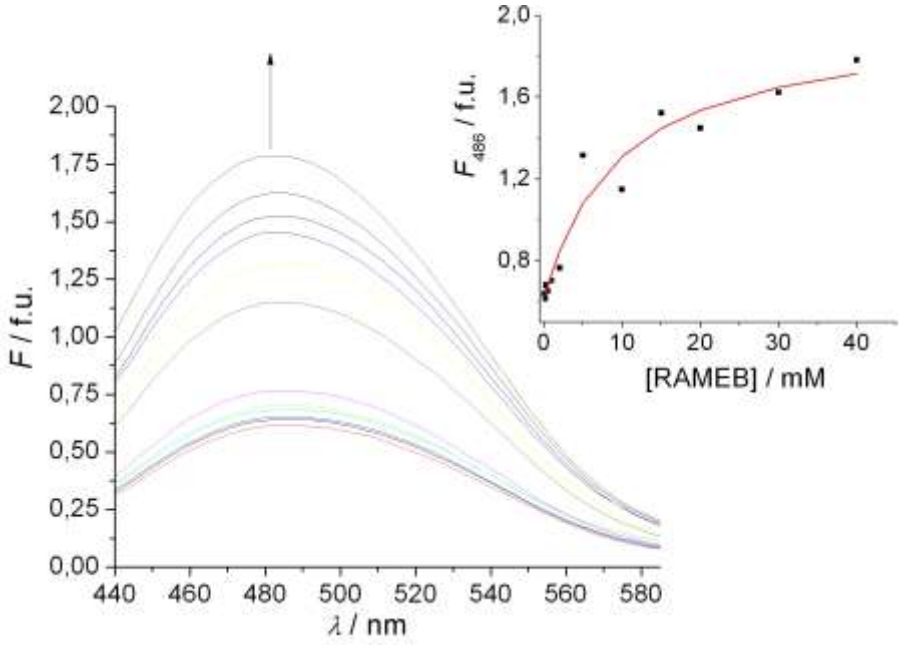
Slika 10. Tipična titracijska krivulja 10 μM otopine ZAL s otopinom βCD (t = 25 °C, *l* = 1 cm). Koncentracija βCD u uzorcima iznosila je od 0 do 15 mM. Umetak: Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 482 nm o koncentraciji βCD.



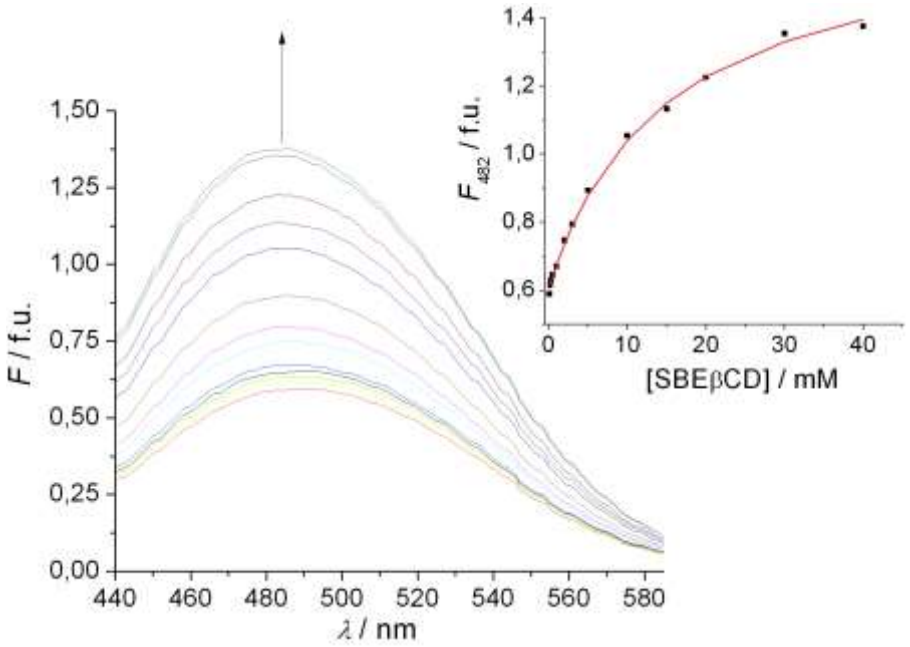
Slika 11. Tipična titracijska krivulja 10 μM otopine ZAL s otopinom γCD (t = 25 °C, *l* = 1 cm). Koncentracija γCD u uzorcima iznosila je od 0 do 15 mM. Umetak: Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 494 nm o koncentraciji γCD.



Slika 12. Tipična titracijska krivulja 10 μM otopine ZAL s otopinom HPβCD (t = 25 °C, *l* = 1 cm). Koncentracija HPβCD u uzorcima iznosila je od 0 do 15 mM. Umetak: Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 488 nm o koncentraciji HPβCD.



Slika 13. Tipična titracijska krivulja 10 μM otopine ZAL s otopinom RAMEB (t = 25 °C, *l* = 1 cm). Koncentracija RAMEB u uzorcima iznosila je od 0 do 15 mM. Umetak: Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 486 nm o koncentraciji RAMEB.



Slika 14. Tipična titracijska krivulja 10 μM otopine ZAL s otopinom SBEβCD (t = 25 °C, *l* = 1 cm). Koncentracija SBEβCD u uzorcima iznosila je od 0 do 15 mM. Umetak: Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 482 nm o koncentraciji SBEβCD.

Kod svih je uzoraka uočena promjena intenziteta fluorescencije kao i valne duljine na kojima ZAL pokazuje maksimum fluorescencije (Slike 8-14). Promjene u valnim duljinama emisijskog maksimuma mogu se pripisati interakciji lijeka i ciklodekstrina, vrlo vjerojatno uslijed nastajanja inkluzijskog kompleksa. Pri nastajanju inkluzijskih kompleksa ne dolazi do nastajanja niti do kidanja postojećih kemijskih veza u molekuli lijeka. Glavna sila koja potiče kompleksaciju je oslobađanje energijom bogatih molekula vode iz šupljine ciklodekstrina, što povećava entropiju sustava i čini ovaj proces termodinamički povoljnim. Također, ulaskom nepolarne molekule lijeka (molekula lijeka mora biti manje polarna od molekule vode) u šupljinu dolazi do hidrofobnih interakcija između lijeka i ciklodekstrina, što smanjuje napetost ciklodekstrinskog prstena i stabilizira prsten (Martin del Valle 2004; Jiang i sur. 2002; Szejtli, 1998). Povećanje intenziteta fluorescencije ZAL javlja se kao posljedica povećanja fluorescencijskog iskorištenja nakon inkluzije molekule lijeka u lipofilnu centralnu šupljinu ciklodekstrina uslijed smanjenja broja polarnih molekula otapala (vode) iz centralne šupljine. Također, tako uklopljena molekula lijeka ima ograničenu slobodu rotacije unutar lipofilne centralne šupljine ciklodekstrina, uslijed čega se povećava rigidnost te molekule, a ujedno smanjuje i konstanta neradijativne relaksacije. Posljedica svega navedenog je veća fluorescencijska učinkovitost (Sivasankar i sur., 2012).

Analiza dobivenih rezultata upućuje na nastajanje inkluzijskih kompleksa stehiometrijskog omjera lijek:ciklodekstrin, 1:1. Predloženi model vezanja opisan je jednadžbom (22):

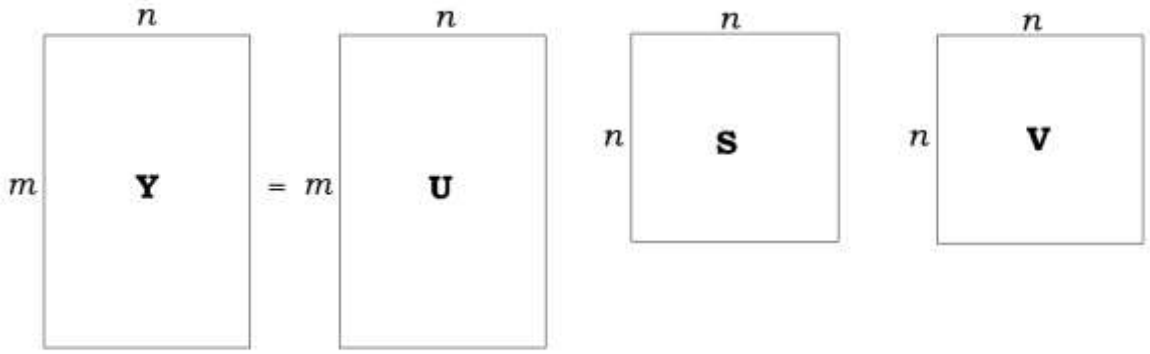
$$\mathrm{ZAL} + \mathrm{CD} \rightleftarrows \mathrm{ZAL-CD}, \quad K_{\mathrm{S\text{-}FL}} = \frac{[ZAL-CD]}{[ZAL][CD]} \tag{22}$$

Vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa ZAL i ispitivanih ciklodekstrina koje su određene spektrofluorimetrijskom titracijom prikazane su u Tablici 8. Temeljem dobivenih vrijednosti konstante stabilnosti kompleksa moguće je procijeniti afinitet vezanja lijeka s ispitivanim ciklodekstrinima. Vrijednosti konstanti stabilnosti su pokazale da je od svih ispitanih derivata ciklodekstrina βCD najprikladniji za interakciju s molekulom lijeka što se može objasniti veličinom centralne šupljine βCD koja je najprikladnija za inkluziju ZAL. Sterička kompatibilnost molekule lijeka s centralnom šupljinom je ključni parametar koji određuje njezin afinitet prema stvaranju inkluzijskog kompleksa i ona ovisi o relativnom odnosu veličine centralne šupljine molekule ciklodekstrina i veličine molekule lijeka ili samo neke njene skupine koja se uklapa u tu šupljinu. Ako molekula lijeka nije odgovarajuće veličine, neće se dobro uklopiti u centralnu šupljinu ciklodekstrina te će pokazivati slab afinitet vezanja. Većina lijekova s ciklodekstrinima stvara komplekse u omjeru 1:1. Zabilježeno je i stvaranje kompleksa u stehiometrijskom omjeru 1:2 gdje dvije molekule ciklodekstrina stvaraju komplekse s jednom molekulom lijeka (svaka molekula ciklodekstrina kompleksira samo jedan dio molekule lijeka). Osim steričkog faktora, vrlo važan faktor koji opisuje sposobnost molekule ciklodekstrina da tvori kompleks s nekom drugom molekulom jest termodinamička interakcija između molekula ciklodekstrina, lijeka i otapala. Da bi došlo do kompleksiranja, taj proces mora biti energetski povoljan. Vrijednost konstante stabilnosti kompleksa ZAL i αCD je dva puta manja od kompleksa ZAL s βCD što se objašnjava steričkom inkompatibilnošću lijeka s centralnom šupljinom αCD. Vrlo vjerojatno, zaleplon je prevelika molekula za uklapanje u centralnu šupljinu αCD, dok je kod γCD centralna šupljina prevelika za uklopljeni lijek, pa uslijed toga ne dolazi do sekundarnih interakcija (van der Waalsove sile, hidrofobne interakcije, vodikove veze, elektrostatske interakcije), koje bi dodatno stabilizirale nastali kompleks, pa je i dobivena vrijednost konstante stabilnosti ZAL/ γCD izrazito niska. Nadalje, prisutnost supstituenata na jezgri βCD sterički ometaju uklapanje

lijeka u centralnu šupljinu pa su dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti za ispitivane derivate βCD (HPβCD, RAMEB i SBEβCD) nešto niže (Frömming i Szejtli 1994).

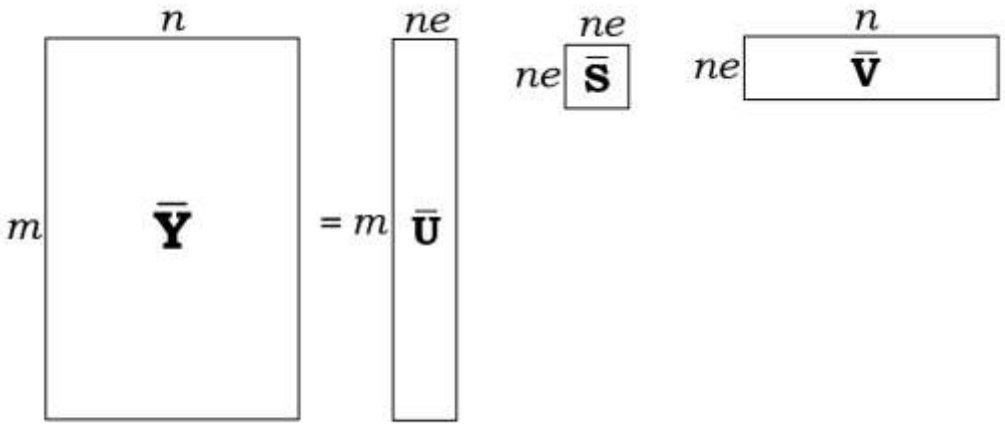
Obradom dobivenih podataka spektrofluorimetrijskom metodom korištenjem programskog paketa Specfit® omogućilo je i određivanje stehiometrije nastalih kompleksa (Gampp i sur., 1986; Gampp i sur., 1985a; 1985b). Broj spektrofluorimetrijskih signifikantnih vrsta određen je faktorskom analizom integriranom u programu, a izabran je model koji daje najmanje vrijednosti standardne devijacije, σ, i najbolje odgovara eksperimentalnim podacima (fit). Faktorska analiza izvršena je prema algoritmu SVD (eng. *Singular Value Decomposition*), koji se smatra jednim od najstabilnijih i najsnažnijih numeričkih algoritama (Maeder i Neuhold, 2007). Prema tom algoritmu, matrica Y koja se sastoji od m redova i n stupaca, primjerice spektara snimljenih variranjem nekog eksperimentalnog parametra, dekomponira se u tri matrice, U, S i V, prema izrazu (23), odnosno shemi prikazanoj na Slici 15.

$$Y = USV^t \tag{23}$$



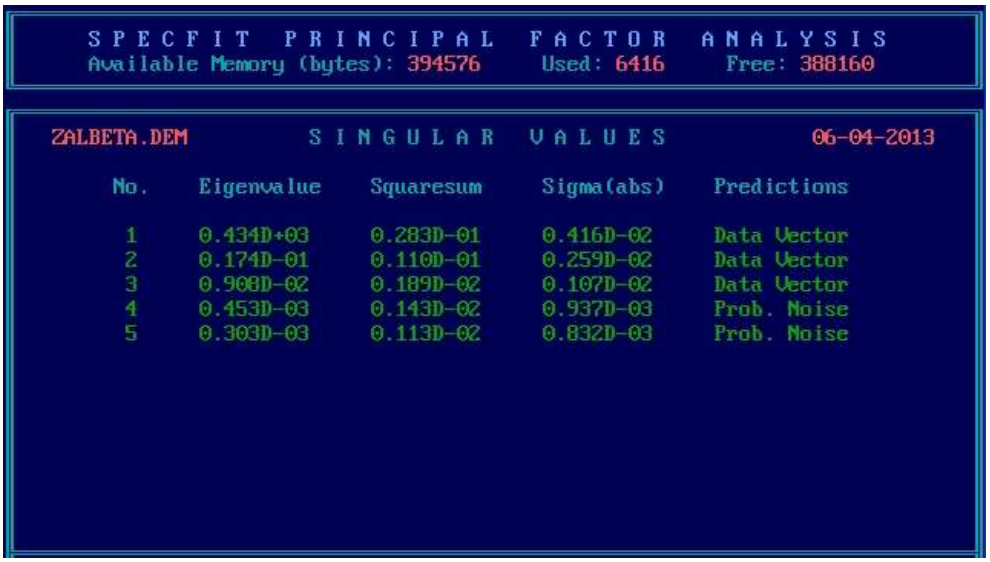
Slika 15. Grafički prikaz algoritma SVD: *m* i *n* označavaju broj redaka i stupaca u matricama.

Dijagonalna matrica S dobivena algoritmom sadrži vrijednosti koje se nazivaju singularnim vrijednostima ili eigenvrijednostima matrice Y, poredane prema veličini, odnosno količini informacija koje sadrže. Odabirom samo prvih nekoliko signifikantnih eigenvrijednosti, *ne*, dobivaju se nove matrice $\bar{U}$, $\bar{S}$i $\bar{V}$ pomoću kojih je moguće rekonstruirati matricu $\bar{Y}$ prema shemi (Slika 16), bez značajnog gubitka informacija u odnosu na početnu matricu Y, uz učinkovito uklanjanje šuma prisutnog u orignalnim podacima. Matrice $\bar{U}$ i $\bar{V}$ sadrže vrijednosti koje se nazivaju singularnim vektorima ili eigenvektorima matrice $\bar{Y}$.



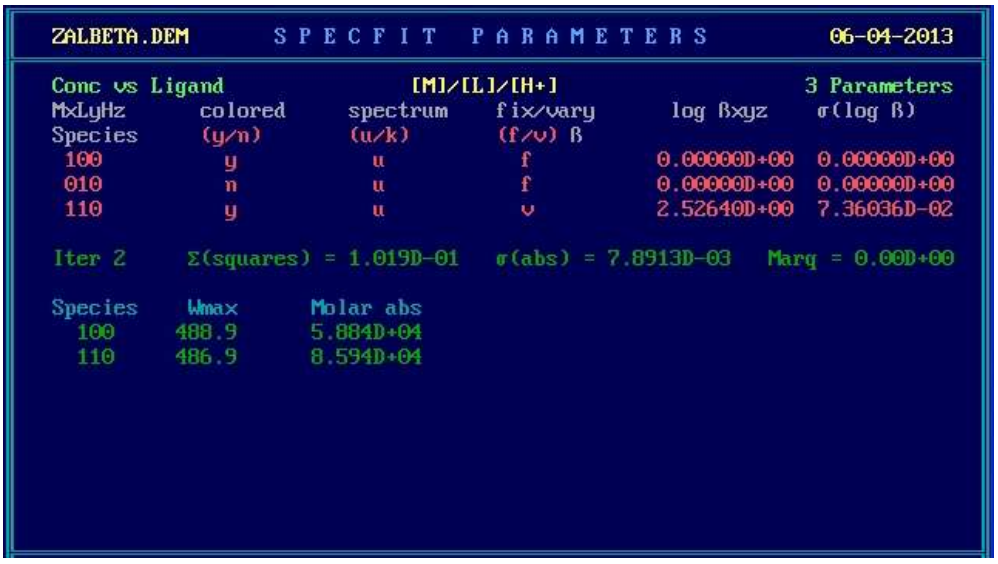
Slika 16. Grafički prikaz matrica dobivenih odabirom signifikantnih eigenvektora algoritmom SVD.

Faktorska analiza u programu SPECFIT predviđa najviše tri spektralno aktivne vrste koje sudjeluju u ravnoteži (*Data Vector*), i to su slobodan lijek (ZAL), lijek u kompleksu stehiometrijskog odnosa 1:1 (ZAL/CD) te lijek u kompleksu stehiometrijskog odnosa 1:2 CD/ZAL/CD). Treća spektralno aktivna vrsta nije izgledna zbog relativno velike vrijednosti 'Sigma (abs)' koja je mjerilo nepouzdanosti podataka. Za prvu i drugu spektralno aktivnu vrstu ona iznosi 14,7%, odnosno 23,6% vrijednosti reziduala faktorske analize ('Squaresum'), dok za treću speciju 'Sigma (abs)' iznosi čak 56,6% (Slika 17).

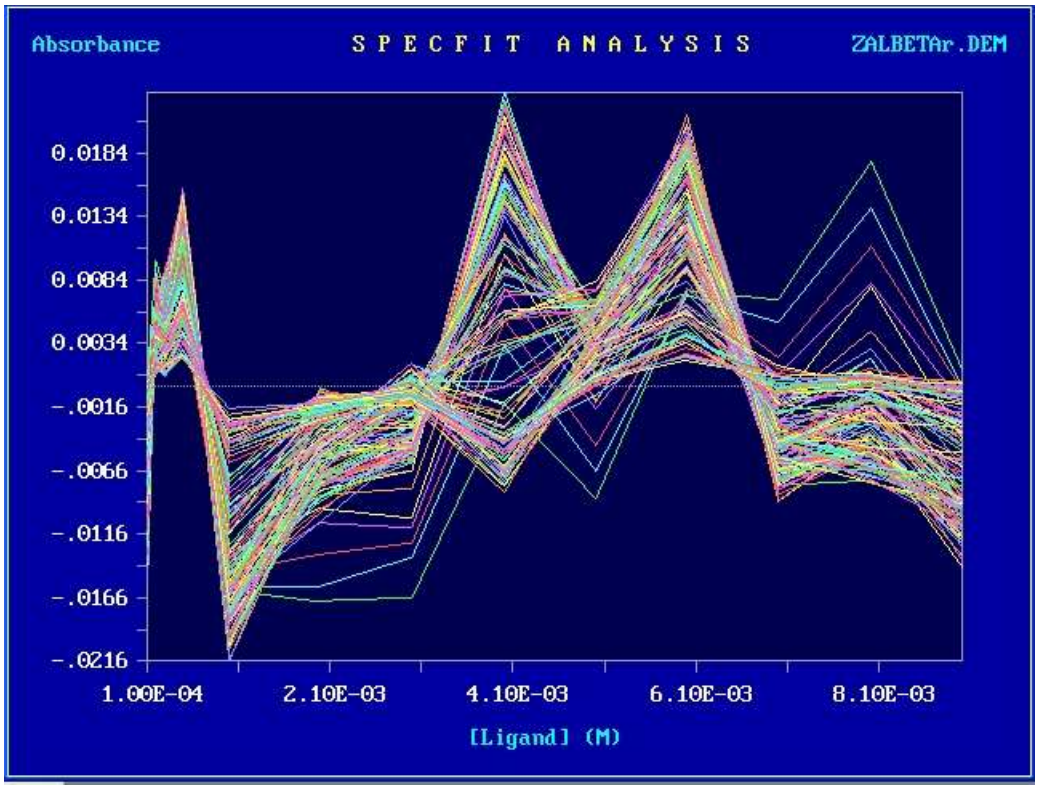


Slika 17. Faktorska analiza u programu SPECFIT.

Dobiveni podaci faktorske analize potvrđuju postojanje dvije relevantne spektralne specije, a to su ZAL (x) i ZAL/βCD kompleks (y). Obradom eksperimentalnih podataka prema takvom reakcijskom modelu (1:1), dobivena vrijednost konstante stabilnosti ZAL/ βCD = 331,13 ± 1,17 M^{-1} (Slika 18).

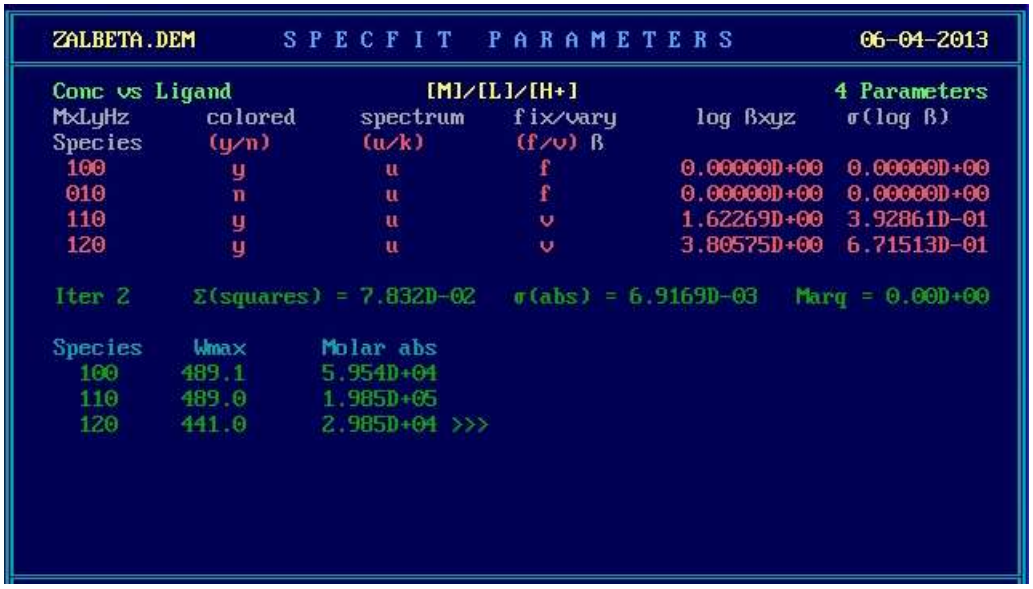


Slika 18. Model s 2 spektralno aktivne vrste – log β_{110} = 2,53 (0,07), σ(abs) = 0,008.

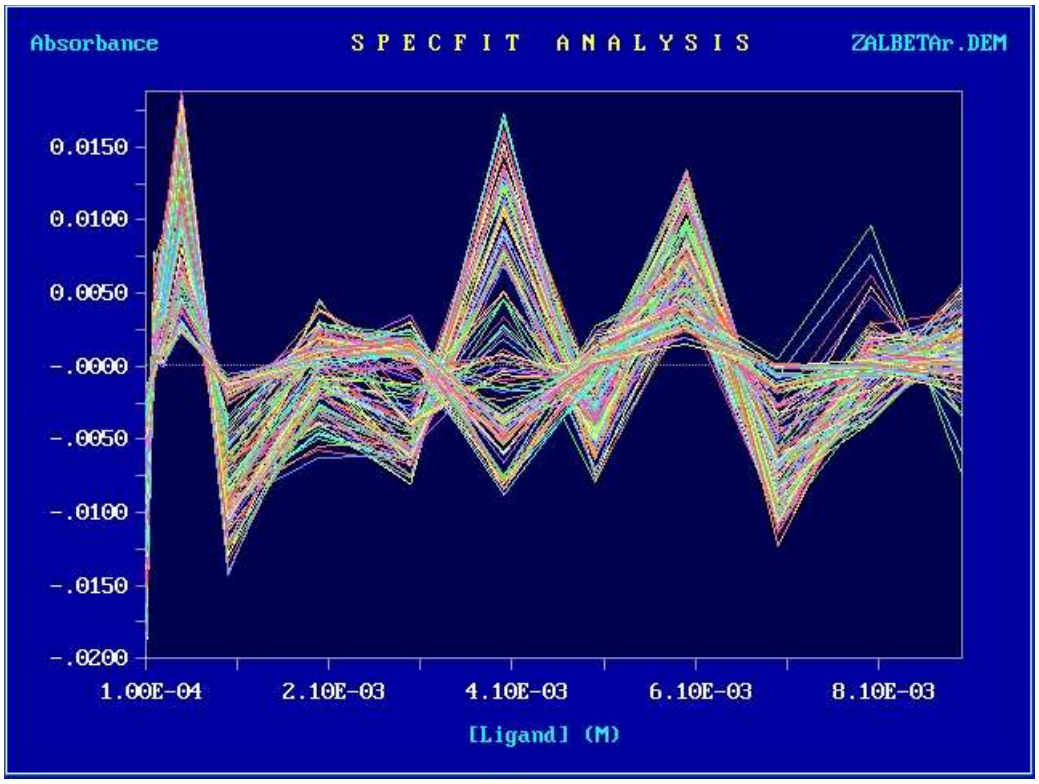


Slika 19. Reziduali fluorescencije nakon obrade podataka prema modelu 1:1.

Obradom eksperimentalnih podataka prema reakcijskom modelu (1:2, jedna molekula lijeka i dvije molekule ciklodekstrina) dobivene vrijednosti su log β_{110} = 1,6 (0,4), log β_{120} = 3,8 (0,7), σ(abs) = 0,007 (Slika 20).



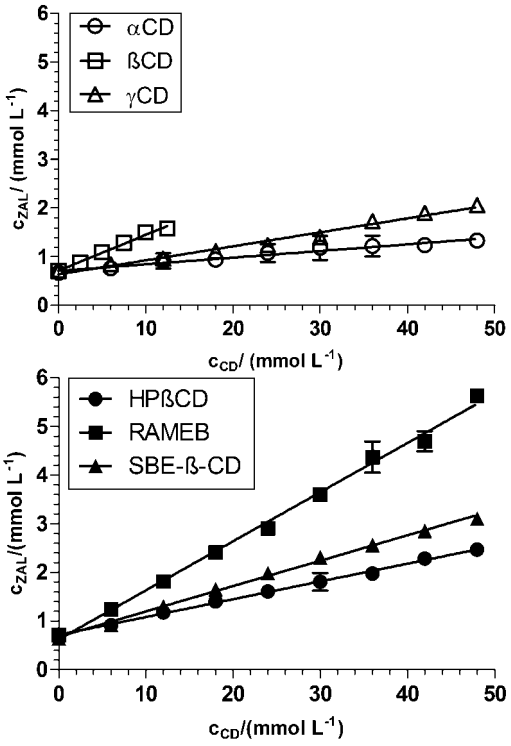
Slika 20. Model s 3 specije – log β_{110} = 1,6 (0,4), log β_{120} = 3,8 (0,7), σ(abs) = 0,007.



Slika 21. Reziduali fluorescencije nakon obrade podataka prema modelu 1:2.

Temeljem provedenih analiza može se zaključiti da model s tri spektralno aktivne vrste samo neznatno smanjuje ukupnu pogrešku u usporedbi s modelom s dvije vrste (σ(abs) = 0,007 vs. σ(abs) = 0,008), ali značajno povećava devijaciju dobivenih konstanti (0,4 i 0,7 vs. 0,07). Reziduali fluorescencije oba modela ne razlikuju se značajno. Iz navedenog je moguće zaključiti kako prikazano mjerenje daje prednost modelu s dvije spektralno aktivne vrste, tj. manje stupnjeva slobode u odnosu na model s tri vrste te je time potvrđeno nastajanje inkluzijskih kompleksa ZAL i ispitivanih derivata ciklodekstrina stehiometrijskog omjera 1:1.

Osim spektrofluorimetrijskim mjerenjima, nastajanje inkluzijskih kompleksa ZAL s ispitivanim derivatima ciklodekstrina praćeno je i solubilizacijskim ispitivanjima. Određene vrijednosti konstanti stabilnosti ovom metodom prikazane su u Tablici 8. Dobivene izoterme topljivosti ZAL u otopinama ispitivanih ciklodekstrina prikazane su na Slici 22. Ova metoda, osim mogućnosti određivanja konstante stabilnosti nastalih kompleksa, omogućuje i procjenu solubilizacijskog potencijala za svaki od ispitivanih ciklodekstrina. Solubilizacijski potencijal je određen kao omjer topljivosti ZAL u otopinama s najvećom ispitivanom količinom pojedinog ciklodekstrina i topljivosti lijeka u vodi te je prikazan u Tablici 8.



Slika 22. Izoterme topljivosti ZAL sa prirodnim ciklodekstrinima i derivatima β-CD u vodi pri 25°C (srednja vrijednost ± SD, *n*=5).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da topljivost ZAL raste linearno s porastom koncentracije ciklodekstrina ($r^2 > 0,98$), što se prema Higuchiju i Connorsu klasificira kao A_L tip izoterme topljivosti. Taj tip izotermi topljivosti upućuje na nastajanje inkluzijskih kompleksa topljivih u vodi. Linearna ovisnost topljivosti lijeka o koncentraciji ciklodekstrina i nagib pravca izotermi topljivosti ($tg\alpha < 1$) potvrđuju nastajanje kompleksa lijek–ciklodekstrin u ekvimolarnom odnosu neovisno o vrsti ispitivanog ciklodekstrina (Higuchi i Connors, 1965). Time su potvrđeni i rezultati dobiveni faktorskom analizom spektrofluorimetrijskih podataka. Konstante stabilnosti kompleksa ($K_{S\text{-}SOL}$) su određene iz grafičkog prikaza topljivosti ZAL, kao funkcije molarne koncentracije ispitivanih ciklodekstrina, prema jednadžbi (4), a prikazane su u Tablici 8.

Iz podataka dobivenih spektrofluorimetrijskim i solubilizacijskim ispitivanjima moguće je zaključiti o nastajanju inkluzijskih kompleksa u ispitivanim sustavima. Rezultati pokazuju da ZAL ima različit afinitet prema vezanju s ispitivanim ciklodekstrinima (Loftsson i sur., 2005). Određena razlika među vrijednostima konstanti stabilnosti dobivenih primijenjenim metodama može se pripisati metodološkim razlikama. Kod spektrofluorimetrijskih ispitivanja koncentracija lijeka je bila konstantna, dok se kod solubilizacijskih ispitivanja koncentracija lijeka mijenja zavisno o količini ciklodekstrina u uzorcima. Osim toga, u spektrofluorimetrijskim ispitivanjima u sustav je dodan metanol (0,1% *V/V*) potreban za osiguranje topljivosti lijeka, dok su solubilizacijska ispitivanja provedena u čistom vodenom mediju. Nadalje, konstanta stabilnosti određena temeljem rezultata solubilizacijskih ispitivanja ovisi o mnogim solubilizacijskim procesima koji su prisutni u sustavu lijek-ciklodekstrin. U takvom sustavu, osim nastajanja inkluzijskog kompleksa, na promjene topljivosti lijeka utječe i nastajanje neinkluzijskog kompleksa u kojem dolazi do interakcija molekule lijeka s hidroksilnim skupinama ciklodekstrina (Kurkov i Loftsson 2013; Loftsson i sur., 2005). Osim toga, ciklodekstrini i/ili nastali inkluzijski kompleksi mogu stvarati agregate ili strukture slične micelama, što dodatno može utjecati na topljivost lijeka u vodenim otopinama ispitivanih derivata ciklodekstrina. Sve to može pridonijeti različitim vrijednostima konstanti stabilnosti nastalih kompleksa koje su određene spektrofluorimetrijskim i solubilizacijskim metodama. S obzirom na složenost i osjetljivost postupka, može se zaključiti kako je spektrofluorimetrijska titracija u usporedbi sa solubilizacijskom metodom znatno jednostavnija i brža. No, iako sam postupak traje kraće, on ne omogućuje procjenu solubilizacijskog potencijala što je važan parametar za određivanje učinka ispitanih ciklodekstrina na topljivost ZAL u vodi. Solubilizacijska ispitivanja se

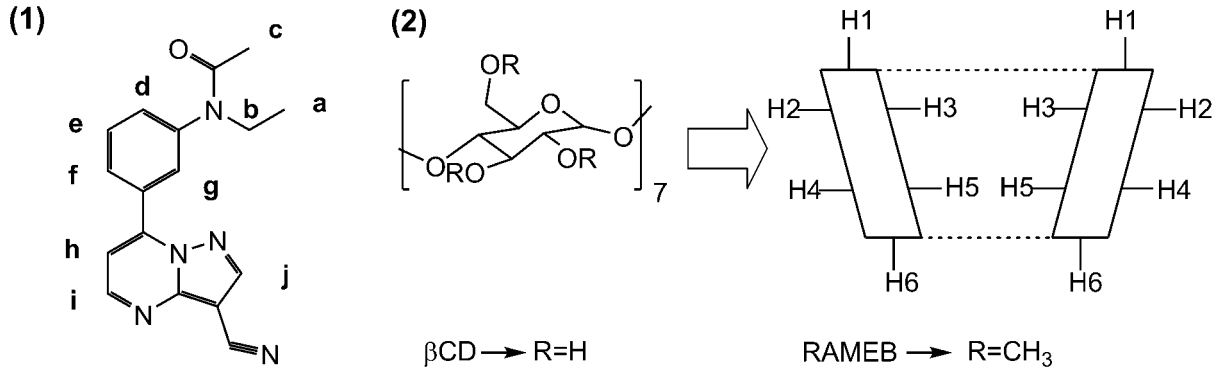
sastoje od puno više koraka u odnosu na spektrofluorimetrijska ispitivanja. Kod solubilizacijskog ispitivanja potrebno je razviti i validirati metodu, što značajno produljuje vrijeme trajanja postupka. Prednost spektrofluorimetrijske titracije u odnosu na solubilizacijska ispitivanja je i u ukupnoj količini upotrijebljenih tvari za ispitivanja. Kod te metode se koriste manje količine tvari jer se radi o vrlo osjetljivoj metodi. U usporedbi sa spektrofotometrom, osjetljivost spektrofluorimetra je 10 do 1000 puta veća. Jednostavna aparatura, kao i različiti mjerni parametri (fluorescencijsko iskorištenje, ekscitacijska i emisijska valna duljina), mogu se upotrijebiti za povećanje analitičke osjetljivosti kod različitih određivanja (Jiang i sur., 2002).

S obzirom na podatke koji su dobiveni spektrofluorimetrijskim i solubilizacijskim ispitivanjima interakcije ZAL s ciklodekstrinima u otopini, može se zaključiti da sposobnost molekule ciklodekstrina za stvaranje inkluzijskog kompleksa s lijekom ovisi na prvom mjestu o relativnom odnosu veličine centralne šupljine molekule ciklodekstrina i veličine molekule lijeka ili dijela lijeka koji se uklapa u centralnu šupljinu. Prirodni ciklodekstrini (αCD, βCD, γCD) se međusobno razlikuju promjerom i volumenom centralne šupljine, što je određeno brojem glukoznih jedinica u strukturi pojedinog derivata. Tako volumen za αCD iznosi 174 $Å^3$, za βCD 262 $Å^3$, a za γCD 427 $Å^3$. Različite vrijednosti veličina centralne šupljine kod prirodnih CD ukazuju na njihovu sposobnost uklapanja molekula lijeka različitih veličina. Molekula lijeka koja se uklapa u centralnu šupljinu orijentira se u molekuli ciklodekstrina tako da uspostavi maksimalan kontakt između hidrofobnih dijelova molekule lijeka i apolarne centralne šupljine. Hidrofilni dijelovi molekule lijeka ostaju što je više moguće na vanjskoj strani kompleksa. Takva orijentacija omogućava najveći kontakt i s otapalom, i s hidroksilnim skupinama ciklodekstrina (Frömming i Szejtli, 1994). Iz dobivenih vrijednosti konstanti stabilnosti vidljivo je da ZAL pokazuje najveći afinitet prema stvaranju inkluzijskog kompleksa s βCD, dok ostali prirodni derivati ne odgovaraju zbog neprikladnog volumena centralne šupljine. Centralna šupljina αCD je premala za inkluziju molekule lijeka, što rezultira relativno niskom vrijednošću konstante stabilnosti kompleksa. S druge strane, prevelika centralna šupljina γCD onemogućuje dovoljno jaku interakciju lijek-ciklodekstrin (Martin del Valle, 2004). Nadalje, solubilizacijski potencijal kod prirodnih ciklodekstrina pada u nizu γCD > βCD > αCD. Iako od prirodnih ciklodekstrina βCD stvara najstabilniji kompleks sa ZAL, njegov solubilizacijski potencijal je ograničen. To se tumači relativno niskom topljivošću βCD u vodi, uslijed čega i nastali kompleksi mogu biti ograničene topljivosti. U molekuli βCD dolazi do stvaranja prstena intramolekularnih vodikovih veza, što

sprječava hidrataciju βCD, povećava rigidnost molekule te značajno stabilizira kristalnu rešetku βCD (Szejtli, 2004). Sve to rezultira niskom topljivošću βCD u vodi (Kurkov i Loftsson, 2013). Solubilizacijski potencijal svih ispitanih kemijski modificiranih derivata βCD je značajno veći od onog prirodnih ciklodekstrina (Tablica 8). Kemijskom modifikacijom molekule βCD nastaje veliki broj izomera, čime se kristalinični βCD pretvara u amorfnu smjesu izomernih derivata, koji imaju znatno veću topljivost u vodi, a uslijed toga i značajno izraženiji solubilizacijski potencijal (Loftsson i sur., 2005). Prema dobivenim rezultatima, derivat s najizraženijim solubilizacijskim učinkom je RAMEB. On najlakše stupa u interakciju s lijekom u odnosu na sve ispitane ciklodekstrine, stvarajući komplekse najveće konstante stabilnosti (Tablica 8). Općenito govoreći, kod ispitivanih derivata βCD, stabilnost nastalih kompleksa je proporcionalna hidrofobnom karakteru supstituenata na molekuli ($K_{RAMEB} > K_{HP\beta CD} > K_{SBE\beta CD}$; Tablica 8). Supstitucijom hidroksilnih skupina s metilnim skupinama na jezgri βCD dolazi do značajnog povećanja topljivosti, čime se objašnjava veći solubilizacijski učinak RAMEB u odnosu na prirodni βCD. Prisutnost lipofilnijih supstituenata, kao što su metilne skupine, na jezgri βCD uzrokuje jaču interakciju s lipofilnom molekulom lijeka, što se vidi iz vrijednosti konstanti stabilnosti za RAMEB. Kod ostalih ciklodekstrina s hidroksipropilnim i sulfobutilnim skupinama na jezgri βCD, vrijednosti konstanti stabilnosti upućuju na slabiji afinitet tih derivata za interakciju s lijekom. Metilne skupine nisu velik supstituent te sterički ne zasjenjuju centralnu šupljinu ciklodekstrina i stoga ne ometaju inkluziju (Kang i sur., 2002). Nadalje, metilirani ciklodekstrini su površinski aktivne molekule, što bi dodatno moglo utjecati na topljivost zaleplona u takvom sustavu, a time i na vrijednost konstante stabilnosti. Niže vrijednosti konstanti stabilnosti za interakciju zaleplona s HPβCD i SBEβCD mogu se povezati s veličinom supstituenata na jezgri βCD. Velike hidroksipropilne i sulfobutilne skupine smanjuju afinitet ZAL za kompleksaciju tako što osiguravaju vodikove veze za molekule vode, što dovodi do smanjenja energetske razlike između molekula vode uključenih u centralnu šupljinu ciklodekstrina i onih iz otopine. Nadalje, prisutnost velikih, hidratiziranih ili nabijenih skupina u blizini centralne šupljine βCD zbog njihove rotacije dovodi do sterički otežane inkluzije molekule lijeka, stoga je afinitet tih derivata za interakciju s ZAL manji (Challa i sur., 2005).

4.2. ^{1}H-NMR spektroskopska ispitivanja

Povećanje topljivosti lijeka i promjene u njegovim fluorescencijskim spektrima u prisutnosti ciklodekstrina, koje su opažene u solubilizacijskim i spektrofluorimetrijskim ispitivanjima, ne mogu se uzeti kao neosporiv dokaz nastajanja inkluzijskih kompleksa. Korištene tehnike ne mogu ponuditi jasan odgovor o vrsti interakcija lijek/ciklodekstrin (inkluzija ili adsorpcija), niti nam mogu pružiti uvid u strukturu nastalog kompleksa (Veiga i sur., 2001). Zbog toga je interakcija između zaleplona i odabranih derivata ciklodekstrina dodatno ispitana primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije. Ispitivanje je obuhvaćalo uzorke s βCD i RAMEB, budući da su ta dva derivata u ranijim ispitivanjima pokazala najveći afinitet za kompleksiranje sa ZAL. ^{1}H-NMR spektroskopija daje točan odgovor o tipu nastalog kompleksa (inkuzijski ili adsorpcijski) te ukazuje na dio molekule lijeka koji je uključen u interakciju sa centralnom šupljinom ciklodekstrina (Jug i sur., 2010). Asignacija ^{1}H-NMR spektara ZAL, βCD i RAMEB je izvršena pomoću literaturnih podataka (Bharathi i sur., 2007; Hazekamp i Verpoorte 2006; Veiga i sur., 2001;) te potvrđena COSY spektroskopijom. Oznake protona u strukturi zaleplona i ispitivanih ciklodekstrina prikazane su na Slici 23.



Slika 23. Strukture i oznake protona ZAL (1) i ispitivanih ciklodekstrina (2).

U ^{1}H-NMR spektrima, kod svih ispitivanih binarnih sustava, signali lijeka su bili jasno odvojeni od signala ciklodekstrina, s iznimkom Hb signala zaleplona, koji se preklapao sa signalima ciklodekstrinskih protona. U ^{1}H-NMR spektru ZAL/CD uzoraka nisu uočeni novi pikovi, što ukazuje da je molekula lijeka, na NMR vremenskoj skali, u brzoj izmjeni između slobodnog i kompleksiranog oblika (Thi i sur., 2010). ^{1}H-NMR spektar βCD ima dobro razdvojene signale (Slika 24) čiji kemijski pomaci su prikazani u Tablici 9.

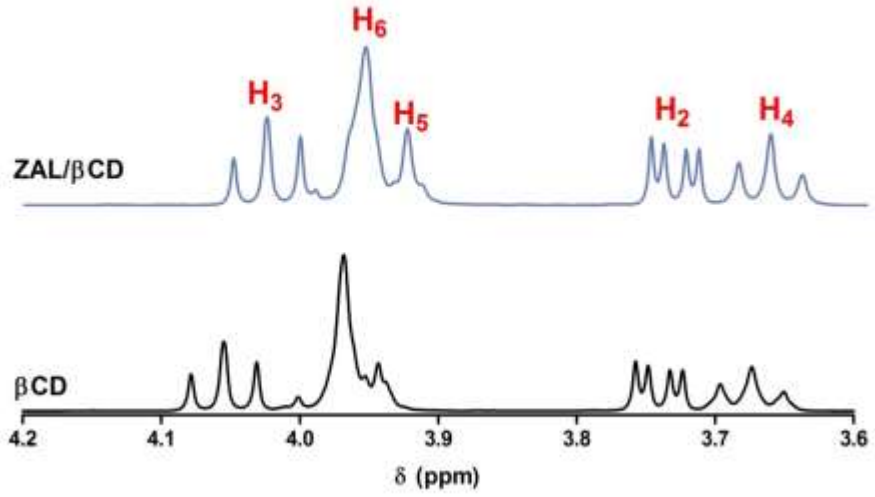
Tablica 9. Vrijednosti ^{1}H-NMR kemijskih pomaka protona βCD i RAMEB u slobodnom i kompleksiranom obliku, snimljeni u D_2O pri 300 K. Multiplicitet pikova naznačen je u zagradi (s-singlet, d-dublet, d.d.-dvostruki dublet i t-triplet).

oznake protona	βCD	βCD kompleks		RAMEB	RAMEB kompleks	
	δ(ppm)	δ(ppm)	Δδ*(ppm)	δ(ppm)	δ(ppm)	Δδ*(ppm)
H1	5,165 (d)	5,159 (d)	-0,006	5,366 (d)	5,360 (d)	-0,006
H2	3,757 (dd)	3,753 (dd)	-0,004	-	-	-
H3	4,055 (t)	4,027 (t)	-0,028	-	-	-
H4	3,674 (t)	3,668 (t)	-0,005	-	-	-
H5	3,943 (s)	3,927 (s)	-0,017	-	-	-
H6	3,968 (s)	3,956 (s)	-0,012	-	-	-
Me2'	-	-	-	3,662 (s)	3,662 (s)	0,000
Me6'	-	-	-	3,490 (s)	3,485 (s)	-0,005

*$\Delta\delta = \delta_{kompleksirani} - \delta_{slobodni}$

U prisutnosti ZAL, protoni H3 i H5 koji se nalaze unutar središnje šupljine ciklodekstrina te proton H6 koji je smješten s vanjske strane molekule ciklodekstrina i to na strani manjeg otvora su zasjenjeni, što je rezultiralo povećanim vrijednostima kemijskih pomaka signala tih protona u spektru (Δδ < 0). Drugi protoni βCD, tj. H1, H2 i H4, koji su smješteni s vanjske strane molekule, pokazuju samo manje promjene u rezonanciji (Tablica 9). Taj rezultat izravno upućuje na nastanak inkluzijskog kompleksa između ZAL i βCD. Opisani rezultat se može pripisati dijamagnetičkom anizotropnom efektu zbog inkluzije grupa bogatih π-elektronima u hidrofobnu centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina (Djedaine i sur., 1990). Nadalje, činjenica da je promjena vrijednosti kemijskog pomaka uočena samo za H3, H5 i H6 protone upućuje da je molekula zaleplona ušla duboko u centralnu šupljinu ciklodekstrina. Jači efekt zasjenjenja H3 u usporedbi s H5 i H6 (ΔδH3 > ΔδH5 > ΔδH6), pokazuje da se inkluzija ZAL u βCD vjerojatno dogodila s više pristupačnije, odnosno šire

strane otvora molekule ciklodekstrina (Jug i sur., 2010; Veiga i sur., 2001).



Slika 24. Usporedan prikaz dijela ^{1}H-NMR spektra βCD i ZAL/βCD kompleksa, snimljenih u D_2O pri 300 K.

Daljnja potvrda nastajanja inkluzijskog kompleksa ZAL/βCD dobivena je analizom vrijednosti kemijskih pomaka protona molekule lijeka u uzorcima sa i bez ciklodekstrina (Tablica 10). Većina protona lijeka u prisutnosti βCD pokazuje pomak prema nižim frekvencijama ($\Delta\delta > 0$), dok je samo Hh proton pomaknut prema višim frekvencijama. Pomak prema nižim frekvencijama može biti povezan s promjenama u lokalnoj polarnosti uslijed uklapanja lijeka u lipofilnu centralnu šupljinu ciklodekstrina (Djedaine i sur., 1990) ili uslijed efekta odsjenjenja, što je posljedica van der Waalsove interakcije između lijeka i lanaca ugljikohidrata (Liu i Guo, 2001). U prisutnosti ciklodekstrina, razlike u kemijskim pomacima Hd, He i Hf protona su najizraženije, što upućuje na zaključak da inkluzijski kompleks ZAL i βCD najvjerojatnije nastaje uklapanjem fenilne skupine lijeka u centralnu šupljinu βCD. Nadalje, Ha i Hc protoni su izloženi nešto jačem efektu zasjenjenja u usporedbi s Hi i Hj protonima, što pokazuje da su Ha i Hc protoni smješteni duboko u centralnoj šupljini βCD. Više frekvencije Hh protona ukazuju da je taj proton bliže atomu domaćina bogatih π-elektronima kao što su atomi kisika kod βCD (Ribeiro i sur., 2005).

Tablica 10. Vrijednosti ^{1}H-NMR kemijskog pomaka protona zaleplona u uzorcima sa i bez ciklodekstrina, izmjereni u D_2O pri 300 K. Multiplicitet pikova naznačen je u zagradama (s-singlet; d-dublet; t-triplet; q-kvartet).

oznake protona	ZAL	βCD kompleks		RAMEB kompleks	
	δ(ppm)	δ(ppm)	Δδ(ppm)	δ(ppm)	Δδ(ppm)
Ha	1,224 (t)	1,294 (t)	0,069	1,293 (t)	0,069
Hb	3,859 (q)	**	**	**	**
Hc	2,012 (s)	2,063 (s)	0,051	2,043 (s)	0,031
Hd	8,089 (d)	8,221 (d)	0,132	8,264 (d)	0,175
He	7,856 (t)	7,979 (t)	0,123	7,990 (t)	0,134
Hf	7,544 (d)	7,651 (d)	0,108	7,650 (d)	0,106
Hg	8,028 (s)	8,067 (s)	0,039	8,094 (s)	0,066
Hh	7,728 (d)	7,670 (d)	-0,058	7,716 (d)	-0,012
Hi	8,945 (d)	8,965 (d)	0,020	9,063 (d)	0,118
Hj	8,690 (s)	8,722 (s)	0,033	8,701 (s)	0,011

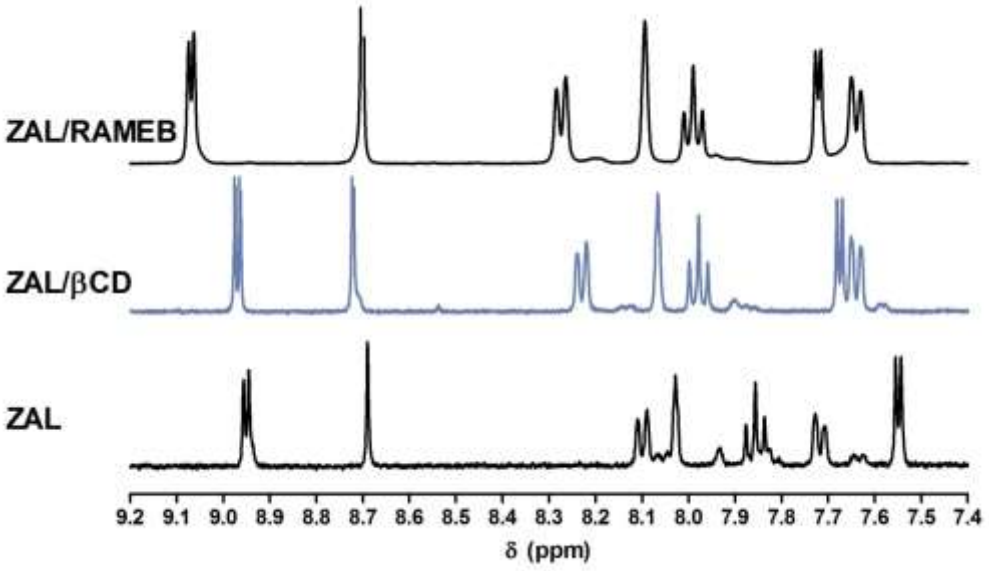
*Δδ = δkompleksirani – δslobodni

** preklapanje sa signalom ciklodekstrina

Budući da je RAMEB kompleksna smjesa različitih stereoizomera, svi signali protona ovog derivata se ne mogu jednoznačno označiti (Tablica 9), (Hazekamp i Verpoorte, 2006). Zbog toga su informacije o nastajanju inkluzijskog kompleksa zaleplona i RAMEB dobivene isključivo analizom vrijednosti kemijskih pomaka signala molekule lijeka (Slika 24 i Tablica 10). Slično kao i kod βCD, najveće promjene vrijednosti kemijskog pomaka su opažene za signale Hd, He i Hf protona, iz čega se može zaključiti o sličnoj geometriji inkluzijskog kompleksa zaleplona s oba ispitivana ciklodekstrina.

Može se uočiti je da je kemijski pomak tih protona kod RAMEB izraženiji od onog kod βCD (Tablica 10), što se može objasniti pretpostavkom da je veći dio molekule lijeka

ušao u centralnu šupljinu, tj. da taj derivat lakše stvara komplekse s lijekom u odnosu na βCD. Dobivene konstante stabilnosti solubilizacijskim ispitivanjima (Tablica 8) potvrđuju takav zaključak. Nadalje, izraženiji kemijski pomak Hi protona, i reducirani pomak Hf protona pokazuje da je došlo do promjene mikrookoline uslijed prisutnosti metilnih skupina na βCD jezgri.



Slika 25. Usporedni prikaz aromatskog dijela ^{1}H-NMR spektra ZAL, ZAL/βCD i ZAL/RAMEB kompleksa u D_2O pri 300 K.

Daljnja potvrda nastajanja inkluzijskog kompleksa između lijeka i odabranih ciklodekstrina dobivena je pomoću difuzijski uvjetovane ^{1}H-NMR spektroskopije (DOSY). DOSY spektroskopija je dvodimenzionalna NMR tehnika koja uspoređuje kemijske pomake sa izračunatim difuzijskim koeficijentom molekula. Metoda koja se temelji na difuziji u prednosti je prema drugim metodama zbog toga što je brza, jednostavna i selektivna, što omogućava istodobnu analizu više komponenata. Kod kompleksa stehiometrije 1:1 ova metoda koristi se za opisivanje sklonosti vezanja molekula različitih dimenzija uporabom impulsnih slijedova koji upotrebljavaju gradijente magnetskog polja ("*pulse-field gradients*") (Sughir i sur., 2010). Srednja vrijednost difuzijskog koeficijenta lijeka određena je analiziranjem DOSY signala Ha, Hc, Hf, Hd, Hi i Hj protona. Za βCD, srednja vrijednost difuzijskog koeficijenta određena je analiziranjem DOSY signala H1, H2, H3, H4 i H6 βCD,

dok su kod RAMEB-a analizirani H1, Me2 i Me6 signali. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Srednja vrijednost difuzijskih koeficijenata lijeka i oba ciklodekstrina u slobodnom i kompleksnom obliku. Vrijednosti u zagradama predstavljaju standardnu devijaciju.

	D x 10^{10}/(m^2s^{-1})	
	$ZAL_{srednje}$	**$CD_{srednje}$**
ZAL	5,196 (0,013)	-
βCD	-	3,103 (0,014)
ZAL/βCD	3,526 (0,041)	3,107 (0,014)
RAMEB	-	2,428 (0,080)
ZAL/RAMEB	2,460 (0,008)	2,380 (0,001)

U prisutnosti oba ciklodekstrina, lijek pokazuje značajno smanjenje difuzijskog koeficijenta u usporedbi s čistim ZAL. Stupanj smanjenja difuzijskog koeficijenta je u izravnoj korelaciji s molekulskom masom samog ciklodekstrina. U slučaju βCD (M = 1135 $gmol^{-1}$) difuzijski koeficijent lijeka smanjen je oko 32% u odnosu na vrijednosti izmjerene za čisti lijek, dok u slučaju RAMEB (M = 1303 $gmol^{-1}$) ta vrijednost iznosi oko 50%. Za oba nastala kompleksa, difuzijski koeficijenti izračunati temeljem DOSY signala zaleplona i ciklodekstrina su neznatno različiti. U prisutnosti oba ciklodekstrina, difuzija lijeka značajno je smanjena u odnosu na slobodni lijek i pokazuje male razlike u usporedbi s rezultatima izračunatim prema vrijednostima DOSY signala ciklodekstrina (Tablica 11). Uzrok tome može biti brza izmjena vezanog i slobodnog oblika lijeka (Pescitelli i sur., 2010). Uz pretpostavku da vezani i slobodni lijek prolazi brzu izmjenu na difuzijskoj vremenskoj skali, uočeni difuzijski koeficijent ZAL (D_{obs}) može se izraziti sljedećim izrazom:

$$D_{obs} = f_{slobodni} \, x \, D_{slobodni} + f_{kompleks} \, x \, D_{kompleks} \qquad (24)$$

gdje su $f_{slobodni}$ i $f_{kompleks}$ frakcije slobodnog zaleplona i vezanog u kompleks sa ciklodekstrinom. Frakcija lijeka u kompleksu se izražava kao:

$$f_{kompleks} = 1 - f_{slobodni} \qquad (25)$$

Povezivanjem ove dvije jednadžbe slijedi :

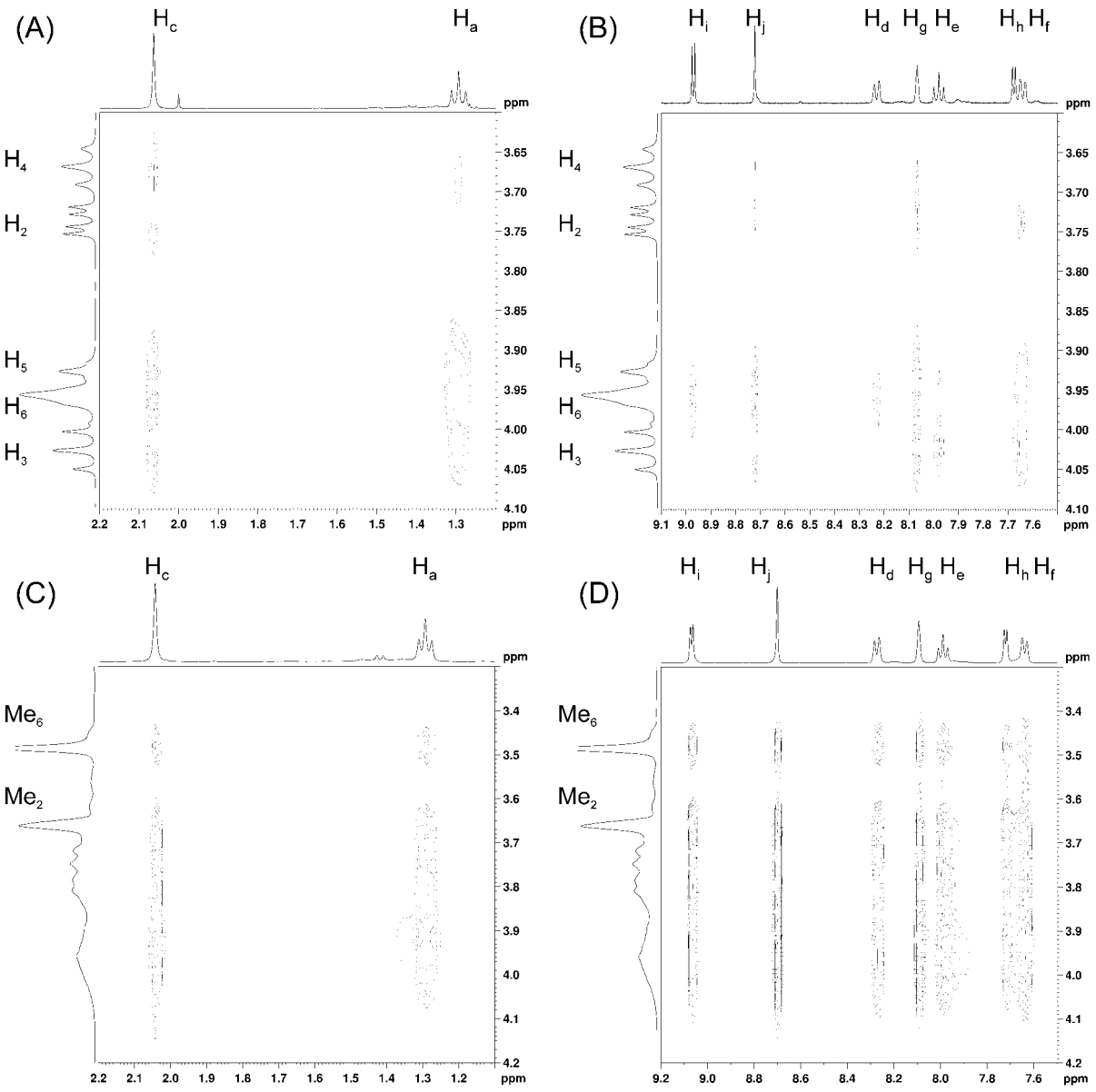
$$f_{kompleksirani} = \frac{(Dslobodni - Dobs)}{(Dslobodni - Dkompleksirani)} \quad (26)$$

Uslijed puno manje molekulske mase lijeka (M=305,34 $gmol^{-1}$) prema onoj ciklodekstrina, može se pretpostaviti da ne dolazi do velike promjene u difuzijskom koeficijentu domaćina prilikom vezanja tako male molekule. Nadalje, difuzijski koeficijent nastalog kompleksa mogao bi biti isti kao i kod nevezane molekule domaćina (Calderini i Pessine, 2008; Jullian i sur., 2007; Grillo i sur., 2007). Posljedično, jednadžba (26) može se preoblikovati u sljedeći izraz:

$$f_{kompleksirani} = \frac{(Dslobodni - Dobs)}{(Dslobodni - DCD)} \quad (27)$$

Korištenjem ovog izraza, moguće je izračunati udio ZAL u kompleksu. Za βCD ta vrijednost iznosi 88,87%, dok je za RAMEB izračunata vrijednost od 99,79%. Taj rezultat dodatno je potvrdio zaključke donesene temeljem solubilizacijskih istraživanja, potvrđujući superiorni kompleksacijski i solubilizacijski potencijal metiliranog derivata u odnosu na prirodni βCD.

Sljedeća faza ^{1}H-NMR spektroskopskih ispitivanja bila je usmjerena na određivanje strukture nastalih kompleksa ZAL s βCD i RAMEB. U tu svrhu koristila se dvodimenzionalna ^{1}H-NMR spektroskopija rotirajućeg Overhauserovog efekta (ROESY) koja omogućava identifikaciju strukture nastalog kompleksa proučavanjem međumolekulskih interakcija. Uslijed korelacije između individualnih signala NMR-a i specifičnog položaja atoma u strukturi molekule pomoću signala nuklearnog Overhauser efekta (NOE), može se odrediti prostorna struktura nastalog kompleksa (Yang i sur, 2011). Signali NOE potječu od međumolekulskih interakcija protona iz dvije različite molekule čija je prostorna udaljenost unutar 3-5 Å. Prisustvo tih signala predstavlja dodatnu potvrdu nastajanja inkluzijskog kompleksa (Jug i sur., 2010). Snimljeni ROESY spektri prikazani su na Slici 19. Kod dvodimenzionalnog ROESY spektra kompleksa zaleplona i βCD uočene su dvije skupine NOE signala. Prva grupa pripada interakciji Ha i Hc protona lijeka s internim (H3 i H5) protonima βCD, (Slika 26A), a druga skupina NOE signala pripada interakciji aromatskih protona lijeka (Hd – Hj) i internih protona βCD (Slika 26B).

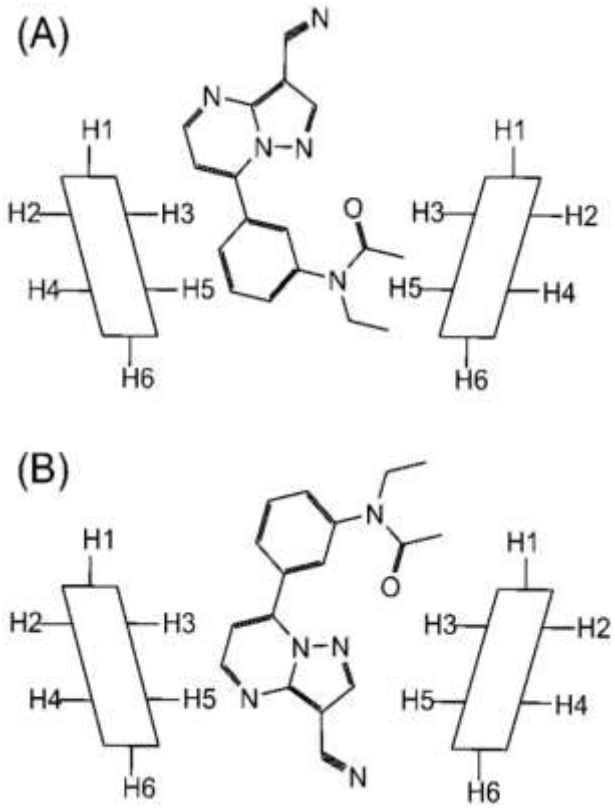


Slika 26. Dijelovi 2D ROESY spektara ZAL u prisutnosti ekvimolarne količine βCD (A, B) ili RAMEB (C, D) u D_2O pri 300 K. Za oznake protona vidjeti Sliku 16.

Oba metilna protona (Ha i Hc) s N-etilacetamidne skupine zaleplona pokazuju snažne signale NOE s H3, H6 i H5 protonima βCD potvrđujući duboku penetraciju te skupine lijeka u šupljinu ciklodekstrina. Nadalje, slobodna rotacija N-etilacetamidne skupine omogućava istovremenu interakciju s oba unutarnja protona ciklodekstrina. U isto vrijeme, opaženi su i signali NOE za Ha i Hc protone s protonima ciklodekstrina smještenih s vanjske strane. Opaženi signali su znatno slabiji u usporedbi sa signalima unutarnjih protona (Slika 26) iz čega proizlazi da je inkluzija N-etilacetamidne skupine u centralnu šupljinu βCD dominantan

način interakcije. Također, uočeno je da svi aromatski protoni ZAL, osim Hi i Hd pokazuju signale NOE s H3 i H5 protonima kao i s H6 protonima βCD. Za Hi i Hd protone ZAL nisu zabilježeni signali NOE s H3 protonima βCD (Slika 26B). Taj rezultat dovodi do zaključka da u slučaju kompleksa ZAL s βCD u otopini istovremeno postoje dva različita načina vezanja, tj. kompleksi s dvije različite strukture. Kod prvog slučaja dolazi do inkluzije fenilnog prstena molekule lijeka u šupljinu ciklodekstrina i to sa šire strane βCD (Slika 27A), dok u drugom slučaju dolazi do inkluzije pirazolol[1,5-a]pirimidinskog prstena, kao što je prikazano na Slici 27B. Ovakva struktura bi objasnila interakciju metilnih protona s N-etilacetamidne skupine lijeka s vanjskim protonima ciklodekstrina, koja je rezultirala slabim NOE signalom (Slika 26). Uzimajući u obzir jak efekt zasjenjenja za Hd i Hf protone što se vidi iz rezultata dobivenih ^{1}H-NMR spektroskopijom (Tablica 10), može se zaključiti da je tip A inkluzije, prikazan na Slici 26A, dominantan. S druge strane, inkluzija jedne molekule ZAL u dvije molekule ciklodekstrina može se isključiti jer niti solubilizacijska ispitivanja, niti spektrofluorimetrijska ispitivanja nisu potvrdila nastajanje kompleksa višeg reda. Osim toga, takav tip kompleksa nije izgledan za lijekove čija je struktura i geometrija slična ZAL (Messner i sur., 2010).

ROESY spektri kompleksa ZAL/RAMEB, također pokazuju dvije skupine signala NOE. Jedna skupina signala pripada interakciji Ha i Hc protona zaleplona s RAMEB-om, a druga interakciji protona aromatskog prstena (Hd-Hj) lijeka s ciklodekstrinom (Slika 27D). Svi dobiveni signali su jako izraženi i međusobno se preklapaju. Iako dobiveni rezultati nedvojbeno potvrđuju nastajanje inkluzijskog kompleksa ZAL s RAMEB, određivanje točne strukture temeljem takvih podataka može biti dvojbeno, naročito zbog činjenice da je RAMEB kompleksna smjesa različitih stereoizomera za koju je nemoguće precizno označiti signale pojedinih derivata. No, bez obzira na to, pretpostavlja se da je struktura kompleksa ZAL i RAMEB vrlo vjerojatno slična onoj određenoj za prirodni βCD. Osim toga, izraženi signali NOE između protona ZAL te Me2 i Me6 protona RAMEB-a potvrđuju njihovu jaku interakciju do koje dolazi uslijed nastajanja inkluzijskog kompleksa.

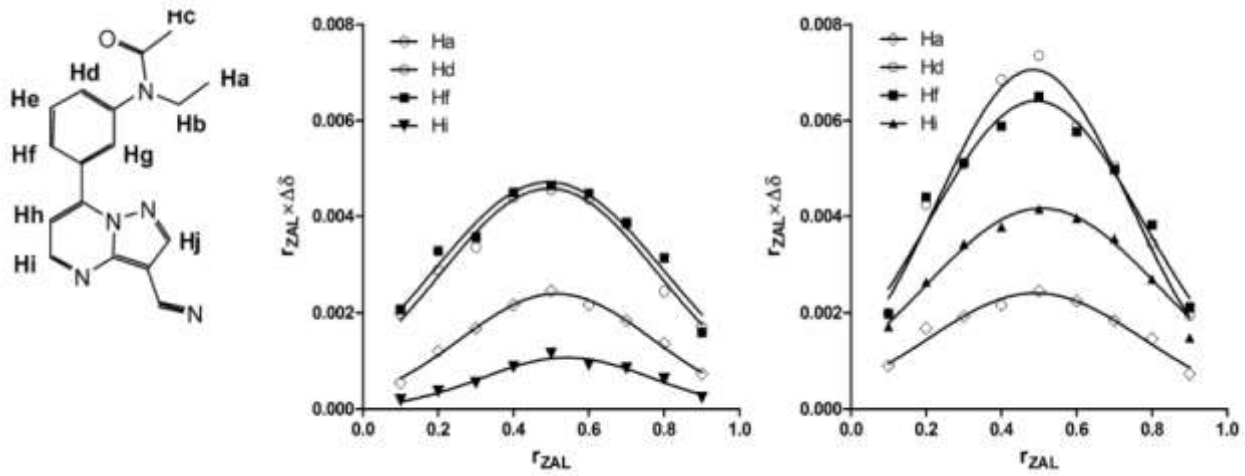


Slika 27. Predložene strukture nastalih inkluzijskih kompleksa ZAL/βCD određena temeljem rezultata ^{1}H-NMR spektroskopije.

4.3. Stehiometrija inkluzijskih kompleksa zaleplona s ciklodekstrinima

Ranija NMR istraživanja pokazala su da se inkluzija ZAL u centralne šupljine βCD i RAMEB odvija na dva različita načina (Slika 27). Prvi, i vjerojatno dominantni način uključuje inkluziju fenilnog prstena molekule lijeka kroz pristupačniji, širi otvor molekule ciklodekstrina, dok drugi način vezanja uključuje inkluziju pirazolo[1,5]pirimidinskog prstena. Da bi se potvrdilo istovremeno nastajanje inkluzijskih kompleksa dviju različitih struktura te da bi se isključila mogućnost nastajanja inkluzijskih kompleksa višeg reda, pristupilo se određivanju stehiometrije nastalih kompleksa. U tu svrhu korištena je metoda kontinuirane promjene (Jobova metoda), izvedena temeljem NMR spektralnih podataka, kao i statistička analiza spektara dobivenih spektrofluorimetrijskim titracijama. Na Slici 28. prikazan je dijagram kontinuirane promjene za odabrane protone ZAL čiji su kemijski pomaci najizraženiji te karakteristični za svaku od opisanih struktura. Kemijski pomaci Ha, Hd i Hf

protona odabrani su kao karakteristični za prvi način inkluzije, dok je kemijski pomak Hj protona karakterističan za drugi način inkluzije (Slika 27).



Slika 28. Dijagram kontinuirane promjene za odabrane protone zaleplona u inkluzijskom kompleksu s βCD (lijevo) i s RAMEB (desno) s oznakama protona na strukturi lijeka.

U svim slučajevima, dobivene krivulje su simetričnog oblika te pokazuju maksimum pri r = 0,5, što potvrđuje da svaki od opisanih kompleksa nastaje u stehiometrijskom odnosu lijek:ciklodekstrin, 1:1. Ti rezultati su u skladu s rezultatima spektrofluorimetrijske titracije i solubilizacijskih ispitivanja, koji također upućuju na nastajanje inkluzijskih kompleksa u stehiometrijskom omjeru 1:1 za sve ispitivane ciklodekstrine. Osim toga, statistička analiza podataka dobivenih spektrofluorimetrijskom titracijom je pokazala da drugi modeli vezanja ciklodekstrina i lijeka, npr. stehiometrijski odnos 1:2 ili 2:1, nisu doveli do konvergencije zadanih statističkih parametara, dodatno potvrđujući zaključke donesene temeljem rezultata dobivenih metodom kontinuirane promjene.

4.4. Termodinamika nastajanja inkluzijskih kompleksa zaleplona s prirodnim i modificiranim ciklodekstrinima

U literaturi su dostupni opsežni podaci o termodinamici nastajanja inkluzijskih kompleksa cijelog niza različitih molekula s ciklodekstrinima, no uglavnom je riječ o tvarima

koje nemaju farmaceutski značajnu primjenu, te uključuju podatke za pentan i njegove derivate, heksanol, cikloheksanol, butadienol, adamantan, benzojevu kiselinu, aspartam te žučne kiseline (Holm i sur., 2011; Kimura i sur., 2011; Waters i sur., 2010). Samo vrlo mali broj istraživanja obuhvaća određivanje termodinamike nastajanja inkluzijskih kompleksa lijekova, bez obzira na izražen značaj tih podataka za razvoj oblika, procjenu stabilnosti lijeka u takvom sustavu te predviđanje brzine oslobađanja lijeka *in vivo*. Zbog toga je istraživanje u okviru ovoga rada usmjereno prema određivanju termodinamičkih parametara nastajanja inkluzijskih kompleksa ZAL s odabranim derivatima ciklodekstrina. Ti podaci omogućit će određivanje kritičnih parametara koji utječu na afinitet lijeka za nastajanje inkluzijskih kompleksa te pomoći u razumijevanju pokretačkih sila koje upravljaju samim procesom nastajanja inkluzijskog kompleksa. Osim toga, ti podaci su ključni u razvoju postupka za pripremu kompleksa u čvrstom stanju, kao što su to u svojim istraživanjima pokazali Passos i sur. (2013), a mogli bi dovesti i do razvoja novih derivata ciklodekstrina koji imaju izraženiji afinitet za interakciju s određenim skupinama lijekova u odnosu na one trenutno dostupne.

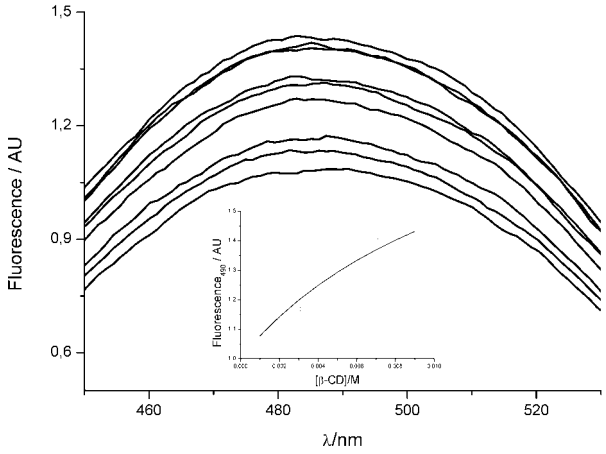
Određivanje termodinamičkih parametara kompleksiranja zaleplona s odabranim derivatima ciklodekstrina provedeno je primjenom spektrofluorimetrije i NMR spektroskopije. Iako su neki autori za izračun termodinamičkih parametara kompleksiranja koristili podatke dobivene solubilizacijskim ispitivanjima (Chen i sur., 2013; Ghuzlaan i sur., 2009; Omari i sur., 2007), taj pristup ima nekoliko ograničenja. Porast topljivosti lijeka utjecajem ciklodekstrina često je rezultat složenih interakcija, koje osim nastajanja inkluzijskih kompleksa uključuju i nastajanje agregata lijeka i ciklodekstrina ili micelama sličnih tvorevina. Stoga konstanta stabilnosti dobivena analizom dijagrama topljivosti često uključuje više različitih procesa koji simultano koegzistiraju u neidealnom sustavu vodene otopine ciklodekstrina (Messner i sur., 2011; Loftsson i sur., 2005). Nasuprot tome, spektroskopske metode, kao što su UV/VIS spektroskopija, cirkularni dikroizam, spektrofluorimetrija i NMR spektroskopija omogućuju precizno i točno određivanje termodinamičkih parametara nastajanja inkluzijskih kompleksa jer su spektralne promjene, kao što su promjena intenziteta fluorescencije, kemijski pomak i sl., usko specifične upravo za nastajanje inkluzijskih kompleksa (Yujuana i sur., 2009). Zbog toga se u ovom istraživanju za određivanja termodinamičkih parametara nastajanja inkluzijskih kompleksa zaleplona i ciklodekstrina koristila spektrofluorimetrijska i NMR titracija pri različitim temperaturama.

4.4.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje termodinamičkih parametara kompleksacije

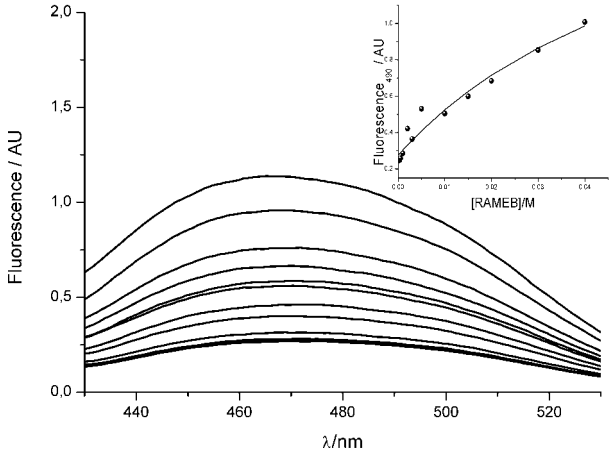
U svrhu određivanja termodinamičkih parametara reakcije nastajanja inkluzijskih kompleksa u otopini najprije je korištena metoda spektrofluorimetrijske titracije gdje je nakon miješanja reaktanata u različitim omjerima sniman fluorescencijski spektar. Titracijom ZAL s otopinama ciklodekstrina dolazi do porasta fluorescencije u svim pokusima i pri svim temperaturama (Slike 29-32). Ovakvo opažanje objašnjava se promjenom polariteta u okolini fluorofora nakon inkluzije lijeka u šupljinu ciklodekstrina. Mikrookolina s nižim polaritetom (unutarnja šupljina ciklodekstrina), kao i povećanje rigidnosti lijeka nakon ulaska u unutrašnju šupljinu ciklodekstrina (ZAL je zarobljen u šupljini ciklodekstrina), dovodi do povećanja kvantnog iskorištenja fluorescencije, a kao posljedica se javlja povećanje fluorescencije (Sivasankar i sur., 2012).

Usporedi li se promjena intenziteta fluorescencije kod ciklodekstrina različite veličine može se zaključiti o karakteristikama kompleksacije. Npr., iz manje šupljine βCD (oko 40% manja u usporedbi s veličinom šupljine γCD) istisne se veći broj molekula vode nego iz šupljine γCD, a kao posljedica se javlja povećanje fluorescencije, što se objašnjava jačom hidrofobnom interakcijom i čvršćom vezom ZAL u kompleksu. Povećanje intenziteta fluorescencije je barem 20% veće u kompleksu s βCD u usporedbi s γCD, dok je za više od 100% veće u usporedbi s HPβCD i SBEβCD. U provedenim pokusima nije pokazan značajan utjecaj temperature na intenzitet fluorescencije.

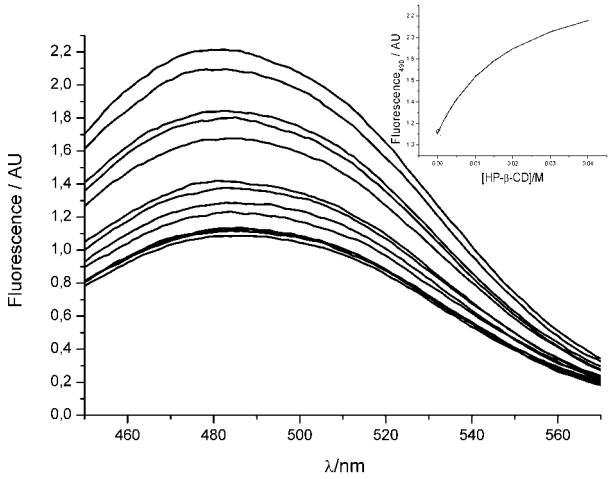
U svim izvedenim pokusima, model ZAL i ciklodekstrina stehiometrijskog odnosa 1:1 dao je najbolje rezultate za zadane vrijednosti. Izračunate konstante ravnoteže odnose se na taj model. Promjena konstante ravnoteže s temperaturom mjerena je za sve promatrane komplekse, dok su termodinamički parametri za reakciju kompleksacije izračunati prema van't Hoffovoj jednadžbi (Slika 33, Tablica 12).



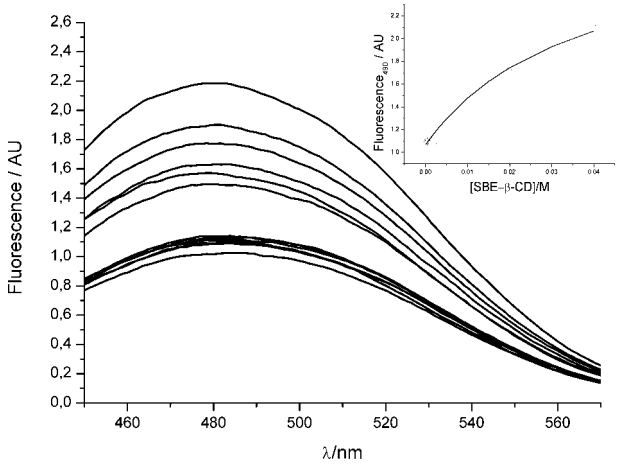
Slika 29. Spektrofluorimetrijska titracija 0,1 mM otopine ZAL s otopinom βCD pri 30 °C. Koncentracija βCD u uzorcima bila je u rasponu od 0,1 do 9 mM. Umetak: ovisnost intenziteta fluorescencije pri 490 nm o koncentraciji ciklodekstrina u uzorku.



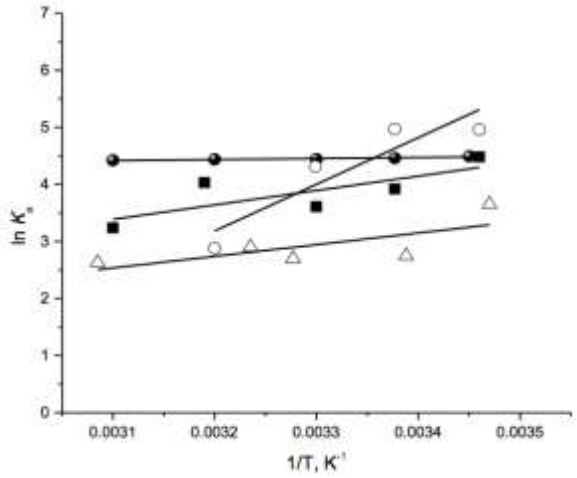
Slika 30. Spektrofluorimetrijska titracija 0,1 mM otopine ZAL s otopinom RAMEB pri 22 °C. Koncentracija βCD u uzorcima bila je u rasponu od 0,1 do 40 mM. Umetak: ovisnost intenziteta fluorescencije pri 490 nm o koncentraciji ciklodekstrina u uzorku.



Slika 31. Spektrofluorimetrijska titracija 0,1 mM otopine ZAL s otopinom HPβCD pri 30 °C. Koncentracija βCD u uzorcima bila je u rasponu od 0,1 do 40 mM. Umetak: ovisnost intenziteta fluorescencije pri 490 nm o koncentraciji ciklodekstrina u uzorku.



Slika 32. Spektrofluorimetrijska titracija 0,1 mM otopine ZAL s otopinom SBEβCD pri 30 °C. Koncentracija βCD u uzorcima bila je u rasponu od 0,1 do 40 mM. Umetak: ovisnost intenziteta fluorescencije pri 490 nm o koncentraciji ciklodekstrina u uzorku.



Slika 33. Van't Hoffovi pravci za inkluzijske komplekse ZAL i CD dobiveni fluorescencijskim mjerenjima. Legenda: RAMEB, Δ; HPβCD, □; SBEβCD ●; βCD, ○.

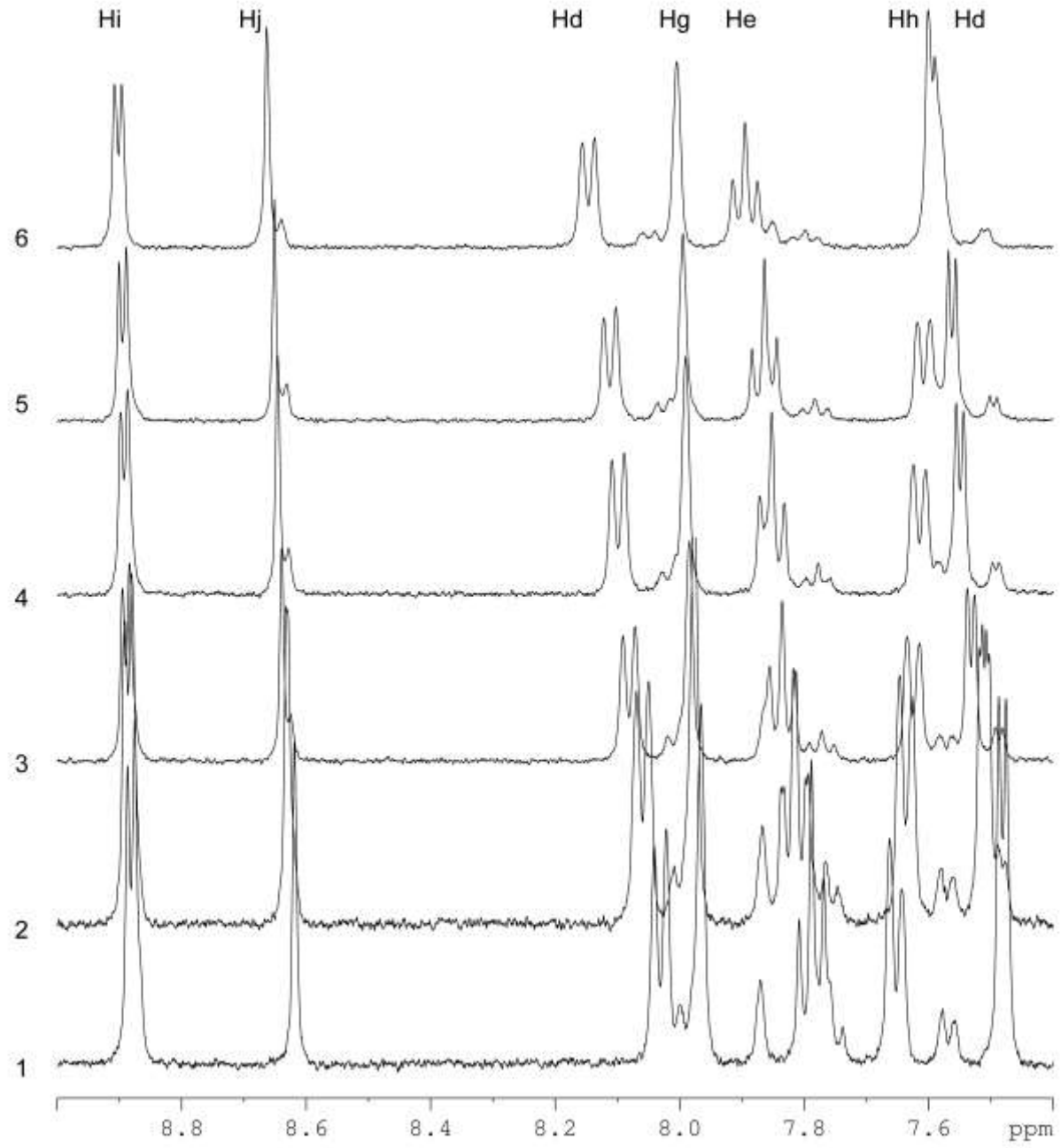
Tablica 12. Termodinamički parametri izračunati iz van't Hoffovih grafova za komplekse ZAL s prirodnim i modificiranim ciklodekstrinima.

	ΔG^{θ} (kJ/mol)		ΔH^{θ} (kJ/mol)		ΔS^{θ} (J/molK)	
	Fluorescencija	NMR	Fluorescencija	NMR	Fluorescencija	NMR
βCD	-11(3)*	-13(2)	-68(19)	-35(6)	-190(50)	-73(23)
RAMEB	-8 (2)	-13(2)	-17(8)	-21(5)	-32(24)	-26(15)
HPβCD	-10 (2)		-21(9)		-37(26)	
SBEβCD	-11(1)	-12(1)	-1,5(3)	-7(5)	-32(1)	-17(25)

*Brojevi u zagradama su standardna devijacija zadnje jedinice

4.4.2. Određivanje termodinamičkih parametara kompleksacije primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije

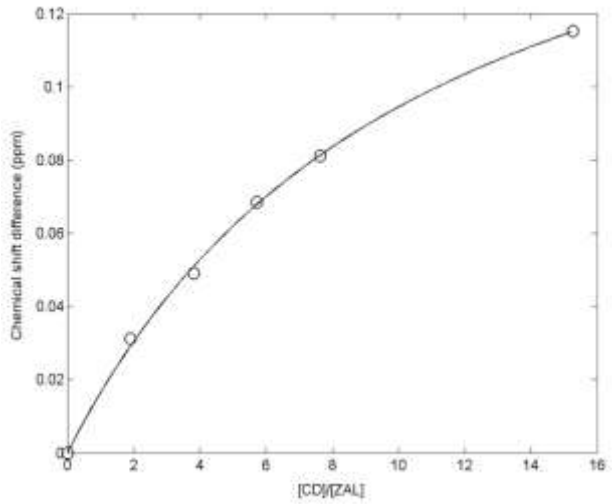
Osim određivanja strukture nastalih kompleksa (Ribeiro i sur., 2005), primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije mogu se odrediti i konstante stabilnosti nastalih kompleksa (K_s), koja je u rasponu vrijednosti od 10 do 10^6 M^{-1} (Nowakowski i Ejchart, 2013; Fielding, 2000). Istovremena analiza podataka nekoliko protona omogućuje točnije određivanje konstante stabilnosti. Vrijednosti konstanti stabilnosti određene primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije pri različitim temperaturama koriste se u određivanju termodinamičkih parametara kompleksacije ZAL s odabranim derivatima ciklodekstrina. U literaturi se prilikom određivanja konstante stabilnosti kompleksa primjenom ^{1}H-NMR titracije najčešće prate signali unutarnjih protona molekule ciklodekstrina (H3 i H5), no kod kemijski modificiranih derivata ciklodekstrina često nije moguće razlučiti te signale, kao što je ranije objašnjeno (Fielding, 2000). Zbog toga se metoda modificirala te su vrijednosti konstante stabilnosti određene analizom ^{1}H NMR kemijskih pomaka odabranih protona molekule lijeka (Sohajda i sur., 2009; Beni i sur., 2007). Kao i u slučaju analize dijagrama kontinuirane promjene, odabrani su signali koji su pokazali najznačajniji pomak i koji su bili karakteristični za oba načina inkluzije.



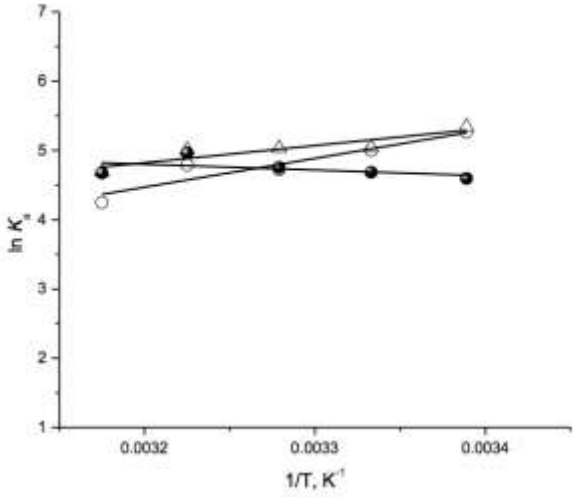
Slika 34. Utjecaj koncentracije βCD na kemijski pomak aromatskih protona zaleplona u ^{1}H NMR spektrima pri 295 K. **1.** 0 mM βCD; **2.** 1,25 mM βCD; **3.** 2,50 mM βCD; **4.** 3,75 mM βCD; **5.** 5,00 mM βCD; **6.** 10,00 mM βCD. Oznake protona molekule lijeka dostupne su na Slici 28.

Kemijski pomak aromatskih protona ZAL mijenja se ovisno o koncentraciji ciklodekstrina te temperaturi pri kojoj je provedeno mjerenje (Slika 34). Isti učinak primijećen je i za Ha i Hc protone ZAL (podaci nisu prikazani). Prikazom ovisnosti promjene kemijskog

pomaka analiziranih protona o omjeru koncentracija ciklodekstrina i lijeka, konstruirana je izoterma iz koje je moguće, primjenom regresijske analize, izračunati vrijednost K_s. Na slici 35. prikazana je odabrana krivulja titracije Hd protona lijeka s βCD pri 295 K. Podaci za ostale protone dobiveni titracijom s ispitivanim ciklodekstrinima pri različitim temperaturama nisu prikazani. Temeljem određenih vrijednosti konstanti, izračunati su termodinamički parametri kompleksacije za ispitivane sustave. Promjena vrijednosti konstanti stabilnosti za ispitivane sustave u ovisnosti o temperaturi prikazana je na Slici 36. Sve konstante ravnoteže izračunate su kao prosjek konstanti ravnoteže izračunatih iz pomaka triju protona koji su bili pod najjačim utjecajem tijekom kompleksacije, prema jednadžbama (25-27). Termodinamičke parametre za ZAL/HPβCD kompleks nije bilo moguće odrediti primjenom ^{1}H-NMR titracije, vjerojatno zbog relativno male konstante ravnoteže i slabog utjecaja kompleksacije na ZAL NMR pomake protona (Zielenkiewicz i sur., 2010). Termodinamički parametri dobiveni NMR mjerenjima izračunati su prema van't Hoffovoj jednadžbi i navedeni su u Tablici 12.



Slika 35. ^{1}H NMR titracijska krivulja Hd protona molekule lijeka kao funkcija koncentracijskog omjera gost-domaćin pri 295 K.



Slika 36. Van't Hoffovi pravci za inkluzijske komplekse ZAL i CD dobiveni ^{1}H NMR mjerenjem (legenda: RAMEB, Δ; SBEβCD ●; βCD, ○).)

Različite molekulske sile utječu na stvaranje kompleksa između molekula ciklodekstrina (domaćina, engl. *host*) i drugih molekula (gosta, engl. *guest*). Stvaranje inkluzijskog kompleksa domaćin-gost u vodenoj otopini dovodi do preraspodjele i uklanjanja molekula vode iz središnje šupljine ciklodekstrina, koje prate elektrostatske interakcije između molekule gosta i ciklodekstrina. Ovisno o strukturi molekule gosta, moguće je nastajanje van der Waalsovih interakcija, vodikovih veza te prijenos naboja (Alvira, 2007; Pinjari i sur. 2006). Vrijednosti određenih termodinamičkih parametara rezultat su međudjelovanja navedenih sila. Smatra se da su glavni čimbenici koji pridonose nastanku inkluzijskog kompleksa van der Waalsove i hidrofobne interakcije (Hallen i sur., 1992; Matsui i sur., 1979). Proces inkluzije lijeka u šupljinu ciklodekstrina najčešće se povezuje s negativnom promjenom entalpije ($\Delta H^{\ominus}$), dok promjena entropije ($\Delta S^{\ominus}$) može biti ili pozitivna ili negativna (Sivasankar i sur., 2012; Chadha i sur., 2004). Proces nastajanja kompleksa može se rasčlaniti u dva koraka. Prvi korak obuhvaća procese vezane uz otapalo, a drugi procese vezane uz otopljenu tvar. Nakon inkluzije molekule gosta u centralnu šupljinu ciklodekstrina, jedan dio površine obiju molekula gubi kontakt s molekulama otapala koje se vraćaju u stvarno otapalo (engl. *bulk water*). Pozitivne vrijednosti $\Delta S^{\ominus}$ objašnjavaju se narušavanjem uređene strukture molekula vode koje okružuju hidrofobne dijelove molekule gosta, do koje dolazi nakon njegove inkluzije u centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina. Hidrofobna

interakcija može se povezati sa slabo pozitivnim ΔH^o i jako pozitivnim ΔS^o, što ukazuje na proces vođen entropijom, dok jako negativni ΔH^o ukazuje na proces vođen entalpijom.

Primjenom spektrofluorimetrijske i ^{1}H-NMR titracije dobivene su slične negativne vrijednosti ΔG^o za sve nastale komplekse (Tablica 12), što ukazuje na spontanost reakcije nastajanja kompleksa ZAL sa svim ispitivanim derivatima ciklodekstrina. Pri tome rezultati pokazuju da se s termodinamičkog stajališta mogu izdvojiti dva različita načina inkluzije. Prvi je inkluzija vođena entalpijom, koja je karakteristična za komplekse lijeka s βCD, RAMEB i HPβCD, a drugi je inkluzija vođena entropijom koja je određena za inkluzijske komplekse lijeka s SBEβCD. Poznato je da na inkluziju uvjetovanu promjenom entalpije dominantan utjecaj imaju van der Waalsove interakcije između molekule lijeka i ciklodekstrina. Entalpijom uvjetovano nastajanje inkluzijskih kompleksa posljedica je penetracije hidrofobnog dijela molekule gosta u hidrofobnu centralnu šupljinu ciklodekstrina, čime se značajno ograničavaju stupnjevi slobode uklopljene molekule lijeka (nizak ΔS^o) (Rekharsky i sur., 1997; Hallen i sur., 1992). Entalpijom vođeni proces nastajanja inkluzijskog kompleksa karakterističan je za velik broj prirodnih kao i kemijski modificiranih ciklodekstrina (Rekharsky i Inoue, 1998).

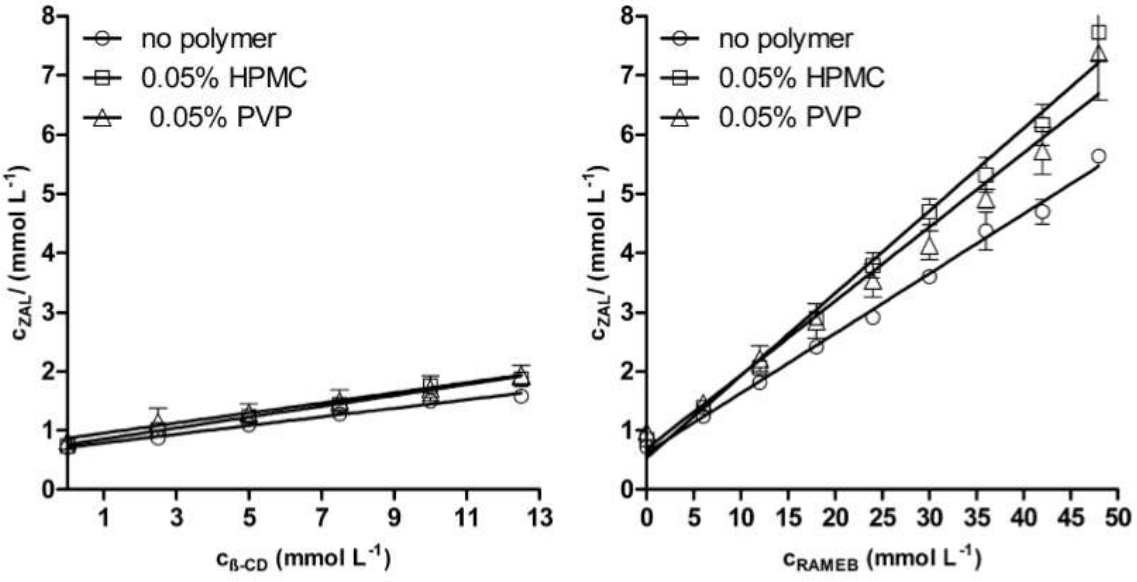
Uspoređujući strukturu nastalih kompleksa, koja je određena primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije, dokazan je dominantan način vezanja, kao što je objašnjeno u poglavlju 4.2. i 4.3., što je posljedica približno istih veličina centralnih šupljina. Uspoređujući komplekse lijeka s βCD, RAMEB i HPβCD, kompleks s βCD pokazuje najveću negativnu promjenu entropije i entalpije, što nije neuobičajeno (Gelb i sur., 1992). Ovaj rezultat se objašnjava steričkom interferencijom između supstituenata i supstrata (Casu i sur., 1970; Casu i sur., 1968). Sterička napetost dala bi pozitivan doprinos ΔH^o što može dovesti do značajne razlike u entalpiji kompleksacije. Također, dio bi se mogao pripisati i gubitku vodikovih veza između glukozilnih skupina (Jaques i sur., 1976; Casu i sur., 1966) uslijed konformacijskih promjena do kojih dolazi tijekom kompleksacije. Ciklodekstrini s metilnim i hidroksipropilnim supstituentima imaju slabiji afinitet prema stvaranju kompleksa sa ZAL, što uzrokuje manje negativne vrijednosti ΔH^o. Moguća su i dodatna objašnjenja, poput različitih interakcija hidroksilne naspram metilne ili hidroksipropilne skupine s molekulama vode. Iz svega navedenog vidljivo je da različite inter- i intra-molekularne veze igraju značajnu ulogu u nastajanju navedenih kompleksa, gdje vjerojatno svi spomenuti fenomeni u određenoj mjeri pridonose ukupnoj promjeni entalpije i entropije.

Komplekse ZAL s SBEβCD karakterizira nešto drugačija termodinamika (Tablica 12). SBEβCD je jaka kiselina koja zadržava negativan naboj i pri izrazito niskim pH-vrijednostima (Masson i sur., 1998), dok je ZAL neutralan lijek pa ne dolazi do elektrostatičke interakcije, a posljedično ni do stabilizacije ili destabilizacije veze kao što je slučaj kod nabijenih molekula lijeka (Zhou i sur., 2006). Kod ovog kompleksa, mala promjena entalpije, kao i pozitivna entropija, upućuju na proces vođenu entropijom. Učinak kompenzacije entalpije i entropije je vidljiv uslijed usporedivih vrijednosti promjene slobodne energije za sve komplekse (Tablica 12). Smatra se da su hidrofobne interakcije između dvije nepolarne molekule pri sobnoj temperaturi uglavnom procesi vođeni entropijom, kod kojih je entropija interakcije velika i pozitivna dok je entalpija interakcije mala (Privalov i Gill, 1998; Wiggins, 1997; Ben-Naim, 1987). Također, veći broj nabijenih sulfobutilnih skupina kod SBEβCD pridonosi pozitivnoj promjeni entropije (Zia i sur., 2000), što se objašnjava povećanom površinom interakcije između ZAL i ciklodekstrina, s obzirom da sulfobutilni alkilni lanci mogu ući u interakciju s hidrofobnim dijelovima lijeka. Na termodinamiku kompleksacije može utjecati i promjena hidratacije u blizini nabijene sulfonske skupine kod slobodnog i kod vezanog ciklodekstrina (Kano i sur., 2000).

4.5. Nastajanje ternarnih kompleksa u otopini

βCD i RAMEB su stvaranjem stabilnih inkluzijskih kompleksa značajno povećali topljivost ZAL u vodi, no količina ciklodekstrina koja se može upotrijebiti u formulaciji često je ograničena, stoga bi bilo poželjno dodatno povećati solubilizirajući i kompleksirajući potencijal tih derivata ciklodekstrina dodatkom prikladne ternarne komponente (Maestrelli i sur., 2011; Kiss i sur., 2010). Različiti hidrofilni polimeri (npr. karboksimetilceluloza, hipromeloza, odnosno hidroksipropilmetilceluloza, ili HPMC, polietilenglikol ili polivinilpirolidon) u malim koncentracijama (0,1 – 0,5%, *m/V*) mogu značajno poboljšati solubilizacijski i kompleksacijski učinak različitih ciklodekstrina stvaranjem ternarnih kompleksa lijek-ciklodekstrin-polimer. Zbog toga su istraživanja usmjerena prema ispitivanju ternarnih kompleksa lijek-ciklodekstrin-polimer, kao mogućoj strategiji koja bi znatno unaprijedila učinkovitost ispitivanih ciklodekstrina u povećanju topljivosti ZAL. U tu su svrhu provedena solubilizacijska ispitivanja u ternarnim sustavima koji su sadržavali niske koncentracije hidrofilnih polimera (HPMC i PVP), s ciljem vrednovanja njihovog utjecaja na

topljivost lijeka, kao i na kompleksaciju s odabranim ciklodekstrinima. Dobivene izoterme topljivosti prikazane su na Slici 37.



Slika 37. Utjecaj HPMC i PVP u koncentraciji od 0,05% (*m/V*) na topljivost ZAL utjecajem βCD (lijevo) i RAMEB (desno) pri 25 ºC (srednja vrijednost ± SD, *n*=5).

Podaci dobiveni analizom izotermi topljivosti prikazani su u Tablici 13. Od hidrofilnih polimera, samo PVP uzrokuje značajnije povećanje topljivosti lijeka u vodi ($p < 0,01$), što ukazuje na interakciju lijek-polimer, dok utjecaj HPMC na topljivost lijeka nije statistički značajan ($p > 0,05$).

U svim ispitivanim uzorcima, topljivost ZAL raste linearno ($r^2>0,99$) s povećanjem koncentracije ciklodekstrina (Slika 37), pokazujući A_L tip izoterme topljivosti (Higuchi i Connors, 1965). Nagibi pravaca su manji od 1, što upućuje na nastajanje inkluzijskih kompleksa u stehiometrijskom omjeru 1:1, bez obzira na prisutnost hidrofilnih polimera u mediju. U oba slučaja opažen je porast vrijednosti nagiba pravca izoterme topljivosti, što ukazuje na interakciju polimera i binarnog kompleksa te nastanak ternarnih kompleksa (Jug i Bećirević-Laćan 2004).

Tablica 13. Učinak HPMC ili PVP (0,05%, *m/V*) na topljivost lijeka (s_0), konstantu stabilnosti kompleksa lijek-ciklodekstrin (βCD ili RAMEB, K_s) i solubilizacijski učinak ispitivanih ciklodekstrina (s_{CD}/s_0) (srednja vrijednost ± SD, *n*=5).

Polimer *%(m/V)*	s_o (mg/mL)	βCD		RAMEB	
		$K_s(M^{-1})$	s_{CD}/s_o	$K_s(M^{-1})$	s_{CD}/s_o
-	0,22 ± 0,01	112 ± 2	2,2	156 ± 5	7,3
0,05 HPMC	0,24 ± 0,01	119 ± 3	2,6	189 ± 8	9,1
0,05 % PVP	0,27 ± 0,02	114 ± 8	2,4	142 ± 7	7,8

U ternarnim sustavima s βCD i HPMC ili PVP, ukupna topljivost lijeka je manja od sume vrijednosti određenih u sustavima gdje su prisutni pojedinačno polimer ili ciklodekstrin ($s_{\beta CD\text{-}HPMC} < s_{\beta CD} + s_{HPMC}$ ili $s_{\beta CD\text{-}PVP} < s_{\beta CD} + s_{PVP}$). Dobiveni rezultati ukazuju da βCD s ispitivanim polimerima ne stvara ternarne komplekse, jer nije došlo do značajnijeg povećanja topljivosti lijeka, niti su poboljšana kompleksirajuća svojstva βCD. Sličan rezultat dobiven je i u ternarnom sustavu koji sadrži ciklodekstrin RAMEB i PVP. Topljivost lijeka u tom ternarnom sustavu je niža od sume vrijednosti određenih za sustave u kojima je bio prisutan samo ciklodekstrin ili polimer ($s_{RAMEB\text{-}PVP} < s_{RAMEB} + s_{PVP}$). Povećanje topljivosti lijeka (Tablica 13) kod uzoraka s RAMEB i PVP može se objasniti istovremenom prisutnošću dva različita solubilizacijska fenomena. Prvi uključuje kompleksaciju zaleplona s RAMEB, dok je drugi posljedica interakcije lijeka s PVP. Suprotno tome, u sustavu s RAMEB i HPMC, topljivost lijeka je uvijek značajno veća u ternarnom kompleksu nego suma topljivosti u pojedinačnim binarnim sustavima s ciklodekstrinom i polimerom ($s_{RAMEB\text{-}HPMC} > s_{RAMEB} + s_{HPMC}$). Iz toga proizlazi da dodatak HPMC u sustav povećava solubilizirajući i kompleksirajući potencijal RAMEB, vrlo vjerojatno uslijed nastajanja ternarnog kompleksa lijek-RAMEB-HPMC, dodatno povećavajući stabilnost nastalog kompleksa (Tablica 13).

4.6. Priprema i karakterizacija kompleksa u čvrstom stanju

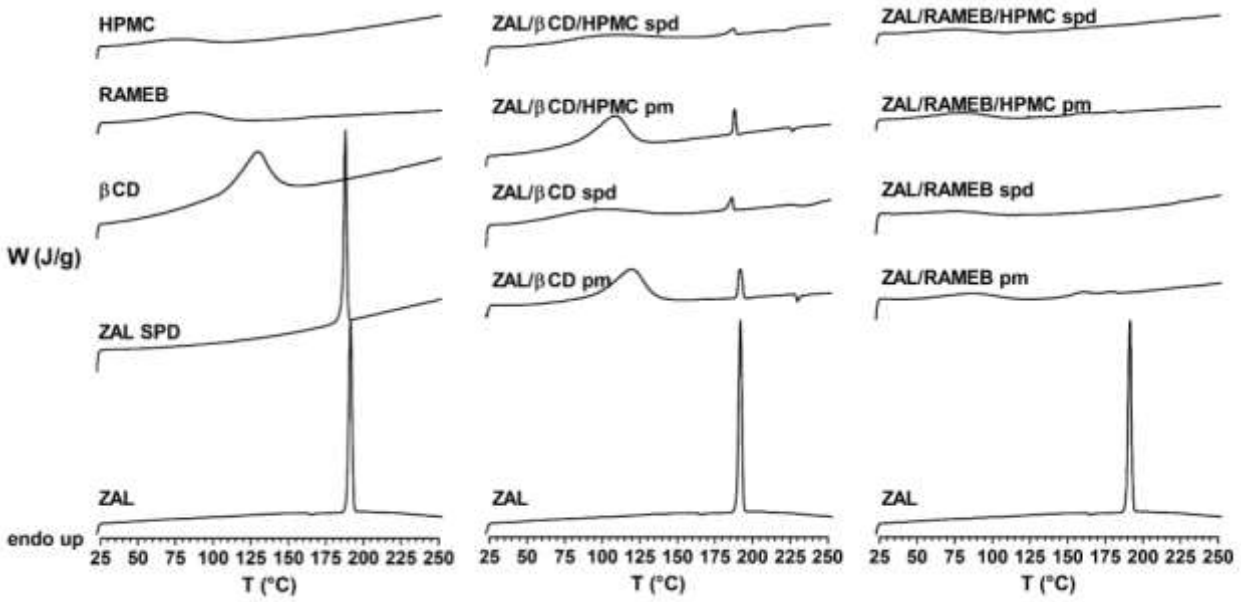
4.6.1. Kompleksi pripremljeni tehnikom sušenja raspršivanjem

Binarni ekvimolarni kompleksi zaleplona s ispitivanim ciklodekstrinima u čvrstom stanju pripremljeni su kao fizičke smjese (pm) i metodom sušenja raspršivanjem (spd), koristeći βCD i RAMEB. Ternarni kompleksi pripremljeni su samo s HPMC kao polimernom komponentom jer su prethodna ispitivanja pokazala da PVP ne stvara ternarne komplekse sa ZAL i odabranim ciklodekstrinima. Svi pripremljeni uzorci analizirani su primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), te difrakcije rentgenskih zraka na praškastom uzorku (XRPD). Intenzitet interakcije među komponentama procjenjivao se prema promjeni temperature taljenja lijeka, promjeni entalpije taljenja, a određen je i udio kristalinične faze ZAL u uzorcima (RDC) (Doiphode i sur., 2008). Parametri određeni DSC analizom prikazani su u Tablici 14. Cilj ovog dijela istraživanja je bio razviti optimalan tehnološki postupak za pripremu kompleksa u čvrstom stanju te ispitati utjecaj pojedinog postupka na fizičko-kemijska svojstva lijeka. Da bi se ispitao utjecaj tehnoloških postupaka za pripremu kompleksa na fizičko-kemijska svojstva čistog lijeka, sam lijek je također podvrgnut sušenju raspršivanjem, a dobiveni uzorci su karakterizirani primjenom DSC i XRPD analize.

Tablica 14. Termička svojstva i udio kristalinične faze lijeka (RDC) u uzorcima čistog ZAL, ZAL sušenog raspršivanjem te kod binarnih i ternarnih kompleksa s βCD i HPMC pripremljenih kao fizička smjesa ili postupkom sušenja s raspršivanjem.

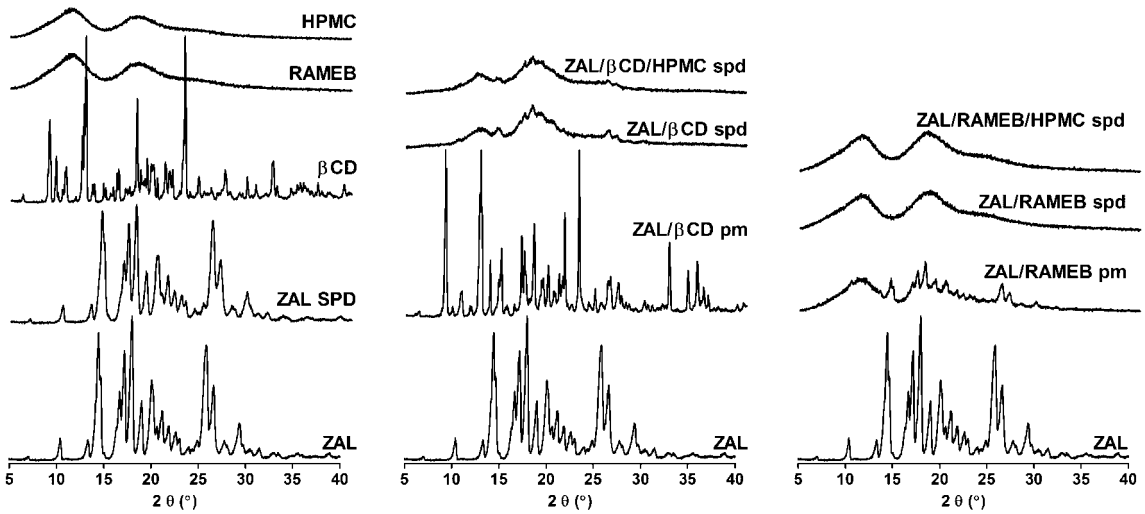
Uzorak	T_{peak} (°C)	$\Delta H_{fus}(Jg^{-1})$	RDC(%)
ZAL	190,6	101,4	100,0
ZALspd	187,4	97,3	96,0
ZAL/βCD pm	190,7	19,7	98,8
ZAL/ βCD spd	185,4	8,5	39,8
ZAL/βCD/HPMC pm	187,3	14,3	67,8
ZAL/βCD/HPMC spd	186,4	6,6	31,1

U termogramu zaleplona (Slika 38) vidljiv je oštar endotermni pik na 190,6 ºC što odgovara temperaturi taljenja lijeka. Uzorak pripremljen postupkom sušenja raspršivanjem (ZAL spd) pokazuje gotovo identičan termogram i tek neznatno smanjenje entalpije taljenja (ΔH = 97,3 J/g) u odnosu na čisti lijek. Dobiveni rezultat ukazuje da postupak sušenja raspršivanjem vodeno-etanolne otopine ZAL nije utjecao na polimorfni oblik lijeka. Niža temperatura taljenja se može objasniti smanjenjem veličine čestica lijeka zbog pripreme uzorka postupkom sušenja raspršivanjem.



Slika 38. DSC termogrami pojedinačnih tvari, raspršivanjem osušenih binarnih i ternarnih kompleksa (spd) te odgovarajućih fizičkih smjesa (pm).

Rezultati dobiveni termičkom analizom potvrđeni su primjenom XRPD analize. XRPD čistog ZAL pokazuje brojne i oštre pikove koji su karakteristični za kristaliničnu tvar. Pikovi dobiveni pri vrijednostima kuta difrakcije (2Θ) od 10,4º, 14,5º 20,1º (Slika 39) potvrđuju prisutnost kristaliničnog polimorfnog oblika 1 zaleplona dobivenog precipitacijom lijeka iz nevodenog otapala (Aslam i sur., 2005). Uzorak zaleplona dobiven postupkom sušenja raspršivanjem pokazuje isti difraktogram kao i čisti lijek (Slika 39), što potvrđuje da sušenje raspršivanjem ne uzrokuje promjenu polimorfnog oblika lijeka.



Slika 39. XRPD difraktogrami pojedinačnih tvari, raspršivanjem osušenih binarnih i ternarnih kompleksa (spd) te odgovarajućih fizičkih smjesa (pm).

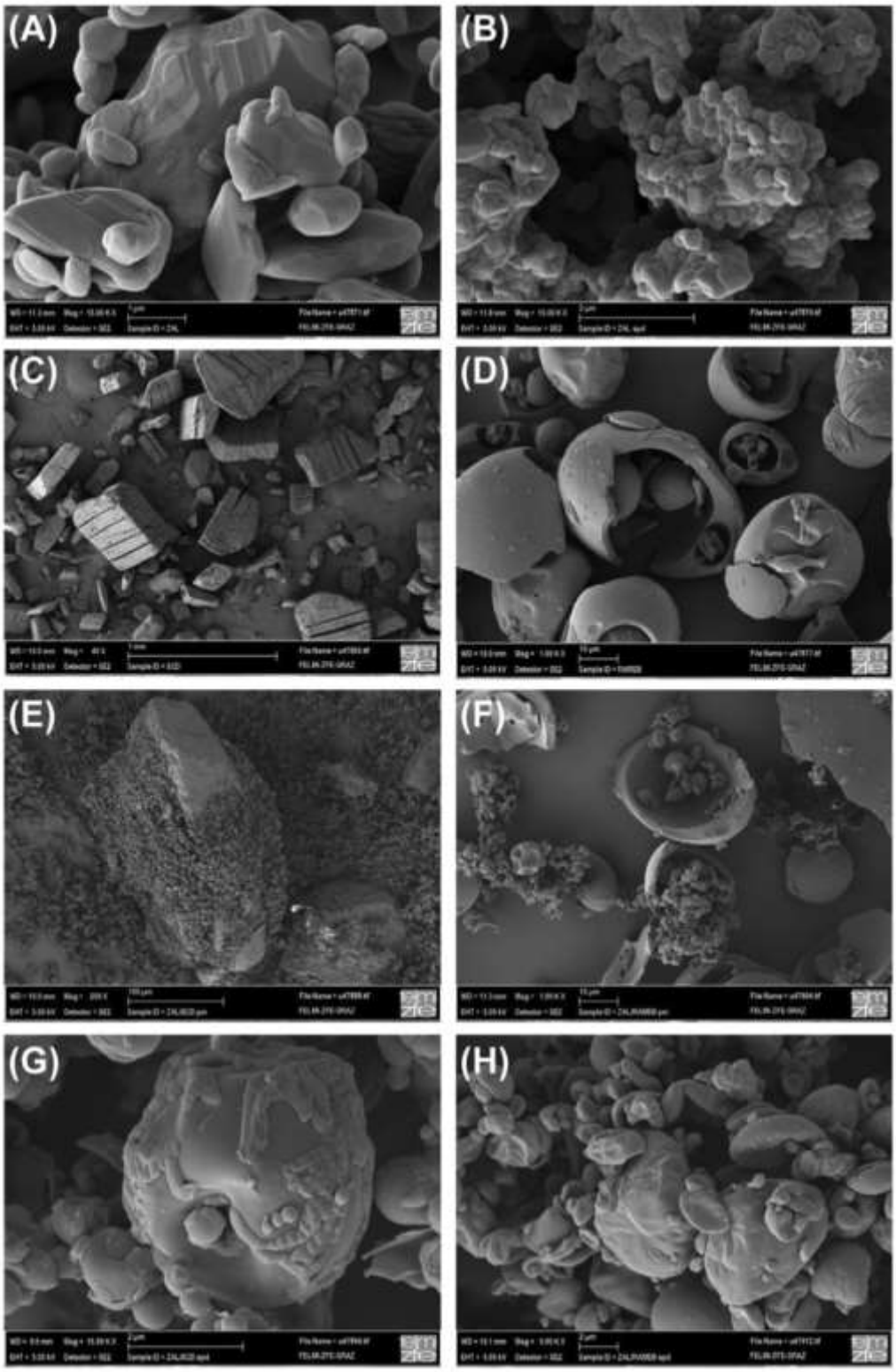
Na termogramu βCD (Slika 38) vidljiv je široki endotermni pik, s maksimumom pri 127,6 °C, koji odgovara oslobađanju kristalne vode iz uzorka. Isti proces vidljiv je u termogramu RAMEB (Slika 38) kao prisutan široki endotermni pik s maksimumom pri 88,4 °C, a kod HPMC javlja se pri 78,7 °C. Pri višim temperaturama ove tvari ne pokazuju značajnije termičke događaje. Temperatura staklastog prijelaza za HPMC nije uočena. XRPD difraktogrami βCD potvrđuju njegovu kristaliničnost (Slika 39), dok su difraktogrami RAMEB i HPMC karakteristični za amorfne tvari (Bettinetti i sur., 2002). Na termogramu fizičke smjese ZAL/βCD vidljiv je pik entalpije taljenja lijeka na istoj temperaturi kao kod čistog ZAL. Izračunati udio kristalinične faze lijeka (Tablica 14) potvrdio je nedostatak bilo kakve interakcije između komponenata u čvrstom stanju, a to je potvrđeno i XRPD analizom (Slika 39). XRPD difraktogram fizičke smjese ZAL/βCD pokazuje jednostavnu superpoziciju difraktograma čistih komponenata. Nasuprot tome, u termogramu binarnog uzorka ZAL/βCD pripremljenog metodom sušenja raspršivanjem, pik taljenja javlja se pri nižim temperaturama u odnosu na onaj čistog lijeka, te je niža i entalpija taljenja (Slika 38, Tablica 14). Izračunati udio kristalinične faze lijeka ukazuje da je došlo do djelomične amorfizacije lijeka u uzorku (Tablica 14). Podaci dobiveni XRPD analizom potvrđuju te navode.

U ternarnom kompleksu ZAL/βCD/HPMC koji je pripremljen kao fizička smjesa značajno se smanjila kristaliničnost lijeka u uzorku (Tablica 14) što se prvenstveno može objasniti termički uzrokovanom interakcijom između komponenata tijekom DSC analize.

Kako je temperatura staklastog prijelaza HPMC (T_g = 202 °C) (Karavas i sur., 2006) viša od temperature taljenja lijeka, može se pretpostaviti da tijekom DSC analize ne dolazi do otapanja kristaliničnog lijeka u gumastom polimeru. Uočenu interakciju je vjerojatno potaknulo oslobađanje adsorbirane vlage s polimera tijekom zagrijavanja uzorka za vrijeme analize. Kod ternarnog kompleksa osušenog raspršivanjem (ZAL/βCD/HPMC), udio kristalinične faze lijeka u uzorku je još niži u usporedbi s binarnim kompleksom (ZAL/βCD), ali nije postignuta potpuna amorfizacija lijeka što je potvrđeno i XRPD analizom (Slika 39). Dobiveni rezultat sugerira da HPMC ne može značajnije poboljšati sposobnost kompleksacije prirodnog βCD s lijekom ni u čvrstom stanju.

Kod binarnih i ternarnih kompleksa ZAL s RAMEB dobiveni su drugačiji rezultati. Termogram fizičke smjese ZAL/RAMEB nije pokazao nikakve termičke događaje pri temperaturi taljenja lijeka (Slika 38), dok su na XRPD difraktogramu istog uzorka uočeni pikovi karakteristični za lijek (Slika 39). Dobiveni rezultati ukazuju da termalna analiza nije prikladna za karakterizaciju čvrstog uzorka s RAMEB uslijed termički uvjetovane interakcije lijeka i nosača (Aigner i sur., 2005). Stoga su interakcije ZAL/RAMEB u čvrstim uzorcima analizirane primjenom XRPD. Difraktogram binarnih i ternarnih kompleksa pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem su u potpunosti difuzni (Slika 39), što upućuje na potpunu amorfnost lijeka u uzorcima, a to se može pripisati nastajanju inkluzijskog kompleksa u čvrstom stanju.

Da bi se potvrdili zaključci izvedeni na osnovu rezultata DSC i XRPD analize, provedeno je morfološko vrednovanje polaznih komponenata i uzoraka pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem, primjenom SEM. Mikrografije uzoraka prikazane su na Slici 40.

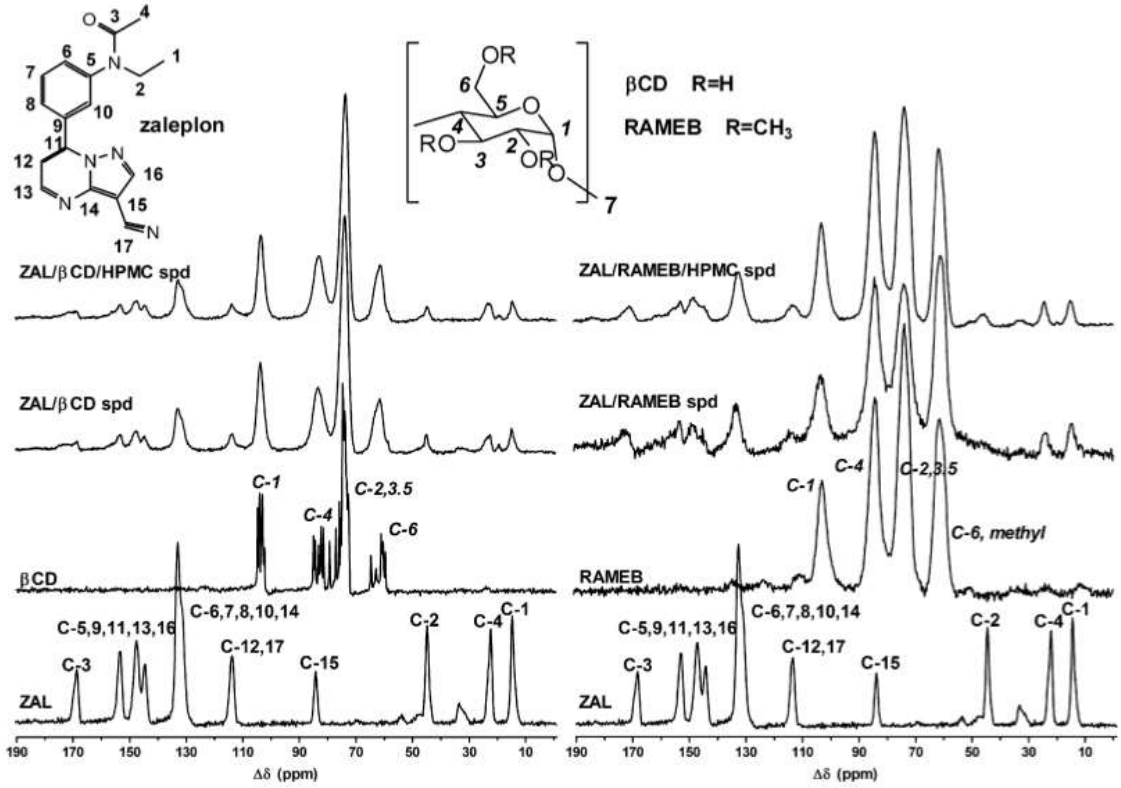


Slika 40. SEM mikrografije ZAL (A), raspršivanjem osušenog ZAL (ZAL spd) (B), βCD (C), RAMEB (D), fizičkih smjesa ZAL/βCD (E) i ZAL/RAMEB (F) te raspršivanjem osušenih ZAL/βCD (G) i ZAL/RAMEB kompleksa (H).

Čisti kristalinični ZAL (Slika 40A) ima oblik nepravilnih čestica različitih veličina s glatkom površinom, pri čemu manje čestice prianjaju na površinu većih. SEM mikrografija ZAL dobivenog metodom sušenja raspršivanjem pokazuje da su u uzorku zadržana tipična morfološka obilježja lijeka što je u skladu s rezultatima XRPD analize. Veličina čestica ZALspd je nešto manja u usporedbi s veličinom čestica čistog ZAL, a prisutna je značajna adhezija čestica (Slika 40B). βCD je prisutan u obliku velikih romboidnih kristala s izraženim pukotinama na površini, dok je RAMEB u obliku šupljih sferičnih čestica (Slike 40C i D). Oba uzorka pokazuju široku raspodjelu veličina čestica. Kod fizičkih smjesa binarnih kompleksa ZAL s βCD ili RAMEB, kristali lijeka adsorbirani su na površini čestica ciklodekstrina što potvrđuje nedostatak interakcije u čvrstom stanju kod tih uzoraka. Nadalje, SEM analiza fizičke smjese ZAL/RAMEB (Slika 40F) potvrđuje zaključke postavljene temeljem rezultata dobivenih DSC analizom o termalno uvjetovanoj interakciji među komponentama. Mikrografije binarnih kompleksa pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem pokazuje veliku promjenu u tipičnoj morfologiji čestica lijeka i ciklodekstrina, ukazujući na nastanak nove krute faze (Zoppi i sur., 2011). Pritom su na mikrografijama binarnog kompleksa ZAL i βCD vidljivi nepravilni oblici koji prianjaju uz površinu raspršivanjem osušenih čestica (Slike 40E i G). Te strukture su vrlo vjerojatno nastale uslijed djelomične kristalizacije lijeka tijekom postupka sušenja raspršivanjem, potvrđujući tako zaključak donesen temeljem rezultata DSC i XRPD analize. Djelomična rekristalizacija lijeka tijekom postupka sušenja raspršivanjem događa se najvjerojatnije uslijed manjeg afiniteta lijeka za kompleksaciju s βCD kao što su pokazali rezultati solubilizacijskih ispitivanja (Tablica 8). Kod uzorka ZAL/RAMEB, dobivenog postupkom sušenja raspršivanjem, nastaju amorfne sferične čestice s naboranom površinom (Slika 40H). U navedenom uzorku više nije moguće razlučiti pojedine komponente, što upućuje na nastajanje nove krute faze, potvrđujući tako rezultate XRPD analize.

Da bi se dobio bolji uvid u kemizam interakcije lijeka i odabranih ciklodekstrina u čvrstom stanju, provedena je i ^{13}C-CP/MAS analiza raspršivanjem osušenih binarnih i ternarnih kompleksa. Izotropni rasponi ^{13}C-CP/MAS spektara prikazani su na Slici 41. Označavanje atoma ugljika zaleplona izvršena je pomoću ^{13}C NMR spektara snimljenih u otopini lijeka (Bharathi i sur., 2007) te u čvrstom stanju (Aslam i sur., 2005). ^{13}C-CP/MAS spektar ZAL tipičan je za polimorfni oblik 1 lijeka (Aslam i sur., 2005) što potvrđuje rezultate dobivene XRPD analizom. ^{13}C-CP/MAS spektar raspršivanjem osušenog ZAL ne pokazuje značajno odstupanje od spektra čistog kristaliničnog lijeka te se može zaključiti da tijekom

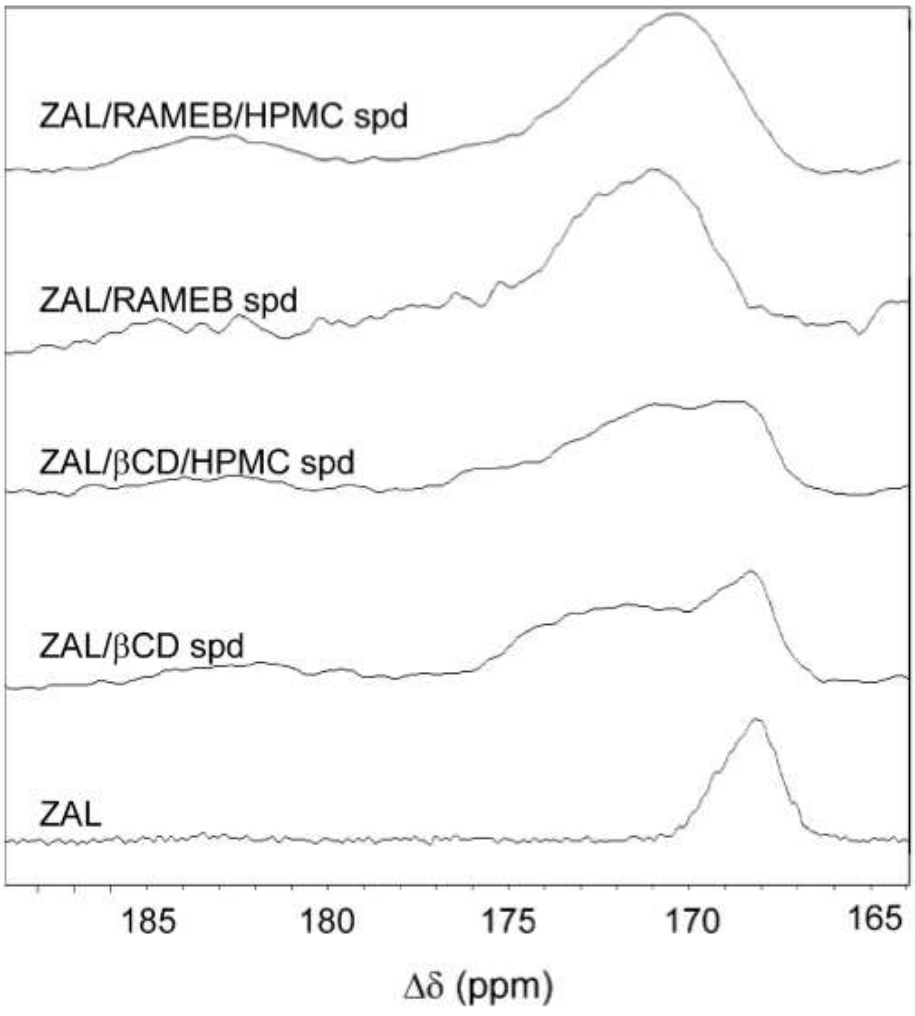
tehnološke obrade uzorka ne dolazi do značajne promjene u molekulskoj okolini lijeka (spektar nije prikazan), što je u skladu s rezultatima DSC, XRPD i SEM analize. Dobiveni ^{13}C-CP/MAS spektar βCD prikazuje odvojene rezonance za iste ugljikove atome različitih glukopiranoza u prstenu. Ovaj rezultat se može objasniti različitim vrijednostima dihedralnih kutova α (1→ 4) glikozidnih veza za atome ugljika 1-4 te vrijednostima kutova torzije koji opisuju orijentaciju hidroksilnih skupina (Zoppi i sur., 2011; Ogawa i sur., 2010).



Slika 41. ^{13}C-CP/MAS spektri kristaliničnog ZAL, ispitivanih ciklodekstrina (βCD ili RAMEB) te njihovih raspršivanjem osušenih binarnih i ternarnih kompleksa.

^{13}C-CP/MAS spektri binarnog i ternarnog kompleksa ZAL/βCD pokazuju da se rezonance pojedinih atoma molekule ciklodekstrina (C-1 do C-6) stapaju u široke pikove dok se središta rezonanci za svaki tip atoma ugljika βCD ne razlikuju značajno od onih kod čistog βCD. Dobiveni rezultati pokazuju da dolazi do povećanja simetričnosti u konformaciji glukopiranoznih jedinica βCD, vrlo vjerojatno uslijed nastajanja inkluzijskog kompleksa (Locci i sur., 2004). Osim toga, signali atoma ugljika molekule lijeka, i to C-3, 5, 9, 11, 13 i 16 u području od 160-144 ppm i C-4 pri 22,40 ppm u spektrima binarnih i ternarnih

kompleksa osušenih raspršivanjem značajno su širi u odnosu prema signalima kristaliničnog lijeka (Slika 41). Takvi rezultati ukazuju da je došlo do nove međumolekulske interakcije lijeka s ciklodekstrinima, što dovodi do promjene u molekularnoj mobilnosti i kemijskoj okolini ZAL i kod binarnih, i kod ternarnih kompleksa s βCD (Ogawa i sur., 2010). ^{13}C-CP/MAS spektri binarnog i ternarnog kompleksa ZAL/βCD pokazuju da kod gotovo ni jednog signala atoma ugljika molekule lijeka ne dolazi do značajnije promjene u vrijednosti kemijskog pomaka. Samo signal C-3 atoma pokazuje visokofrekventni pomak (Slika 42) što se može pripisati nastanku inkluzijskog kompleksa.

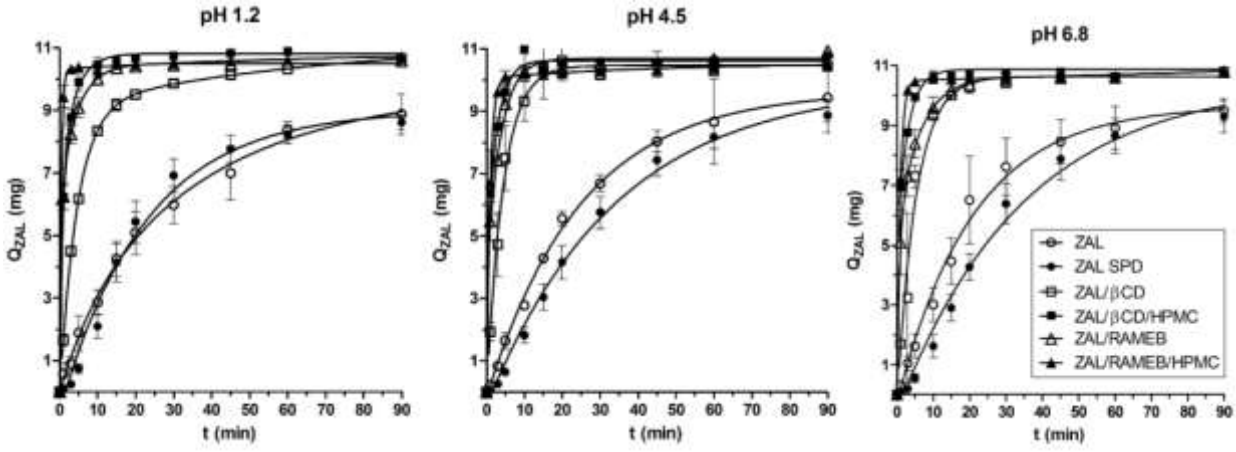


Slika 42. Fragment ^{13}C-CP/MAS NMR spektra kristaliničnog ZAL te raspršivanjem osušenih binarnih i ternarnih kompleksa s βCD ili RAMEB.

Kako je RAMEB kompleksna smjesa različitih stereoizomera, dobiveni spektar ^{13}C-CP/MAS je slabije razlučen u odnosu na onaj βCD (Slika 41). Označavanje signala atoma

ugljika u molekuli RAMEB provedena je prema literaturnim podacima o ^{13}C-CP/MAS spektru RAMEB u otopini (Gan i sur., 2011). Signali atoma ugljika molekule lijeka u binarnim i ternarnim kompleksima s RAMEB su širi u odnosu na signale čistog ZAL što ukazuje da je došlo do njegovog prelaska u amorfno stanje. Nadalje, signal C-3 karbonila u odnosu na čisti lijek pomaknut je prema višim frekvencijama (172,3 i 170,9 ppm za binarni i ternarni kompleks, u odnosu na 168,4 ppm za kristalinični lijek (Slika 42), što se može objasniti prisutnošću vodikovih veza između karbonilne skupine lijeka i hidroksilnih skupina RAMEB. Do stvaranja takvih veza dolazi uslijed nastanka inkluzijskog kompleksa (Zoppi i sur., 2011). Dobiveni rezultat je u skladu s prethodnim zaključkom o strukturi kompleksa ZAL/RAMEB u otopini, pri čemu inkluzija fenilnog prstena ZAL u centralnu šupljinu domaćina preko šireg otvora predstavlja glavni način vezanja.

In vitro ispitivanjem brzine otapanja ZAL iz pripremljenih binarnih i ternarnih kompleksa vrednovan je utjecaj ciklodekstrina (βCD i RAMEB) i hidrofilnih polimera na topljivost lijeka. Profil otapanja lijeka kao i različitih binarnih i ternarnih kompleksa u umjetnom želučanom mediju (pH 1,2), duodenalnom mediju (pH 4,5) i crijevnom mediju (pH 6,8) bez enzima prikazan je na Slici 43.



Slika 43. *In vitro* profil oslobađanja zaleplona iz binarnih i ternarnih kompleksa s βCD ili RAMEB osušenih raspršivanjem u različitim medijima: umjetni želučani medij (pH 1,2), duodenalni medij (pH 4,5) i crijevni medij (pH 6,8) bez enzima pri 37 ºC (srednja vrijednost ± SD, *n*=6).

Postotak otopljenog lijeka nakon 15 min ispitivanja (Q_{15min}) korišten je kao indikator brzine otapanja, dok je učinkovitost otapanja nakon 90 min (DE_{90}) služila za procjenu dosega procesa otapanja lijeka (Tablica 15) (Maestrelli i sur., 2011).

Tablica 15. Postotak otopljenog lijeka u 15 min (Q_{15min}) i učinkovitost otapanja u 90 min (DE_{90}) čistog zaleplona i njegovih binarnih i ternarnih kompleksa s βCD ili RAMEB u različitim medijima: umjetni želučani medij (pH 1,2), duodenalni medij (pH 4,5) i crijevni medij (pH 6,8) bez enzima pri 37 ºC (srednja vrijednost ± SD, *n*=6).

	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)
ZAL	42,5 ± 5,6	64,9 ± 3,9	42,9 ± 0,6	68,5 ± 5,2	44,6± 2,8	72,4 ± 7,6
ZAL spd	41,3 ± 6,0	65,8 ± 3,8	30,4 ± 4,2	62,1 ± 3,6	29,0± 2,4	65,4 ± 5,3
ZAL/ βCD	86,0 ± 2,4	89,6 ± 0,5	90,9 ± 2,8	91,7 ± 2,2	92,6± 0,4	92,4 ± 0,7
ZAL/ βCD/HPMC	95,5 ± 0,7	95,8 ± 0,4	97,8 ± 1,3	95,4 ± 1,2	95,3± 0,2	95,7 ± 0,1
ZAL/RAMEB	97,9± 0,4	96,6± 0,5	98,7± 1,3	95,4± 1,2	94,5± 2,2	94,7± 0,3
ZAL/RAMEB/HPMC	98,8± 0,2	97,7± 0,1	99,0± 0,6	97,2± 0,1	97,2± 0,2	97,0± 0,1

Otapanje ZAL u *in vitro* uvjetima je sporo i nepotpuno u svim ispitivanim medijima, a ZAL osušen raspršivanjem također ne pokazuje značajno brže otapanje niti značajno veći doseg procesa otapanja lijeka ($p>0,05$). To je u skladu s rezultatima DSC, XRPD i SEM analize, koji su pokazali da taj postupak ne mijenja značajno kristalinična svojstva lijeka, a time ni njegovu topljivost. Osim toga, rezultati pokazuju da kod ZAL osušenog raspršivanjem dolazi do blagog pada u brzini otapanja *in vitro*, naročito u medijima s višom pH-vrijednošću (Slika 43). To se može pripisati adheziji čestica koja je uočena SEM analizom te statičkom naboju prašaka koji se javlja pri metodi sušenja raspršivanjem (Murtomaa i sur., 2004). Prilično niske vrijednosti Q_{15min} i DE_{90} dobivene za čisti lijek i lijek pripremljen postupkom sušenja raspršivanjem pokazuju da bi početak djelovanja lijeka kao i njegova oralna bioraspoloživost mogle biti značajno ograničene zbog nedostatne topljivosti lijeka (Chavda i sur., 2010). Pripremom inkluzijskog kompleksa zaleplona s βCD značajno se povećala topljivost lijeka u svim ispitivanim medijima ($p<0,01$). Kod binarnog kompleksa ZAL/βCD u 15 min ispitivanja otopilo se dva puta više lijeka u usporedbi s čistim lijekom, a kod ternarnog

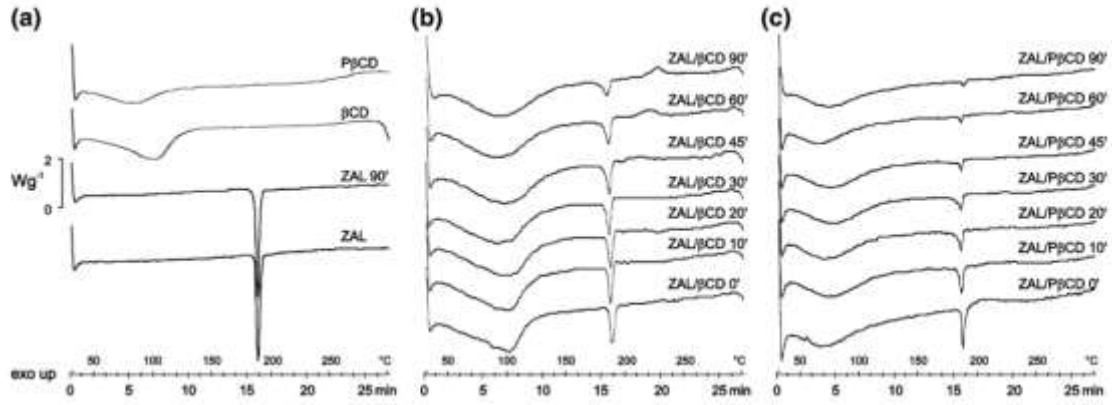
kompleksa ZAL/βCD/HPMC uočen je značajan porast brzine otapanja ($p<0,05$), što dovodi do potpunog otapanja doze lijeka u 15 min. Iako solubilizacijska ispitivanja kao i analiza čvrstog uzorka nisu potvrdila nastanak ternarnog kompleksa ZAL/βCD/HPMC, brže otapanje lijeka se može pripisati lokalnom djelovanju HPMC, pri čemu polimer pridonosi ovlaživanju čestica lijeka medijem za oslobađanje. Profil otapanja binarnog ZAL/RAMEB kompleksa usporediv je s profilom ternarnog ZAL/βCD/HPMC kompleksa (Tablica 15, $p>0,05$). To jasno pokazuje superioran kompleksirajući i solubilizirajući potencijal kemijski modificiranog ciklodekstrina. Brzina otapanja ternarnog kompleksa ZAL/RAMEB/HPMC je nešto brža u odnosu na onu binarnog kompleksa oblikovanog korištenjem istog ciklodekstrinskog derivata, no ta razlika nije statistički značajna ($p>0,05$). Modificirani ciklodekstrin (RAMEB) pokazuje bolju topljivost u odnosu na prirodni ciklodekstrin (βCD), a to vjerojatno uvjetuje bolju topljivost binarnog kompleksa s RAMEB (Loftsson i Duchêne, 2007). Osim toga, kao što je pokazano analizom čvrstog uzorka, lijek u binarnim kompleksima s RAMEB je u potpunosti amorfan što dodatno pridonosi bržem otapanju lijeka (Slika 39). Dobiveni rezultati ispitivanja oslobađanja lijeka *in vitro* pokazuju da su i binarni i ternarni kompleksi lijeka s RAMEB potencijalni kandidati za daljnji razvoj oralne formulacije lijeka s trenutnim oslobađanjem.

4.6.2. Kompleksi pripremljeni mljevenjem u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima

Mljevenje je jedan od najčešće korištenih tehnoloških postupaka u farmaceutskoj industriji. Mehanička energija kojom se djeluje na čvrsti uzorak prilikom mljevenja dovodi do smanjenja veličina čestica uzorka, stvarajući prašak koji ima veću površinu, a to može rezultirati povećanjem topljivosti (Lin i sur., 2010; Colombo i sur., 2009). No, ovaj postupak može dovesti do pojave statičkog elektriciteta, promjene polimorfnog oblika lijeka, kemijske nestabilnosti te razgradnje lijeka, a može nastati i izrazito kohezivan prašak sa slabim svojstvima tečenja. Moguća je i aglomeracija čestica što dovodi do smanjenja efektivne površine (Talukder i sur., 2011; Lin i sur., 2010; Barzegar-Jalali i sur., 2010). Mnogobrojna ispitivanja su pokazala da se te pojave mogu izbjeći upotrebom odgovarajućeg hidrofilnog ekscipijensa. Mljevenje lijekova uz dodatak različitih polimera ili šećera rezultira produktima s izraženom topljivošću i bioraspoloživošću nakon oralne primjene (Talukder i sur., 2011; Barzegar-Jalali i sur., 2010; Balasubramaniam i sur., 2010; Voinovich i sur., 2009). Korišteni

ekscipijensi prevode, djelomično ili u potpunosti, kristaliničan lijek u amorfno stanje, što izravno povećava topljivost lijeka, a osim toga poboljšava svojstva močenja. Ciklodekstrini se također mogu primijeniti kao ekscipijensi pri mljevenju u visokoenergetskim vibracijskim mlinovima, pri čemu nastaju topljivi produkti povećane oralne bioraspoloživosti (Maestrelli i sur., 2009; Vojnovich i sur., 2009; Bahl i sur., 2008). To se može pripisati nastajanju inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju koje je uzrokovano mehaničko-kemijskim promjenama tijekom postupka mljevenja (Aigner i sur., 2012; Ogawa i sur., 2010). U usporedbi s ostalim postupcima za pripremu inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju, mljevenje ne zahtijeva uporabu otapala čije uklanjanje iz konačnog produkta može biti izrazito složeno (Martin del Valle, 2004). Sam postupak je brz, jednostavan i prikladan za industrijsku primjenu, te ne zahtijeva upotrebu skupe opreme. To ga čini ekonomičnim i ekološki prikladnim postupkom (Colombo i sur., 2009).

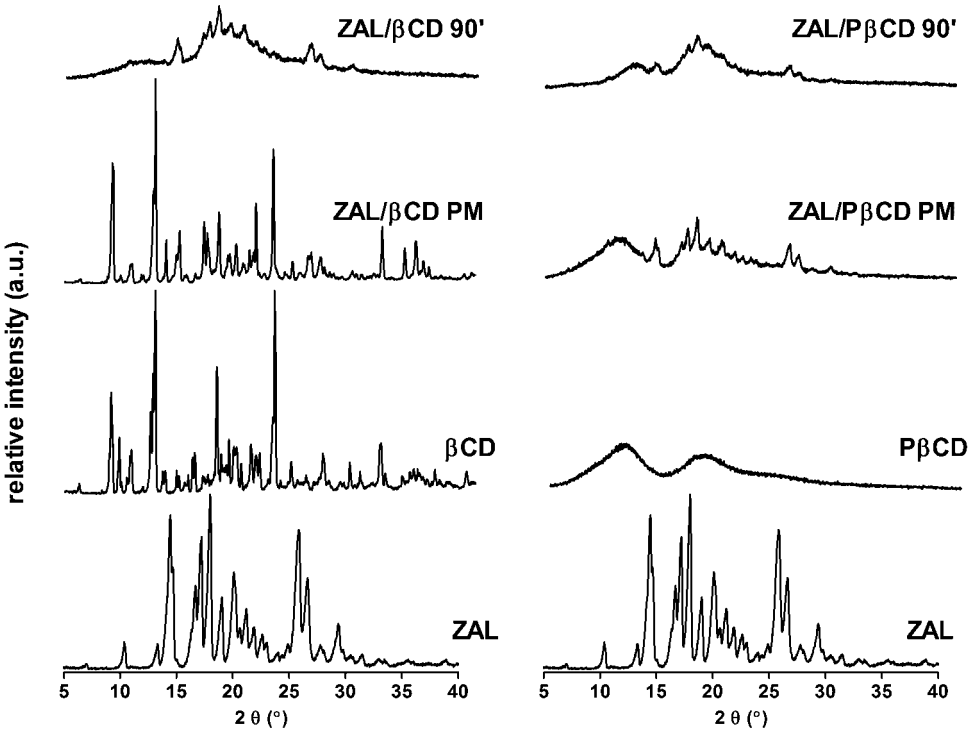
Učinkovitost mljevenja, kao postupka za pripremu inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju, često ovisi o odabranom derivatu ciklodekstrina. Ranija istraživanja su pokazala da su hidrofilni derivati βCD učinkovitiji u odnosu na sam prirodni βCD u stvaranju inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju (Maestrelli i sur., 2009). Nadalje, čini se da su polimerni derivati βCD čak i učinkovitiji u odnosu na nepolimerne, hidrofilne derivate βCD (Jug i sur., 2011; Jug i sur., 2010; Layre i sur., 2002). S obzirom na sve navedeno, činilo se zanimljivim ispitati prikladnost u vodi topljivog polimernog βCD (PβCD) kao potencijalnog nosača za pripremu inkluzijskih kompleksa zaleplona u čvrstom stanju postupkom mljevenja u visokoenergetskim vibracijskim mlinovima. Učinkovitost polimernog derivata uspoređena je s onom prirodnog βCD, s ciljem kritičkog vrednovanja njegovog potencijala u pripremi produkata visoke topljivosti. Kako bi se optimirao postupak mljevenja te ostvarila maksimalna interakcija između komponenata u čvrstom stanju, ekvimolarne smjese ZAL i odabranog derivata ciklodekstrina podvrgnute su mljevenju u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima kroz različite vremenske intervale, a pripremljeni uzorci analizirani su primjenom DSC analize. Promjena relativne kristaliničnosti lijeka u uzorku, koja je izračunata kao omjer normalizirane entalpije taljenja ZAL u mljevenom uzorku te entalpije taljenja čistog lijeka, korištena je kao indikator interakcije među komponentama u čvrstom stanju. DSC termogrami analiziranih uzoraka prikazani su na Slici 44, a ostali parametri određeni termičkom analizom prikazani su u Tablici 16. Za praćenje interakcije lijeka i odabranih ciklodekstrina u čvrstom stanju korištena je i XRPD analiza (Slika 45).



Slika 44. DSC termogrami čistog ZAL te njegovih ekvimolarnih smjesa s βCD i s PβCD dobivenih mljevenjem u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima kroz različito vrijeme.

Tablica 16. Parametri određeni termičkom analizom (t_1-temperatura početka taljenja, t_2-temperatura taljenja, *ΔH*-entalpija taljenja lijeka) i udio kristalinične faze lijeka (RDC) u uzorcima čistog zaleplona i u njegovim ekvimolarnim smjesama s βCD ili s PβCD, mljevenih različito vrijeme u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima.

Vrijeme mljevanja (min)	t_1 (˚C)	t_2 (˚C)	Δ H (J/g)	RDC (%)
ZAL				
0	185,27	186,47	97,79	100,00
90	185,27	186,47	97,69	99,87
βCD				
0	184,32	187,20	20,29	98,08
10	183,14	185,38	16,87	81,51
20	182,57	185,87	16,17	79,83
30	181,65	185,40	15,61	78,10
45	180,28	184,75	14,72	77,04
60	178,63	184,28	14,62	70,62
90	175,86	182,71	10,57	51,10
PβCD				
0	184,35	186,19	20,31	97,21
10	181,68	184,93	16,97	81,11
20	180,41	184,45	15,13	72,31
30	179,59	184,52	14,09	67,34
45	182,48	184,74	3,08	14,71
60	184,19	184,89	2,67	12,78
90	182,25	184,65	2,52	12,05



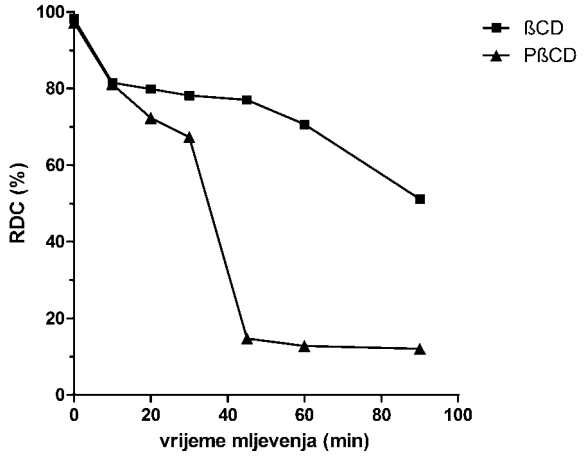
Slika 45. XRPD difraktogrami čistog zaleplona, βCD, PβCD, ekvimolarnih fizičkih smjesa lijeka i ispitivanih ciklodekstrina te njihovih produkta, dobivenih mljevenjem u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima, pri 24 Hz, tijekom 90 min.

U termogramu ZAL (Slika 44) vidljiv je široki endotermni pik na 186,47 ºC što se može pripisati procesu taljenja kristaliničnog lijeka. Nakon procesa taljenja, lijek pokazuje zadovoljavajuću termičku stabilnost u promatranom temperaturnom intervalu. XRPD difraktogram čistog zaleplona pokazuje brojne intenzivne pikove (Slika 45) što ukazuje na kristaliničnu prirodu lijeka. Osobito pikovi pri vrijednostima kuta difrakcije (2Θ) od 10,4º, 14,5º i 20,1º potvrđuju prisutnost najstabilnijeg bezvodnog kristaliničnog polimorfa ZAL u uzorku (Aslam i sur., 2005).

Termogrami odabranih ciklodekstrina pokazuju široke endotermne pikove u temperaturnom rasponu od 50 do 130 ºC, koji odgovaraju gubitku adsorbirane vlage (Slika 44). Kod obje fizičke smjese ZAL/CD koje nisu bile podvrgnute postupku mljevenja, temperature taljenja lijeka bile su neznatno niže u usporedbi s temperaturom taljenja čistog lijeka, dok je opaženo smanjenje vrijednosti entalpije taljenja u skladu s masenim omjerom komponenata u analiziranim uzorcima (Tablica 16). Nadalje, u tim se uzorcima udio kristalinične faze lijeka neznatno smanjuje, a nešto je niža i temperatura taljenja zaleplona. Ti

rezultati mogu se pripisati termički induciranoj interakciji među komponentama do koje je došlo tijekom termalne analize (Aigner i sur., 2005). Tu pretpostavku potvrđuju i rezultati XRPD analize. XRPD difraktogrami fizičkih smjesa ZAL/βCD i ZAL/PβCD pokazuju nekoliko oštrih pikova, čiji je intenzitet nešto manji nego kod čistog lijeka, što se može povezati s manjim udjelom lijeka u uzorku (Aigner i sur., 2012). Ti rezultati potvrđuju da u smjesi ZAL i odabranih ciklodekstrina koja nije bila izložena mljevenju nije došlo do interakcije u čvrstom stanju.

Kod ekvimolarnih uzoraka pripremljenih mljevenjem u visokoenergetskom vibracijskom mlinu dolazi do postupne promjene u vrijednostima parametara određenih termičkom analizom (Tablica 16). To se može pripisati interakciji među komponentama koja je uzrokovana mljevenjem u visokoenergetskim vibracijskim mikromlinovima. Da bi se isključio bilo kakav učinak same tehnike na fizičko-kemijska svojstva lijeka, zaleplon je također podvrgnut istom postupku, a dobiveni uzorci karakterizirani su primjenom DSC i XRPD analize. DSC termogram lijeka, koji je bio podvrgnut mljevenju tijekom 90 minuta, pokazuje pik taljenja lijeka pri istoj temperaturi kao i kod čistog lijeka (Slika 44), dok se entalpija taljenja samo neznatno smanjila (Tablica 16). Smanjenje entalpije taljenja se može pripisati promjeni udjela kristalinične faze lijeka, koji se tek neznatno smanjio (za 0,13%) što pokazuje da taj tehnološki postupak ima minimalan učinak na kristalinična svojstva lijeka. Ovakav zaključak potvrdila je i XRPD analiza, pri čemu je difraktogram zaleplona mljevenog tijekom 90 minuta istovjetan onome čistog lijeka (podatak nije prikazan). Time je potvrđeno da sam postupak mljevenja ne pridonosi amorfizaciji lijeka u čvrstom stanju, odnosno promjeni polimorfnog oblika lijeka (Lin i sur., 2010), već da se to može pripisati interakciji lijeka s ispitivanim ciklodekstrinima do koje je došlo tijekom postupka mljevenja (Slika 45, Tablica 16).

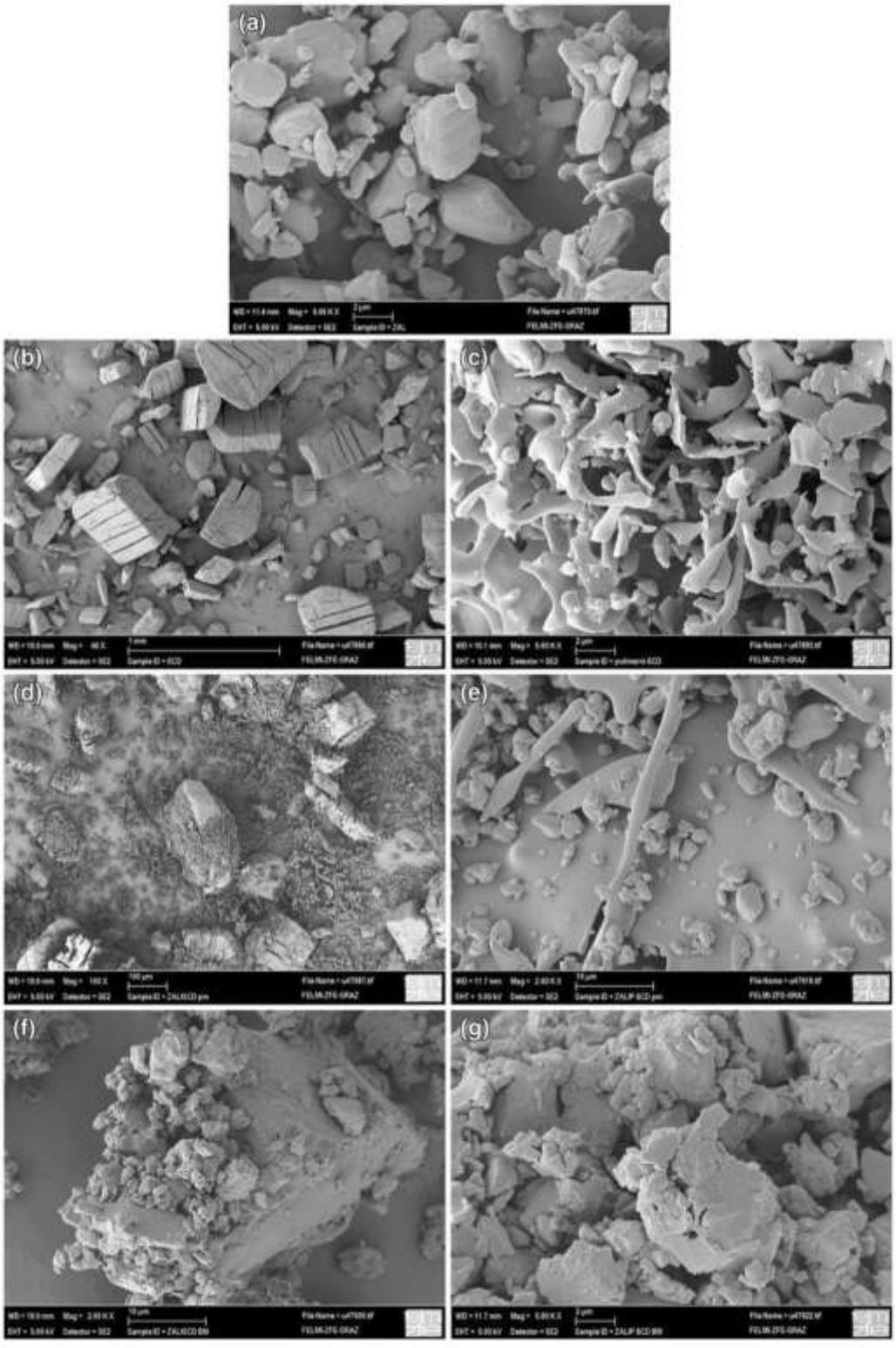


Slika 46. Promjena udjela kristalinične faze lijeka kod binarnih kompleksa ZAL s βCD ili s PβCD dobivenih postupkom mljevenja u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu prikazana kao funkcija vremena mljevenja.

Tijekom postupka mljevenja u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu tijekom 10 minuta dolazi do gotovo identičnog smanjenja udjela kristalinične faze lijeka u uzorcima ZAL/βCD i ZAL/PβCD. Dužim vremenom mljevenja dolazi do značajnijeg snižavanja u vrijednostima RDC kod ZAL/PβCD u odnosu na uzorak ZAL/βCD. Veća učinkovitost amorfnog polimernog nosača posebice je vidljiva nakon 45 minuta mljevenja (Slika 46). Pri tome, udio kristalinične faze lijeka u uzorku ZAL/PβCD se smanjio na samo 14,71%, dok je u uzorku ZAL/βCD ona otprilike 5,3 puta veća. Dužim mljevenjem uzoraka (60 i 90 minuta) dolazi do intenzivnije interakcije u čvrstom stanju u smjesi ZAL i βCD, dok je kod ZAL/PβCD vrijednost RDC ostala gotovo ista (Slika 46, Tablica 16). Nakon 90 minuta mljevenja, udio kristalinične faze lijeka u uzorku s βCD je oko 4,3 puta veći u odnosu na uzorak s PβCD, potvrđujući veću učinkovitost amorfnog, polimernog nosača u uspostavljanju interakcija u čvrstom stanju koje vode prema amorfizaciji lijeka u uzorku. Ti rezultati su potvrđeni i XRPD analizom (Slika 45).

Karakteristični pikovi lijeka prisutni su u difraktogramima uzoraka dobivenih mljevenjem ZAL u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu s βCD i PβCD, no intenzitet tih pikova je izraženiji u uzorku ZAL/βCD mljevenom 90 minuta, dok je u odgovarajućem uzorku s PβCD manje izražen (Slika 45). Taj rezultat upućuje na veći udio kristalinične faze lijeka u uzorku s βCD te potvrđuju rezultate dobivene DSC analizom. Također, XRPD rezultati pokazuju da se polimorfni oblik ZAL u uzorcima nije mijenjao tijekom postupka mljevenja s odabranim ciklodekstrinima. Pritom se čini da amorfno stanje korištenog

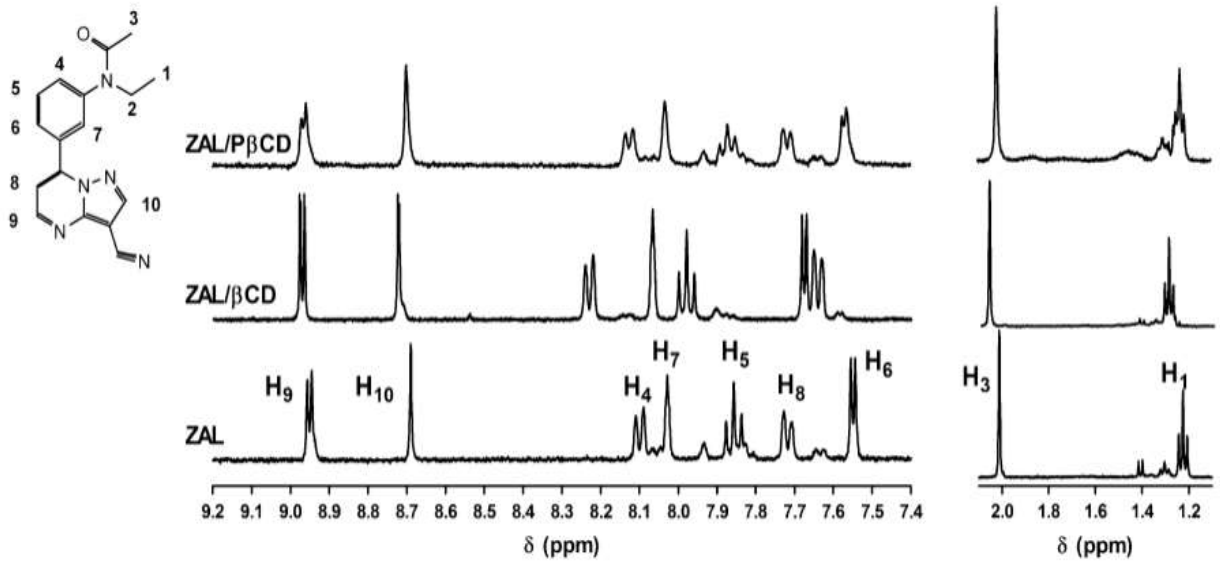
ekscipijensa pridonosi boljoj interakciji s lijekom u čvrstom stanju (Maestrelli i sur., 2009; Cirri i sur., 2004). Time se zapravo može objasniti bolja učinkovitost PβCD kao amorfnog nosača za stvaranje kompleksa u čvrstom stanju u odnosu na onu kristaliničnog βCD. Smatra se da tijekom mljevenja dolazi do različitih faznih promjena u čvrstom stanju, kao što je razaranje kristalne rešetke, stvaranje čvrstih otopina, kao i kristalizacija nove faze (Lin i sur., 2010). Mehanička sila koja djeluje za vrijeme mljevenja uzorka dovodi do smanjenja veličine čestica, a samim time dolazi do bližeg kontakta lijeka i amorfnog PβCD, kao i do njihovog intenzivnog miješanja. Pri tome dolazi do narušavanja strukture kristalne rešetke lijeka i/ili stvaranja inkluzijskog kompleksa u čvrstom stanju. Nastanak inkluzijskog kompleksa najvjerojatnije sprječava ponovni rast kristala lijeka tijekom mljevenja, uzrokujući djelomičnu ili potpunu amorfizaciju lijeka.



Slika 47. SEM slike čistih tvari, ZAL (a), βCD (b), PβCD (c); fizičke smjese ZAL/βCD (d) i ZAL/PβCD (e); ZAL/βCD (f) i ZAL/PβCD (g) pripremljenih postupkom mljevenja u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu kroz 90 minuta.

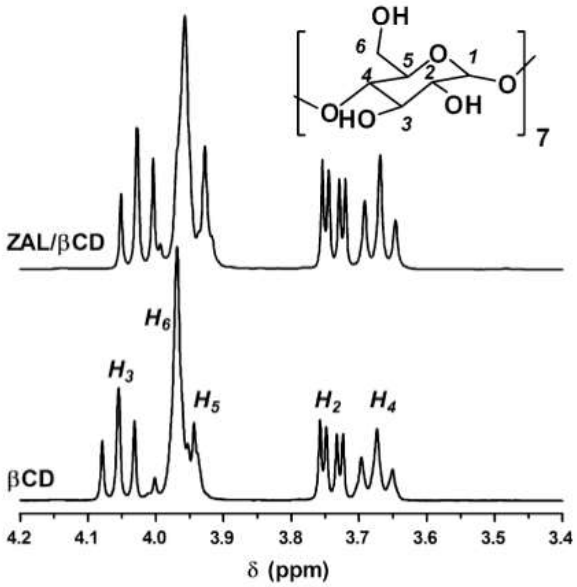
Morfološka karakterizacija pripremljenih uzoraka, provedena primjenom SEM analize (Slika 47) potvrdila je rezultate dobivene DSC i XRPD analizom. Čisti lijek je prisutan u obliku nepravilnih čestica različitih veličina i glatke površine. βCD je u obliku romboidnih kristala, dok se PβCD javlja u obliku ljuščica s amorfnim oblim česticama (Slika 47). Kod obje fizičke smjese vidljivi su tipični kristali lijeka adsorbirani na površini čestica ciklodekstrina, što potvrđuje nedostatak interakcije u čvrstom stanju kod tih uzoraka. Nadalje, tipična morfologija lijeka znatno se promijenila kod uzoraka dobivenih postupkom mljevenja u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu, što potvrđuje zaključke o stvaranju nove krute faze izvedene na osnovu rezultata DSC i XRPD analize. Kod uzorka pripremljenog mljevenjem lijeka i βCD vidljive su romboidne čestice βCD s adsorbiranim manjim česticama lijeka, što pokazuje da sam postupak mljevenja nije značajno utjecao na morfologiju čestica βCD. To se može pripisati vrlo stabilnoj kristalnoj rešetci βCD koja je dodatno stabilizirana intramolekulskim vodikovim vezama. No, u tako pripremljenom uzorku ZAL/βCD promijenila se morfologija čestica lijeka, vjerojatno djelomičnom amorfizacijom lijeka uslijed interakcije s βCD. S druge strane, kod ZAL/PβCD uzorka pripremljenog istim postupkom mljevenjem došlo je do potpune promjene morfoloških svojstava komponenata te se više ne mogu razlikovati pojedinačne komponente uzorka. To potvrđuje zaključak dobiven prethodnim analizama o većoj sklonosti polimernog βCD prema interakciji s lijekom u čvrstom stanju.

Gubitak kristaliničnosti i djelomična amorfizacija lijeka u pripravcima s βCD i PβCD pripremljenih postupkom mljevenja u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu, koja je dokazana primjenom DSC, XRPD i SEM analize, ne može se uzeti kao neosporiv dokaz o nastajanju inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju jer korištene tehnike ne mogu razlikovati stvarni inkluzijski kompleks od homogene disperzije amorfnih komponenata (Figueiras i sur., 2007). Zbog toga je interakcija između ZAL i odabranih ciklodekstrina u pripremljenim produktima dodatno karakterizirana primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije, nakon njihovog otapanja u D_2O. Označavanje ^{1}H-NMR spektara ZAL, βCD i PβCD izvršena je pomoću literaturnih podataka (Bharathi i sur., 2007; Djedaine i sur., 1990) te je potvrđena COSY spektroskopijom. Oznake protona u strukturi zaleplona i ispitivanih ciklodekstrina, kao i njihovi ^{1}H-NMR spektri pripravaka prikazani su na Slici 48 i 49.



Slika 48. ^{1}H-NMR spektri čistog ZAL, ZAL/βCD i ZAL/PβCD pripremljeni postupkom mljevenja u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu, otopljeni u D_2O i snimljeni pri 400 MHz i 300 K.

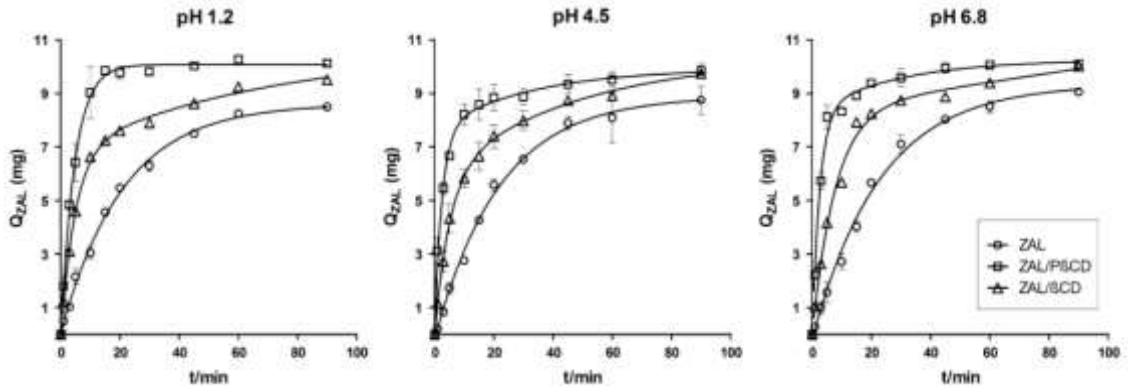
U ^{1}H-NMR spektrima, kod svih ispitivanih binarnih sustava, signali lijeka pokazuju pomak prema nižim frekvencijama ($\delta_{kompleks} - \delta_{slobodni} > 0$) u usporedbi sa signalima čistog lijeka. Kod uzorka ZAL/βCD, signali protona (H4 - H10) pokazuju kemijski pomak od 0,03 do 0,13 ppm, dok signali protona H1 i H3 pokazuju kemijski pomak od 0,07 ppm. U slučaju pripravka ZAL/PβCD, promjene u kemijskim pomacima manje su izražene (od 0,01 do 0,03 ppm). Uočeni pomak prema nižim frekvencijama može biti povezan s promjenama u lokalnoj polarnosti uslijed uklapanja lijeka u lipofilnu centralnu šupljinu ciklodekstrina ili uslijed učinka odsjenjenja, što je posljedica van der Waalsove interakcije između lijeka i lanaca ugljikohidrata (Liu i Guo, 2001; Djedaine i sur. 1990). Nadalje, u prisutnosti ZAL, protoni H3 i H5, koji se nalaze unutar središnje šupljine βCD, pokazuju povećane vrijednosti kemijskih pomaka signala tih protona u spektru (od -0,05 do -0,03 ppm) (Slika 49), dok ostali protoni βCD pokazuju samo manje promjene u rezonanciji. Opisani rezultat se može pripisati dijamagnetičkom anizotropnom efektu zbog inkluzije grupa bogatih π-elektronima u hidrofobnu centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina koja se vjerojatno dogodila s pristupačnije, odnosno šire, strane otvora molekule ciklodekstrina (Djedaine i sur., 1990).



Slika 49. ^{1}H-NMR spektri čistog βCD i ZAL/βCD pripremljenog postupkom mljevenja u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu, otopljenih u D_2O i snimljenih pri 400 MHz i 300 K.

^{1}H-NMR spektar PβCD karakterizira svega nekoliko širokih pikova zbog nedostatka simetričnosti u polimernoj strukturi tog derivata, a signali unutarnjih protona nisu jasno izraženi te se ne mogu koristiti za interpretaciju načina inkluzije lijeka. Kod oba uzorka pripremljena postupkom mljevenja, u ^{1}H-NMR spektrima se ne javljaju novi pikovi, što ukazuje da je molekula lijeka u brzoj izmjeni između slobodnog i kompleksnog oblika (Thi i sur., 2010). Iz toga proizlazi da nakon otapanja u vodi oba pripremljena uzorka (ZAL/βCD i ZAL/PβCD) lako prelaze u inkluzijske komplekse.

In vitro oslobađanje lijeka nakon mljevenja ZAL s βCD ili PβCD u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu praćeno je u umjetnom želučanom (pH 1,2), duodenalnom (pH 4,5) i crijevnom (pH 6,8) mediju bez enzima. Dobiveni profili oslobađanja prikazani su na Slici 50. Postotak lijeka koji se oslobodio nakon 15 minuta ispitivanja (Q_{15} min) korišten je kao indikator brzine oslobađanja lijeka, dok učinkovitost oslobađanja nakon 90 minuta (DE_{90}) korištena je za procjenu opsega procesa oslobađanja (Maestrelli i sur., 2011). Određeni parametri oslobađanja lijeka navedeni su u Tablici 17.



Slika 50. *In vitro* profili oslobađanja za čisti ZAL te njegove ekvimolarne produkte s βCD i PβCD pripremljene mljevenjem u vibracijskim mikromlinovima u umjetnom želučanom (pH 1,2), duodenalnom (pH 4,5) i crijevnom (pH 6,8) mediju pri 37 ºC (srednja vrijednost ± SD, *n*=6).

Dobiveni rezultati pokazuju da pH-vrijednost medija korištenog za ispitivanje ne utječe značajno na brzinu i doseg oslobađanja lijeka iz analiziranih uzoraka ($p>0,05$), a oslobađanje čistog zaleplona u sva tri medija nepotpuno je i sporo (Slika 50). Niske vrijednosti Q_{15} i DE_{90} za čisti ZAL (Tablica 17) ukazuju da bi početak djelovanja lijeka te njegova oralna bioraspoloživost mogli biti znatno ograničeni nedostatnom topljivošću i brzinom oslobađanja (Chavda i sur., 2010). Uzorci pripremljeni mljevenjem u visokoenergetskom vibracijskom mikromlinu imaju značajno veću brzinu i opseg oslobađanja lijeka (Tablica 17, $p<0,01$). To se može objasniti amorfizacijom lijeka uslijed interakcije s ispitanim ciklodekstrinima tijekom procesa mljevenja te brzom konverzijom u inkluzijski kompleks nakon otapanja, kao što su pokazala ^{1}H-NMR ispitivanja. Na svojstva oslobađanja lijeka iz pripremljenih uzorka značajan utjecaj ima vrsta korištenog ciklodekstrina (Slika 50). Rezultati dobiveni za uzorak s PβCD pokazuju značajno brže oslobađanje lijeka u odnosu na uzorak pripremljen s prirodnim βCD ($p<0,05$, Tablica 17). To se može objasniti višim stupnjem amorfizacije lijeka u tom uzorku, kao što je pokazala i DSC i XRPD analiza. U uzorku dobivenom mljevenjem zaleplona i βCD veći je udio kristaliničnog lijeka pa je i njegovo otapanje sporije. Osim toga, može se pretpostaviti da i topljivost korištenog derivata ciklodekstrina može utjecati na ukupnu brzinu otapanja kompleksa. Zbog toga se produkt pripremljen korištenjem izrazito topljivog PβCD otapa znatno brže u odnosu na onaj pripremljen korištenjem kristaliničnog βCD, koji je ograničene topljivosti u vodi (Mura i sur., 2002). S obzirom na navedene rezultate, može se zaključiti da bi produkt pripremljen mljevenjem ZAL s PβCD mogao imati velik potencijal za razvoj oblika s trenutnim

oslobađanjem lijeka, a sam postupak bi mogao imati značajan potencijal primjene u razvoju novih terapijski sustava baziranih na ciklodekstrinima, posebice kada se uzme u obzir njegova ekološka prikladnost.

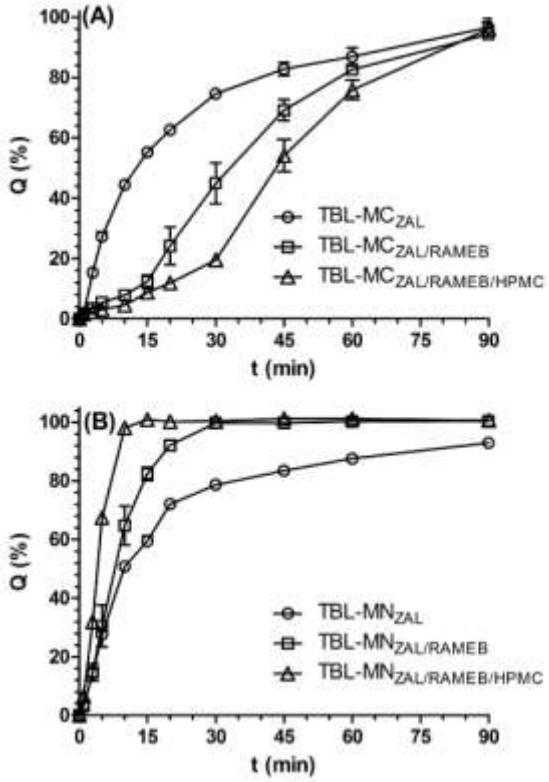
Tablica 17. Postotak oslobađanja lijeka nakon 15 minuta (Q_{15} min) i učinkovitost oslobađanja lijeka u 90 minuta (DE_{90}) za čisti ZAL te njegove ekvimolarne produkte s βCD i PβCD pripremljene mljevenjem u vibracijskim mikromlinovima u umjetnom želučanom (pH 1,2), duodenalnom (pH 4,5) i crijevnom (pH 6,8) mediju pri 37 ºC (srednja vrijednost ± SD, *n*=6).

Uzorak	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)
ZAL	45,7 ± 1,5	65,9 ± 0,6	42,7 ± 0,7	66,5 ± 1,7	40,3± 1,3	68,9 ± 0,9
ZAL/ βCD	72,4 ± 0,5	80,9 ± 0,4	76,6 ± 1,3	79,7 ± 3,1	79,2± 0,7	83,8 ± 0,4
ZAL/ PβCD	90,5 ± 1,7	95,3 ± 1,1	91,4 ± 1,9	90,75 ± 1,8	89,1± 2,1	94,0 ± 0,9

4.7. Potencijal primjene inkluzijskih kompleksa zaleplona u razvoju oralnog oblika s trenutnim oslobađanjem lijeka

Pripremljeni binarni i ternarni kompleksi zaleplona oblikovani su u tablete kako bi se vrednovao njihov potencijal u razvoju čvrstih ljekovitih oblika s trenutačnim oslobađanjem djelatne tvari. Za izradu tableta odabrani su binarni (ZAL/RAMEB) i ternarni (ZAL/RAMEB/HPMC) kompleks lijeka s RAMEB zbog njegove superiorne topljivosti u odnosu na ostale pripremljene komplekse. Tablete su izrađene postupkom direktnog komprimiranja, koristeći dva različita ekscipijensa, i to u vodi netopljivu mikrokristaliničnu celulozu (TBL-MC, Avicel®) te manitol, topljivi ekscipijens (TBL-ML, Mannogem®). Avicel® se često koristi kao pomoćna tvar u izradi čvrstih dozirnih oblika. Karakterizira ga dobra kompresibilnost, visoki potencijal razrjeđenja, a oblikovane tablete su niske rastrošljivosti. Omogućava izradu iznimno čvrstih i stabilnih tableta koje se brzo raspadaju, a spomenuta ga svojstva čine pogodnim za direktno komprimiranje (Rowe i sur., 2009). S druge strane, manitol je dobro topljiv u vodi, nije higroskopan, izrazito je stabilan i inertan. Radi

svojih karakteristika, idealan je za poboljšanje stabilnosti i otapanja gotovih formulacija, posebice onih koje sadrže djelatnu tvar niske topljivosti (Rowe i sur., 2009; Camarco i sur., 2006). Profil *in vitro* oslobađanja lijeka iz pripremljenih tableta u umjetnom želučanom mediju (pH 1,2) prikazan je na Slici 51, a parametri oslobađanja lijeka u Tablici 18.



Slika 51. Profil *in vitro* oslobađanja lijeka iz pripremljenih tableta u umjetnom želučanom mediju (pH 1,2) bez enzima pri 37 ºC (srednja vrijednost ± SD; *n*=6).

Tablica 18. Parametri oslobađanja (Q_{15min} i DE_{90min}) i vrijeme raspadljivosti tableta pripremljenih s mikrokristaliničnom celulozom (MC) i manitolom (MN) u umjetnom želučanom mediju (pH 1,2) bez enzima (srednja vrijednost ± SD, n=6).

	MC tablete			MN tablete		
	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)	T(min)	Q_{15min}(%)	DE_{90min}(%)	T(min)
ZAL	55,2 ± 1,7	76,8 ± 2,6	1,5 ± 0,3	59,4 ± 3,0	81,8 ± 0,9	0,2 ± 0,1
ZAL/RAMEB	12,3 ± 3,8	61,1 ± 2,0	13,5 ± 0,5	82,3 ± 3,9	89,1 ± 2,0	2,9 ± 0,7
ZAL/RAMEB/HPMC	8,7 ± 0,3	50,5 ± 1,9	27,4 ± 0,4	100,8 ± 1,2	98,2 ± 2,2	4,0 ± 1,2

Oslobađanje čistog zaleplona iz pripremljenih tableta je sporo i nepotpuno te se za 90 minuta oslobodi oko 90% doze lijeka. Pri tome vrsta ekscipijensa korištena za formulaciju tableta značajno mijenja parametre oslobađanja lijeka (Tablica 18, $p<0,05$). Tablete oblikovane korištenjem netopljive mikrokristalinične celuloze, u kojima je lijek uklopljen kao binarni ili ternarni kompleks s RAMEB, karakterizira značajno sporije oslobađanje lijeka ($p<0,01$) u usporedbi s tabletama u kojima je lijek u čistom obliku, a sam proces karakterizira dvofazna kinetika. Primarno, oslobađanje zaleplona iz obje formulacije je sporo te slijedi kinetiku nultog reda, ($r^2 > 0,998$; k_{15min} = 0,76 ± 0,05 za TBL-$MC_{ZAL/RAMEB}$ te k_{30min} = 0,61 ± 0,03 mg min^{-1} za TBL-$MC_{ZAL/RAMEB/HPMC}$), a zatim slijedi faza bržeg oslobađanja lijeka koje slijedi kinetiku prvog reda reda ($r^2<0,999$; $k_{15\text{-}90min}$ = (3,8 ± 0,5)×10^{-2} min^{-1} za TBL-$MC_{ZAL/RAMEB}$ te $k_{30\text{-}90min}$ = (4,4 ± 0,1)×10^{-2} min^{-1} za TBL-$MC_{ZAL/RAMEB/HPMC}$). Takav rezultat je neočekivan i suprotan svojstvima otapanja samih binarnih i ternarnih kompleksa (Slika 43, Tablica 15), a može se pripisati utjecaju binarnih i ternarnih kompleksa na raspadljivost tableta (Tablica 18). Čini se da HPMC u ternarnom kompleksu, kao i sam RAMEB, djeluje kao vezivo unutar TBL-MC te na taj način produžava vrijeme njezinog raspadanja. Pri tome je površina koja je u kontaktu s medijem za oslobađanje ograničena što rezultira sporijim oslobađanjem lijeka kinetikom nultog reda. Nakon 15 minuta za TBL-$MC_{ZAL/RAMEB}$, a 30 minuta za TBL-$MC_{ZAL/RAMEB/HPMC}$ dolazi do raspadanja tablete, što omogućava brže oslobađanje lijeka, u skladu s profilima oslobađanja koji su određeni za same komplekse. Iako binarni i ternarni kompleksi zaleplona pokazuju sličan učinak na raspadljivost tableta oblikovanih korištenjem manitola, oslobađanje lijeka iz te formulacije se odvija konstantnom

brzinom, vjerojatno uslijed visoke topljivosti samog ekscipijensa. Oslobađanje lijeka iz ternarnih kompleksa ZAL/RAMEB/HPMC s manitolom je kompletno nakon samo 5 minuta, što potvrđuje prikladnost takvog ternarnog kompleksa za razvoj čvrstog oralnog oblika s trenutnim oslobađanjem lijeka.

4.8. Eudragitne mikrosfere s odgođenim oslobađanjem lijeka

4.8.1. Optimizacija postupka pripreme mikrosfera

Eudragitne mikrosfere pripremljene su postupkom sušenja raspršivanjem. Ta tehnika se naširoko primjenjuje u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, za pripremu mikrosfera za oralnu, pulmonalnu i topikalnu primjenu (Cal i Sollohub, 2010; Sollohub i Cal, 2010; Gharsallaoui i sur., 2007). Za razliku od konvencionalnih postupaka pripreme mikrosfera odjeljivanjem faza emulzije i koacervacijom, sušenje raspršivanjem nudi mnogobrojne prednosti. Priprema mikrosfera odvija se u jednom, kontinuiranom postupku te ne zahtijeva sekundarno sušenje pripremljenog produkta (Cal i Sollohub, 2010). Taj postupak je reproducibilan, jednostavan za uvećanje na industrijske razmjere proizvodnje te omogućuje pripremu produkta s relativno uskom raspodjelom veličina čestica. Nadalje, primjenom sušenja raspršivanjem moguće je izbjeći uporabu organskih otapala, čije je uklanjanje iz gotovog produkta vrlo kompliciranо i skupo. Osim toga, organska otapala su izrazito zapaljiva i često toksična, zbog čega se preferira priprema mikrosfera iz vodenog medija, što je ekonomično i ekološki prihvatljivo (Rizi i sur., 2011a). Nasuprot tome, priprema mikrosfera odjeljivanjem faza emulzije zahtijeva uporabu većih količina organskih otapala koja često zaostaju u gotovom produktu (Thomasin i sur., 1996), postupak uvećanja tog postupka na industrijske razmjere proizvodnje je izrazito kompleksan, dok je koacervacijom teško pripremiti čestice relativno male veličine (Freitas i sur., 2005). Do sada su istraživane različite formulacijske strategije za pripremu mikrosfera Eudragita® s pH ovisnim oslobađanjem lijeka primjenom postupka sušenja raspršivanjem, no još nije razvijen optimalan postupak. Veličina pripremljenih mikrosfera bila je izrazito varijabilna, uklapanje lijeka u polimerni matriks bilo je neuspješno te je dolazilo do neželjenog oslobađanja lijeka iz pripremljenih mikrosfera pri niskim pH-vrijednostima medija za oslobađanje (Palmieri i sur., 2002; Moretti i sur., 2001).

Poznato je da morfološka svojstva i profil oslobađanja lijeka kod mikrosfera pripremljenih postupkom sušenja raspršivanjem ovise o sastavu otopine za raspršivanje kao i o parametrima samog postupka sušenja (Rassu i sur., 2008). Pri tome se često optimiraju varijable kao što su vrsta i koncentracija polimera, udio lijeka u otopini za raspršivanje (Raffin i sur., 2008; Rattes i Oliveira, 2007), brzina rada pumpe, intenzitet rada aspiratora te temperatura sušenja, s ciljem pripreme mikrosfera odgovarajućih svojstava (Nandiyanto i Okuyama, 2011; Esposito i sur., 2000). No vrlo se rijetko kao parametar analizira vrsta otapala koja se koristi za pripremu otopine za raspršivanje, iako i otapalo zasigurno utječe na svojstva pripremljenih mikrosfera.

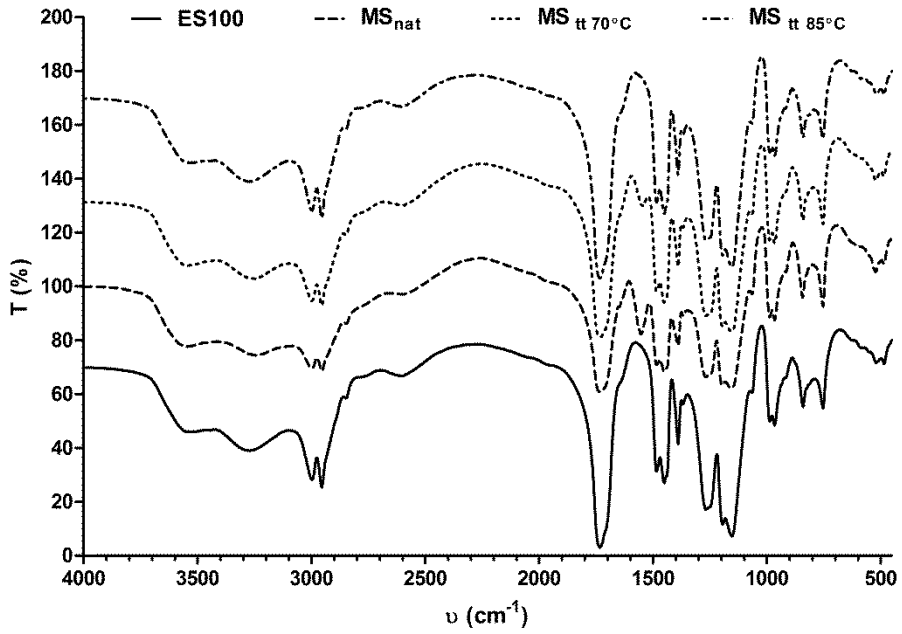
Eudragit S100 (E_{S100}) je kopolimer metakrilne kiseline i metilmetakrilata u stehiometrijskom omjeru 1:2. U vodi je topljiv pri pH-vrijednostima većim od 7 pa se često koristi u razvoju enteričkih mikrosfera s kontroliranim oslobađanjem u tankom crijevu i kolonu (Maroni i sur., 2013b; Alhnan i sur., 2011; Esposito i sur., 2002). E_{S100} se otapa u metanolu, etanolu, smjesi izopropilnog alkohola i acetona koja sadrži najviše 3% vode te 1 M vodenoj otopini NaOH, a netopljiv je u etilacetatu, metilenkloridu i vodi. Temeljem tih parametara, odabrana su dva različita sustava otapala za pripremu otopine za raspršivanje. U prvom, kao otapalo za pripremu otopine za raspršivanje korišten je etanol, a u drugom 0,96% vodena otopina amonijevog hidrogenkarbonata. Ovi sustavi otapala su odabrani imajući na umu njihov prihvatljiv toksikološki profil. Koncentracija E_{S100} u otopinama za raspršivanje iznosila je 2% (*m/V*), jer je ranijim istraživanjima pokazano da pri višim koncentracijama polimera dolazi do nastanka mikrosfera s izrazito kohezivnim svojstvima zbog grube površine čestica. Uporaba nižih koncentracija polimera rezultira neadekvatnim uklapanjem lijeka u polimerni matriks mikrosfera, zbog čega dolazi do naglog oslobađanja lijeka, čak i u kiselom mediju (Rizi i sur., 2011a). U svim pripremljenim mikrosferama, maseni omjer polimera i lijeka iznosio je 10:1.

Rizi i sur. (2011) su pokazali da kod izrade Eudragitnih mikrosfera korištenje čistog etanola kao otapala za izradu otopine za raspršivanje rezultira mikrosferama s izrazito naboranom površinom, koje pokazuju izrazito loša svojstva tečenja te su karakterizirane neželjenim oslobađanjem lijeka pri nižim pH-vrijednostima. Čini se da je dodatak vode nužan za pravilno oblikovanje eudragitnih mikrosfera tijekom procesa sušenja raspršivanjem. Zbog toga je bilo najprije potrebno odrediti maksimalnu količinu vode koja se može dodati u etanolnu otopinu E_{S100}, a da pri tome ne dođe do taloženja polimera. U tu je svrhu provedena titracija 2% (*m/V*) etanolne otopine E_{S100} vodom, a organoleptički se pratila pojava zamućenja

koja indicira netopljivost polimera u sustavu otapala. Rezultati su pokazali da dodatkom do 37,5% (*V/V*) vode, etanolna otopina E_{S100} ostaje bistra, dok pri 39,4% (*V/V*) otopina postaje opalescentna, a nakon dodatka 41,2% (*V/V*) vode dolazi do taloženja E_{S100}. Budući da su Rizi i sur. (2011) pokazali da raspršivanjem vodeno-etanolne otopine Eudragita koja sadrži veći udio vode dolazi do formiranja pravilnijih mikrosfera, kao otapalo za pripremu otopine za raspršivanje odabrali smo sustav koji je sadržavao 62% (*V/V*) etanola i 38% (V/V) vode. Takav medij osigurao je zadovoljavajuću topljivost ZAL.

Zbog prisutnosti karboksilnih skupina u strukturi, E_{S100} je praktički netopljiv u vodi i u vodenim medijima niske pH-vrijednosti. Jedan od načina za povećanje topljivost E_{S100} u vodi je ionizacija karboksilnih skupina u strukturi polimera. Alkalne otopine mogu osigurati dobru topljivost E_{S100} pa se tako mogu pripraviti otopine pogodne za raspršivanje. U tu svrhu se već ranije koristio natrijev hidroksid, što je omogućilo pripremu odgovarajuće otopine za raspršivanje te pripremu enteričkih mikrosfera postupkom sušenja raspršivanjem (Raffin i sur., 2008; Colome i sur., 2007; Raffin i sur., 2007). No, natrijev hidroksid koji zaostane u mikrosferama se brzo otapa u kiselom mediju, što pridonosi neželjenom oslobađanju lijeka pri niskim pH-vrijednostima. Taj problem bi se mogao riješiti zamjenom natrijevog hidroksida s amonijevim hidroksidom ili amonijevim hidrogenkarbonatom, koji se razgrađuju pri povišenoj temperaturi od 60-70 °C pa se na taj način mogu ukloniti iz pripremljenih mikrosfera. U tu je svrhu E_{S100} najprije dispergiran u 0,96% vodenoj otopini amonijevog hidrogenkarbonata. Pri tome dolazi do neutralizacije karboksilnih skupina u strukturi polimera, a hidrogenkarbonati koji zaostaju nakon reakcije uklanjaju se iz reakcijske smjese kao ugljikov dioksid, zagrijavanjem na 50 °C tijekom 15 minuta. U tom vremenu dolazi do potpunog otapanja polimera u vodenom mediju, a otopina je postala transparentna i više se nije pjenila, što pokazuje da je ugljikov dioksid u potpunosti uklonjen iz reakcijske smjese. No, u takvom mediju nije bilo moguće otopiti lijek zbog niske topljivost ZAL u vodi. Zbog toga je bilo nužno dodati određenu količinu etanola kako bi se omogućilo otapanje lijeka u otopini za raspršivanje. Preliminarni pokusi su pokazali da je za tu svrhu nužno dodati 30% (*V/V*) etanola, s tim da je lijek najprije bio otopljen u koncentriranom etanolu, u kojem se dobro otapa, te je u tom obliku dodan u alkalnu otopinu polimera. Sušenje pripremljene otopine provedeno je na laboratorijskom uređaju za sušenje raspršivanjem, uz temperaturu ulaznog zraka od 100 °C te temperaturu izlaznog zraka od 60 °C. Kako bi se provjerilo da li ti uvjeti osiguravaju potpuno uklanjanje amonijeve soli E_{S100} iz pripremljenih mikrosfera, pripremljene su mikrosfere načinjene samo od polimera, slijedeći ranije opisanu proceduru,

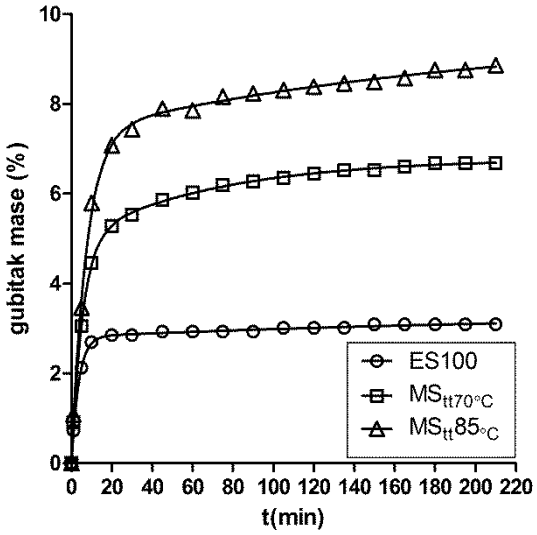
ali izostavljajući ZAL iz propisa, te su analizirane primjenom FTIR spektroskopije i termičke analize.



Slika 52. FTIR spektri E_{S100} (ES100), nativnih eudragitnih mikrosfera bez lijeka, pripremljenih postupkom sušenja raspršivanjem (MS_{nat}), te mikrosfera bez lijeka, termički obrađenih na 70 °C ($MS_{tt70°C}$) i 85 °C ($MS_{tt85°C}$) tijekom 3 sata.

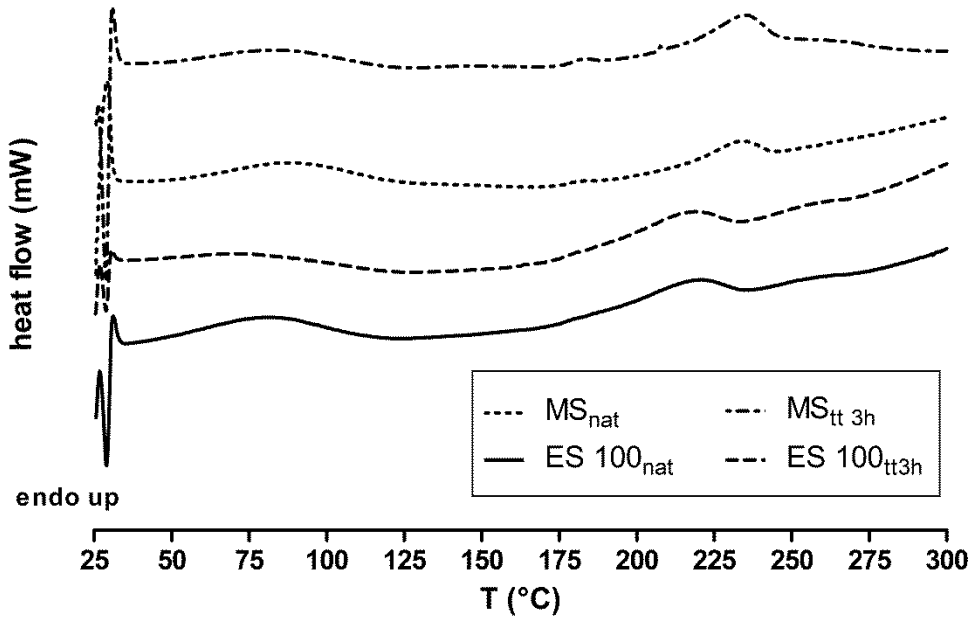
FTIR spektri E_{S100} i pripremljenih mikrosfera prikazani su na Slici 52. E_{S100} pokazuje izraženu apsorpcijsku vrpcu pri 1705 cm^{-1} koja odgovara vibracijama istezanja C=O veze. Apsorpcijske vrpce u području od 1150-1160, 1190-1195 i 1250-1275 cm^{-1} odgovaraju vibracijama savijanja esterske skupine. Široka apsorpcijska vrpca od 2500 do 3500 cm^{-1}, koja odgovara vibracijama istezanja OH veze, preklapa se s apsorpcijskom vrpcom koja odgovara vibracijama C-H veza, a koje se javljaju u području od 2900 do 3000 cm^{-1}. Ostale apsorpcijske vrpce koje odgovaraju vibracijama savijanja C-H veze javljaju se pri 1385-1390, 1450 i 1485 cm^{-1}. Kod nativnih mikrosfera, koje su pripremljene raspršivanjem otopine E_{S100} iz alkalnog, vodeno-alkoholnog medija, uočava se nova vibracijska vrpca pri 1550 cm^{-1}, koja odgovara vibracijama istezanja N-H veze, a upućuje na prisutnost amonijeve soli E_{S100} u mikrosferama. Iako je sušenje provedeno pri temperaturi izlaznog zraka od 60 °C, čini se da vrijeme izloženosti mikrosfera tim uvjetima nije bilo dostatno za potpuno uklanjanje termolabilne amonijeve soli iz mikrosfera te da je nužan dodatni termički tretman već pripremljenih mikrosfera, kako bi se u potpunosti uklonio amonijak iz polimernog matriksa i

time regenerirao E_{S100} u svom kiselom, netopljivom obliku. U tu su svrhu mikrosfere tretirane termički na 70 °C tijekom 3 sata, sukladno rezultatima Alhnana i sur. (2011). Pri tome se pratila promjena mase uzorka tijekom termičkog tretmana, a dobiveni profili su prikazani na Slici 53.



Slika 53. Profili promjene mase u vremenu E_{S100} i mikrosfera pripremljenih raspršivanjem iz alkalne vodeno-etanolne otopine tijekom termičke obrade pri različitim uvjetima (70 i 85 °C).

Kod termičke obrade E_{S100} pri 70 °C najprije dolazi do brzog gubitka mase od 2,85% tijekom prvih 20 minuta, vjerojatno uslijed isparavanja adsorbirane vlage iz uzorka. Daljnjom termičkom obradom ne dolazi do značajnije promjene mase (Slika 53). Kod mikrosfera pripremljenih sušenjem raspršivanjem alkalne vodeno-etanolne otopine E_{S100}, u prvih 30 minuta dolazi do značajnijeg gubitka mase od 5,30%, nakon čega slijedi faza sporije promjene mase do nekih 140 minuta, a od 180 do 210 minuta promjena mase je neznatna. Ukupni gubitak mase tijekom termičkog tretmana na 85 °C iznosio je 6,52%. No FTIR analiza tako tretiranog uzorka je pokazala da time nije u potpunosti uklonjena topljiva amonijeva sol iz mikrosfera (Slika 52), jer je u FTIR još uvijek prisutan pik pri 1550 cm^{-1}, no njegov intenzitet je znatno smanjen. Stoga, kako bi se pronašli optimalni uvjeti termičkog tretmana, provedena je DSC analiza pripremljenih mikrosfera, a snimljeni termogrami su prikazani na Slici 54.



Slika 54. DSC termogrami netretiranog E_{S100} ($ES100_{nat}$); polimera termički tretiranog 3h na 70 °C; te nativnih mikrosfera bez lijeka pripremljenih raspršivanjem alkalne vodeno-etanolne otopine polimera (MS_{nat}) i mikrosfera termički tretiranih 3h na 70 °C.

Na DSC termogramu E_{S100} vidljiv je široki endotermi pik u području od 45 do 120 °C koji odgovara isparavanju adsorbirane vlage (ΔH=67,06 Jg^{-1}), a staklasti prijelaz nije uočen. Prema podacima proizvođača, temperatura staklastog prijelaza E_{S100} iznosi 130±5 °C, te je moguće da je taj proces bio prekriven pikom koji odgovara isparavanju adsorbirane vlage. Kod uzorka polimera koji je prethodno sušen 3 sata pri 70 °C, intenzitet tog pika je nešto smanjen (ΔH=75,39 Jg^{-1}), zbog nižeg sadržaja vlage u uzorku. Prazne mikrosfere pripremljene sušenjem raspršivanjem iz alkalnog vodeno-etanolnog medija pokazuju izraženi široki pik u području temperatura od 50-120 °C, koji odgovara isparavanju adsorbirane vlage te termičkoj razgradnji amonijeve soli E_{S100} (ΔH=93,30 Jg^{-1}). S obzirom da taj pik pokazuje maksimum pri 85,18 °C, odlučeno je da se mikrosfere nakon izrade termički tretiraju pri 85 °C. Uzorak mikrosfera bez lijeka, tretiran pri toj temperaturi tijekom 3 sata, pokazuje znatno smanjen intenzitet pika u tom području temperatura, uz značajno smanjenu vrijednost entalpije (ΔH=39,39 Jg^{-1}), iz čega se može zaključiti o uspješnijoj termičkoj razgradnji topljive amonijeve soli E_{S100} pri tim uvjetima. Također je pri tim uvjetima inicijalni gubitak mase mikrosfera jače izražen u odnosu na onaj opažen tijekom termičkog tretmana pri 70 °C

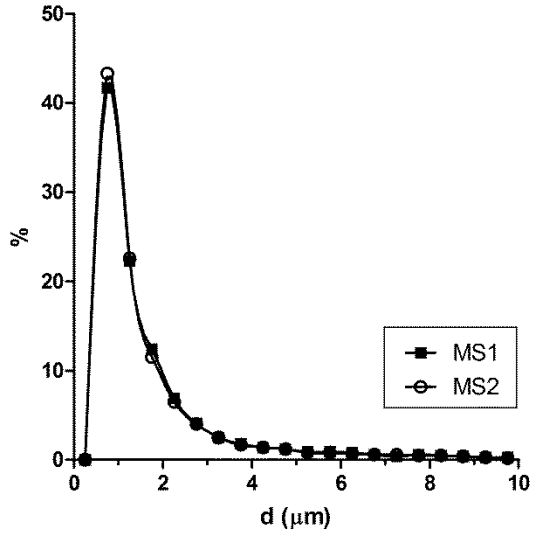
(Slika 53) te je tijekom prvih 30 minuta došlo do gubitka 6,68% mase, a ukupni gubitak mase nakon termičkog tretmana je iznosio 7,97%. To govori o uspješnijem uklanjanju termolabilne amonijeve soli iz mikrosfera termičkim tretmanom pri višoj temperaturi. To je potvrdila i FTIR analiza (Slika 52), jer u spektru tako tretiranog uzorka, pik karakterističan za vibracije istezanja N-H veze više nije vidljiv, što znači da je došlo do potpune razgradnje termolabilne, u vodi topljive amonijeve soli E_{S100}. Stoga su sve ostale mikrosfere pripremljene raspršivanjem iz alkalne vodeno-etanolne otopine termički tretirane na 85 °C tijekom 210 minuta.

4.8.2. Tehnološka svojstva mikrosfera

Sastav i osnovna svojstva pripremljenih mikrosfera prikazan je u Tablici 19. Postupak pripreme mikrosfera raspršivanjem iz etanolno-vodenog medija (MS_1) rezultirao je relativno visokim prinosom, dok je pripremom iz alkalnog vodeno-etanolnog medija (MS_2) ta vrijednost znatno niža (Tabica 19). MS_2 mikrosfere su se jače hvatale za staklene stijenke uređaja za raspršivanje, pa ih je bilo teže kvantitativno sakupiti. U oba slučaja, uklapanje je lijeka bilo uspješno te je iznosilo više od 90%, a pripremljene mikrosfere nisu se značajno razlikovale ni s obzirom na srednji promjer čestica (Tablica 19). Raspodjela veličina čestica slijedila je log-normalnu razdiobu koja je karakteristična za praške pripremljene postupkom sušenja raspršivanjem. Naime, uređaj koji je korišten u pripremi mikrosfera nije bio opremljen hvatačem vrlo sitnih čestica koje su bile izgubljene kroz ispuh. Pri tome, vrsta medija koji je korišten za pripremu otopine za raspršivanje nije utjecala na raspodjelu veličina čestica u pripremljenim uzorcima (Slika 55). S obzirom na vrijednosti indeksa kompresibilnosti i Hauserovog indeksa (Tablica 19), može se zaključiti kako mikrosfere MS_1 i MS_2 imaju usporediva svojstva tečenja, koja su u prihvatljivim granicama. Čini se da vrsta otapala korištena u pripremi otopine za raspršivanje ne utječe značajno na svojstva tečenja prašaka.

Tablica 19. Sastav i tehnološki značajna svojstva pripremljenih mikrosfera.

Uzorak	Otapalo	Sastav	Lijek	Prinos (%)	Sadržaj lijeka (%)	Uklapanje lijeka (%)	Srednji promjer mikrosfera (μm)	Indeks kompresibilnosti	Hauserov indeks
MS_1	etanol:voda 62:38	E_{S100}	ZAL	75,1	8,68 ± 0,05	91,07 ± 0,53	1,71 ± 1,52	19,05	1,24
MS_2	vodena otopina NH_4HCO_3/etanol 70:30	E_{S100}		56,6	8,28 ± 0,05	95,47 ± 0,51	1,76 ± 1,83	19,23	1,24
MS_3		E_{S100}:E_{NE30D} 80:20		62,8	8,64 ± 0,17	104,36 ± 0,25	1,64 ± 1,45	18,18	1,22
MS_4		E_{S100}:E_{NE30D} 70:30		63,4	9,33 ± 0,22	107,48 ± 1,48	1,68 ± 1,57	20,83	1,26
MS_5		E_{S100}:E_{NE30D} 60:40		66,0	9,38 ± 0,20	106,83 ± 1,05	1,68 ± 1,52	21,67	1,28
MS_6		E_{S100}:E_{NE30D} 50:50		63,1	9,22 ± 0,04	98,09 ± 1,18	1,72 ± 1,61	21,74	1,28
MS_7		E_{S100}+10%GMS		57,3	8,17 ± 0,10	98,09 ± 1,18	1,67 ± 1,58	22,73	1,29
MS_8		E_{S100}+10%GMS	75% ZAL 25% ZAL/RAMEB	57,8	7,39 ± 0,03	96,93 ± 0,39	1,69 ± 1,62	21,74	1,28
MS_9		E_{S100}+10%GMS	50% ZAL 50% ZAL/RAMEB	59,4	6,86 ± 0,05	96,95 ± 0,74	1,77 ± 1,75	22,22	1,29
MS_{10}		E_{S100}+10%GMS	100% ZAL/RAMEB	53,8	6,12 ± 0,04	99,60 ± 0,64	1,69 ± 1,60	22,00	1,28

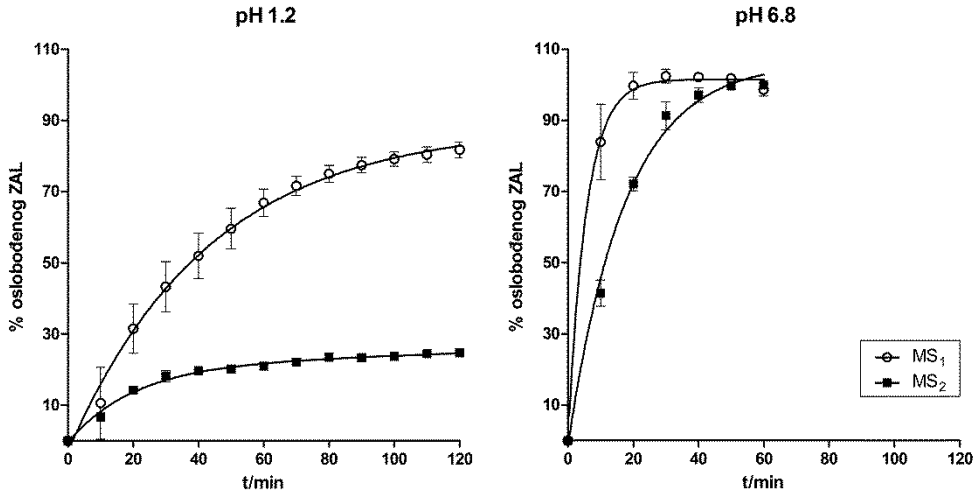


Slika 55. Raspodjela veličina čestica za Eudragitne mikrosfere pripremljene raspršivanjem etanolno-vodene (MS_1) i alkalne vodeno-etanolne (MS_2) otopine polimera i lijeka.

In vitro ispitivanje oslobađanja lijeka iz pripremljenih mikrosfera provedeno je u umjetnom želučanom mediju (pH 1,2) te umjetnom crijevnom mediju (pH 6,8). S obzirom na svojstva topljivosti E_{S100} u vodenim medijima, očekivalo se da će u kiselom mediju, gdje je E_{S100} netopljiv, oslobađanje lijeka biti neznatno, dok bi ono trebalo biti relativno brzo u mediju s pH-vrijednošću 6,8, koji je blizu vrijednosti kod koje je polimer korišten za oblikovanje mikrosfera u potpunosti topljiv (pH>7). Iako je pH vrijednost umjetnog crijevnog medija nešto niža od one kod koje se polimer u potpunosti otapa, uslijed izraženog bubrenja i relaksacije polimernih lanaca E_{S100} može se očekivati relativno brzo oslobađanje lijeka pri pH 6,8 (Alhnan i sur., 2011). Profili oslobađanja ZAL iz mikrosfera MS_1 i MS_2 u navedenim medijima prikazani su na Slici 56.

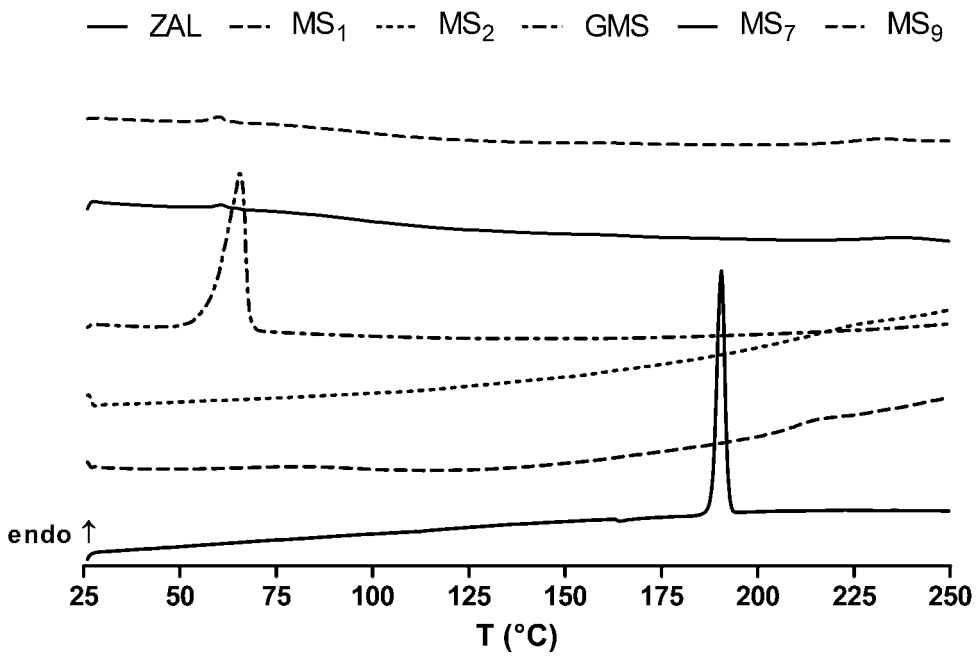
Suprotno očekivanjima, kod oba tipa mikrosfera došlo je do značajnog oslobađanja lijeka i u kiselom mediju (Slika 56). Pri tome je kod mikrosfera MS_1 oslobođeno 81,7% uklopljene doze lijeka, dok su mikrosfere MS_2, pripremljene raspršivanjem iz alkalne vodeno-etanolne otopine pokazale bolji protektivni učinak, te je nakon 2 sata oslobođeno oko 24,7% uklopljene doze lijeka. Oslobađanje lijeka u umjetnom crijevnom soku (pH 6,8) bilo je značajno brže, a odvijalo se kinetikom prvog reda (r^2>0,98). Pri tome je oslobađanje ZAL iz MS_1, pripremljenih raspršivanjem iz etanolno vodenog medija, bilo dvostruko brže nego kod mikrosfera MS_2 (k_{MS1}=0,201±0,002 min^{-1} i k_{MS2}=0,094±0,009 min^{-1}, p<0,05). To pokazuje da odabir otapala za pripremu otopine za raspršivanje ima značajan utjecaj na svojstva

pripremljenih mikrosfera. Kako bi se omogućilo bolje razumijevanje dobivenih rezultata, provedena je detaljna karakterizacija pripremljenih mikrosfera u čvrstom stanju, primjenom DSC, XRPD i SEM analize.

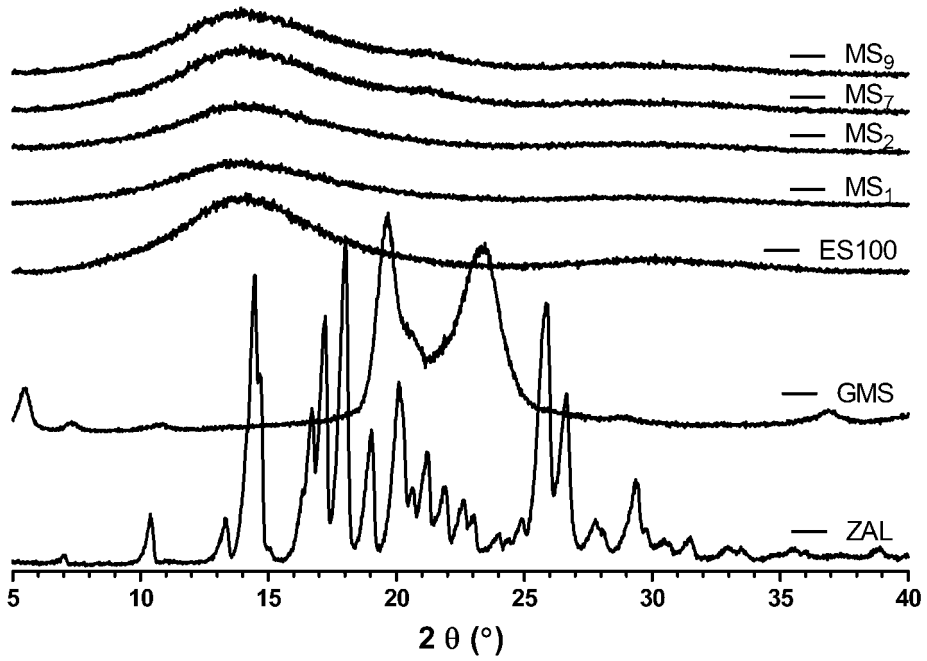


Slika 56. *In vitro* profili oslobađanja ZAL iz mikrosfera MS_1 i MS_2 u umjetnom želučanom (pH 1,2) i crijevnom soku (pH 6,8), pri 37 °C. Sastav mikrosfera prikazan je u Tablici 19.

DSC termogrami mikrosfera MS_1 i MS_2 (Slika 57) ne pokazuju značajnije termičke događaje u rasponu temperatura od 25 do 250 °C, a pik taljenja ZAL pri 190,58 °C nije vidljiv. Taj rezultat upućuje na uspješno uklapanje lijeka u polimerni matriks mikrosfera te njegovu amorfizaciju tijekom procesa sušenja raspršivanjem (Matsumoto i sur., 2008), no može se pripisati i otapanju lijeka u polimeru tijekom DSC analize, pri temperaturama višim od temperature staklastog prijelaza E_{S100} (Bragagni i sur., 2013). Kako bi se to detaljnije proučilo, provedena je XRPD analiza svih polaznih tvari i pripremljenih mikrosfera (Slika 58).

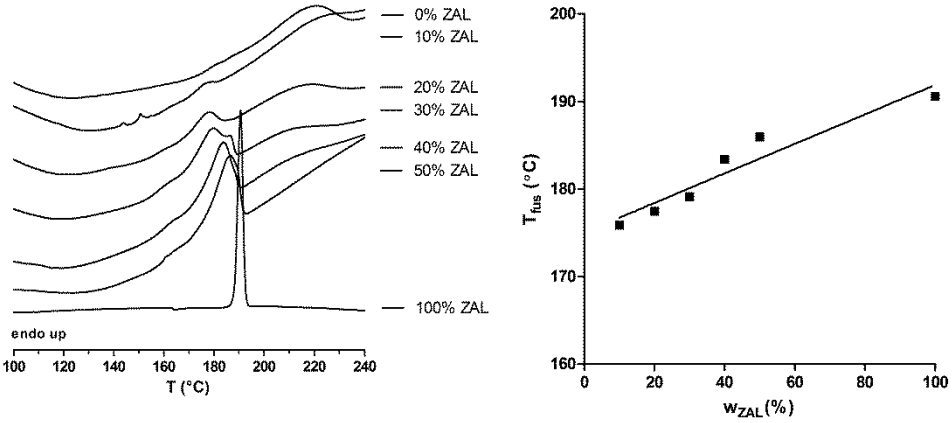


Slika 57. DSC termogrami ZAL, glicerolmonostearata (GMS) i pripremljenih mikrosfera. Sastav mikrosfera prikazan je u Tablici 19.



Slika 58. XRPD spektri ZAL, glicerolmonostearata (GSM), E_{S100} i pripremljenih mikrosfera. Sastav mikrosfera prikazan je u Tablici 19.

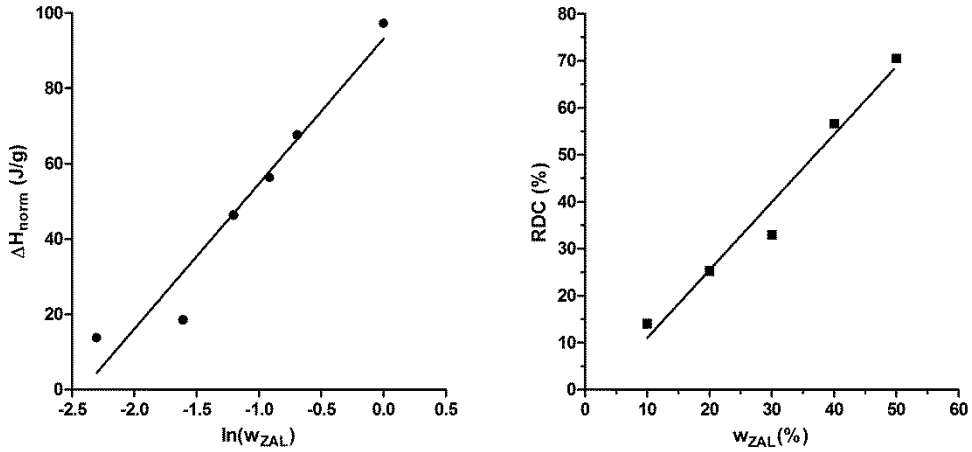
XRPD spektar ZAL pokazuje mnogobrojne, oštre pikove, koji su karakteristični za kristaliničnu tvar. Upravo pikovi pri 10,4°, 14,5° i 20,1° ukazuju na prisutnost kristaliničnog polimorfa 1 zaleplona, dobivenog taloženjem lijeka iz nevodenog medija (Aslam i sur., 2005). XRPD spektar E_{S100} je u potpunosti difuzan, ukazujući na njegovu amorfnu strukturu. XRPD spektri mikrosfera MS_1 i MS_2 su također tipični za amorfne tvari, a karakteristični pikovi ZAL nisu izraženi. Taj rezultat pokazuje da je prilikom izrade mikrosfera došlo do uspješnog uklapanja lijeka u polimerni matriks mikrosfera, a da je uklopljeni lijek u potpunosti amorfan. Kako bi se detaljnije proučio proces amorfizacije ZAL u matriksu E_{S100}, provedena je DSC analiza fizičkih smjesa ZAL i E_{S100}, koje su sadržavale od 10 do 50% lijeka. Dobiveni rezultati, prikazani na Slici 59, poslužili su kao temelj za analizu svojstava miješanja polimera i lijeka te za studiju njihove kompatibilnosti. U DSC termogramima fizičkih smjesa ZAL i E_{S100} nisu uočeni novi pikovi, a pik taljenja lijeka u fizičkim smjesama javlja se pri nižim temperaturama (175,88 – 183,25 °C) nego kod čistog ZAL (190,15 °C), te se smanjuje kao funkcija udjela lijeka u smjesi s polimerom (Slika 59). Taj rezultat je u skladu s podacima dostupnim u literaturi (Bragagni i sur., 2013; Da Silva i sur., 2009; Bikiaris i sur., 2005), a može se pripisati prisutnosti polimera u uzorku. Vrlo vjerojatno, tijekom DSC analize dolazi do otapanja dijela lijeka u polimeru, budući da polimer ima nižu temperaturu staklastog prijelaza (130 °C) od temperature taljenja lijeka (190 °C). To pridonosi sniženju temperature taljenja lijeka u smjesi o odnosu na onu čistog lijeka.



Slika 59. DSC termogrami fizičkih smjesa lijeka i polimera u različitim masenim omjerima (lijevo) te ovisnost temperature taljenja ZAL o udjelu lijeka u smjesi sa E_{S100} (desno).

Osim toga, termička ispitivanja nisu ukazala na moguće inkompatibilnosti između lijeka i polimera korištenog za pripremu mikrosfera. Kako bi se procijenila svojstva miješanja lijeka i polimera, pratila se normalizirana entalpija taljenja lijeka u uzorku (ΔH_{norm}), izračunata iz entalpije taljenja lijeka u smjesi ZAL i E_{S100} (ΔH_{obs}), normiranjem sadržaja lijeka u uzorku. Prikazom ovisnosti (ΔH_{norm}) o prirodnom logaritmu udjela lijeka u smjesi (lnw_{ZAL}), konstruiran je pravac (r^2=0,9542) (Slika 60). Matematički modeli opisani u literaturi pokazuju da se u slučaju linearne ovisnosti, nagib i vrijednost odsječaka na ordinati i apscisi mogu koristiti kao pokazatelji svojstava miješanja lijeka i polimera (Bragagni i sur., 2013; Da Silva i sur., 2009). Pri tome, odsječak pravca na ordinati predstavlja stanje nulte entalpije, a odgovarajući sadržaj lijeka (tj. udio lijeka u smjesi) koja predstavlja maksimalnu količinu lijeka koja se miješa tj. otapa u polimeru. Za ispitivane sustave, odsječak na ordinati iznosi -2,42, iz čega proizlazi da maksimalna količina lijeka koja se miješa s polimerom iznosi svega 0,09%. To je značajno manja vrijednost od sadržaja lijeka u mikrosferama koja je iznosila od 8,17 do 9,38% (Tablica 19). Iz toga proizlazi da se amorfizacija lijeka u uzorku ne može objasniti dobrim svojstvima miješanja lijeka i polimera. No, kada se promatra promjena relativne kristaliničnosti lijeka, određena primjenom DSC analize, u ovisnosti o sadržaju lijeka u smjesi (Slika 60), može se vidjeti da dolazi do značajne amorfizacije ZAL tijekom termičkog tretmana, naročito kada je sadržaj lijeka u uzorku relativno nizak. Tako uslijed termičkog tretmana tijekom DSC analize uzorka koji sadrži 50% lijeka dolazi do amorfizacije

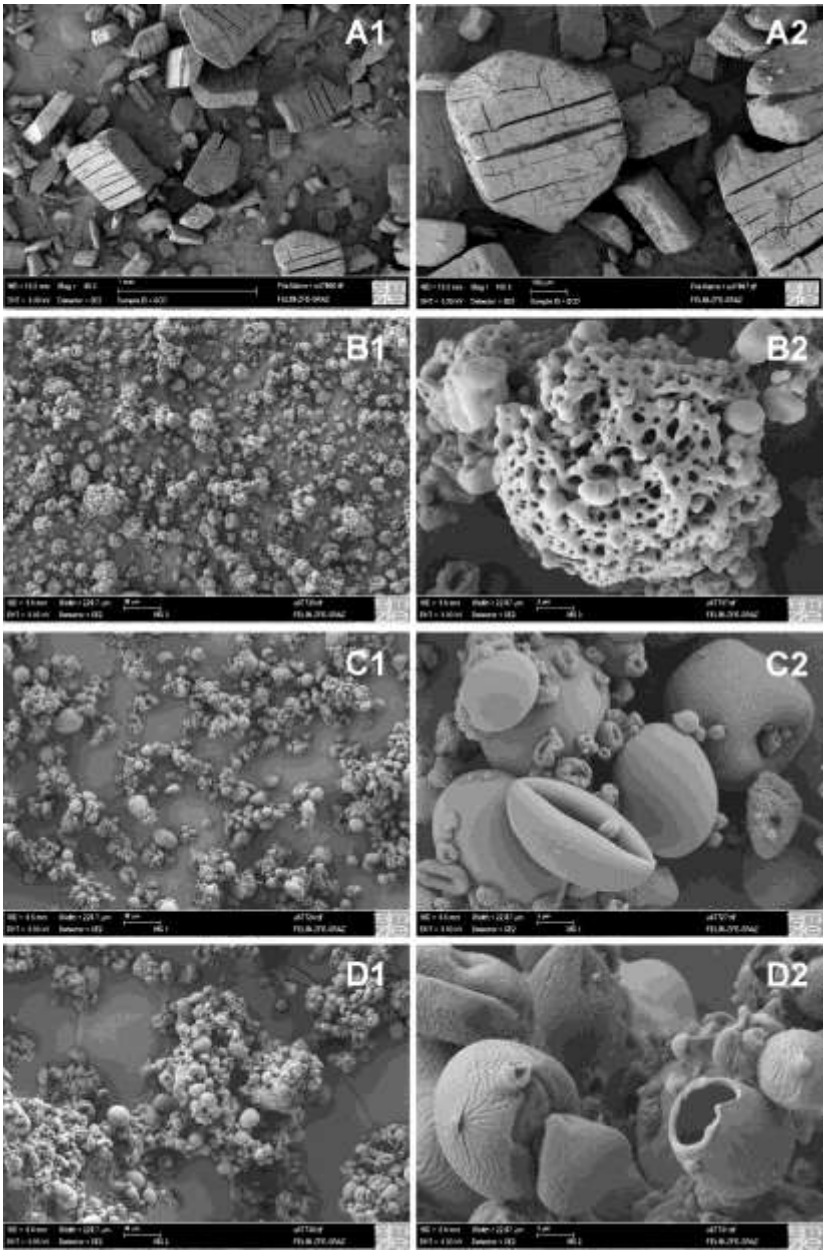
oko 30% doze lijeka, a kod niskih udjela lijeka (10%), čak 85,96% doze lijeka prijeđe u amorfni oblik tijekom termičkog tretmana. Iz toga proizlazi da termički tretman tijekom sušenja raspršivanjem, kao i kasniji termički tretman korišten za uklanjanje u vodi topljivih amonijevih soli značajno pridonose amorfizaciji lijeka u polimernom matriksu mikrosfera.



Slika 60. Ovisnost normirane entalpije taljenja lijeka (ΔH_{norm}) o prirodnom logaritmu udjela lijeka u smjesi (lnw_{ZAL}, lijevo) i ovisnost relativne kristaliničnosti lijeka (*RDC*), određene DSC analizom, o udjelu lijeka u uzorku (w_{ZAL}).

Amorfna struktura lijeka u mikrosferama može objasniti izraženo oslobađanje ZAL iz mikrosfera u kiselom mediju. Naime, lijek u amorfnom stanju ima znatno veću topljivost u odnosu na onaj u kristaliničnom obliku. S druge strane, mikrosfere su karakterizirane vrlo velikom površinom koja je u kontaktu s medijem za oslobađanje te pri tome dolazi do otapanja amorfnog lijeka na površini mikrosfera. Na taj način raste poroznost polimernog matriksa koja omogućuje dublju penetraciju medija za oslobađanje u unutrašnjost mikrosfera te daljnje otapanje/oslobađanje lijeka. No, ti podaci još uvijek ne objašnjavaju razlike u brzini oslobađanja lijeka, pri čemu se nakon 2 sata iz MS_1 oslobodila gotovo 3,2 puta veća količina ZAL nego kod MS_2. Kako bi se ta razlika detaljnije proučila, provedena je SEM analiza pripremljenih mikrosfera i rezultati su prikazani na Slici 61. SEM mikrografije pripremljenih mikrosfera pokazuju da su uzorci karakterizirani širokom raspodjelom veličina čestica, a karakteristična morfološka svojstva ZAL (Slika 61, A_1 i A_2) se ne uočavaju u mikrografijama pripremljenih mikrosfera, potvrđujući time zaključke donesene temeljem DSC i XRPD analize o uklapanju lijeka u matriks mikrosfera. Mikrosfere MS_1 su nepravilnog oblika te izrazito porozne, spužvaste strukture. Takva struktura mikrosfera može se povezati sa

sastavom otopine za raspršivanje koja je sadržavala relativno visoku koncentraciju etanola. Stoga, tijekom sušenja raspršivanjem, dolazi do vrlo brzog isparavanja otapala s površine raspršenih kapljica. Pri tome, u površinskim slojevima raspršenih kapljica brzo pada koncentracija etanola, te se sukladno time smanjuje i topljivost polimera te dolazi do njegove solidifikacije i stvaranja kore na površini mikrosfera. No, voda koja je također prisutna u mediju za raspršivanje hlapi sporije, uzrokujući nastajanje kanala i pukotina u solidificiranom sloju polimera na površini mikrosfera, pogodujući nastajanju izrazito poroznog, spužvastog matriksa (Slika 61, B_1 i B_2).

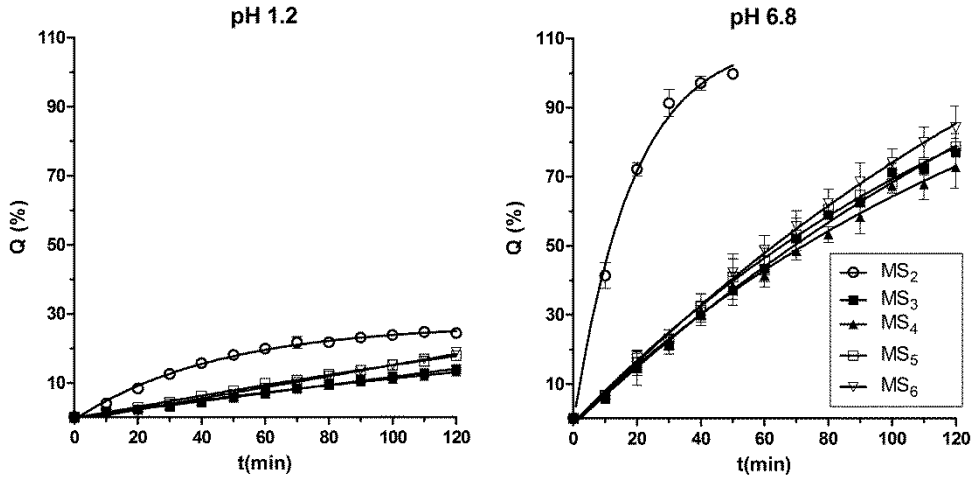


Slika 61. SEM mikrografije ZAL (A_1 i A_2), MS_1 (B_1 i B_2), nativnih MS_2 mikrosfera (C_1 i C_2) te MS_2 mikrosfera nakon termičkog tretmana na 85 °C (D_1 i D_2).

Upravo takva struktura nastalih mikrosfera je odgovorna za brzo oslobađanje lijeka u umjetnom želučanom i umjetnom crijevnom soku. Osim toga, brzo isparavanje etanola može potaknuti migraciju molekula lijeka u površinske slojeve mikrosfera, što dodatno pridonosi njegovom brzom oslobađanju (Rizi i sur., 2011b). Morfologija MS_2 mikrosfera je puno pravilnija, većina mikrosfera je sferičnog oblika i glatke površine, a neke, naročito one manje, su smežurane (Slika 61, C_1 i C_2). Takav oblik mikrosfera je karakterističan za uzorke pripremljene postupkom sušenja raspršivanjem pri temperaturama nižim od *Tg* polimera (Rizi i sur., 2011a). Pri takvim uvjetima, nakon isparavanja otapala dolazi do taloženja polimera na površini raspršenih kapljica, pri čemu je pokretljivost polimernih lanaca ograničena, te se oni ne mogu reorganizirati u pravilnu sferu. Vjerojatno nastali sloj polimera nije u potpunosti rigidan, pa daljnje isparavanje otapala iz jezgre raspršenih kapljica dovodi do nabiranja mikrosfera. Za E_{S100}, *Tg* iznosi 130 °C, no provođenje postupka sušenja raspršivanjem pri toj temperaturi pridonosi ljepljivosti nastalih mikrosfera te njihovom prijanjanju za stijenke uređaja, što dovodi do relativno niskog prinosa (Bhandari i Howes, 1999). Zbog toga postupak sušenja nije proveden pri višim temperaturama ulaznog zraka. Dodatni termički tretman MS_2 na 85 °C nije značajno promijenio strukturu mikrosfera, jedino se povećala naboranost površine mikrosfera. Takve mikrosfere, zahvaljujući povoljnijim morfološkim svojstvima, bolje štite lijek od neželjenog oslobađanja u kiselom mediju te sporije oslobađaju lijek u umjetnom crijevnom soku u odnosu na izrazito porozne MS_1.

Može se zaključiti da metoda pripreme eudragitnih mikrosfera iz etanolno-vodene otopine polimera ne daje produkt sa zadovoljavajućim svojstvima, pa su stoga daljnji napori uloženi u optimiranje svojstava mikrosfera pripremljenih iz alkalne, vodeno-etanolne otopine polimera. Kako bi se modificiralo oslobađanje lijeka iz mikrosfera te smanjilo neželjeno oslobađanje ZAL u kiselom mediju, u formulaciju je uveden Eudragit NE30D (E_{NE30D}). Riječ je o komercijalno dostupnoj, vodenoj disperziji neutralnog kopolimera etilakrilata i metilakrilata u stehiometrijskom omjeru 1:1. E_{NE30D} je u vodi netopljiv, slabo permeabilan polimer, koji se primjenjuje u razvoju oblika s vremenski kontroliranim, pH-neovisnim oslobađanjem lijeka (Lunter i Daniels, 2012; Cuppok i sur., 2011; Maeda i sur., 2011; El-Malah i Nazzal, 2008). E_{NE30D} posjeduje izražena filmogena svojstva i tvori fleksibilne filmove bez dodatka plastifikatora, a prikladan je i za izradu matriksnih terapijskih sustava (Maroni i sur., 2013a). Prilikom izrade mikrosfera, E_{NE30D} je dodan u alkalnu vodenu otopinu E_{S100}, nakon čega je slijedio dodatak etanolne otopine lijeka, a kako bi se odredio optimalan omjer E_{S100} i E_{NE30D}, variran je omjer ta dva polimera u rasponu od 8:2 do 5:5. Pregled

tehnoloških karakteristika pripremljenih mikročestica prikazan je u Tablici 19. Prinos postupka pripreme je nešto veći nego kod MS_2 i kreće se u rasponu od 62,8 do 66,0%, a uspješnije je i uklapanje lijeka u matriks mikrosfera. Pri tome, za neke preparacije (MS_3-MS_5), uklapanje lijeka premašuje teoretskih 100%. Sličan rezultat opažen je i ranije prilikom pripreme Eudragitnih mikrosfera s ketoprofenom primjenom postupka sušenja raspršivanjem, a autori taj rezultat pripisuju gubitku vrlo sitnih mikrosfera, koje se sastoje pretežno od polimera, kroz ispuh uređaja za sušenje raspršivanjem (Rassu i sur., 2008). Naime, uređaj koji je korišten za pripremu mikrosfera nije bio opremljen sustavom za hvatanje vrlo sitnih čestica, koje zbog svoje niske mase nisu istaložene u ciklonu, već su odnesene strujom zraka kroz ispuh uređaja (Giunchedi i sur., 2000). Srednji promjer mikrosfera nije se značajno mijenjao s promjenom udjela E_{NE30D} u formulaciji (Tablica 19), ali vidljiv je lagani porast vrijednosti indeksa kompresibilnosti i Hauserovog indeksa, što ukazuje da povećanje udjela E_{NE30D} negativno djeluje na svojstva tečenja mikrosfera, ali su navedene vrijednosti još uvijek u prihvatljivim granicama.



Slika 62. *In vitro* profili oslobađanja ZAL iz mikrosfera MS_2-MS_5 u umjetnom želučanom (pH 1,2) i umjetnom crijevnom mediju (pH 6,8) pri 37 °C (srednja vrijednost ± SD, *n*=6). Sastav mikrosfera prikazan je u Tablici 19.

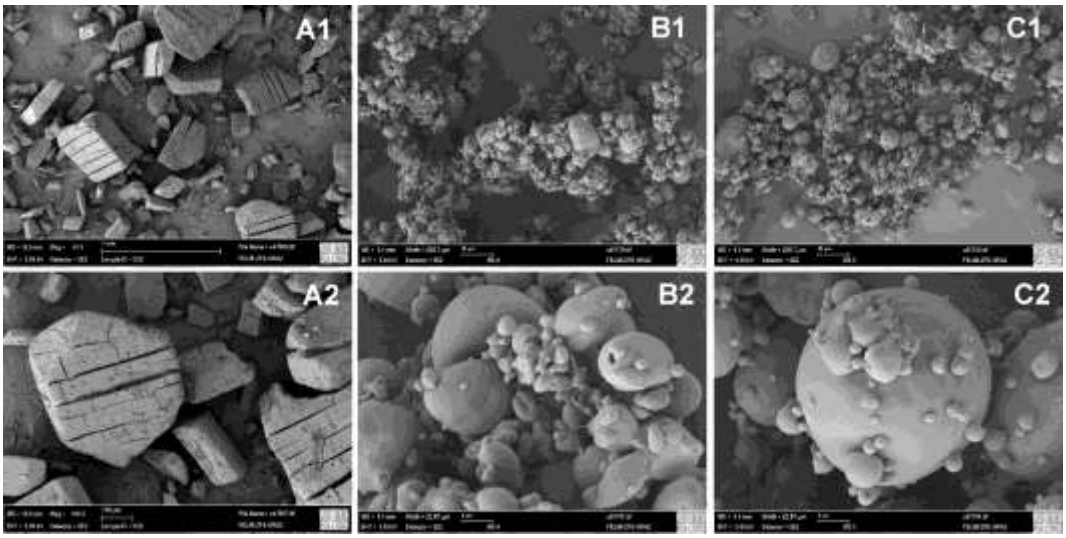
Dodatak E_{NE30D} u formulaciju utjecao je značajno na brzinu oslobađanja lijeka iz mikrosfera i u umjetnom želučanom, i crijevnom soku. Profili oslobađanja lijeka iz mikrosfera s E_{NE30D} *in vitro* prikazani su na Slici 62, a kinetički parametri oslobađanja lijeka u Tablici 20. Pri tome se promijenila i kinetika oslobađanja lijeka, a mikrosfere oblikovane s E_{NE30D} slijede kinetiku prema Higuchiju (r^2=0,9865-0,9956), neovisno o pH vrijednosti medija za oslobađanje. To ukazuje da se u tim uzorcima oslobađanje odvija difuzijom lijeka kroz polimerni matriks mikrosfera, što je posljedica fizičko-kemijskih svojstava E_{NE30D}, koji je u vodi netopljiv polimer i pokazuje svojstvo bubrenja neovisno o pH vrijednosti medija. Cuppok i sur. (2011) su pokazali da E_{NE30D}, zavisno o svom udjelu u formulaciji, ograničava difuzibilnost lijeka, pridonoseći njegovom sporijem oslobađanju. No, rezultati prikazani u ovom radu pokazuju drugačiji trend. Naime, dodatkom E_{NE30D} u količini od 20% došlo je do značajnog smanjenja brzine oslobađanja lijeka, te je nakon 2 sata u kiselom mediju oslobođeno 42,5% manje ZAL u odnosu na MS_1, koje su oblikovane samo korištenjem E_{S100}. Također je došlo do smanjenja brzine oslobađanja lijeka i u umjetnom crijevnom mediju, te je nakon 2 sata iz MS_3 oslobođeno oko 77,1% doze lijeka, dok je kod MS_2 oslobađanje bilo potpuno već nakon 60 minuta ispitivanja. Daljnjim povećanjem udjela E_{NE30D} u formulaciji na 30%, brzina oslobađanja lijeka je najprije neznatno smanjena, a pri koncentracijama od 40 i 50% E_{NE30D} došlo je do ponovnog povećanja brzine oslobađanja lijeka u oba medija (Tablica 20). Taj rezultat se može pripisati utjecaju nonoksinola 100, neionogenog surfaktanta koji je prisutan u vodenoj disperziji E_{NE30D} u koncentraciji od 1,5%. Nonoksinol, kao etoksilirani derivat alkilfenola, je komponenta dobro topljiva u vodi. Stoga se može pretpostaviti da u kontaktu s medijem za oslobađanje dolazi do brzog otapanja navedenog surfaktanta i njegove migracije iz polimernog matriksa mikrosfera. Uslijed toga raste poroznost polimernog matriksa te se povećava difuzibilnost molekula lijeka kroz takav sustav, što rezultira porastom brzine oslobađanja lijeka, neovisno o pH-vrijednosti medija za oslobađanje. Stoga, primjenom E_{NE30D} nije bilo moguće svesti oslobađanje lijeka u kiselom mediju na prihvatljivu razinu, a osim toga, došlo je i do smanjenja brzine oslobađanja lijeka u umjetnom crijevnom mediju (pH 6,8), što predstavlja dodatno odstupanje od zacrtanih ciljeva ovog rada. Zbog toga su svojstva Eudragitnih mikrosfera modificirana dodatkom glicerolmonofosfata (GMS), koji je neionogena, u vodi netopljiva površinski aktivna tvar. Prilikom izrade otopine za raspršivanje, GMS je dodan u etanolnu otopinu lijeka zagrijanu na 60 °C, u količini od 10% u odnosu na količinu E_{S100} (MS_7). Već ranije je pokazano da dodatak GMS može povećati hidrofobnost eudragitnih mikrosfera te tako smanjiti neželjeno oslobađanje lijeka u kiselom mediju (Alhnan i sur., 2011).

Tablica 20. Utjecaj E_{NE30D} na parametre *in vitro* oslobađanja ZAL iz mikrosfera M_3-M_6 u umjetnom želučanom (pH 1,2) i umjetnom crijevnom mediju (pH 6,8) pri 37 °C: količina oslobođenog lijeka u kiselom mediju nakon 2h (Q_{2h}) te konstanta brzine oslobađanja lijeka prema Higuchiju (k_H) (srednja vrijednost ± SD, n=6).

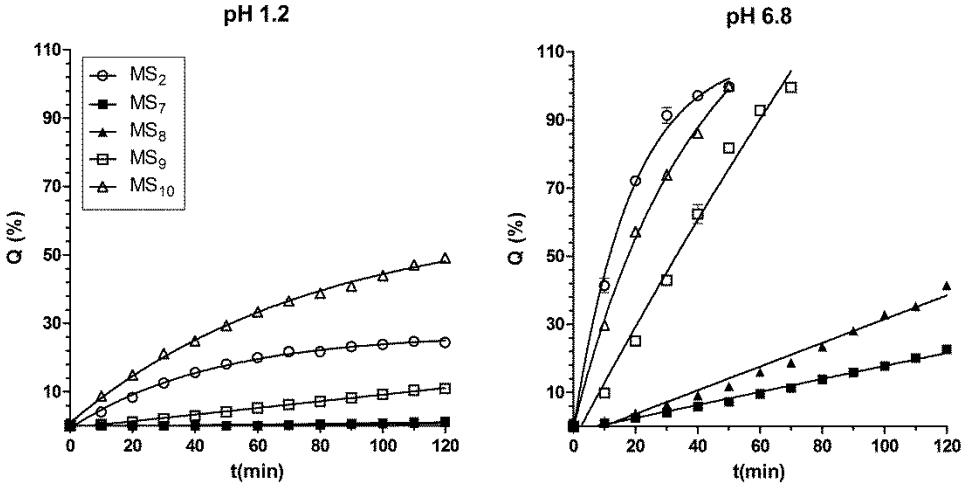
Uzorak	**Omjer E_{S100} i E_{NE30D}**	**Q_{2h}**	**k_H ($min^{-1/2}$)**	
			pH 1,2	**pH 6,8**
MS_2	10:0	24,37 ± 0,79	-	-
MS_3	8:2	14,02 ± 0,59	1,69 ± 0,11	9,10 ± 0,21
MS_4	7:3	13,34 ± 0,92	1,55 ± 0,06	9,33 ± 0,20
MS_5	6:4	17,90 ± 1,13	2,18 ± 0,08	9,43 ± 0,21
MS_6	5:5	18,87 ± 0,15	2,66 ± 0,15	10,45 ± 0,29

Prinos postupka za pripremu mikrosfera, uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere i srednji promjer MS_7 mikrosfera se ne razlikuju značajno u odnosu na vrijednosti za MS_2 (Tablica 19). To pokazuje da GMS nema značajan utjecaj na te parametre. Što se tiče tehnoloških karakteristika pripremljenih mikrosfera, dodatak GMS je nepovoljno utjecao jedino na svojstva tečenja MS_7, iako su te vrijednosti i dalje u prihvatljivim okvirima. Nešto lošija svojstva tečenja mogu se objasniti rezultatima SEM analize (Slika 62), koja je pokazala da su u uzorku MS_7 mikrosfere međusobno slijepljene u veće nakupine. Osim toga, GMS je utjecao i na morfološka svojstva oblikovanih mikrosfera. Mikrosfere MS_7 su uglavnom sferičnog oblika i glatke površine. Sitnije mikrosfere, koje su uglavnom nepravilnog oblika, adsorbirane su na površinu većih, pravilnijih mikrosfera. Pri tome su se u potpunosti izgubila morfološka svojstva ZAL, upućujući na uklapanje lijeka u polimerni matriks mikrosfera. Taj rezultat su potvrdile i DSC i XRPD analiza (Slike 57 i 58). DSC termogram GMS pokazuje pik taljenja pri 65,67 °C, koji je karakterističan za stabilniji, β-polimorfni oblik GMS. Iako se ta vrijednost nešto razlikuje od podataka dostupnih u literaturi (Windbergs i sur., 2009; Yajima i sur., 2002), u XRPD difraktogramu GMS vidljivi su izraženi pikovi pri 19,6 i 22,5° (Slika 58), što nedvojbeno potrđuje da je riječ o β-polimorfnom obliku GMS. Nadalje, u DSC

termogramima ostalih mikrosfera pripremljenih s GMS vidljiv je slabo izraženi pik taljenja GMS (Slika 57), što ukazuje da je nakon sušenja raspršivanjem GMS zadržao svoj stabilniji oblik unutar matriksa mikrosfera. Na XRPD difraktogramima mikrosfera MS_7 i MS_9, karakteristični pikovi za β-polimorfni oblik GMS nisu izraženi, što upućuje na zaključak da se mikrokristalinične zone GMS nalaze uklopljene u matriks E_{S100}. Rezultati morfološke SEM analize potvrđuju taj zaključak, s obzirom na to da se na površini mikrosfera ne uočavaju nikakve strukture koje bi se mogle pripisati kristalima GMS (Slika 62). Može se pretpostaviti da GMS, s obzirom na svoju relativno nisku temperaturu tališta, ostaje u rastaljenom stanju tijekom procesa sušenja te da djeluje kao plastifikator u sloju E_{S100}, omogućujući oblikovanje pravilnijih mikrosfera. Istovremeno, to može uzrokovati i međusobno sljepljivanje susjednih mikrosfera te stvaranje nakupina, što nepovoljno djeluje na svojstva tečenja uzorka (Tablica 19).



Slika 62. SEM mikrografije ZAL (A_1 i A_2), mikrosfera MS_7 (B_1 i B_2), i MS_9 (C_1 i C_2) nakon termičkog tretmana na 85 °C.



Slika 63. *In vitro* profili oslobađanja ZAL iz mikrosfera MS_2 i MS_7-MS_{10} u umjetnom želučanom (pH 1,2) i umjetnom crijevnom mediju (pH 6,8) pri 37 °C (srednja vrijednost ± SD, *n*=6). Sastav mikrosfera prikazan je u Tablici 19.

Dodatak GMS u mikrosfere značajno je utjecao na svojstva oslobađanja lijeka (Slika 63). Povećana hidrofobnost tako nastalog matriksa (MS_7) značajno je reducirala oslobađanje lijeka u kiselom mediju, pa je nakon 2 sata ispitivanja iznosila oko 22,5 puta manje u odnosu na mikrosfere MS_2, bez obzira na to što je ZAL u tim mikrosferama također bio u amorfnom obliku, kao što je pokazala DSC i XRPD analiza (Slike 57 i 58). No istovremeno, dodatak GMS je nepovoljno djelovao na oslobađanje lijeka u umjetnom crijevnom mediju, pri čemu se tijekom 2 sata oslobodilo svega oko 20% doze lijeka, dok je kod MS_2, oslobađanje u istom mediju bilo potpuno već nakon 60 minuta (Slika 63). Pri tome se promijenila i kinetika oslobađanja lijeka iz mikrosfera. Oslobađanje lijeka iz MS_7 najbolje opisuje kinetika nultog reda (r^2=0,9998 i 0,9919, za profile oslobađanja u umjetnom želučanom i crijevnom mediju), dok se oslobađanje ZAL iz MS_2 mikrosfera odvija kinetikom prvog reda, r^2=0,9872 i 0,9998, za profile oslobađanja u umjetnom želučanom i crijevnom mediju (Tablica 21). Iako se u razvoju terapijskih sustava preferira oslobađanje lijeka kinetikom nultog reda, pri čemu je brzina oslobađanja konstantna, brzina oslobađanja ZAL iz MS_7 nije odgovarala terapijskoj namjeni ljekovitog oblika. Naime, za terapiju nesanice, naročito oblika koje karakterizira prerano buđenje i nemogućnost ponovnog usnivanja, bilo bi poželjno da se doza lijeka oslobodi relativno brzo nakon perioda latencije od 2-4 sata. Stoga je bilo potrebno dodatno modulirati brzinu oslobađanja lijeka iz mikrosfera. U tu je svrhu korišten ranije pripremljen

inkluzijski kompleks ZAL s RAMEB. Naime, pokazano je da ciklodekstrini mogu značajno pridonijeti bržem oslobađanju u vodi teško topljivih lijekova iz polimernih mikrosfera (Jug i Bećirević-Laćan 2008, 2007). Zbog toga su pripremljene mikrosfere koje su sadržavale 25, 50 i 100% doze lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa s RAMEB (MS_8, MS_9 i MS_{10}). Uklapanje inkluzijskog kompleksa u mikrosfere provedeno je na dva načina. Prvi način uključivao je izravan dodatak odgovarajuće količine već ranije pripremljenog kompleksa ZAL/RAMEB u alkalnu otopinu E_{S100}, a drugi način je uključivao postupak *in situ* nastajanja inkluzijskog kompleksa. U tom je postupku RAMEB otopljen u alkalnoj otopini polimera, a ZAL u koncentriranom etanolu, zajedno s GMS. Nakon toga su te dvije otopine pomiješane, nakon čega je došlo do *in situ* nastajanja inkluzijskog kompleksa. Preliminarna istraživanja su pokazala da svojstva oblikovanih mikrosfera kao i profili oslobađanja lijeka ne ovise o načinu uklapanja inkluzijskog kompleksa u formulaciju (podaci nisu prikazani), tj. E_{S100} i GMS ne interferiraju s nastajanjem inkluzijskog kompleksa ZAL i RAMEB. Stoga je za pripremu mikrosfera, kao tehnološki jednostavniji i prikladniji postupak, odabran onaj koji uključuje *in situ* nastajanje inkluzijskog kompleksa u otopini za raspršivanje. Dodatak RAMEB u formulaciju nije značajno utjecao na prinos postupka pripreme mikrosfera, kao ni na uspješnost uklapanja lijeka, srednji promjer mikročestica ni njihova morfološka svojstva (Tablica 19, Slika 62).

Tablica 21. Utjecaj GMS i RAMEB na parametre oslobađanja ZAL iz mikrosfera MS_7-MS_{10} *in vitro* u umjetnom želučanom (pH 1,2) i umjetnom crijevnom mediju (pH 6,8) pri 37 °C: količina oslobođenog lijeka u kiselom mediju nakon 2 h (Q_{2h}) te konstante brzine oslobađanja lijeka nultog (k_0) i prvog reda (k_1) (srednja vrijednost ± SD, n=6).

Uzorak	**Omjer E_{S100} i GMS**	**% doze lijeka kao RAMEB kompleks**	**Q_{2h}**	**$k_1 \times 10^2$ (min^{-1})**		**$k_0 \times 10^3$ (mg min^{-1})**	
				pH 1,2	**pH 6,8**	**pH 1,2**	**pH 6,8**
MS_2	10:0	0	24,37 ± 0,79	0,19 ± 0,03	9,39 ± 0,91	-	-
MS_7	10:1	0	1,08 ± 0,34	-	-	1,14± 0,14	19,10 ± 0,52
MS_8		25	1,33 ± 0,32	-	-	8,75± 0,11	34,85 ± 0,14
MS_9		50	9,31 ± 0,48	-	-	9,71± 0,19	155,00 ± 0,72
MS_{10}		100	49,13 ± 1,64	0,54 ± 0,01	9,18 ± 0,26	-	-

RAMEB utječe na brzinu oslobađanja lijeka iz pripremljenih mikrosfera, a taj utjecaj ovisi o udjelu doze lijeka koja je bila uklopljena u obliku inkluzijskog kompleksa. U usporedbi s MS_7, uklapanjem 25% doze lijeka u obliku RAMEB kompleksa (MS_8) tek se neznatno promijenila količina lijeka oslobođena tijekom ispitivanja u kiselom mediju, dok je brzina oslobađanja u umjetnom crijevnom mediju bila oko 1,8 puta veća. Tako se nakon 2 sata ispitivanja u umjetnom crijevnom mediju oslobodilo oko 41% doze lijeka, što je značajno više nego kod MS_7 mikrosfera, oblikovanih bez uporabe ciklodekstrina. Taj rezultat može se prvenstveno pripisati poboljšanoj topljivosti lijeka u obliku RAMEB kompleksa, što pridonosi njegovom bržem oslobađanju iz polimernog matriksa mikrosfera. Osim toga, RAMEB je izrazito topljiva tvar koja se otapa u kontaktu s medijem za oslobađanje, pridonoseći tako povećanju poroznosti polimernog matriksa mikrosfera, te na taj način olakšava ulazak vode u matriks i daljnje oslobađanje lijeka. Sličan učinak ciklodekstrina na oslobađanje lijeka iz polimernih matriksa različite geometrije već je ranije opisan (Jug i sur., 2012a; Jug i sur., 2012b; Jug i sur., 2009; Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Uklapanje 50% i 100% doze lijeka u obliku RAMEB kompleksa (MS_9 i MS_{10}) dodatno pridonosi bržem oslobađanju lijeka u umjetnom želučanom i umjetnom crijevnom mediju (Slika 63, Tablica 21). Pri tome se kod mikrosfera koje su sadržavale 100% lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa mijenja kinetika oslobađanja lijeka. Neovisno o pH-vrijednosti medija, oslobađanje ZAL iz MS_{10} najbolje opisuje kinetika prvog reda (r^2=0,9900 i 0,9891). Iako je brzina oslobađanja ZAL iz MS_{10} u umjetnom crijevnom mediju usporediva s onom kod MS_2, oslobađanje u kiselom mediju je gotovo 2,8 puta brže, što pokazuje da relativno visoka koncentracija dobro topljivog RAMEB u mikrosferama MS_{10} narušava integritet E_{S100} matriksa, te tako onemogućava pH-selektivno oslobađanje lijeka. No, profili oslobađanja lijeka iz MS_9, koje sadrže 50% doze lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa s RAMEB, mogu se smatrati prihvatljivim za postizanje željenog terapijskog učinka. Oslobađanje lijeka iz MS_9 u umjetnom želučanom mediju nakon 2 h iznosi oko prihvatljivih 10% doze lijeka, a u umjetnom crijevnom mediju je relativno brzo, te se ukupna doza lijeka oslobodi tijekom 70 minuta. U oba slučaja, oslobađanje lijeka se odvija kinetikom nultog reda (r^2=0,9956 i 0,9819 za pH 1,2 i 6,8). Dobiveni rezultati pokazuju da se moduliranjem hidrofobnosti matriksa E_{S100} dodatkom GMS, te korekcijom topljivosti lijeka stvaranjem inkluzijskih kompleksa, mogu uspješno oblikovati mikrosfere kao terapijski sustav s pH-ovisnim oslobađanjem lijeka. Pri tome valja pažljivo optimirati udjele pojedinih komponenata u formulaciji, s ciljem pripreme mikrosfera zadovoljavajućih svojstava.

5. Zaključci

Temeljem provedenih istraživanja i postignutih rezultata te njihovog tumačenja i detaljne rasprave, moguće je donijeti sljedeće zaključke:

(i) U otopini ZAL stvara topljive inkluzijske komplekse s prirodnim i kemijski modificiranim ciklodekstrinima. Od prirodnih ciklodekstrina, ZAL stvara najstabilnije komplekse s βCD, no njegov solubilizacijski potencijal je ograničen. Stabilnost nastalih kompleksa te solubilizacijski potencijal kemijski modificiranih derivata βCD smanjuje se u nizu RAMEB>SBEβCD>HPβCD. S obzirom na stabilnost nastalih kompleksa te izraženi solubilizacijski potencijal, RAMEB je derivat izbora za pripremu inkluzijskih kompleksa ZAL u čvrstom stanju.

(ii) Nastajanje inkluzijskih kompleksa ZAL s βCD i RAMEB u otopini potvrđeno je ^{1}H-NMR spektroskopijom te je određena njihova struktura. U tom sustavu su istovremeno prisutne dvije vrste inkluzijskih kompleksa: prvi tip kompleksa nastaje inkluzijom fenilne skupine lijeka u centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina kroz širu stranu otvora i to je dominantni tip vezanja, dok drugi tip kompleksa nastaje inkluzijom pirazolo[1,5-a] pirimidinskog prstena molekule lijeka. Navedeni kompleksi nastaju u ekvimolarnom stehiometrijskom odnosu lijeka i ciklodekstrina, a nastajanje kompleksa višeg reda je isključeno.

(iii) Primjena ^{1}H-NMR spektroskopije i spektrofluorimetrije omogućila je precizno određivanje termodinamičkih parametara reakcije kompleksiranja ZAL s ispitivanim derivatima ciklodekstrina. Nastajanje kompleksa je spontani proces, a s obzirom na pokretačke sile, razlikuje se entalpijom uvjetovano nastajanje kompleksa, koje je karakteristično za inkluzijske komplekse ZAL s βCD, HPβCD i RAMEB, dok je kompleksiranje ZAL s SBEβCD entropijom vođen proces.

(iv) Topljivost i stabilnost kompleksa s RAMEB značajno je povećana dodatkom HPMC (0,05%, *m/V*), uslijed nastanka ternarnih kompleksa, dok dodatak hidrofilnih polimera nije utjecao na stabilnost i topljivost kompleksa s βCD. PVP (0,05%, *m/V*) je pokazao slabo izraženi solubilizacijski potencijal prema ZAL, a nije utjecao na stabilnost i topljivost inkluzijskih kompleksa ZAL s βCD i RAMEB.

(v) Primjenom sušenja raspršivanjem, uspješno su pripravljeni binarni i ternarni kompleksi ZAL s βCD, RAMEB i HPMC, a primjenom NMR spektroskopije čvrstog stanja potvrđeno je nastajanje inkluzijskih kompleksa u pripremljenim uzorcima. Binarni i ternarni kompleksi s RAMEB su u potpunosti amorfni, dok je u kompleksima s βCD došlo samo do

djelomične amorfizacije lijeka. Brzina otapanja lijeka *in vitro* slijedi niz ZAL/RAMEB/HPMC > ZAL/RAMEB = ZAL/βCD/HPMC > ZAL/βCD >> ZAL, a brzina otapanja je konstantna u rasponu pH vrijednosti karakterističnih za probavni sustav. Sve to jasno pokazuje izraženi potencijal RAMEB za stvaranje inkluzijskih kompleksa ZAL u čvrstom stanju te njegov sinergistički učinak s HPMC na topljivost lijeka.

(vi) Korištenjem ternarnog kompleksa ZAL/RAMEB/HPMC i topljivog punila (manitol) pripremljene su tablete koje omogućuju oslobađanje doze lijeka u samo 5 minuta, što osigurava brz nastup djelovanja lijeka. Formulaciju oblikovanu korištenjem netopljivog punila (mikrokristalinična celuloza) karakterizira značajno sporije oslobađanje lijeka jer RAMEB i HPMC djeluju kao vezivo unutar tablete usporavajući njezinu raspadljivost, a time i brzinu oslobađanja lijeka.

(vii) Topljivi kompleksi zaleplona s u vodi topljivim, polimernim derivatom β-ciklodekstrina (PβCD) uspješno su pripremljeni primjenom tehnike mljevenja u vibracijskim mikromlinovima. Nakon 90 minuta mljevenja, pri frekvenciji od 24 Hz, dobiven je amorfni produkt izražene topljivosti, koji otapanjem u vodi prelazi u inkluzijski kompleks, što je pokazano primjenom ^{1}H-NMR spektroskopije.

(viii) Primjenom tehnike sušenja raspršivanjem, uspješno su pripremljene mikrosfere s odgođenim, pH-ovisnim oslobađanjem zaleplona, kao novi terapijski sustav za liječenje nesanice koju karakterizira prerano buđenje te nemogućnost naknadnog usnivanja. Pri tome je ostvareno visoko uklapanje lijeka u sferične mikrosfere srednjeg promjera oko 1,7 μm. Matriks koji sadrži 80% E_{S100} i 20% GMS pokazao se optimalnim u sprječavanju neželjenog oslobađanja lijeka pri nižim pH-vrijednostima medija. Uklapanjem 50% doze lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa s RAMEB osigurano je potpuno oslobađanje lijeka u umjetnom crijevnom mediju, kinetikom nultog reda (k_0=155 μgmin^{-1}).

(ix) Vrsta otapala koja je korištena za pripremu otopine za raspršivanje značajno je utjecala na tehnološka svojstva pripremljenih mikrosfera. Raspršivanjem etanolno-vodene otopine polimera i lijeka pripremljene su mikrosfere izrazito porozne strukture koje neselektivno oslobađaju lijek u simuliranom želučanom mediju (pH 1,2). Prikladnijim se pokazalo sušenje raspršivanjem alkalne vodeno-etanolne otopine koja je sadržavala 0,96% NH_4HCO_3. Njegovom reakcijom s E_{S100} nastaje u vodi topljiva sol polimera koja se djelomično termički razgrađuje tijekom procesa sušenja raspršivanjem. Za potpuno uklanjanje amonijaka iz pripremljenih mikrosfera potreban je dodatni termički tretman na 85 °C tijekom

210 minuta, čime se polimer u potpunosti regenerira u svom netopljivom obliku, bez značajne promjene morfoloških svojstava pripremljenih mikrosfera.

(x) ZAL pokazuje izraženo svojstvo amorfizacije u matriksu Eudragita S100, posebice tijekom termičkog tretmana, a to dovodi do neželjenog oslobađanja lijeka u umjetnom želučanom mediju (pH 1,2). Zbog toga je bilo potrebno dodatno modificirati sastav polimernog matriksa dodatkom 20% GMS, čime se značajno smanjilo neželjeno oslobađanje lijeka u umjetnom želučanom mediju (na samo 1,1% uklopljene doze lijeka, nakon 2 sata ispitivanja). Dodatak GMS značajno je smanjio brzinu oslobađanja lijeka *in vitro* u umjetnom crijevnom soku (pH 6,8) na samo 19,1 $\mu g min^{-1}$, što nije u skladu s terapijskom namjenom razvijanih mikrosfera. Uklapanjem 50% doze lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa sa ZAL, uspješno je modificirana brzina oslobađanja lijeka, bez značajnog utjecaja na ostale tehnološke parametre pripremljenih mikrosfera. Na taj je način oblikovan novi terapijski sustav koji može poslužiti kao platforma za razvoj novih oblika s odgođenim oslobađanjem lijekova ograničene topljivosti u probavnom sustavu.

6. Literatura

Aaltonen, J., Alleso, M., Mirza, S., Koradia, V., Gordon, K.C., Rantanen, J. (2009) Solid Form Screening--a Review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71: 23-37.

Abrahamsson, B., Alpsten, M., Johnsson, M., Lunberg, U.E., Sandberg, A., Sundgren, M., Svenheden, A., Tolli, J. (1996) Gastro-intestinal Transit of a Multiple-unit Formulation (metoprolol CR/ZOK) and a Non-disintegrating Tablet with the Emphasis on Colon. *Int. J. Pharm.* 140: 229-235.

Aigner, Z., Berkesi, O., Farkas, G., Szabó-Révész, P. (2012) DSC, X-ray and FTIR Studies of a Gemfibrozil/Dimethyl-β-Cyclodextrin Inclusion Complex Produced by Co-grinding. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 57: 62-67.

Aigner, Z., Hassan, H.B., Berkesi, O., Kata, M., Eros, I. (2005) Thermoanalytical, FTIR and X-ray Studies of Gemfibrozil-Cyclodextrin Complexes. *J. Therm. Anal. Calorim*. 81: 267-272.

Al Omari, M.M., Zughul, M.B., Davies, J.E.D., Badwan, A.A. (2007) Thermodynamic Enthalpy-entropy Compensation Effects Observed in the Complexation of Basic Drug Substrates with Beta-Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro*. 57: 379-384.

Alhnan, M.A., Kidia E., Basit A.W. (2011) Spray-drying Enteric Polymers from Aqueous Solutions: a Novel, Economic, and Environmentally Friendly Approach to Produce pH-responsive Microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79: 432-439.

Ali Asgher, L.F., Chandren, S. (2006) Multiparticulate Formulation Approach to Colon Specific Drug Delivery : Current Perspectives. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9: 327-338.

Alvira, E. (2007) A Continiuum Model for van der Waals Interaction between Beta-Cyclodextrins and Linear Molecules : part 2. *Chem. Phys. Lett*. 439: 258-263.

Aslam, F., Cowans, B., Byrn, S., West, P.G. (2005) Polymorphs of Zaleplon and Methods for the Preparation Thereof. *EP 1526136 A1*.

Bahl, D., Bogner, R.H. (2008) Amorphization Alone Does not Account for the Enhancement of Solubility of Drug Co-ground with Silicate: the Case of Indomethacin. *AAPS Pharm. Sci. Tech*. 9: 146-153.

Balasubramaniam, J., Rajesh, Y., Bindu, K., Hemalatha, T., Swetha, M., Umesh, R.V. (2010) Enhanced Dissolution and Bioavailability of Raloxifene Hydrochloride by Co-grinding with Different Superdisintegrants. *Chem. Pharm. Bull*. 58: 293-300.

Barzegar-Jalali, M., Valizdeh, H., Shadbad, M.-R.S., Adibkia, K., Mohannadi, G., Farahani, A., Harash, Z., Nokhodchi, A. (2010) Co-grinding as an Approach to Enhance Dissolution Rate of a Poorly Water-soluble Drug (gliclazide). *Powder Technol*. 197: 150-158.

Ben-Naim, A. (1987) Solvation Thermodynamics. Plenum Press, New York.

Beni, S., Szakacs, Z., Csernak, O., Barcza, L., Noszal, B. (2007) Cyclodextrin/Imatinib Complexation : Binding Mode and Charge Dependent Stabilities. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30: 167-174.

Bettinetti, G.P., Mura, P., Faucci, M.T., Sorrenti, M., Setti, M. (2002b) Interaction of Naproxen with Noncrystalline Acetyl Beta- and Acetyl Gamma-Cyclodextrins in the Solid and Liquid State. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15: 21-29.

Bettinetti, G.P., Sorrenti, M., Rossi, S., Ferrari, F., Mura, P., Faucci, M.T. (2002a) Assessment of Solid-State Interactions of Naproxen with Amorphous Cyclodextrin Derivatives by Dsc. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30: 1173-1179.

Bhandari B.R., Howes T. (1999) Implication of Glass Transition for the Drying and Stability of Dried Foods. *J. Food Eng*. 40: 71-79.

Bharathi, C., Prabahar, K.J., Prasad, C.S., Kumara, M.S., Magesha, S., Handaa, V.K., Dandala, R., Naidu, A. (2007) Impurity Profile Study of Zaleplon. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 44: 101–109.

Bibby, D.C., Davies N.M., Tucker I.G. (2000) Mechanism by which Cyclodextrin Modify Drug Release from Polymeric Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm*. 197: 1-11.

Bikiaris, D., Papageorgiou G.Z., Stergiou A., Pavlidou, E., Karavas, E., Kanaze, F., Georgarakis, M. (2005) Physicochemical Studies on Solid Dispersions of Poorly Water-Soluble Drugs - Evaluation of Capabilities and Limitations of Thermal Analysis Techniques. *Thermochim. Acta* 439: 58-67.

Birnbaum, D.T., Brannon-Peppas, L. (2004) Microparticle Drug Delivery Systems. In: Brown, D.M. (ed) Drug Delivery Systems in Cancer Therapy.Humana Press, Totowa, New Jersey: 117-135.

Bragagni, M., Beneitez, C., Martin, C., De la Ossa, D.H.P., Mura P.A., Gil-Alegre, M.E. (2013) Selection of PLA Polymers for the Development of Injectable Prilocaine Controlled Release Microparticles: Usefulness of Thermal Analysis. *Int. J. Pharm.* 441: 468-475.

Brewster, M.E., Loftsson, T. (2007) Cyclodextrins as Pharmaceutical Solubilizers. *Adv. Drug Del.* 59: 645-666.

Buggins, T.R., Dickinson, P.A., Taylor, G. (2007) The Effects of Pharmaceutical Excipients on Drug Disposition. *Adv. Drug. Del. Rev*. 59: 1482-1503.

Cal, K. and Sollohub, K. (2010) Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *J. Pharm. Sci.* 99: 575-586.

Calderini, A., Pessine, F.B.T. (2008) Synthesis and Characterization of Inclusion Complex of the Vasodilatador Drug Minoxidil with β-Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro.* 60: 369−377.

Camarco, W., Ray, D., Druffner, A. (2006) Selecting Superdisintegrants for Orally Disintegrating Tablet Formulations. *Pharm. Tech*. 30: 28-33.

Carrier, R.L., Miller, L.A., Ahmed I. (2007) The Utility of Cyclodextrins for Enhancing Oral Bioavailability. *J. Control. Release* 123: 78-99.

Casu, B., Reggiani, M., Gallo, G.G., Vigevani, A. (1966) Hydrogen Bonding and Conformation of Glucose and Polyglucoses in Dimethyl-Sulphoxide Solution. *Tetrahedron* 22: 3061-3083.

Casu, B., Reggiani, M., Gallo, G.G., Vigevani, A. (1968) Conformation of o-Methylated Amylose and Cyclodextrins. *Tetrahedron* 24: 803-821.

Casu, B., Reggiani, M., Gallo, G.G., Vigevani, A. (1970) Conformation of Acetylated Cyclodextrins and Amylose. *Carbohyd. Res*. 12: 157-170.

Chadha, R., Kashid, N., Saini, A. (2004) Account of Analytical Techniques Employed for the Determination of Thermodynamics of Inclusion Complexation of Drugs with Cyclodextrins. *J. Sci. Ind. Res.* 63: 211-229.

Challa, R., Ahuja, A., Khar, R.K. (2005) Cyclodextrins in Drug Delivery: An Update Review. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6: 329-357.

Chavda, H.V., Patel, C.N., Anand, I.S. (2010) Biopharmaceutics Classification System. *Syst. Rev. Pharm.* 1: 62-69.

Chen, A.J., Liu, M., Dong, L.N., Sun, D.Z. (2013) Study on the Effect of Solvent on the Inclusion Interaction of Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin with Three Kinds of Coumarins by Phase Solubility Method. *Fluid Phase Equilib*. 341: 42-47.

Choe, S.Y., Neudeck, B.L., Welage, L.S., Amidon, G.E., Barnett, J.L., Amidon,G.L. (2001) Novel Method to Assess Gastric Emptying in Humans: Pellet Gastric Emptying Test. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14: 347-353.

Cirri, M., Maestrelli, F., Furlanetto, S., Mura, P. (2004) Solid-state Characterization of Glyburide-Cyclodextrin Co-ground products. *J. Therm. Anal. Calorim*. 77: 413-422.

Collnot, E.M., Ali, H., Lehr, CM. (2012) Nano- and Microparticulate Drug Carriers for Targeting of the Inflamed Intestine Mucosa. *J. Control. Release* 161: 235-246.

Colombo, I., Grassi, G., Grassi, M. (2009) Drug Mechanochemical Activation. *J. Pharm. Sci.* 98: 3961-3986.

Colome, L.M., Raffin, R.P., Jornada, D.S., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. (2007) Pantoprazole-loaded Eudragit Blended Microparticles: Preparation, Characterization, *in Vitro* Gastro-Resistance and *in Vivo* Anti-ulcer Evaluation. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 17: 113-118.

Cuppok, Y., Muschert, S., Marucci, M., Hjaertstam, J., Siepmann, F., Axelsson, A., Siepmann, J. (2011) Drug Release Mechanisms from Kollicoat SR:Eudragit NE Coated Pellets. *Int. J. Pharm.* 409: 30-37.

Da Silva, A.A., De Matos, J.R., Formariz, T.P., Rossanezi, G., Scarpa, M.V., Egito, E.S.T., De Oliveira, A.G. (2009) Thermal Behavior and Stability of Biodegradable Spray-Dried Microparticles Containing Triamcinolone. *Int. J. Pharm.* 368: 45-55.

Davis, M.E.; Brewster, M.E. (2004) Cyclodextrin-based Pharmaceutics: Past, Present and Future. *Nature Rev. Drug Dis.* 3: 1023-1035.

Davis, S.S., Hardy, J.G., Taylor, M.J., Whalley, D.R., Wilson, C.G. (1984) The Effect of Food on the Gastrointestinal Transit of Pellets and on Osmotic Device (osmet) *Int. J. Pharm.* 21: 331-340.

De La Vega, J.C., Elischer,P., Schneider, T., Häfeli, U.O. (2013) Uniform Polymer Microspheres: Monodispersity Criteria, Methods of Formation and Applications. 8: *Nanomedicine* 265-285.

Dittgen, M., Durrani, M., Lehmann, K. (1997) Acrylic Polymers, A Review of Pharmaceutical Applications, *S.T.P. Pharm. Sci.* 7: 403-437.

Djedaïni, F., Lin, S.Z., Perly, B., Wouessidjewe, D. (1990) High-Field Nuclear Magnetic Resonance Techniques for the Investigation of a β-Cyclodextrin: Indomethacin Inclusion Complex. *J. Pharm. Sci.* 79: 643-646.

Dodziuk, H. (2006) Cyclodextrins and Their Complexes. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Doiphode, D., Gaikwad, S., Pore,Y., Kuchekar, B., Late, L. (2008) Effect of β-Cyclodextrin Complexation on Physicochemical Properties of Zaleplon. *J. Incl. Phenom. Macro.* 62: 43-50.

Ebbens, M.M., Verster, J.C. (2010) Clinical Evaluation of Zaleplon in the Treatment of Insomnia. *Nat. Sci. Sleep.* 2: 115-26.

El-Malah, Y., Nazzal, S. (2008) Novel Use of Eudragit (R) NE 30D/Eudragit (R) L 30D-55 Blends as Functional Coating Materials in Time-Delayed Drug Release Applications. *Int. J. Pharm.* 357: 219-227.

Esposito, E., Cervellati, F., Menegatti, E., Nastruzzi, C., Cortesi, R. (2002) Spray Dried Eudragit Microparticles as Encapsulation Devices for Vitamin C. *Int. J. Pharm.* 242: 329-334.

Esposito, E., Roncarati, R., Cortesi, R., Cervellati, F., Nastruzzi, C. (2000) Production of Eudragit Microparticles by Spray-Drying Technique: Influence of Experimental Parameters on Morphological and Dimensional Characteristics. *Pharm. Dev. Technol.* 5: 267-278.

Fielding, L. (2000) Determination of Association Constants (Ka) from Solution NMR Data. *Tetrahedron* 56: 6151-6170.

Figueiras, A., Ribeiro, L., Vieira, M.T., Veiga, F. (2007) Preparation and Physicochemical Characterization of Omeprazole: Methyl-Beta-Cyclodextrin Inclusion Complex in Solid State. *J. Incl. Phenom. Macro.* 57: 173-177.

Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B. (2005) Microencapsulation by Solvent Extraction/evaporation: Reviewing the State of the Art of Microsphere Preparation Process Technology. *J. Control. Release* 102: 313-332.

Frömming, K-H., Szejtli, J. (1994) Cyclodextrins in Pharmacy. Kluwer Academic Publishers, London, p: 1-32.

Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C.J., Zuberbühler A.D. (1985a) Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic Data-I: Mathematical Considerations. *Talanta* 32: 95-101.

Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C.J., Zuberbühler A.D. (1985b) Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic Data-II32, 95: Specfit: Two User-friendly Programs in Basic and Standard Fortran. 77 *Talanta* 32: 257-264.

Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C.J., Zuberbühler A.D. (1986) Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic data-IV: Model-free Least-Squares Refinement by Use of Evolving Factor Analysis *Talanta* 33: 943-951.

Gan, Y., Zhang, Y., Xiao, C., Zhou, C., Zhao, Y. (2011) A Novel Preparation of Methyl-Beta-Cyclodextrin from Dimethyl Carbonate and Beta-Cyclodextrin. *Carbohydr. Res.* 346: 389-392.

Gelb, R.I., Schwartz, L.M. (1989) Complexation of Adamantaneammonium Substrates by Beta-Cyclodextrin and its o-Methylated Derivatives. *J. Incl. Phenom. Macro*. 7: 537-543.

Gharsallaoui, A., Roudaut ,G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007) Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview. *Food Res. Int.* 40: 1107-1121.

Ghuzlaan, A., Al Omari, M.M., Al-Sou'od, K.A. (2009) Prednisone/Cyclodextrin Inclusion Complexation: Phase Solubility, Thermodynamic, Hysicochemical and Computational Analysis. *J. Sol. Chem.* 38: 83-94.

Giunchedi, P., Gavini, E., Bonacucina, G., Palmieri, G.F. (2000) Tabletted Polylactide Microspheres Prepared by a w/o Emulsion Spray-Drying Method. *J Microencapsul*. 17: 711-720.

Gladys, G., Claudia, G., Marcela, L. (2003) The Effect of pH and Triethanolamine on Sulfisoxazole Complexation with Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 20: 285-293.

Grillo, R., Melo, N.F.S., Moraes, C.M., Rosa, A.H., Roveda, J.A.F., Menezes, C.M.S., Fereira, E.I., Franceto, L.F. (2007) Hydroxymethylnitrofurazone: Dimethyl-Beta-Cyclodextrin Inclusion Complex: A Physical-Chemistry Characterization *J. Biol. Phys.* 33: 445-453.

Hallen, D., Schon, A., Shehatta, I., Wadso, I. (1992) Microcalorimetric Titration of Alpha-Cyclodextrin with Some Straight-Chain Alkan-1-ols at 288.15, 298.15 and 308.15 K. *J. Chem. Soc. Farad. T.* 88: 2859-2863.

Hazekamp, A., Verpoorte, R. (2006) Structure Elucidation of the Tetrahydrocannabinol Complex with Randomly Methylated Beta-Cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29: 340-347.

He, W., Fu, P., Shen, X.H., Gao, H.C. (2008) Cyclodextrin-Based Aggregates and Characterization by Microscopy. *Micron*. 39: 495-516.

Heydorn, W. E. (2000) Zaleplon - a Review of a Novel Sedative Hypnotic Used in the Treatment of Insomnia. *Expert Opin. Investig. Drugs* 9: 841-858.

Higuchi, T., Connors, K. (1965) Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum*. 7: 117-212.

Hillery, A.M., Lloyd, A.W., Swarbrick, J. (2001) Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists.1st, Taylor and Francis, London.

Hirayama F., Uekama, K. (1999) Cyclodextrin-Based Controlled Drug Release System. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 36: 125-141.

Holm, R., Madsen, J.C., Shi, W. Lambertsen Larsen, K., Wagner Städe, L., Westh, P. (2011) Thermodynamics of Complexation of Tauro- and Glyco-Conjugated Bile Salts with

Two Modified B-Cyclodextrins. *J.Incl. Phenom. Macro.* 69: 201-211.

Hu, L., Zhang, H., Song, W. (2013) An Overview of Preparation and Evaluation Sustained-Release Injectable Microspheres. *J. Microencapsul.* 30: 369-382.

Irie, T., Uekama, K. (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J.Pharm.Sci*. 86: 147-162.

Jalšenjak, I., Jalšenjak, V., Filipović-Grčić, J. (1998) Farmaceutika. Školska knjiga, Zagreb, pp: 120-129.

Jansook, P., Kurkov, S.V., Loftsson. T. (2010) Cyclodextrins as Solubilizers: Formation of Complex Aggregates. *J. Pharm. Sci.* 99: 719-29.

Jaques, M.S., Sundarrajan, P.R., Taylor, K.J., Marchessault, R.H. (1976) Nuclear Magnetic Resonance and Conformational Studies on Amylose and Model Compounds in Dimethyl Sulfoxide Solution. *J. Am. Chem. Soc*. 98: 4386-4391.

Jiang, H., Tongxin, L., Zhide, H. (2002) The Fluorescence Study of the Inclusion Coordinated Compound of Beta-Cyclodextrin and P-Hydroxyphenolacetamide and Its Analytical Applications. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 58: 2659-2668.

Jug, M., Bećirević-Laćan, M. (2004) Multicomponent Complexes of Piroxicam with Cyclodextrins and Hydroxypropyl Methylcellulose. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 30: 1051-1060.

Jug, M., Bećirević-Laćan, M. (2007) Screening of Mucoadhesive Microparticles Containing Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin for the Nasal Delivery of Risperidone. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 10: 358-367

Jug, M., Bećirević-Laćan, M. (2008) Development of a Cyclodextrin-Based Nasal Delivery System for Lorazepam. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 34: 817-826.

Jug, M., Bećirević-Laćan, M., Bengez, S. (2009) Novel Cyclodextrin-Based Film Formulation Intended for Buccal Delivery of Atenolol. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 35: 796-807.

Jug, M., Kosaec, I., Maestrelli F., Mura, P. (2011) Analysis of Triclosan Inclusion Complexes with Beta-Cyclodextrin and its Water-Soluble Polymeric Derivative. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 54: 1030-1039.

Jug, M., Kosalec, I., Maestrelli, F., Mura, P. (2012a) Development of Low Methoxy Amidated Pectin-Based Mucoadhesive Patches for Buccal Delivery of Triclosan: Effect of Cyclodextrin Complexation. *Carbohydr. Polym*. 90: 1794-1803.

Jug, M., Maestrelli, F., Bragagni, M., Mura, P. (2010) Preparation and Solid-State Characterization of Bupivacaine Hydrochloride Complexes Aimed for Buccal dDelivery. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 52: 9-18.

Jug, M., Maestrelli, F., Mura, P. (2012b) Native and Polymeric Beta-Cyclodextrins in Performance Improvement of Chitosan Films Aimed for Buccal Delivery of Poorly Soluble Drugs. *J. Incl. Phenom. Macro.* 74: 87-97.

Jug, M., Mennini, N., Kover, K.E., Mura, P. (2014) Comparative Analysis of Binary and Ternary Cyclodextrin Complexes with Econazole Nitrate in Solution and in Solid State. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 91: 81-91.

Julllian, C., Miranda, S., Zapata-Torres, G., Mendizabal, F., Olea-Azar, (2007) C. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 3217-3236.

Kadian S.S., Harikumar S.L. (2009) Eudragit and its Pharmaceutical Significance, Kishanpur, *Roorkee College of Pharmacy* 17.

Kang, J., Kumar, V., Yang, D., Chowdhury, P.R., Hohl, R.J. (2002) Cyclodextrin Complexation: Influence on the Solubility, Stability and Cytotoxicity of Camptothecin, an Antineoplastic Agent, *Eur. J. Pharm. Sci.* 15: 163-170.

Kano, K., Kitae, T., Shimofuri, Y., Tanaka, N., Mineta, Y. (2000) Complexation of Polyvalent Cyclodextrin Ions with Oppositely Charged Guests: Entropically Favorable Complexation Due to Dehydration. *Chem. Eur. J.* 6: 2705-2713.

Karavas, E., Georgarakis, E., Bikiaris, D. (2006) Application of Pvp/Hpmc Miscible Blends with Enhanced Mucoadhesive Properties for Adjusting Drug Release in Predictable Pulsatile Chronotherapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64: 115-126.

Kawabata, Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S., Onoue, S. (2011) Formulation Design for Poorly Water-Soluble Drugs Based on Biopharmaceutics Classification System: Basic Approaches and Practical Applications. *Int. J. Pharm.* 420: 1-10.

Kimura, T., Fujie, S., Yukiyama, T., Fujisawa, M., Kamiyama, T., Aki, H. (2011) Enthalpy and Entropy Changes on Molecular Inclusion of Pentane Derivatives into α-Cyclodextrin Cavities in Aqueous Solutions. *J. Incl. Phenom. Macro.* 70: 269-278.

Kiss, T., Fenyvesi, F., Bacskay, I., Varadi, J., Fenyvesi, E., Ivanyi, R., Szente, L., Tosaki, A., Vecsernyes, M. (2010) Evaluation of the Cytotoxicity of Beta-Cyclodextrin Derivatives: Evidence for the Role of Cholesterol Extraction. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40: 376-380.

Kohane, D.S., Anderson, D.G., Yu, C., Langer, R. (2003) pH-Triggered Release of Macromolecules from Spray-Dried Polymethacrylate Microparticles. *Pharm. Res.* 20: 1533-1538.

Ku, M.S., Dulin, W. (2010) A Biopharmaceutical Classification-Based Right-First-Time Formulation Approach to Reduce Human Pharmacokinetic Variability and Project

Cycle Time from First-In-Human to Clinical Proof-of-Concept. *Pharma. Develop. Tech.* 17: 285-302.

Kurkov, S. V., Loftsson, T. (2013) Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 453: 167-180.

Kurkov, S.V., Ukhatskaya, E.U., Loftsson. T. (2010) Drug/Cyclodextrin: Beyond Inclusion Complexation. *J. Incl. Phenom. Macro.* 69: 297-301.

Lam, P.L., Gambari, R., (2014) Advanced Progress of Microencapsulation Technologies: *In Vivo* and *in Vitro* Models for Studying Oral and Transdermal Drug Deliveries. *J. Control. Release* 178: 25-45.

Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y. (2003) Microsphere Design for the Colonic Delivery 5-Fluorouracil. *J. Control. Release* 90: 313-322.

Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y. (2004) Design of pH-Sensitive Microspheres for the Colonic Delivery of the Immunosuppressive Drug Tacrolimus. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 37-43.

Lautenschläger, C., Schmidt, C., Fischer, D., Stallmach, A. (2013) Drug Delivery Strategies in the Therapy of Inflammatory Bowel Disease. *Adv. Drug Del. Rev.* http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.10.001.

Lavelle, E.C. (2001) Targeted Delivery of Drugs to the Gastrointestinal Tract. *Cri. Rev. Therap. Drug Car. Syst.* 18: 341-386.

Layre, A.M., Gosselet, N.M., Renard, E., Sebille, B., Amiel, C. (2002) Comparison of the Complexation of Cosmetical and Pharmaceutical Compounds with β-Cyclodextrin, 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin and Water Soluble β-Cyclodextrin-Co-Epichlorohydrin Polymers. *J. Incl. Phenom. Macro*. 43: 311-317.

Lin, S.-Y., Hsu, C.-H., Ke, W.-T. (2010) Solid-State Transformation of Different Gabapentin Polymorphs upon Milling and Co-Milling *Int. J. Pharm.* 396: 83-90.

Liu, L., Guo, Q.X. (2001) Isokinetic Relationship, Isoequilibrium Relationship, and Enthalpy-Entropy Compensation. *Chem. Rev.* 101: 673-695.

Liu, W., Yang, X-L., Winston Ho, W.S. (2011) Preparation of Uniform-Sized Multiple Emulsions and Micro/Nano Particulates for Drug Delivery by Membrane Emulsification. *J. Pharm. Sci*. 100: 75-93.

Locci, E., Lai, S., Piras, A., Marongiu, B., Lai, A. (2004) 13c-Cpmas and 1h-Nmr Study of the Inclusion Complexes of Beta-Cyclodextrin with Carvacrol, Thymol, and Eugenol Prepared in Supercritical Carbon Dioxide. *Chem. Biodivers.* 1: 1354-1366.

Loftsson, T., Brewster, M.E. (1997) Cyclodextrins as pharmaceutical excipients. *Pharm. Tech. Eur.* 9: 26-32.

Loftsson, T., Brewster, M.E. (2011) Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Effects on Drug Permeation through Biological Membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* 63: 1119-1135.

Loftsson, T., Brewster, M.E. (2012) Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *J. Pharm. Sci.* 101: 3019-3032.

Loftsson, T., Brewster, M.E., (2010) Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. *J. Pharm. Pharmacol.* 62: 1607-1621.

Loftsson, T., Duchene, D. (2007) Cyclodextrins and Their Pharmaceutical Applications. *Int. J. Pharm.* 329: 1-11.

Loftsson, T., Hreinsdottir, D., Masson, M. (2005) Evaluation of Cyclodextrin Solubilization of Drugs. *Int. J. Pharm*. 302: 18-28.

Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., Másson, M. (2007) The Complexation Efficiency. *J. Incl. Phenom. Macro.* 57: 545-552.

Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M., Jarvinen, T. (2005) Cyclodextrins in Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2: 335-351.

Loftsson, T., Masson, M. (2004) The Effects of Water-Soluble Polymers on Cyclodextrins and Cyclodextrin Solubilization of Drugs. *J. Drug. Del. Sci. Tech*. 14: 35-43.

Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konradsdottir, F. (2007) Effects of Cyclodextrins on Drug Delivery through Biological Membranes. *J. Pharm. Sci.* 96: 2532-2546.

Lunter, D.J., Daniels, R. (2012) New Film Forming Emulsions Containing Eudragit (R) NE and/or RS 30D for Sustained Dermal Delivery of Nonivamide. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 82: 291-298.

Maeda, A., Shinoda, T., Ito, N., Baba, K., Oku, N., Mizumoto, T. (2011) Evaluating Tamsulosin Hydrochloride-Released Microparticles Prepared Using Single-Step Matrix Coating. *Int. J. Pharm*. 408: 84-90.

Maedar, M., Neuhold, Y.M. (2007) Practical Data Analysis in Chemistry, Elsevier B.V., Amsterdam.

Maestrelli, F., Cecchi, M., Cirri, M., Capasso, G., Mennini, N., Mura, P. (2009) Comparative Study of Oxaprozin Complexation with Natural and Chemically-Modified Cyclodextrins in Solution and in the Solid State. *J. Incl. Phenom. Macro*. 63: 17-25.

Maestrelli, F., Cirri, M., Mennini, N., Zerrouk, N., Mura, P. (2011) Improvement of oxaprosin solubility and permeability by the combined use of cyclodextrin, chitosan and bile components. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 78: 385-393.

Maestrelli, F., Zerrouk, N., Cirri, M., Mennini, N., Mura., P. (2008) Microspheres for Colonic Delivery of Ketoprofen-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34: 1-11.

Mao, S., Guo, C., Shi, Y., Li, L.C. (2012a) Recent Advances in Polymeric Microsferes for Parenteral Drug Delivery Part 1. *Expert Opin. Drug Del.* 9: 1161-1176.

Mao, S., Guo, C., Shi, Y., Li, L.C. (2012b) Recent Advances in Polymeric Microsferes for Parenteral Drug Delivery Part 2. *Expert Opin. Drug Del.* 9: 1209-1223.

Maroni, A., Del Curto, M.D., Cerea, M., Zema, L., Foppoli, A., Gazzaniga, A. (2013a) Polymeric Coatings for a Multiple-Unit Pulsatile Delivery System: Preliminary Study on Free and Applied Films. *Int. J. Pharm*. 440: 256-263.

Maroni, A., Del Curto, M.D., Zema, L., Foppoli, A., Gazzaniga, A. (2013b) Film Coatings for Oral Colon Delivery. *Int. J. Pharm*. 457: 372-394.

Marques, H.M.C. (2010) A Review on Cyclodextrin Encapsulation of Essential Oils and Volatiles. *Flavour Frag. J.* 25: 313-326.

Martin Del Valle, E.M.(2004) Cyclodextrins and Their Uses: A Review. *Process Biochem.* 39: 1033-1046.

Masson, M., Loftsson, T., Jonsdottir, S., Fridriksdottir, H., Petersen, D.S. (1998) Stabilisation of Ionic Drugs Through Complexation with Non-Ionic and Ionic Cyclodextrins. *Int. J. Pharm*. 164: 45-55.

Mathiowitz, E., (2008) Drug Delivery Systems. *Toxicol Pathol.*, 36: 16-20.

Matsui, Y., Mochida, K. (1979) Binding Forces Contributing to the Association of Cyclodextrin with Alcohol in an Aqueous-Solution. *B. Chem. Soc. Jpn*. 52: 2808-2814.

Matsumoto, A., Matsukawa, Y., Nishioka, Y., Harada, M., Horikiri, Y., Yamahara, H. (2008) A New Method of Preparing TRH Derivative-Loaded Poly(dl-lactide-coglycolide) Microspheres Based on a Solid Solution System. *Drug Discov. Ther*. 2: 45-51.

Messner, M., Kurkov, S.V., Flavia-Piera, R., Brewster, M.E., Loftsson, T. (2011) Self-Assembly of Cyclodextrins : the Effect of the Guest Molecule. *Int. J. Pharm*. 408: 235-247.

Messner, M., Kurkov, S.V., Jansook, P., Loftsson, T. (2010) Self-Assembled Cyclodextrin Aggregates and Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 387: 199-208.

Moretti, M.D.L., Gavini, E., Juliano, C., Pirisino, G., Giunchedi, P. (2001) Spray-Dried Microspheres Containing Ketoprofen Formulated into Capsules and Tablets. *J. Microencapsul.* 18: 111-121.

Mrsny, R.J. (2012) Oral Drug Delivery Research in Europe. *J. Control. Release* 161: 247-253.

Munro, I.C., Newberne, P.M., Young, R.R., Bär, A. (2004) Safety assessment of γ-cyclodextrin. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39: 3-13.

Mura, P., Faucci, M.T., Maestrelli, F., Furlanetto, S., Pinzauti, S. (2002) Characterization of Physiochemical Properties of Naproxen Systems with Amorphous β-Cyclodextrin-Epichlorohydrin Polymers. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 29: 1015-1024.

Mura, P., Faucci, M.T., Manderioli, A., Bramanti, G. (2001) Multicomponent Systems of Econazole with Hydroxyacids and Cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macro.* 39: 131-138.

Mura, P., Maestrelli, F., Cirri, M. (2003) Ternary Systems of Naproxen with Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin and Aminoacids. *Int. J. Pharm.* 260: 293-302.

Murtomaa, M., Savolainen, M., Christiansen, L., Rantanen, J., Laine, E., Yliruusi, J. (2004) Static Electrification of Powders During Spray Drying. *J. Electrost.* 62: 63-72.

Mustafin, R.I. (2011) Interpolymer Combinations of Chemically Complementary Grades of Eudragit Copolymers: A New Direction in the Design of Peroral Solid Dosage Forms of Drug Delivery Systems with Controlled Release. *Pharm. Chem. J.* 45: 285-295.

Nakase, H., Okazaki, K., Tabata, Y., Chiba, T. (2003) Biodegradable Microspheres Targeting Mucosal Immune-Regulating Cells: New Approach for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J. Gastroenterol.* 38: 59-62.

Nakase, H., Okazaki, K., Tabata, Y., Uose, S., Ohana, M., Uchida, K., Matsushima, Y., Kawanami, C., Oshima, C., Ikada, Y., Chiba, T. (2000) Development of an Oral Drug Delivery System Targeting Immune-Regulating Cells in Experimental Inflammatory Bowel Disease: a New Therapeutic Strategy. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 292: 15-21.

Nandiyanto, A.B.D., Okuyama, K. (2011) Progress in Developing Spray-Drying Methods for the Production of Controlled Morphology Particles: From the Nanometer to Submicrometer Size Ranges. *Adv. Powder. Technol.* 22: 1-19.

Nowakowski, M., Ejchart, A. (2013) Complex Formation of Fenchone with α-Cyclodextrin: NMR Titrations. *J. Incl. Phenom. Macro.* Doi. 10.1007/s10847-013-0356-4.

Ogawa, N., Higashi, K., Nagase, H., Endo, T., Moribe, K., Loftsson, T., Yamamoto, K., Ueda, H. (2010) Effects of Co-grinding with β-Cyclodextrin on the Solid State of Fentanyl. *J. Pharm. Sci*. 99: 5019-5029.

Okazaki, K., Nakase, H., Watanabe, N., Tabata, Y., Ikada, Y., Chiba, T. (2002) Intestinal Drug Delivery Systems with Biodegradable Microspheres Targeting Mucosal Immune-Regulating Cells for Chronic Inflammatory Colitis. *J. Gastroenterol.* 37: 44-52.

Omar, L., El-Barghouthi, M.I., Masoud, N.A., Abdoh, A.A., Al Omari, M.M., Zughul, M.B., Badwan, A.A. (2007) Inclusion Complexation of Loratadine with Natural and Modified Cyclodextrins: Phase Solubility and Thermodynamic Studies. *J. Solut. Chem*. 36: 605-616.

Palmieri, G.F., Bonacucina, G., Di Martino, P., Martelli, S. (2002) Gastro-Resistant Microspheres Containing Ketoprofen. *J. Microencapsul.* 19: 111-119.

Passos, J.J., Sousa, F.B.D., Mundim, I.M., Bonfim, R.R., Melo, R., Viana, A.F., Stolz, E.D., Borsoi, M., Rates, S.M.K., Sinisterra, R.D. (2013) Double Continuous Injection Preparation Method of Cyclodextrin Compounds by Spray Drying. *Chem. Eng. J.* 228: 345-351.

Perrie, Y., Rades, T. (2012) Pharmaceutics-Drug Delivery and Targeting. 2nd, Pharmaceutical Press, London.

Pescitelli, G., Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Vincieri, F.F., Di Bari, L. (2010) Cyclodextrins as Carriers for Kavalactones in Aqueous Media: Spectroscopic Characterization of (S)-7,8-Dihydrokavain and Beta-Cyclodextrin Inclusion Complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52: 479-483.

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M. (2014) Cyclodextrins as Encapsulation Agents for Plant Bioactive Compounds. *Carbohyd. Pol*. 101: 121-135.

Pinto, J. F. (2010) Site-Specific Drug Delivery Systems within the Gastro-Intestinal Tract: From the Mouth to the Colon. *Int. J.Pharm.* 395: 44-52.

Pinjari, R.V., Joshi, K.A., Gejji, S.P. (2006) Molecular Electrostatic Potentials and Hydrogen Bonding in Alpha-, Beta-, and Gamma-Cyclodextrins. *J. Phys. Chem. A.* 110: 13073-13080.

Pokharkar, V., Dhar, S., Bhumkar, D. et al. (2009) Acute and Subacute Toxicity Studies of Chitosan Reduced Gold Nanoparticles: A Novel Carrier for Therapeutic Agents. *J. Biochem. Nanotechnol*. 5: 233-239.

Privalov, P.L., Gill, S.J. (1988) Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interactions. *Adv. Prot. Chem.* 39: 191-234.

Raffin, R.P., Colome, L.M., Haas, S.E., Jornada, D.S., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. (2007) Development of HPMC and Eudragit S100 (R) Blended Microparticles Containing Codium Pantoprazole. *Pharmazie* 62: 361-364.

Raffin, R.P., Colome, L.M., Schapoval, E.E.S., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. (2008) Increasing Sodium Pantoprazole Photostability by Microencapsulation: Effect of the Polymer and the Preparation Technique. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 69: 1014-1018.

Raffin, R.P., Jornada, D.S., Re, M.I., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. (2006) Sodium Pantoprazole-Loaded Enteric Microparticles Prepared by Spray Drying: Effect of the Scale of Production and Process Validation. *Int. J. Pharmaceut.* 324: 10-18.

Ranade, V.V., Cannon, J.B. (2011) Drug Delivery Systems. 3rd, CRC Press, New York.

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K. (2007) Pharmacology In Amino Acid Transmitters. Churchill Livingstone, London 792, pp: 470-482.

Rassu, G., Gavini, E., Spada, G., Giunchedi, P., Marceddu, S. (2008) Ketoprofen Spray-Dried Microspheres Based on Eudragit RS and RL: Study of the Manufacturing Parameters. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 34: 1178-1187.

Rattes, A.L.R., Oliveira, W.P. (2007) Spray-Drying Conditions and Encapsulating Composition Effects on Formation and Properties of Sodium Diclophenac Microparticles. *Powder Technol.* 171: 7-14.

Rekharsky, M.V., Inoue, Y. (1998) Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins, *Chem. Rev*. 98: 1875-1917.

Rekharsky, M.V., Mayhew, M.P., Goldberg, R.N., Ross, P.D., Yamashoji, Y. Inoue, Y.(1997) Thermodynamic and Nuclear Magnetic Resonance Study of the Reaction of Alpha- and Beta-Cyclodextrin with Acids, Aliphatic Amines, and Cyclic Alcohols. *J. Phys. Chem. B* 101: 87-100.

Ribeiro, L., Ferreira, D.C.,Veiga, F.J. (2005) In Vitro Controlled Release of Vinpocetine-Cyclodextrin-Tartaric Acid Multicomponent Complexes from Hpmc Swellable Tablets. *J. Control. Release* 103: 325-339.

Rizi, K., Green, R.J., Donaldson, M., Williams, A.C. (2011a) Production of pH-Responsive Microparticles by Spray Drying: Investigation of Experimental Parameter Effects on Morphological and Release Properties. *J. Pharm. Sci.* 100: 566-579.

Rizi, K., Green, R.J., Khutoryanskaya, O., Donaldson, M., Williams, A.C. (2011b) Mechanisms of Burst Release from pH-Responsive Polymeric Microparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 63: 1141-1155.

Rosen, A.D., Fournie, P., Darwish, M., Danjou, P., Troy, S.M. (1999) Zaleplon

Pharmacokinetics and Absolute Bioavailability. *Biopharm. Drug Dispos. 20*: 171-175.

Rowe, R.C., Shjeskey, P.J., Quinn, M.E. (eds) (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition, Pharmaceutcal Press, London, pp: 424-428.

Salustio, P.J., Pontes, P., Conduto, C., Sanches, I., Carvalho, C., Arrais, J., Marques, H.M.C. (2011) Advanced Technologies for Oral Controlled Release : Cyclodextrins for Oral Controlled Release. *AAPS Pharm. Sci. Tech*. 12: 1276-1292.

Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Russo,P., Gasparri, F., Giannini, V., Lauro, M.R., Puglisi, G., Aquino, R.P. (2013) Enhanced Technological and Permeation Properties of a Microencapsulated Soy Isoflavones Extract. *J.Food Eng.* 115: 298-305.

Shukla, RK., Tiwari, A. (2012) Carbohydrate Polymers: Applications and Recent Advances in Delivering Drugs to Colon. *Carbohyd. Polymers* 88: 399-416.

Sie, M. (2010) An Update on Sleep Disorders and their Treatment. *Prog. Neuro. Psychiatry* 14: 9-20.

Sivasankar, T., Antony Muthu Prabhu, A., Karthick, M., Rajendiran, N. (2012) Encapsulation of Vanillylamine by Native and Modified Cyclodextrins: Spectral and Computational Studies. *J. Mol. Struct.* 1028: 57-67.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. (1999) Osnove Analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb, pp: 585-593.

Sohajda, T., Beni, S., Varga, E., Ivanyi, R., Racz, A., Szente, L., Noszal, B. (2009) Characterization of Aspartame-Cyclodextrin Complexation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50: 737-745.

Sollohub, K. and Cal, K. (2010) Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *J. Pharm. Sci.* 9: 587-597.

Sughir, A., Skiba, M., Lameiras, P., Coadou, G., Lahiani-Skiba, M., Oulyadi, H. (2010) Study of interaction between tiagabine HCl and 2-HPβCD: investigation of inclusion process. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* 68: 55-63.

Sweetman, S.C. (36th) (2009) Martindale: The Complete Drug Reference. Pharmaceutical Press, London, pp: 1038-1039.

Szejtli, J. (1998) Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 98: 1743-1754.

Szejtli, J., Szente, L. (2005) Elimination of Bitter, Disgusting Tastes of Drugs and Foods by Cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 61: 115-125.

Szejtli, J.(1998) Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev* 98: 1743-54.

Szente, L., Szejtli, J. (1999) Higly solubile cyclodextrin derivates: chemistry, properties and trends in development. *Adv. Drug. Del. Rev.* 36: 17-28.

Talei, F., Atyabi, F., Azhdarzaleh, M., Dinarvand, R., Saadatzadeh, A. (2013) Overcoming Therapeutic Obstacles in Inflammatory Bowel Diseases: A Comprehensive Review on Novel Drug Delivery Strategies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49: 712-722.

Talukder, R., Reed, C., Dürig, T., Hussain, M. (2011) Dissolution and Solid State Characterization of Poorly Water-Soluble Drugs in the Presence of a Hydrophilic Carrier. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 12: 1227-1233.

Tang, B., Wang, X., Jia, B., Niu, J., Wei, Y., Chen, Z., Wang, Y. (2003) Simple, Rapid, and Sensitive Spectrofluorimetric Determination of Zaleplon in Micellar Medium. *Anal. Letters* 36: 2985-2997.

Tariq, S. H., Pulisetty, S. (2008) Pharmacotherapy for Insomnia. *Clin. Geriatr. Med.* 24: 93-105.

Thi, T.D., Nauwelaerts, K., Froeyen, M., Baudemprez, L., Speybroeck, M.V., Augustijns, P., Annaert, P., Martens, J., Humbeeck, J.V., Mooter, G.V. (2010) Comparison of the Complexation between Methylprednisolone and Different Cyclodextrins in Solution by ^{1}H-NMR and Molecular Modeling Studies. *J. Pharm. Sci*. 99: 3863-3873.

Thomasin, C., Adlder, P., Bemsel, R., Hottinger, H., Altorfer, H., Wright, A.D., Wehrli, E., Merkle, H.P., Gander, B. (1996) A Contribution to Overcoming the Problem of Residual Solvents in Biodegradable Microspheres Prepared by Coacervation. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 42: 16-24.

Tran, V.T., Benoît, J.P., Venier-Julienne, M.C. (2011) Why and How to Prepare Biodegradable, Monodispersed, Polymeric Microparticles in the Field of Pharmacy? *Int. J. Pharm.* 407: 1-11.

Uddin, M.S., Hawlader, M.N.A., Zhu, H.J. (2001) Microencapsulation of Ascorbic Acid: Effect of Process Variables on Product Characteristics. *J. Microencapsul.* 18: 199-209.

Uekama, K., Hirayama, F., Arima, H. (2006) Recent Aspect of Cyclodextrin-Based Drug Delivery System. *J.Incl. Phenom. Macro. Chem.* 56: 3-8.

Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T. (1998) Cyclodextrin drug carrier system. Chem. Rew. 98: 2045-2076.

Varum, F.J., Merchant, H.A., Basit, A.W. (2010) Oral Modified-Release Formulations in Motion: The Relationship between Gastrointestinal Transit and Drug Absorption. *Int. J. Pharm.* 395: 26-36.

Veiga, F. J., Fernandes, C.M., Carvalho, R.A., Geraldes, C.F. (2001) Molecular Modelling

and 1H-NMR: Ultimate Tools for the Investigation of Tolbutamide: Beta-Cyclodextrin and Tolbutamide: Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Complexes. *Chem. Pharm. Bull.* 49: 1251-1256.

Voinovich, D., Perissutti, B., Grassi, M., Passerini, N., Bigotto, A. (2009) Solid State Mechanochemical Activation of Silybum Marianum Dry Extract with Beta-Cyclodextrins: Characterization and Bioavailability of the Co-ground Systems. *J. Pharm. Sci*. 98: 4119-4129.

Waghmare, A., Pore, Y., Kuchekar, B. (2008) Development and Characterization of Zaleplon Solid Dispersion Systems: A Technical Note. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* 9: 536-543.

Wang, Y., Lu, Z., Wu, H., Lv, F. (2009) Study on the Antibiotic Activity of Microcapsule Curcumin against Foodborne Pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 136: 71-74.

Wang, Z., Horikawa, T., Hirayama, F., Uekama, K. (1993) Design and *in-Vitro* Evaluation of a Modified-Release Oral Dosage form of Nifedipine by Hybridization of Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin and Hydroxypropylcellulose. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 942-946.

Waterman, K.C., (2007) A Critical Review of Gastric Retentive Controlled Drug Delivery. *Pharmaceut. Develop. Tech.* 121: 1-10.

Waters, L.J., Bedford, S., Parkes, G.M.B., Mitchell, J.C. (2010) Influence of Lipophilicity on Drug–Cyclodextrin Interactions: A Calorimetric Study. *Thermo. Acta* 511: 102-106.

Wiggins, P.M. (1997) Hydrophobic Hydration, Hydrophobic Forces and Protein Folding. *Phys. A* 238: 113-128.

Wilson, C. G. (2010) The Transit of Dosage Forms through the Colon. *Int. J. Pharm.* 395: 17-25.

Windbergs, M., Strachan, C.J., Kleinebudde, P. (2009) Investigating the Principles of Recrystallization from Glyceride Melts. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 10: 1224-1233.

Yajima, T., Itai, S., Takeuchi, H,, Kawashima, Y. (2002) Determination of Optimum Processing Temperature for Transformation of Glyceryl Monostearate. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 1430-1433.

Yang, C.M., Lee, H.C., Yeh, Z.-T. (2011) Management of Late-Life Insomnia. *CMG*er 4: 9-22

Yujuana, C., Runhua, L. (2009) ^{1}H-NMR Titration and Quantum Calculation for the Inclusion Complexes of Cis-1,5-Cyclooctadiene with ß-Cyclodextrin. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectros.* 73: 713-718.

Zhou, Y.H., Zhang, G.M., Wang, Z.R., Wang, H.Y., Dong, C., Shuang, S.M. (2006) The

Interaction of Piroxicam with Neutral (HP-β-CD) and Anionically Charged (SBE-β-CD) Beta-Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro.* 56: 215-220.

Zia, V., Rajewski, R.A., Stella, V.J. (2000) Thermodynamics of Binding of Neutral Molecules to Sulfobutylether Beta-Cyclodextrins (SBE-beta-CDs): the Effect of Total Degree of Substitution. *Pharm. Res.* 17: 936-941.

Zielenkiewicz, W., Terekhova, I.V., Wszelaka-Rylik, M., Kumeev, R.S. (2010) Thermodynamics of Inclusion Complex Formation of Hydroxypropylated Alpha- and Beta-Cyclodextrins with Aminobenzoic Acids in Water. *J. Thermal Anal. Calorim.* 101: 15-23.

Zoppi, A., Garnero, C., Garro Linck, Y., Chattah, A.K., Monti, G.A., Longhi, M.R. (2011) Enalapril:B-Cd Complex: Stability Enhancement in Solid State. *Carbohyd. Polymers* 86: 716-721.

7. Prilog

Ovaj dodatak sadrži četiri znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazama *Current Contents* ili *Science Citation Indeks-Expandeded* koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

(i) **J. Jablan**, T. Weitner, M. Gabričević, M. Jug, Stability and Structure of Inclusion Complexes of Zaleplon with Natural and Modified Cyclodextrins, *Croat. Chem. Acta*, 84 (2011) 169-178 (**Q4: IF=0.614, 2 citata**).

(ii) **J. Jablan**, G. Szalontai, M. Jug, Comparative Analysis of Zaleplon Complexation with Cyclodextrins and Hydrophilic Polymers in Solution and in Solid State. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 35-44 (**Q2: IF=2.947, 1 citat**)

(iii) **J. Jablan**, I. Bačić, N. Kujundžić, M. Jug, Zaleplon Co-ground Complexes with Natural and Polymeric β-Cyclodextrin, *J. Inc. Phen. Macroc. Chem*., 76 (2013) 353-362 (**Q2: IF= 1.399, 1 citat**).

(iv) M. Jug, **J. Jablan**, K. Köver, T. Weitner, M. Gabričević, Thermodynamic Study of Zaleplon Complexation with Natural and Modified Cyclodextrins, *J. Inc. Phen. Macroc. Chem.* DOI 10.1007/s10847-013-0362-6 (**Q2: IF= 1.399, 0 citata**).

8. Životopis

Jasna Jablan rođena je 14. listopada 1969. godine u Banja Luci, Bosna i Hercegovina. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje (*III. gimnazija*) završila je u Sarajevu. Studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1987. godine. Za vrijeme studija boravila je 3 mjeseca na Institutu za kemiju, *Centre National de la Recherche Scientifique Gif-sur-Yvette*, Paris, Francuska. Diplomski rad izradila je na Zavodu za analitičku kemiju te 1993. godine stekla zvanje diplomirane inženjerke medicinske biokemije.

Tijekom 1994/95. godine odradila je pripravnički staž u medicinsko-biokemijskom laboratoriju doma zdravlja u Sigetu, Zagreb. Od 1997. do 2008. godine zaposlena je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na određeno vrijeme, gdje je sudjelovala u izvođenju praktične i seminarske nastave na Zavodu za analitičku kemiju, Zavodu za opću i anorgansku kemiju, Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, Zavodu za farmakognoziju i Zavodu za organsku kemiju. U tom periodu upisuje te završava Studij farmacije na istom fakultetu te odrađuje pripravnički staž i polaže stručni ispit. Od 15. srpnja 2008. stalno je zaposlena kao asistent na Zavodu za analitičku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje sudjeluje u izvođenju praktične i seminarske nastave na kolegijima tog Zavoda. 2009. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij ”*Farmaceutske znanosti*” na istom fakultetu. U svom znanstvenom radu bavi se primjenom termičkih (DSC i TG) i spektroskopskih (UV/VIS, FTIR, XRPD, ^{1}H-NMR i ^{13}C-CP MAS) metoda u karakterizaciji inkluzijskih kompleksa lijeka i ciklodekstrina te razvija i provodi tehnološku karakterizaciju novih terapijskih sustava baziranih na inkluzijskim kompleksima.

Do sada je kao autor/koautor objavila četiri znanstvena rada u časopisima citiranim u bazi *Current Contents* te je aktivno sudjelovala na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima s 14 posterskih i dva usmena priopćenja. Članica je *Hrvatskog farmaceutskog društva*. Udana je i majka dvoje djece.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorska disertacija

OBLIKOVANJE I VREDNOVANJE CIKLODEKSTRINSKIH TERAPIJSKIH SUSTAVA ZA ORALNU PRIMJENU ZALEPLONA

Jasna Jablan

SAŽETAK

Nesanica je jedan od najčešćih poremećaja spavanja koji zahvaća oko 30% odrasle populacije, a značajno je češći kod starije populacije i psihičkih bolesnika. Zahvaljujući svojim farmakološkim svojstvima, zaleplon je hipnotik izbora za kratkotrajno liječenje nesanice. Međutim, slaba topljivost i razgradnja u jetri ograničavaju mu oralnu bioraspoloživost na samo 30%. Stoga je cilj ovog rada pripremom inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima poboljšati topljivost lijeka u vodi, a uklapanjem u oblik s kontroliranim oslobađanjem razviti novi terapijski sustav koji bi mogao značajno unaprijediti terapijsku učinkovitost ovog lijeka.

Spektrofluorimetrijska i solubilizacijska ispitivanja su pokazala da β-ciklodekstrin sa zaleplonom stvara komplekse prikladne stabilnosti, no topljivost nastalog kompleksa je ograničena. Od kemijski modificiranih derivata, nasumično metilirani β-ciklodekstrin se pokazao najprikladnijim, dok je topljivost i stabilnost inkluzijskih kompleksa zaleplona sa sulfobutil-β-ciklodekstrinom i hidroksipropil-β-ciklodekstrinom nešto niža. Nastajanje inkuzijskih kompleksa s navedenim derivatima ciklodekstrina je potvrđeno primjenom ^{1}H NMR spektroskopije, a određena je i njihova struktura. Sustav karakterizira istovremeno prisustvo dva načina vezanja. Prvi, dominantni način uključuje inkluziju fenilnog prstena molekule zaleplona u centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina, a drugi inkluziju pirazolo[1,5-a] pirimidinskog prstena molekule lijeka, dok je nastajanje kompleksa višeg reda isključeno. Termodinamička ispitivanja su pokazala da je nastajanje kompleksa zaleplona s β-ciklodekstrinom i njegovim metiliranim i hidroksipropiliranim derivatima entalpijom uvjetovani proces, dok je kompleksiranje lijeka sa sulfobutil-β-ciklodekstrinom entropijom vođen proces. U oba slučaja riječ je o spontanom procesu.

Dodatkom hipromeloze je značajno povećan solubilizacijski potencijal metiliranog β-ciklodekstrina uslijed nastajanja ternarnih kompleksa lijek-ciklodekstrin-polimer, dok hidrofilni polimeri nisu utjecali na topljivost i stabilnost kompleksa zaleplona s β-ciklodekstrinom. Binarni i ternarni kompleksi zaleplona s navedenim ciklodekstrinima i hidrofilnim polimerima u čvrstom stanju pripremljeni su tehnikom sušenja raspršivanjem. Diferencijalna pretražna kalorimetrija, difrakcija rentgenskih zraka na prašku te pretražna elektronska mikroskopija su pokazale djelomičnu amorfizaciju lijeka u binarnim i ternarnim kompleksima s β-ciklodekstrinom, dok su kompleksi s metiliranim-β-ciklodekstrinom bili u potpunosti amorfne strukture. Binarni kompleksi s metiliranim-β-ciklodekstrinom te ternarni kompleksi s metiliranim-β-ciklodekstrinom i hipromelozom bili su najučinkovitiji u povećanju topljivosti zaleplona u odnosu na ostale komplekse. Korištenjem manitola kao topljivog punila te ternarnog kompleksa zaleplona s metiliranim β-ciklodekstrinom i hipromelozom pripremljene su tablete koje omogućuju oslobađanje doze lijeka u samo 5 minuta, osiguravajući brz početak djelovanja lijeka. Topljivi kompleksi zaleplona s u vodi topljivim, polimernim derivatom ciklodekstrina su pripremljeni i tehnikom mljevenja u vibracijskim mikromlinovima. Nakon 90 minuta mljevenja pri frekvenciji od 24 Hz dobiven je amorfni produkt koji otapanjem u vodi prelazi u inkluzijski kompleks, što je dokazano ^{1}H-NMR spektroskopijom.

Primjenom tehnike sušenja raspršivanjem pripremljene su mikrosfere s pH ovisnim oslobađanjem zaleplona kao novi terapijski sustav za liječenje nesanice koju karakterizira prerano buđenje te nemogućnost naknadnog usnivanja. Matriks koji sadrži 80% Eudragita S100 i 20% glicerolmonostearata pokazao se optimalnim u sprječavanju neželjenog oslobađanja lijeka pri nižim pH-vrijednostima medija, dok je uklapanjem 50% doze lijeka u obliku inkluzijskog kompleksa s metiliranim β-ciklodekstrinom osigurano potpuno oslobađanje lijeka u umjetnom crijevnom mediju, kinetikom nultog reda (k_0=155 μg/min).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 170 stranica, 63 grafičkih prikaza, 21 tablicu i 213 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: zaleplon, ciklodekstrini, inkluzijski kompleksi, topljivost, sušenje raspršivanjem, Eudragit, mikrosfere, oslobađanje lijeka

Mentor: **Dr. sc. Mario Jug**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Nikola Kujundžić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić,** *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, *znanstveni savjetnik Pliva-Istraživanje i razvoju Zagrebu.*

Rad prihvaćen:

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Analitical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

FORMULATION AND EVALUATION OF CYCLODEXTRIN-BASED DRUG DELIVERY SYSTEM FOR ORAL APPLICATION OF ZALEPLON

Jasna Jablan

SUMMARY

Insomnia is one of the most common sleep disorders affecting about 30% of adult population, while its prevalence is even higher among elderly and psychiatric patients. Pharmacological properties makes zaleplon the drug of choice for the short term treatment of insomnia, but its low aqueous solubility and intensive metabolism in liver are reducing its oral bioavailability to only 30%. Therefore, the aim of this work was to improve aqueous solubility of zaleplon through inclusion complexation and to develop a novel drug delivery system able to enhance its therapeutical efficiency.

Spectrofluorimetric and phase solubility studies showed that parent β-cyclodextrin forms stable inclusion complexes with zaleplon, but aqueous solubility of the complexes formed was limited. Among chemically modified β-cyclodextrin derivatives, randomly methylated derivative was the most efficient, while the solubility and stability of zaleplon complexes with sulphobutyl- and hydroxypropyl-β-cyclodextrin was less pronounced. The inclusion complex formation in all cases was confirmed by ^{1}H-NMR spectroscopy. The structure of the complexes formed was characterised by the presence of two different binding modes which existed simultaneously in the solution. The first and the dominant one occurs through inclusion of phenyl moiety of the drug into central cavity of cyclodextrin molecule, while the other involves the inclusion of the pyrazolo[1,5-a]pyrimidine ring of the drug. The formation of higher order complexes was not demonstrated. Thermodynamic studies showed that complexation of zaleplon with β-cyclodextrin and its randomly methylated and hydroxypropylated derivatives was enthalpy driven, while entropy driven complexation was observed in case of sulphobutyl-β-cyclodextrin. In all cases, inclusion complex formation was a spontaneous process.

Addition of hypromellose enhanced significantly the solubilising and complexing potential of randomly methylated β-cyclodextrin due to ternary complex formation, while hydrophilic polymers had no effect on solubility and stability of zaleplon complexes with parent β-cyclodextrin. Binary and ternary zaleplon complexes with cyclodextrins and polymers tested were prepared by spray-drying. Differential scanning calorimetry, X-ray powder diffractometry and scanning electron microscopy showed only partial drug amorphization of the drug in binary and ternary complexes with β-cyclodextrin, while all complexes with randomly methylated β-cyclodextrin were completely amorphous. The inclusion complex formation in spray-dried products was confirmed by the solid state NMR. Binary and ternary complexes with randomly methylated β-cyclodextrin and hypromellose were the most efficient in increasing the dissolution rate of zaleplon. The use of mannitol as a soluble filler and ternary inclusion complex with randomly methylated β-cyclodextrin and hypromellose allowed formulation of tablets which released the complete drug dose in 5 minutes, providing fast onset of drug action. Highly soluble zaleplon complexes with soluble, polymeric β-cyclodextrin derivative were also prepared by co-grinding in high energy vibrational micromill. Co-grinding at frequency of 24 Hz resulted in an amorphous product which is readily soluble in water, forming inclusion complexes as demonstrated by ^{1}H-NMR spectroscopy.

Spray-drying technique was used to prepare pH-responsive zaleplon microspheres with delayed release properties as a novel drug delivery system for treatment of specific type of insomnia characterised with premature awaking and inability to fall asleep again. Matrix containing 80% of Eudragit S100 and 20% of glycerol monostearate

was demonstrated to be optimal, preventing the drug release at high pH-values. The incorporation of 50% of the drug dose in form of binary inclusion complex with randomly methylated β-cyclodextrin ensured complete drug release in simulated intestinal media, with the zero-order release rate (k_0=155 μg/min).

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 170 pages, 63 figures, 21 tables and 213 references. Original is in Croatian language.

Keywords: zaleplon, cyclodextrins, inclusion complexes, solubility, spray-drying, Eudragit, microspheres, pH-dependent drug release

Mentor: **Mario Jug**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Nikola Kujundžić, Ph.D. *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biserka Cetina-Čižmek, **Ph.D.** */Seniour Scientist, Pliva – Research and Development, Zagreb*

The thesis was accepted: