

Poboljšanje topljivosti nabumetona uslijed kompleksiranja s odabranim ciklodekstrinima

Jukić, Nino

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:227666>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Nino Jukić

Poboljšanje topljivosti nabumetona uslijed kompleksiranja s odabranim ciklodekstrinima

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc.
Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Davida Klarića, mag. chem.

Zahvale

Zahvaljujem se profesorici Nives Galić koja mi je omogućila izradu diplomskog rada na analitičkom zavodu Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta u ovim teškim i neizvjesnim vremenima. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, vremenu i cjelokupnom trudu.

Zahvaljujem se svom neposrednom voditelju Davidu Klariću koji mi je uvelike olakšao pisanje ovog diplomskog rada zahvaljujući strpljenju, davanju brojnih savjeta, uputa i stručne pomoći. Hvala na svemu.

Zahvaljujem se svim kolegama s faksa koji su mi tijekom studentskog života postali prijatelji. Hvala Petri Stanić (P.S.) i Luciji Podrug (Koka) na svakoj kavi, tračevima, druženju, nezaboravnim vožnjama u mom autu, izlascima, učenju u knjižnici, druženju na praktikumima, jelima u menzi i u Submarine (P.S.), objašnjavanju gradiva, sudjelovanju u prezentacijama i još puno toga.

Hvala Dori Glavaš ex Marković (D.M, a sad je D.G., viša klasa „Dolce & Gabbana“) na najboljoj svadbi na kojoj sam bio dosad, putovanju u Međugorje 2015. koje je bilo nezaboravno i što si mi bila kolegica na faksu 2014. i 2015. Hvala ti i što si nagovorila Luciju da sjedne na prvi sat fizike pored mene jer si joj rekla: „ovaj mi se čini pametan, mogli bi sjesti kod njega“.

Hvala i Klari Karadakić čije je druženje započelo 2014, završilo 2015., a nastavilo se tek 2020.

Hvala i mojim prijateljicama Ivi, Emi, Sari na svakom razgovoru, svim kavama, druženjima i izlascima. Hvala Iva na svim palačinkama, hamburgerima i pizzama koje smo jeli kad su bila krizna studentska vremena.

Hvala i najjačim sestrama u naselju Maksimir, Mariji i Kristini Vorih (M.V i K.V.) na svim savjetima koje ste mi dale. Naše intenzivno druženje započelo je 2017., a vjerujem da će se nastaviti i dalje.

Veliko hvala mom najboljem prijatelju i kumu Valentinu koji je pratio moje školovanje od 2002. do 2021., svaku ocjenu koju sam dobio u osnovnoj, srednjoj i svaki polozeni kolegij na faksu. Hvala i na svim druženjima od djetinjstva, pomaganju, slušanju i rješavanju mnogih problema.

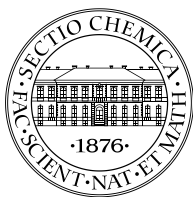
I na kraju jedno veliko hvala mojim roditeljima i sestri bez kojih ovo sve ne bi bilo moguće. Hvala Vam na podršci kroz cjelokupno studiranje, što ste vjerovali u mene i podupirali me onda kada je bilo najteže. Hvala što ste sa mnom slavili sve lijepe trenutke i na svoj ljubavi koju ste mi pružili kroz čitav život.

Volim vas.

Sadržaj

| | |
|---|------------|
| SAŽETAK..... | X |
| ABSTRACT | XII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 4 |
| 2.1. Nesteroidni protuupalni lijekovi..... | 4 |
| 2.2. Nabumeton..... | 5 |
| 2.3. Biofarmaceutski sustav klasifikacije | 7 |
| <i>2.3.1. Djelatne tvari skupine II biofarmaceutskog sustava klasifikacije.....</i> | <i>9</i> |
| 2.4. Ciklodekstrini | 14 |
| <i>2.4.1. Povijest otkrića ciklodekstrina.....</i> | <i>14</i> |
| <i>2.4.2. Struktura i svojstva ciklodekstrina.....</i> | <i>15</i> |
| <i>2.4.3. Toksikologija i farmakokinetika ciklodekstrina</i> | <i>19</i> |
| <i>2.4.4. Primjena ciklodekstrina u farmaciji.....</i> | <i>20</i> |
| 2.5. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina | 21 |
| <i>2.5.1. Priprava inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina mehanokemijskom aktivacijom.....</i> | <i>24</i> |
| <i>2.5.2. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju.....</i> | <i>29</i> |
| 2.6. Analiza poboljšanja topljivosti (solubilizacijska ispitivanja)..... | 32 |
| <i>2.6.1. Dijagrami topljivosti.....</i> | <i>33</i> |
| <i>2.6.2. Konstanta stabilnosti.....</i> | <i>35</i> |
| <i>2.6.3. Efikasnost kompleksiranja</i> | <i>36</i> |
| 2.7. Spektroskopske tehnike | 37 |
| <i>2.7.1. UV/Vis apsorpcijska spektroskopija</i> | <i>38</i> |
| <i>2.7.2. Fluorescencijska spektroskopija</i> | <i>41</i> |
| <i>2.7.3. Infracrvena spektroskopija.....</i> | <i>44</i> |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 47 |
| 3.1. Kemikalije i materijali..... | 47 |
| <i>3.1.1. Priprava otopine biorelevantnog medija (simulirani želučani medij, pH = 1,0).....</i> | <i>47</i> |
| <i>3.1.2. Priprava otopine biorelevantnog medija (simulirani duodenalni medij, pH = 4,5).....</i> | <i>47</i> |
| <i>3.1.3. Priprava otopine biorelevantnog medija (simulirani intestinalni medij, pH = 6,8).....</i> | <i>48</i> |
| 3.2. Instrumentacija | 48 |
| 3.3. Kvantitativno određivanje nabumetona | 49 |
| 3.4. Priprema suspenzija za analizu poboljšanja topljivosti | 50 |

| | |
|--|-------------|
| 3.4.1. Analiza saturacijske topljivosti | 52 |
| 3.5. Priprema uzoraka nabumetona i odabranih ciklodekstrina u čvrstom stanju | 53 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 55 |
| 4.1. Analiza poboljšanja topljivosti (solubilizacijska ispitivanja)..... | 55 |
| 4.1.1. Analiza poboljšanja topljivosti UV/Vis spektrofotometrijskom metodom..... | 55 |
| 4.1.2. Analiza poboljšanja topljivosti spektrofluorimetrijskom metodom..... | 60 |
| 4.2. Određivanje konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja..... | 65 |
| 4.3. Analiza saturacijske topljivosti..... | 71 |
| 4.4. Karakterizacija uzoraka nabumetona i odabranih ciklodekstrina u čvrstom stanju IR spektroskopijom..... | 72 |
| 4.4.1. Uzorci nabumetona..... | 73 |
| 4.4.2. Uzorci β -ciklodekstrina..... | 73 |
| 4.4.3. Uzorci sulfobutileter- β -ciklodekstrina | 74 |
| 4.4.4. Uzorci nabumetona i β -ciklodekstrina | 75 |
| 4.4.5. Uzorci nabumetona i sulfobutileter- β -ciklodekstrina | 79 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 83 |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 85 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI..... | 86 |
| § 8. DODATAK..... | XIII |
| § 9. ŽIVOTOPIS | XXI |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

POBOLJŠANJE TOPLJIVOSTI NABUMETONA USLIJED KOMPLEKSIRANJA S ODABRANIM CIKLODEKSTRINIMA

Nino Jukić

Nabumeton je nesteroidni protuupalni predlijek koji se u jetri metabolizira u svoj farmakološki aktivan oblik, 6-metoksi-2-naftiloctenu kiselinu koja djeluje kao inhibitor enzima ciklooksigenaza. Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari nabumeton spada u lijekove skupine II (slaba topljivost, dobra permeabilnost). Utvrđeno je da se topljivost nabumetona u vodi i u biorelevantnim medijima povećava ukoliko je kompleksiran s ciklodekstrinom. U sklopu ovog diplomskog rada istražen je utjecaj β -ciklodekstrina i njegovog alkilsulfoniranog derivata, sulfobutileter- β -ciklodekstrina na topljivost nabumetona u vodi i u biorelevantnim medijima. Kvantitativno određivanje nabumetona provedeno je UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom i fluorescencijskom spektroskopijom uz pomoć prethodno razvijenih i validiranih metoda. Pripravljene su uzorci nabumetona i navedenih ciklodekstrina u čvrstom stanju mljevenjem u visokoenergijskim vibracijskim mlinovima te su okarakterizirani primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom te tehnike prigušene totalne refleksije. Uzorcima pripremljenim u čvrstom stanju ispitana je topljivost te je uspoređena s intrinzičnom topljivošću nabumetona u vodi.

(88 + XXI stranica, 44 slike, 23 tablice, 53 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ciklodekstrini, inkluzijski kompleksi, nabumeton, topljivost

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Neposredni voditelj: David Klarić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 1. veljače 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

ENHANCEMENT OF NABUMETONE SOLUBILITY BY COMPLEXATION WITH SELECTED CYCLODEXTRINS

Nino Jukić

Nabumetone is a nonsteroidal anti-inflammatory prodrug which is metabolized in the liver to its pharmacological active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid which acts as cyclooxygenase inhibitor. According to the Biopharmaceutical Classification System nabumetone is categorized as class II compound (low solubility, high permeability). Studies have shown that solubility of nabumetone in water and biorelevant media increases if complexed with cyclodextrin. Effect of β -cyclodextrin and its alkyl sulfonated derivative sulfobutylether- β -cyclodextrine on solubility of nabumetone in water and biorelevant media was studied in this thesis. Nabumetone was quantitatively determined by developed and validated UV/Vis spectrophotometric and spectrofluorimetric methods. Samples of nabumetone and mentioned cyclodextrins in the solid state were prepared in high-energy vibrational mills and were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy and attenuated total reflectance. Samples prepared in the solid state were analyzed and compared with intrinsic solubility of nabumetone in water as well.

(88 + XXI pages, 44 figures, 23 tables, 53 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: cyclodextrins, inclusion complexes, nabumetone, solubility

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor

Assistant mentor: David Klarić, mag. chem.

Reviewers:

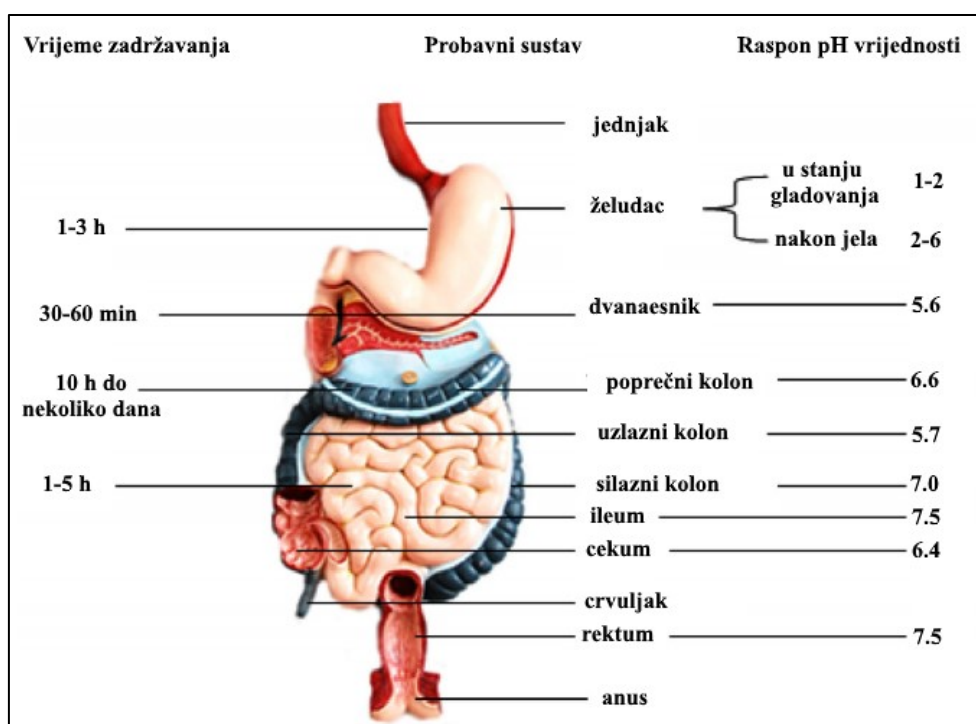
1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 1. February 2021.

§ 1. UVOD

Lijekom se smatra svaki kemijski spoj koji utječe na organizam i njegove procese, a čija je namjena dijagnoza, liječenje, suzbijanje ili prevencija bolesti.¹

Danas najčešći i najpopularniji način primjene lijekova je oralnim putem jer lijekovi za oralnu primjenu osiguravaju točnost doziranja i omogućuju modifikaciju mjesta i brzine oslobađanja lijeka sukladno terapijskim potrebama. Postoje ograničenja oralne primjene lijekova koja uključuju kemijsku nestabilnost lijeka u probavnom sustavu koja je uzrokovana pH posredovanom i enzimskom razgradnjom lijeka te nisku permeabilnost lijeka kroz sluznicu gastrointestinalnog sustava što rezultira niskom bioraspoloživošću.



Slika 1. Građa gastrointestinalnog sustava s prikazanim vremenima zadržavanja lijeka i pH vrijednostima u njegovim različitim dijelovima²

Na slici 1 prikazan je prolazak lijeka kroz gastrointestinalni sustav kojeg karakteriziraju drastične promjene pH-vrijednosti. U želucu je pH izuzetno nizak (1 – 3), u dvanaesniku je pH nešto viši u odnosu na želudac (5 – 6), a u većem dijelu tankog crijeva je neutralan (oko

7). Također, u sklopu gastrointestinalnog sustava postoji velik broj enzima koji značajno utječu na kemijsku stabilnost lijeka i utječu na proces probave, a među njima su enzimi proteaze i lipaze.³

Ograničena oralna bioraspoloživost, a posljedično i terapijski potencijal nekih lijekova može biti uzrokovana njihovom slabom topljivošću. Razvojem novih terapijskih sustava lijekova za oralnu primjenu moguće je povećati oralnu bioraspoloživost i terapijsku učinkovitost takvih lijekova. Oni bi djelatnu tvar trebali dopremiti na ciljno mjesto u potrebnoj dozi te osigurati njenu stabilnost u gastrointestinalnom sustavu. Jedna od strategija prilikom dizajna novih terapijskih sustava temelji se na tvorbi supramolekulskih kompleksa djelatne tvari s ciklodekstrinskim makromolekulama.

Nabumeton je nesteroidni protuupalni predlijek koji se koristi u liječenju reumatoidnog artritisa, osteoartritisa te za akutne ozljede mekog tkiva.⁴ Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari (engl. *biopharmaceutical classification system*, BCS) nabumeton se svrstava u II. skupinu kojoj pripadaju lijekovi slabe topljivosti i dobre permeabilnosti. Kao jedna od mogućih strategija za poboljšavanje topljivosti nabumetona u vodenim otopinama je njegovo kompleksiranje s molekulama ciklodekstrina (CD).

Ranijim istraživanjima utvrđene su interakcije nabumetona s prirodnim ciklodekstrinima (α -, β - i γ -CD) te s derivatima β -CD (hidroksipropil- β -CD i nasumično metilirani β -CD).^{5,6,7,8} Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj β -CD i njegovog alkilsulfoniranog derivata (natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina, SBE β CD) na topljivost nabumetona u vodi te u biorelevantnim medijima. Kvantitativno određivanje nabumetona provedeno je UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom i fluorescencijskom spektroskopijom.

Poznate su različite metode koje se koriste za pripravu inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju, a mehanokemijska aktivacija mljevenjem se izdvaja kao praktična, brza, održiva, visokoučinkovita i ekološki prihvatljiva metoda.⁹ U sklopu ovog istraživanja pripremljeni su uzorci nabumetona i navedenih ciklodekstrina u čvrstom stanju mljevenjem u visokoenergijskim vibracijskim mlinovima. Mljevenje je provedeno uz dodatak malih (katalitičkih) količina otapala tzv. otapalom potpomognuto mljevenje (engl. *liquid assisted grinding*, LG) te bez dodatka otapala tzv. suho mljevenje (engl. *neat grinding*, NG). Primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom te tehnike prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) provedena je karakterizacija pripremljenih uzoraka i mogućih interakcija između nabumetona i ciklodekstrina. Ispitana je

topljivost pripremljenih uzoraka u čvrstom stanju te je uspoređena s intrinzičnom topljivošću nabumetona u vodi.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nesteroidni protuupalni lijekovi

Nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *non steroidal anti-inflammatory drugs*; NSAID) su najčešće korištena grupa lijekova, a koriste se za liječenje bolova, upala i povišene tjelesne temperature. NSAID su lijekovi raznolikog kemijskog sastava i različitih terapijskih učinaka koji imaju tri zajedničke karakteristike: identična osnovna farmakološka svojstva, sličan osnovni mehanizam djelovanja i slične nuspojave. Uglavnom svi lijekovi ove grupe pokazuju kiseli karakter jer su kiseline srednje jakosti s rasponom pK_a -vrijednosti od 3 do 5.

NSAID se mogu podijeliti u nekoliko skupina s obzirom na njihovu strukturu tj. na: derivate anilina i *p*-aminofenola, derivate pirazolona, derivate salicilne, indolactene, propionske, enolne, antranilne, nikotinske i piranokarboksilne kiseline, pirolepirole, koksibe, derivate naftilbutanona, derivate sulfonamida i derivate benzoksazocina. Nabumeton, lijek koji je tema ovog diplomskog rada spada u derivate naftilbutanona. Molekule NSAID sadrže hidrofilne (karboksilna ili enolna grupa) i lipofilne skupine (aromatski prsten, halogeni elementi).⁴

Protuupalno, analgetsko i antipiretsko djelovanje NSAID lijekova posljedica je inhibicije sinteze prostaglandina, vrste signalnih lipidnih molekula. Prostaglandini (podskupina prostanoida) pripadaju eikozanoidima za koje se smatra da su najbitniji medijatori upalnih reakcija. Inhibicija sinteze prostaglandina, ali i eikozanoida općenito, posljedica je inhibicije enzima ciklooksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX) i lipoksigenaze. Ovi enzimi su ključni za biosintezu eikozanoida kroz metabolički put arahidonske kiseline. Ciklooksigenaze mogu postojati u tri izoformna oblika tj. COX-1, COX-2 i COX-3, a oni se razlikuju po svojoj strukturi, funkciji i ekspresiji. To su membranski proteini locirani na površini endoplazmatskog retikuluma i jezgrine ovojnice (uglavnom COX-2). Sve tri izoforme posjeduju uzak hidrofobni kanal koji povezuje katalitičko mjesto u srži enzima s mjestom vezanja za membranu. U gornjoj polovini ovog kanala locirano je vezno mjesto za arahidonsku kiselinu (Arg-120 do Tyr-385). Izoforme COX-1 i COX-2 se međusobno razlikuju po položaju 523, gdje izoforma COX-1 posjeduje izoleucin, a izoforma COX-2 valin koji ostavlja pukotinu koja je dovoljno velika za selektivne COX-2 antagoniste koji prolaze kroz nju i vežu se za svoje vezno mjesto tj. za hidrofilno postranično proširenje enzima.¹⁰

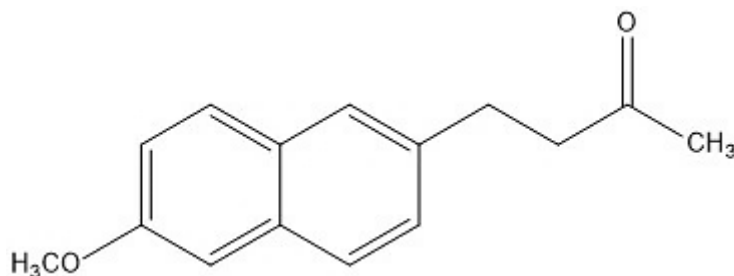
Inhibitori ciklooksigenaze se prema stupnju inhibicije COX-1 i COX-2 dijele na neselektivne inhibitore COX (većina NSAID) i selektivne inhibitore COX-2. Ranije se smatralo da je COX-1 konstitutivna izoforma enzima, dok je COX-2 inducibilna izoforma pomoću koje se sintetiziraju prostaglandini zaslužni za upalne odgovore. S obzirom na to, smatralo se da je djelovanje NSAID posredovano inhibicijom izoforme COX-2, a da su nuspojave izazvane djelovanjem NSAID posljedica inhibicije izoforme COX-1. To je dovelo do razvoja selektivnih inhibitora izoforme COX-2 koji ne posjeduju karboksilne skupine za razliku od klasičnih NSAID. Takvi lijekovi su trebali zadržati analgetski i protuupalni učinak, ali s manje nuspojava na gastrointestinalni trakt za razliku od klasičnih NSAID što su eksperimentalne i kliničke studije i pokazale. Osim toga, pokazalo se da imaju potencijal u liječenju karcinoma debelog crijeva i dojke te Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Novija istraživanja su utvrdila da i COX-1 sudjeluje u upalnim odgovorima te da je COX-2 konstitutivna izoforma u bubrezima, mozgu (hipokampus i kora), leđnoj moždini te u reproduktivnim organima. Nova saznanja o COX-1 i COX-2 izoformama dovela su do zaključka da već spomenuti selektivni inhibitori COX-2 izoforme u nekim slučajevima ne zadovoljavaju potrebe za sigurnijim NSAID lijekovima.¹⁰

2.2. Nabumeton

Nabumeton (NAB) ili 4-(6-metoksinaftalen-2-il)-butan-2-on je nesteroidni protuupalni predlijek. Kao predlijek nabumeton je biološki neaktivna supstanca koja se u jetri metabolizira u svoj farmakološki aktivan oblik, 6-metoksi-2-naftiloctenu kiselinu (6-MNA) koja djeluje kao inhibitor ciklooksigenaza i to najvjerojatnije preferentno kao inhibitor COX-2. Prema nekim istraživanjima 6-MNA pokazuje 3 do 5 puta veću aktivnost prema COX-2 u usporedbi s COX-1 izoformom.¹¹

Nabumeton se koristi za ublažavanje boli pacijenata s osteoartritisom i reumatoidnim artritisom u simptomatskom liječenju upala te za liječenje akutnih ozljeda mekog tkiva. Metabolit 6-MNA je u sklopu biotransformacije lijeka gotovo sav konjugiran i manje od 1 % aktivne forme se izlučuje putem urina, čime su probavni sustav i bubrezi rijetko oštećeni korištenjem nabumetona. Zbog takvog načina djelovanja i biotransformacije u organizmu, nabumeton prvo djeluje protuupalno, a zatim kao analgetik. Nabumeton u manjoj mjeri može utjecati na agregaciju trombocita i može izazvati kromosomsku aberaciju (promjenu u strukturi kromosoma zbog promjena u procesu mitoze i mejoze) u limfocitima.⁴

Nabumeton je keton, a struktura mu je prikazana na slici 2. Molekulska formula nabumetona je $C_{15}H_{16}O_2$, a molarna masa iznosi $228,29 \text{ g mol}^{-1}$.



Slika 2. Strukturna formula nabumetona

Tri glavna metabolička puta nabumetona su oksidativno cijepanje bočnog lanca nabumetona čime se dobiva farmakološki aktivan oblik 6-MNA, *O*-demetilacija i redukcija ketona do alkohola čime se dobivaju dodatni metaboliti.

Iako sam nabumeton kao nekiseli predlijek ne uzrokuje iritaciju želučane sluznice, njegov aktivni metabolit 6-MNA može uzrokovati dispepsiju i mučninu. Oralnom administracijom nabumeton se lako apsorbira iz gastrointestinalnog trakta u presistemsku cirkulaciju. Nabumeton se nikada u urinu ne izlučuju nepromijenjen. U urinu su pronađeni slobodna, konjugirana 6-MNA kao i njezin *O*-demetilirani metabolit, ali se ipak $< 1 \%$ ukupne doze nabumetona urinom izlučuje u obliku glavnog aktivnog metabolita 6-MNA. Ukupno 80% primijenjene doze nabumetona se izlučuje urinom, a oko 10% izmetom.

Za razliku od uobičajenih neselektivnih inhibitora COX koji često pokazuju nepovoljan utjecaj na sluznicu gastrointestinalnog trakta u vidu krvarenja te nastanka perforacija i čireva, nabumeton i njegov aktivni metabolit 6-MNA pokazuju višestruko manji utjecaj na sluznicu gastrointestinalnog trakta. Pretpostavlja se da su za to zaslužna neka farmakološka svojstva nabumetona poput formulacija u obliku nekiselog predlijeka, manjka enterohepatičke recirkulacije i preferentne inhibicije COX-2. Iako se isprva mislilo da je uzrok nepovoljnog utjecaja neselektivnih inhibitora COX na sluznicu gastrointestinalnog trakta inhibicija COX-1 aktivnosti u želučanoj sluznici, novija eksperimentalna i klinička istraživanja ne potvrđuju ovu hipotezu. Misli se da je mehanizam utjecaja neselektivnih inhibitora COX na gastrointestinalni trakt kompleksniji nego što se isprva pretpostavljalo.

Slično kao i u slučaju ostalih inhibitora COX nabumeton se pokazao učinkovitim kod smanjenja boli i upala pacijenata koji boluju od osteoartritisa. Djelovanje nabumetona

uspoređeno je s djelovanjem tradicionalnih NSAID lijekova poput diklofenaka, aspirina, indometacina i naproksena, pri čemu je utvrđeno da je nabumeton jednako efikasan. Kod pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisa (čak i kod mlađe populacije) nabumeton se pokazao učinkovitim kod smanjenja boli, upala i ukočenosti. Klinička učinkovitost nabumetona kod ovih pacijenata je usporediva s aspirinom, ibuprofenom, naproksenom, piroksikamom i diklofenakom. U usporedbi s tradicionalnim NSAID lijekovima poput aspirina, indometacina i diklofenaka nabumeton je uzrokovao manje nuspojave vezanih za gastrointestinalni trakt. Kod pacijenata s ozljedama mekog tkiva koje su nastale kao posljedica bavljenja sportom nabumeton se pokazao jednako učinkovitim kao i aspirin, ibuprofen i naproksen.¹¹

2.3. Biofarmaceutski sustav klasifikacije

Biofarmaceutski sustav klasifikacije je sustav kategorizacije djelatnih tvari koji je prvi put predložen 1995. godine u sklopu istraživanja koje su objavili Amidon i sur. Danas je ovaj sustav kategorizacije djelatnih tvari odobren od strane mnogih regulatornih tijela poput Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) te Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *United States Food And Drug Administration*, FDA) te je inkorporiran u smjernice za odobravanje izuzimanja obveze od provođenja *in vivo* ispitivanja bioekvivalencije (engl. *biowaiver*) kao što je npr. *ICH M9 on BCS biowaivers*. Danas ovaj sustav kategorizacije djelatnih tvari ima zadaću unaprijediti učinkovitost prilikom razvoja djelatnih tvari i njihovih farmaceutskih formulacija te pomoći u predviđanju farmakokinetičkog ponašanja djelatnih tvari *in vivo* na temelju određivanja topljivosti i permeabilnosti *in vitro*.

Prema BCS-u djelatne tvari se kategoriziraju prema topljivosti u vodi i permeabilnosti kroz membrane probavnog sustava (tablica 1). Skupini I pripadaju lijekovi dobre topljivosti i dobre permeabilnosti, skupini II lijekovi slabe topljivosti i dobre permeabilnosti, skupini III lijekovi dobre topljivosti i slabe permeabilnosti, a skupini IV lijekovi slabe topljivosti i slabe permeabilnosti.¹²

Tablica 1. Prikaz biofarmaceutskog sustava klasifikacije lijekova¹⁸

| BCS skupina | Topljivost | Permeabilnost | Apsorpcija djelatne tvari |
|-------------|------------|---------------|---------------------------|
| I | dobra | dobra | dobra |
| II | slaba | dobra | dobra |
| III | dobra | slaba | promjenjiva |
| IV | slaba | slaba | slaba |

Podjela djelatnih tvari u četiri odvojene skupine na temelju njihovih svojstava topljivosti i permeabilnosti zapravo predstavlja podjelu djelatnih tvari u skupine koje odgovaraju različitim očekivanim *in vivo-in vitro* korelacijama (IVIVK).¹² Ovaj pojam prema USFDA definiciji predstavlja predviđajući matematički model koji opisuje odnos između neke *in vitro* karakteristike farmaceutske formulacije te relevantnog *in vivo* odgovora koji je izazvan kao posljedica djelovanja te farmaceutske formulacije. Najčešće se taj odnos uspostavlja za brzinu ili opseg otapanja/oslobađanja (engl. *dissolution*) djelatne tvari iz farmaceutske formulacije *in vitro* i koncentracije djelatne tvari u plazmi (ili količine apsorbirane djelatne tvari). Glavna svrha uspostave ovakvih korelacija je smanjenje opsega ili neprovođenje *in vivo* ispitivanja bioraspodivnosti tijekom razvijanja farmaceutskih formulacija budući da se bioraspodivnost može procijeniti na temelju spomenutih *in vitro* ispitivanja.^{13,14}

Dozvola za izuzimanje obveze od provođenja *in vivo* ispitivanja bioekvivalencije se dodjeljuje za farmaceutske formulacije djelatnih tvari BCS skupine I s trenutnim oslobađanjem djelatne tvari (engl. *immediate release*). Ovakve formulacije moraju zadovoljavati uvjete dobre topljivosti i permeabilnosti te velike brzine oslobađanja djelatne tvari, a uz to ne smiju sadržavati bilo kakve pomoćne tvari (ekscipijente) koji mogu utjecati na brzinu i opseg apsorpcije djelatne tvari u organizmu. Dozvola za izuzimanje obveze od provođenja *in vivo* ispitivanja bioekvivalencije se u nekim slučajevima može dodijeliti za farmaceutske formulacije s trenutnim oslobađanjem djelatne tvari BCS skupine III.¹²

Prema smjernicama USFDA iz 2017. godine djelatna tvar se smatra dobro topljivom ako se njena najveća doza može otopiti u manje od 250 mL vodenog medija pri rasponu pH vrijednosti 1 – 6,8 i temperaturi 37 ± 1 °C.¹² Volumen od 250 mL odgovara volumenu jedne čaše vode koja se konzumira tijekom primjene lijeka oralnim putem. Prema smjernicama WHO topljivost djelatne tvari se određuje pri rasponu pH vrijednosti 1,2 – 6,8, a prema EMEA pri rasponu pH vrijednosti 1 – 8.¹⁵

Djelatna tvar smatra se dobro permeabilnom ukoliko njen opseg intestinalne apsorpcije nakon oralne primjene iznosi 85 % ili više u usporedbi s referentnom intravenskom dozom. Ukoliko se govori o predlijeku tada se permeabilnost određuje s obzirom na biotransformaciju predlijeka u lijek (aktivan oblik). Ukoliko do biotransformacije dolazi nakon intestinalne apsorpcije tada se permeabilnost određuje za predlijek, no ukoliko do biotransformacije dolazi prije intestinalne apsorpcije permeabilnost se određuje za aktivan oblik lijeka.¹²

Većina istraživanja otapanja u biorelevantnim medijima se odnosi na djelatne tvari skupine II koji pokazuju ograničenu apsorpciju nakon oralne primjene zbog niske brzine i dosega otapanja. Brzina otapanja tih spojeva ovisi o pH, površinski aktivnim tvarima, kapacitetu pufera, ionskoj jakosti, volumenu tekućine i rezultirajućoj hidrodinamici. Dosadašnja istraživanja su pokazala kako ne postoji univerzalni biorelevantni medij koji bi se mogao koristiti za predviđanje otapanja djelatne tvari ili brzine i opsega oslobađanja djelatne tvari iz farmaceutске formulacije *in vivo*.¹²

2.3.1. Djelatne tvari skupine II biofarmaceutskog sustava klasifikacije

Pojam topljivosti se definira kao najveća količina neke tvari koja se može otopiti u nekoj količini otapala pri određenoj temperaturi.¹⁶ U farmaceutskom kontekstu topljivost se definira kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama djelatne tvari. Kvantitativne karakteristike predstavljaju maksimalnu količinu djelatne tvari koju je moguće otopiti u određenom volumenu otapala pri konstantnoj temperaturi. Kvalitativne karakteristike odnose se na međudjelovanje dviju ili više tvari koje oblikuju homogenu disperziju određene farmaceutске formulacije.¹⁷

Bioraspoloživost je definirana kao omjer koncentracije djelatne tvari koja nepromijenjena dopijeva u krvotok bilo kojim putem i koncentracije djelatne tvari u krvi nakon intravenske primjene. Bioraspoloživost nakon intravenske primjene iznosi 1 (100 %), dok je za druge načine primjene uglavnom manja od 1.¹⁸

Kao što je već i spomenuto lijekovi skupine II BCS-a su slabo topljivi i dobro permeabilni. Gotovo 90 % novorazvijenih lijekova,¹² a 40 % komercijalno dostupnih IR farmaceutskih formulacija (topljivost $< 100 \mu\text{g mL}^{-1}$)¹⁹ čine slabo topljivi spojevi koji se svrstavaju u BCS skupine II i IV. Za lijekove skupine II i djelomično skupine IV, bioraspoloživost je povezana s njihovom brzinom otapanja/oslobađanja, a ona je ovisna o samoj topljivosti lijeka. Prema tome, lijekovima BCS skupine II potrebno je poboljšati

topljivost kako bi im se povećala *in vivo* bioraspoloživost. Pritom se koriste različite strategije kao što su primjerice prevođenje djelatnih tvari u amorfnu stanje, kristalne modifikacije djelatnih tvari, micelarna solubilizacija, smanjenje veličine (mikronizacija) čestica djelatnih tvari, pH modifikacije, tvorba prezasićenih sustava za dostavu lijeka u organizam, kompleksiranje s ciklodekstrinima,^{12,19} što je ujedno i tema ovog diplomskog rada. Ciklodekstrini mogu poboljšati oralnu bioraspoloživost lijekova BCS skupina II i IV, dok na lijekove BCS skupine III gotovo da i nemaju utjecaj. Kod lijekova BCS skupine I mogu imati negativan utjecaj na bioraspoloživost.²⁰

Ispravan odabir strategije za poboljšanje topljivosti slabo topljivih lijekova u vodi je od ključne važnosti za dizajn formulacije djelatne tvari koja će osigurati njenu dobru bioraspoloživost, smanjenje doziranja djelatne tvari i niže troškove proizvodnje. Odabir odgovarajuće metode ovisi o svojstvima djelatne tvari poput topljivosti, kemijskih i fizikalnih karakteristika, farmakokinetike, mjesta apsorpcije te regulatornih zahtjeva poput dopuštene maksimalne dnevne doze djelatne tvari i/ili pomoćnih tvari i slično.²¹ Neke od strategija povećanja topljivosti djelatnih tvari uključuju:

Kristalne modifikacije

➤ metastabilni polimorfi:

Polimorfija je pojava koju vežemo uz proces kristalizacije neke tvari. Ukoliko prilikom kristalizacije dođe do nastanka više kristalnih oblika možemo reći da ta tvar kristalizira u obliku više polimorfa.²²

Velika većina lijekova može kristalizirati u nekoliko polimorfa, a svaki se razlikuje po energiji i pokazuje različita fizikalno-kemijska svojstva (gustoća, topljivost, stabilnost i temperatura tališta). Razlike u topljivosti polimorfa mogu biti značajne te je priprema metastabilnih polimorfa učinkovit način povećanja topljivosti djelatne tvari, no bitno je naglasiti da metastabilni polimorfi u nekom trenutku uglavnom prelaze u termodinamički stabilnije forme. Takve prijelaze između više kristalnih formi nužno je pratiti tijekom proizvodnje i skladištenja djelatne tvari kako bi se osigurala njena reproducibilna bioraspoloživost prilikom oralne primjene.¹⁹

➤ priprava kristalnih soli:

Gotovo 70 % postojećih djelatnih tvari može biti ionizirano, a većina njih su slabo bazični spojevi. Topljivost takvih lijekova je pH ovisna, pri čemu su slabo kiseli lijekovi bolje topljivi pri uvjetima $\text{pH} > \text{p}K_a$, a slabo bazični pri $\text{pH} < \text{p}K_a$. Pripravom soli slabo kiselih ili bazičnih lijekova može se povećavati njihova topljivost i brzina otapanja. Soli nastaju prijenosom protona s kiselina na bazu. Protuion soli osigurava povoljne pH uvjete nakon otapanja u vodi (dolazi do promjene pH u difuzijskom sloju na površini čestice soli) čime se postiže veća brzina otapanja soli u usporedbi sa slobodnim djelatnim tvarima. Prevođenjem u soli poboljšava se kristaliničnost, stabilnost i omogućava lakša farmaceutska prerada lijekova.^{19,23}

➤ priprava kokristala:

Priprava kokristala je moguća za lijekove koji nisu ionizirani pri fiziološkom pH. Kokristal je kristalni materijal kojeg čine najmanje dvije komponente. Farmaceutski kokristal se sastoji od djelatne tvari i konformera (molekule gosta) koji su u stehiometrijskom omjeru. U većini slučajeva prilikom priprave stabilnog kokristala dolazi do nastanka nekovalentnih interakcija poput vodikovih veza (kiselina-amid, kiselina-kiselina i amid-amid interakcije). Poboljšanje topljivosti lijeka pripravom kokristala postiže se zbog sniženja energije kristalne rešetke i većeg afiniteta prema otapalu.^{19,23}

Smanjenje veličine čestica

➤ mikronizacija:

Smanjenjem veličine čestica djelatne tvari moguće je povećavati brzinu njenog otapanja. To je sigurna metoda za povećanje topljivosti djelatne tvari jer joj se ne mijenja kemijska priroda.¹⁸ Brzina otapanja lijeka proporcionalno se povećava s povećanjem površine čestice djelatne tvari i smanjenjem debljine difuzijskog sloja.¹⁹ Pa iako se ovom metodom na učinkovit način može utjecati na brzinu otapanja djelatne tvari, smanjenje veličine čestica ima malen utjecaj na povećanje njene topljivosti (a posljedično i bioraspoloživosti) budući da se ne utječe na svojstva čestice u čvrstom stanju.²⁴ Uobičajene metode za dobivanje mikroniziranih čestica djelatne tvari su tehnike suhog mljevenja (mljevenje pomoću kuglica primjerice). Najmanja veličina čestica koja se može dobiti uobičajenim mljevenjem je 2 – 3 μm .¹⁹

➤ priprava nanokristala:

Smanjenje veličine čestica djelatnih tvari na veličinu manju od 1 μm (čime nastaju nanočestice) provodi se mljevenjem s kuglicama uz dodatak otapala, kontroliranom precipitacijom i homogenizacijom pod visokim tlakom (engl. *high pressure homogenization*).¹⁹ Iako se kao i u prethodnom slučaju utječe na povećanje površine čestica i smanjenje debljine difuzijskog sloja, smanjenje veličine čestica ispod 1 μm može povoljno utjecati na povećanje ukupne topljivosti djelatne tvari zbog povećanja tlaka solvatacije koji utječe i na remećenje interakcija između čestica djelatne tvari koja se otapa (što posljedično olakšava otapanje).²⁴ Za stabilizaciju suspenzija nanokristala često koriste se hidrofilni polimeri te površinski aktivne tvari. Nanokristalne čestice lijeka se mogu dispergirati na inertne nosače nakon postupka sušenja raspršivanjem ili liofilizacije.¹⁹

Prevođenje djelatne tvari u amorfno stanje

Stabilne kristalne forme djelatnih tvari imaju veliku energiju kristalne rešetke.²³ Topljivost djelatne tvari u amorfnoj formi veća je od topljivosti kristalne forme zbog velike Gibbsove slobodne energije u amorfnoj formi.²⁴ Promjenom svojstava čestica djelatne tvari u čvrstom stanju moguće je povećati njihovu topljivost. Zbog viška entalpije, entropije i slobodne energije amorfne forme teže kristalizaciji, no s razvojem novih tehnika koje pospješuju stabilnost amorfni formi javlja se mogućnost korištenja ovakvih strategija prilikom dizajna novih farmaceutskih formulacija.²³ Stabilne amorfne forme moguće je pripremiti u obliku čvrstih disperzija u kojima su čestice djelatnih tvari okružene česticama inertnih nosača poput polimera ili površinski aktivnih tvari pomoću kojih se osigurava stabilnost takvog sustava.¹⁹

Kompleksiranje s ciklodekstrinima

Ciklodekstrini i njihovi derivati poboljšavaju topljivost slabo topljivih lijekova u vodi tako što s njima tvore inkluzijske komplekse.¹⁹ S farmaceutskog stajališta ciklodekstrini su kompleksirajući agensi koji imaju sposobnost povećati topljivost (posljedično i bioraspoloživost) i stabilnost aktivne farmaceutske tvari, maskirati boju i okus lijeka te spriječiti gastrointestinalnu i očnu iritaciju.²⁴ Same fizičke smjese djelatne tvari i ciklodekstrina ne pokazuju povećanje bioraspoloživosti djelatne tvari nakon oralne primjene, za razliku od inkluzijskih kompleksa.¹⁹ Metode za pripravu inkluzijskih kompleksa

ciklodekstrina i djelatnih tvari su liofilizacija, sušenje raspršivanjem, koprecipitiranje otopine djelatne tvari i ciklodekstrina, gnječenje te mljevenje smjese ciklodekstrina i djelatne tvari.²⁴

pH modifikacije

Alternativna opcija za povećanje topljivosti i brzine otapanja djelatnih tvari koje mogu biti ionizirane su pH modifikacije. Ugradnja pH modifikatora u farmaceutske formulacije može promijeniti pH mikrokoliša koji predstavlja mikroskopski sloj koji okružuje čestice čvrste tvari u kojem ona formira zasićenu otopinu adsorbirane vode. Na oslobađanje djelatne tvari iz farmaceutske formulacije utječu svojstva pH modifikatora poput topljivosti, brzine otapanja i pK_a -vrijednosti. Da bi se postiglo potpuno otapanje djelatne tvari iz farmaceutske formulacije pH modifikator mora u potpunosti koegzistirati s česticama djelatne tvari sve dok se djelatna tvar u potpunosti ne otopi.¹⁹

Samoemulgirajući sustavi

Samoemulgirajući sustavi se koriste za povećanje topljivosti djelatnih tvari velike lipofilnosti, a predstavljaju izotropne smjese ulja, površinski aktivnih tvari, kootapala i otopljene djelatne tvari. Djelatne tvari kojima se topljivost povećava strategijom izrade samoemulgirajućih sustava bi trebale imati visoku intrinzičnu lipofilnost jer bi se one trebale otapati u određenoj količini ulja.¹⁹

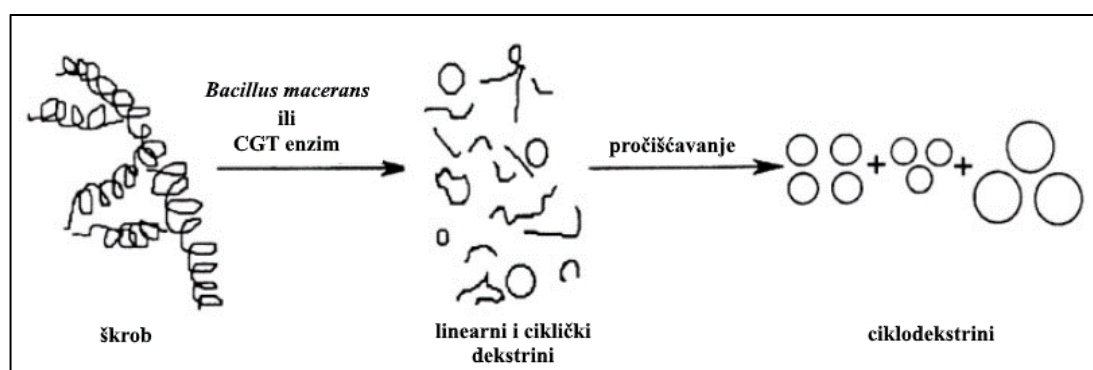
2.4. Ciklodekstrini

2.4.1. Povijest otkrića ciklodekstrina

Ciklodekstrini se prvi put spominju u znanstvenoj publikaciji objavljenoj 1891. kada je francuski znanstvenik Antoine Villiers otkrio kristalne dekstrine (celulozine) dobivene enzimatskom razgradnjom škroba iz krumpira djelovanjem mikroorganizma *Bacillus macerans*.²⁵ Danas se smatra kako je Villiers zapravo izolirao smjesu α - i β -ciklodekstrina (α -CD i β -CD).²⁶ Godine 1903. austrijski mikrobiolog Franz Schardinger je izolirao, odvojio i pročistio celulozine nastale bakterijskom razgradnjom krumpirovog škroba, a 30-ih i 40-ih godina prošlog stoljeća njihovu kristalnu strukturu su otkrili Freudenberg i sur. rendgenskom strukturnom analizom. Termin „ciklodekstrini“ krajem 40-ih godina po prvi put uvodi Freudenbergov student F. Cramer.²⁵

Bakterijskom enzimatskom razgradnjom škroba pomoću enzima ciklodekstrin glukoziltransferaze (CGT) dolazi do intramolekularne reakcije primarnog produkta razgradnje škroba bez prisutnosti vode³ i nastaje smjesa cikličkih i linearnih dekstrina, proteina i ostalih onečišćenja (slika 3). Cramer je prvi pročistio i izolirao male količine prirodnih čistih ciklodekstrina (α -, β - i γ -ciklodekstrin). Također je proveo i mnogobrojna istraživanja inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju i u otopini.^{25,26}

Ciklodekstrini se u farmaceutskoj industriji koriste od 70.-ih godina kada je u Japanu proizveden prostaglandin E2/ β CD, prva farmaceutska formulacija s ciklodekstrinom. Od tada je farmaceutska primjena inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina za poboljšavanje topljivosti, stabilnosti i bioraspoloživosti lijekova opisana u brojnim znanstvenim publikacijama. Trenutno je na svjetskom tržištu dostupno oko 50 farmaceutskih proizvoda koji sadrže ciklodekstrine.²⁵

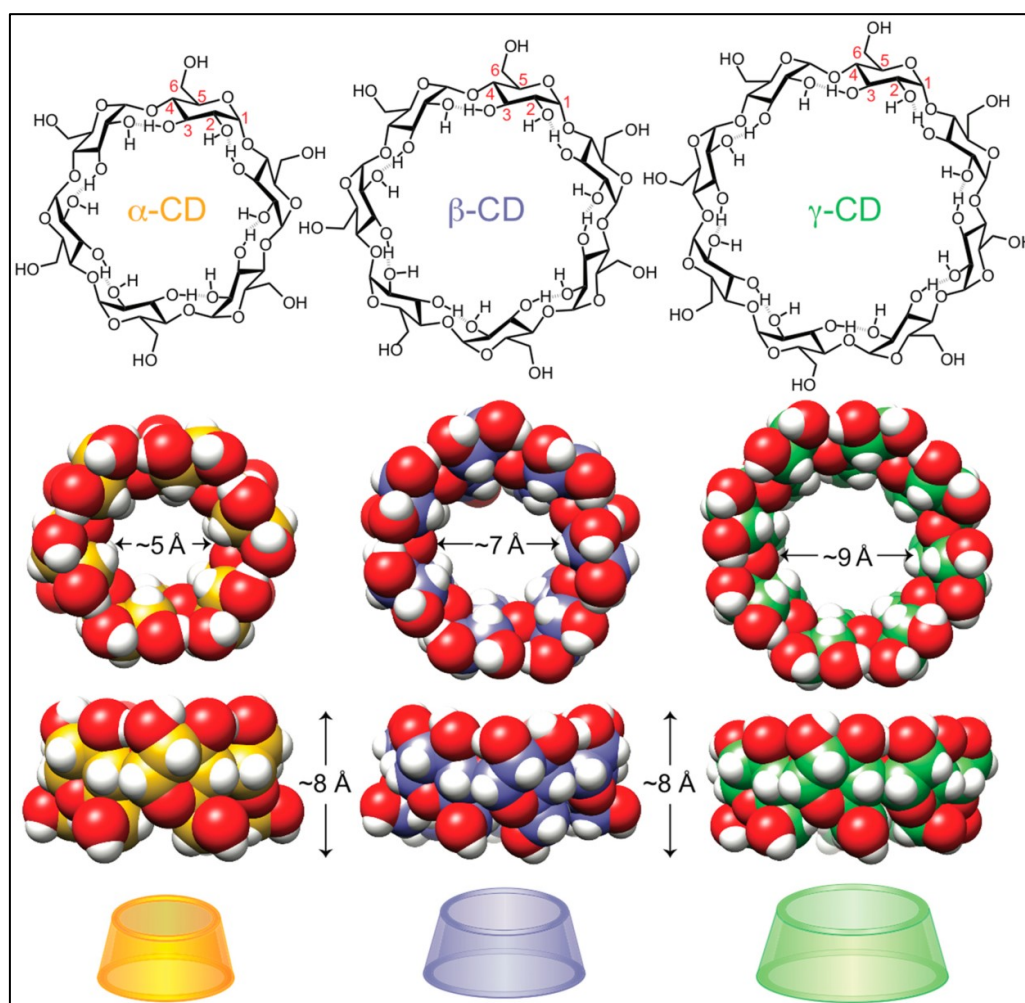


Slika 3. Prikaz biotehnološkog procesa dobivanja ciklodekstrina²⁷

2.4.2. Struktura i svojstva ciklodekstrina

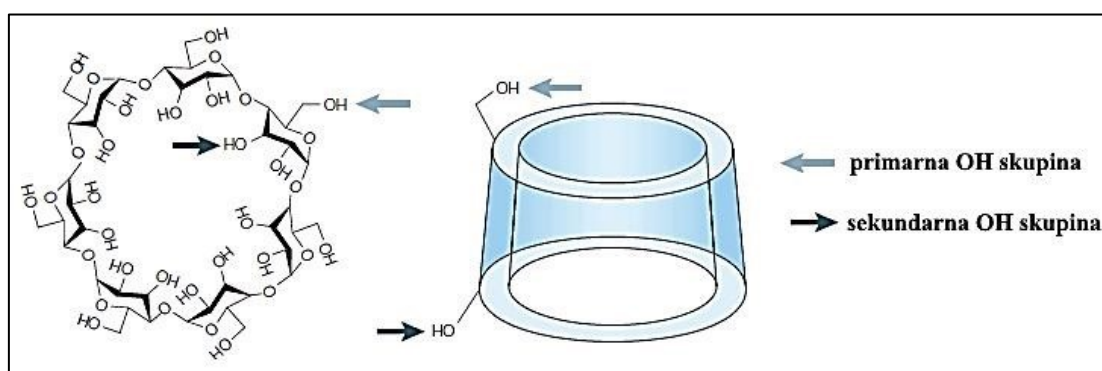
Ciklodekstrini su skupina cikličkih oligosaharida koji se sastoji od niza α -D-glukopiranoznih jedinica međusobno vezanih α -(1,4) glikozidnom vezom. Najčešće korišteni ciklodekstrini su α -, β -, i γ -ciklodekstrin, a sastoje se od 6 (α -ciklodekstrin), 7 (β -ciklodekstrin) i 8 (γ -ciklodekstrin) α -D-glukopiranoznih jedinica.²⁸ To su prirodni spojevi i mogu se pronaći u malim količinama u različitim fermentiranim proizvodima kao što je pivo.²⁰ Njihove strukture i dimenzije (visina i unutarnji promjer centralne šupljine) prikazane su na slici 4.

Ciklodekstrini s manje od 6 α -D-glukopiranoznih jedinica ne nastaju enzimatskom razgradnjom škroba zbog steričkih razloga, dok su ciklodekstrini s više od 8 α -D-glukopiranoznih jedinica izolirani i okarakterizirani. Ipak, njihova uporaba je ograničena zbog visoke cijene proizvodnje, niskog iskorištenja, teškoća u pročišćavanju i smanjenoj sposobnosti kompleksiranja.²⁸



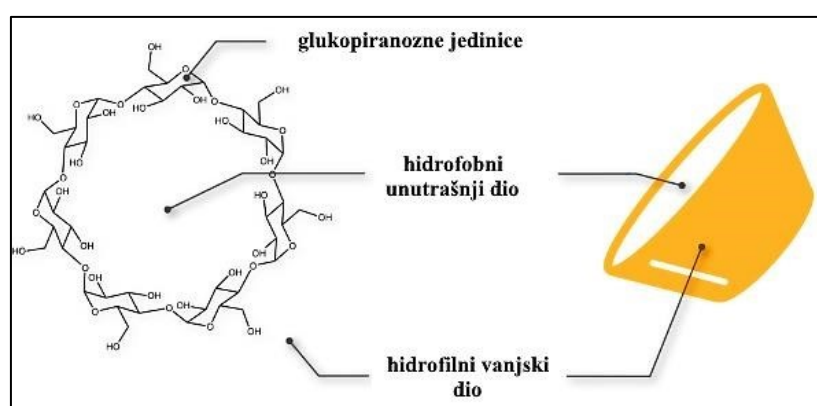
Slika 4. Struktura i dimenzije prirodnih ciklodekstrina (α -, β - i γ - ciklodekstrini)²⁹

Ciklodekstrini imaju oblik krnjeg stošca s centralnom šupljinom koja se povećava s porastom broja α -D-glukopiranoznih jedinica. Oblik krnjeg stošca posljedica je konformacije stolca α -D-glukopiranoznih jedinica. Primarne i sekundarne hidroksilne skupine ciklodekstrina orijentirane su prema vanjskoj strani molekule i nalaze se na suprotnim krajevima šupljine zbog rigidne strukture i nemogućnosti rotacije oko α -(1,4) glikozidne veze.²⁰ Primarne hidroksilne skupine su smještene na užem obodu molekule (ugljikov atom C₆), a sekundarne na širem obodu molekule (ugljikovi atomi C₂ i C₃) što je prikazano na slici 5.³⁰



Slika 5. Struktura β -ciklodekstrina s prikazom položaja primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina³¹

Centralnu šupljinu ciklodekstrina okružuju atomi vodika i glikozidni mostovi kisika (C-H i C-O-C veze) pa šupljina ima lipofilan karakter, dok je vanjska strana ciklodekstrina hidrofilnog karaktera (slika 6). Zbog toga su ciklodekstrini topljivi u vodi i imaju mogućnost djelomičnog ili potpunog uklapanja hidrofobnih molekula određene veličine u središnju šupljinu pri čemu tvore inkluzijske komplekse.²⁸



Slika 6. Shematski prikaz molekule ciklodekstrina³²

Međutim, topljivost prirodnih ciklodekstrina značajno je ograničena zbog formiranja intramolekulskih vodikovih veza između sekundarnih hidroksilnih skupina susjednih glukopiranoznih jedinica što im u velikoj mjeri onemogućuje interakciju s okolnim molekulama vode putem vodikovih veza (stvora se prsten vodikovih veza između C₂-OH jedne glukopiranozne jedinice i C₃-OH susjedne glukopiranozne jedinice³).²⁸ Ovakav način vezanja dodatno stabilizira kristalnu rešetku molekule ciklodekstrina. Topljivost prirodnih ciklodekstrina u vodi nije proporcionalna broju prisutnih hidroksilnih skupina.³ Primjerice, β-ciklodekstrin je najmanje topljiv u vodi iako sadrži više hidroksilnih skupina od α-ciklodekstrina koji je topljiviji u vodi. Veća rigidnost i niska topljivost β-ciklodekstrina u odnosu na molekule α- i γ-ciklodekstrina posljedica je formiranja prstena od 7 vodikovih veza. U molekuli α-ciklodekstrina se zbog steričkih razloga formira 5 vodikovih veza pa zato pokazuje 7 do 8 puta bolju topljivost od β-ciklodekstrina. Najtopljiviji prirodni ciklodekstrin je γ-ciklodekstrin zbog fleksibilnije (manje rigidne) i neplanarne strukture. Tališta α-, β- i γ-ciklodekstrina iznose između 240 °C i 265 °C, a razlog tomu je stabilna struktura kristalne rešetke ciklodekstrina.³ U vodenim su otopinama ciklodekstrini kemijski stabilni pri neutralnim i bazičnim uvjetima, ali su podložni kiseloj hidrolizi pri niskom pH što rezultira otvaranjem prstena i nastankom različitih linearnih oligosaharida. pK_a vrijednosti prirodnih ciklodekstrina kreću se između 12,1 i 13,5.²⁰ Najvažnija fizikalno-kemijska svojstva prirodnih ciklodekstrina prikazana su u tablici 2.

Tablica 2. Najvažnija svojstva α-, β- i γ-ciklodekstrina²⁸

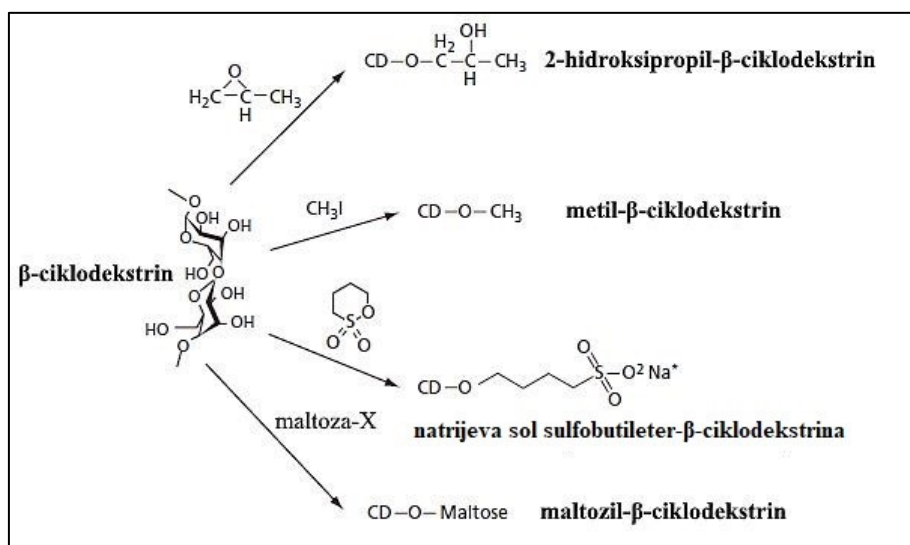
| svojstvo | α-ciklodekstrin | β-ciklodekstrin | γ-ciklodekstrin |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| broj glukopiranoznih jedinica | 6 | 7 | 8 |
| molekulska masa / g mol ⁻¹ | 972 | 1135 | 1297 |
| topljivost u vodi / mg mL ⁻¹ (25 °C) | 14,5 | 1,85 | 23,2 |
| volumen šupljine / Å ³ | 174 | 262 | 472 |
| promjer centralne šupljine / nm | 0,47 – 0,53 | 0,60 – 0,65 | 0,75 – 0,83 |
| broj molekula vode u šupljini | 6 | 11 | 17 |
| temperaturni raspon taljenja / °C | 255 – 260 | 255 – 265 | 240 – 245 |

Zbog jednostavnog načina dobivanja, ekonomskih razloga i optimalne veličine centralne šupljine za formiranje inkluzijskih kompleksa s lijekovima β -ciklodekstrin se najčešće koristi unatoč njegovoj ograničenoj topljivosti.³

Djelomičnom supstitucijom hidroksilnih skupina s različitim supstituentima pa čak i s lipofilnim funkcionalnim skupinama kao što su metoksi skupine dolazi do velikog porasta topljivosti ciklodekstrina.^{25,26} Kristalni ciklodekstrini nasumičnom supstitucijom hidroksilnih skupina poprimaju amorfnu strukturu jer nastaje veliki broj stereoizomera i sprječava se formiranje intramolekulskih vodikovih veza, a preostale hidroksilne skupine mogu slobodno tvoriti vodikove veze s molekulama vode.²⁵ Supstituiranjem različitim funkcionalnim skupinama mogu se modificirati sekundarne i/ili primarne hidroksilne skupine ciklodekstrina.²⁰ Derivati ciklodekstrina od farmaceutskog interesa su hidroksipropil- β - i γ -ciklodekstrin (HP β CD i HP γ CD), nasumično metilirani β -ciklodekstrin, natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE β CD) i neki razgranati ciklodekstrini kao što je maltozil- β -ciklodekstrin. Njihova najvažnija svojstva prikazana su u tablici 3, a načini sintetiziranja derivata iz β -ciklodekstrina su prikazani na slici 7.

Tablica 3. Svojstva nekih uobičajenih derivata ciklodekstrina^{20,25}

| | SBEβCD | HPβCD | RMβCD |
|---|---|--|-------------------------------|
| broj glukopiranoznih jedinica | 7 | 7 | 7 |
| molekulska masa / g mol⁻¹ | 2163 | 1400 | 1312 |
| topljivost u vodi / mg mL⁻¹ (25 °C) | > 1200 | > 1200 | > 500 |
| supstituent | (CH ₂) ₄ -SO ₃ Na | -CH ₂ -CHOH-CH ₃ | -CH ₃ |
| prosječan broj supstituenata po glukopiranoznoj jedinici | 0,90 | 0,65 | 1,80 |



Slika 7. Načini sintetiziranja derivata ciklodekstrina od farmaceutskog interesa iz β -ciklodekstrina²⁶

Derivati ciklodekstrina čija topljivost ovisi o pH-vrijednosti medija dobiveni su uvođenjem ionizirajućih skupina. Primjeri takvih vrsta derivata ciklodekstrina su karboksialkilirani, karboksilirani i alkilsulfonirani derivati kao što je natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina.³

Fizikalno-kemijska svojstva derivata ciklodekstrina ne ovise samo o vrsti supstituenata već i o broju supstituenata po molekuli ciklodekstrina o čemu govori molarni omjer supstitucije (engl. *molar degree of substitution*). Molarni omjer supstitucije definira se kao prosječan broj supstituenata koji su reagirali s jednom glukopiranoznom ponavljajućom jedinicom.²⁶

2.4.3. Toksikologija i farmakokinetika ciklodekstrina

Većina ciklodekstrina od farmaceutskog interesa su hidrofilni spojevi. Zbog podložnosti bakterijskoj razgradnji, velike molekulske mase, velikog broja donora i akceptora vodikovih atoma te visoke hidrofilnosti (vrlo negativne logaritamske vrijednosti koeficijenta razdjeljivanja oktanol/voda, $\log K_{o/w}$ između -8 i -12) njihova oralna bioraspodivnost obično iznosi manje od 4 % (1 – 3 %).²⁶

Oralno primjenjivani ciklodekstrini su netoksični zbog nedostatka apsorpcije u gastrointestinalnom traktu. Iznimka je nasumično metilirani β -ciklodekstrin koji je lipofilnijeg karaktera i ima manje donora vodikovih veza od ostalih ciklodekstrina pa je njegova

bioraspoloživost nešto veća. Ipak, ograničene je primjene zbog potencijalne toksičnosti. Ciklodekstrini poput α -CD, β -CD, γ -CD, HP β CD i SBE β CD se sigurno primjenjuju oralnim putem i ne pokazuju štetne učinke. Visoke doze ovih vrsta ciklodekstrina uzrokuju manje probavne tegobe (nadutost i mekanu stolicu).²⁶ Ciklodekstrini uglavnom pokazuju otpornost na razgradnju humanim enzimima budući da se ubrizgavanjem u ljudsko tijelo intravenski izlučuju putem bubrega u intaktnom obliku.³¹

Parenteralna primjena β -CD je ograničena zbog njegove slabe topljivosti i posljedične nefrotoksičnosti, ali je netoksičan ukoliko se primjenjuje oralnim putem. Istraživanja *in vivo* na laboratorijskim životinjama pokazala su da se metilirani β -ciklodekstrini i β -ciklodekstrin ne bi trebali primjenjivati u obliku parenteralnih formulacija, dok se α -CD, γ -CD, HP β CD i SBE β CD već neko vrijeme koriste u obliku parenteralnih formulacija koje su dostupne na komercijalnom tržištu. Pri dovoljno visokim koncentracijama RM β CD i β -CD mogu uzrokovati raspadanje eritrocita, odnosno hemolizu.²⁶ Kod osoba s normalnom funkcijom bubrega oko 90 % parenteralno primjenjenih ciklodekstrina će se izlučiti unutar 6 sati od primjene i oko 99 % unutar 12 sati od primjene.²⁵

Ciklodekstrini su otporni na utjecaj enzima β -amilaze, dok ih enzim α -amilaza iz ljudske sline i soka gušterače hidrolizira. Slobodni ciklodekstrin se hidrolizira brže od ciklodekstrina koji postoji u obliku inkluzijskog kompleksa. Nakon oralne primjene jedino se nesupstituirani γ -ciklodekstrin potpuno probavi u gastrointestinalnom sustavu djelovanjem α -amilaze, dok α - i β -ciklodekstrin u velikoj mjeri probavljaju bakterije u debelom crijevu, s tim da se α -ciklodekstrin sporije probavlja od β -ciklodekstrina.²⁶

2.4.4. Primjena ciklodekstrina u farmaciji

Danas ciklodekstrini pronalaze veliku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj, kemijskoj i tekstilnoj industriji, zbog svoje karakteristične trodimenzionalne strukture i svojstava koji iz nje proizlaze poput mogućnosti nastajanja inkluzijskih kompleksa.³¹ Godišnje se proizvede više od 10 000 tona ciklodekstrina, a oko 70 % proizvodnje otpada na β -CD, oko 15 % na α -CD i oko 5 % na γ -CD. Oko 30 % ukupne godišnje količine proizvedenih ciklodekstrina iskoristi se za potrebe farmaceutske industrije, 20 % odlazi na prehrambene proizvode i oko 50 % na mnogobrojne proizvode za konzumaciju.²⁵

U kemijskoj se industriji ciklodekstrini koriste za odvajanje izomera i stereoizomera, ubrzavanje kemijskih reakcija te uklanjanje ili detoksikaciju otpadnih materijala.

Ciklodekstrini se koriste za odvajanje enantiomera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) ili plinskom kromatografijom (engl. *gas chromatography*, GC) pri čemu stacionarnu fazu čine imobilizirani ciklodekstrini.³⁰

Najveću primjenu ciklodekstrini pronalaze u farmaceutskoj industriji jer su biokompatibilne molekule koje ne potiču imunoreakcije u organizmu te su relativno niske toksičnosti.³¹ Formiranje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina i djelatne tvari može značajno utjecati na kemijsku stabilnost djelatne tvari i može ju štititi od enzimatske razgradnje u probavnom sustavu. Uklapanjem u središnju šupljinu ciklodekstrina djelatna tvar je zaštićena od vanjskih utjecaja što doprinosi njenoj kemijskoj stabilnosti.³ Ciklodekstrini primjerice stabiliziraju otopine inzulina sprječavanjem njihove fizikalne i kemijske degradacije jer mogu stabilizirati konformaciju proteina ostvarivanjem interakcija s dostupnim hidrofobnim aminokiselinskim ostacima.³¹

Uspostavljanjem kemijske stabilnosti i povećanjem topljivosti djelatnih tvari njihova bioraspoloživost se značajno povećava neovisno o načinu primjene. Ciklodekstrini mogu povećati permeabilnost djelatnih tvari kroz biološke membrane mijenjajući njihovu permeabilnost interakcijom s lipofilnim komponentama.³

Primjena ciklodekstrina osigurava preciznu kontrolu brzine oslobađanja djelatne tvari te njenu prilagodbu terapijskim potrebama bez obzira na topljivost u vodi. Ciklodekstrinima se može prekriti neugodan okus lijeka, spriječiti inkompatibilnost lijeka s drugim pomoćnim tvarima u formulaciji te prevesti tekuće, plinovite i lako hlapljive lijekove u čvrsto stanje. Sve navedene primjene pokazuju da su ciklodekstrini zaista multifunkcionalne pomoćne tvari koje omogućuju modifikaciju nepovoljnih biofarmaceutskih svojstava lijekova i razvoj suvremenih farmaceutskih formulacija.³

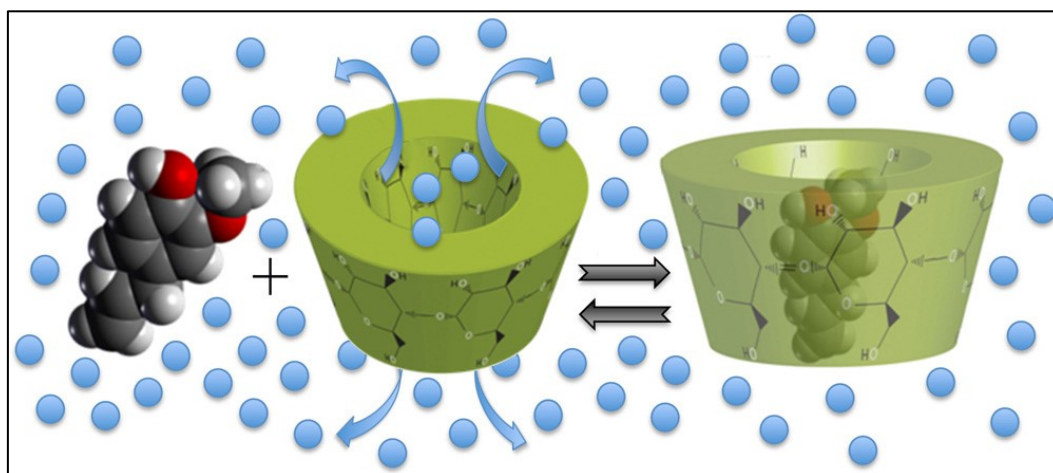
U komercijalno dostupnim farmaceutskim formulacijama koje sadrže ciklodekstrine najviše je zastupljen β -ciklodekstrin (54,8 %), zatim HP β CD (16,1 %), α -ciklodekstrin (9,6 %) te SBE β CD, RM β CD i HP γ CD (6,5 %).³³

2.5. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina

Inkluzijski kompleksi su supramolekulski kompleksi koje tvore molekule po principu domaćin-gost, pri čemu je molekula gosta uklopljena u šupljinu molekule domaćina bez formiranja ili kidanja kovalentnih veza. Molekule domaćina mogu biti makromolekule s već

postojećom šupljinom kao što su ciklodekstrini ili manje organske molekule koje mogu tvoriti intermolekulske vodikove veze stvarajući šupljinu.²⁷

Glavna karakteristika ciklodekstrina je njihova sposobnost tvorbe inkluzijskih kompleksa s čvrstim, tekućim ili plinovitim spojevima molekularnom kompleksacijom (slika 8). Vezanje molekula gosta unutar šupljine ciklodekstrina nije fiksno ili trajno već predstavlja dinamičku ravnotežu.³⁰



Slika 8. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina²⁸

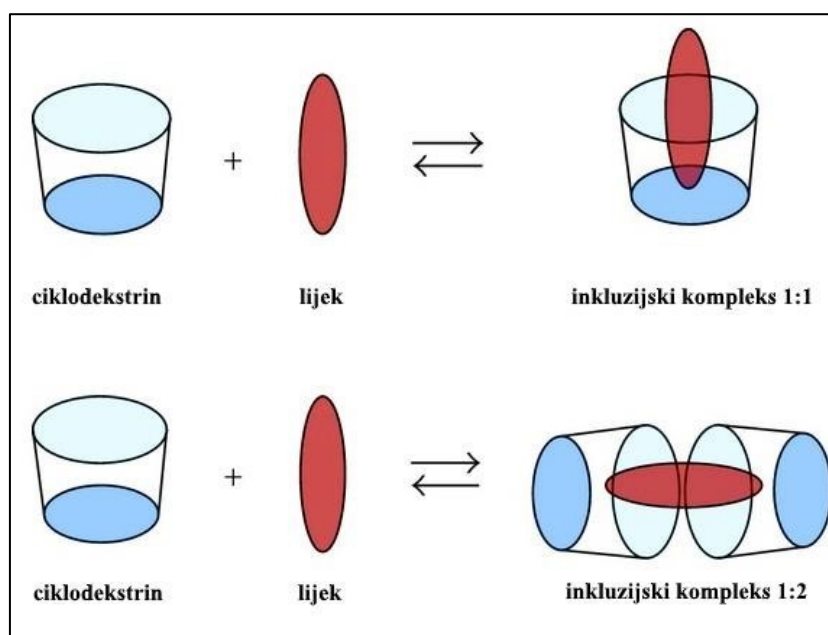
Lipofilna šupljina molekule ciklodekstrina pruža mikrokoliš u kojeg se mogu uklopiti nepolarni dijelovi molekule prikladne veličine prilikom čega nastaju inkluzijski kompleksi. Inkluzijske komplekse u otopini ciklodekstrini tvore s hidrofobnim molekulama pri čemu se molekule vode prisutne u šupljini izmjenjuju hidrofobnom molekulom ili samo nekim njezinim dijelom.

Uklapanjem u šupljinu ciklodekstrina molekula gosta se modificira što dovodi do promjene njenih fizikalno-kemijskih svojstava. Ta svojstva su: poboljšavanje topljivosti netopljivih molekula gosta, stabilizacija molekula gosta koje su podložne utjecaju degradacijskih učinaka kao što su oksidacija, utjecaj topline i UV-zračenja, kontrola sublimacije i hlapljivosti, prikrivanje neugodnih okusa i mirisa te kontrolirano oslobađanje lijekova i aroma. U središnju šupljinu ciklodekstrinske molekule mogu se uklopiti molekule gosta različitih spojeva poput razgranatih ili nerazgranatih ugljikovodika, aldehida, ketona, alkohola, organskih i masnih kiselina, aromata i polarnih spojeva (halogena, oksokiselina i

amina).³⁰ Nastajanje kompleksa ovisi o polarnosti molekule gosta pa će tako samo one molekule čija je polarnost manja od polarnosti ciklodekstrina s njima tvoriti komplekse.³

Za nastajanje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina ključna su dva faktora, sterički i termodinamički. Sterički faktor ovisi o promjeru ciklodekstrinske šupljine koji nije strogo definiran već ovisi o vrsti ciklodekstrina. Veličina molekule gosta bi trebala biti manjih dimenzija od promjera ciklodekstrinskog prstena kako bi nastao stabilan supramolekulski kompleks. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina mogu nastati u stehiometrijskom omjeru 1:1 prilikom čega se jedna molekula gosta uklapa u šupljinu ciklodekstrina, a moguć je i nastanak kompleksa viših redova ovisno o molekulskoj masi gosta i njenim steričkim karakteristikama (slika 9).³

Visina šupljine ciklodekstrina jednaka je za sva tri tipa prirodnih ciklodekstrina, ali broj α -D-glukopiranoznih jedinica definira promjer šupljine. Na temelju definiranih dimenzija za α -, β - i γ -ciklodekstrin, α -ciklodekstrin može kompleksirati molekule male molekulske mase ili spojeve s alifatskim lancima, β -ciklodekstrin kompleksira aromate i heterocikle, a γ -ciklodekstrin makrocikle i steroide.³⁰



Slika 9. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina i molekule gosta u omjeru 1:1 i kompleksa višeg reda u omjeru 1:2³¹

Iako je za nastajanje inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina važan veliki broj intermolekulskih interakcija, misli se kako je glavna pokretačka sila izmjena hidrofobnih molekula gosta iz otapala i entalpijom bogatih molekula vode unutar centralne šupljine ciklodekstrina. Molekule vode koje se nalaze unutar centralne šupljine ciklodekstrina ne mogu u potpunosti zadovoljiti svoj potencijal za interakcije vodikovim vezama pa su shodno tome bogatije energijom (entalpijom). Njihovom izmjenom s molekulom (ili molekulama) gosta dolazi do sniženja energije sustava. Uz spomenuto istiskivanje visokoenergetskih molekula vode iz centralne šupljine CD postoje još neki energetski povoljni fenomeni koji su zaslužni za formiranje inkluzijskog kompleksa poput uspostave vodikovih veza istisnutih molekula vode u vodenoj otopini van šupljine CD, smanjenja odbojnih interakcija između hidrofobnih molekula gosta i molekula vode van šupljine CD, povećanja hidrofobnih interakcija uklapanjem molekule gosta u središnju šupljinu CD. Za uspostavljanje stabilnog inkluzijskog kompleksa između molekule gosta i CD osim spomenutog istiskivanja energijom bogatih molekula vode iz središnje šupljine CD važne su i druge interakcije poput van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija, vodikovih veza i promjene u površinskoj napetosti otapala.

U kristalnoj su formi samo molekule na površini kristala ciklodekstrina dostupne za kompleksiranje, dok je u otopini dostupno više molekula. Zagrijavanje može povećati topljivost ciklodekstrina i molekule gosta te pospješiti kompleksaciju, ali u isto vrijeme i destabilizirati kompleks jer se većina kompleksa raspada na 50 °C – 60 °C, dok su neki stabilni i pri višim temperaturama.³⁰

Ciklodekstrini mogu tvoriti i komplekse bez inkluzije gosta kod kojih hidroksilne skupine s vanjske strane molekule ciklodekstrina tvore vodikove veze s molekulom gosta. Ciklodekstrini te inkluzijski kompleksi lijeka i ciklodekstrina mogu tvoriti agregate nanometarskih veličina. Agregati također mogu pozitivno utjecati na solubilizacijski potencijal lijekova kroz formiranje kompleksa bez inkluzije ili kroz formiranje struktura koje su slične micelama.³⁴

2.5.1. Priprava inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina mehanokemijskom aktivacijom

Među mnogobrojnim tehnikama za pripravu inkluzijskih kompleksa CD u čvrstom stanju mehanokemijska aktivacija mljevenjem izdvaja se kao brza, vrlo učinkovita, sveobuhvatna, prikladna, održiva i ekološki prihvatljiva metoda koja ne zahtjeva upotrebu otapala. Odabir metode za pripravu inkluzijskih kompleksa CD u čvrstom stanju predstavlja ključni korak u

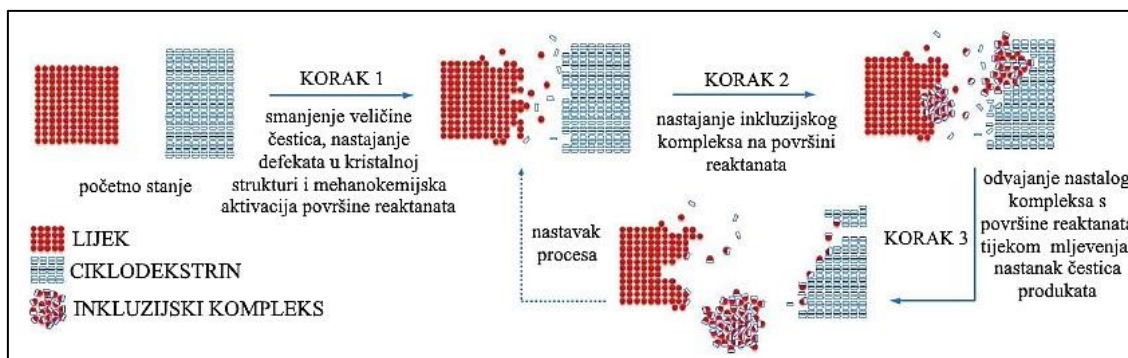
razvoju proizvoda koji se temelje na ciklodekstrinima jer može odrediti njegova ukupna svojstva i funkcionalnost.

Metode pripreve inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju možemo podijeliti na metode u otopini, metode u polučvrstom stanju i metode u čvrstom stanju. Metodom u otopini lijek i CD su otopljeni u vodi, organskom otapalu ili smjesi organskog otapala i vode s prilagodbom pH-vrijednosti i temperature kako bi se ostvarila što bolja interakcija između komponenti.

Kod metoda u polučvrstom stanju fizikalna smjesa lijeka i CD se gnječi i miješa uz dodatke malih volumena vode ili otopine etanola i vode čime se dobije homogeni produkt u obliku paste. Daljnjim miješanjem paste dobije se prah, a otapalo se uklanja sušenjem.

Metodama u čvrstom stanju kompleksiranje ciklodekstrina se postiže mikrovalnim ozračivanjem (engl. *microwave irradiation*), laganim zagrijavanjem komponenti u zatvorenoj posudi uz prisustvo male količine vode (engl. *sealed-heating*) ili mehanokemijskom aktivacijom mljevenjem fizičke smjese lijeka i ciklodekstrina u različitim vrstama mlinova. Mehanokemijska aktivacija se izdvaja od prethodne dvije metode jer ne zahtijeva uporabu organskih otapala (tzv. zelena kemija) i tako predstavlja ekonomski i ekološki održivu tehniku za pripravu inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina.

Mehanokemija se odnosi na kemijske reakcije koje se odvijaju u čvrstom stanju, a potaknute su primjenom mehaničke energije. Postupci mogu uključivati ručno mljevenje pomoću tarionika i tučka ili još efikasnije, mehaničko mljevenje koristeći kuglične, vibracijske ili oscilirajuće mlinove. Popularnost mehanokemijske sinteze koja se temelji na mljevenju leži u učinkovitosti formiranja koordinacijskih veza metal-ligand i nekovalentnih interakcija kao što su vodikove veze, halogenske veze, $\pi \cdots \pi$ interakcije arena itd. Sve to je dovelo do primjene mljevenja u razvoju farmaceutski važnih polimorfa, kokristala, poroznih metalo-organskih mreža (engl. *metalo-organic frameworks*), polimernih disperzija i inkluzijskih kompleksa. Na slici 10 prikazan je predloženi mehanizam nastajanja inkluzijskog kompleksa mljevenjem fizičke smjese lijek-CD.



Slika 10. Shematski prikaz mehanizma nastajanja inkluzijskog kompleksa lijeka i ciklodekstrina u čvrstom stanju mljevenjem⁹

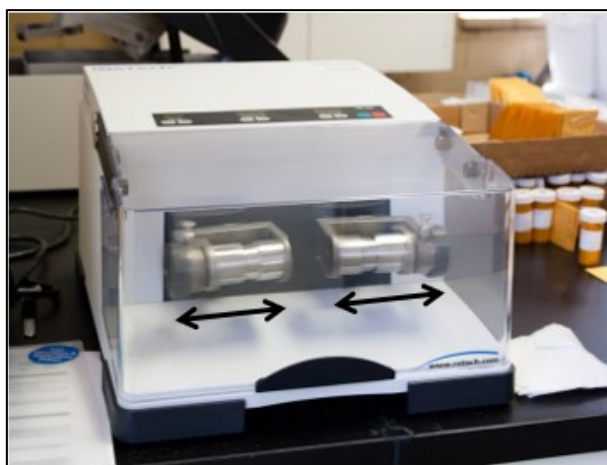
S makroskopskog gledišta, najveći dio primijenjene mehaničke energije pretvara se u toplinu čime se olakšava interakcija između lijeka i ciklodekstrina. Takva toplinski inducirana reakcija često se može promatrati diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) sustava lijek-CD. Mljevenjem dolazi do nastajanja defekata u kristalnoj strukturi i smanjenja veličine čestica čime dolazi do povećanja aktivne površine reaktanata te se ostvaruje interakcija između lijeka i ciklodekstrina u čvrstom stanju. Pretpostavlja se da se nastajanje inkluzijskog kompleksa odvija na površini čestica ciklodekstrina i lijeka, a proces uključuje nekoliko međufaza kao što je nastajanje čvrste disperzije iz koje postupno nastaje inkluzijski kompleks u čvrstom stanju. Daljnjim mljevenjem inkluzijski kompleks se odvaja od čestica lijek-CD stvarajući zasebne čestice produkata čime se oslobađa površina čestica lijek-CD i reakcija se nastavlja. Mljevenje i homogenizacija reaktanata doprinose interakciji između lijeka i ciklodekstrina u čvrstom stanju. Mljevenjem smjese lijeka i ciklodekstrina često nastaju amorfnu produkti ili produkti koji sadrže tragove kristala ovisno o intenzitetu i vremenu mljevenja te o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka i ciklodekstrina.

Opisanu tehniku nazivamo suhim mljevenjem. U nekim slučajevima mogu se dodati male (katalitičke) količine otapala čime se pospješuje interakcija između reaktanata što rezultira većim iskorištenjem produkta sa željenim svojstvima, a tada govorimo o tehnici otapalom potpomognutog mljevenjem. Mehanokemijska sinteza mljevenjem uz dodatak malih količina otapala prvotno se koristila za pripremu kokristala.

Inkluzijski kompleksi lijek-CD mogu biti relativno složeni sustavi jer mogu sadržavati razne amorfne i kristalne faze. Općenito, u uzorku može postojati kombinacija slobodnog i

vezanog lijeka, a moguća je i kombinacija slobodnog i vezanog ciklodekstrina posebice u slučajevima kada omjer lijeka i ciklodekstrina, vrsta ciklodekstrina i uvjeti pripreme nisu pažljivo optimizirani. Najčešće analitičke tehnike koje se koriste za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa su DSC i difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (engl. *powder X-Ray diffraction*, PXRD). U nekim slučajevima za dodatnu potvrdu podataka dobivenih tehnikama DSC i PXRD koriste se infracrvena spektroskopija (engl. *infrared spectroscopy*, IR) i pretražna elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscope*, SEM).

Tijekom pripreme inkluzijskih kompleksa lijek-CD važno je kontrolirati reakcijske uvjete jer utječu na biofarmaceutska svojstva lijekova. Najvažnije reakcijske parametre čine korištena energija, vrijeme, temperatura i volumen mljevenja te popunjenost posudica za mljevenje. Utjecaj parametara je strogo povezan s vrstom korištenog uređaja za mljevenje koji ima značajan utjecaj na učinkovitost procesa mljevenja i svojstva dobivenog produkta. U slučaju korištenja visokoenergetskog vibracijskog mlina, vrijeme i frekvencija su parametri koji se kontroliraju podešavanjem postavki mlina, dok temperaturu pri kojoj se mljevenje odvija nije lako kontrolirati jer se reakcijske posudice zagrijavaju zbog kolizija koje se javljaju tijekom mljevenja unutar njih. Na temperaturu mljevenja utječe volumen kuglica za mljevenje, primijenjena frekvencija te veličina i stupanj popunjenosti posudice. Povećanjem frekvencije povećava se brzina kuglica, a samim time i njihova energija, a produljenje vremena mljevenja povećava unesenu količinu energije. Visokoenergetski vibracijski mlin sastoji se od posude toroidalnog oblika ili metalnih diskova koji nose dvije zasebne cilindrične posudice za mljevenje (slika 11).



Slika 11. Visokoenergetski vibracijski mlin s prikazom smjera oscilacije posudica³⁵

Kada uređaj radi, posudice za mljevenje radijalno osciliraju u vodoravnom smjeru, dok kuglice koje se nalaze u posudicama utječu velikom energijom na uzorak, posebice na zaobljenim krajevima posudica za mljevenje. Sudari čestica uzorka i klizanje kuglica uzrokuju povećanje mehaničke energije što dovodi do usitnjavanja uzorka i posljedično mehanokemijske aktivacije. Intenzivno miješanje uzorka u posudicama se postiže pomicanjem posudica i kuglica.

Materijali koji se koriste za izradu posudica i kuglica su nehrđajući čelik (slika 12), volframov karbid (WC), silicijev nitrid (Si_3N_4), mineral i dragi kamen ahat, polistiren, metakrilat, polikarbonat i Teflon[®].

Frekvencija koja se obično primjenjuje prilikom pripreve inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u mlinu iznosi od 15 do 25 Hz. Posudice za mljevenje bi trebale biti napunjene do 25 % ukupnog volumena uzimajući u obzir i volumen uzorka i kuglica za mljevenje. Količina punjenja posudica važan je parametar jer utječe na kinetičku energiju kuglica koja se prenosi na uzorak. Uobičajeno vrijeme mljevenja dovoljno za potpunu amorfizaciju uzorka i djelomično formiranje inkluzijskog kompleksa iznosi između 30 i 60 minuta, a ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka i ciklodekstrina te njihovom omjeru.

Jedini primjer pripreve inkluzijskog kompleksa na proizvodnoj skali proveden je od strane farmaceutske kompanije Vectorpharma Spa (Trst, Italija). Oni su uspjeli pripremiti inkluzijske komplekse β -CD i nimesulida, protuupalnog lijeka.⁹



Slika 12. Posudice za mljevenje i kuglice od nehrđajućeg čelika³⁶

2.5.2. Karakterizacija inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u čvrstom stanju

Potpuna analitička karakterizacija čvrstih inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina ili onih u otopini nije jednostavan proces i uključuje rezultate dobivene pomoću više analitičkih tehnika, a njih treba zajednički ispitati i vrednovati. Istraživanja su pokazala kako ispravan odabir metode za pripremu čvrstih inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina snažno utječe na svojstva i karakteristike dobivenog produkta. Upravo zato odgovarajuća karakterizacija sustava lijek-CD ima ključnu ulogu jer pruža osnovne informacije potrebne za odabir optimalne metode pripreme inkluzijskih kompleksa i odgovarajućih eksperimentalnih uvjeta te najprikladnijeg ciklodekstrina za molekulu gosta kako bi se što više povećale interakcije između lijeka i ciklodekstrina i postigao željeni cilj.

Glavne analitičke tehnike za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa CD u čvrstom stanju su:

- tehnike termalne analize: diferencijalna pretražna kalorimetrija i termogravimetrijska analiza (engl. *thermogravimetric analysis*, TGA)
- rendgenska difrakcija: difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku i difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu (engl. *single crystal X-ray diffraction*, SCXRD)
- spektroskopske tehnike: infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infra-red spectroscopy*, FTIR), tehnika prigušene totalne refleksije (Attenuated total reflectance, ATR), Ramanova spektroskopija (engl. *Raman spectroscopy*, RS)
- pretražna elektronska mikroskopija (engl. *scanning electronic microscopy*, SEM)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija je najčešće korištena metoda za istraživanje interakcija između lijeka i ciklodekstrina u čvrstom stanju. Usporedbom DSC termalnih krivulja pojedinačnih komponenti, njihove fizičke smjese i uzorka pretpostavljenog inkluzijskog kompleksa dobiva se uvid u interakcije između komponenti koje su posljedica upotrijebljene metode pripreme inkluzijskog spoja. DSC krivulje prirodnih i amorfnih ciklodekstrina karakterizira intenzivan i proširen endoterman pik između 90 °C i 130 °C što odgovara njihovoj dehidraciji (gubitku vode), a pri 300 °C dolazi do njihovog raspada. Termalna DSC krivulja fizičke smjese trebala bi odgovarati sumi krivulja pojedinačnih komponenti. Promjene u DSC krivuljama uzorka pretpostavljenog inkluzijskog kompleksa kao što su smanjenje, širenje ili pomicanje (ka nižim temperaturama) oštrog endoternog

pika koji odgovara taljenju lijeka tumače se kao gubitak njegove kristalne strukture što može biti posljedica interakcije lijeka i ciklodekstrina. Pretpostavlja se da potpuni nestanak pika s DSC krivulje označava potpuno uklapanje molekule lijeka u šupljinu ciklodekstrina. Bilo kakva prisutnost oštrog endoternog pika molekule lijeka znači njegovu prisutnost u kristalnoj formi te nepotpuno uklapanje u CD šupljinu. Povećana temperatura raspada inkluzijskog kompleksa može biti posljedica povećane termičke stabilnosti lijeka zbog njegove ugradnje u šupljinu CD.

Termogravimetrijskom analizom prate se gubici u masi uzorka s obzirom na promjene u temperaturi. Usporedbom TGA krivulja pojedinačnih komponenti, njihove fizičke smjese i pretpostavljenog inkluzijskog kompleksa trebao bi se dobiti uvid u moguće interakcije i nastajanje inkluzijskog kompleksa lijeka i CD. Termogravimetrijska analiza često se koristi u kombinaciji s DSC analizom za potvrdu i interpretaciju DSC rezultata. Termogravimetrijsku analizu malih količina kristalnih i amornih ciklodekstrina karakteriziraju dva gubitka mase. Prvi gubitak mase se uočava pri oko 100 °C i odgovara dehidraciji ciklodekstrina, dok se drugi gubitak mase uočava pri temperaturi većoj od 300 °C i odgovara raspadu ciklodekstrina. Lijek uklopljen u šupljinu ciklodekstrina pokazat će drugačije rezultate u usporedbi s rezultatima koji su dobiveni za slobodni lijek jer mu se povećava termička stabilnost uslijed kompleksiranja s ciklodekstrinom.

Difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu je nedestruktivna tehnika koja se koristi za detaljno određivanje kristalne strukture uzoraka i zahtjeva uporabu pojedinačnih stabilnih kristala prikladnih veličina između 80 i 250 µm. Budući da je samo mali broj inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina i lijekova dobiven u kristalnoj formi primjena difrakcije rendgenskog zračenja na monokristalu za njihovo proučavanje je ograničena. Za razliku od difrakcije rendgenskog zračenja na monokristalu analiza difrakcije rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku se može izvoditi na fino mljevenim i homogeniziranim uzorcima te se onda može koristiti za brzu identifikaciju nepoznate kristalne tvari i za određivanje stupnja kristalnosti ili amornosti ispitivanih uzoraka.

PXRD ne zahtjeva prethodnu pripremu uzorka za analizu i za razliku od tehnika termalne analize uzorku se ne mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva te se nakon snimanja može ponovno koristiti za druge analize. Usporedba difraktograma pojedinačnih komponenti, fizičke smjese lijeka i ciklodekstrina te inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina bi trebala omogućiti opažanje promjena koje su se dogodile kao rezultat interakcije lijeka i

ciklodekstrina. Opažanje novih pikova kao i pomaci karakterističnih pikova molekula lijeka i promjene u njihovim intenzitetima mogu ukazivati na nastajanje inkluzijskog kompleksa. PXRD kao tehnika može biti korisna za potkrepljivanje rezultata dobivenih DSC analizom. Mogu se potvrditi pojave uočene na DSC krivulji poput smanjenja intenziteta ili potpunog gubitka pika koji odgovara taljenju lijeka kao posljedice potpunog prelaska lijeka u amorfnu fazu, a ne interakcije lijeka i ciklodekstrina uzrokovane zagrijavanjem tijekom DSC analize. Ova tehnika ponekad nije primjenjiva u slučaju produkata dobivenih mljevenjem, sušenja raspršivanjem ili liofilizacijom budući da nije moguće pouzdano odrediti je li dobiveni produkt rezultat stvarne inkluzije ili se radi o homogenoj smjesi dvije amorfne komponente. Spektroskopske tehnike zajedno uz DSC i difrakciju rendgenskog zračenja pomažu u identifikaciji i karakterizaciji formi u krutom stanju.

FTIR je kao spektroskopska tehnika korisna za identifikaciju vibracijskih vrpca kod kojih je došlo do određenih promjena uslijed inkluzije lijeka u ciklodekstrin. Promjene karakterističnih vrpca lijeka kao što su nestanak, širenje, promjene u intenzitetu i/ili pomak vrpca prema nižim ili višim valnim brojevima mogu biti pokazatelj inkluzije u ciklodekstrina. Sve te promjene mogu biti rezultat ograničenja vibracija istezanja molekule gosta (lijeka) zbog njegove inkluzije u šupljinu ciklodekstrina i/ili slabljenja veza među atoma zbog promjena u njihovoj okolini uslijed kompleksiranja. Glavne prednosti ove tehnike su široka upotreba, niski troškovi, visoko osjetljive i selektivne te relativno brze analize. Kao nedostatak tehnike može se navesti komplicirana priprema uzoraka. Uzorak se miješa s kalijevim bromidom te komprimira čime se dobije prozirna pastila. Pastila često zna pucati i biti nejednake debljine pa je FTIR tehnika manje korisna za kvantitativna mjerenja. Također, moguće su i promjene fizikalno-kemijskih svojstava uzorka tijekom izrade KBr pastile, a u obzir se uzima i visoka higroskopnost pastila. Još jedan nedostatak je često preklapanje ili maskiranje karakterističnih vrpca lijeka s vrpcama ciklodekstrina zbog većih masenih udjela ciklodekstrina u usporedbi s lijekom u smjesama u kojima se ove komponente nalaze u ekvimolarnim količinama.

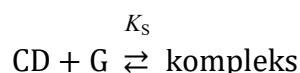
ATR pruža mnoge prednosti u usporedbi s FTIR tehnikom, budući da nije potrebna prethodna priprema uzorka te se izbjegava problem disperzije uzorka u KBr pastilama. Praškasti uzorak se nanosi na reflektirajuću površinu ATR kristala te se pritisne dijamantrnim klipom. Za razliku od FTIR, ATR analize ne pokazuju osjetljivost na promjene u debljinama uzorka. ATR tehnika je vrlo prikladna za analize razlika u formama čvrstih stanja te za

identifikacije i karakterizacije farmaceutskih formulacija. ATR tehnika se smatra osobito pogodnom za istraživanje vodikovih veza, budući da omogućava dobivanje spektara bez poteškoća povezanih s intenzivnom apsorpcijom vibracija istezanja O–H veza.³⁷

2.6. Analiza poboljšanja topljivosti (solubilizacijska ispitivanja)

Nastajanje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina u otopini proučava se tehnikama među kojima se ističu UV/Vis apsorpcijska spektroskopija, fluorescencijska spektroskopija, cirkularni dikroizam i nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR). Rjeđe se koriste metode i tehnike poput pH-potenciometrijskih titracija i mikrokalorimetrije.²⁵

Važno je naglasiti da je proces nastajanja inkluzijskog kompleksa između ciklodekstrina i molekule gosta reverzibilan posebice u vodenim otopinama gdje postoji stalna i brza izmjena između vezanog i nevezanog oblika. Takav reverzibilan proces se opisuje konstantom stabilnosti, K_S i konstantom disocijacije, K_D koja je recipročna vrijednost konstante stabilnosti.^{3,34}



Praćenje konstante stabilnosti od iznimne je važnosti budući da je afinitet vezanja lijeka za ciklodekstrin određen tom konstantom.³⁰

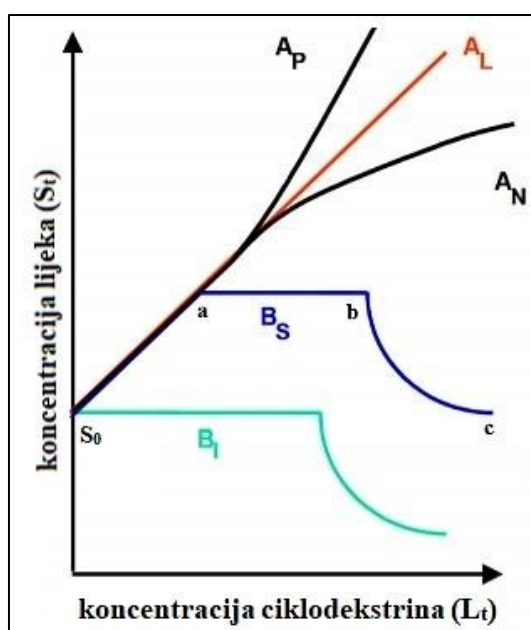
Vrijednost konstante stabilnosti predstavlja indikator fizikalno-kemijskih promjena molekule gosta prilikom nastajanja kompleksa s ciklodekstrinom. Većina metoda za određivanje konstanti stabilnosti temelji se na titracijama i praćenju promjena fizikalno-kemijskih svojstava molekule gosta (lijeka) prilikom nastajanja kompleksa s ciklodekstrinom pri čemu se analizira njihova koncentracijska ovisnost.³⁰ Svojstva koja se mogu pratiti su topljivost u vodenoj otopini, kemijska reaktivnost, molarna apsorptivnost, kemijski pomaci (NMR), pK_a vrijednosti i vremena zadržavanja (HPLC). Iako je moguće pratiti promjene fizikalno-kemijskih svojstava molekule domaćina (ciklodekstrina), uobičajenije i lakše je takve promjene pratiti za molekulu gosta.^{26,30}

Ipak, od svih navedenih metoda najviše se primjenjuje analiza poboljšanja topljivosti solubilizacijskim ispitivanjima (engl. *phase-solubility analysis*) koju su razvili Higuchi i Connors 1964. godine. Solubilizacijskim se ispitivanjima prati utjecaj solubilizatora (ciklodekstrina) na topljivost supstrata (lijeka).³⁰ Solubilizacijska ispitivanja se provode u

nizu tikvica u kojima se nalazi suvišak lijeka (s obzirom na njegovu topljivost u odsutnosti ciklodekstrina, tzv. intrinzičnu topljivost, S_0) te solubilizatora, odnosno ciklodekstrina (ligand) čija se koncentracija sukcesivno povećava. Suvišak lijeka je nužan kako bi se održala njegova visoka termodinamička aktivnost.³⁴ U svaku od tikvica se dodaje određeni volumen medija (voda ili neki od biorelevantnih medija). Dobivene suspenzije stave se na tresilicu te se miješaju određenim brojem okretaja u minuti pri uvjetima konstantne temperature kako bi se postiglo stanje ravnoteže. Nakon uspostavljanja ravnoteže suspenzije se profiltriraju, a lijek se kvantitativno određuje različitim analitičkim tehnikama (UV/Vis apsorpcijska spektroskopija, fluorescencijska spektroskopija, HPLC, itd.). Potom se konstruiraju dijagrami topljivosti (engl. *phase-solubility diagrams*) koji predstavljaju ovisnost ukupne množinske koncentracije lijeka (supstrat, S_t) o ukupnoj množinskoj koncentraciji ciklodekstrina (ligand, L_t).^{30,34}

2.6.1. Dijagrami topljivosti

Dijagrami topljivosti se dijele na dva glavna tipa, tip A i tip B s dodatnim podskupinama. Dijagrami topljivosti tipa A ukazuju na nastajanje topljivih inkluzijskih kompleksa, dok su dijagrami tipa B pokazatelj nastajanja inkluzijskih kompleksa ograničene topljivosti (slika 13).³⁰



Slika 13. Dijagrami topljivosti tipa A (s krivuljama ovisnosti A_L , A_P i A_N tipa) i tipa B (s krivuljama ovisnosti B_S i B_I tipa)³⁴

U slučaju dijagrama topljivosti tipa A topljivost supstrata raste s povećanjem koncentracije liganda. Intrinzična topljivost, S_0 predstavlja ravnotežnu topljivost supstrata u odsustvu liganda.³⁹ Krivulja ovisnosti A_L tipa predstavlja linearan porast topljivosti, a dobiva se u slučaju kompleksa prvog reda s obzirom na ligand i prvog ili višeg reda s obzirom na supstrat te nastaju kompleksi ciklodekstrina opće formule S_mL_n stehiometrijskog omjera 1:1, 2:1 ili 3:1.²⁵ Ako je nagib krivulje ovisnosti A_L tipa veći od 1 pretpostavlja se da su u sustavu prisutni kompleksi višeg reda s obzirom na supstrat. Nagib manji od 1 ne isključuje nužno komplekse višeg reda, ali u odsustvu drugih informacija obično se pretpostavlja stehiometrijski omjer 1:1 nastalih kompleksa.³⁰ Krivulja ovisnosti A_P tipa predstavlja pozitivno odstupanje od linearnosti (ukoliko je učinkovitost liganda u povećanju topljivosti supstrata pri višim koncentracijama veća)³⁴, a karakteriziraju je kompleksi opće formule SL_n koji su prvog reda s obzirom na supstrat, ali drugog ili višeg reda s obzirom na ligand.²⁵ Krivulje ovisnosti A_N tipa je teže interpretirati, a predstavljaju negativno odstupanje od linearnosti koje može biti rezultat kozmotropnog ili kaotropnog ponašanja liganda te utjecaja na svojstva medija poput provodljivosti, viskoznosti ili površinske napetosti. Samoudruživanje liganada u agregate pri višim koncentracijama je također jedno od mogućih objašnjenja krivulje ovisnosti A_N tipa.³⁴

Dijagrami topljivosti tipa B rezultat su nastajanja kompleksa ograničene topljivosti. Ukoliko promotrimo krivulju ovisnosti B_S tipa i područje od S_0 do točke a topljivost supstrata raste linearno zbog nastajanja topljivog kompleksa. U točki a je postignuta granična topljivost kompleksa. Daljnjim dodatkom liganda dodatno nastaje kompleks i dolazi do njegovog taloženja sve dok je u suspenziji prisutan slobodan supstrat. Održava se stalna koncentracija S_t (plato) sve do točke b . U točki b sav supstrat u čvrstom stanju je potrošen (otopljen), a daljnjim dodatkom liganda dolazi do dodatnog taloženja netopljivog kompleksa što smanjuje ukupnu koncentraciju otopljenog supstrata.

Krivulja ovisnosti B_I tipa interpretira se na isti način kao i krivulja B_S samo što je nastali kompleks toliko netopljiv da ne dolazi do početnog linearnog porasta topljivosti supstrata u ovisnosti o dodanom ligandu. Ako je kompleks koji je odgovaran za početni rast krivulje B_S identičan kompleksu koji taloži (dio krivulje $b-c$), porast koncentracije od S_0 do a bi trebao biti jednak konačnoj koncentraciji u točki c . Ipak, ovo ne predstavlja nužno pravilo budući da ovakvi sustavi često uključuju nastajanje dva ili više različitih kompleksa od kojih jedan može

biti odgovoran za početni rast topljivosti supstrata, dok drugi taloži u kasnijim fazama krivulje.³⁴

U slučaju dijagrama topljivosti tipa A nije moguće sa sigurnošću utvrditi stehiometrijski omjer inkluzijskih kompleksa, dok je kod krivulje ovisnosti B_S tipa to moguće iz područja platoa. U području platoa od točke a do točke b količina liganda je jednaka onoj količini koja sudjeluje u kompleksiranju, a količina kompleksiranog supstrata jednaka je količini neotopljenog, slobodnog supstrata u točki a . Stoga, količina kompleksiranog supstrata odgovara razlici ukupne količine supstrata dodanog u sustav i otopljene količine supstrata u točki a . Omjer $[S]/[L]$ odgovara stehiometrijskom omjeru inkluzijskog kompleksa.^{34,39} Ukoliko poboljšanju topljivosti supstrata doprinosi više od jedne vrste kompleksa tada će izračunata stehiometrija kompleksa odražavati utjecaje svakog od njih.³⁸

2.6.2. Konstanta stabilnosti

Konstanta stabilnosti ravnotežna je konstanta nastajanja kompleksa u otopini, a predstavlja mjeru za određivanje jakosti interakcija između tvari koje tvore kompleks. Kompleksna priroda sustava kojeg čine kompleksi otežava točno određivanje njihovog stehiometrijskog omjera koji je važan za opisivanje i interpretaciju konstante stabilnosti. U većini slučajeva, stehiometrijski omjer se razumno pretpostavi, a dobivena prividna konstanta stabilnosti je često zadovoljavajuća u svrhu iskazivanja opsega interakcije.³⁸

Promatrajući dijagram topljivosti tipa A (uključujući i početni dio krivulje B_S) pod pretpostavkom da je za rast topljivosti supstrata odgovoran stabilan kompleks opće formule S_mL_n , konstanta stabilnosti se može definirati prema izrazu:

$$K = \frac{[S_mL_n]}{[S]^m[L]^n}$$

gdje $[S_mL_n]$ označava množinsku koncentraciju kompleksa, $[S]$ množinsku koncentraciju supstrata, a $[L]$ množinsku koncentraciju liganda. Ukoliko se pretpostavi da stehiometrijski omjer nastalog kompleksa iznosi 1:1, konstanta stabilnosti se može definirati prema matematičkom izrazu pomoću nagiba pravca i intrinzične topljivosti (S_0) supstrata:

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

Ovaj matematički izraz se može koristiti samo ako je vrijednost nagiba krivulje dijagrama topljivosti manja od 1. Ako je vrijednost nagiba veća od 1 ne može se isključiti nastanak kompleksa drugog stehiometrijskog omjera pa se onda izraz ne može upotrijebiti.^{30,34}

Vrijednost konstante stabilnosti ($K_{1:1}$) se koristi za usporedbu afiniteta lijekova prema ciklodekstrinima ili njegovim derivatima, a izražava se u M^{-1} ($\text{mol}^{-1} \text{ L}$). Drugim riječima, konstanta stabilnosti je fundamentalno svojstvo koje opisuje jakost interakcije između lijeka i ciklodekstrina. Stoga, za bilo koju formulaciju za koju se zahtjeva potpuno otapanje upotreba ciklodekstrina kao učinkovitih solubilizatora ovisi o konstanti stabilnosti i intrinzičnoj topljivosti lijeka.³⁹

Vrijednosti konstante stabilnosti se kreću od 0 što upućuje da molekula gosta nema afiniteta prema molekuli ciklodekstrina do $10\ 000 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, što je do sada najveća eksperimentalno određena vrijednost. Prihvatljive vrijednosti konstante stabilnosti kreću se između $50 - 5000 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Vrijednosti manje od $50 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ukazuju na neznatan afinitet lijeka prema ciklodekstrinu, dok vrijednosti veće od $5000 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ mogu značajno ograničiti bioraspoloživost lijeka jer je stabilnost inkluzijskih kompleksa izrazito visoka.³

2.6.3. Efikasnost kompleksiranja

Otopljene molekule lijeka mogu u vodi tvoriti topljive dimere, trimere i agregate višeg reda te se mogu udružiti i s ostalim pomoćnim tvarima poput polimera i puferskih soli prisutnih u vodenoj otopini. Pri pojavi takvih fenomena vrijednost intrinzične topljivosti neće biti jednaka odsječku na ordinati. Ciklodekstrini često nisu u mogućnosti tvoriti inkluzijske komplekse s takvim vrstama.⁴⁰ Također, vrijednost konstante stabilnosti je usko ovisna o vrijednosti intrinzične topljivosti lijeka, a za vrlo lipofilne lijekove ponekad može biti problematično odrediti njihove točne vrijednosti.²⁰ Sve navedeno može dovesti do pogrešnih rezultata prilikom određivanja konstante stabilnosti. Stoga su konstante stabilnosti zapravo prividne konstante stabilnosti koje opisuju kombinaciju učinaka različitih složenih struktura na topljivost lijeka.

Točnija metoda za određivanje solubilizacijskog učinka ciklodekstrina je određivanje efikasnosti kompleksiranja (CE) koja predstavlja omjer koncentracije kompleksa CD te koncentracije slobodnog CD.

$$CE = \frac{[D/CD_n]}{[CD]}$$

Efikasnost kompleksiranja se računa iz nagiba solubilizacijske krivulje topljivosti i potpuno je neovisna je o odsječku i intrinzičnoj topljivosti. Za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 efikasnost kompleksiranja se računa prema izrazu:

$$CE = \frac{nagib}{1 - nagib}$$

Pomoću vrijednosti efikasnosti kompleksiranja moguće je odrediti i stehiometrijski omjer lijeka i ciklodekstrina u mediju koji je zasićen lijekom prema izrazu:

$$D:CD = 1: \frac{(CE + 1)}{CE}$$

Vrijednosti efikasnosti kompleksiranja slabo topljivih lipofilnih lijekova mogu se kretati od 0 za slučajeve kod kojih ne dolazi do kompleksiranja pa sve do beskonačnosti kada svaka molekula ciklodekstrina koja je prisutna u otopini formira kompleks s molekulom lijeka. U vodenim otopinama vrijednosti efikasnosti kompleksiranja su rijetko veće od 1,5 s prosječnom vrijednošću od 0,3, što znači da u prosjeku samo jedna od četiri molekule ciklodekstrina u mediju tvori kompleks sa slabo topljivom molekulom lijeka uz pretpostavku nastanka inkluzijskog kompleksa stehiometrijskog omjera 1:1.⁴⁰

Solubilizacijski učinak ciklodekstrina na slabo topljive lijekove može se poboljšati povećanjem S_0 i/ili $K_{1:1}$ različitim metodama. Povećanje intrinzične topljivosti u vodenim otopinama može se postići ionizacijom molekula lijeka, prevođenjem u soli i prevođenjem lijeka iz kristalne u amorfnu formu. Metode koje se koriste za povećanje konstante stabilnosti uključuju pripravu ternarnih kompleksa, dodatak polimera koji su topljivi u vodi u vodene otopine i elektrostatske interakcije između ioniziranih ciklodekstrina i lijekova u obliku protuiona.²⁵

2.7. Spektroskopske tehnike

Spektroskopija proučava interakciju elektromagnetskog značenja i tvari. Razvojem kroz povijest primjena spektroskopskih tehnika se širi pa se uz vidljivu svjetlost počinju proučavati druge vrste elektromagnetskog zračenja poput rendgenskog, ultraljubičastog, infracrvenog,

mikrovalnog i radiofrekventnog zračenja. Današnja primjena spektroskopskih tehnika proširena je na ostale tehnike koje ne uključuju elektromagnetsko zračenje, a to su masena spektrometrija te akustička i elektronska spektroskopija.

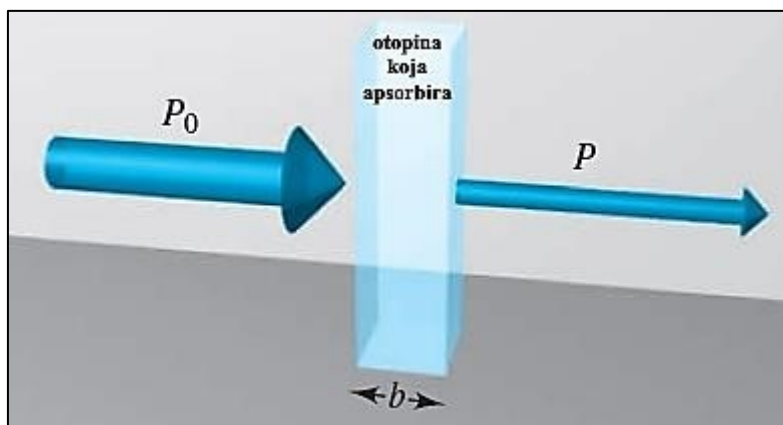
Prilikom spektroskopskih mjerenja uzorak se obično pobudi nekim oblikom energije poput svjetlosti, topline, električne energije, čestica ili kemijskom reakcijom. Analit apsorbira upadno elektromagnetsko zračenje te iz osnovnog stanja (stanje najniže energije) prelazi u pobuđeno stanje (stanje više energije). Informacije o analitu dobiju se mjerenjem elektromagnetskog zračenja koje se emitira pri povratku u osnovno stanje ili mjerenjem količine apsorbiranog elektromagnetskog zračenja. Spektroskopske metode koriste se za pojašnjavanje molekulskih struktura kao i za kvalitativno i kvantitativno određivanje anorganskih i organskih spojeva.⁴¹

2.7.1. UV/Vis apsorpcijska spektroskopija

Molekulska ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija primjenjuje se ponajprije za kvantitativnu analizu. To je najčešće primjenjivana tehnika u kemijskim i kliničkim laboratorijima.⁴¹

UV/Vis spektroskopija istražuje prijelaze elektronskih stanja molekula, tj. prijelaz elektrona pobudom iz molekulske orbitale niže energije u orbitalu više energije. Apsorpcijom fotona čija je energija jednaka energijskog razlici osnovnog i višeg energijskog stanja (orbitale) intenzitet propuštenog zračenja slabi i nastaju apsorpcijski spektri. Funkcionalna skupina u molekulskoj strukturi odgovorna za apsorpciju zračenja naziva se kromofor.^{41,43} Slika 14 prikazuje snop elektromagnetskog zračenja prije i nakon prolaska kroz sloj otopine debljine b i koncentracije c vrste koja apsorbira. Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju je smanjenje snage snopa upadnog zračenja s P_0 na P , pri čemu definiramo transmitanciju T otopine kao udio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu, a ona se obično izražava u postocima:

$$T = \frac{P}{P_0}$$



Slika 14. Prikaz prigušivanja snopa zračenja prolaskom kroz otopinu određene koncentracije koja apsorbira⁴³

U odnosu s transmitancijom je apsorbancija, A , koja opisuje količinu apsorbiranog zračenja, a definira se prema izrazu:

$$A = -\log T = \log\left(\frac{P_0}{P}\right)$$

Funkcijski odnos između apsorbancije i koncentracije apsorbirajuće vrste poznat je kao Beer-Lambertov zakon:

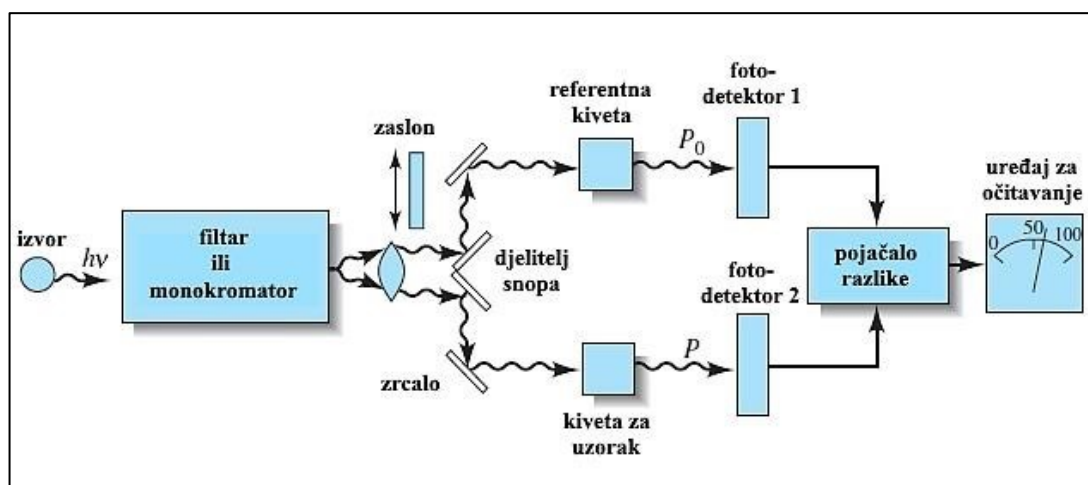
$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = a \cdot b \cdot c$$

Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji i duljini puta zračenja kroz uzorak uz konstantu proporcionalnosti, a , koja se naziva apsorpcijski koeficijent. Ako se koncentracija otopine apsorbirajuće vrste izražava u mol L^{-1} , a duljina puta zračenja kroz uzorak u cm^{-1} , konstanta proporcionalnosti se naziva molarna apsorptivnost sa simbolom ε , a izražava se u $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Tada je:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Većina instrumenata koji se koriste u UV/Vis apsorpcijskoj spektroskopiji su sastavljeni od nekoliko osnovnih dijelova: stabilnog izvora kontinuiranog zračenja, selektora valnih duljina,

spremnika za uzorke, detektora (pretvornika) zračenja i procesora signala s uređajem za njegovo mjerenje. Kao izvori kontinuiranog zračenja koriste se deuterijeve lampe za UV (200 – 380 nm) i lampe s volframovom niti za vidljivo područje spektra (380 – 800 nm). Kao selektori valnih duljina koji izoliraju uske vrpce zračenja koriste se filtri (u fotometrima) ili monokromatori (u spektrofotometrima). Kao detektori tj. pretvornici (pretvaraju različite kemijske i fizičke veličine u napon, naboj ili struju) koriste se fotocijevi, fotomultiplikatori, silicijske fotodiode, diodni nizovi ili fotonaponski članci. Spremnike za uzorke nazivamo kivetama, a one su načinjene od materijala prozirnog u određenom spektralnom području. Tako se kvarcne kivete koriste za rad u ultraljubičastom i vidljivom području, dok se kivete od silikatnog stakla i plastike koriste za rad u vidljivom području.⁴¹



Slika 15. Shematski prikaz osnovnih dijelova UV/Vis spektrofotometra⁴³

Spektrofotometri mogu biti jednosnopni ili dvosnopni. Kod jednosnopnih spektrofotometara analizira se samo jedan uzorak kroz kojeg prolazi jedan snop zračenja. Referentni uzorak se snima posebno, a dobiveni spektri se naknadno obrađuju. Dvosnopni spektrofotometri istovremeno analiziraju dva uzorka, referentni i mjerni uzorak. Dva rezultirajuća signala se pojačavaju te se određuje njihov omjer ili logaritam njihovih omjera. Ovisno o vrsti i dizajnu instrumenta dvosnopni spektrofotometri mogu mjeriti u prostoru ili u vremenu.⁴¹

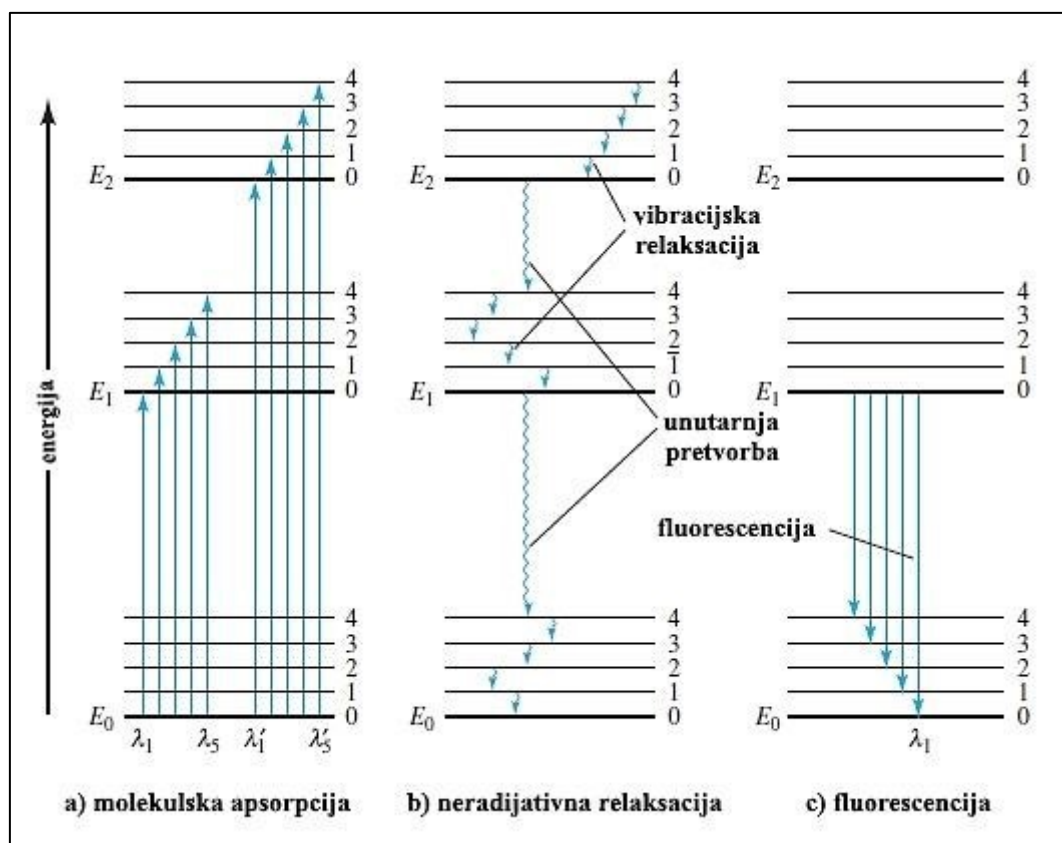
UV/Vis apsorpcijska spektroskopija je široko primjenjiva analitička tehnika s velikom osjetljivošću s niskim granicama detekcije do 10^{-5} mol dm⁻³. Smatra se umjereno selektivnom jer preklapanje širokih apsorpcijskih maksimuma otežava izravnu analizu smjesa pa je potrebna separacija.⁴¹

2.7.2. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencija i fosforescencija analitički su važni emisijski fenomeni kod kojih se molekule prvo pobuđuju apsorpcijom snopa elektromagnetskog zračenja. Pobuđene se vrste relaksiraju u osnovno stanje otpuštanjem suviška svoje energije u obliku fotona. Fluorescencijska emisija je analitički mnogo važnija od fosforescencijske emisije i zbiva se daleko brže te je potpuna za 10^{-5} sekundi ili manje nakon pobuđivanja. Fosforescencijska emisija može trajati nekoliko minuta, pa čak i nekoliko sati.⁴¹

Broj molekula koje imaju sposobnost fluorescencijske emisije relativno je malen. Fluorescencija zahtjeva strukturalna svojstva koja će usporiti brzinu neradijativnih relaksacijskih procesa. Većina molekula posjeduje strukturu koja omogućuje neradijativnu relaksaciju koja je brža od fluorescencijske emisije čime se isključuje mogućnost radijativne relaksacije. Sposobnost fluorescencijske emisije najčešće pripada organskim molekulama koje posjeduju kondenzirane aromatske sustave ili visoko konjugirane dvostruke veze te rjeđe alifatskim i acikličkim karbonilnim spojevima. Poznato je da fenomenu fluorescencijske emisije osobito pogoduje krutost molekula koja smanjuje brzinu neradijativne relaksacije.⁴¹ Aromatski spojevi koji sadrže $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{F}$, $-\text{OCH}_3$ (nabumeton), $-\text{NHCH}_3$ i $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ skupine lako fluoresciraju, dok skupine $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{NHCOCH}_3$ i većina meta-usmjeravajućih skupina, osim $-\text{CN}$ slabo ili uopće ne fluoresciraju.⁴³

Jednom kada molekula apsorbira energiju elektromagnetskog zračenja i prijeđe u pobuđeno stanje postoji nekoliko relaksacijskih procesa kojima se može vratiti u svoje osnovno stanje. Te procese prikazuje dijagram energijskih razina i prijelaza (dijagram po Jablonskom) prikazan na slici 16.

Slika 16. Dijagram energijskih razina i prijelaza (dijagram po Jablonskom)⁴²

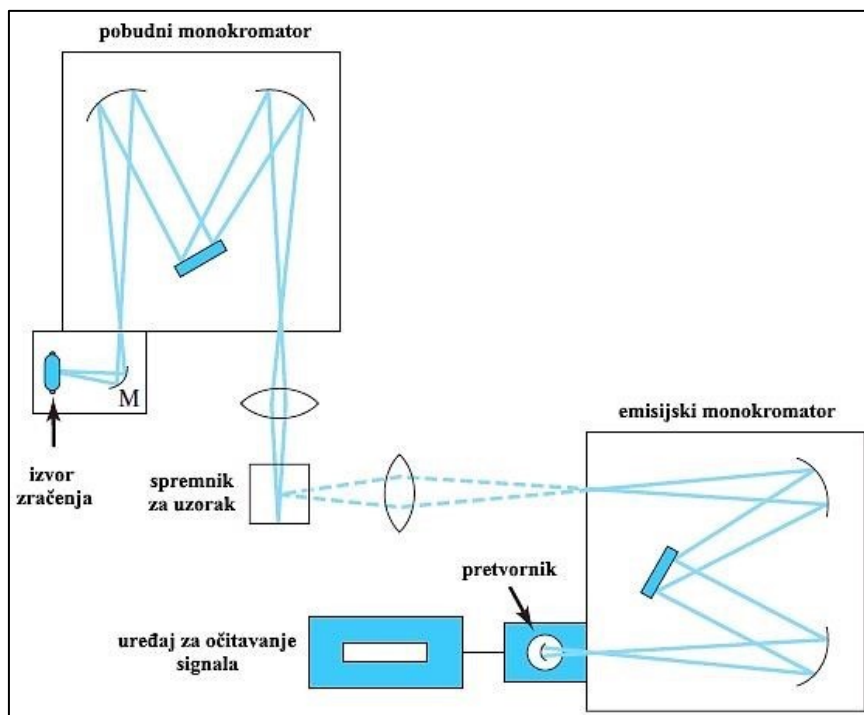
Struktura većine molekula omogućava neradijativne procese relaksacije u kojima pobuđene molekule gube energiju prilikom povratka u osnovno stanje, ali bez emisije zračenja. Neradijativne procese čine unutrašnja pretvorba (elektronska stanja molekule su energijski toliko bliska da im se vibracijske razine preklapaju; $S_2 \rightarrow S_1$), međusustavno križanje (prijelaz između dva stanja različitog multipliciteta) i vibracijska relaksacija (posljedica kolizija pobuđenih molekula između molekula analita i otapala). Fluorescencija je radijativni relaksacijski proces u kojem pri prijelazu između stanja istog multipliciteta ($S_1 \rightarrow S_0$) molekula emitira zračenje.

Fluorescencijska spektroskopija je selektivnija tehnika od UV/Vis apsorpcijske spektroskopije jer fluorescentnu vrstu karakteriziraju dvije vrste spektara. Pobudni i emisijski spektar karakteristični su za molekule koje fluoresciraju. Oba spektra se često pojavljuju kao međusobno zrcalne slike uz preklapanje pri rezonancijskoj liniji budući da su energijske razlike međusobno podjednake za osnovno i pobuđeno stanje. Pobudni spektar odgovara apsorpcijskom spektru molekule i snima se pri valnoj duljini emisije, a prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pobude. Emisijski spektar prikazuje ovisnost

fluorescencije uzorka o valnoj duljini emisije, a snima se pri valnoj duljini pobude. Karakterističan je za danu tvar i neovisan o valnoj duljini pobude.⁴¹

Fluorescencijska spektroskopija je i do 1000 puta osjetljivija tehnika od UV/Vis apsorpcijske spektroskopije te omogućava određivanje analita pri vrlo niskim koncentracijama (10^{-8} mol L⁻¹). Osjetljivost mjerenja se može povećati ili povećanjem snage pobudnog snopa ili pojačanjem detektorskog signala jer intenzitet fluorescencije izravno ovisi o ta dva parametra.

Osnovni dijelovi instrumenta za fluorescencijsku spektroskopiju su izvori velikog fluksa zračenja budući da je intenzitet fluorescencijske emisije direktno proporcionalan intenzitetu izvora (lampa ksenonovog luka, Xe/Hg žarulja ili laseri), selektori valnih duljina (filtri ili monokromatori), spremnik za uzorke (kvarcne kivete), fotoelektrični detektor te procesor signala s uređajem za njegovo mjerenje.⁴¹ Tipični instrumenti za praćenje fluorescencijske emisije su fotometri i spektrofluorimetri (slika 17).⁴³ Oni su uglavnom dvosnopni instrumenti radi kompenzacije fluktuacije snage zračenja. Snop za pobudu uzorka prvo prolazi kroz primarni selektor valnih duljina pri čemu se propušta zračenje koje uzrokuje fluorescenciju. Uzorak emitira zračenje u svim smjerovima, ali ga je najpogodnije pratiti pod pravim kutom u odnosu na pobudni snop pri čemu se izbjegava utjecaj raspršenog zračenja na mjerenje intenziteta emisije. Emitirano zračenje prolazi kroz drugi selektor valnih duljina koji izolira fluorescencijski maksimum i zračenje dolazi do fotoelektričnog detektora. Za razliku od kiveta predviđenih za UV/Vis apsorpcijska mjerenja za spektrofluorimetrijska određivanja koriste se kvarcne kivete kod kojih su sve četiri stijenke transparentne budući da se emitirano zračenje detektira pod kutem od 90°.⁴¹

Slika 17. Shematski prikaz osnovnih dijelova spektrofluorimetra⁴²

2.7.3. Infracrvena spektroskopija

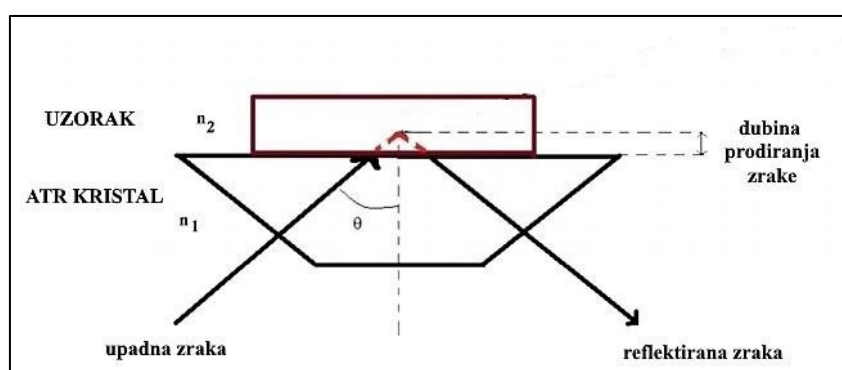
Infracrvena spektroskopija je tehnika koja se temelji na interakciji tvari i elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području spektra. Apsorpcijom infracrvenog zračenja potiču se vibracije i rotacije molekule budući da su energije u IR dijelu spektra nedostatne za pobudu elektronskih prijelaza. Molekula apsorbira IR zračenje samo ako se tijekom vibracije mijenja električni dipolni moment molekule.⁴⁴

Apsorpcijom IR zračenja nastaju vibracijski spektri koji se koriste pri određivanju molekulske strukture i kemijskog sastava tvari.⁴⁴ Učinci razlika u rotacijskim stupnjevima se obično ne mogu uočiti budući da su rotacije u krutim i tekućim uzorcima ograničene.⁴¹ Za identifikaciju i karakterizaciju uzoraka najčešće se snimaju spektri u srednjem infracrvenom području ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). IR spektar se može podijeliti na dva područja: područje funkcionalnih skupina ($4000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$) i područje otiska prsta ($1100 - 400 \text{ cm}^{-1}$).⁴⁴

IR spektroskopija jedna je od najkorištenijih tehnika za identifikaciju čistih organskih i anorganskih spojeva, jer osim nekoliko homonuklearnih molekula kao što su O_2 , N_2 i Cl_2 , sve molekulske vrste apsorbiraju infracrveno zračenje. Osim kiralnih molekula u kristaliničnom stanju, svaka molekulska vrsta ima jedinstven infracrveni apsorpcijski spektar.

IR spektroskopija za razliku od UV/Vis apsorpcijske spektroskopije najčešće nije pogodna za kvantitativna određivanja jer uski maksimumi koji su tipični za infracrvenu apsorpciju uzrokuju odstupanja od Beerova zakona te su mjerenja apsorpcije u infracrvenom području manje precizna. Međutim kada je dovoljna umjerena preciznost, jedinstvena priroda IR spektara pridonosi stupnju selektivnosti u kvantitativnim određivanjima čime se smanjuje učinak neželjenih značajki.⁴¹

Iako se IR spektri najčešće snimaju tehnikom transmisije pomoću FTIR spektrofotometara, zbog nekonvencionalnog načina pripreme uzorka u obliku KBr pastile danas se sve više primjenjuje ATR tehnika i za analizu tekućih i za analizu čvrstih uzoraka. ATR tehnika temelji se na totalnoj unutarnjoj refleksiji zračenja na granici faza. Jednu fazu čini uzorak, a drugu refleksijski kristal koji je načinjen od materijala koji ne apsorbira u IR području spektra i čiji je indeks loma velik u usporedbi s uzorkom (ZnSe, Si, Ge i dijamant). Nakon što upadna zraka prodre u refleksijski element ona se potpuno reflektira na granici između elementa i uzorka ukoliko je kut upada zrake veći od kritičnog kuta. Zraka prije refleksije ipak dijelom prodire u uzorak koji se nalazi na refleksijskom elementu. Rezultirajuće reflektirano zračenje manjeg je intenziteta od upadnog zračenja te se naziva prigušeno zračenje. ATR tehnika ne zahtijeva posebnu pripravu uzoraka za mjerenje niti su potrebne kivete, već samo nosač s prikladnim unutarnjim refleksijskim elementom. Pogodna je za snimanje spektara uzoraka koji izrazito apsorbiraju IR zračenje. Na slici 18 shematski je prikazan princip rada ATR tehike.⁴⁴



Slika 18. Shematski prikaz principa rada ATR tehike⁴⁵

Kod uređaja za infracrvenu spektroskopiju uzorak se za razliku od uređaja za UV/Vis apsorpcijsku spektroskopiju smješta između izvora i monokromatora. Takav smještaj ima prednost jer se svo raspršeno zračenje koje nastaje u dijelu za uzorke ukloni

monokromatorom. Komponente uređaja za infracrveno područje bitno se razlikuju od onih za UV/Vis područje. Izvori za IR zračenje su Nernstov štapić, Globalov štapić ili električno grijana uzvojnica od žice nikroma. Detektori su najčešće toplinski (termoelektrični element, bolometar, pneumatski detektor ili piroelektrični detektor). Optičke komponente instrumenata za infracrveno područje načinjene su od krutina kao što su kalijev bromid, KBr i natrijev klorid, NaCl.

FTIR spektrometar se očituje u neobično velikoj osjetljivosti, razlučivanju te brzini skupljanja podataka (unutar jedne sekunde). Instrumenti koji imaju sposobnost Fourierove transformacije ne sadrže disperzni element, a sve se valne duljine detektiraju i mjere precizno i simultano pomoću Michelsonovog interferometra. Rezultirajući interferogram se u oblik IR spektra prevodi matematičkom operacijom – Fourierovom transformacijom.^{41,42}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i materijali

U eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije i materijali:

- 4-(6-metoksi-2-naftil)-2-butanon, nabumeton ($C_{15}H_{16}O_2$), Cayman Chemical, Ann Arbor, SAD
- β -ciklodekstrin, β -CD ($C_{42}H_{70}O_{35}$), CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- Natrijeva sol sulfobutileter- β -ciklodekstrina, SBE β CD; $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8O_3SNa)_n$, CycloLab, Budimpešta, Mađarska
- Acetonitril (CH_3CN), HPLC stupanj čistoće, J. T. Baker, Phillipsburg, SAD
- simulirani želučani medij, pH = 1,0
- simulirani duodenalni medij, pH = 4,5
- simulirani intestinalni medij, pH = 6,8
- Ultračista voda dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sustava za pročišćavanje, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Filteri *Chromafil Xtra* H-PTFE, veličina pora 0,45 μ m, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka
- Kalijev bromid (KBr), *pro analysi* stupanj čistoće, Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.1.1. Priprava otopine biorelevantnog medija (simulirani želučani medij, pH = 1,0)

Otopina simuliranog želučanog medija (pH = 1,0) pripravljena je pipetiranjem 250 cm³ otopine natrijeva klorida (NaCl) koncentracije 0,2 mol dm⁻³ i 425 cm³ otopine klorovodične kiseline (HCl) koncentracije 0,2 mol dm⁻³ u odmjernu tikvicu od 1000 cm³. Tikvica se zatim nadopunila do oznake ultračistom vodom. Otopina simuliranog želučanog medija je pripravljena prema smjernicama iz devetog izdanja Europske farmakopeje.⁴⁶

3.1.2. Priprava otopine biorelevantnog medija (simulirani duodenalni medij, pH = 4,5)

Otopina simuliranog duodenalnog medija (pH = 4,5) pripravljena je na način da se u odmjernoj tikvici od 1000 cm³ otopilo 13,61 g kalijeva dihidrogen fosfata (KH₂PO₄) u 750,0 cm³ deionizirane vode. Kada je to bilo potrebno pH vrijednost je podešena pomoću 0,1 mol

dm⁻³ otopine natrijeva hidroksida (NaOH) ili pomoću 0,1 mol dm⁻³ otopine klorovodične kiseline (HCl). Odmjerna tikvica je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Otopina simuliranog duodenalnog medija je pripravljena prema smjernicama iz devetog izdanja Europske farmakopeje.⁴⁶

3.1.3. Priprava otopine biorelevantnog medija (simulirani intestinalni medij, pH = 6,8)

Otopina simuliranog intestinalnog medija (pH = 6,8) pripravljena je na način da se u odmjernu tikvicu od 1000 cm³ otpipetiralo 250,0 cm³ otopine KH₂PO₄ koncentracije 0,2 mol dm⁻³ i 112,0 cm³ otopine NaOH koncentracije 0,2 mol dm⁻³. Odmjerna tikvica je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Otopina simuliranog intestinalnog medija je pripravljena prema smjernicama iz devetog izdanja Europske farmakopeje.⁴⁶

3.2. Instrumentacija

Suspenzije binarnih sustava (nabumeton i ciklodekstrini) miješane su (250 – 300 RPM) do postizanja ravnoteže korištenjem orbitalnih tresilica Tehnica EV-402 i Tehnica Vibromix 403 EVT.

Analiza UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom provedena je spektrofotometrom Specord 200 (Analytik Jena AG, Jena, Njemačka). Apsorpcijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina 190 – 400 nm s postavljenom širinom pukotine od 1 nm i brzinom snimanja od 10 nm s⁻¹. Apsorpcijski maksimum (λ_{MAX}) korišten za kvantitativno određivanje nabumetona se nalazio pri 232 nm. Prije svakog mjerenja provedena je referentna korekcija instrumenta otopinom slijepe probe koja po svom sastavu odgovarala sustavu otapala koji je korišten za pripravu uzoraka (acetonitril:voda = 70:30). Korištene su standardne kvarne kivete dimenzija 10 × 10 mm.

Analiza fluorescencijskom spektroskopijom provedena je spektrofluorimetrom LS55 (PerkinElmer Inc., Waltham, SAD). Emisijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina 290 – 450 nm, pri čemu je valna duljina pobude (λ_{EX}) iznosila 315 nm, dok je maksimum fluorescentne emisije nabumetona (λ_{EM}) identificiran pri 353 nm. Širina ulazne i izlazne pukotine iznosila je 5 nm. Korištene su standardne kvarne kivete dimenzija 10 × 10 mm.

Uzorci kompleksa u čvrstom stanju te čistih komponenti pripremljeni su mljevenjem u periodu od 30 min (25 Hz) korištenjem Mixer Mill MM 200 visokoenergijskog vibracijskog

mlina (Retsch, Haan, Njemačka). Uzorci fizičkih smjesa pripremljeni su tretiranjem smjese komponenti pomoću keramičkog tarionika i tučka.

Transmisijski (FTIR) spektri prethodno pripremljenih uzoraka u obliku KBr pastila snimljeni su (kao rezultat uprosječivanja 32 snimanja) u rasponu valnih brojeva 4000 – 400 cm^{-1} , uz rezoluciju od 4 cm^{-1} korištenjem instrumenta IR spektrometra Vector 22 (Bruker, Billerica, SAD). Smjese uzorka i KBr ($m:m = 1:100$) usitnjene su u ahatnom tarioniku do finog praha i zatim pod hidrauličnom prešom (PerkinElmer Inc., Waltham, SAD) komprimirane u tanke pastile (tzv. KBr pastile).

ATR spektri uzoraka snimljeni su (kao rezultat uprosječivanja 32 snimanja) u rasponu valnih brojeva 4000 – 600 cm^{-1} , uz rezoluciju od 4 cm^{-1} korištenjem IR spektrometra Vector 22 (Bruker, Billerica, SAD) i uz korištenje Pike MIRacle ATR nosača.

Svi spektralni podaci obrađeni su računalnim programom *OriginPro 2016*.

3.3. Kvantitativno određivanje nabumetona

Za kvantitativno određivanje nabumetona korištene su UV/Vis spektrofotometrijske i spektrofluorimetrijske metode koje su razvijene i validirane na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 4. Izvedbene značajke, odnosno analitički parametri metoda prema kojima se kvantitativno određivao nabumeton

| | spektrofotometrija | spektrofluorimetrija |
|---|------------------------|---------------------------|
| područje linearnosti ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,25 – 4,0 | 0,05 – 1,20 |
| jednadžba kalibracijskog pravca | $y = 0,3530x - 0,0232$ | $y = 794,4497x + 24,1822$ |
| koeficijent determinacije | 0,9999 | 0,9997 |
| granica detekcije, LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,03 | 0,02 |
| granica kvantifikacije, LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,09 | 0,05 |
| ponovljivost (RSD %) | $\leq 1,0$ | $\leq 3,0$ |
| intermedijarna preciznost (RSD %) | $< 0,5$ | $< 1,0$ |
| specifičnost | zadovoljavajuća | zadovoljavajuća |

3.4. Priprema suspenzija za analizu poboljšanja topljivosti

Prilikom određivanja topljivosti nabumetona u prisutnosti ciklodekstrina bilo je potrebno pripremiti suspenzije nabumetona sa svakim od korištenih ciklodekstrina, odnosno β -CD i SBE β CD. Suspenzije su pripremljene na način da se u svaku od tikvica za miješanje dodala jednaka količina nabumetona u velikom suvišku (s obzirom na njegovu intrinzičnu topljivost), mase 10 mg, a pojedini ciklodekstrini dodavani su u različitim koncentracijskim rasponima sa sukcesivnim porastom koncentracije. Za pripremu suspenzija nabumetona s β -CD koncentracijski raspon ciklodekstrina iznosio je $0 - 12,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Za pripremu suspenzija nabumetona s SBE β CD koncentracijski raspon ciklodekstrina iznosio je $0 - 40,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. U svaku od tikvica dodano je po 5,0 mL predviđenog medija, a tikvice su potom smještene na orbitalne tresilice. Od svake suspenzije uzimani su alikvoti (2,0 mL) u vremenskim periodima 24 i 48 sati od pripreme suspenzija te su profiltrirani uz pomoć filtera *Chromafil Xtra* H-PTFE s veličinom pora 0,45 μm . Mjerne otopine za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje nabumetona pripremane su nakon filtriranja alikvota suspenzija nabumetona i ciklodekstrina.

Mjerne otopine za UV/Vis spektrofotometrijsko kvantitativno određivanje nabumetona pripremane su u odmjernim tikvicama volumena 5,0 mL pipetiranjem određenog volumena profiltriranog alikvota suspenzije (tablica 5) i razrjeđivanjem odgovarajućim volumenom acetonitrila i vode tako da konačan sustav otapala bude acetonitril:voda = 70:30.

Mjerne otopine za spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje nabumetona pripremane su analogno prethodno opisanom postupku (tablica 6) u odmjernim tikvicama volumena 10,0 mL. Sustav otapala je također bio acetonitril:voda = 70:30.

Tablica 5. Priprava mjernih otopina za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje nabumetona u suspenzijama s β -CD

| Otopina | UV/Vis spektrofotometrija | | Fluorescencijska spektroskopija | |
|---------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|
| | $V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$ | Faktor razrjeđenja | $V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$ | Faktor razrjeđenja |
| 1 | 500,0 | 10,0 | 200,0 | 50,0 |
| 2 | 100,0 | 50,0 | 40,0 | 250,0 |
| 3 | 100,0 | 50,0 | 40,0 | 250,0 |
| 4 | 50,0 | 100,0 | 40,0 | 250,0 |
| 5 | 50,0 | 100,0 | 20,0 | 500,0 |
| 6 | 50,0 | 100,0 | 20,0 | 500,0 |

Tablica 6. Priprava mjernih otopina za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje nabumetona u suspenzijama sa SBE β CD

| Otopina | UV/Vis spektrofotometrija | | Fluorescencijska spektroskopija | |
|---------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|
| | $V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$ | Faktor razrjeđenja | $V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$ | Faktor razrjeđenja |
| 1 | 500,0 | 10,0 | 200,0 | 50,0 |
| 2 | 20,0 | 250,0 | 10,0 | 1000,0 |
| 3 | 20,0 | 250,0 | 10,0 | 1000,0 |
| 4 | 20,0 | 250,0 | 10,0 | 1000,0 |
| 5 | 10,0 | 500,0 | 10,0 | 1000,0 |
| 6 | 10,0 | 500,0 | 5,0 | 2000,0 |
| 7 | 10,0 | 500,0 | 5,0 | 2000,0 |
| 8 | 10,0 | 500,0 | 5,0 | 2000,0 |
| 9 | 10,0 | 500,0 | 5,0 | 2000,0 |

Na temelju mjerenja apsorbancije pri apsorpcijskom maksimumu nabumetona i uz pomoć baždarnog pravca određene su koncentracije nabumetona u suspenzijama korištenjem validirane UV/Vis spektrofotometrijske metode.

Mjerenjem intenziteta fluorescencije uzoraka pri maksimumu emisije nabumetona također su na osnovu baždarnog pravca određene koncentracije nabumetona u svakoj od suspenzija korištenjem validirane spektrofluorimetrijske metode.

Konstruirani su pripadajući dijagrami topljivosti i izračunate su konstante stabilnosti, $K_{1:1}$, prema izrazu:

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

i efikasnosti kompleksiranja, CE , prema izrazu:

$$CE = \frac{nagib}{1-nagib}$$

3.4.1. Analiza saturacijske topljivosti

Prilikom određivanja topljivosti čvrstih kompleksa nabumetona i korištenih ciklodekstrina kao i uzorka nabumetona koji je bio podvrgnut mehanokemijskoj aktivaciji mljevenjem u navedenom mlinu bilo je potrebno pripremiti njihove suspenzije. U jednu od tikvica za miješanje dodana je količina netretiranog nabumetona u velikom suvišku (s obzirom na njegovu intrinzičnu topljivost), mase ≈ 10 mg. U drugu tikvicu za miješanje dodana je količina nabumetona tretiranog u visokoenergijskom vibracijskom mlinu u velikom suvišku, mase ≈ 10 mg. U dvije tikvice za miješanje dodana je količina čvrstih uzoraka nabumetona i β -CD (NG, odnosno LG uzorci) koja je bila ekvivalentna masi suviška nabumetona koji je korišten tijekom solubilizacijskih ispitivanja, odnosno $\approx 59,72$ mg. U posljednje dvije tikvice za miješanje dodana je količina čvrstih uzoraka nabumetona i SBE β CD (NG, odnosno LG uzorci) koja je bila ekvivalentna masi suviška nabumetona koji je korišten tijekom solubilizacijskih ispitivanja, odnosno $\approx 104,77$ mg. U svaku od ukupno šest tikvica za miješanje zatim je dodan volumen od 5,0 mL vode, a tikvice su zatim smještene na orbitalne tresilice.

Od svake suspenzije uzimani su alikvoti (2,0 mL) u vremenskim periodima 24 i 48 sati od pripreme suspenzija te su profiltrirani uz pomoć filtera *Chromafil Xtra* H-PTFE s veličinom pora 0,45 μ m. Mjerne otopine za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko kvantitativno određivanje nabumetona pripremane su nakon filtriranja alikvota suspenzija nabumetona i ciklodekstrina. Mjerne otopine za UV/Vis spektrofotometrijsko kvantitativno određivanje nabumetona pripremane su u odmjernim tikvicama volumena 5,0 mL pipetiranjem određenog volumena profiltriranog alikvota suspenzije (tablica 7) i

razrjeđivanjem odgovarajućim volumenom acetonitrila i vode tako da konačan sustav otapala bude acetonitril:voda = 70:30.

Mjerne otopine za spektrofotometrijsko kvantitativno određivanje nabumetona pripravane su analogno prethodno opisanom postupku (tablica 7) u odmjernim tikvicama volumena 10,0 mL. Sustav otapala je također bio acetonitril:voda = 70:30.

Tablica 7. Priprava mjernih otopina za UV/Vis spektrofotometrijsko i spektrofotometrijsko kvantitativno određivanje nabumetona u suspenzijama čvrstih kompleksa

| Uzorak | UV/Vis spektrofotometrija | | Fluorescencijska spektroskopija | |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|
| | $V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$ | Faktor razrjeđenja | $V_{\text{ALIKVOT}} / \mu\text{L}$ | Faktor razrjeđenja |
| NAB | 500,0 | 10,0 | 200,0 | 50,0 |
| NAB (MLIN) | 500,0 | 10,0 | 200,0 | 50,0 |
| NAB + β -CD (NG) | 50,0 | 100,0 | 20,0 | 500,0 |
| NAB + β -CD (LG) | 50,0 | 100,0 | 20,0 | 500,0 |
| NAB + SBE β CD (NG) | 20,0 | 250,0 | 10,0 | 1000,0 |
| NAB + SBE β CD (LG) | 20,0 | 250,0 | 10,0 | 1000,0 |

3.5. Priprema uzoraka nabumetona i odabranih ciklodekstrina u čvrstom stanju

U okviru ovog diplomskog rada mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu i u tarioniku (fizička smjesa) pripremljeni su čvrsti uzorci nabumetona s β -ciklodekstrinom i sulfobutileter- β -ciklodekstrinom. Čvrsti uzorci u visokoenergijskim vibracijskim mlinovima pripremljeni su tehnikom suhog mljevenja i tehnikom mljevenja uz dodatak malih katalitičkih količina otapala (otapalom potpomognuto mljevenje) tj. etanola koji je prije mljevenja u za to predviđene uzorke dodan u volumenu od 15,0 μL . Čvrsti uzorci pripremljeni su na način da su navedene komponente prije tretiranja u mlinu, odnosno tarioniku bile prisutne (odvagane) u ekvimolarnim omjerima, a ukupna masa smjese komponenti iznosila je ≈ 200 mg (tablica 8). Smjese komponenti su nakon vaganja smještene u posude za mljevenje od nehrđajućeg čelika (volumena 10,0 mL) u kojima su se nalazile po dvije kuglice od identičnog materijala promjera 7 mm. Također, mehanokemijskoj aktivaciji mljevenjem u vibracijskom mlinu (M) i

tretiranjem u tarioniku (PM) podvrgnuti su uzorci samog nabumetona kao i samih ciklodekstrina kako bi se utvrdio utjecaj mljevenja na njihova svojstva.

Tablica 8. Teorijski izračunate mase nabumetona i korištenih ciklodekstrina potrebne za pripravu uzoraka mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu, odnosno tretiranjem u tarioniku

| Uzorak | $m(\text{NAB})_{\text{teor.}} / \text{mg}$ | $m(\text{CD})_{\text{teor.}} / \text{mg}$ |
|--------------------------------------|--|---|
| NAB | 200,0 | - |
| β-CD | - | 200 |
| SBEβCD | - | 200 |
| NAB + β-CD | 33,49 | 166,51 |
| NAB + SBEβCD | 19,09 | 180,91 |

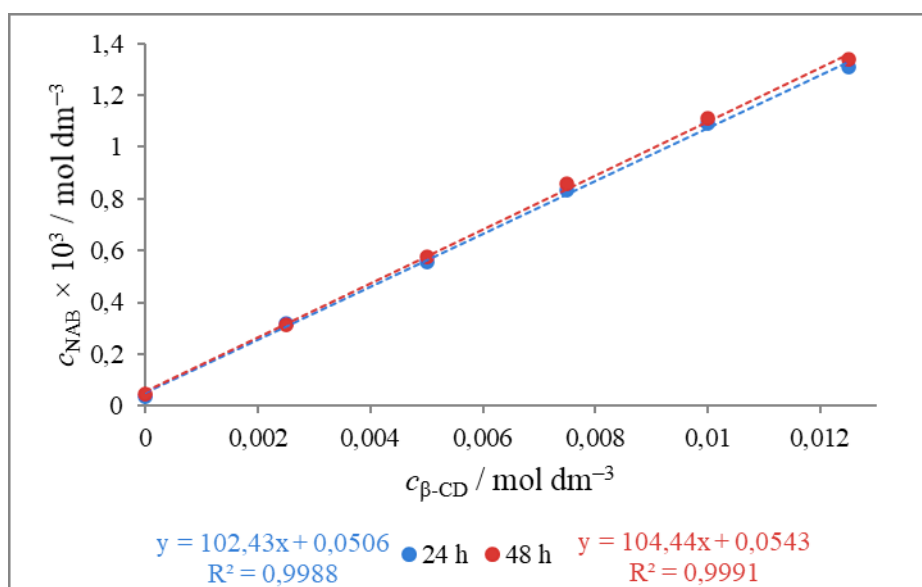
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza poboljšanja topljivosti (solubilizacijska ispitivanja)

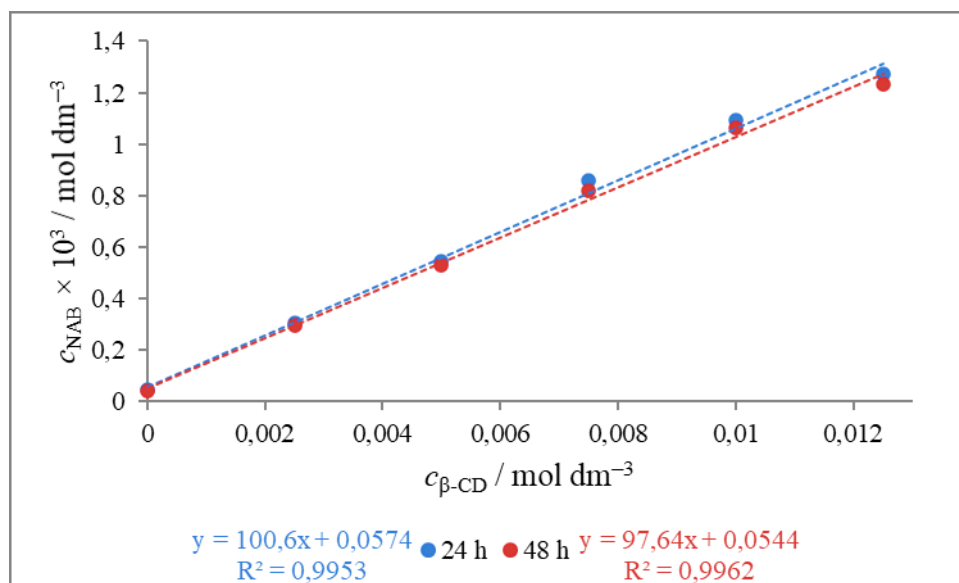
4.1.1. Analiza poboljšanja topljivosti UV/Vis spektrofotometrijskom metodom

Ovisnost topljivosti nabumetona o prisutnosti ciklodekstrina praćena je u vodi i u otopinama biorelevantnih medija različitih pH-vrijednosti (1,0, 4,5 i 6,8), a nabumeton se kvantitativno određivao 24 i 48 h od pripreve suspenzija. Nakon pripreve mjernih otopina i mjerenja apsorbancije pri apsorpcijskom maksimumu, nabumeton je kvantitativno određen korištenjem baždarnog pravca validirane UV/Vis spektrofotometrijske metode.

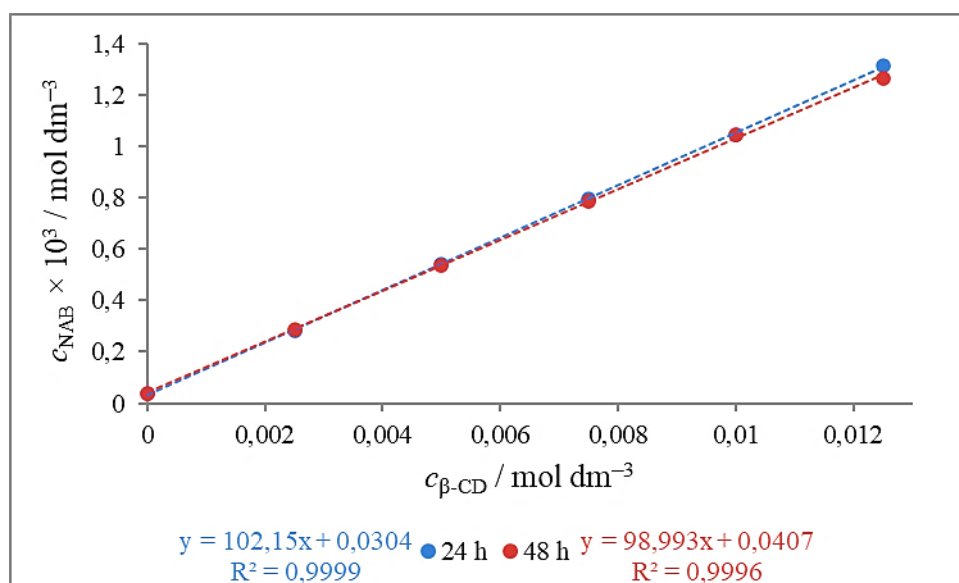
Na temelju dobivenih podataka konstruirani su dijagrami topljivosti prema Higuchiju i Connorsu. Dobiveni dijagrami topljivosti okarakterizirani su kao tip A s krivuljom ovisnosti A_L koja predstavlja linearno povećanje topljivosti lijeka s povećanjem koncentracije ciklodekstrina. Slike 19, 20, 21 i 22 prikazuju dijagrame topljivosti nabumetona u prisutnosti β -CD, a slike 23, 24, 25 i 26 dijagrame topljivosti nabumetona u prisutnosti SBE β CD s pripadajućim jednadžbama pravaca i koeficijentima determinacije.



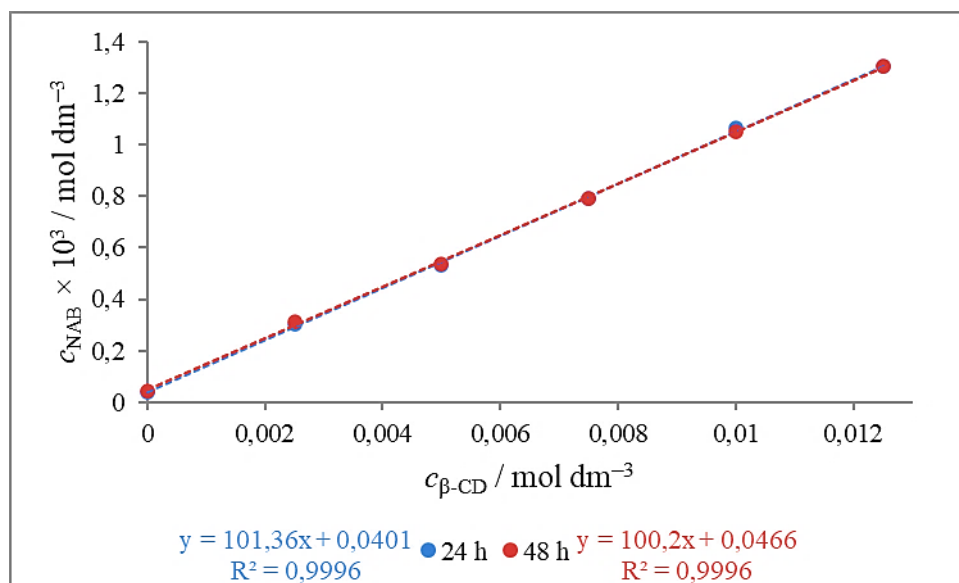
Slika 19. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u vodi



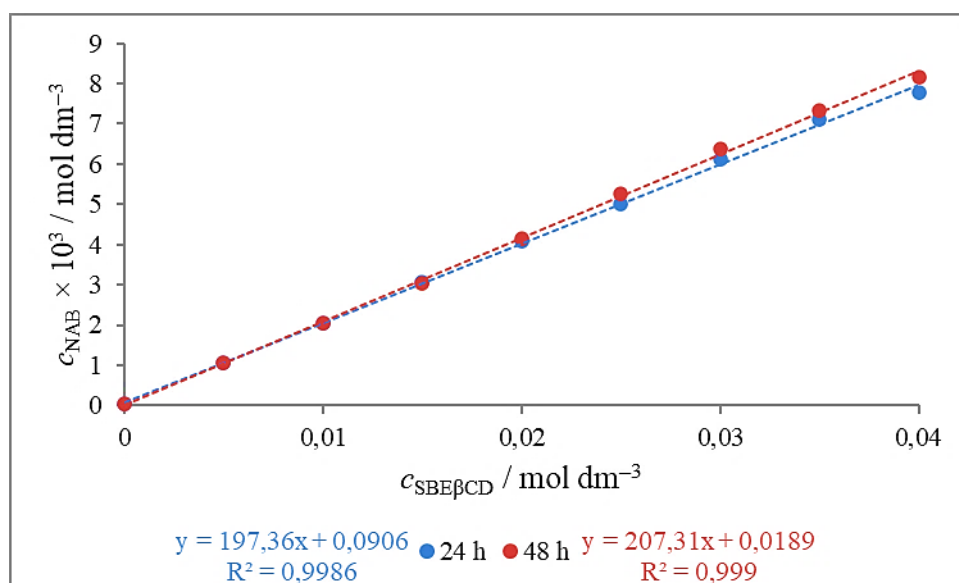
Slika 20. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od priprave suspenzija u simuliranom želučanom mediju



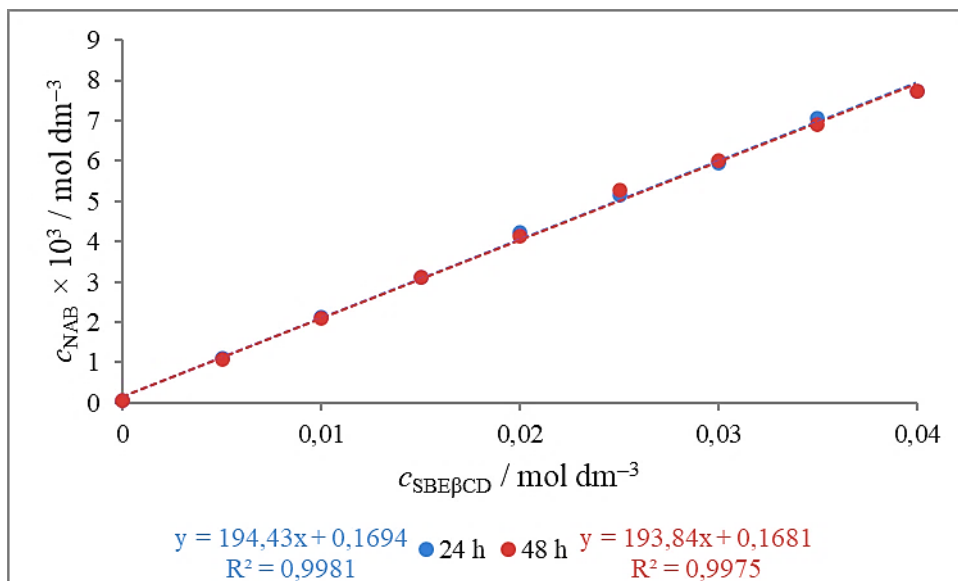
Slika 21. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od priprave suspenzija u simuliranom duodenalnom mediju



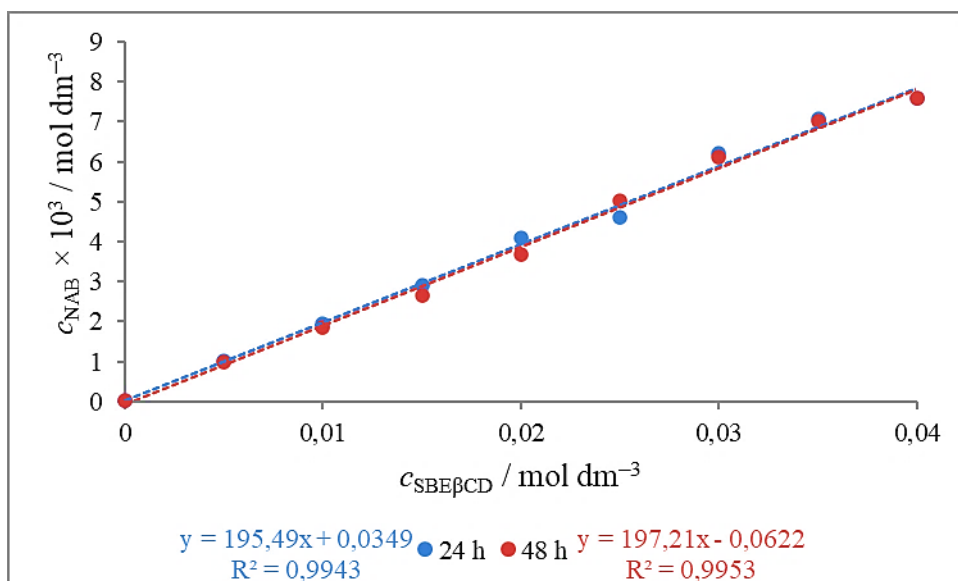
Slika 22. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom intestinalnom mediju



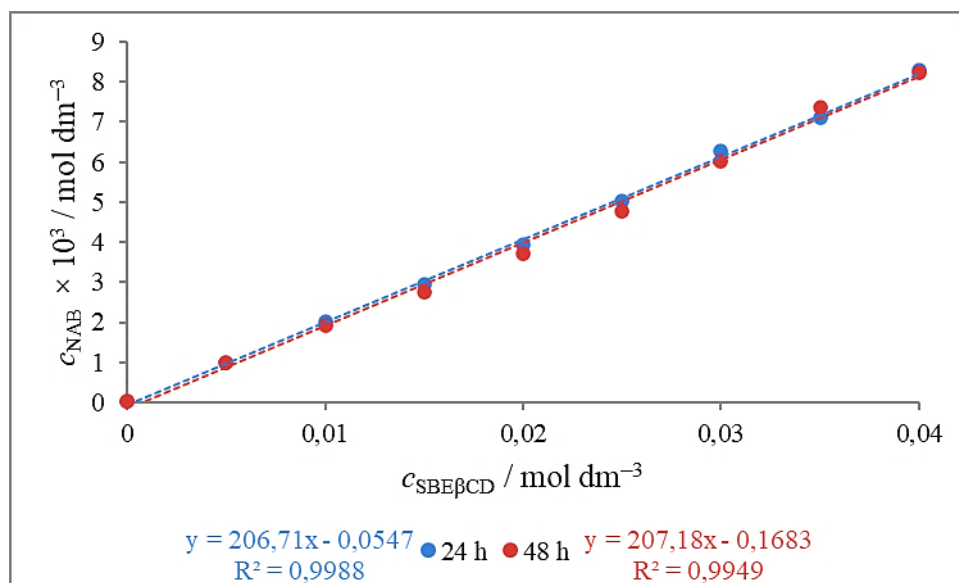
Slika 23. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u vodi



Slika 24. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom želučanom mediju



Slika 25. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom duodenalnom mediju



Slika 26. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom intestinalnom mediju

Na temelju konstruiranih dijagrama topljivosti i ovisnosti koncentracije otopljenog nabumetona o koncentraciji β -CD i SBE β CD koji su dobiveni UV/Vis spektrofotometrijskom metodom može se zaključiti kako se ravnoteža nastajanja kompleksa nabumetona i odabranih ciklodekstrina uspostavila 24 h od pripreve suspenzija. Naime dijagrami topljivosti dobiveni 24 h i 48 h od pripreve suspenzija poklapaju se u svim slučajevima. Između svih dijagrama postoje minimalne razlike u vrijednostima nagiba krivulja, uz izuzetak krivulje koja opisuje utjecaj SBE β CD na topljivost nabumetona u vodi gdje je razlika nešto veća (slika 23). Navedena razlika se može pripisati eksperimentalnoj pogrešci što je i potvrđeno kasnijim spektrofluorimetrijskim mjerenjima (slika 31).

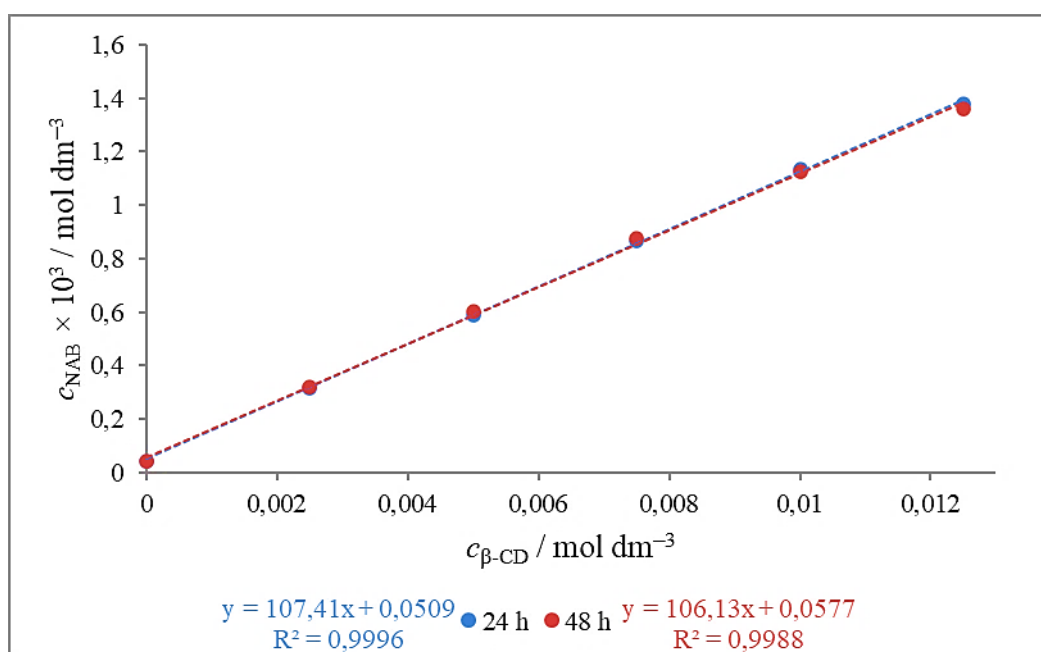
Istraživanja su pokazala kako je početna ravnoteža prilikom nastajanja inkluzijskog kompleksa lijeka i ciklodekstrina vrlo brza (često unutar nekoliko minuta), dok uspostava konačne ravnoteže može biti dugotrajnija jer se molekula gosta uklapanjem u šupljinu ciklodekstrina konformacijski prilagođava koristeći pritom slabe Van der Waalsove sile.³⁰

Budući da je do uspostave ravnoteže nastajanja kompleksa lijeka i ciklodekstrina došlo 24 h od pripreve suspenzija, u svrhu određivanje konstanti stabilnosti kompleksa i efikasnosti kompleksiranja nabumetona i odabranih CD korišteni su samo podaci dobiveni mjerenjima 24 h od pripreve suspenzija.

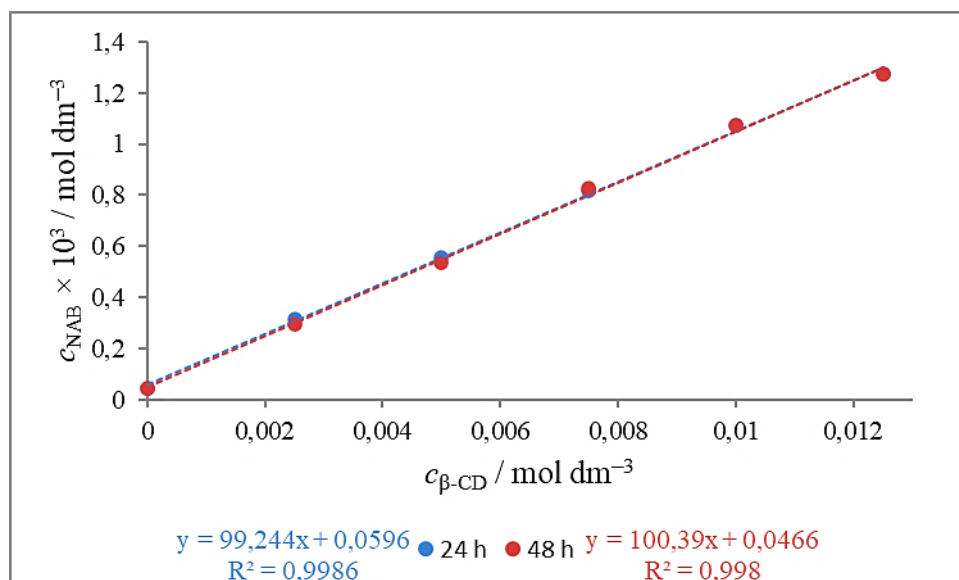
4.1.2. Analiza poboljšanja topljivosti spektrofotometrijskom metodom

Ovisnost topljivosti nabumetona o prisutnosti odabranih CD praćena je u vodi i u otopinama biorelevantnih medija različitih pH vrijednosti (1,0, 4,5 i 6,8), s tim da se nabumeton u ovom slučaju kvantitativno određivao spektrofotometrijski u periodima 24 i 48 h od priprave suspenzija. Nakon priprave mjernih otopina i mjerenja intenziteta fluorescentne emisije pri emisijskom maksimumu, nabumeton je kvantitativno određen korištenjem baždarnog pravca validirane spektrofotometrijske metode.

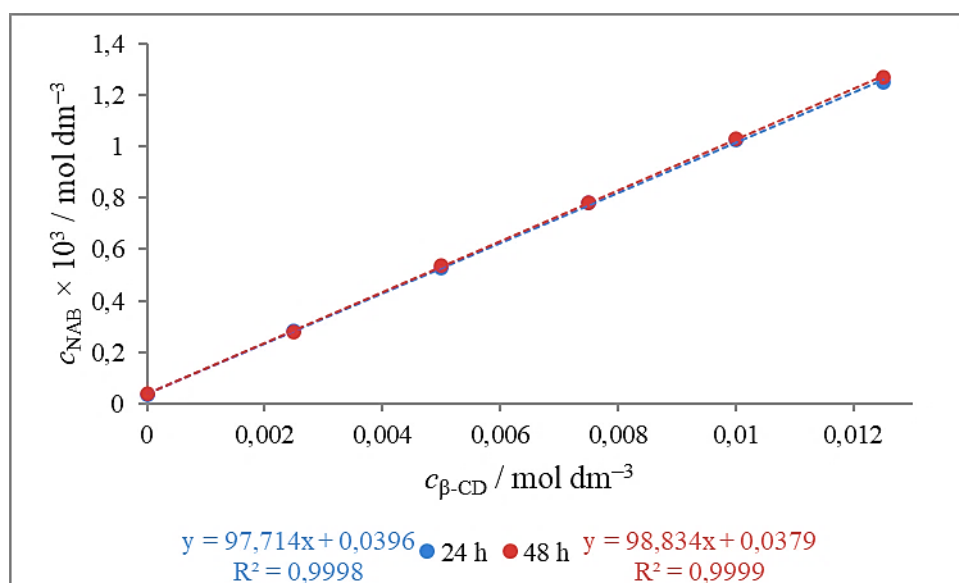
Kao i u slučaju određivanja topljivosti nabumetona UV/Vis spektrofotometrijskom metodom na temelju dobivenih podataka konstruirani su dijagrami topljivosti prema Higuchiju i Connorsu. Dobiveni dijagrami topljivosti su okarakterizirani kao tip A s krivuljom ovisnosti A_L . Slike 27, 28, 29 i 30 prikazuju dijagrame topljivosti nabumetona u prisutnosti β -CD, a slike 31, 32, 33 i 34 dijagrame topljivosti nabumetona u prisutnosti SBE β CD s pripadajućim jednadžbama pravaca i koeficijentima determinacije.



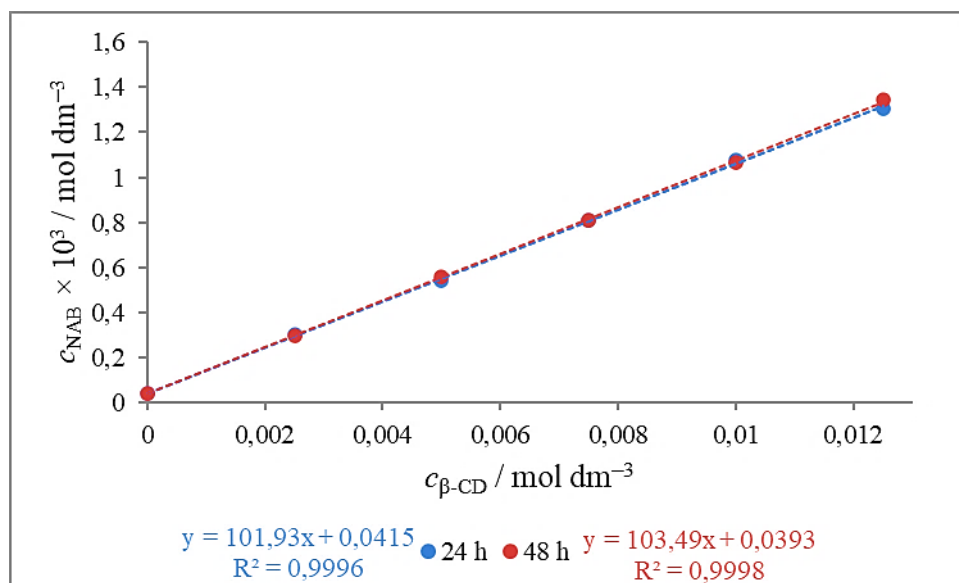
Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od priprave suspenzija u vodi



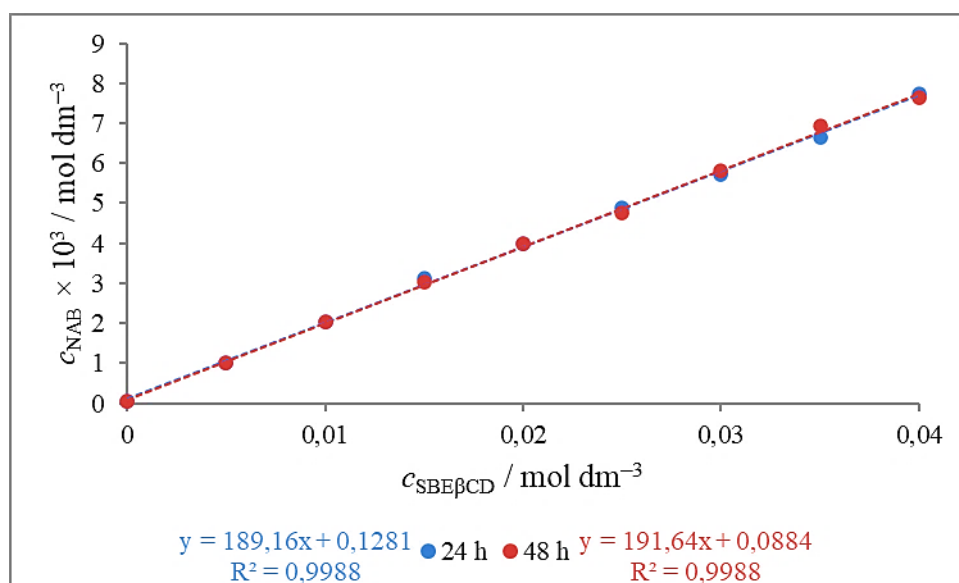
Slika 28. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom želučanom mediju



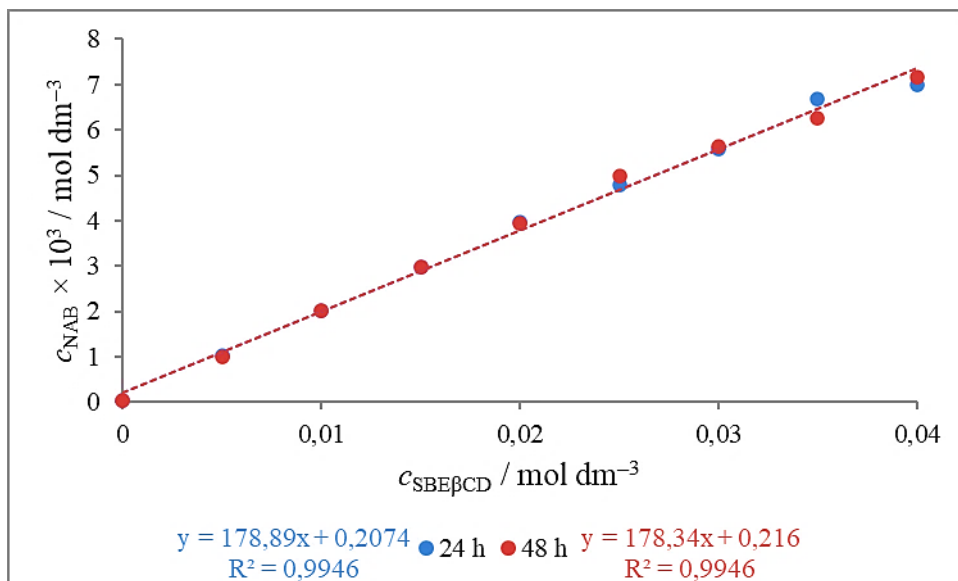
Slika 29. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom duodenalnom mediju



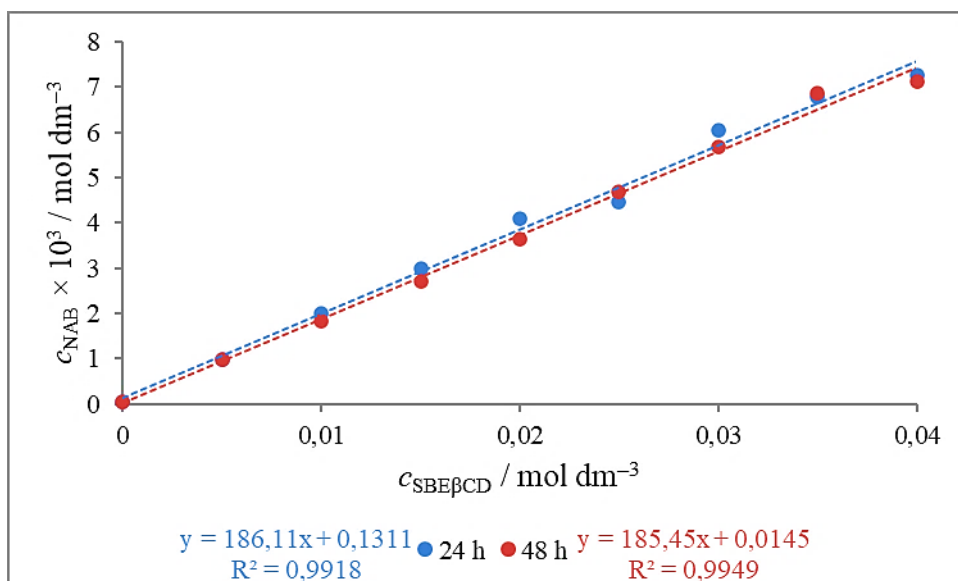
Slika 30. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji β -CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom intestinalnom mediju



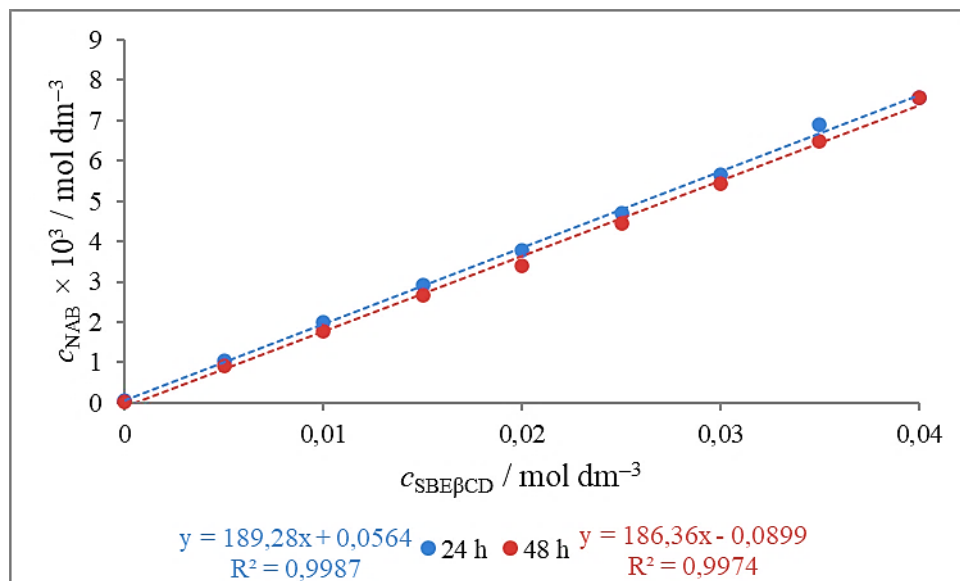
Slika 31. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u vodi



Slika 32. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreme suspenzija u simuliranom želučanom mediju



Slika 33. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreme suspenzija u simuliranom duodenalnom mediju



Slika 34. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije nabumetona o koncentraciji SBE β CD, mjereno 24 i 48 h od pripreve suspenzija u simuliranom intestinalnom mediju

Na temelju dobivenih dijagrama topljivosti i ovisnosti koncentracije otopljenog nabumetona o koncentracijama β -CD i SBE β CD spektrofluorimetrijskom metodom može se zaključiti kako se ravnoteža nastajanja kompleksa nabumetona i ciklodekstrina uspostavila nakon 24 h (što je u slaganju s rezultatima dobivenim UV/Vis spektrofotometrijskim ispitivanjem) jer se dijagrami topljivosti dobiveni nakon 24 h i 48 h uglavnom poklapaju u svim slučajevima. U svrhu određivanja konstanti stabilnosti kompleksa i efikasnosti kompleksiranja nabumetona i odabranih CD korišteni su samo podaci dobiveni mjerenjima 24 h od pripreve suspenzija. Izračunate vrijednosti su uspoređene s onima koje su dobivene UV/Vis spektrofotometrijskom metodom.

4.2. Određivanje konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja

Konstante stabilnosti pretpostavljenih inkluzijskih kompleksa nabumetona i odabranih ciklodekstrina izračunate su iz konstruiranih dijagrama topljivosti pomoću vrijednosti nagiba krivulje dijagrama topljivosti i intrinzične topljivosti nabumetona prema izrazu:

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

Efikasnost kompleksiranja izračunata je prema izrazu:

$$CE = \frac{\text{nagib}}{1-\text{nagib}}$$

U oba navedena izraza *nagib* predstavlja nagib krivulje dijagrama topljivosti, a S_0 eksperimentalno određenu intrinzičnu topljivost nabumetona.

U tablicama 9. i 10. prikazane su izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (*CE*) te eksperimentalno određene vrijednosti S_0 i S_{\max} koje su dobivene UV/Vis spektrofotometrijskom metodom, pri čemu S_{\max} odgovara koncentraciji otopljenog nabumetona pri najvećoj upotrebljenoj koncentraciji ciklodekstrina. Tablice 11 i 12 također prikazuju izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja te eksperimentalno određene vrijednosti S_0 i S_{\max} koje su rezultat analize spektrofluorimetrijskom metodom.

U svim tablicama navedene su i vrijednosti nagiba krivulja dijagrama topljivosti koje su dobivene UV/Vis spektrofotometrijskim i spektrofluorimetrijskim mjerenjima 24 h od pripreve suspenzija nabumetona i odabranih CD. Vrijednosti S_0 , S_{\max} , $K_{1:1}$ i *CE* odnose se samo na podatke dobivene mjerenjima nakon 24 h budući da se ravnoteža nastajanja kompleksa uspostavila nakon 24 h, što je već ranije prikazano odgovarajućim dijagramima topljivosti i naglašeno u sklopu ovog diplomskog rada.

Tablica 9. Eksperimentalno dobivene vrijednosti intrinzične topljivosti nabumetona (S_0), maksimalne topljivosti nabumetona (S_{max}), konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (CE) za kompleks nabumetona i β -CD, određene UV/Vis spektrofotometrijskom metodom

| β -CD | voda | otopine biorelevantnih medija | | |
|--------------------------------------|---------|-------------------------------|---------|---------|
| | | pH 1,0 | pH 4,5 | pH 6,8 |
| $S_0 / \text{mmol L}^{-1}$ | 0,0379 | 0,0456 | 0,0373 | 0,0401 |
| $S_{max} / \text{mmol L}^{-1}$ | 1,3085 | 1,2704 | 1,3149 | 1,3054 |
| $K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{L}$ | 3013,80 | 2451,87 | 3053,71 | 2813,66 |
| CE | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 |
| $nagib / \text{mol L}^{-1}$ | 0,10243 | 0,1006 | 0,10215 | 0,10136 |

Tablica 10. Eksperimentalno dobivene vrijednosti intrinzične topljivosti nabumetona (S_0), maksimalne topljivosti nabumetona (S_{max}), konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (CE) za kompleks nabumetona i SBE β CD, određene UV/Vis spektrofotometrijskom metodom

| SBE β CD | voda | otopine biorelevantnih medija | | |
|--------------------------------------|---------|-------------------------------|---------|---------|
| | | pH 1,0 | pH 4,5 | pH 6,8 |
| $S_0 / \text{mmol L}^{-1}$ | 0,0496 | 0,0491 | 0,0373 | 0,0407 |
| $S_{max} / \text{mmol L}^{-1}$ | 7,7684 | 7,7401 | 7,5946 | 8,3037 |
| $K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{L}$ | 4954,82 | 4919,83 | 6507,51 | 6401,36 |
| CE | 0,25 | 0,24 | 0,24 | 0,26 |
| $nagib / \text{mol L}^{-1}$ | 0,19736 | 0,19443 | 0,19549 | 0,20671 |

Tablica 11. Eksperimentalno dobivene vrijednosti intrinzične topljivosti nabumetona (S_0), maksimalne topljivosti nabumetona (S_{max}), konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (CE) za kompleks nabumetona i β -CD, određene spektrofluorimetrijskom metodom

| β -CD | voda | otopine biorelevantnih medija | | |
|--------------------------------------|---------|-------------------------------|---------|---------|
| | | pH 1,0 | pH 4,5 | pH 6,8 |
| $S_0 / \text{mmol L}^{-1}$ | 0,0439 | 0,0440 | 0,0367 | 0,0395 |
| $S_{max} / \text{mmol L}^{-1}$ | 1,3778 | 1,2744 | 1,2505 | 1,3054 |
| $K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{L}$ | 2740,14 | 2504,42 | 2947,04 | 2876,82 |
| CE | 0,12 | 0,11 | 0,11 | 0,11 |
| $nagib / \text{mol L}^{-1}$ | 0,10741 | 0,09924 | 0,09771 | 0,10193 |

Tablica 12. Eksperimentalno dobivene vrijednosti intrinzične topljivosti nabumetona (S_0), maksimalne topljivosti nabumetona (S_{\max}), konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa ($K_{1:1}$) i efikasnosti kompleksiranja (CE) za kompleks nabumetona i $SBE\beta CD$, određene spektrofotometrijskom metodom

| SBE β CD | voda | otopine biorelevantnih medija | | |
|--------------------------------------|---------|-------------------------------|---------|---------|
| | | pH 1,0 | pH 4,5 | pH 6,8 |
| $S_0 / \text{mmol L}^{-1}$ | 0,0477 | 0,0446 | 0,0435 | 0,0440 |
| $S_{\max} / \text{mmol L}^{-1}$ | 7,7324 | 6,9927 | 7,2582 | 7,5705 |
| $K_{1:1} / \text{mol}^{-1} \text{L}$ | 4893,10 | 4882,00 | 5259,23 | 5310,30 |
| CE | 0,23 | 0,22 | 0,23 | 0,23 |
| <i>nagib</i> / mol L^{-1} | 0,18916 | 0,17889 | 0,18611 | 0,18928 |

Na osnovu rezultata dobivenih UV/Vis spektrofotometrijskim i spektrofotometrijskim mjerenjima koji su prikazani u sklopu dijagrama topljivosti i tablica 9, 10, 11 i 12 nedvojbeno se može utvrditi da β -CD i njegov alkilsulfonirani derivat višestruko povećavaju topljivost nabumetona neovisno o korištenom mediju. Na temelju vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja lako se da zaključiti da $SBE\beta CD$ s nabumetonom tvori stabilniji kompleks u odnosu na prirodni, nesupstituirani β -CD. Koncentracije otopljenog nabumetona pri najvećoj upotrijebljenoj koncentraciji ciklodekstrina (S_{\max}) bilo bi besmisleno uspoređivati za ova dva korištena ciklodekstrina budući da je najveća upotrijebljena koncentracija β -CD iznosila $12,50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je u slučaju $SBE\beta CD$ ona iznosila $40,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Sam β -CD ima vrlo ograničenu topljivost u usporedbi sa svojim alkilsulfoniranim derivatom kao što je već i naglašeno u sklopu ovog diplomskog rada. Međutim, ukoliko usporedimo koncentracije otopljenog nabumetona u prisutnosti jednakih količina ova dva ciklodekstrina (u ovom slučaju $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) nedvojbeno se može zaključiti da $SBE\beta CD$ pokazuje veći solubilizacijski učinak na nabumeton u odnosu na β -CD, bez obzira na korišteni medij, što je i vidljivo iz prethodno prikazanih dijagrama topljivosti.

Vrlo visoke vrijednosti izračunatih konstanti stabilnosti kompleksa nabumetona sa $SBE\beta CD$ ukazuju na formiranje vrlo stabilnog inkluzijskog kompleksa u svim korištenim medijima, što može biti ograničavajući parametar za njegovu upotrebu budući da su prihvatljive vrijednosti K_S u rasponu 50 – 5000 $\text{mol}^{-1} \text{L}$. Možemo konstatirati kako su vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa nabumetona i $SBE\beta CD$ na samoj granici prihvatljivosti budući da vrijednosti veće od 5000 $\text{mol}^{-1} \text{L}$ mogu značajno ograničiti

bioraspoloživost lijeka jer je stabilnost takvog inkluzijskog kompleksa izrazito velika.² S druge strane, nabumeton i β -CD u svim medijima grade inkluzijske komplekse optimalne stabilnosti budući da vrijednosti konstanti stabilnosti izračunate iz eksperimentalno dobivenih podataka iznose 2500 – 3000 mol⁻¹ L. Ukoliko bi u obzir uzimali samo vrijednosti konstanti stabilnosti mogli bismo zaključiti kako je β -CD u ovom slučaju optimalniji kandidat za povećanje bioraspoloživosti nabumetona, iako mu je topljivost bitno ograničena strukturom.

Vrijednosti konstanti stabilnosti koje su određene na temelju eksperimentalnih rezultata dobivenih UV/Vis spektrofotometrijom i spektrofluorimetrijom u nekim slučajevima pokazuju određena neslaganja (primjerice u slučaju analize poboljšanja topljivosti nabumetona u prisutnosti SBE β CD u simuliranom duodenalnom mediju). Te razlike pripisujemo neslaganjima između mjerenih vrijednosti intrinzične topljivosti nabumetona ovim dvjema tehnikama preko kojih se konstante stabilnosti definiraju. Naime, kako je već i naglašeno u sklopu ovog diplomskog rada, vrijednosti konstanti stabilnosti su izuzetno osjetljive na male promjene S_0 . Razlike u eksperimentalno određenim vrijednostima intrinzične topljivosti nabumetona mogu se pripisati mogućim eksperimentalnim pogreškama tijekom pripreme mjernih otopina i velikim razlikama u osjetljivosti ove dvije analitičke tehnike. Točnija metoda određivanja solubilizacijskog učinka ciklodekstrina je svakako računanje efikasnosti kompleksiranja. Vrijednosti efikasnosti kompleksiranja koje su određene na temelju rezultata dobivenih korištenim analitičkim tehnikama pokazuju jako dobra slaganja u gotovo svim slučajevima. Iznimku predstavlja nešto veće neslaganje vrijednosti CE u sklopu analize poboljšanja topljivosti nabumetona u prisutnosti SBE β CD u simuliranom intestinalnom mediju. Vrijednost određena na temelju rezultata dobivenih UV/Vis spektrofotometrijskom metodom iznosi 0,26, dok ona određena na temelju rezultata spektrofluorimetrijske analize iznosi 0,23, a te se razlike očituju i u nagibima pripadajućih krivulja dijagrama topljivosti. Ove razlike se mogu pripisati eksperimentalnim pogreškama pripreme i analize mjernih otopina. Vrijednosti CE u vodenim otopinama rijetko kada premašuju 1,50, a prema nekoj gruboj procjeni koju su iznijeli Loftsson i sur. vrijednost CE u prosjeku iznosi 0,30 što govori da otprilike jedna od četiri molekule CD koje su prisutne u mediju gradi inkluzijski kompleks.

Iz izračunatih vrijednosti CE moguće je izračunati molarni omjer komponenti u kompleksacijskom mediju koji je zasićen lijekom prema sljedećem izrazu:

$$\text{lijek: CD} = 1: \frac{(CE + 1)}{CE}$$

Iz njega slijedi da molarni omjer komponenti u slučaju kompleksiranja nabumetona i β -CD iznosi približno 1:10, dok u slučaju kompleksiranja nabumetona i SBE β CD iznosi približno 1:5 u svim korištenim medijima.

Na početku ovog istraživanja pretpostavljeno je da korišteni kompleksacijski mediji koji se uvelike razlikuju prema svojim pH-vrijednostima neće imati velik utjecaj na intrinzičnu topljivost nabumetona kao ni na kompleksiranje nabumetona s odabranim ciklodekstrinima. Pregledom strukture nabumetona (slika 2) očigledno je da isti ne posjeduje ionizabilne funkcionalne skupine. Vrijednosti konstanti stabilnosti, nagiba krivulja dijagrama topljivosti te kompleksacijskih efikasnosti za komplekse nabumetona s istim ciklodekstrinima u različitim kompleksacijskim medijima su bile podjednake. Isto vrijedi i za vrijednosti intrinzične topljivosti nabumetona.

Vrijednosti konstanti stabilnosti i kompleksacijskih efikasnosti koje su dobivene u ovom radu su uspoređene s podacima iz dostupne literature. Objavljen je jako mali broj radova koji se bave problematikom poboljšavanja topljivosti nabumetona kompleksiranjem s ciklodekstrinima, pa su i vrijednosti konstanti stabilnosti njihovih kompleksa vrlo oskudne.

Sánchez i sur. su proučavali interakcije nabumetona s prirodnim CD te s nekim sintetskim derivatima β -CD u čvrstom stanju. Također su analizirali poboljšanje topljivosti nabumetona u prisutnosti α -CD i γ -CD. U slučaju α -CD dobiven je dijagram topljivosti A tipa s krivuljom A_P tipa (pozitivno odstupanje od linearnosti). Takav rezultat je indicacija nastajanja kompleksa koji su višeg reda s obzirom na nabumeton. Izračunate vrijednosti konstanti stabilnosti za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 i 1:2 su iznosile $77,3 \pm 6,8 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, odnosno $57,7 \pm 6,0 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ što ukazuje na postojanje slabih interakcija. Pretpostavljeno je da je naftalenski dio molekule nabumetona suviše velik za uklapanje u središnju šupljinu α -CD. U slučaju γ -CD dobiven je dijagram topljivosti B tipa s krivuljom B_S tipa što ukazuje na formiranje netopljivog inkluzijskog kompleksa pri višim koncentracijama CD. Iz platoa B_S krivulje utvrđen je stehiometrijski omjer nastalog kompleksa koji je iznosio 1:1. Iz linearnog dijela krivulje izračunata je konstanta stabilnosti koja je iznosila $219 \pm 1 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.⁶

Vrlo je bitno naglasiti kako se ovakav način analize poboljšanja topljivosti lijeka provodi u suspenzijama lijeka i ciklodekstrina koje su zasićene s obzirom na lijek, a za njih kažemo da

nisu „idealne“. Često se inkluzijski kompleksi u otopini proučavaju i karakteriziraju NMR spektroskopijom te nekim drugim spektroskopskim tehnikama u razrijeđenim vodenim otopinama tj. u „idealnim“ uvjetima. Rezultati dobiveni na taj način ne mogu biti nedvojbeno upotrijebljeni kako bi se objasnilo kompleksiranje u „neidealnim“ uvjetima tj. prilikom analize poboljšanja topljivosti nekog lijeka kakva je provedena i u sklopu ovog diplomskog rada.²⁶

Nešto ranije nego u prethodno spomenutom istraživanju Sánchez i sur. su istraživali nastajanje inkluzijskih kompleksa nabumetona s β -CD i njegovim metiliranim i hidroksipropiliranim derivatima u otopini $^1\text{H-NMR}$ spektroskopijom i fluorescencijskom spektroskopijom. Istraživanja su provedena u razrijeđenim otopinama tj. u „idealnim“ uvjetima. U sklopu spektrofluorimetrijskih mjerenja je praćena promjena intenziteta fluorescentne emisije nabumetona u prisutnosti navedenih ciklodekstrina pri različitim temperaturama (15, 25, 37 i 45 °C), pri čemu je utvrđeno da prisutnost metiliranog derivata pokazuje najveći hiperkromni utjecaj na njegov emisijski spektar. Spektrofluorimetrijski su utvrđene konstante stabilnosti navedenih kompleksa, a nabumeton je najstabilnije komplekse tvorio s metiliranim derivatom β -CD. Vrijednosti konstanti stabilnosti za kompleks nabumetona s β -CD su iznosile 2420 ± 390 , 1800 ± 70 , 1450 ± 80 i $1230 \pm 70 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (pri 15, 25, 37 i 45 °C).⁵

Al-Rawashdeh je utvrdio konstante stabilnosti kompleksa nabumetona i γ -CD pri 15, 25, 35 i 45 °C. Praćen je utjecaj CD na fluorescentnu emisiju nabumetona, a konstante stabilnosti su određene Benesi-Hildebrand metodom iz rezultata spektrofluorimetrijskog mjerenja. Iznosile su 2900 ± 400 , 2200 ± 100 , 1700 ± 100 i $1200 \pm 100 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.⁸

Costa i sur. su pratili interakcije nabumetona s α -CD, β -CD i $\text{HP}\beta\text{CD}$ u otopini $^1\text{H-NMR}$ spektroskopijom, spektrofotometrijom i spektrofluorimetrijom. U apsorpcijskom spektru nabumetona utvrđen je izražen batokromni pomak njegovih apsorpcijskih maksimuma u prisutnosti α -CD te nešto manje izražen u prisutnosti β -CD i $\text{HP}\beta\text{CD}$. U svrhu određivanja konstanti stabilnosti kompleksa praćen je hiperkromni pomak maksimuma fluorescentne emisije nabumetona u prisutnosti navedenih CD kao posljedice njihove interakcije. Utvrđene vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa nabumetona s navedenim CD iznosile su $42,8 \pm 3$ (za kompleks s α -CD), 2864 ± 143 (za kompleks s β -CD) te $3048 \pm 122 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (za kompleks s $\text{HP}\beta\text{CD}$).⁷

4.3. Analiza saturacijske topljivosti

Za određivanje topljivosti čvrstih kompleksa nabumetona i ciklodekstrina te uzorka nabumetona koji je bio podvrgnut mljevenju u visokoenergijskom vibracijskom mlinu pripravljene su suspenzije u vodi. Ispitivanja topljivosti uzoraka nabumetona te uzoraka nabumetona i odabranih ciklodekstrina su provedena samo u vodi, budući da je prethodno u sklopu analize poboljšanja topljivosti utvrđeno da korišteni medij ne utječe na samu topljivost lijeka.

Nakon pripreve mjernih otopina i mjerenja apsorbancije i intenziteta fluorescentne emisije nabumeton je kvantitativno određen korištenjem baždarnih pravaca validiranih UV/Vis spektrofotometrijskih i spektrofluorimetrijskih metoda. Nabumeton se kvantitativno određivao u periodima 24 i 48 h od pripreve suspenzija koje su sadržavale netretirani (čisti) nabumeton, nabumeton tretiran u mlinu te uzorke nabumetona s odabranim CD. Tablica 13 prikazuje rezultate analize topljivosti uzoraka netretiranog nabumetona, nabumetona tretiranog u visokoenergijskom vibracijskom mlinu, nabumetona i β -CD te nabumetona i SBE β CD koji su dobiveni tehnikom suhog mljevenja i tehnikom otapalom potpomognutog mljevenja.

Tablica 13. Eksperimentalno određena topljivost nabumetona u netretiranom uzorku, uzorku tretiranom u visokoenergijskom vibracijskom mlinu te u kompleksima s odabranim CD koji su dobiveni mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (u vodi nakon 24 i 48 h)

| Uzorci | UV/Vis spektrofotometrija | | spektrofluorimetrija | |
|---|--|--------|----------------------|--------|
| | $c_{\text{NAB}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | | | |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| NAB NETRETIRAN | 0,0365 | 0,0434 | 0,0357 | 0,0420 |
| NAB MLIN | 0,0389 | 0,0429 | 0,0380 | 0,0408 |
| NAB + β-CD (NG) | 0,8990 | 0,9113 | 0,8859 | 0,9057 |
| NAB + β-CD (LG) | 0,8838 | 0,9179 | 0,8746 | 0,8989 |
| NAB + SBEβCD (NG) | 1,5060 | 1,4750 | 1,4606 | 1,4638 |
| NAB + SBEβCD (LG) | 1,4127 | 1,4679 | 1,3925 | 1,4489 |

Prema rezultatima prikazanim u tablici 13 možemo zaključiti kako tretiranje uzorka čistog nabumetona u visokoenergijskom vibracijskom mlinu gotovo da i nije imalo utjecaj na poboljšanje njegove intrinzične topljivosti. U literaturi se navodi kako su smanjenje veličine

čestica djelatnih tvari te prevođenje djelatne tvari iz kristalne u amorfnu formu učinkoviti načini poboljšavanja topljivosti djelatnih tvari. Pa ipak, mljevenje pri uvjetima koji su navedeni u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada nije rezultiralo značajnim poboljšanjem topljivosti nabumetona.

Iz prikazanih rezultata je jasno kako topljivost nabumetona povećava prisutnost β -CD i njegovog derivata SBE β CD. Ipak, sulfobutileterski derivat β -CD učinkovitije povećava topljivost nabumetona u usporedbi s prirodnim β -CD, što je u skladu s rezultatima prikazanim u sklopu analize poboljšanja topljivosti. Zanimljivo je da dodatak malih količina otapala (etanol) prilikom pripreme čvrstog kompleksa sa SBE β CD pokazuje blago nepovoljan utjecaj na topljivost nabumetona koja je manja u usporedbi s onom koja je određena za kompleks pripremljen tehnikom suhog mljevenja. Može se zaključiti kako način pripreme čvrstog kompleksa s β -CD bitno ne utječe na topljivost nabumetona budući da je ona podjednaka za oba slučaja.

Topljivost nabumetona se kod svih uzoraka blago povećava i nakon perioda od 48 sati, osim u slučaju uzorka nabumetona i SBE β CD dobivenog suhim mljevenjem.

4.4. Karakterizacija uzoraka nabumetona i odabranih ciklodekstrina u čvrstom stanju IR spektroskopijom

Kao što je i ranije navedeno, u sklopu ovog diplomskog rada pripremljeni su uzorci nabumetona s odabranim ciklodekstrinima u čvrstom stanju metodama suhog mljevenja i otapalom potpomognutog mljevenja koje su detaljnije opisane u jednom od poglavlja literaturnog pregleda. Dobiveni uzorci su okarakterizirani FTIR i ATR tehnikama kako bi se dobio uvid u moguće interakcije nabumetona i ciklodekstrina u čvrstom stanju. Navedenim tehnikama okarakterizirani su i uzorci pojedinačnih komponenti koje su tretirane u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (M) ili keramičkom tarioniku (PM), a dodatno su ATR tehnikom okarakterizirani i netretirani uzorci pojedinačnih komponenti (C). Takva karakterizacija je bila potrebna kako bi se utvrdio utjecaj mljevenja na svojstva pojedinačnih komponenti, a posebice u slučaju djelatne tvari (nabumeton) budući da je poznato da mljevenje može inducirati djelomičan ili potpun prijelaz iz kristalinične u amorfnu formu.

4.4.1. Uzorci nabumetona

U snimljenim FTIR i ATR spektrima nabumetona identificirane su njegove karakteristične vrpce istežanja (ν), deformacija tj. svijanja (δ) i torzija (τ) koje su asignirane prema dostupnim literaturnim podacima.⁴⁷ Asignirane su vrpce iz FTIR i ATR spektara uzoraka nabumetona koji je tretiran u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (NAB M), keramičkom tarioniku (NAB PM) te vrpce iz ATR spektara netretiranog uzorka nabumetona (NAB C). FTIR spektri uzoraka nabumetona (slika D1) su jednaki, a pregledom vrijednosti koje su prikazane u tablici D1 može se uočiti kako ne dolazi do promjene položaja karakterističnih vrpca nabumetona u uzorku koji je pripremljen u visokoenergijskom vibracijskom mlinu u odnosu na onaj koji je pripremljen u tarioniku.

Isto vrijedi i u slučaju ATR spektara. Pregledom vrijednosti koje su prikazane u tablici D4 može se zaključiti kako se položaji karakterističnih vrpca nabumetona u spektrima ne mijenjaju osim u slučaju dviju karakterističnih vrpca gdje su uočene male promjene u položajima. Vrpca identificirana pri 1452 cm^{-1} u spektru uzorka netretiranog nabumetona koja odgovara vibraciji svijanja u ravnini HCH skupine pomiče se na 1454 cm^{-1} u spektrima uzoraka NAB PM i NAB M. Vrpca pri 1361 cm^{-1} u spektrima NAB C i NAB PM uzorka nabumetona, a koja odgovara vibraciji simetričnog istežanja C–C skupine pomiče se na 1363 cm^{-1} u spektru uzorka NAB M. Pregledom spektara navedenih uzoraka nabumetona zaključeno je da se izgled karakterističnih vrpca ne mijenja (slika D4).

Male promjene u položajima navedenih vrpca mogle bi se protumačiti tvrdnjom kako ulaganjem veće količine mehaničke energije prilikom tretiranja uzorka u mlinu dolazi do promjena u kristalnoj strukturi spoja koje se očituju u promjeni položaja vrpca, odnosno njihovog valnog broja.

4.4.2. Uzorci β -ciklodekstrina

Snimljeni su FTIR i ATR spektri uzoraka β -ciklodekstrina koji su tretirani u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (β -CD M), keramičkom tarioniku (β -CD PM) te ATR spektar netretiranog uzorka (β -CD C). Vrpce iz navedenih spektara su asignirane prema dostupnim literaturnim podacima (tablice D2 i D5).^{48,49,50}

FTIR i ATR spektre uzoraka β -ciklodekstrina karakterizira intenzivna i široka vrpca u području $3750 - 3050\text{ cm}^{-1}$ koja odgovara vibraciji istežanja O–H skupina. Prisutne su vrpce koje su asignirane vibracijama asimetričnog istežanja C–H skupina u području $3000 - 2800$

cm^{-1} . Vrpca pri $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ odgovara vibraciji svijanja H–O–H skupina (potječu od molekula vode vezanih na ciklodekstrin).

FTIR spektri uzoraka β -ciklodekstrina (slika D2) se prema obliku karakterističnih vrpce ne razlikuju. Pregledom položaja tih vrpce (tablica D2) može se primijetiti kako postoje određene razlike između spektara dvaju uzoraka. Vrpce pri $1647, 1417, \text{ i } 1157 \text{ cm}^{-1}$ u spektru koji odgovara β -CD PM uzorku mijenjaju svoj položaj u spektru uzorka β -CD M koji je dobiven mljevenjem. Općenito su vrpce u spektru koji odgovara β -CD PM uzorku intenzivnije u usporedbi s istim vrpcama u spektru koji odgovara β -CD M uzorku.

Manje razlike u položajima karakterističnih vrpce β -ciklodekstrina su primijećene u snimljenim ATR spektrima (tablica D5, slika D5). Vrpce pri $1637, 1296, 1203 \text{ i } 1076 \text{ cm}^{-1}$ u spektru β -CD C uzorka se pomiču prema višim valnim brojevima u spektrima β -CD PM i β -CD M uzoraka.

4.4.3. Uzorci sulfobutileter- β -ciklodekstrina

Kao i u slučaju uzoraka β -ciklodekstrina snimljeni su FTIR i ATR spektri uzoraka sulfobutileter- β -ciklodekstrina, a uzorci su prethodno pripremljeni na identičan način. Vrpce su asignirane prema dostupnim literaturnim podacima (tablice D3 i D6).^{50,51,52,53} Slično kao i u slučaju β -ciklodekstrina FTIR i ATR spektre uzoraka sulfobutileter- β -ciklodekstrina karakteriziraju intenzivne vrpce u području $3800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju vibracijama istezanja O–H skupina. U području $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ uočavaju se vrpce koje pripadaju vibracijama asimetričnog i simetričnog istezanja C–H skupina. Vrpca pri $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ odgovara vibraciji svijanja H–O–H skupina. Najintenzivnija vrpca u spektrima SBE β CD nalazi se pri $1050 - 1025 \text{ cm}^{-1}$ i posljedica je vibracija istezanja S=O i C–O skupina.

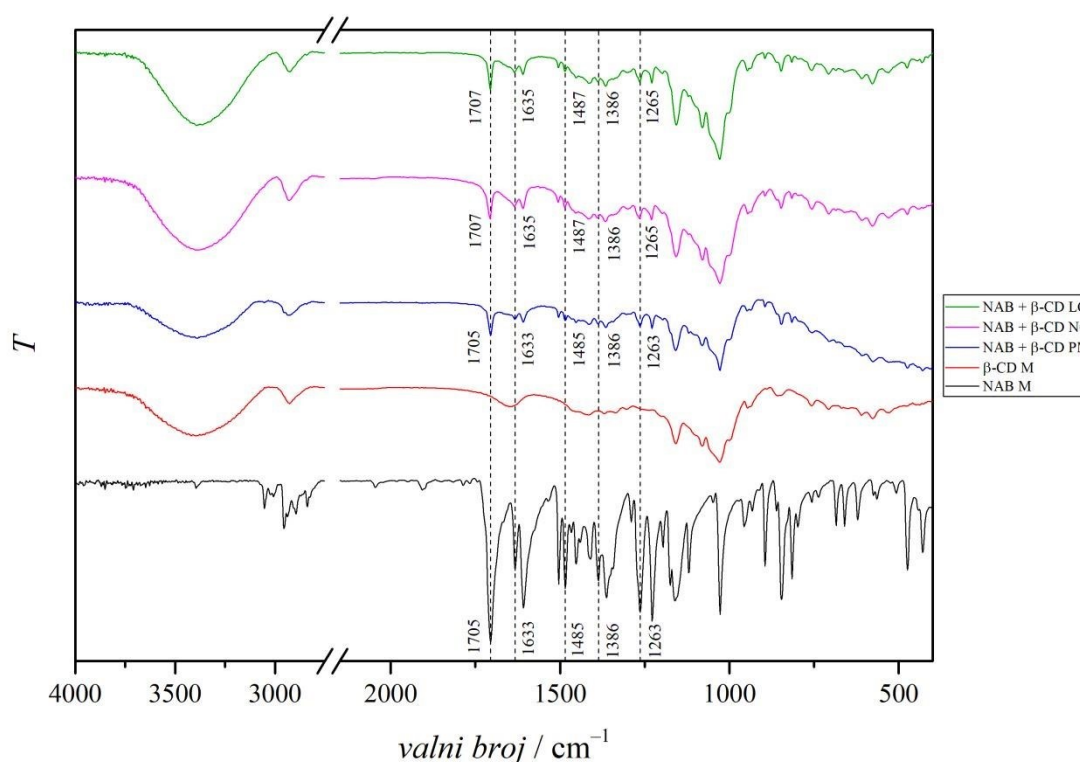
FTIR spektri uzoraka SBE β CD (slika D3) se prema obliku karakterističnih vrpce ne razlikuju. Kao i kod FTIR spektara β -ciklodekstrina općenito su vrpce u spektru koji odgovara uzorku SBE β CD PM intenzivnije u odnosu na iste vrpce u spektru koji odgovara SBE β CD M uzorku. Uspoređujući položaje vrpce iz spektra koji odgovara SBE β CD PM uzorku u odnosu na spektar koji odgovara SBE β CD M uzorku (tablica D3) utvrđeni su pomaci vrpce koje se nalaze pri $2939, 2881, 1649 \text{ i } 1367 \text{ cm}^{-1}$.

ATR spektri uzoraka SBE β CD (slika D6) se prema obliku karakterističnih vrpce uglavnom ne razlikuju. Karakteristične vrpce spektra koji odgovara uzorku SBE β CD M su dosta intenzivnije u usporedbi sa spektrima koji odgovaraju uzorcima SBE β CD C i SBE β CD

PM. Uspoređujući položaje karakterističnih vrpca (tablica D6) može se primijetiti da se vrpce pri 1078 i 1026 cm^{-1} iz spektra uzorka SBE β CD C pomiču prema višim valnim brojevima u spektrima uzoraka SBE β CD PM i SBE β CD M.

4.4.4. Uzorci nabumetona i β -ciklodekstrina

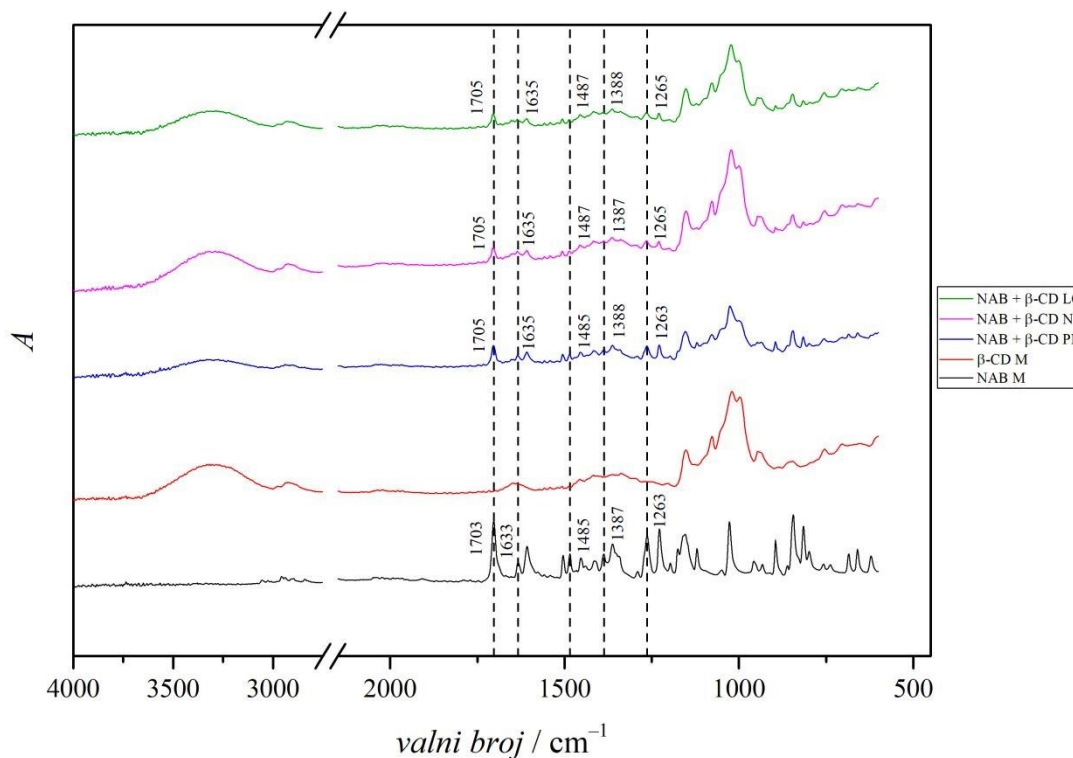
Na slici 35 prikazana je usporedba FTIR spektara, a na slici 36 usporedba ATR spektara uzorka nabumetona i uzorka β -ciklodekstrina pripremljenih mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (NAB M i β -CD M) te uzorka smjese nabumetona i β -ciklodekstrina pripremljenog u obliku fizičke smjese u keramičkom tarioniku (NAB + β -CD PM) i mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu tehnikom suhog mljevenja (NAB + β -CD NG) i otapalom potpomognutog mljevenja (NAB + β -CD LG).



Slika 35. Usporedba FTIR spektara uzorka NAB M, β -CD M, NAB+ β -CD PM, NAB + β -CD NG i NAB + β -CD LG

U tablicama D7 i D9 prikazani su položaji i asignacija karakterističnih vrpca nabumetona iz spektara navedenih uzoraka. Na slikama koje prikazuju spomenute spektre naznačene su one

vrpce nabumetona za koje je utvrđeno da su promjene u položajima vidljive kako u FTIR, tako i u ATR spektru. Radi se o karakterističnim vrpčama nabumetona pri 1705 (1703 cm^{-1} u ATR spektru), 1633, 1485, 1387 i 1263 cm^{-1} .



Slika 36. Usporedba ATR spektara uzoraka NAB M, β -CD M, NAB+ β -CD PM, NAB + β -CD NG i NAB + β -CD LG

U FTIR spektrima prikazanim na slici 35 vrpca pri 1705 cm^{-1} iz spektra uzorka NAB M, a koja odgovara vibraciji istezanja C=O veze, pomiče se na 1707 cm^{-1} što odgovara pomaku od 2 cm^{-1} u spektrima uzorka NAB + β -CD (NG i LG). Ovaj pomak nije uočen u FTIR spektru uzorka fizičke smjese NAB + β -CD PM, a koji je zapravo superpozicija spektara pojedinačnih komponenti. To bismo mogli protumačiti postojanjem određenih interakcija nabumetona i β -CD u uzorcima uslijed mljevenja u visokoenergijskom vibracijskom mlinu. Ovakav pomak su uočili Sánchez i sur. prilikom analize inkluzijskih kompleksa nabumetona i γ -CD u čvrstom stanju koji su dobiveni tehnikama gnječenja, koevaporacije i koprecipitacije. Tumačili su ga pucanjem intermolekulskih vodikovih veza nabumetona u kristalnoj fazi uslijed inkluzije u hidrofobnu šupljinu CD.⁶ U ATR spektrima dolazi do pomaka položaja te vrpce s 1705 na 1707 cm^{-1} u spektrima uzorka NAB + β -CD (NG i LG), no takav pomak je uočen i u spektru

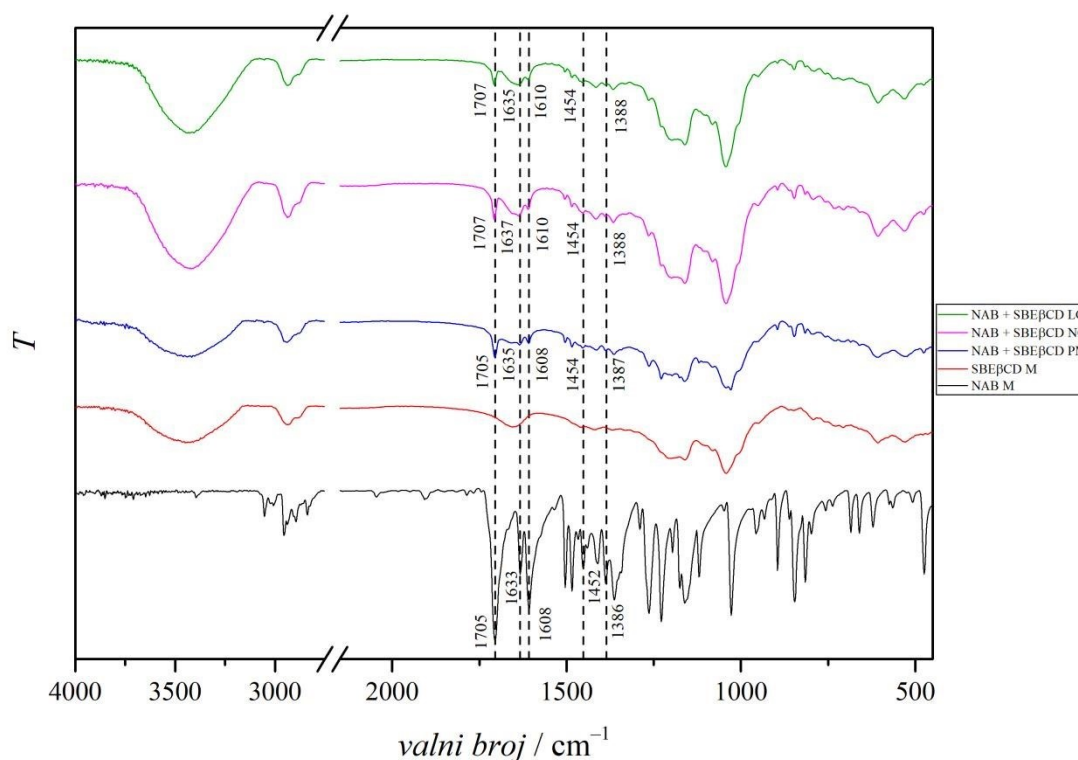
fizičke smjese. Vrpce pri 1633 i 1608 cm^{-1} koje odgovaraju vibracijama istezanja C=C veze aromata pomiču se za 2 cm^{-1} u FTIR spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG), dok se takav pomak nije uočio u spektru fizičke smjese komponenti. U ATR spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG) dolazi do pomaka analogne vrpce s 1633 cm^{-1} na 1635 cm^{-1} , no takav pomak je uočen i u spektru uzorka fizičke smjese. Pomak vrpce pri 1608 cm^{-1} nije uočen u ATR spektrima. U FTIR spektru uzorka NAB + β -CD NG vrpca pri 1485 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istezanja C–C veze prstena se pomiče na 1487 cm^{-1} . U ATR spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG) pomak položaja analogne vrpce na 1487 cm^{-1} je također primjetan. Takav pomak nije uočen u FTIR i ATR spektrima uzorka fizičke smjese. Vrpce pri 1452 i 1387 cm^{-1} nabumetona odgovaraju vibraciji svijanja HCH skupine, a prva vrpca se pomiče na 1454 cm^{-1} u FTIR spektru uzorka NAB + β -CD NG, dok se druga pomiče na 1388 cm^{-1} u spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG), no taj je pomak primjetan i u spektru uzorka fizičke smjese. U ATR spektrima prva analogna vrpca se nalazi pri 1454 cm^{-1} i pomiče se na 1456 cm^{-1} u spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG), dok se druga analogna vrpca nalazi pri 1387 cm^{-1} i pomiče se na 1388 cm^{-1} u spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG), dok takav pomak nije identificiran u spektru uzorka fizičke smjese. Vrpce pri 1363 i 1228 cm^{-1} odgovaraju vibraciji istezanja C–C veze. U FTIR spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG) dolazi do pomaka prve vrpce na 1365 cm^{-1} , no takav pomak je identificiran i u spektru uzorka fizičke smjese, dok se u ATR spektrima položaj te vrpce nije mijenjao ni u jednom slučaju. Vrpca pri 1228 cm^{-1} se pomiče na 1230 cm^{-1} u spektru uzorka NAB + β -CD NG, dok se u ATR spektrima položaj te vrpce nije mijenjao. Vrpca pri 1263 cm^{-1} odgovara vibraciju svijanja HCC skupine zajedno s torzijskim vibracijama HCCC skupine. Ta vrpca se u FTIR i ATR spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG) pomiče na 1265 cm^{-1} , dok se u spektrima fizičke smjese pomak nije uočio. Vrpca pri 1161 cm^{-1} također odgovara vibraciji svijanja HCC skupine, a u FTIR spektru uzoraka NAB + β -CD (NG i LG) se pomiče na 1157 cm^{-1} , dok je u spektru fizičke smjese uočena pri 1159 cm^{-1} . U ATR spektru uzorka nabumetona analogna vrpca se nalazi pri 1153 cm^{-1} , a u spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG) se pomiče na 1151 cm^{-1} . U spektru fizičke smjese taj pomak nije uočen. Vrpca pri 1028 cm^{-1} odgovara vibraciju istezanja C–O–C skupine i ne dolazi do njenog pomaka u FTIR spektrima, dok se u ATR spektrima analogna vrpca pomiče s 1028 cm^{-1} prema nižim valnim brojevima u spektrima uzoraka NAB + β -CD (NG i LG) na 1022 cm^{-1} . Ova vrpca se u spektru uzorka fizičke smjese nalazi pri 1026 cm^{-1} . Ipak, jako je bitno naglasiti da se ova vrpca nabumetona

preklapa s najintenzivnijom vrpcom ciklodekstrina, a koja se nalazi pri 1020 cm^{-1} . Vrpca pri 847 cm^{-1} koja odgovara torzijskoj vibraciji HCCC skupine u FTIR spektrima ne mijenja svoj položaj, dok se u ATR spektrima analogna vrpca pomiče s 845 cm^{-1} na 847 cm^{-1} . Takav pomak nije identificiran u ATR spektru uzorka fizičke smjese.

Kao što je primjetno na slikama 35 i 36 karakteristične vrpce nabumetona su smanjenog intenziteta u FTIR i ATR spektrima uzoraka NAB + β -CD u usporedbi sa spektrima uzoraka NAB M. Ovo je tipična mana FTIR tehnike prilikom karakterizacije ovakvih sustava budući da su karakteristične vrpce lijeka često prekrivene ili se preklapaju s vrpčama ciklodekstrina. To je rezultat većeg masenog udjela ciklodekstrina u usporedbi s lijekom ukoliko se govori o ekvimolarnim smjesama komponenti kao što je slučaj u ovom radu. Pretpostavlja se da su pomaci karakterističnih vrpca nabumetona u spektrima uzoraka fizičkih smjesi rezultat takvih preklapanja, a ne interakcije s ciklodekstrinom.

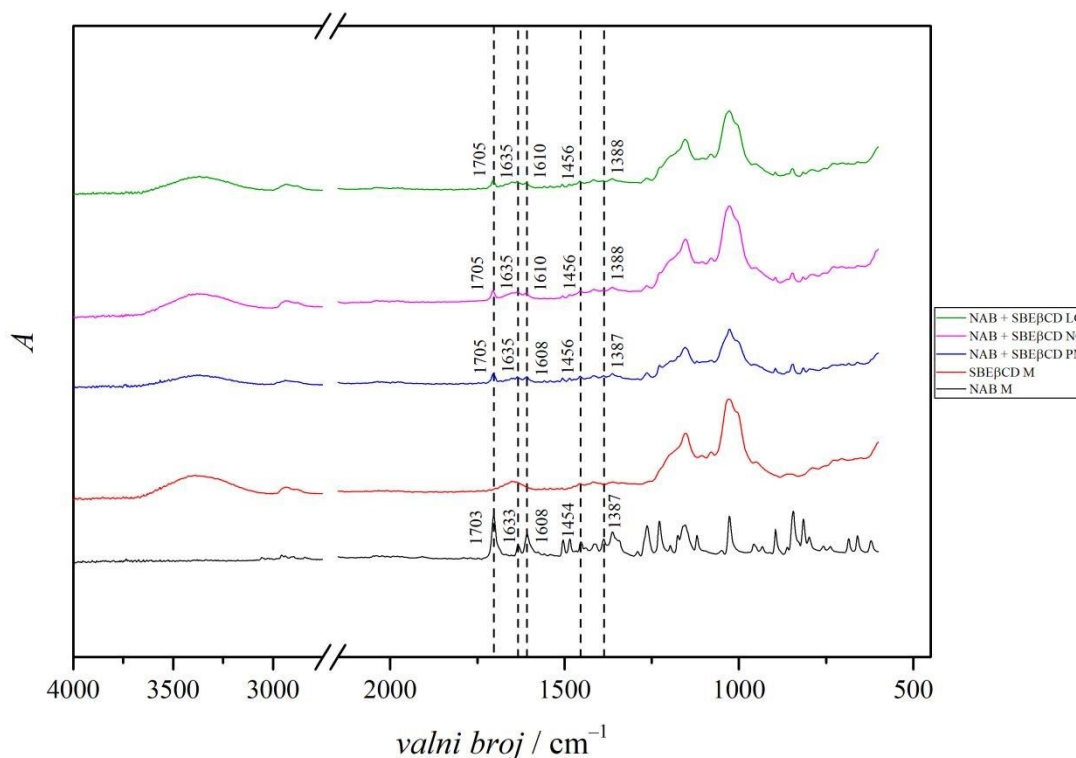
4.4.5. Uzorci nabumetona i sulfobutileter- β -ciklodekstrina

Na slici 37 prikazana je usporedba FTIR spektara, a na slici 38 usporedba ATR spektara uzorka nabumetona i uzorka sulfobutileter- β -ciklodekstrina pripremljenih mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (NAB M i SBE β CD M) te uzorka smjese nabumetona i sulfobutileter- β -ciklodekstrina pripremljenih u obliku fizičke smjese u keramičkom tarioniku (NAB + SBE β CD PM) i mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu tehnikom suhog mljevenja (NAB + SBE β CD NG) i otapalom potpomognutog mljevenja (NAB + SBE β CD LG).



Slika 37. Usporedba FTIR spektara uzorka NAB M, SBE β CD M, NAB + β -CD PM, NAB + SBE β CD NG i NAB + SBE β CD LG

U tablicama D8 i D10 prikazani su položaji i asignacija karakterističnih vrpca nabumetona iz spektara navedenih uzoraka. Na slikama koje prikazuju spomenute spektre naznačene su one vrpce nabumetona za koje je utvrđeno da su promjene u položajima vidljive kako u FTIR, tako i u ATR spektru. Radi se o karakterističnim vrpcama nabumetona pri 1705 (1703 cm^{-1} u ATR spektru), 1633, 1608, 1452 (1454 cm^{-1} u ATR spektru) i 1387 cm^{-1} .



Slika 38. Usporedba ATR spektara uzoraka NAB M, SBE β CD M, NAB+ β -CD PM, NAB + SBE β CD NG i NAB + SBE β CD LG

U FTIR spektrima prikazanim na slici 37 vrpca pri 1705 cm^{-1} iz spektra uzorka NAB M, a koja odgovara vibraciji istežanja C=O veze, pomiče se na 1707 cm^{-1} što odgovara pomaku od 2 cm^{-1} u spektrima uzorka NAB + SBE β CD (NG i LG). Ovaj pomak nije uočen u FTIR spektru uzorka fizičke smjese ovih komponenti (NAB + SBE β CD PM). U ATR spektrima uzorka NAB + SBE β CD (NG i LG) dolazi do pomaka analogne vrpce s 1703 na 1705 cm^{-1} , ali i u spektru uzorka fizičke smjese. Vrpca pri 1633 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istežanja C=C veze aromata pomiče se na 1637 cm^{-1} u FTIR spektru uzorka NAB + SBE β CD NG, dok se u spektrima uzorka NAB + SBE β CD LG i fizičke smjese uočava pri 1635 cm^{-1} . Analogna se vrpca u ATR spektrima pomiče s 1633 na 1635 cm^{-1} u spektrima mljevenih uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG) kao i u spektru uzorka fizičke smjese. Vrpca pri 1608 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istežanja identične veze u FTIR i ATR spektrima se pomiče prema višim valnim brojevima, odnosno na 1610 cm^{-1} . Takav pomak nije uočen u spektrima uzorka fizičke smjese komponenti. Vrpca pri 1485 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istežanja C–C veze prstena se u ATR spektru uzorka NAB + SBE β CD LG pomiče na 1487 cm^{-1} . Pomaci ove vrpce u

ostalim FTIR i ATR spektrima nisu uočeni. Vrpca pri 1452 cm^{-1} koja odgovara vibraciji svijanja HCH skupine u ravnini pomiče se na 1454 cm^{-1} u spektrima uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG). Uočen je i pomak analogne vrpce u ATR spektrima s položaja 1454 na 1456 cm^{-1} . Ipak, identični pomaci su uočeni u FTIR i ATR spektrima uzorka fizičke smjese. Vrpca pri 1387 cm^{-1} koja također odgovara vibraciji svijanja HCH skupine se u spektrima uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG) pomiče na 1388 cm^{-1} , dok takav pomak nije uočen u FTIR i ATR spektrima uzorka fizičke smjese. Vrpca pri 1363 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istezanja C–C veze se u FTIR spektrima uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG) pomiče na 1365 cm^{-1} . Ovakav pomak nije uočen u FTIR spektru fizičke smjese. Analogna vrpca pri 1363 cm^{-1} u ATR spektrima ne mijenja svoj položaj. Vrpca pri 1228 cm^{-1} koja također odgovara vibraciji istezanja C–C veze u FTIR spektrima ne mijenja svoj položaj. U ATR spektrima uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG) analogna se vrpca javlja u obliku ramena jer je prekrivena jednom od širokih vrpce koja potječe od ciklodekstrina. Vrpca pri 1263 cm^{-1} koja odgovara vibraciji svijanja HCC skupine zajedno s torzijskim vibracijama HCCC skupine u FTIR i ATR spektrima ne mijenja svoj položaj. Vrpca pri 1161 cm^{-1} u FTIR spektru (odnosno 1153 cm^{-1} u ATR spektru) koja odgovara vibraciji svijanja HCC skupine ne mijenja svoj položaj. Vrpca pri 1028 cm^{-1} u FTIR spektru koja odgovara vibraciji C–O–C skupine mijenja svoj položaj te se u spektrima uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG) uočava u obliku ramena pri 1030 cm^{-1} u sklopu vrlo široke vrpce koja potječe od ciklodekstrina (pri 1043 cm^{-1}). Navedeni pomak položaja uočen je i u spektru uzorka fizičke smjese. Analogna vrpca pri 1028 cm^{-1} u ATR spektru ne mijenja svoj položaj u spektrima uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG) te je također prekrivena vrlo širokom vrpcom koja potječe od ciklodekstrina (pri 1028 cm^{-1}). Vrpca pri 847 cm^{-1} u FTIR spektru koja odgovara torzijskoj vibraciji HCCC skupine mijenja svoj položaj u spektru uzorka NAB + SBE β CD LG, a uočava se pri 848 cm^{-1} . Analogna vrpca pri 845 cm^{-1} mijenja svoj položaj u ATR spektrima uzoraka NAB + SBE β CD (NG i LG) i pomiče se na 847 cm^{-1} . Ovaj pomak nije uočen u spektru uzorka fizičke smjese.

Slično kao i u slučaju FTIR i ATR spektara uzoraka NAB + β -CD, intenziteti karakterističnih vrpce nabumetona su niži u usporedbi sa spektrima uzoraka NAB M. Karakteristične vrpce lijeka su ponovno u nekim slučajevima prekrivene ili se preklapaju s vrpcoma ciklodekstrina. Ciklodekstrin je prisutan u većem masenom udjelu u odnosu na lijek jer se radi o ekvimolarnim smjesama komponenti u uzorcima NAB + SBE β CD. Pretpostavlja

se da u uzorcima fizičke smjese ne dolazi do interakcija lijeka i ciklodekstrina pa su pomaci karakterističnih vrpca nabumetona u spektrima tih uzoraka rezultat preklapanja s vrpcama ciklodekstrina. Spektri fizičke smjese komponenti onda predstavljaju superpoziciju spektara pojedinačnih komponenti.

§ 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti utjecaj β -ciklodekstrina i njegovog derivata, natrijeve soli sulfobutileter- β -ciklodekstrina na topljivost nabumetona u biorelevantnim medijima i vodi. Kvantitativno određivanje nabumetona provedeno je UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom i fluorescencijskom spektroskopijom prethodno razvijenim i validiranim metodama za određivanje nabumetona.

Nakon što je provedena analiza poboljšanja topljivosti prema metodi Higuchija i Connorsa konstruirani su dijagrami topljivosti. U svim slučajevima su dobiveni dijagrami topljivosti tipa A s krivuljom ovisnosti A_L koja predstavlja linearno povećanje topljivosti lijeka s povećanjem koncentracije ciklodekstrina. Na temelju konstruiranih dijagrama topljivosti određene su vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za pretpostavljene inkluzijske komplekse nabumetona s β -ciklodekstrinom i sulfobutileter- β -ciklodekstrinom. Pri tome su korišteni samo podaci dobiveni mjerenjima 24 h od pripreve suspenzija, budući da je nakon tog perioda došlo do uspostave ravnoteže formiranja kompleksa između lijeka i ciklodekstrina.

Prema rezultatima koji su prikazani u ovom diplomskom radu može se zaključiti kako je korišteni alkilsulfonirani derivat β -CD pokazao veći utjecaj na topljivost nabumetona u odnosu na prirodni β -CD bez obzira na korišteni solubilizacijski medij. Vrijednosti konstanti stabilnosti i efikasnosti kompleksiranja za pretpostavljeni inkluzijski kompleks nabumetona sa SBE β CD bile su čak dvostruko veće u usporedbi s vrijednostima koje su dobivene za nabumeton i β -CD. U nekim su slučajevima utvrđena određena neslaganja između konstanti stabilnosti koje su računane na temelju eksperimentalnih podataka dobivenih pomoću dvije spektroskopske tehnike. Razlog tomu jesu male razlike u eksperimentalno određenim vrijednostima intrinzične topljivosti nabumetona o kojima vrijednost konstante stabilnosti izravno ovisi. Stoga je bolje koristiti vrijednost efikasnosti kompleksiranja kao mjeru afiniteta nabumetona prema CD jer ona ovisi samo o nagibu dijagrama topljivosti. Prikazani rezultati nikako ne mogu biti nedvojbena dokaz o inkluziji molekule nabumetona u hidrofobne centralne šupljine korištenih CD u pripremljenim suspenzijama. Analizom razrijeđenih vodenih otopina nabumetona i ciklodekstrina NMR spektroskopijom dobile bi se detaljne

informacije o strukturi kompleksa u otopini, eventualnoj inkluziji molekule lijeka i njenoj orijentaciji u šupljini CD.

Uzorci ekvimolarnih smjesa nabumetona i CD u čvrstom stanju pripremljeni su u visokoenergijskim vibracijskim mlinovima tehnikom suhog mljevenja i otapalom potpomognutog mljevenja. Analizom saturacijske topljivosti utvrđeno je da se topljivost nabumetona u tim produktima višestruko povećava u usporedbi s uzorkom samog nabumetona koji je tretiran u mlinu na jednak način.

Pripremljeni uzorci nabumetona i odabranih CD u čvrstom stanju okarakterizirani su primjenom FTIR i ATR tehnika. Pomaci karakterističnih vrpci nabumetona u spektrima mljevenih uzoraka ekvimolarnih smjesa nabumetona i ciklodekstrina mogu ukazivati na interakcije ove dvije komponente u čvrstom stanju i formiranje kompleksa. Međutim, iako se infracrvena spektroskopija pokazala kao korisna tehnika za karakterizaciju pripremljenih uzoraka u čvrstom stanju, prikazani rezultati nikako ne mogu biti nedvojben dokaz o inkluziji molekule gosta u molekulu domaćina. Analiza dobivenih produkata primjenom DSC i PXRD tehnika bila bi logičan sljedeći korak u sklopu ovog istraživanja budući da se one smatraju fundamentalnim tehnikama za karakterizaciju inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju. Rezultati prezentirani u ovom diplomskom radu poslužili bi kao izvrsna nadopuna takve analize te bi pružili jasniju sliku o interakcijama nabumetona i CD u čvrstom stanju.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

6-MNA – 6-metoksi-2-naftiloctena kiselina
ATR – tehnika prigušene totalne refleksije
BCS – biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari
CD – ciklodekstrin
CGT – ciklodekstrin glukoziltransferaza
COX – enzim ciklooksigenaza
DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija
EMA – Europska agencija za lijekove
FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
GC – plinska kromatografija
HP β CD – hidroksipropil- β -ciklodekstrin
HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IR – infracrvena spektroskopija
IVIVK – *in vivo-in vitro* korelacije
LG – tehnika otapalom potpomognutog mljevenja
NAB – nabumeton
NG – tehnika suhog mljevenja
NMR – nuklearna magnetska rezonancija
NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi
PXRD - difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku
RM β CD – nasumično metiliran- β -ciklodekstrin
RS – Ramanova spektroskopija
SBE β CD – sulfobutyleter- β -ciklodekstrin
SCXRD - difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu
SEM – pretražna elektronska mikroskopija
TGA – termogravimetrijska analiza
USFDA – Američka agencija za hranu i lijekove
WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-za-pacijente/lijekovi> (datum pristupa 30. kolovoza 2020.)
2. F. Talaei, F. Atyabi, M. Azhdarzadeh, R. Dinarvand, A. Saadatzadeh, *Eur. J. Pharm. Sci.* **49** (2013) 712–722.
3. J. Jablan, *Oblikovanje i vrednovanje ciklodekstrinskih terapijskih sustava za oralnu primjenu zaleplona*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 1–185.
4. M. Starek, J. Krzek, *Talanta* **77** (2009) 925–942.
5. N. Goyenechea, M. Sánchez, I. Vélaz, C. Martín, C. Martínez-Ohárriz, G. González-Gaitano, *Luminescence* **16** (2001) 117–127.
6. N. Goyenechea, M. Sánchez, I. Vélaz, C. Martín, C. Martínez-Ohárriz, A. Zornoza, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **44** (2002) 283–287.
7. M. Valero, S. M. B. Costa, J. R. Ascenso, M. M. Velázquez, L. J. Rodríguez, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **35** (1999) 663–677.
8. N. A. F. Al-Rawashdeh, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **51** (2005) 27–32.
9. M. Jug., P. A. Mura, *Pharmaceutics* **10** (2018) 189.
10. V. Čoso, Z. Rajić, B. Zorc, *Farm. Glas.* **65** (2009), 1–14.
11. T. Hedner, O. Samulesson, P. Währborg, H. Wadenwik, K.-A. Ung, A. Ekbom, *Drugs* **64** (2004) 2315–2343.
12. A. Charalabadis, M. Sfouni, C. Bergström, P. Macheras, *Int. J. Pharm.* **566** (2019) 264–281.
13. P. Kaur, X. Jiang, J. Duan, E. Stier, *AAPS J.* **17** (2015) 1035–1039.
14. J. Emani, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **9** (2006) 31–51.
15. H. V. Chavda, C. N. Patel, I. S. Anand, *Syst. Rev. Pharm.* **1** (2010) 62–69.
16. <http://struna.ihjj.hr/naziv/topljivost/2535/> (datum pristupa: 16. rujna 2020.)
17. I. Ivančić, *Priprava i profil oslobađanja timolola uklopljenog u micelle neionskih površinskih aktivnih tvari*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 1–50.
18. <http://struna.ihjj.hr/naziv/bioraspolozivost/35628/> (datum pristupa: 16. rujna 2020.)

19. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 1–10.
20. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, T. Loftsson, *Molecules* **23** (2018) 1–15.
21. T. Savjani, A. K. Gajjar, J. K. Savjani, *ISRN Pharm.* **2012** (2012) 1–10.
22. T. Piteša, *Istraživanje utjecaja adsorpcije acetona na kristalnu strukturu i stabilnosti rompskih polimorfa 1,3-difenilpropan-1,3-diona pomoću simulacija molekulske dinamike*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 1–44.
23. S. Kalepu, V. Nekkanti, *Acta Pharm. Sin. B* **5** (2015) 442–453.
24. P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun, J. Lee, *Asian J. Pharm. J. Pharm. Sci.* **9** (2014) 304–316.
25. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 272–284.
26. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **62** (2010) 1607–1621.
27. H. Dodziuk, *Introduction to Supramolecular Chemistry*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002, str. 208.
28. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 238–250.
29. <https://www.mdpi.com/2073-8994/11/10/1249> (datum pristupa 16. rujna 2020.)
30. E. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
31. M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discov.* **3** (2004) 1023–1035.
32. <https://www.okklo.com/technology/cyclodextrins> (datum pristupa 16. rujna 2020.)
33. S. V. Kurkov, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **453** (2013) 167–180.
34. T. Loftsson, M. E. Brewster, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59** (2007) 645–666.
35. <https://sibs.tamu.edu/services/grinding/> (datum pristupa 16. rujna 2020.)
36. <http://m.deco-ballmill.com/ball-mill-jar/metal-ball-mill-jar/304-stainless-steel-ball-mill-jar.html> (datum pristupa 16. rujna 2020.)
37. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 226–238.
38. C. N. Reilley (ur.), *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, Vol. 4., Interscience publishers, New York, 1965, str. 117–212.
39. S. S. Jambhekar, P. Breen, *Drug Discovery Today* **21** (2016) 1–6.
40. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.* **101** (2012) 3019–3032.
41. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999., str. 489–590.

42. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, 2014, str. 649–770.
43. R. T. Williams, J. W. Bridges, *J. Clin. Path* **17** (1964) 371–394.
44. S. Miljanić, N. Galić, *Viši praktikum analitičke kemije 1 (interna skripta za studente Diplomskog sveučilišnog studija Kemija, smjer: istraživački)*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2018, str. 19–22.
45. M. L. Larramendy, S. Soloneski (ur.), *Emerging Pollutants in the Environment – Current and Further Implications*, Vol. 7., InTech, Rijeka, 2015, str. 206.
46. *European Pharmacopoeia 9.0*, Council of Europe, Strasbourg, 2016, str. 761–763.
47. P. Govindasamy, S. Gunasekaran, *Spectrochim. Acta, Part A* **149** (2015) 800–811.
48. X. Ge, J. He, F. Qi, Y. Yeng, Z. Huang, R. Lu, L. Huang, *Spectrochim. Acta, Part A* **81** (2011) 397–403.
49. Y. Wang, C. Yin, X. Cheng, G. Li, Y. Shan, X. Zhu, *Coatings* **10** (2020) 1-18.
50. S. Mahandoss, T. N. I. Edison, R. Atchudan, S. Palanisamy, N. M. Prabhu, A. A. Napoleon, S. G. You, Y. R. Lee, *J. Mol. Liq.* **319** (2020) 1-10.
51. D.-Y. Ma, Y.-M. Zhang, J.-N. Xu, *Tetrahedron* **72** (2016) 3105–3112.
52. J. Xu, J. Zhang, X. Li, Y. Zheng, *J. Mol. Struct.* **1141** (2017) 328–334.
53. V. Venuti, C. Cannavà, M. C. Cristiano, M. Fresta, D. Majolino, D. Paolino, R. Stancanelli, S. Tommasini, C. A. Ventura, *Colloids Surf. B* **115** (2014) 22–28.

§ 8. DODATAK

Tablica D1. Usporedba položaja karakterističnih vrpci nabumetona iz FTIR spektara uzoraka nabumetona tretiranog u tarioniku (NAB PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (NAB M)

| valni broj / cm^{-1} | | asignacija |
|-------------------------------|-------|---|
| NAB PM | NAB M | |
| 1705 | 1705 | $\nu (\text{C}=\text{O})^{47}$ |
| 1633 | 1633 | $\nu (\text{C}=\text{C})$ aromati ⁴⁷ |
| 1608 | 1608 | |
| 1504 | 1504 | $\nu (\text{C}-\text{C})$ aromati ⁴⁷ |
| 1485 | 1485 | |
| 1452 | 1452 | $\delta_{\text{ip}} (\text{HCH})^{47}$ |
| 1387 | 1387 | $\delta (\text{HCH})^{47}$ |
| 1363 | 1363 | $\nu (\text{C}-\text{C})^{47}$ |
| 1263 | 1263 | $\delta (\text{HCC}) + \tau (\text{HCCC})^{47}$ |
| 1228 | 1228 | $\nu (\text{C}-\text{C})^{47}$ |
| 1161 | 1161 | $\delta (\text{HCC})^{47}$ |
| 1028 | 1028 | $\nu (\text{C}-\text{O}-\text{C})^{47}$ |
| 847 | 847 | $\tau (\text{HCCC})^{47}$ |

Tablica D2. Usporedba položaja karakterističnih vrpci β -CD iz FTIR spektara uzoraka β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (β -CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (β -CD M)

| valni broj / cm^{-1} | | asignacija |
|-------------------------------|----------------|---|
| β -CD PM | β -CD M | |
| 3410 | 3394 | $\nu (\text{O}-\text{H})^{48,49,50}$ |
| 2925 | 2925 | $\nu_{\text{as}} (\text{C}-\text{H})^{48,49,50}$ |
| 1647 | 1643 | $\delta (\text{H}-\text{O}-\text{H})^{49}$ |
| 1417 | 1415 | $\delta_{\text{ip}} (\text{O}-\text{H})^{48}$ |
| 1369 | 1369 | $\delta_{\text{s}} (\text{CH}_3)^{48}$ |
| 1336 | 1336 | $\delta_{\text{s}} (\text{CH}_2)^{48,50}$ |
| 1304 | 1304 | $\delta_{\text{tw}} (\text{CH}_2)$ |
| 1244 | 1238 | $\nu (\text{C}-\text{O})$ |
| 1198 | 1201 <i>sh</i> | $\nu (\text{C}-\text{O})$ |
| 1157 | 1159 | $\nu (\text{C}-\text{O}-\text{C})^{48,49}$ |
| 1080 | 1080 | $\nu (\text{C}-\text{C}), \nu (\text{C}-\text{O})^{48}$ |
| 1028 | 1028 | |

Tablica D3. Usporedba položaja karakterističnih vrpci SBE β CD iz FTIR spektara uzoraka sulfobutileter- β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (SBE β CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (SBE β CD M)

| valni broj / cm ⁻¹ | | asignacija |
|-------------------------------|------------------|--|
| SBE β CD PM | SBE β CD M | |
| 3423 | 3448 | ν (O–H) ^{50,51,52,53} |
| 2939 | 2937 | ν_{as} (CH ₂) ^{51,52,53} |
| 2881 | 2879 | ν_{s} (CH ₂) ^{51,52,53} |
| 1649 | 1655 | δ (H–O–H) ^{51,53} |
| 1419 | 1419 | δ_{ip} (O–H) |
| 1367 | 1369 | δ_{s} (CH ₃) |
| 1331 | 1331 | δ_{s} (CH ₂) ⁵⁰ |
| 1161 | 1161 | ν (S=O), ν (C–O–C) ⁵¹ |
| 1082 | 1082 | ν (C–C), ν (C–O) |
| 1043 | 1043 | ν (S=O), ν (C–O) ^{50,51,52} |
| 530 | 530 | ν (S–O) ⁵¹ |

Tablica D4. Usporedba položaja karakterističnih vrpci nabumetona iz ATR spektara uzoraka netretiranog nabumetona (NAB C), nabumetona tretiranog u tarioniku (NAB PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (NAB M)

| valni broj / cm ⁻¹ | | | asignacija |
|-------------------------------|--------|-------|--|
| NAB C | NAB PM | NAB M | |
| 1703 | 1703 | 1703 | ν (C=O) ⁴⁷ |
| 1633 | 1633 | 1633 | ν (C=C) aromati ⁴⁷ |
| 1608 | 1608 | 1608 | |
| 1504 | 1504 | 1504 | ν (C–C) aromati ⁴⁷ |
| 1485 | 1485 | 1485 | |
| 1452 | 1454 | 1454 | δ_{ip} (HCH) ⁴⁷ |
| 1387 | 1387 | 1387 | δ (HCH) ⁴⁷ |
| 1361 | 1361 | 1363 | ν (C–C) ⁴⁷ |
| 1263 | 1263 | 1263 | δ (HCC) + τ (HCCC) ⁴⁷ |
| 1228 | 1228 | 1228 | ν (C–C) ⁴⁷ |
| 1153 | 1153 | 1153 | δ (HCC) ⁴⁷ |
| 1028 | 1028 | 1028 | ν (C–O–C) ⁴⁷ |
| 845 | 845 | 845 | τ (HCCC) ⁴⁷ |

Tablica D5. Usporedba položaja karakterističnih vrpci β -CD iz ATR spektara uzoraka netretiranog β -ciklodekstrina (β -CD C), β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (β -CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (β -CD M)

| valni broj / cm^{-1} | | | asignacija |
|-------------------------------|----------------|----------------|---|
| β -CD C | β -CD PM | β -CD M | |
| 3226 | 3228 | 3317 | ν (O–H) ^{48,49,50} |
| 2916 | 2923 | 2924 | ν_{as} (C–H) ^{48,49,50} |
| 1637 | 1647 | 1647 | δ (H–O–H) ⁴⁹ |
| 1417 | 1417 | 1417 | δ_{ip} (O–H) ⁴⁸ |
| 1363 | 1363 | 1361 | δ_{s} (CH ₃) ⁴⁸ |
| 1338 | 1338 | 1338 | δ_{s} (CH ₂) ^{48,50} |
| 1296 | 1300 | 1300 | δ_{tw} (CH ₂) |
| 1254 | 1254 | 1246 <i>sh</i> | ν (C–O) |
| 1203 | 1205 | 1205 | ν (C–O) |
| 1151 | 1151 | 1151 | ν (C–O–C) ^{48,49} |
| 1076 | 1078 | 1078 | ν (C–C), ν (C–O) ⁴⁸ |
| 1020 | 1020 | 1020 | |

Tablica D6. Usporedba položaja karakterističnih vrpci SBE β CD iz ATR spektara uzoraka netretiranog sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE β CD C), sulfobutileter- β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (SBE β CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (SBE β CD M)

| valni broj / cm^{-1} | | | asignacija |
|-------------------------------|-------------------|------------------|--|
| SBE β CD C | SBE β CD PM | SBE β CD M | |
| 3305 | 3384 | 3390 | ν (O–H) ^{50,51,52,53} |
| 2941 | 2929 | 2937 | ν_{as} (CH ₂) ^{51,52,53} |
| 2879 | 2891 | 2879 | ν_{s} (CH ₂) ^{51,52,53} |
| 1653 | 1647 | 1647 | δ (H–O–H) ^{51,53} |
| 1417 | 1417 | 1417 | δ_{ip} (O–H) |
| 1361 | 1361 | 1361 | δ_{s} (CH ₃) |
| 1338 | 1338 | 1338 | δ_{s} (CH ₂) ⁵⁰ |
| 1153 | 1153 | 1153 | ν (S=O), ν (C–O–C) ⁵¹ |
| 1078 | 1080 | 1080 | ν (C–C), ν (C–O) |
| 1026 | 1028 | 1028 | ν (S=O), ν (C–O) ^{50,51,52} |

Tablica D7. Usporedba položaja karakterističnih vrpca nabumetona iz FTIR spektara uzorka nabumetona (NAB M) i uzoraka NAB + β -CD pripremljenih u obliku fizičke smjese u tarioniku (PM) te mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu tehnikom suhog mljevenja (NG) i otapalom potpomognutog mljevenja (LG)

| valni broj / cm^{-1} | | | | asignacija |
|-------------------------------|-------------------|------|------|--------------------------------|
| NAB M | NAB + β -CD | | | |
| | PM | NG | LG | |
| 1705 | 1705 | 1707 | 1707 | ν (C=O) |
| 1633 | 1633 | 1635 | 1635 | ν (C=C) aromati |
| 1608 | 1608 | 1610 | 1610 | |
| 1504 | 1504 | 1506 | 1504 | ν (C-C) aromati |
| 1485 | 1485 | 1487 | 1485 | |
| 1452 | 1452 | 1454 | 1452 | δ_{ip} (HCH) |
| 1387 | 1388 | 1388 | 1388 | δ (HCH) |
| 1363 | 1365 | 1365 | 1365 | ν (C-C) |
| 1263 | 1263 | 1265 | 1265 | δ (HCC) + τ (HCCC) |
| 1228 | 1228 | 1230 | 1228 | ν (C-C) |
| 1161 | 1159 | 1157 | 1157 | δ (HCC) |
| 1028 | 1028 | 1028 | 1028 | ν (C-O-C) |
| 847 | 847 | 847 | 847 | τ (HCCC) |

Tablica D8. Usporedba položaja karakterističnih vrpca nabumetona iz FTIR spektara uzorka nabumetona (NAB M) i uzoraka NAB + SBE β CD pripremljenih u obliku fizičke smjese u tarioniku (PM) te mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu tehnikom suhog mljevenja (NG) i otapalom potpomognutog mljevenja (LG)

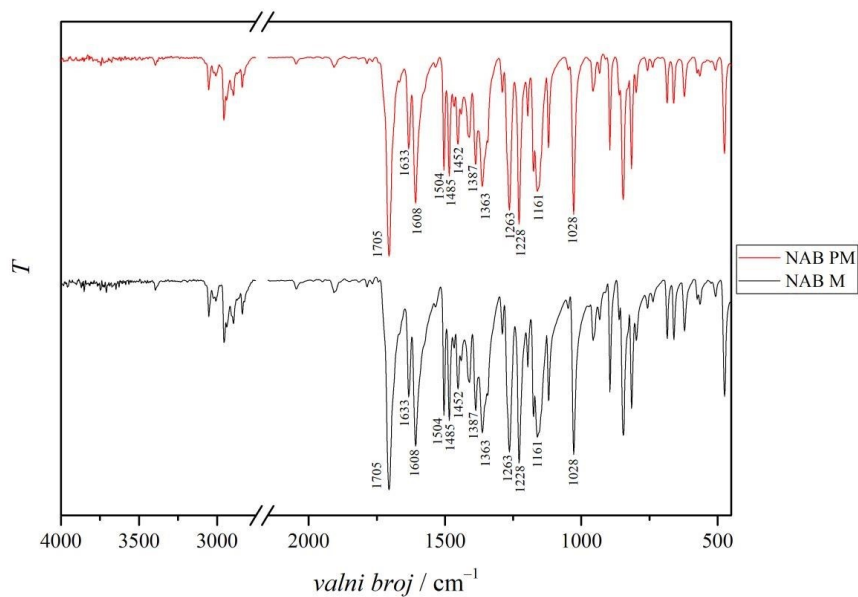
| valni broj / cm^{-1} | | | | asignacija |
|-------------------------------|----------------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| NAB M | NAB + SBE β CD | | | |
| | PM | NG | LG | |
| 1705 | 1705 | 1707 | 1707 | ν (C=O) |
| 1633 | 1635 | 1637 | 1635 | ν (C=C) aromati |
| 1608 | 1608 | 1610 | 1610 | |
| 1504 | 1504 | 1504 | 1504 | ν (C-C) aromati |
| 1485 | 1485 | 1485 | 1485 | |
| 1452 | 1454 | 1454 | 1454 | δ_{ip} (HCH) |
| 1387 | 1387 | 1388 | 1388 | δ (HCH) |
| 1363 | 1363 | 1365 | 1365 | ν (C-C) |
| 1263 | 1263 | 1263 | 1263 | δ (HCC) + τ (HCCC) |
| 1228 | 1228 | 1228 | 1228 | ν (C-C) |
| 1161 | 1161 | 1161 | 1161 | δ (HCC) |
| 1028 | 1030 | 1030 <i>sh</i> | 1030 <i>sh</i> | ν (C-O-C) |
| 847 | 847 | 847 | 848 | τ (HCCC) |

Tablica D9. Usporedba položaja karakterističnih vrpca nabumetona iz ATR spektara uzorka nabumetona (NAB M) i uzoraka NAB + β -CD pripremljenih u obliku fizičke smjese u tarioniku (PM) te mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu tehnikom suhog mljevenja (NG) i otapalom potpomognutog mljevenja (LG)

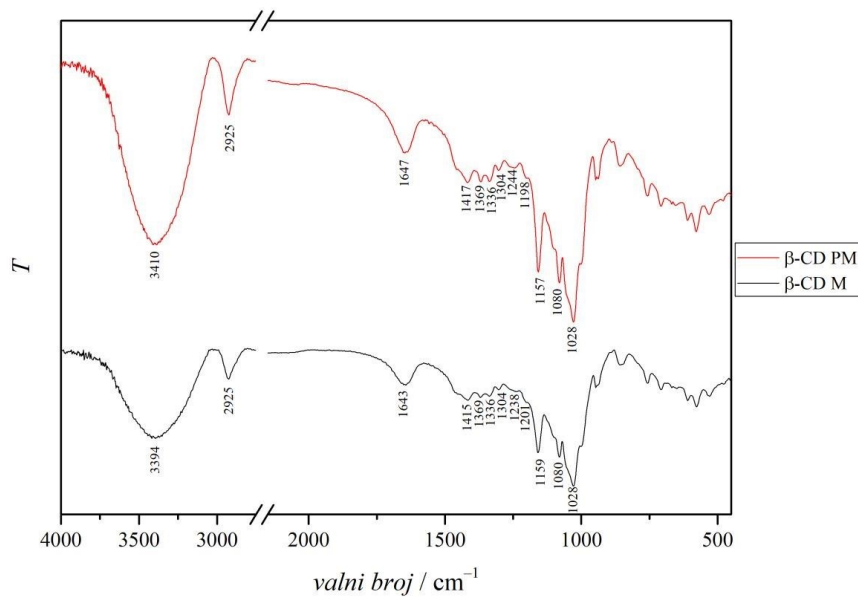
| NAB M | valni broj / cm^{-1} | | | asignacija |
|-------|-------------------------------|------|------|--------------------------------|
| | NAB + β -CD | | | |
| | PM | NG | LG | |
| 1703 | 1705 | 1705 | 1705 | ν (C=O) |
| 1633 | 1635 | 1635 | 1635 | ν (C=C) aromati |
| 1608 | 1608 | 1608 | 1608 | |
| 1504 | 1506 | 1506 | 1506 | |
| 1485 | 1485 | 1487 | 1487 | ν (C-C) aromati |
| 1454 | 1454 | 1456 | 1456 | δ_{ip} (HCH) |
| 1387 | 1387 | 1388 | 1388 | δ (HCH) |
| 1363 | 1363 | 1363 | 1363 | ν (C-C) |
| 1263 | 1263 | 1265 | 1265 | δ (HCC) + τ (HCCC) |
| 1228 | 1228 | 1228 | 1228 | ν (C-C) |
| 1153 | 1153 | 1151 | 1151 | δ (HCC) |
| 1028 | 1026 | 1022 | 1022 | ν (C-O-C) |
| 845 | 845 | 847 | 847 | τ (HCCC) |

Tablica D10. Usporedba položaja karakterističnih vrpca nabumetona iz ATR spektara uzoraka nabumetona (NAB M) i uzoraka NAB + SBE β CD pripremljenih u obliku fizičke smjese u tarioniku (PM) te mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu tehnikom suhog mljevenja (NG) i otapalom potpomognutog mljevenja (LG)

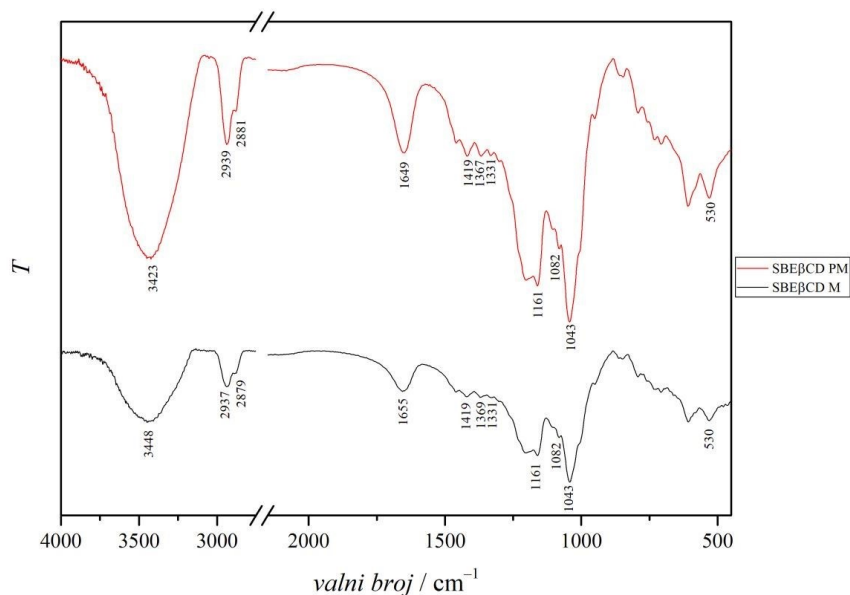
| NAB M | valni broj / cm^{-1} | | | asignacija |
|-------|-------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| | NAB + SBE β CD | | | |
| | PM | NG | LG | |
| 1703 | 1705 | 1705 | 1705 | ν (C=O) |
| 1633 | 1635 | 1635 | 1635 | ν (C=C) aromati |
| 1608 | 1608 | 1610 | 1610 | |
| 1504 | 1506 | 1506 | 1506 | |
| 1485 | 1485 | 1485 | 1487 | ν (C-C) aromati |
| 1454 | 1456 | 1456 | 1456 | δ_{ip} (HCH) |
| 1387 | 1387 | 1388 | 1388 | δ (HCH) |
| 1363 | 1363 | 1363 | 1363 | ν (C-C) |
| 1263 | 1263 | 1263 | 1263 | δ (HCC) + τ (HCCC) |
| 1228 | 1227 | 1227 <i>sh</i> | 1227 <i>sh</i> | ν (C-C) |
| 1153 | 1153 | 1153 | 1153 | δ (HCC) |
| 1028 | 1028 | 1028 | 1028 | ν (C-O-C) |
| 845 | 847 | 847 | 847 | τ (HCCC) |



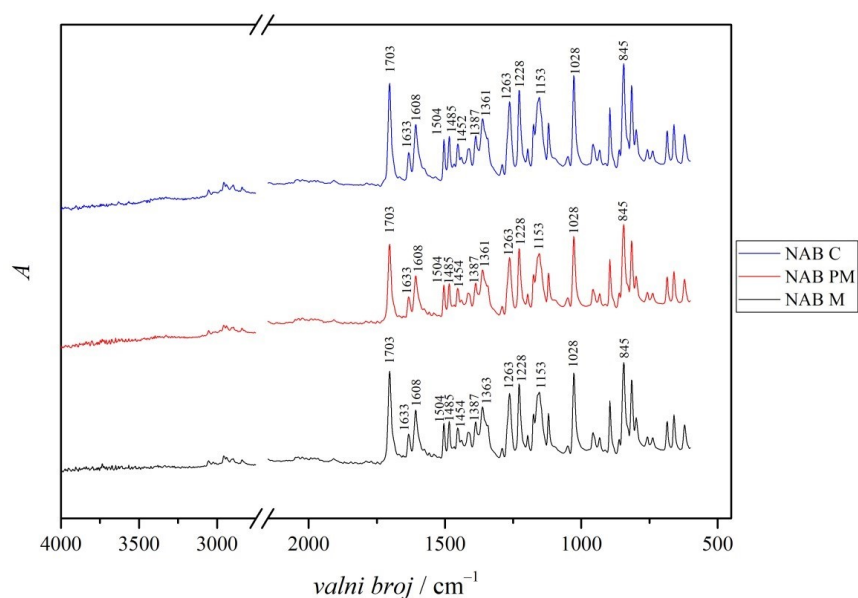
Slika D1. Usporedba FTIR spektara uzoraka nabumetona tretiranog u tarioniku (NAB PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (NAB M)



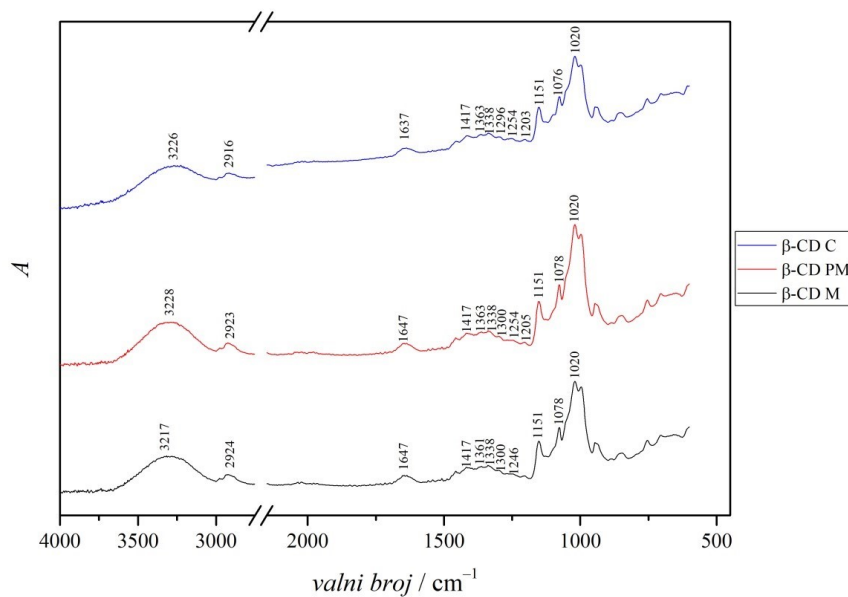
Slika D2. Usporedba FTIR spektara uzoraka β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (β -CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (β -CD M)



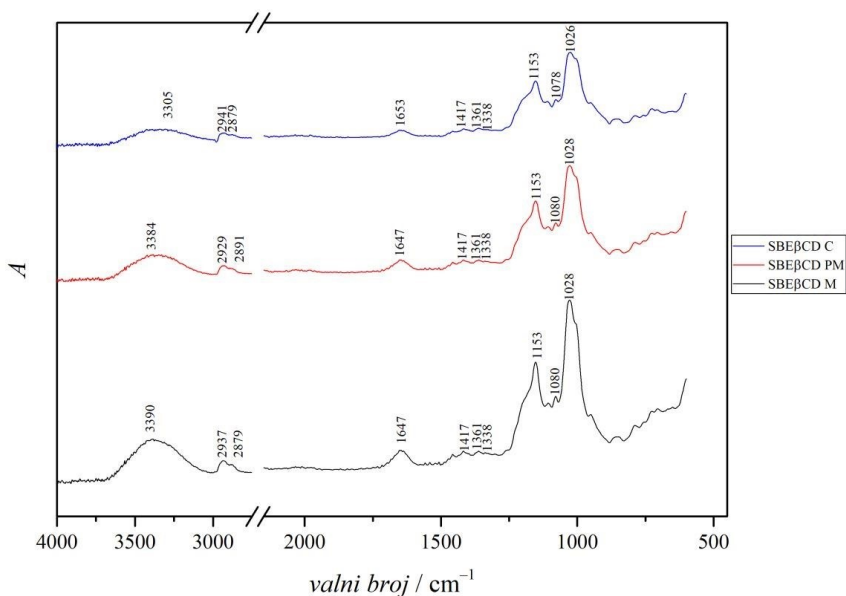
Slika D3. Usporedba FTIR spektara uzoraka sulfobutil- β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (SBE β CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (SBE β CD M)



Slika D4. Usporedba ATR spektara uzoraka netretiranog nabumetona (NAB C), nabumetona tretiranog u tarioniku (NAB PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (NAB M)



Slika D5. Usporedba ATR spektara uzoraka netretiranog β -ciklodekstrina (β -CD C), β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (β -CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (β -CD M)



Slika D6. Usporedba ATR spektara uzoraka netretiranog sulfobutyleter- β -ciklodekstrina (SBE β -CD C), sulfobutyleter- β -ciklodekstrina tretiranog u tarioniku (SBE β -CD PM) i tretiranog mljevenjem u visokoenergijskom vibracijskom mlinu (SBE β -CD M)

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Nino Jukić

Datum rođenja: 11. listopada 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Antuna Gustava Matoša, Zagreb

2010.–2014. Nadbiskupska klasična gimnazija, Zagreb

2014.–2018. Preddiplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Završni rad: Anorganski spojevi: lijekovi i otrovi, mentor: prof. dr. sc. Marina Cindrić

2018.–2021. Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička i anorganska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Radno iskustvo

od srpnja 2018. Rad u laboratoriju na odjelu Teva API R&D Analitika, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska