

Modifikacija oslobađanja djelatne tvari pomoću makrocikličkih receptora

Adamić-Golić, Melani

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:248880>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Melani Adamić Golić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Melani Adamić-Golić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 09. srpnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Krunoslav Žižek, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Ernest Meštrović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 12. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Melani Adamić Golić

**MODIFIKACIJA OSLOBAĐANJA DJELATNE TVARI
POMOĆU MAKROCIKLIČKIH RECEPTORA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

prof. dr. sc. Irena Škorić

prof. dr. sc. Ernest Meštrović

Zagreb, srpanj 2024.

*Eksperimenti u ovom istraživanju provedeni su u
Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo i
Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale
Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Karakterizacija inkluzijskih kompleksa provedena je u
Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale,
Zavodu za inženjerstvo površina polimernih materijala i
Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju
Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
te Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković.*

*Karakterizacija tableta provedena je u
Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo
Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

ZAHVALA

Prvenstveno bih htjela zahvaliti mentoru prof. dr. sc. Krunoslavu Žižeku, na velikoj količini prenesenog znanja, velikom trudu i susretljivosti, kako i iskazanom povjerenju što je učinilo izradu ovog rada lijepim iskustvom.

Hvala asistentici Katarini Sokač, mag. ing. cheming. na suradnji i pomoći u provedbi eksperimentalnog dijela rada i raspravi, kao i na entuzijazmu prema svom poslu koji je prenjela na mene.

Hvala mojoj obitelji koja je uvijek uz mene, koja vjeruje u mene i pruža mi podršku u svakom trenutku. Hvala neizmjerne ljubavi, potpori i ohrabrenju kroz sve ove godine. Također, hvala mojim prijateljima na njihovom razumijevanju, strpljenju i pomoći koja mi je neizmjereno značila. Bez vas, ovaj uspjeh ne bi bio moguć.

SAŽETAK

MODIFIKACIJA OSLOBAĐANJA DJELATNE TVARI POMOĆU MAKROCIKLIČKIH RECEPTORA

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

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

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

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

Ključne riječi:

dasatinib, poboljšanje topljivosti lijeka, inkluzijski kompleksi, makrociklički receptori, mehanokemijska aktivacija, oslobađanje djelatne tvari

ABSTRACT

DRUG RELEASE MODIFICATION WITH MACROCYCLIC RECEPTORS

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

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

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

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

Keywords:

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

SADRŽAJ RADA

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 3 |
| 3. OPĆI DIO | 4 |
| 3.1. Izazovi u farmaceutskoj industriji | 4 |
| 3.2. Značaj gastrointestinalne apsorpcije u dostavi lijeka i načini poboljšanja | 5 |
| 3.3. Priprava inkluzijskih kompleksa pomoću makrocikličkih receptora | 9 |
| 3.4. Mehanokemijska priprava/sinteza | 13 |
| 4. METODIKA | 17 |
| 4.1. Djelatna tvar – aktivni sastojak lijeka..... | 17 |
| 4.2. Makrociklički receptor - β -ciklodekstrin..... | 18 |
| 4.3. Pomoćne tvari – ekscipijenti..... | 19 |
| 4.4. Mehanokemijska priprava/sinteza inkluzijskih kompleksa..... | 20 |
| 4.4.1. Priprava mješavine | 20 |
| 4.4.2. Postupak mljevenja u planetarnom kugličnom mlinu | 21 |
| 4.5. Karakterizacija mehanokemijski pripremljenih uzoraka | 23 |
| 4.5.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija | 23 |
| 4.5.2. Rendgenska difrakcijska analiza praha | 24 |
| 4.5.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama..... | 25 |
| 4.5.4. Nuklearna magnetska rezonancija..... | 27 |
| 4.6. Priprava oralnog dozirnog oblika s modificiranim profilom oslobađanja djelatne tvari 29 | |
| 4.6.1. <i>In-situ</i> granuliranje taljenjem u fluidiziranom sloju..... | 29 |
| 4.6.2. Tabletiranje..... | 30 |
| 4.7. Karakterizacija oralnog dozirnog oblika | 31 |
| 4.7.1. Ujednačenost masa tableta | 31 |
| 4.7.2. Sadržaj djelatne tvari u tableti | 31 |
| 4.7.3. Testovi topljivosti..... | 32 |
| 4.7.4. Matematički opis oslobađanja djelatne tvari iz dozirnog oblika..... | 33 |
| 5. REZULTATI I RASPRAVA | 36 |
| 5.1. Karakterizacija mehanokemijski pripremljenih uzoraka | 36 |
| 5.1.1. Podatci toplinske analize tvari – DSC analiza | 36 |
| 5.1.2. Podatci difrakcijske analize tvari – XRPD analiza | 37 |
| 5.1.3. Podatci spektroskopske analize tvari – FTIR analiza..... | 38 |
| 5.1.4. Podatci spektroskopske analize tvari - NMR analiza..... | 39 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.2. | Karakterizacija oralnog dozirnog oblika | 43 |
| 5.2.1. | Ujednačenost masa tableta | 43 |
| 5.2.2. | Sadržaj dasatiniba u tableti..... | 44 |
| 5.2.3. | Profili oslobađanja dasatiniba iz tableta..... | 47 |
| 5.2.4. | Matematički opis oslobađanja dasatiniba iz tableta | 48 |
| 6. | ZAKLJUČAK | 51 |
| 8. | POPIS SIMBOLA I AKRONIMA | 57 |

1. UVOD

Farmaceutska industrija suočava se s mnogim izazovima, kao što su slaba topljivost djelatnih tvari i potreba za prelaskom na ekološki prihvatljivije proizvodne procese. Nastoji se smanjiti primjena otapala, a u istovremeno poboljšati bioraspoloživost lijekova kako bi se osigurala njihova maksimalna terapijska učinkovitost.

Ovo istraživanje demonstrirat će kako su ovi izazovi premostivi primjenom principa zelene kemije i metodologije kemijskog inženjerstva za modificiranje oslobađanja djelatne tvari. U ovom istraživanju, nastoji se poboljšati topljivost djelatne tvari, a samim time i njezina bioraspoloživost. Kao djelatna tvar koristi se dasatinib, koji pripada II. skupini Biofarmaceutskog sustava klasifikacije (engl. *Biopharmaceutical Classification System*, BCS) zbog svoje loše topljivosti u vodenom mediju, ali visoke permeabilnosti kroz crijevnu membranu. Dasatinib se koristi za liječenje određenih slučajeva kronične mijeloične i akutne limfoblastične leukemije i kao takav daje dodatan značaj ovom radu.

U ovom radu, nastoji se mehanokemijski pripremiti inkluzijski kompleks djelatne tvari i makrocikličkog receptora, β -ciklodekstrina, i time pozitivno utjecati na topljivost dasatiniba u vodenom mediju, a samim time i bioraspoloživost lijeka. Također, nastoji se istražiti kako inkluzijski kompleksi utječu na profil oslobađanja djelatne tvari, što može pružiti nove uvide u farmakokinetiku lijeka i njegovu terapijsku učinkovitost.

Kako bi se primijenili principi zelene kemije i time omogućilo provođenje procesa bez upotrebe otapala, za pripremu inkluzijskih kompleksa djelatne tvari odabran je mehanokemijski tretman u planetarnom kugličnom mlinu. U ovakvom uređaju moguće je pripremiti inkluzijske komplekse bez primjene otapala, čime se smanjuje potrošnja energije i rizik od ekoloških štetnosti.

Dobiveni uzorci karakterizirat će se rendgenskom difrakcijskom analizom praha, diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama te nuklearnom magnetskom rezonancijom. Ove analitičke tehnike mogu dati detaljne informacije o strukturi, termičkim svojstvima i kemijskom sastavu kompleksa, što je ključno za razumijevanje karakteristika i performansi istih.

Nakon karakterizacije, mehanokemijski pripremljeni uzorci će se tabletirati zajedno s pripremljenim granulatima pomoćnih tvari. Tablete će se karakterizirati kako bi se osigurala njihova kvaliteta i konzistentnost. Zatim će se provesti *in vitro* ispitivanje kako bi se testirala topljivost dasatiniba iz tableta te utvrdio profil oslobađanja iz istih. Očekuje se da će tablete poboljšane topljivosti djelatne tvari omogućiti bolju apsorpciju

dasatiniba u organizmu, što bi potencijalno trebalo rezultirati učinkovitijim terapijskim rezultatima kod pacijenata oboljelih od leukemije. Dodatno, profili oslobađanja ove djelatne tvari nastojat će se opisati pogodnim matematičkim modelom.

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Pripravom inkluzijskih kompleksa pomoću makrocikličkih receptora moguće je utjecati na profil i kinetiku oslobađanja djelatne tvari i potencijalno doprinijeti njenoj boljoj apsorpciji u organizmu.

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

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Mehanokemijski pripremiti inkluzijske komplekse specifične djelatne tvari pomoću makrocikličkih receptora.

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

3. OPĆI DIO

3.1. Izazovi u farmaceutskoj industriji

Farmaceutska industrija, kao jedna od vodećih industrija svijeta, ostvarila je ukupni prihod od 1,6 bilijuna dolara u 2023. godini.¹ Također, farmaceutske tvrtke su jedan od najvećih onečišćivača s godišnjom emisijom ugljičnog dioksida od 1,9 Mt. Iako su ideje o zaštiti okoliša prezentirane prije desetak godina, mnoge su propale zbog nedostatka suradničkih napora industrija. Unatoč tome, s novim regulativama i željom industrije za stvaranjem revolucionarnih lijekova kako bi poboljšale životni standard diljem svijeta, farmaceutske tvrtke su krenule ka modificiranju kemijskih proizvodnih procesa prema zelenoj sintezi proizvoda koji uključuju principe zelene kemije.²

Zelenu kemiju i njenih 12 principa prvi su predstavili Paul Anastas i John Warner, koji se oslanjaju na minimalizaciju ili nekorištenje toksičnih otapala u kemijskim procesima i analizama, kao i na negeneriranje otpada iz tih procesa.³ Nekorištenje otapala može značajno utjecati na troškove, jer ona čine 50 do 80 % mase potrebne za kemijske operacije u serijskoj proizvodnji, odnosno, uzrokuje povećanu potrošnju energije, a samim time i najveću zabrinutost u vezi sigurnosti procesa. Kao dobar primjer primjene zelene kemije u farmaceutskoj industriji može se spomenuti tvrtka Merck, koja je primijenila principe zelene kemije pri proizvodnji molnupiravira, antivirusnog lijeka za liječenje COVIDa-19. Smanjenjem korištenja otapala, povećanjem prinosa za 1,6 puta i redukcijom broja koraka s 5 na 3 Merck je zavrijedio Nagradu za zelenije uvjete reakcije (*Greener Reaction Conditions Award*) od Američke agencije za zaštitu okoliša (*U.S. Environmental Protection Agency*). Sama nagrada dokaz je da društvo teži ka zelenoj kemiji i kako zeleniji procesi nisu samo dobri za okoliš, već mogu smanjiti troškove i postići bolju iskoristivost procesa.⁴

Valja spomenuti i da je više od 40 % novosintetiziranih djelatnih tvari gotovo netopivo u vodenom mediju, odnosno, gastrointestinalnoj tekućini. Svaki lijek koji se treba apsorbirati mora biti prisutan u obliku otopine na mjestu apsorpcije. To predstavlja veliki problem jer je upravo sposobnost otapanja u vodenom mediju važan parametar u postizanju željene koncentracije lijeka u sistemske cirkulaciji čovjeka radi optimalnog farmakološkog djelovanja. Kako bi se omogućila terapijska koncentracija u plazmi nakon oralne primjene lijeka, lijekovi zahtijevaju veće doze koje kao posljedicu imaju toksično djelovanje na gastrointestinalnu sluznicu i promjenjivu bioraspodjivost, točnije nestalan udio primijenjenog lijeka koji doseže u sistemske cirkulaciju. Problem topljivosti veliki je

izazov za znanstvenika u formulaciji, koji se može riješiti različitim tehnološkim pristupima tijekom rada na razvoju farmaceutskih proizvoda. Čvrsta disperzija, mikronizacija, korištenje surfaktanata, formuliranje soli, smanjenje veličine čestica neki su od vitalnih pristupa koji se rutinski koriste za poboljšanje topljivosti slabo topljivih lijekova. Svaki pristup ima određena ograničenja i prednosti, a među svim navedenim pristupima, tehnika kompleksacije se preciznije primjenjuje kako bi se poboljšala vodena topljivost, brzina otapanja i bioraspoloživost loše topljivih lijekova. Poboljšanje topljivosti lijeka te, posljedično, i njegove bioraspoloživosti jedan je od najizazovnijih aspekata procesa razvoja lijeka, posebno za oralne oblike dostave.^{5,6}

3.2. Značaj gastrointestinalne apsorpcije u dostavi lijeka i načini poboljšanja

Lijekovi se mogu unijeti u organizam na više načina. Enteralna ruta lijekova uključuje oralnu, sublingvalnu, bukalnu ili rektalnu primjenu lijekova, omogućujući apsorpciju lijekova prvenstveno u tankom crijevu ili rektumu. Postoje i tzv. parenteralne rute koje lijekove dostavljaju izravno u tkivo i krvotok. Takav se način koristi upotrebom intravenske, intramuskularne i potkožne injekcije. Ostale rute lijekova uključuju transnazalnu, inhalacijsku, vaginalnu, transdermalnu i intraosoznu primjenu.⁷ Najzastupljeniji oblik dostave lijeka u organizam jest oralni, ponajviše radi preferencije pacijenata, ekonomske isplativosti, jednostavnosti proizvodnje i praktičnosti primjene. Dokazano je da se pacijenti najviše pridržavaju terapijski prepisanoj učestalosti konzumiranja lijekova koji se u organizam unose oralnim putem. Trenutna je procjena da čak 90 % globalnog tržišta lijekova čine upravo oralni oblici koji mogu biti čvrsti kao što su tablete, kapsule, granule, pastile, a mogu biti i tekući poput sirupa.⁸ No, oralni dozirni oblici suočavaju se s problemom niske bioraspoloživosti, posljedice niske propusnosti lijeka, male brzine otapanja, ali i loše topljivosti.⁵ Na slici 1. prikazane su tablete.



Slika 1. Oralni dozirni oblik – tablete

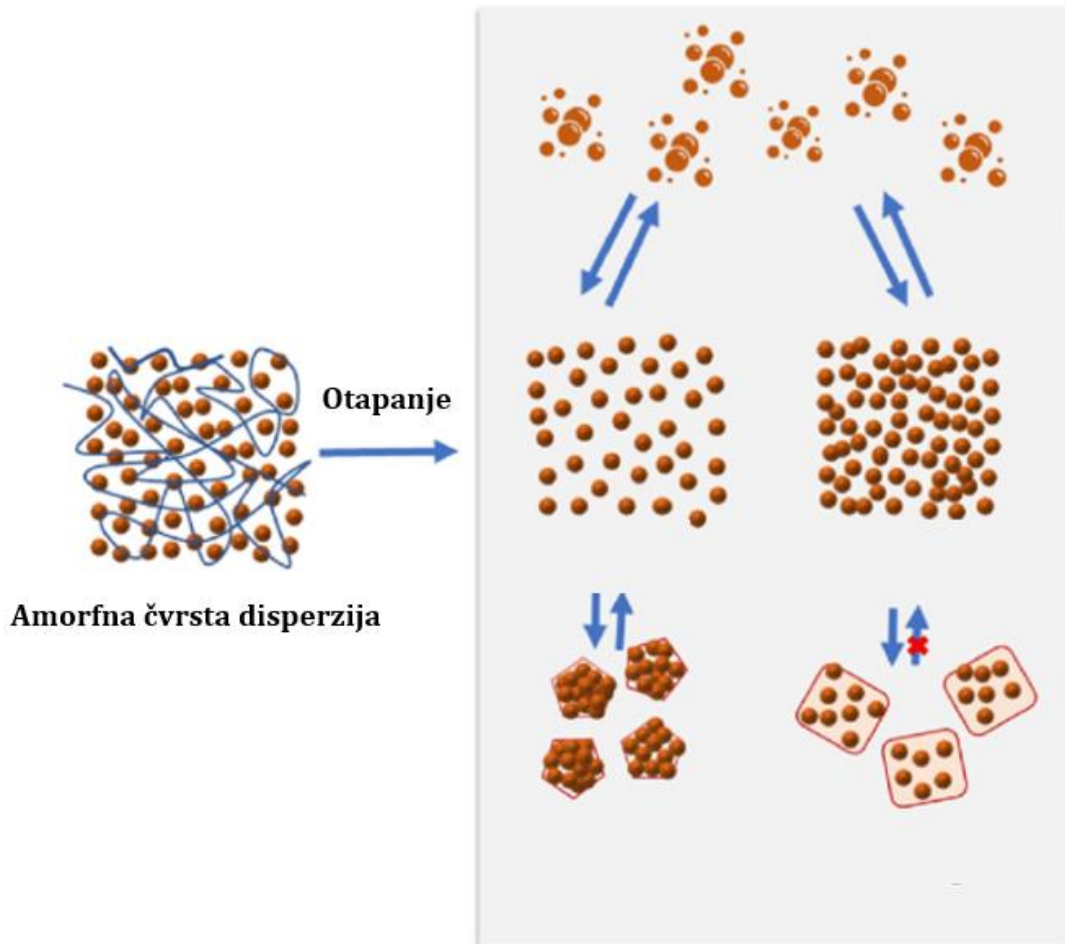
Topljivost tvari podrazumijeva sposobnost tvari da se otapa u određenom otapalu kako bi se dobila homogena smjesa, a može ovisiti o vrsti otapala, tlaku, temperaturi i pH vrijednosti. Već je spomenuto u radu da lijekovi sa slabom topljivosti u vodenom mediju zahtijevaju visoke doze kako bi se postigla željena koncentracija lijeka u sistemskej cirkulaciji, a to dovodi do smanjenja njihove učinkovitosti. Loša topljivost zapravo smanjuje bioraspoloživost, odnosno sposobnost gastrointestinalne apsorpcije lijeka. Ako je lijek topljiv u 250 mL ili manje vodenog medija, pri rasponu pH od 1 do 7,5 i temperaturi od 37 °C, smatra se da ima dobru topljivost.⁵ U svrhu mogućnosti razlikovanja djelatnih tvari po topljivosti i permeabilnosti, razvijena je BCS klasifikacija lijekova koja olakšava razumijevanje procesa oslobađanja djelatne tvari iz oralnih dozirnih oblika i njene intestinalne apsorpcije. BCS klasificira djelatne tvari u jednu od četiri skupine: u prvoj se skupini nalaze lijekovi s visokom topljivosti i permeabilnosti, drugoj skupini pripadaju lijekovi niske topljivosti i visoke permeabilnosti, treća skupina je suprotna drugoj te njoj pripadaju djelatne tvari visoke topljivosti i niske permeabilnosti, dok u četvrtu skupinu spadaju lijekovi niske topljivosti i permeabilnosti. Navedene skupine prikazane su u Tablici 1.⁹

Tablica 1. Prikaz BCS skupina

| BCS skupina | Topljivost | Permeabilnost |
|--------------------|-------------------|----------------------|
| I | Visoka | Visoka |
| II | Niska | Visoka |
| III | Visoka | Niska |
| IV | Niska | Niska |

Za poboljšanje topljivosti djelatnih tvari koriste se različite tehnike modifikacije. Iste se se mogu podijeliti u tri kategorije: fizikalne, kemijske i ostale. Fizikalne metode uključuju smanjenje veličine čestica, poput mikronizacije i nanosuspenzija, modifikaciju kristalne strukture, stvaranje disperzija lijeka u nosačima kao što su eutektične smjese i čvrste disperzije te primjenu kriogenih tehnika. Kemijske modifikacije obuhvaćaju promjenu pH vrijednosti, upotrebu pufera, derivatizaciju, kompleksaciju i formiranje soli. Ostale metode, koje ne spadaju niti pod kemijske niti fizikalne metode, su upotreba aditiva, procesi sa superkritičnim fluidima i slično.⁵ Čvrste disperzije imaju široku primjenu u poboljšanju brzine otapanja, topljivosti i oralne apsorpcije lijekova, a najčešće se koriste za lijekove druge skupine BCS klasifikacije. Koriste principe supramolekularne

interakcije i sastoje se od najmanje dva sastojka – djelatne tvari i polimernog nosača. Djelatna tvar dispergirana je unutar polimernog nosača na molekulskoj razini te su time ostvarene međumolekulske interakcije. Djelatna tvar posjeduje hidrofobna svojstva, dok je polimer hidrofilan. U dodiru s vodenim medijem, hidrofilni nosač se otapa, oslobađajući aktivnu tvar i time povećavajući brzinu oslobađanja i biorasploživost lijeka.^{5,10}

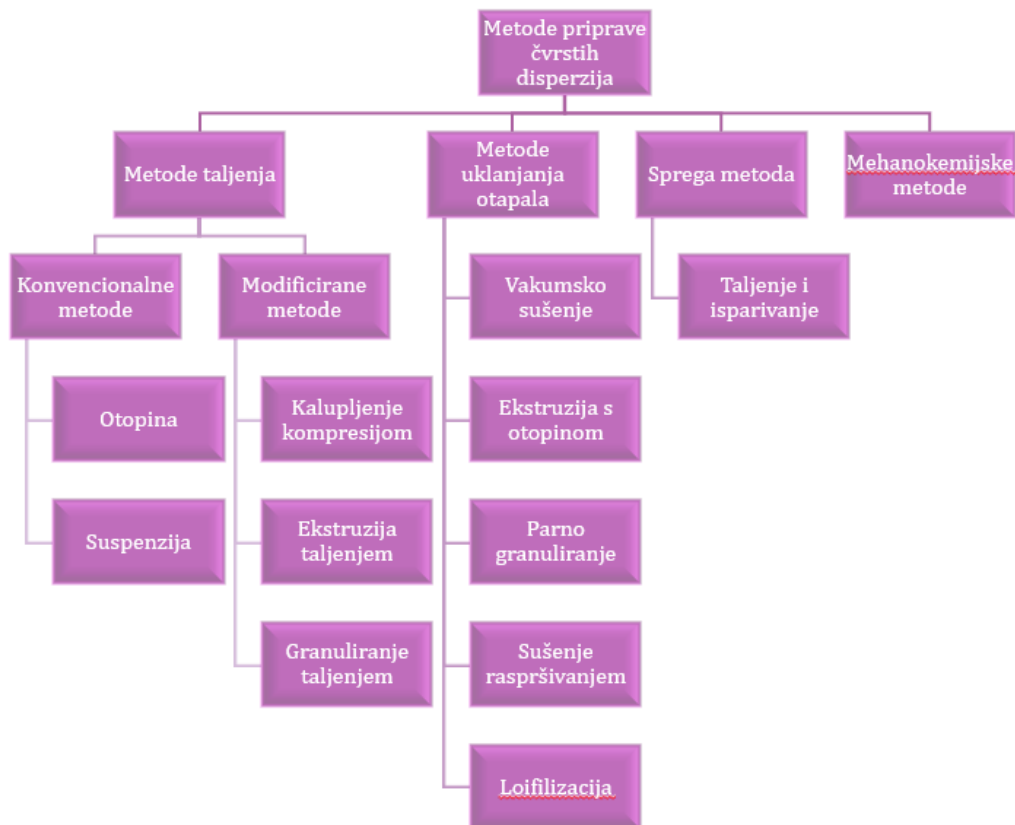


Slika 2. Prikaz otapanja čvrste disperzije u vodenom mediju

Čvrste disperzije mogu se podijeliti u tri generacije prema strukturi i svojstvima. Prva generacija obuhvaća disperzije s eutektičkim smjesama koje su nestabilne. Druga generacija priprema se s amorfnim nosačima i pokazuje bolju topljivost, iako može rezultirati rekristalizacijom. Treću generaciju karakterizira disperzija s nosačima koji djeluju kao površinski aktivne tvari, dajući pritom najbolje rezultate u pogledu topljivosti i stabilnosti.^{10,11}

Metode pripreme čvrstih disperzija podijeljene su u pet kategorija prikazanih na slici 3. Metode taljenja odnose se na taljenje djelatne tvari unutar nosača, a kao najveći

nedostaci istih navode se mješljivost lijeka i nosača, degradacija polimera i djelatne tvari zbog visokih temperatura. U svrhu rješavanja problema degradacije, uvedene su nove metode poput ekstruzije i granuliranja taljenjem te kalupljenje kompresijom. Kod metode uklanjanja otapala, djelatna tvari i nosač otapaju se u hlapljivom otapalu koje se naposljetku uklanja. Prilikom uklanjanja otapala pojavljuje se ekološki problem zbog toksičnosti otapala, kao i financijski troškovi. Sprega metoda taljenja i isparavanja koristi prednosti obje metode, gdje se otopljena djelatna tvar ugrađuje u rastaljeni nosač. Mehanokemijske metode koriste mehaničku energiju za pripravu čvrstih disperzija te ne koriste otapala, čime se smanjuju troškovi pripreme lijeka. U ovom istraživanju koristit će se mehanokemija u cilju dobivanja inkluzijskih kompleksa koji se formiraju umetanjem nepolarne molekule, tzv. *gosta*, u šupljinu druge molekule, *domaćina*.^{5,10,12}



Slika 3. Metode pripreve čvrstih disperzija

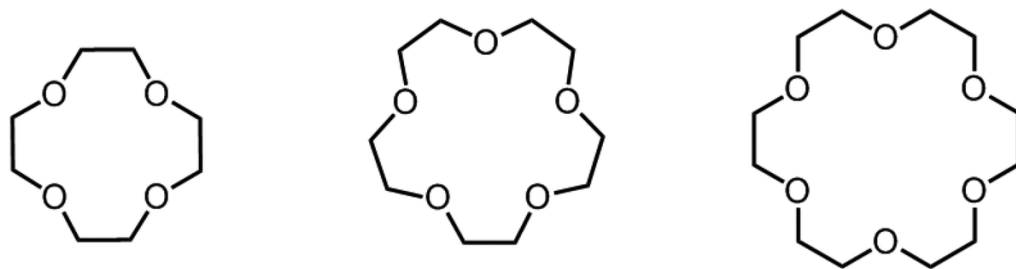
3.3. Priprava inkluzijskih kompleksa pomoću makrocikličkih receptora

Supramolekulska kemija je područje kemije koje proučava nekovalente interakcije između molekula, kao što su vodikove veze, van der Waalove sile i elektrostatika. Ove interakcije omogućuju formiranje složenih struktura koje imaju specifična svojstva i funkcije, a korisne su u raznim područjima poput farmaceutske industrije, molekularne biotehnologije i inženjerstva materijala. Enzimi, antitijela i virusi samo su neki od primjera supramolekulske kemije. Jednim imenom mogu se nazvati i supramolekulskim strojevima upravo zbog dizajna koji izvršava pokrete slične strojevima kao odgovor na vanjske podražaje. Inkluzijski kompleksi su specifične vrste supramolekulskih struktura koje se zasnivaju na interakciji domaćin-gost gdje molekula domaćin stvara šupljinu u koju se smješta druga molekula, gost, koja je često manja molekula. Ovaj fenomen je široko rasprostranjen u kemiji, osobito kompleksacija hidrofobnog gosta od strane makromolekularnih domaćina. Domaćin pruža zaštitu i stabilnu okolinu za molekulu gosta, mijenjajući njena fizička i kemijska svojstva. Primjena inkluzijskih kompleksa može rezultirati poboljšanjem topljivosti lijekova u vodenom mediju, stabiliziranjem reaktivnih spojeva, kontroliranim oslobađanjem aktivnih spojeva (poput mirisa i lijekova) te kontroliranjem selektivnosti reakcija.^{13,14,15}

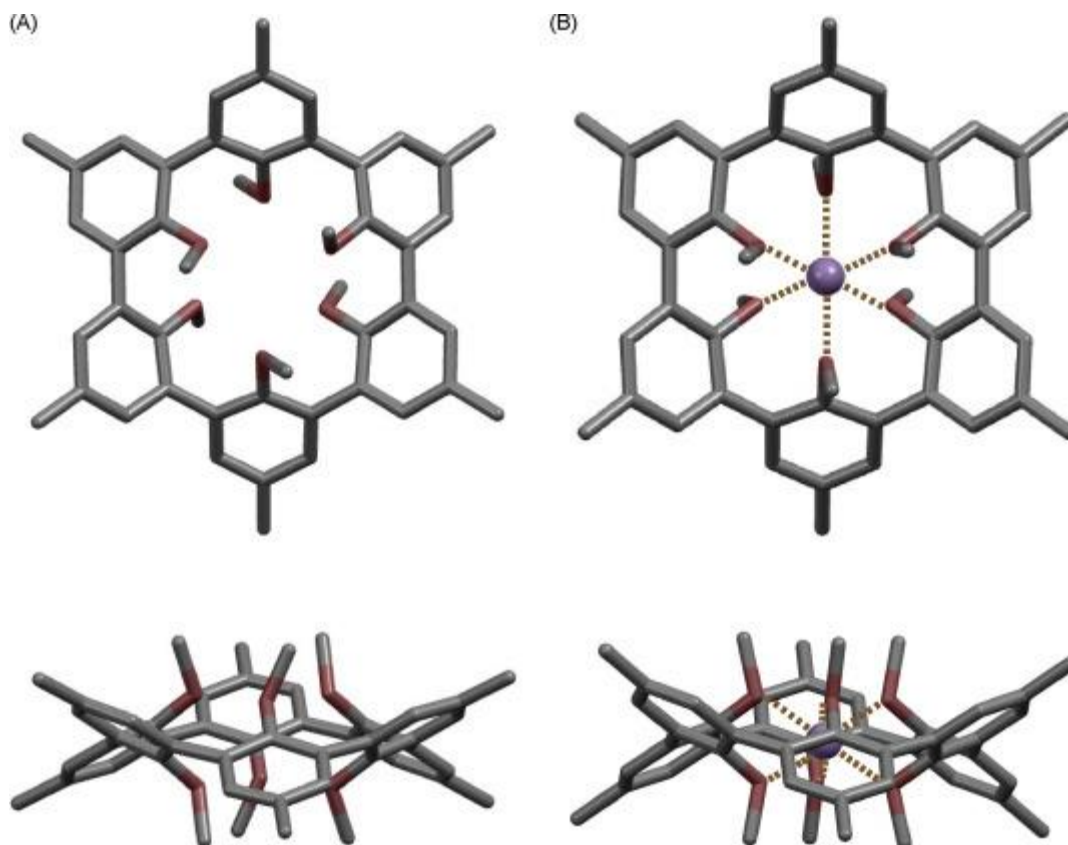
Postoji nekoliko metoda pripreme inkluzijskih kompleksa - koeksprecipitacija, metoda gnječanja, metoda superkritičnih fluida, metoda mikrovalnog zračenja, metoda sušenja raspršivanjem te metoda mljevenja. Koeksprecipitacijska metoda prikladna je za tvari koje nisu topljive u vodi. U ovoj metodi, otopina organskog otapala i gosta dodaje se u vodu s otopljenim domaćinom uz konstantno miješanje. Nakon toga, otopina se hladi pri čemu dolazi do kristalizacije i taloženja te se filtrat pere kako bi se uklonile slobodne gostujuće molekule s površine domaćina. Koeksprecipitacija je najkorištenija metoda zbog svoje jednostavnosti i učinkovitosti. Metoda gnječanja, odnosno metoda paste, zasniva se na miješanju i mljevenju domaćina uz dodatak pročišćene vode, čime se dobiva pasta. Gost se zatim dodaje u pastu uz temeljito miješanje, a dobiveni čvrsti materijal pere se s malom količinom otapala. U metodi superkritičnih fluida, domaćin i gost stavljaju se u autoklav koji je termostatiran i tlačen fluidom pri određenom tlaku i temperaturi. Zbog naglog pada tlaka, dolazi do isparavanja fluida i separiranja inkluzijskih kompleksa. Metoda mikrovalnog zračenja podrazumijeva miješanje gosta i domaćina u smjesi vode i otapala, koja se zatim stavlja u mikrovalnu pećnicu kako bi se dobio prah. Prah se čisti organskim otapalom i time se uklanjaju ostatci gostujućih molekula. Metoda sušenja

raspršivanjem sastoji se od tri koraka: atomizacije tekuće smjese gosta i domaćina, sušenja sitnih kapljica strujom zagrijanog zraka te odvajanja suhih čestica od struje zraka. Metoda mljevenja koristi mehaničku energiju kako bi se samljela smjesa gosta i domaćina. Ova metoda koristit će se u ovom radu, a detaljnije će biti objašnjena u poglavlju 3.4.¹⁶

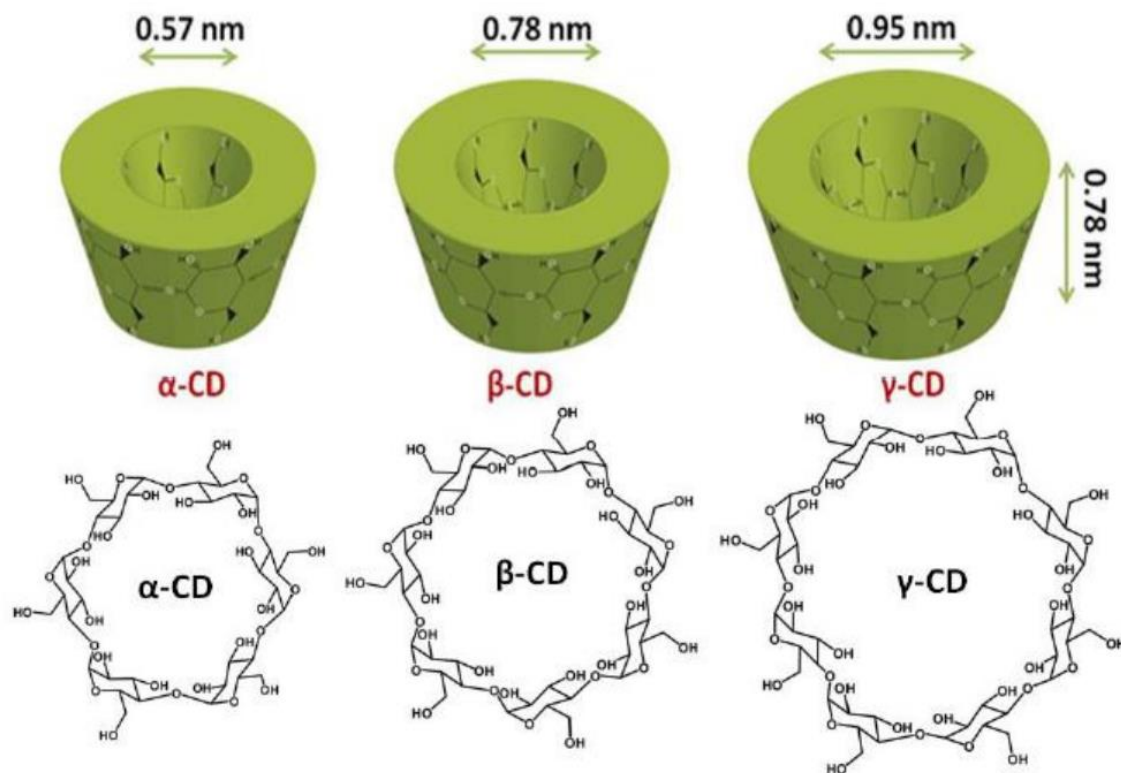
Da bi se dobio inkluzijski kompleks, potreban je domaćin koji u svojoj šupljini može smjestiti hidrofobnu molekulu gosta. Ovi receptori su ključni u supramolekularnoj kemiji zbog svoje sposobnosti selektivnog prepoznavanja i vezivanja gostujućih molekula. Imaju stupanj strukturne reorganizacije koji omogućava ključnim funkcionalnim skupinama interakciju preko proširenih veznih mjesta u proteinu, čime se smanjuje veliki gubitak entropije tijekom vezanja. Makrociklički receptori dijele se u četiri generacije s obzirom na konformaciju i veličinu šupljina te svaka nova generacija donosi poboljšanu strukturu, stabilnost i specifičnost vezivanja. Prvoj generaciji (slika 4) pripadaju krunasti makrociklički eteri koji su isprva korišteni kao medijatori prijenosa elektrona u redoks reakcijama, a njihova sposobnost selektivnog vezivanja metalnih kationa dovela je do široke primjene u molekularnom prepoznavanju i katalizi istih. Druga generacija omogućuje (slika 5) bolju reorganizaciju vezivanja gostujućih molekula te veće asocijacijske konstante. Njoj pripadaju kriptandi i sferandi koji pronalaze svoju primjenu u molekularnom prepoznavanju te se koriste u složenijim supramolekulskim strukturama i katalizi. Kaliksareni, ciklodekstrini, kriptofani i kukurbiturili predstavljaju složenije makrocikle s velikim šupljinama koje mogu udomiti veći raspon molekula od makrocikla druge generacije te zbog navedenog spadaju u treću generaciju (slika 6). Primjenjuju se u farmaceutskoj industriji, senzorskoj tehnologiji i složenim molekularnim prepoznavanjima. Ciklodekstrini i kukurbiturili također posjeduju hidrofobne unutrašnjosti koje omogućuju jače vezivanje nepolarnih molekula. Osim ion-dipolnih i vodikovih veza, treća generacija makrocikličkih receptora koristi i kation- π i C-H- π vezivanja. Četvrta generacija (slika 7) fokusira se na rigidnije strukture s naprednim interakcijama, povećavajući selektivnost i primjenu u naprednim tehnologijama kao što su elektronika i fotodinamička terapija, a u nju spadaju pilareni, porfirini i tetratiafulvaleni.^{15,17,18,19,20}



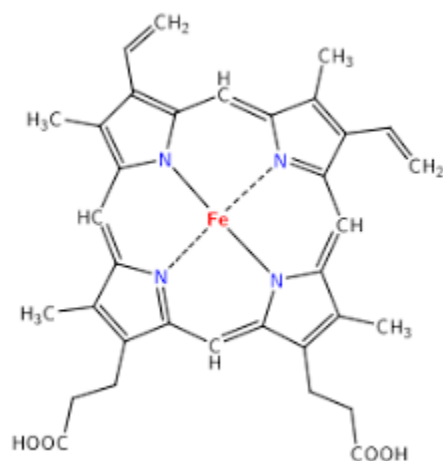
Slika 4. Primjer prve generacije markocikličkih etera - krunasti eteri (redom sa 4, 5 i 6 kruna)



Slika 5. Primjer druge generacije makrocikličkih receptora – sferandi



Slika 6. Primjer treće generacije makrocikličkih receptora – ciklodekstrini



Slika 7. Primjer četvrte generacije makrocikličkih receptora – porifin

Fizikalna i kemijska svojstva makrocikličkih receptora omogućuju im jedinstvenu sposobnost dostave lijekova i nukleinskih kiselina u organizam čovjeka. Geometrijske dimenzije makrocikličkih šupljina, poput promjera i visine, traže da je gostujuća molekula s kojom će tvoriti inkluzijski kompleks odgovarajuće veličine. Hidrofobna unutrašnjost šupljine omogućuje zadržavanje i oslobađanje djelatnih tvari putem hidrofobnih i van der Waalsovih interakcija, dok hidrofilna vanjska površina omogućuje funkcionalnost koja

reagira na podražaje kao što su pH i redoks mikrookruženja. Isto tako, makrocikličke strukture imaju prednost u odnosu na linearne strukture jer su propusnije kroz membrane, metabolički su stabilnije i bolja im je farmakokinetika. Stereokemijska složenost, organizirana struktura i funkcionalna raznolikost omogućuje im vezanje s većim afinitetom i selektivnošću za ciljeve nego što to mogu male molekule djelatne tvari. Unatoč svojoj veličini imaju dobru propusnost kroz staničnu membranu i bioraspoloživost što im omogućuje brži i lakši dolazak do unutarstaničnih ciljeva nakon oralne primjene lijeka. Makrocikli mogu poboljšati otapanje i topljivost djelatnih tvari. To potvrđuje albendazol čija se topljivost povećala 2000 puta nakon što je pripremljen inkluzijski kompleks s kukurbiturilom [8]. Prilikom poboljšanja topljivosti u vodenom mediju, makrociklički receptori ne mijenjaju stabilnost i sigurnost djelatne tvari. Štoviše, isti mogu poboljšati kemijsku i termičku stabilnost djelatne tvari.^{21, 22,23}

Ciklodekstrini su skupina cikličkih spojeva koji su otkriveni slučajno od strane francuskog znanstvenika Villiersa iz prirodnih spojeva 1891. godine, Oni su makrociklički oligosahardi sastavljeni od D-glukoza jedinica povezanih α -1,4-glukozidnim vezama. Poznati su po svojoj sposobnosti formiranja inkluzijskih kompleksa s različitim spojevima niske molekularne mase, od nepolarnih alifatskih molekula do polarnih amina i kiselina. Ciklodekstrini se sastoje od različitog broja glukoza, što određuje njihovu strukturu. Najčešće korišteni podtipovi su α -, β -, i γ -ciklodekstrini, koji se sastoje od šest, sedam i osam glukoza jedinica, redom.^{15,16,20,21}

Ciklodekstrini se, za razliku od drugih makrocikličkih molekula, proizvode iz amiloze i sastoje od glukoze pa su stoga topljivi u vodi i netoksični. Zbog navedenih razloga mogu se koristiti u ljudskom tijelu za dostavu lijekova. Posebno se koriste za inkapsulaciju antikancerogenih lijekova kao što su doksorubicin i paklitaksel, što dovodi do poboljšanja njihove topljivosti, stabilnosti i bioraspoloživosti.^{15,16,20,21}

3.4. Mehanokemijska priprava/sinteza

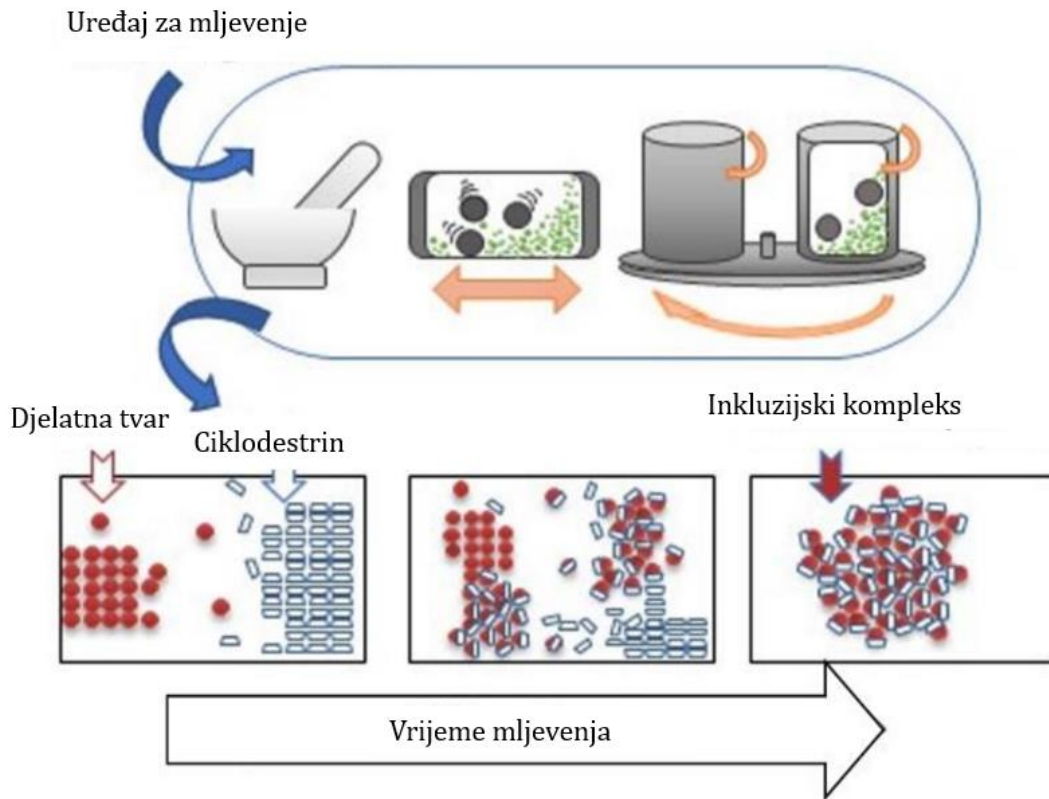
Mehanokemija obuhvaća fizikalne i kemijske transformacije i kemijske reakcije koje utječu na tvari nakon primjene mehaničke energije. Glavni učinak mehaničkog djelovanja je usitnjavanje čestica čime se dovodi do promjene fizikalno-kemijskih svojstava čvrstih materijala. Mehaničko djelovanje može proizvesti radikale, stvoriti aktivna mjesta ili generirati nove aktivne površine te formirati nove veze, rezultirajući

povećanjem reaktivnosti materijala. Mehanokemija svoju najveću prednost pokazuje kod čvrstih tvari koje nisu topljive – primjerice, u slučaju kad se žele eliminirati opasna otapala. Odsustvo otapala, precizna kontrola nad stehiometrijom i selektivnije reakcije koje omogućuju pojednostavljene postupke obrade karakteristični su faktori koji označavaju superiornost mehanokemijskih procesa nad kemijom koja se temelji na otopinama te usklađenost s principima zelene kemije. Mehanokemijski procesi priznati su od strane Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) kao jedna od deset najperspektivnijih novih tehnologija u kemiji. Omogućuju provedbu reakcija bez otapala, čime se smanjuje upotreba opasnih kemikalija i energije, što je u skladu s načelima zelene kemije i održivosti. Mehanokemija svoju primjenu nalazi u sintezi raznih organskih i anorganskih spojeva, mehaničkom legiranju materijala te farmaceutskoj industriji.^{24,25,26}

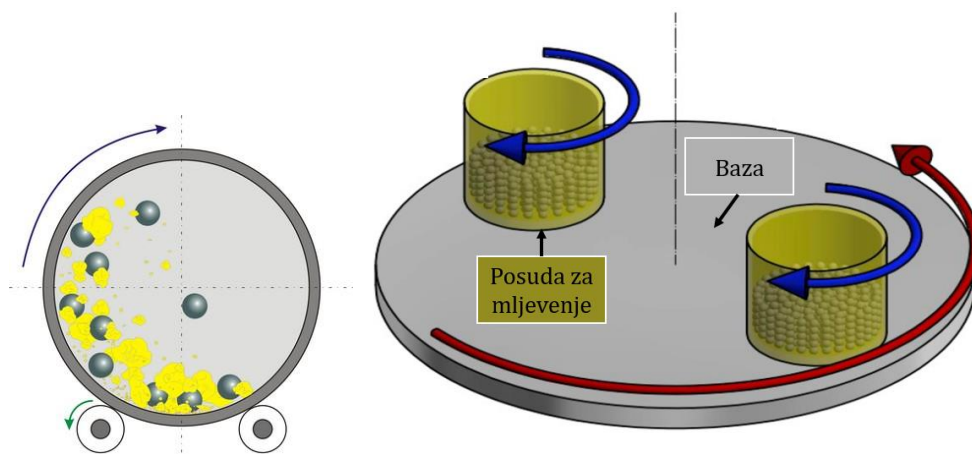
Mehanokemija se koristi u pretraživanju novih farmaceutskih oblika, ciljanoj sintezi i transformacijama djelatnih tvari. Primjena mehanokemije u farmaceutskoj industriji, posebno u dostavi lijeka, ima značajne prednosti i nedostatke. Mehanokemijska aktivacija čvrstih lijekova putem mljevenja poboljšava njihovu bioraspodivnost, bez potrebe za upotrebom otapala. Ovaj pristup je posebno koristan za lijekove s niskom topljivošću u vodi, koji inače mogu imati poteškoće s propusnošću. Kroz eksperimentalne alate i matematičko modeliranje dinamike mljevenja, mogu se optimizirati uvjeti mljevenja radi postizanja željenih svojstava aktiviranog sustava. Rezultati aktiviranih sustava mogu se testirati kako *in vitro*, tako i *in vivo*, što omogućuje procjenu njihove učinkovitosti. Sveukupno, mehanokemijska aktivacija predstavlja važan alat u poboljšanju dostave lijekova i biološke raspoloživosti, pružajući alternativu tradicionalnim metodama koje mogu biti skuplje i složenije.^{27,28}

Mehanokemijska aktivacija mljevenjem koristi se kao metoda za pripravu inkluzijskih kompleksa jer je brza i učinkovita, a svoju ekološku prihvatljivost potvrđuje nekorištenjem otapala. Vrste mljevenja koje mogu inducirati mehanokemijske reakcije su ručno mljevenje (mužar, tarionik), planetarni kuglični mlinovi i oscilirajući ili vibracijski mlinovi. U ovom istraživanju za dobivanje inkluzijskih kompleksa koristi se proces finog mljevenja u planetarnom kugličnom mlinu bez primjene otapala. Trenutno ne postoji poznat mehanizam koji objašnjava stvaranje kompleksa pri mljevenju smjese lijekova i makrocikličkih receptora. Hasa i Jones predložili su trostupanjski mehanizam u kojem se, tijekom prvog koraka, smanjuje veličina čestica i stvaraju se defekti u kristalnoj strukturi, a mehanokemijski aktiviraju površine reaktanata. U drugom koraku dolazi do stvaranja

kompleksa na površini reaktanata. Tijekom trećeg koraka odvajaju se formirani kompleksi s površine reaktanata tijekom mljevenja i stvaraju se čestice proizvoda. Kako bi se bolje razumjeli koraci mljevenja na primjeru ciklodekstrina i djelatne tvari, proces je prikazan na slici 8.²⁹



Slika 8. Prikaz koraka prilikom mehanokemijske pripreme inkluzijskih kompleksa



Slika 9. Prikaz rotacije baze i posude planetarnog mlina

Planetarni mlinovi sastavljeni su od rotirajuće kružne baze oko svoje glavne osi simetrije, koja nosi jednu ili više ekscentrično postavljenih posuda za mljevenje (slika 9). Posude se mogu rotirati u istom ili suprotnom smjeru u odnosu na bazu, što stvara složene rotacijske pokrete kuglica za mljevenje. Razlika u brzinama između kuglica i posuda generira kombinaciju sila trenja i udara koje oslobađaju mehaničku energiju. Ova sinergija sila omogućava visoku i učinkovitu redukciju veličine čestica te mehanokemijsku aktivaciju obrađene smjese makrocikličkog kompleksa i djelatne tvari. Planetarni mlinovi su dostupni za laboratorijsku i pilot-proizvodnju, a posude i kuglice za mljevenje mogu biti izrađene od raznih materijala.³⁰

Radi postizanja što bolje iskoristivosti procesa mljevenja za pripremu inkluzijskih kompleksa, potrebno je razumijevanje i kartoniranje procesnih varijabli. Općenito, maseni unos gosta i domaćina u procesni prostor, vrijeme mljevenja, temperatura mljevenja i volumen posude za mljevenje smatraju se najvažnijim procesnim parametrima. Utjecaj navedenih varijabli povezan je s vrstom odabranog mlina. Kod planetarnih kugličnih mlinova, kontrola vremena mljevenja i broj okretaja su konstantni, dok je temperaturu teže kontrolirati u skladu s činjenicom da se posude za reakciju zagrijavaju zbog sudara tijekom procesa. Varijable koje utječu na temperaturu uključuju punjenje posuda, volumen kuglica za mljevenje, veličinu uzorka i posude te broj okretaja. Više okretaja ubrzava kuglice, povećavajući njihovu energiju, dok duže vrijeme mljevenja povećava energetske unos. Međutim, prijenos energije pri sudaru ne može se direktno kontrolirati i ovisi o faktorima poput volumena kuglica, punjenja posuda (tj. veličine serije), materijala pribora za mljevenje i drugo.³⁰

4. METODIKA

4.1. Djelatna tvar – aktivni sastojak lijeka

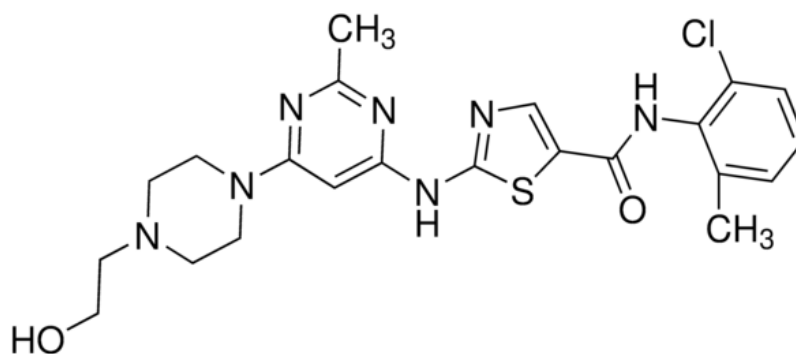
U ovom istraživanju, koristi se dasatinib kao djelatna tvar. Djelatna tvar predstavlja aktivni sastojak lijeka koji posjeduje specifična farmakološka svojstva. Dasatinib se koristi za liječenje kronične mijeloične i akutne limfoblastične leukemije, dvostruki je inhibitor proteinskih kinaza, a na tržištu je dostupan kao čvrsti oralni dozirni oblik. Osim toga, istraživanja su pokazala da može imati potencijalnu primjenu i u drugim područjima medicine, poput neuromuskularnih bolesti, što ukazuje na njegov širi terapijski potencijal.^{31,32}

Dasatinibova molekularna formula je $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$, strukturna formula je prikazana na slici 10, a svojstva u tablici 2. Karakteriziran je kao spoj niske topljivosti u vodenom mediju i visoke propusnosti što ga stavlja u II. skupinu BCS klasifikacije. ApSORpcija lijeka postiže se unutar 0.5 do 3 sata, s procijenjenim rasponom bioraspoloživosti od 14 % do 34 % doze.^{32,33}

Molekula dasatiniba sastoji se od devet akceptora vodikove veze i tri donora vodikove veze koji su sposobni formirati vodikove veze. Donori vodikovih veza u dasatinibu su hidroksilna skupina (-OH), amino skupina (-NH) i amino skupina u piperazinskom prstenu (-NH). Akceptori su kisik u karbonilnoj skupini (-C=O), kisik u hidroksilnoj skupini (-OH), dušik u pirimidinskom prstenu i dušik u tiazolskom prstenu.³⁴

Tablica 2. Prikaz svojstva dasatiniba

| Svojstvo | Opis |
|------------------------|-------------------------|
| Molekulska masa | 488 g mol ⁻¹ |
| Izgled | Bijeli prašak |
| Topljivost u vodi | 8 µg mL ⁻¹ |
| Biološka raspoloživost | 14 - 34 % |
| BCS klasifikacija | II. skupina |

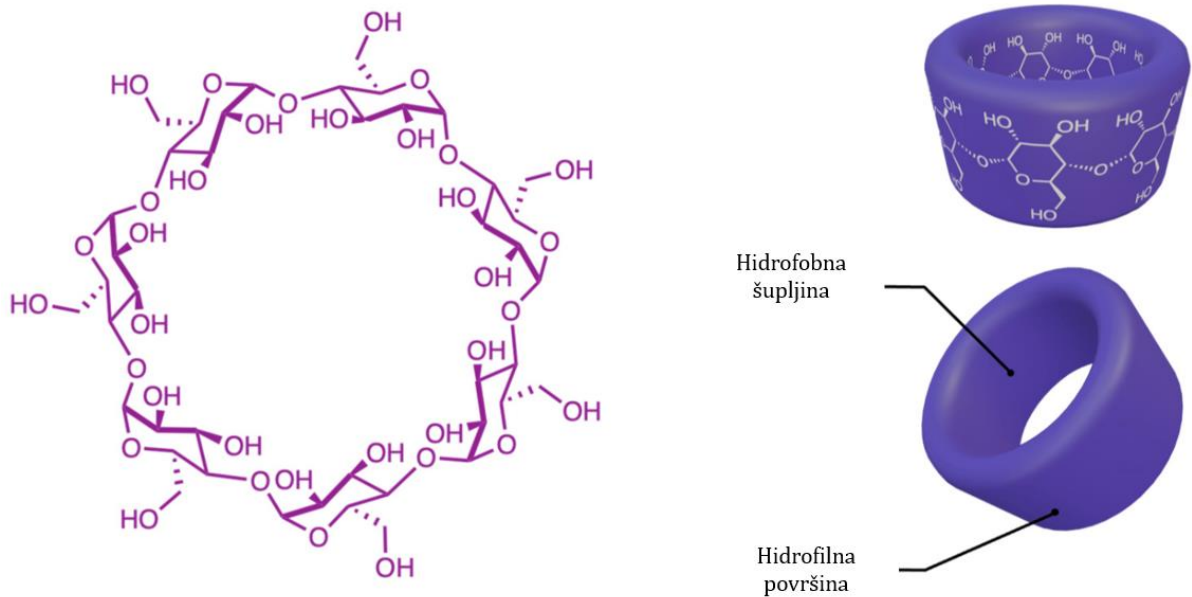


Slika 10. Struktura dasatiniba

4.2. Makrociklički receptor - β -ciklodekstrin

Trodimenzionalna struktura ciklodekstrina može se smatrati molekularnim spremnikom u obliku skraćenog stošca s hidrofobnom unutarnjom šupljinom i hidrofilnom vanjskom površinom. Ciklodekstrini imaju sposobnost uhvatiti ili inkapsulirati goste odgovarajuće veličine s različitim afinitetima vezivanja putem hidrofobnih, van der Waalsovih i vodikovih veza. Zahvaljujući visokoj stabilnosti, izvrsnoj biokompatibilnosti i jednostavnoj modifikaciji osnovne strukture, razni derivati ciklodekstrina i sustavi na bazi ciklodekstrina koriste se u biomedicini i farmaceutskoj industriji. Posebno je važna njihova netoksičnost za ljude, što je omogućilo odobrenje nekoliko farmaceutskih proizvoda koji ih sadrže od strane regulatornih agencija poput FDA-a (engl. *Food and Drug Administration*) i EMA-a (engl. *European Medicines Agency*). Ciklodekstrini se posebno koriste kao nositelji za inkapsulaciju antikancerogenih lijekova kao što su doksorubicin, paklitaksel i kamptotecin, što je rezultiralo poboljšanjem njihove topljivosti, stabilnosti i bioraspoloživosti.^{15,16,20,22}

U ovom istraživanju, koristi se β -ciklodekstrin (BCD) koji se sastoji od sedam D-glukoza jedinica. BCD je idealan domaćin za većinu farmaceutskih lijekova zbog odgovarajuće veličine šupljine (6 Å - 7 Å). Najčešće je korišten ciklodekstrin i svoju primjenu nalazi u poboljšanju različitih svojstava lijekova, poput topljivosti, brzine otapanja, stabilnosti i bioraspoloživosti. BCD ima sposobnost uspostavljanja vodikovih veza između hidroksoilnih grupa i odgovarajućih funkcionalnih grupa na gostujućim molekulama.^{35, 36}



Slika 11. Strukturna formula β -ciklodekstrina

4.3. Pomoćne tvari – ekscipijenti

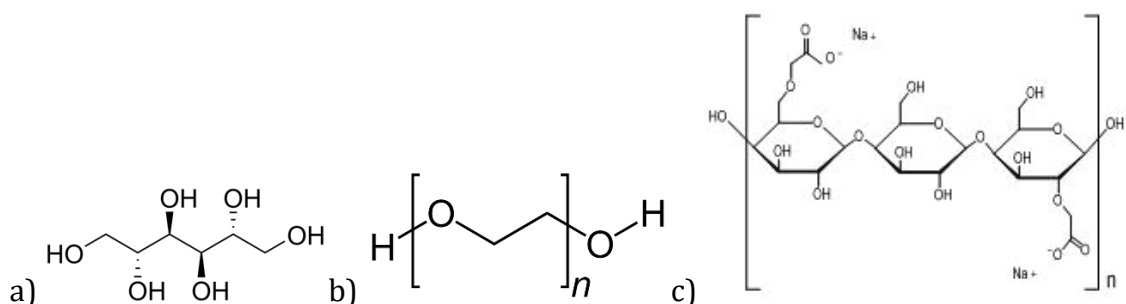
Svaki farmaceutski proizvod sastoji se od djelatne tvari koja je pomiješana s pomoćnim tvarima kako bi osigurali da djelatna tvar stigne na željeno mjesto djelovanja unutar tijela. Ekscipijenti imaju ograničeno farmakološko djelovanje, za razliku od djelatne tvari. Svaki služi određenoj svrsi za pravilno funkcioniranje dozirnog oblika. Koriste se za stabilizaciju lijeka, povećanje volumena dozirnih oblika i za bolje farmakoterapijsko djelovanje. Svojstva konačnog proizvoda uvelike ovise o odabranim dodacima, njihovim koncentracijama i interakcijama s aktivnim spojevima i međusobno. Manitol, poli(etilen-glikol) i natrijeva kroskarmeloza ekscipijenti su korišteni u ovom istraživanju.³⁷

Zbog svoje niske higroskopnosti, jake inertnosti prema djelatnim tvarima i tijelu pacijenta i povoljnih svojstava tabletiranja, manitol se koristi kao vezivo i punilo pri izradi tableta. Prednost mu je što ne povećava razinu glukoze u krvi kao druga punila kao što su fruktoza ili laktoza. Ovo niskokalorično sladilo u ovom istraživanju daje voluminoznost napravljenim tabletama, odnosno služi kao punilo.³⁸

Poli(etilen-glikol) ima nekoliko primjena u farmaceutskoj industriji. Može se koristiti za povećanje topljivosti određenih djelatnih tvari, kao laksativ ili kao ekscipijent. Kao neaktivni sastojak svoju primjenu pronalazi kao otapalo, plastifikator, surfaktant,

baza za masti i supozitorije, kao lubrikant za tablete i kapsule te kao vezivo što će mu biti funkcija u ovom radu.³⁹

Natrijeva kroskarmeloza je farmaceutski pomoćni sastojak koji ima široku primjenu zbog svoje učinkovitosti u oralnim čvrstim dozirnim oblicima, kompatibilnosti s velikim brojem djelatnih tvari te prikladnosti za izravnu kompresiju, granuliranje, kompaktiranje i punjenje. U ovom istraživanju služi kao sredstvo za raspadanje i pomaže kao bi bioraspoloživost bila bolja. Kada je u kontaktu s vodom, bubri čime poboljšava raspadanje tablete i omogućuje bolji kontakt djelatne tvari s tjelesnim tekućinama.⁴⁰



Slika 12. Strukturne formule ekscipijenta:

a) manitol, b) poli(etilen-glikol), c) natrijeva kroskarmeloza

4.4. Mehanokemijska priprava/sinteza inkluzijskih kompleksa

4.4.1. Priprava mješavine

Početak ovog istraživanja počinje pripremom mješavine djelatne tvari, dasatiniba, i makrocikličkog receptora BCD.

Priprema mješavine podrazumijevala je vaganje određenih masa dasatiniba i BCD kako bi se postigli maseni omjeri DAS:BCD 1:1 i 1:2. Nakon vaganja, djelatna tvar i makrociklički receptor stavljeni su u posudu od cirkonijevog oksida koja se koristila u planetarnom mlinu. Mase vaganih komponenti i njihovi omjeri prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Omjer i mase korištene za pripravu mješavine

| Uzorak | Omjer DAS : BCD | <i>m</i> (DAS), mg | <i>m</i> (BCD), mg |
|--------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| DAS:β-CD 1:1 | 1:1 | 500 | 333 |
| DAS:β-CD 1:2 | 1:2 | 500 | 667 |

4.4.2. Postupak mljevenja u planetarnom kugličnom mlinu

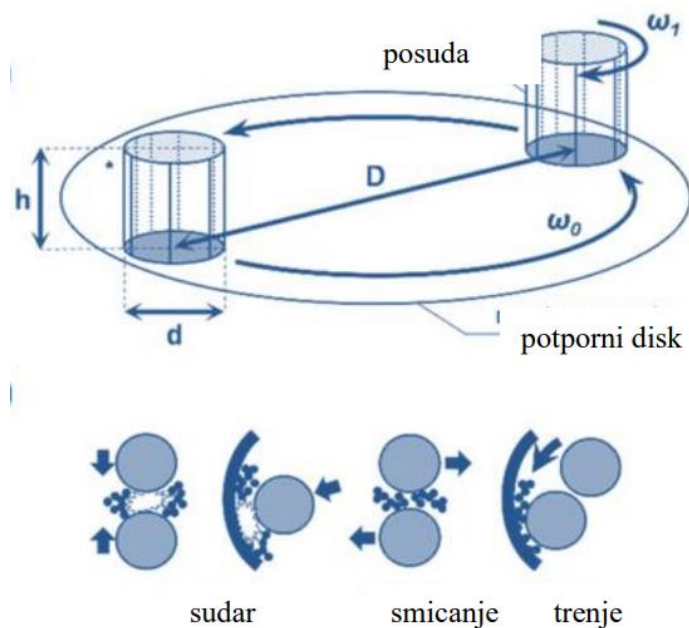
Planetarni kuglični mlin korišten je za mehanokemijsku pripravu inkluzijskih kompleksa i prikazan je na slici 13.



Slika 13. Fotografija planetarnog kugličnog mlina Pulverisette 6 (FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, SR Njemačka)

Pogonski mehanizam u planetarnom kugličnom mlinu, u isto vrijeme okreće posudu smještenu na rotirajući disk oko vlastite osi i oko podloge. Kuglice za mljevenje se kreću u jednom trenutku uz unutarnju stijenkku posude, a zatim udaraju u suprotnu stranu zbog centrifugalne sile. To je rezultat okretanja posude i diska u suprotnim smjerovima. U planetarnom mlinu do mljevenja dolazi zbog trenja, smicanja i sudara koji su prikazani na slici 14.⁴¹

Kako ne bi došlo do onečišćenja produkta habanjem posude, potrebno je odabrati materijal iste koji ima veliku tvrdoću. Također, posuda i kuglice za mljevenje moraju biti od istog materijala kako ne bi došlo do prevelikog trošenja. Neki od materijala koji se mogu koristiti za izradu posuda i kuglica su nehrđajući čelik, ahat, volframov karbid, aluminijev oksid, teflon, cirkonijev oksid i drugi. U ovom istraživanju korištena je posuda i 10 kuglica približno iste veličine od cirkonijevog oksida.⁴¹



Slika 14. Shematski prikaz planetarnog kugličnog mlina (gore) te sila i naprezanja do kojih dolazi (dolje)

Kako bi se dobivene mješavine podvrgnule mljevenju, potrebno je odrediti procesne uvjete uz već spomenutu posudu i tijela za usitnjavanje od cirkonijeva oksida. Odabrani su sljedeći uvjeti: 500 okretaja po minuti u vremenskom periodu od jednog sata. Nakon što je mljevenje završeno, potrebno je prikupiti produkt mljevenja te ga spremi u za to predviđenu bočicu. Uvjeti rada su tablično prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeri rada planetarnog kugličnog mlina

| Uvjeti | Iznos |
|-----------------------------|------------------------------|
| Masa uzorka | 1 g |
| Materijal posude i kuglica | Cirkonijev oksid (ZrO_2) |
| Vrijeme mljevenja | 60 min |
| Broj okretaja | 500 min^{-1} |
| Broj kuglica | 10 |
| Prosječna masa kuglice | 1,6962 g |
| Masa kuglica (ukupno) | 16,9618 g |
| Omjer mase smjese i kuglica | 1:17 |

4.5. Karakterizacija mehanokemijski pripremljenih uzoraka

Pripremljeni inkluzijski kompleksi karakterizirani su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama, rendgenskom difrakcijskom analizom praha te nuklearnom magnetskom rezonancijom.

4.5.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (eng. *Differential Scanning Calorimetry, DSC*) podrazumijeva termičku analizu koja mjeri kako se fizička svojstva uzorka mijenjaju s temperaturom tijekom vremena. Odnosno, određuje temperaturu i toplinski tok povezan s prijelazima materijala kao funkciju vremena i temperature. Tijekom promjene temperature, mjeri se razlika između uzorka i referentnog materijala.⁴²

Postoje dvije vrste DSC uređaja i dijele se na DSC s kompenzacijom snage i DSC s toplinskim tokom. U DSC-u s kompenzacijom snage, uzorak i referentna posuda stavljaju se u dvije zasebne peći koje se zagrijevaju na zasebnim grijačima, Uzorak i referentna posuda održavaju se na istoj temperaturi. Razlika u toplinskoj snazi potrebnoj za održavanje iste temperature mjeri se i prikazuje se kao funkcija temperature o vremenu.⁴²

Kod DSC analize toplinskog toka, uzorak i referentna posuda stavljaju se u na termodinamički disk koji je okružen peći. Peć se zagrijava linearnom brzinom, a toplina se prenosi na uzorak i referentnu posudu kroz termoelektrični disk. Razlike u toplinskom kapacitetu (C_p) uzorka i referentnih posuda uzrokuje i razliku temperature koja se mjeri pomoću termoparova. Rezultirajući toplinski tok određuje se pomoću Ohmovog zakona:

$$q = \frac{\Delta T}{R}$$

Gdje q označava toplinski tok, ΔT temperaturnu razliku između uzorka i referencije i R otpornost termoelektričnog diska.⁴²

DSC analiza omogućuje praćenje faznih transformacija i termodinamičkih parametara tijekom kontroliranog ciklusa zagrijavanja i hlađenja materijala. Također, služi kako bi se pratile termičke i oksidativne stabilnosti materijala, reakcije otvrdnjivanja, fazne mješavine i kompatibilnost polimernih mješavina. DSC analizom mogu se odrediti temperature staklastog prijelaza polimera, kristalizacije i taljenja, postotak kristalnosti polimera, specifični toplinski kapacitet, kinetika i brzina reakcije, termička stabilnost materijala itd. Pogodna je za analiziranje svih vrsta materijala kao što su polimeri, metali, anorganski materijali, keramike i drugi.⁴³

U ovom eksperimentalnom radu ispitivanja toplinskih svojstava mehanokemijski pripremljenih inkluzijskih kompleksa provedena su na uređaju prikazanom na slici 15. Masa uzoraka DAS: β -CD 1:1 i DAS: β -CD 1:2 iznosila je 5 mg te su vagani u aluminijske posudice s probušenim poklopcem. Mjerenja su provedena u struji dušika 60 mL s^{-1} , a uzorci su bili zagrijavani od $0 \text{ }^\circ\text{C}$ do $360 \text{ }^\circ\text{C}$ brzinom od $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Rezultati mjerenja su DSC termogrami.



Slika 15. Fotografija diferencijalnog pretražnog kalorimetra Mettler Toledo 822e (Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska)

4.5.2. Rendgenska difrakcijska analiza praha

Rendgenska difrakcijska analiza (eng. *X-ray diffraction, XRD*) određuje sastav uzorka ili kristalnu strukturu. Za veće kristale, poput makromolekula i anorganskih spojeva, može se koristiti za određivanje atomske strukture. Za manje kristale, tehnika može odrediti sastav uzorka, kristalnost i faznu čistoću.⁴⁴

Ova metoda koristi rendgenske zrake jer njihova valna duljina odgovara razmaku između atoma u uzorku. Rendgenske zrake prolaze kroz uzorak i difraktiraju se pod određenim kutom, θ . Neki difraktirani snopovi međusobno se poništavaju, ali ako zrake imaju slične valne duljine, dolazi do konstruktivnih smetnji, gdje se zrake zbrajaju i stvaraju snop s većom amplitudom, što rezultira jačim signalom za taj kut difrakcije.⁴⁴

Kut difrakcije koristi se za određivanje razmaka između atomskih ravnina pomoću Braggovog zakona:

$$\sin \theta = \frac{n\lambda}{2d}$$

gdje je λ valna duljina, θ kut difrakcije, a d razmak između atomskih ravnina. Taj razmak se potom koristi za određivanje sastava ili kristalne strukture uzorka.⁴⁴

Rendgenska difrakcija praha (XRPD) je metoda pri kojoj se zraka karakterističnog rendgenskog zračenja usmjerava na ravnu površinu fino usitnjenog materijala smještenog u nosač uzorka. Pri analizi se koristi difraktometar kojim se mjeri intenzitet difraktiranog zračenja mijenjajući upadni kut zračenja (2θ). Rezultat mjerenja difraktometrom je difraktogram koji je grafički prikaz ovisnosti intenziteta difraktiranog zračenja o difrakcijskom kutu. XRPD se koristi za analizu kristaličnih uzoraka jer svaka kristalična tvar ima jedinstveni uzorak difrakcije iz kojeg se može izvesti porijeklo karakterističnog seta ravnina u kristalnoj rešetci. Može se dokazati i prisutnost amorfne faze ako se poveća intenzitet dijela krivulje na difraktogram.⁴⁵

U ovom eksperimentalnom radu identifikacija kristalnih faza u uzorcima provedena je rendgenskom difrakcijom praha na uređaju prikazanom na slici 16. Identifikacija je provedena s $\text{Cu-K}\alpha$ zračenjem valne duljine $\lambda = 1,5 \text{ \AA}$ uz napon od 40 kV i jakost struje od 30 mA.



Slika 16. Fotografija uređaja za rendgensku difrakciju XRD 600
(Shimadzu, Kyoto, Japan)

4.5.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

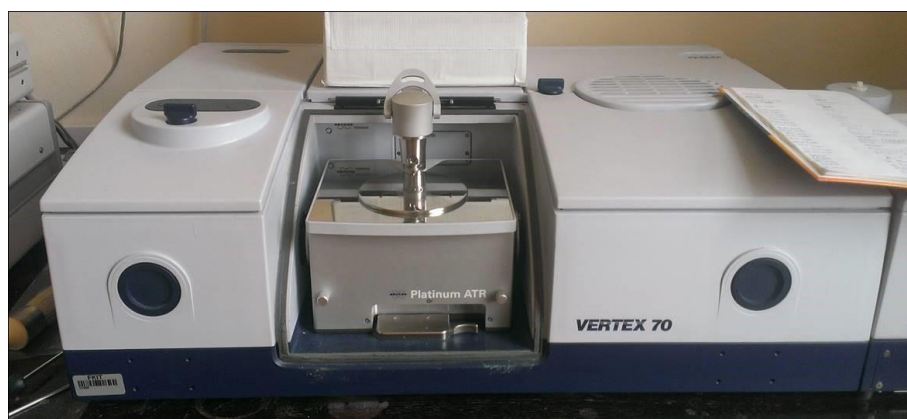
Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier Transform Infrared Spectrometry, FTIR*) jedna je od najčešće korištenih tehnika kemijske analize i dostupna je u mnogim laboratorijima. Ova tehnika pruža informacije o molekularnim vibracijama i omogućuje identifikaciju funkcionalnih skupina, što je čini

moćnim alatom za identifikaciju kemijskih komponenti, molekula i molekularnih segmenata.⁴⁶

Infracrvena spektroskopija temelji se na apsorpciji infracrvenog zračenja od strane uzorka. Infracrveni spektar, koji prikazuje skupinu apsorpcijskih vrpca nacrtanih kao intenzitet apsorpcije ili transmitancije u odnosu na frekvenciju (valni broj), pruža informacije o strukturi i vezama u molekuli, budući da različite valni brojevi predstavljaju različite funkcionalne skupine. Infracrveni spektar je spektar molekularne vibracije. Kada su izložene infracrvenom zračenju, molekule uzorka selektivno apsorbiraju zračenje određenih valnih duljina, što uzrokuje promjenu dipolnog momenta molekula uzorka. Posljedično, vibracijske energetske razine molekula uzorka prelaze iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje. Infracrveni spektar nepoznatog spoja služi kao njegov otisak prsta i može se usporediti s referentnim spektrima iz literature kako bi se identificirale kemijske veze i molekularna struktura.⁴⁶

FTIR se često koristi za identifikaciju različitih organskih spojeva, ali se može koristiti i za anorganske materijale poput različitih minerala ili metala. Pomoću IR spektroskopije mogu se analizirati kapljevine i krutine, a analiza se provodi pri atmosferskom tlaku, što je korisno za neke uzorke u usporedbi s metodama ultravisokog vakuuma.⁴⁶

FTIR spektroskopija korištena je u ovom istraživanju kako bi se detektirale potencijalne interakcije između DAS i BCD. Za tu je priliku korišten FTIR spektrofotometar Vertex 70 s platinastim detektorom prikazan na slici 17.



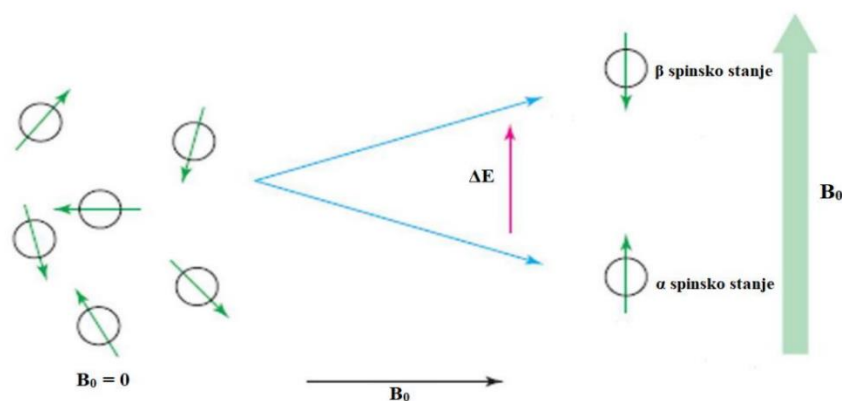
Slika 17. Fotografija FTIR spektrometra Vartex 70 s platinastim detektorom (Bruker, Billerica, SAD)

4.5.4. Nuklearna magnetska rezonancija

Nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) je vrsta spektroskopije kojom se određuje kvaliteta i čistoća uzorka kao i molekularna struktura kemijskog spoja. Ona se temelji na nuklearnoj magnetskoj rezonanciji atoma uzorka koji se ispituje. NMR spektroskopija se primjenjuje pri proučavanju različitih jezgara kao što su ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P , a za organske molekule najkorisnije su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopija.^{47,48}

NMR spektroskopija se temelji na nuklearnoj magnetskoj rezonanciji, fenomenu gdje atomske jezgre apsorbiraju i emitiraju elektromagnetsko zračenje u prisutnosti jakog magnetskog polja. U središtu NMR spektroskopije nalazi se koncept nuklearnog spina koji predstavlja temeljna svojstva atomskih jezgara. Kada su smještene u magnetskom polju (B_0), jezgre s neparnim brojem protona ili neutrona pokazuju spin i stvaraju magnetski moment. U odsustvu vanjskog magnetskog polja, ti magnetski momenti su nasumično orijentirani. Međutim, pod utjecajem B_0 , oni se usklađuju ili paralelno (α stanje, niža energija) ili antiparalelno (β stanje, viša energija) ovisno o smjeru polja. Razlika u energiji između α i β stanja ovisi o jakosti vanjskog magnetskog polja (B_0) i žiromagnetskom omjeru (γ) određene jezgre. Ova energijska razlika može se izraziti formulom: ^{47,48}

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$$



Slika 18. Prikaz spinskih stanja protona bez i u prisustvu vanjskog magnetskog polja B_0

Primjenom radiofrekvencijskog impulsa koji odgovara energetskej razlici između α i β stanja, jezgre se mogu dovesti do viših energetskej razina. Naknadno opuštanje u niže energetskej stanje rezultira emisijom radiofrekvencijskog zračenja, koje se detektira i bilježi kao NMR spektar. Frekvencija emitiranog zračenja izravno korelira s jakosti magnetskog polja (B_0) i pruža dublje uvide u molekularno okruženje i strukturu. ^{47,48}

Centralna karakteristika NMR spektara je kemijski pomak, izražen u dijelovima po milijun (ppm). Taj pomak proizlazi iz magnetskog okruženja koje okružuje jezgre, a koje je pod utjecajem bliskih elektronegativnih atoma ili skupina. Vrijednosti kemijskog pomaka referirane su na standardni spoj poput tetrametilsilana (TMS), s $\delta = 0$ ppm. Sprega spin-spin proizlazi iz interakcije između jezgri i veza, što utječe na višestrukost i intenzitet signala u spektru.^{47,48}

Primjene NMR spektroskopije obuhvaćaju različita područja, uključujući organsku kemiju, biokemiju, farmaceutiku i znanost o materijalima. U razotkrivanju strukture, NMR pruža detaljne informacije o molekularnoj povezanosti, analizi konformacija i stereo kemiji. Nezamjenjiv je u proučavanju struktura proteina, interakcija lijekova i metaboličkih puteva u biološkim sustavima. Nadalje, NMR spektroskopija pomaže u kontroli kvalitete, forenzičkoj analizi i karakterizaciji novih materijala.^{47,48}

U ovom radu korišten je *Bruker Avance* spektrometar od 600 i 300 MHz kako bi se zabilježili ¹H spektri kako bi se odredilo dolazi li do interakcija vodikovih atoma BCD sa dasatinibom. Uzorci analizirani NMR tehnikama otopljeni su u deuteriranoj vodi. Kao standard korišten je tetrametilsilan (TMS). Kemijski pomaci izraženi su u ppm (dijelovi na milijun) jedinicama.⁴⁹

Kako bi se dobili odgovarajući spektri, bilo je potrebno pripremiti otopine za analizu koncentracije dasatiniba od 3,52 mM po uzoru na T. K. Špehar (2021) . Pripremljene otopine volumena 600 μ L prebačene su u NMR cjevčice.⁵⁰

4.6. Priprava oralnog dozirnog oblika s modificiranim profilom oslobađanja djelatne tvari

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

Kako bi se pripravio oralni dozirni oblik, potrebno je najprije granulirati pomoćne tvari, zatim granulat pomiješati sa dobivenim inkluzijskim kompleksima. Granuliranje pomoćnih tvari provodi se kako bi se izbjeglo dobivanje tablete loših primjenskih svojstava (neujednačenost sadržaja djelatne tvari, mala tvrdoća itd.). Pomoćne tvari korištene pri granuliranju su manitol, poli(etilen-glikol) i natrijev kroskarmeloza.

U početnoj fazi granuliranja, ekcipienti se stavljaju u konus granulatora prikazanog na slici 19. Iz donjeg dijela granulatora upuhuje se zrak iz kompresora čime se postiže fluidizacija koja omogućuje stohastičko gibanje. Kako bi se omogućilo formiranje kapljevutih premoštenja koja su ključna kako bi se dobile granule, potrebno je zagrijati smjesu pomoćnih tvari na temperaturu faznog prijelaza veziva iz čvrstog u tekuće. Zatim slijedi hlađenje smjese do temperature faznog prijelaza veziva iz tekućeg u čvrsto stanje. Hlađenje uzrokuje ukrućivanje premoštenja i formiranje granula.

Dobivene granule pomiješane su s pripravljenim inkluzijskim kompleksima u tarioniku kako bi se smjesa homogenizirala i pripremila za tabletiranje.



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

4.6.2. Tabletiranje

Proces tabletiranja proveden je na uređaju prikazanom na slici 20. Kako bi se dobile tablete, bilo je potrebno smjesi granulata i inkluzijskih kompleksa dodati 1 % magnezijevog stearata koji služi kao mazivo kako bi se spriječilo neželjeno lijepljenje mješavine za tabletirku. Korištena tabletirka pripada skupini ekscentričnih tabletirki i sadrži jedan par klipova za izradu tablete. Korištena je okrugla matrica promjera 8 mm, a ciljane masa tableta iznosila je 200 mg te su prikazane na slici 21.



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



Slika 21. Fotografija pripremljenih tableta

4.7. Karakterizacija oralnog dozirnog oblika

Pripravljenim tabletama određena je ujednačenost masa i sadržaj djelatne tvari, a provedeni su testovi topljivosti kako bi se dobili profili oslobađanja djelatne tvari iz dozirnog oblika. Dobiveni profili matematički su opisani.

4.7.1. Ujednačenost masa tableta

Zbog ciljane vrijednosti masa tablete u iznosu od 200 mg, potrebno je provjeriti ujednačenost masa. Analiza se provodi vaganjem dobivenih tableta na analitičkoj vagi prikazanoj na slici 22. Analiza se provodi na 10 nasumično odabranih tableta uzoraka DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:2.



Slika 22. Fotografija analitičke vage KERN ALJ 220-4NM
(KERN, Balingem, SR Njemačka)

4.7.2. Sadržaj djelatne tvari u tableti

Sadržaj djelatne tvari provodi se po metodi propisanoj Europskom farmakopejom (eng. *European Pharmacopeia*) kako bi se vidjelo sadrže li pripravljene tablete 40 mg dasatiniba, odnosno 20 % ukupne mase tablete. Sadržaj se određuje UV/Vis spektrofotometrom koji je prikazan na slici 23.

UV/Vis spektrofotometrija govori o energiji koja pobuđuje molekulu iz osnovnog stanja u pobuđeno, odnosno energiji koja izaziva elektronske prijelaze. Mjerno područje UV/Vis spktrofotometra iznosi od 200 nm do 380 nm za UV i od 380 nm do 780 nm za vidljivi dio spektra.⁵⁰

Prvo je bilo potrebno pripremiti otopine tableta. Izvagano je 10 tableta uzoraka je DAS i BCD 1:1 i DAS:BCD 1:2. Tablete su usitnjene u tarioniku do pojave praha i stavljene u tikvice od 10 mL. Usitnjenim tabletama dodan je metanol do 2/3 volumena te su tikvice stavljene u ultrazvučnu kupelj na 60 minuta kako bi se otopina homogenizirala. Nakon što

su tikvice izvađene iz kupelji, dodaje se ostatak metanola kako bi volumen otopine bio 10 mL. Nekoliko mililitara svake otopine propušta se kroz politetrafluoroetilenski (PTFE) membranski filter veličine pora 0,45 μm . Dobivene otopine razrijeđene su do koncentracije od 40 ppm te je određena apsorbancija dasatiniba u tim otopinama.



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

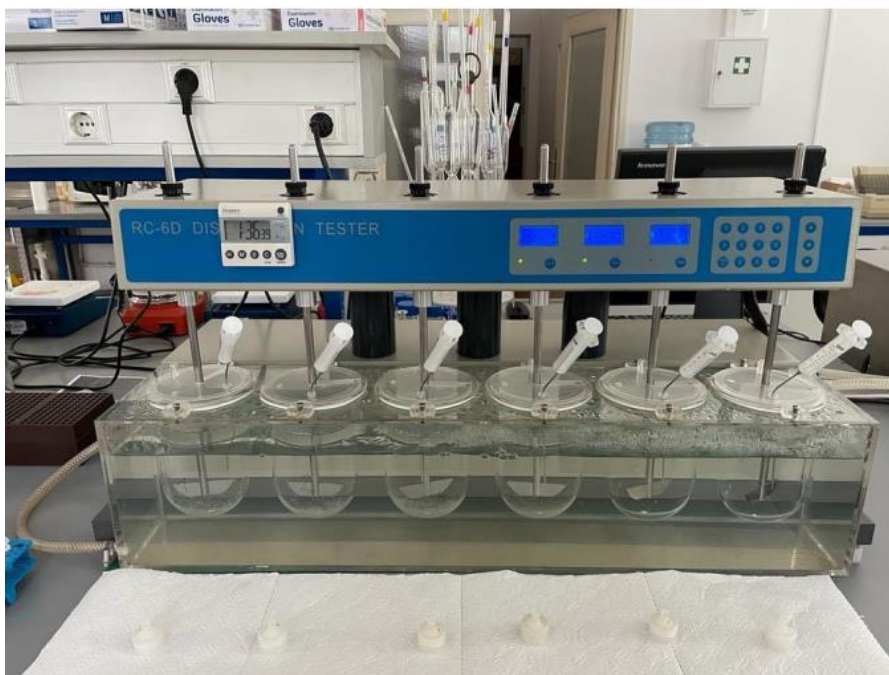
4.7.3. Testovi topljivosti

Profil oslobađanja djelatne tvari (eng. *Drug release profile*) govori o promjeni koncentracije otopljene djelatne s vremenom $c = f(t)$.

Za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari potrebno je uzeti u obzir nekoliko ključnih faktora, uključujući sastav, volumen i temperaturu medija, način miješanja, intervale uzorkovanja i metode analize. Medij oponaša fiziološke uvjete s temperaturom od 37 °C i pH 4,0. Volumen mora omogućiti potpunu topljivost lijeka bez dosezanja granične koncentracije. Miješanje mora osigurati ravnomjernu koncentraciju lijeka u mediju, prilagođavajući se peristaltici želuca. Vrijeme uzorkovanja odabire se prema svojstvima pripravka, a intervali moraju pružiti dovoljno podataka za daljnju analizu.

Profil oslobađanja djelatne tvari analiziran je *in vitro* testiranjem prema metodi *UPS Apparatus II Paddle* koju propisuje Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*). Testiranje se provodi u uređaju prikazanom na slici 24. Ispitivanje je provedeno na tabletama koje su pripravljene s omjerom DAS i BCD 1:1, 1:2 te sa čistim dasatinibom. Medij u kojem se provodilo testiranje sastojao se od acetatnog pufera (NaAC + HAc) i surfaktanta (1 % Triton X-100) te mu je volumen iznosio 1000 mL, a pH 4,0. Vrtnja miješala postavljena je na 60 okretaja po minuti. Uzorci alikvota od 5 mL su prikupljeni u periodu od 2 sata u 1., 5., 10., 15., 20., 30., 45., 60., 75., 105. i 120. minuti. Alikvot je filtriran pomoću PTFE membranskih filtera promjera pora 0,45 μm te analiziran UV/Vis spektrofotometrom. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije izračunate su

koncentracije djelatne tvari u određenom vremenu. Programskim dodatkom *DDSolver* analizirani su profili oslobađanja dasatiniba iz tableta.



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

4.7.4. Matematički opis oslobađanja djelatne tvari iz dozirnog oblika

Podatci dobiveni iz testiranja topljivosti lijekova mogu se kvantitativno analizirati korištenjem različitih matematičkih formula. Matematički modeli imaju ključnu ulogu u tome, zahtijevajući duboko razumijevanje svih faktora koji utječu na kinetiku oslobađanja lijeka kako bi se formulacije učinkovito optimizirale. Ti modeli predstavljaju matematičke prikaze stvarnih procesa i široko su primijenjeni u disciplinama poput genetike, medicine, psihologije, biologije, ekonomije, inženjerstva i tehnologije. Metode koje ovise o modelu temelje se na različitim matematičkim funkcijama koje opisuju profile otapanja, pri čemu odabrana funkcija određuje kako se procjenjuju profili otapanja na temelju izvedenih modelnih parametara.⁵¹

Matematičko modeliranje oslobađanja lijekova je područje koje ima sve veći akademski i industrijski značaj s ogromnim potencijalom za budućnost. Zahvaljujući značajnim napredcima u informacijskoj tehnologiji, može se očekivati da će *in silico* optimizacija novih sustava dostave lijekova značajno poboljšati točnost i jednostavnost primjene. Razmatrajući željeni način primjene, dozu lijeka koja se treba ugraditi i ciljani profil oslobađanja lijeka, matematička predviđanja omogućuju dobre procjene potrebne

kompozicije, geometrije, dimenzija i postupka pripreme odgovarajućih dozirnih oblika. Stoga je jedan od glavnih pokretača upotrebe matematičkog modeliranja u dostavi lijekova ušteda vremena i smanjenje troškova: broj potrebnih eksperimentalnih studija za razvoj novog i/ili optimizaciju postojećeg lijeka može se znatno smanjiti. Također, kvantitativna analiza fizičkih, kemijskih i potencijalno bioloških fenomena koji su uključeni u kontrolu oslobađanja lijeka nudi još jednu fundamentalnu prednost: moguće je razumjeti osnovne mehanizme oslobađanja lijeka. To znanje nije samo akademski interes, već preduvjet za učinkovito poboljšanje sigurnosti novih farmakoterapija.⁵²

Matematičkim modeliranjem moguće je:

- predvidjeti ovisnost koncentracije o vremenu za odabrane uvjete $c = f(t)$,
- kvantificirati kinetiku oslobađanja djelatne tvari iz dozirnog oblika,
- utvrditi po kojem se mehanizmu oslobađa djelatna tvar iz testiranog dozirnog oblika,
- kvantificirati na koji način svojstva ulaznih tokova materijala i procesne varijable utječu na profil oslobađanja,
- optimizirati i kontrolirati oslobađanje djelatne tvari.⁵³

Tablica 5. prikazuje najčešće korištene matematičke modele u predviđanju oslobađanja djelatne tvari M iz dozirnog oblika u vremenu t te su opisani kao $M = f(t)$.⁵³

Tablica 5. Prikaz najčešće korištenih matematičkih modela u opisu oslobađanja djelatne tvari

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

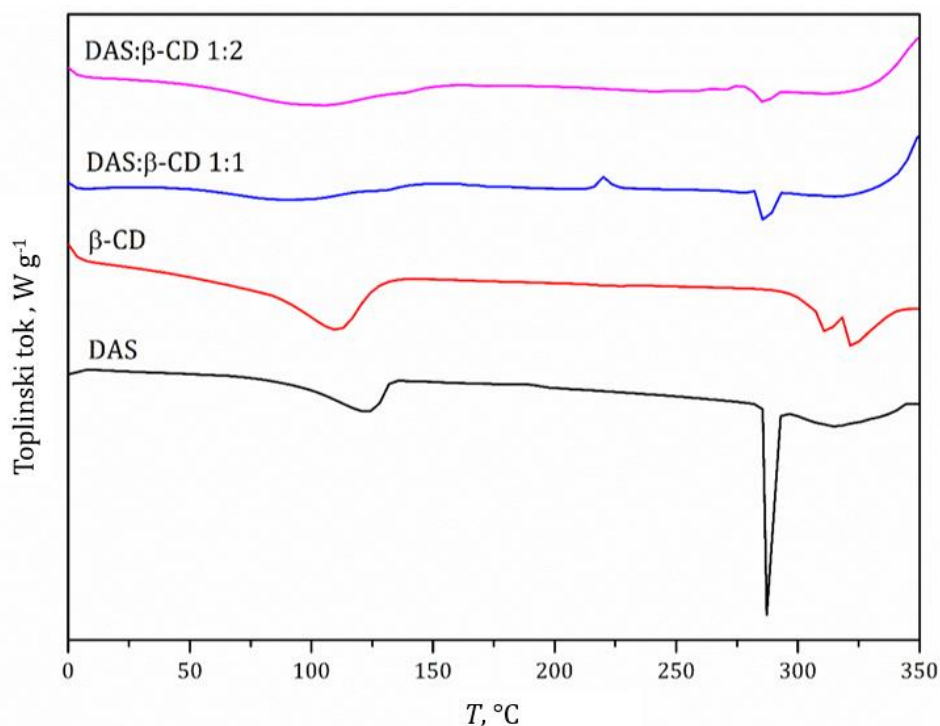
Model nultog reda može se opisati linearnom jednadžbom, a oslobađanje djelatne tvari je jednako po jedinici vremena, što je idealno za postizanje produljenog farmakološkog djelovanja. U modelu prvog reda, brzina oslobađanja djelatne tvari proporcionalna je preostaloj količini tvari, pri čemu se količina oslobođene djelatne tvari smanjuje s vremenom, a varijable uključuju konstantu brzine oslobađanja te količinu tvari u vremenu nula i vremenu t . Higuchijev model opisuje oslobađanje lijeka iz matričnog sustava na temelju nekoliko pretpostavki, uključujući konstantnu difuziju lijeka prema Fickovom zakonu. Weibullova jednadžba modelira krivulje oslobađanja lijeka koristeći parametre α za vremensku ovisnost i β za oblik krivulje, omogućujući proračun vremena oslobađanja i dobivanje linearnih log-log grafova u farmaceutskim sustavima. Korsmeyer-Peppas model se primjenjuje kada nije jasno određen ili postoji više mehanizama za oslobađanje djelatne tvari. Vrijednost eksponenta n u modelu može ukazati na dominantni mehanizam oslobađanja djelatne tvari iz farmaceutskog dozirnog oblika. Peppas-Sahlinov model pokazuje sličan primjer gdje je kinetika oslobađanja djelatne tvari rezultat dva mehanizma: difuzijskog i relaksacijskog.⁵¹

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Karakterizacija mehanokemijski pripremljenih uzoraka

5.1.1. Podatci toplinske analize tvari – DSC analiza

Na slici 25. prikazani su termogrami inkluzijskih kompleksa omjera DAS i BCD 1:1 i 1:2, te čistog DAS i čistog BCD. Termogram dasatiniba prikazuje širok endotermni prijelaz pri otprilike 120 °C koji odgovara gubitku oslobođene kristalne vode iz kristalne rešetke uslijed mehanokemijske aktivacije budući da je dasatinib u ovom istraživanju dostupan u obliku monohidrata. Vidljiv je karakterističan uzak endotermni prijelaz koji se pripisuje taljenju DAS s minimumom pri 288 °C, a širina ukazuje na visoku čistoću uzorka. Nakon njega slijedi endotermni prijelaz koji je posljedica termičke degradacije DASa.



Slika 25. DSC termogrami inkluzijskih kompleksa s različitim omjerima te čistih komponenti DAS i BCD

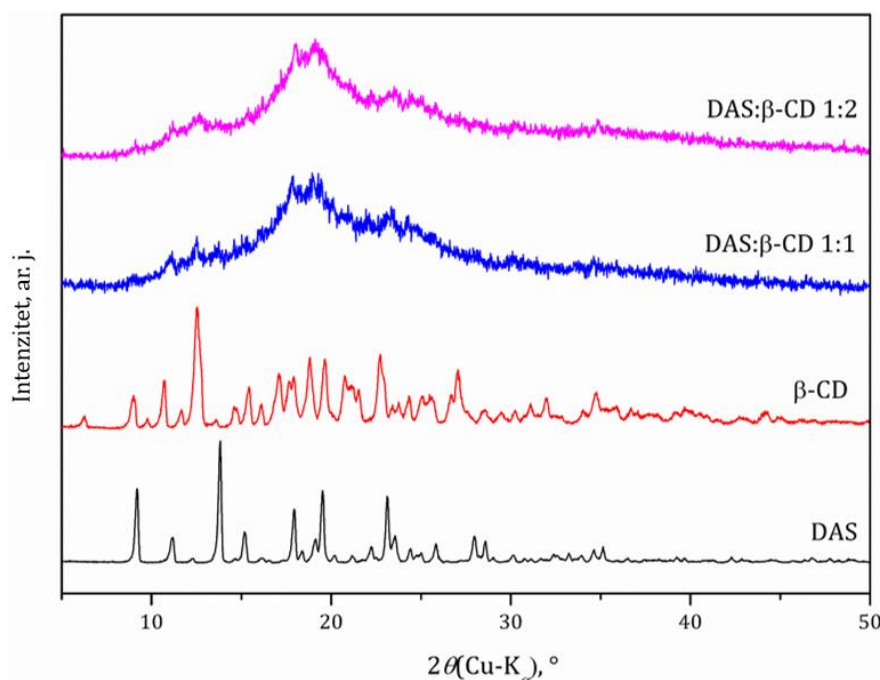
Termogram β-cikodekstrina također pokazuje prijelaz pri otprilike 110 °C koji odgovara oslobađanju vode iz kristalne rešetke. Endotermni prijelaz pri 323 °C odgovara faznom prijelazu taljenja.

Kod pripreve inkluzijskog kompleksa usred mehanokemijske aktivacije oslobađa se određena količina toplinske energije. Kada se uzorak ponovno zagrijava na DSC-u, amorfni dio koji se nije uspio prerasporediti naglo kristalizira. Navedeno je vidljivo na

egzotermnom prijelazu s maksimumom pri 224 °C koji se pripisuje hladnoj kristalizaciji koja je karakteristična za amorfizirane tvari. Relativni stupanj kristalnosti djelatne tvari u inkluzijskim kompleksima smanjen je u odnosu na ishodu što potvrđuje amorfnu strukturu dobivenih inkluzijskih kompleksa. Kod inkluzijskog kompleksa DAS:BCD 1:1 relativni stupanj kristalnosti iznosi 26,70 %, dok kod inkluzijskog kompleksa DAS:BCD 1:2 iznosi 17,51 %. Podatci o relativnom stupnju kristalnosti dobiveni su integriranjem površine endotermnih prijelaza taljenja DAS, čime su dobivene standardne entalpije taljenja DAS u svim uzorcima. Navedene vrijednosti izravno su proporcionalne stupnju kristalnosti djelatne tvari u pojedinom uzorku.

5.1.2. Podatci difrakcijske analize tvari – XRPD analiza

Rendgenska difrakcijska analiza korištena je kako bi se utvrdio fazni sastav čistog dasatiniba i β -cikodekstrina te inkluzijskih kompleksa DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:2, a difraktogrami istih prikazani su na slici 26.



Slika 26. Difraktogrami inkluzijskih kompleksa različitih omjera i čistih komponenti - DAS i BCD

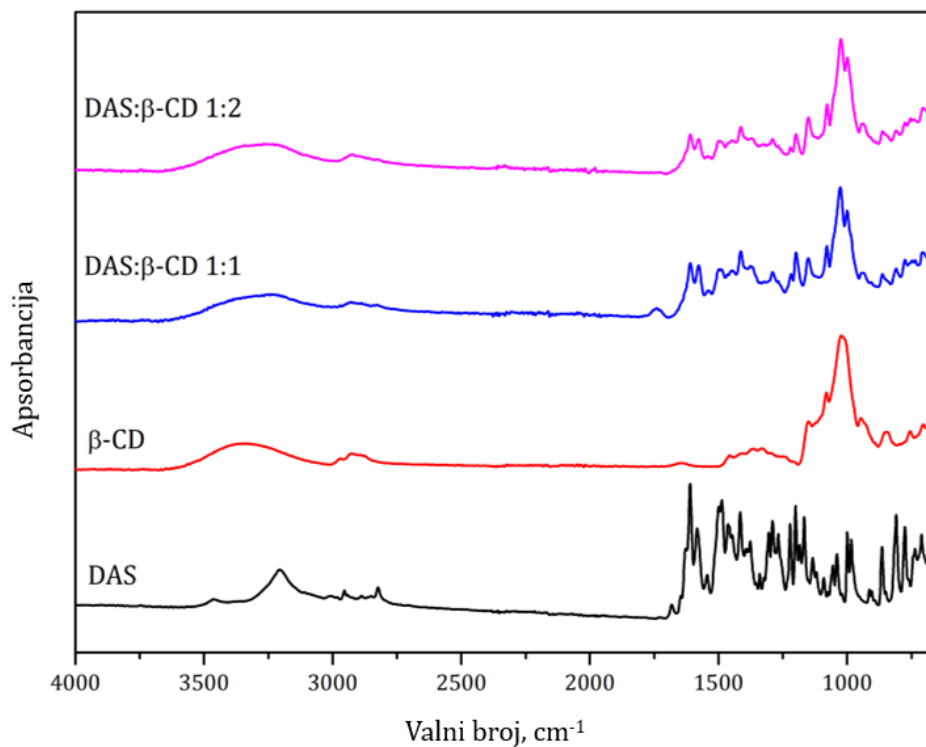
Na difraktogramima dasatiniba i β -cikodekstrina jasno su vidljivi oštri difrakcijski maksimumi koji ukazuju na visoku uređenost kristalne strukture. Kod pripremljenih inkluzijskih kompleksa novi maksimumi izostaju te nema karakterističnih difrakcijskih maksimuma ishodnih komponenti, što je dokaz amorfizacije ishodne kristalne djelatne tvari i makrocikličkog receptora uslijed mehanokemijske aktivacije. Amorfiziranjem

dasatiniba olakšava se njegov ulazak u šupljinu β -cikodekstrina. Difraktogrami dokazuju amorfnu strukturu inkluzijskih kompleksa.

5.1.3. Podatci spektroskopske analize tvari – FTIR analiza

Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama korištena je kako bi se detektirale potencijalne interakcije između djelatne tvari i makrocikličkog receptora. Ukoliko je prilikom pripreve inkluzijskih kompleksa došlo do interakcija pojedinih komponenata, na FTIR spektru bio bi vidljiv pomak apsorpcijskih vrpca karakterističnih za one funkcionalne skupine koje sudjeluju u interakciji.

Slika 27 prikazuje rezultate FTIR analize za uzorke čistih komponenta DAS i BCD te inkluzijskih kompleksa. FTIR spektar dasatiniba prikazuje apsorpcijske vrpce karakteristične za rastezanje -NH skupine pri 3456 cm^{-1} te rastezanje -OH skupine pri 3203 cm^{-1} . FTIR spektar BCD pokazuje apsorpcijske vrpce pri $3,300\text{--}3,400\text{ cm}^{-1}$ karakteristične za istežanja -OH skupine. Apsorpcijska vrpca pri $2,854\text{ cm}^{-1}$ predstavlja asimetrično/simetrično istežanje C-H veze. Apsorpcijska vrpca pri $1,650\text{ cm}^{-1}$ predstavlja H-O-H deformacijske vrpce vode prisutne u BCD, a vrpce pri $1,153$ i $1,029\text{ cm}^{-1}$ ukazuju na istežanje C-H veze. Vrpca pri $1,029\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na istežanje C-H i C-O. Apsorpcija vibracije C-O-C veze vidljiva je pri $1,153\text{ cm}^{-1}$. Spektar oba inkluzijska kompleksa poprma izgled spektra ishodnog ciklodekstrina što potencijalno dokazuje da je dasatinib ušao u šupljinu β -cikodekstrina.

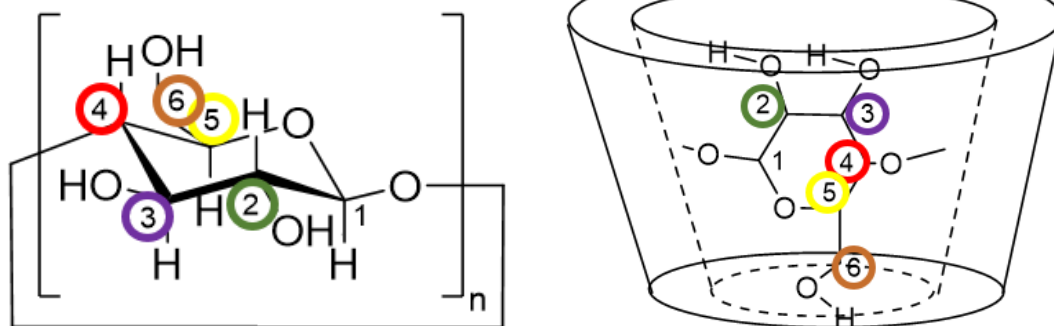


Slika 27. FTIR spektri inkluzijskih kompleksa različitih omjera i čistih komponenti - DAS i BCD

5.1.4. Podatci spekroskopske analize tvari - NMR analiza

NMR spektroskopija korištena je kako bi se utvrdilo dolazi li do kemijskih pomaka u strukturi β -ciklodekstrina i dasatiniba uslijed stvaranja inkluzijskih kompleksa. NMR spektri su dobiveni u deuteriranoj vodi. Vaganjem 10 mg svih uzoraka nije bilo moguće vidjeti signale dasatiniba, no vidljivi su kemijski pomaci ciklodekstrina. Zbog vidljivih kemijskih pomaka ciklodekstrina moguće je donijeti zaključke koji dio molekule ciklodekstrina točno sudjeluje u interakciji.

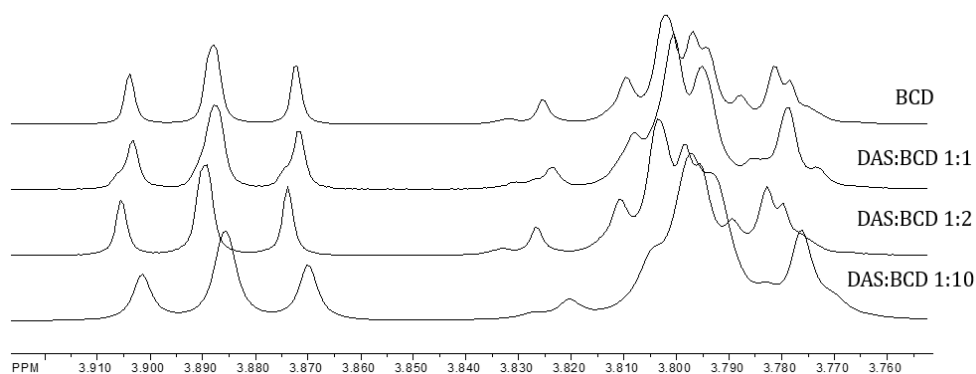
Slika 28. prikazuje molekulu β -ciklodekstrina i vidljive H atome u NMR spektru. Atomi vodika označeni brojem 3, 5 i 6 pripadaju unutrašnjosti šupljine i očekuju se njihovi kemijski pomaci. Vodikovi atomi označeni brojevima 1, 2 i 4 dio su vanjske strane molekule te bi kemijski pomaci ovih atoma ukazivali na površinsku interakciju s molekulom DAS.



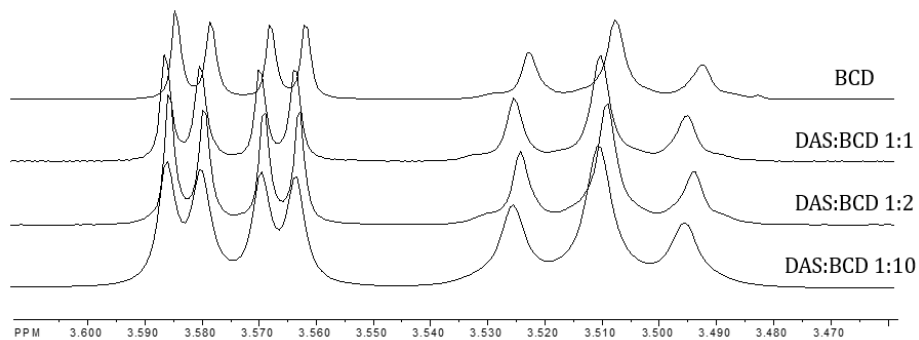
Slika 28. Prikaz β -CD i atoma vodika koji su vidljivi u NMR spektru

Na slikama 29. i 30. prikazani su NMR spektri BCD-a i uzoraka DAS:BCD 1:1, DAS:BCD 1:2 te DAS:BCD 1:10.

Signali NMR spektra između 3,910 i 3,875 ppm pripadaju 3. H atomu u BCD molekli, između 3,830 i 3,790 5. H atomu, između 3,780 i 3,765 6. H atomu, između 3,590 i 3,560 2. H atomu, dok signali između 3,530 i 3,490 ppm pripadaju 4. H atomu. Veći pomaci vidljivi su kod 3., 5., i 6. atoma vodika, koji pripadaju unutrašnjosti šupljine β -ciklodekstrina. Navedeno govori kako dasatinib stupa u interakciju unutar šupljine β -ciklodekstrina, dok manji kemijski pomaci kod vanjskih atoma vodika ukazuju na minimalne površinske interakcije

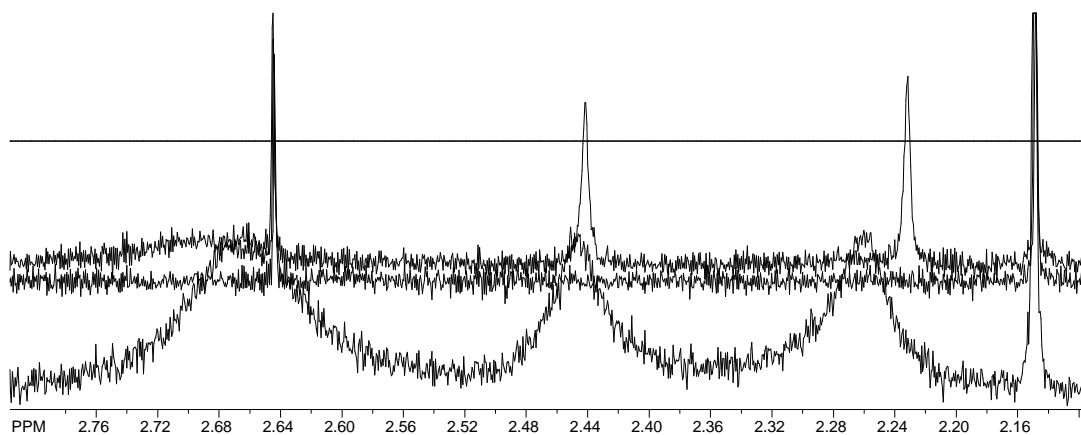


Slika 29. NMR spektri sa kemijski pomacima od 3,920 do 3,750 ppm za BDC, DAS:BCD 1:1, DAS:BCD 1:2, DAS:BCD 1:10

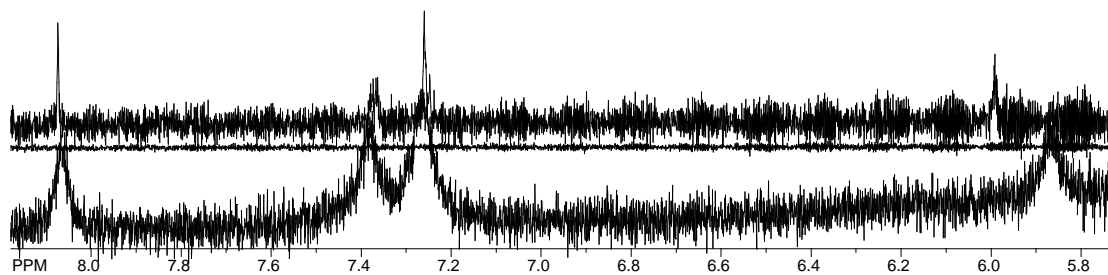


Slika 30. NMR spektri sa kemijski pomacima od 3,610 do 3,460 ppm za BDC, DAS:BDC 1:1, DAS:BCD 1:2, DAS:BCD 1:10

Uzorci su ponovno dati na analizu kako bi se usporedili pomaci dasatiniba. U ovom slučaju, uzorci su bili pripremljeni tako da je koncentracije dasatiniba u svakom uzorku iznosila 3,52 mM po uzoru na T. K. Špehar (2021). Na slikama 31 i 32 prikazani su usporedni podatci za DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:10 koji su značajno različiti. Konkretno, hidroksilne skupine su pokazale pomake od 0,031 ppm između kompleksa s omjerom 1:10 i 1:1. Takođe, vidljivi su pomaci od 0,008, 0,031 i 0,001 ppm gdje pomak od 0,001 ppm pripada metilnoj skupini. Slika 32 prikazuje pomak od -0,010, 0,015, 0,010 i 0,125 ppm između ta dva kompleksa, pomak od 0,125 ppm pripada NH-skupini.



Slika 31. Usporedba pomaka DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:10 za hidroksilne i metilne skupine



Slika 32. Usporedba pomaka DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:10 za amino skupinu

Iz rezultata je vidljivo kako dolazi do interakcija između dasatiniba i β -ciklodekstrina. Kemijski pomaci na unutrašnjim vodikovim atomima β -ciklodekstrina (označenim brojevima 3, 5 i 6) ukazuju na to da je došlo do interakcije unutar šupljine β -ciklodekstrina. Promjene u spektrima također pokazuju interakcije hidroksilnih, amino i metilnih skupina dasatiniba s unutrašnjim vodikovim atomima β -ciklodekstrina, što potvrđuje formiranje inkluzijskih kompleksa između dasatiniba i β -ciklodekstrina.

5.2. Karakterizacija oralnog dozirnog oblika

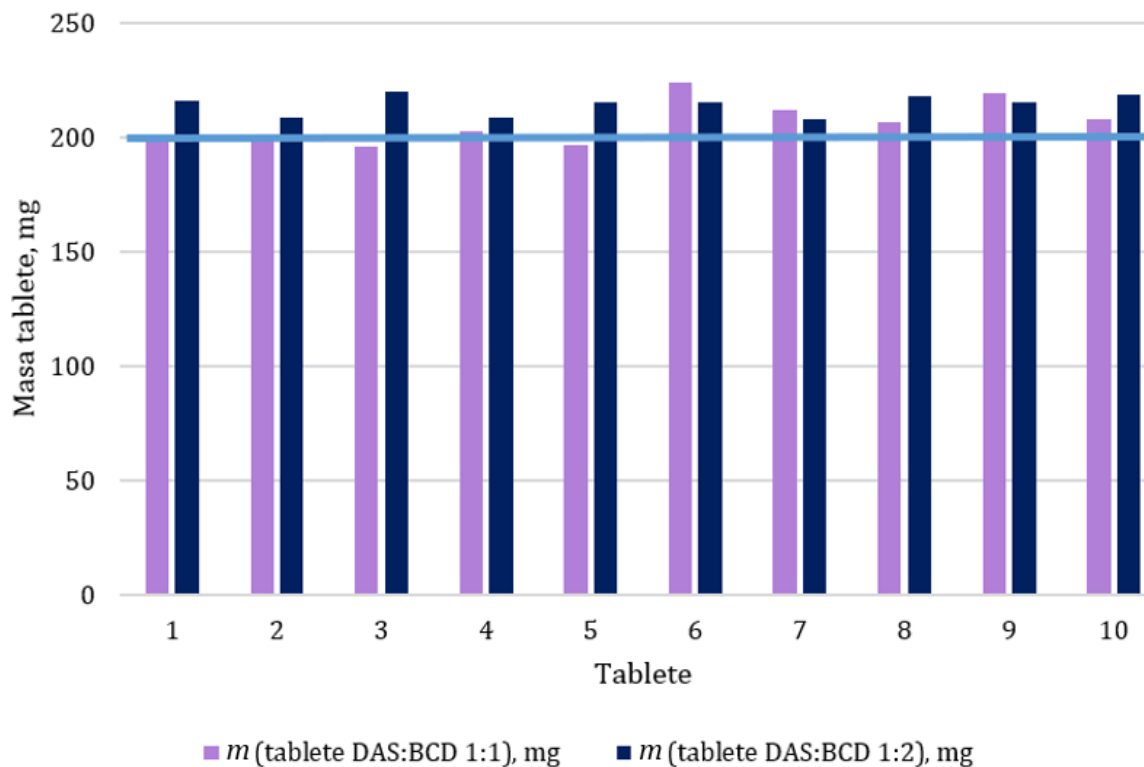
5.2.1. Ujednačenost masa tableta

Kod karakterizacije oralnog dozirnog oblika, najprije treba odrediti ujednačenost masa tableta na uzorku od 10 nasumično odabranih tableta svakog pojedinog uzorka. U tablici 6. prikazane su vrijednosti masa svake pojedine tablete te srednja vrijednost i standardna devijacije za oba uzorka.

Masa tableta DAS:BCD 1:1 iznosi $206,7 \pm 9,435$ mg dok je masa tableta DAS:BCD 1:2 jednaka $214,5 \pm 4,383$ mg. Masa svih tableta također je prikazana na slici 33 u obliku stupčastog dijagrama. Masa tableta DAS:BCD 1:1 bliža je idealnoj masi tablete od 200 mg, dok je veća ujednačenost masa tableta prisutna kod tableta DAS:BCD 1:2.

Tablica 6. Rezultati ujednačenosti masa na uzorku od 10 tableta

| Tablete | <i>m</i> (tablete DAS:BCD 1:1), mg | <i>m</i> (tablete DAS:BCD 1:2), mg |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 200,8 | 216,1 |
| 2 | 199,7 | 208,7 |
| 3 | 196,3 | 220,3 |
| 4 | 202,6 | 208,9 |
| 5 | 196,9 | 215,2 |
| 6 | 224,2 | 215,5 |
| 7 | 211,9 | 208,3 |
| 8 | 207,0 | 218,1 |
| 9 | 219,4 | 215,6 |
| 10 | 208,0 | 218,7 |
| Srednja vrijednost, mg | 206,7 | 214,5 |
| Standardna devijacija, mg | 9,435 | 4,383 |



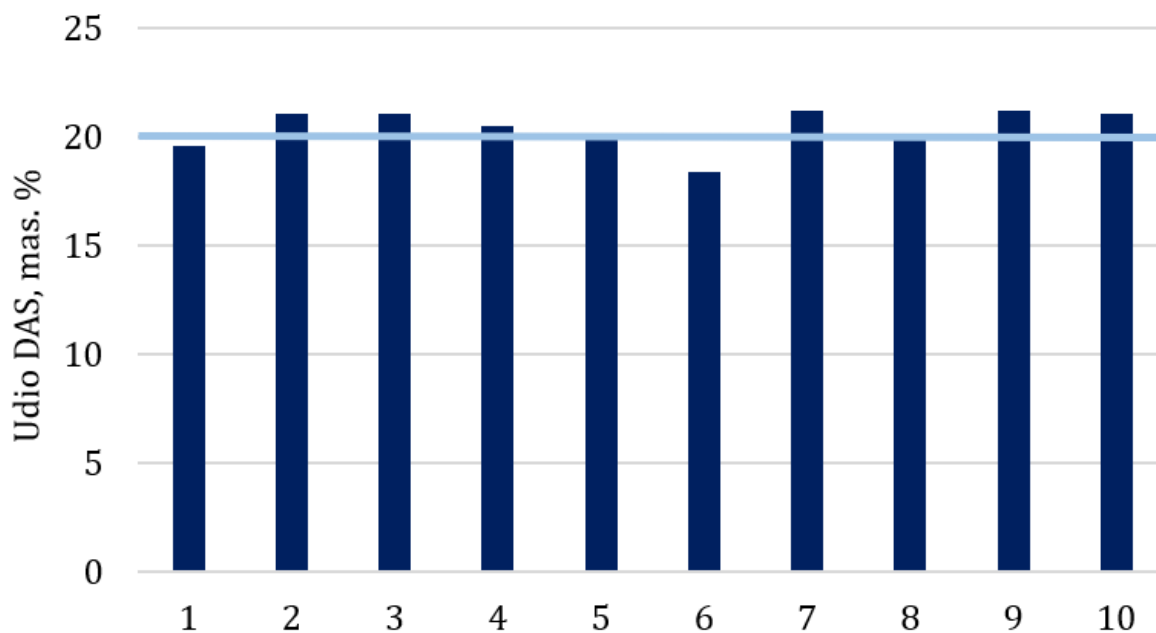
Slika 10. Grafički prikaz tableta uzoraka DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:2

5.2.2. Sadržaj dasatiniba u tableti

Sadržaj dasatiniba u tableti ispitan je na uzorku od 10 tableta za uzorke DAS:BCD 1:1 te DAS:BCD 1:2 pomoću UV/Vis spektrofotometra. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 7 i 8 te slikama 34 i 35. Ciljani udio djelatne tvari u svakoj tableti je 20 % od ukupne mase tablete, odnosno 40 mg. Treba uzeti u obzir odstupanja mase tableta od idealnih 200 mg. Europska farmakopeja u svojim smjernicama dopušta odstupanje ± 15 % od idealnog postotka. Sve tablete DAS:BCD 1:1 te DAS:BCD 1:2 zadovoljavaju smjernice Europske farmakopeje te su odstupanja u većini tableta mala.

Tablica 7. Rezultati sadržaja djelatne tvari u tabletama DAS:BCD 1:1

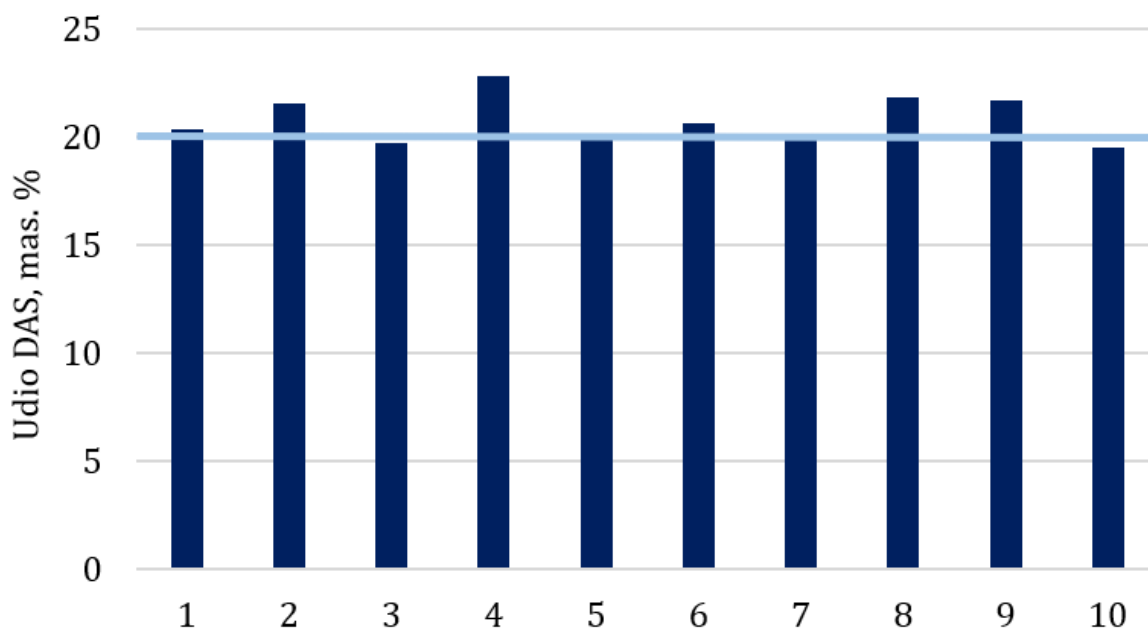
| Tableta DAS:BCD 1:1 | <i>m</i> (tablete), mg | <i>m</i> (DAS, očekivano), mg | % od cilja | <i>m</i> (DAS u tableti), mg | % DAS u tableti |
|---------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------|---------------------------------|--------------------|
| 1 | 200,8 | 40,16 | 98,06 | 39,38 | 19,61 |
| 2 | 199,7 | 39,94 | 105,24 | 42,03 | 21,05 |
| 3 | 196,3 | 39,26 | 105,15 | 41,28 | 21,03 |
| 4 | 202,6 | 40,52 | 102,43 | 41,51 | 20,49 |
| 5 | 196,9 | 39,38 | 99,47 | 39,17 | 19,89 |
| 6 | 224,2 | 44,84 | 92,06 | 41,28 | 18,41 |
| 7 | 211,9 | 42,38 | 106,15 | 44,98 | 21,23 |
| 8 | 207,0 | 41,40 | 99,67 | 41,27 | 19,93 |
| 9 | 219,4 | 43,88 | 106,02 | 46,52 | 21,20 |
| 10 | 208,0 | 41,60 | 105,46 | 43,87 | 21,09 |
| Srednja vrijednost, mg | 206,7 | 41,34 | 101,97 | 42,13 | 20,39 |
| Standardna devijacija, mg | 9,43 | 1,89 | 4,62 | 2,22 | 0,92 |



Slika 34. Dijagram masenog udjela dasatiniba u tabletama DAS:BCD 1:1

Tablica 8. Rezultati sadržaja dasatiniba u tableti DAS:BCD 1:2

| Tableta DAS:BCD 1:2 | <i>m</i> (tablete), mg | <i>m</i> (DAS, očekivano), mg | % od cilja | <i>m</i> (DAS u tableti), mg | % DAS u tableti |
|---------------------------|------------------------|--------------------------------|------------|------------------------------|-----------------|
| 1 | 216,1 | 43,22 | 101,71 | 43,96 | 20,34 |
| 2 | 208,7 | 41,74 | 107,74 | 44,97 | 21,55 |
| 3 | 220,3 | 44,06 | 98,72 | 43,49 | 19,74 |
| 4 | 208,9 | 41,78 | 113,94 | 47,61 | 22,79 |
| 5 | 215,2 | 43,04 | 99,17 | 42,68 | 19,83 |
| 6 | 215,5 | 43,10 | 103,08 | 44,43 | 20,62 |
| 7 | 208,3 | 41,66 | 100,68 | 41,94 | 20,14 |
| 8 | 218,1 | 43,62 | 109,14 | 47,61 | 21,83 |
| 9 | 215,6 | 43,12 | 108,59 | 46,82 | 21,72 |
| 10 | 218,7 | 43,74 | 97,54 | 42,67 | 19,51 |
| Srednja vrijednost, mg | 214,5 | 42,91 | 104,03 | 44,62 | 20,81 |
| Standardna devijacija, mg | 4,38 | 5,48 | 5,48 | 1,98 | 1,10 |



Slika 35. Dijagram masenog udjela dasatiniba u tabletama DAS:BCD 1:2

5.2.3. Profili oslobađanja dasatiniba iz tableta

Profil oslobađanja dasatiniba iz pripremljenih tableta određeni su *in vitro* testovima otapanja unutar vremenskog intervala od 120 minuta. Slika 36 prikazuje profile oslobađanja iz tableta koje sadrže čisti dasatinib te inkluzijske komplekse DAS:BCD 1:1 te DAS:BCD 1:2. Daljnja rasprava pruža uvid u poboljšanje primjenskih svojstava tableta inkluzijskih kompleksa DAS i BCD u usporedbi s tabletama s čistom djelatnom tvari.

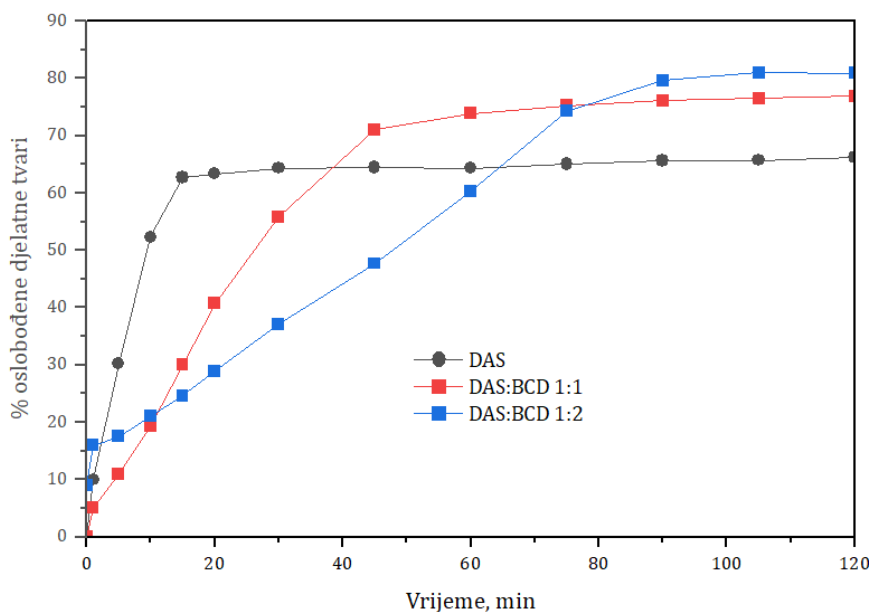
Kod tableta s čistom djelatnom tvari konačni oslobođeni udio iste u vremenu $t = 120$ min iznosi 66,22%. Ovaj profil karakterizira vrlo brzi porast do $t = 15$ min na 62,68%, nakon čega se udio stabilizira te gotovo ne mijenja do kraja mjerenja. Ovakav profil oslobađanja s naglim porastom kod antitumorskih lijekova nije poželjan već se preferira kontrolirano oslobađanje. Tijekom prvog prolaska djelatne tvari kroz jetru dolazi do metabolizacije u manje molekule čime se smanjuje količina djelatne tvari koja dolazi do ciljanih tkiva i organa. Kontroliranim oslobađanjem omogućuje se stabilnija i terapijski učinkovitija koncentracija djelatne tvari u krvotoku tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Također, smanjuje se potreba za čestim doziranjem.

Konačni oslobođeni udio DAS iz tableta uzorka DAS:BCD 1:1 iznosi 76,87%, a tableta uzorka DAS:BCD 1:2 79,91%. Kod tableta s omjerom DAS:BCD 1:1 oslobađanje je sporije u usporedbi s čistom djelatnom tvari te raste do 73,89% kod $t = 60$ min, nakon čega gotovo se ne mijenja do kraja mjerenja. Tablete uzorka DAS:BCD 1:2 pokazuju kontinuirano rastući trend koje počinje stagnirati na 78,49% u devedesetoj minuti, što sugerira postojanje kontroliranijeg oslobađanja dasatiniba.

Tablete pripravljene korištenjem inkluzijskih kompleksa pokazuju značajno poboljšanu topljivost dasatiniba u usporedbi s tabletama koje sadrže čisti dasatinib, što rezultira većim oslobađanjem djelatne tvari unutar istog vremenskog perioda. Rezultati dokazuju uspješnost mehanokemijske pripreme inkluzijskih kompleksa u poboljšanju konačnog oslobađanja djelatne tvari.

Profili oslobađanja djelatne tvari kod mehanokemijski pripremljenih inkluzijskih kompleksa pokazuje kontrolirano oslobađanje dasatiniba s maksimalnom koncentracijom nakon 60 minuta kod DAS:BCD 1:1, odnosno 90 minuta kod DAS:BCD 1:2. Kontroliranim oslobađanjem omogućuje se kontinuirani farmakoterapijski učinak i smanjenje potrebe za čestim dozama.

Dobiveni rezultati potvrđuju hipoteze postavljene na početku istraživanja.



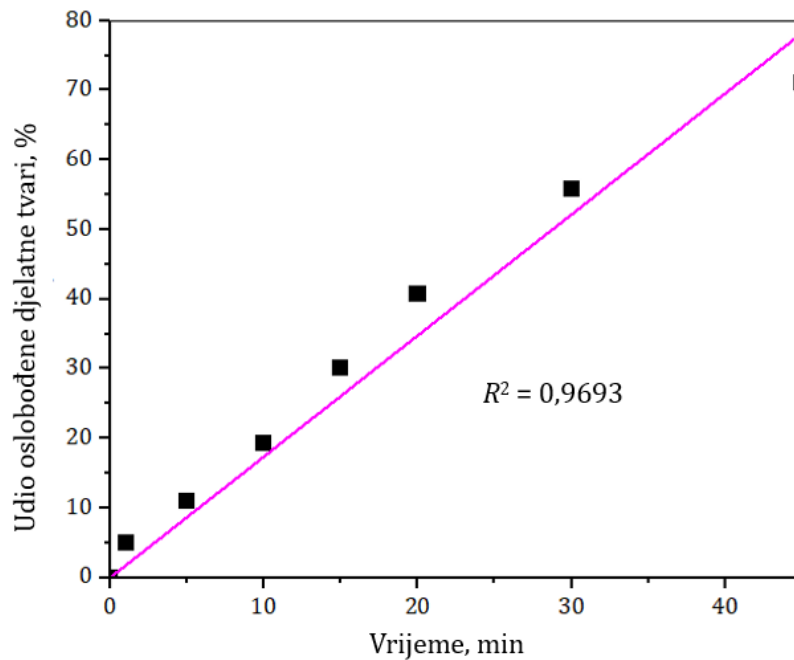
Slika 36. Profili oslobađanja dasatiniba iz tableta koje sadrže: čisti DAS, inkluzijski kompleks DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:2

5.2.4. Matematički opis oslobađanja dasatiniba iz tableta

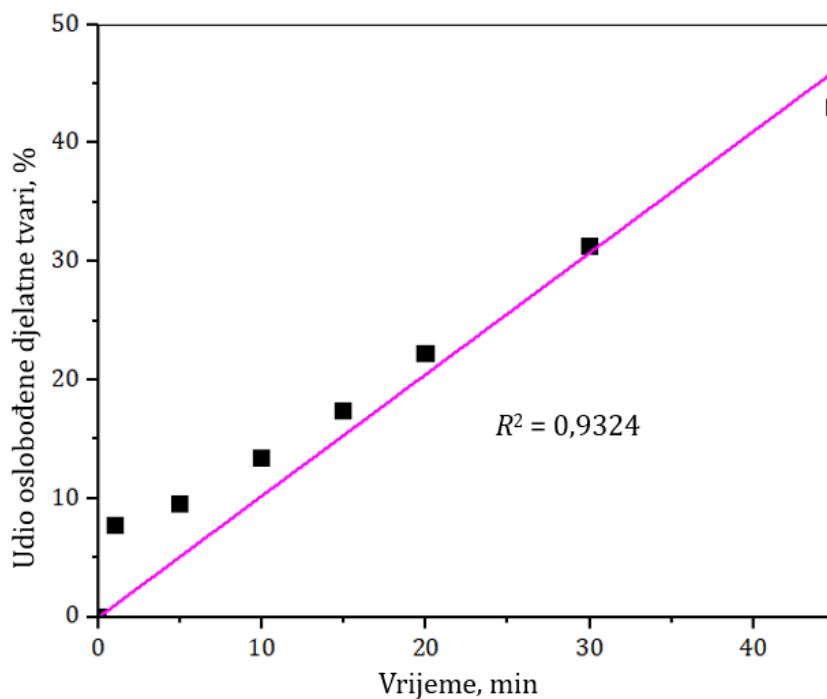
Dobiveni profili oslobađanja dasatiniba iz tableta s čistim dasatinibom i s inkluzijskim kompleksima DAS:BCD 1:1 te DAS:BCD 1:2 dodatno su opisani matematičkim modelima. Korišteni su podatci za prvih 45 minuta mjerenja prema smjernicama Američke agencije za hranu i lijekove. Testiranje modela provedeno je u programskom dodatku za Microsoft Excel, *DDSolver*, koji se koristi kako bi se analizirala kinetika oslobađanja djelatnih tvari s postojećim modelima iz farmaceutske industrije. Ispitano je slaganje eksperimentalnih podataka oslobađanja iz tableta s inkluzijskim kompleksima s modelom nultog reda. Dozirni oblici dizajnirani za postizanje produženog farmakološkog učinka idealno slijede kinetiku nultog reda. To znači da oslobađaju jednaku količinu djelatne tvari konstantno kroz vrijeme. Ispitano je slaganje eksperimentalnih podataka tableta s čistim dasatinibom sa sljedećim modelima: model nultog reda, model prvog reda, Higuchi model, Korsmeyer-Peppas model i Peppas-Sahlin model.

Podudaranje eksperimentalnih podataka i modela nultog reda za tablete s inkluzijskim kompleksima DAS:BCD 1:1 i DAS:BCD 1:2 prikazano je na slikama 37. i 38., dok su u tablici 9 prikazani parametri modela. Rezultat R^2 govori o vrijednosti srednjeg kvadratnog odstupanja podataka od modela i on iznosi 0,9693 kod omjera 1:1, odnosno 0,9324 kod omjera 1:2 što ukazuje na dobro podudaranje. Parametar K_0 poznat je kao konstanta oslobađanja nultog reda te predstavlja brzinu oslobađanja lijeka koja ostaje

konstantna tijekom vremena. Konstanta je veća kod tableta s inkluzijskim kompleksom DAS:BCD 1:1 što govori kako će se dasatinib brže osloboditi kod tih tableta.



Slika 37. Testiranje primjenjivosti modela nultog reda u opisu profila oslobađanja dasatiniba iz tableta s inkluzijskim kompleksom DAS:BCD 1:1



Slika 38. Testiranje primjenjivosti modela nultog reda u opisu profila oslobađanja dasatiniba iz tableta s inkluzijskim kompleksom DAS:BCD 1:2

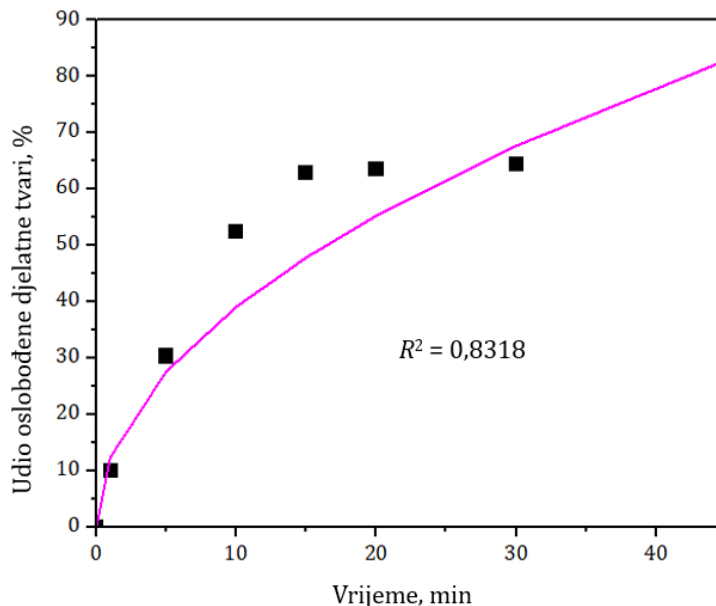
Tablica 9. Parametri modela nultog reda za ispitivane uzorke

| Parametar | Uzorak DAS:BCD 1:1 | Uzorak DAS:BCD 1:2 |
|-----------|----------------------------|----------------------------|
| K_0 | 1,7378 % min ⁻¹ | 1,0246 % min ⁻¹ |

Matematički model koji najbolje opisuje oslobađanje dasatiniba iz tableta s čistim dasatinibom je Higuchi model gdje je vrijednost R^2 jednaka 0,8318. U Higuchi modelu parametar K_H označava Higuchi konstantu koja opisuje brzinu oslobađanja lijeka iz matrice, može se definirati kao:

$$K_H = \frac{Q}{\sqrt{t}} = A\sqrt{D(2C - C_s)C_s}$$

Gdje je Q količina oslobođenog lijeka po jedinici površine, A je površina sustava, D difuzijski koeficijent molekule lijeka, C početna koncentracija lijeka i C_s je topljivost lijeka u matrici. Higuchi model opisuje oslobađanje lijeka kao difuzijski proces temeljen na Fickovom zakonu, ovisan o kvadratnom korijenu vremena. Podaci dobiveni *in vitro* testiranjem oslobađanja lijeka se prikazuju kao kumulativni postotak oslobođenog lijeka u odnosu na kvadratni korijen vremena. Prikaz podudaranja modela s eksperimentalnim podacima prikazan je na slici 39., a parametar K_H iznosi 12,3328 % min^{-0,5}.

**Slika 39.** Testiranje primjenjivosti Higuchi modela u opisu profila oslobađanja dasatiniba iz tableta s čistim dasatinibom

6. ZAKLJUČAK

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

Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije pokazali su promjene u toplinskim svojstvima dasatiniba u pripremljenim uzorcima, što može biti posljedica uspješnog nastajanja inkluzijskog kompleksa s β -ciklodekstrinom. Rendgenska difrakcija pružila je uvid u fazni sastav, pokazujući smanjenje kristalčnosti u usporedbi s čistim dasatinibom, što dokazuje kako je došlo do amorfizacije djelatne tvari u inkluzijskom kompleksu. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama pokazuje karakteristične promjene u apsorpcijskim vrpama koje mogu potencijalno ukazati na interakcije između dasatiniba i β -ciklodekstrina. Nuklearna magnetska rezonancija potvrdila je inkluziju dasatiniba unutar šupljine β -ciklodekstrina pomoću vodikovih veza i dodatno omogućila detaljno razumijevanje molekularne dinamike.

Dobivene tablete karakterizirane su na ujednačenost mase i sadržaja djelatne tvari. Testovima topljivosti dobiveni su profili oslobađanja dasatiniba. Dodatno, matematički su opisani profili oslobađanja ove specifične djelatne tvari.

Testiranja tableta pokazuju zadovoljavajuću ujednačenost masa tableta unutar dozvoljenog intervala. Analiza sadržaja djelatne tvari, provedena UV/Vis spektrofotometrijom, pokazala je kako sve tablete zadovoljavaju uvjete propisane Europskom farmakopejom te su odstupanja od ciljane mase unutar dopuštenih 15 %. Testovi topljivosti dokazali su sporije, ali kontinuirano oslobađanje dasatiniba iz tableta što je i poželjno kod antitumorskih lijekova. Konačno, primjena matematičkih modela za opis kinetike oslobađanja djelatne tvari potvrdila je kako se dobiveni podatci ponašaju u skladu s modelom nultog reda.

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

7. LITERATURA

1. Statista, Health, Pharma and Medtech, Pharmaceutical market worldwide revenue 2001-2023 | Statista (pristup 19. svibnja 2024)
2. M. Mishra, M. Sharma, R. Dubey, P. Kumari, V. Ranjan, J. Pandey, Green synthesis interventions of pharmaceutical industries for sustainable development, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4 (2021)
3. B. A. De Marco, et al., Evolution Of Green Chemistry And Its Multidimensional Impacts: A Review, *Saudi Pharm. J.*, 27 (2018)
4. CAS, Green chemistry in the pharma industry: Sustainable pastures for those who innovate. Green chemistry in the pharma industry: Sustainable pastures for those who innovate | CAS (pristup 19. svibnja 2024.)
5. K.T. Savjani, A.K. Gajjar, J.K.Savjani, Drug solubility: importance and enhancement techniques, *ISRN Pharm.*, (2012)
6. J. S. Patil, D.V. Kadam, S.C. Marapur, M.V. Kamalapur, Inclusion complex system; A novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: A review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2 (2010)
7. J. Kim, O. De Jesus, Medication Routes of Administration, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568677/> (pristup 19. svibnja 2024.)
8. M.A. Alqahtani, M. Kazi, M.A. Alsenaidy, M.Z. Ahmad, *Advances in Oral Drug Delivery*, *Front Pharmacology*, 2021
9. Internacional council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, *Biopharmaceutics classification system-based biowaivers*, M9, 2019
10. S. Sareen, G. Mathew, L. Joseph Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion, *Int J Pharm Investig*, (1) 2012
11. Y. Huang, W.G. Dai, Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs, *Acta Pharm.* 4(1) (2014) str: 18-25
12. G. Mucsi, A review on mechanical activation and mechanical alloying in stirred media mill, *Chem. Eng. Res. Des.*, 148 (2019)
13. Faculty of Science, Charles University, Department of Organic Chemistry, <https://orgchem.natur.cuni.cz/jindrich/home> (pristup 21. svibnja 2024.)

14. D. Velić, M. Knapp, G. Kohler, Supramolecular inclusion complexes between a coumarin dye and β -cyclodextrin to gold surface, *Journal of Molecular Structure*, 598, 2001, str: 49 - 56
15. A. Harada, Cyclodextrin-Based Molecular Machines, *Acc. Chem. Res* 2001, 34, str: 456-464
16. A. Cid-Samamed, J. Rakmai, J. C. Mejuto, J. Simal-Gandara, G. Astray, Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry application, *Food Chemistry*, 384, 2022
17. J. Zhou, G. Yu, F. Huang, Supramolecular chemotherapy based on host-guest molecular recognition: a novel strategy in battle against cancer with bright future, *Chem. Soc. Rev.*, 46, 2017
18. S. Kumar, P.R. Sahoo, V.R. Macwan, J. Kaur, Mukesh, R. Sahney, *Macrocyclic Receptors for Environmental and Biosensing Applications*, CRC Press, 2022,
19. M. Vinodh, F. H. Alipur, A.A Mohamod, T.F. Al-Azemi, *Molecular Assemblies of Porphyrins and Macrocyclic Receptors: Recent Developments in Their Synthesis and Application*, *Molecules* (17) 10, 2012
20. G. Mamardashvili, N. Mamardashvili, O. Koifman, *Macrocyclic Receptors for Identification and Selective Binding of Substrates of Different Nature*, *Molecules* 26 (17) 2021
21. H. Bai, J. Wang, Z. Li, G. Tang, *Macrocyclic Compounds for Drug Delivery in Immune-Modulating Therapy*, *Int J Mol Sci*, 20(9), 2019
22. A. Gu, N.J. Wheate, *Macrocycles as drug-enhancing excipients in pharmaceutical formulations*, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 100(1), 2021, str: 1-15
23. D. G. Jimenez, V. Poongavanam, J. Kihiberg, *Macrocycles in Drug Discovery – Learning from the Past for the Future*, *J. Med. Chem* 66(8), 2023, str: 5377-5396
24. S. Mateti, M. Mathesh, Z. Liu, T. Tao, T. Ramireddy, A. M. Glushenkov, W. Yand, Y. I. Chen, *Mechanochemistry: A force in disguise and conditional effects towards chemical reactions*, *Chemical Communications*, 2021
25. G. Mucsi, *A review on mechanical activation and mechanical alloying in stirred media mill*, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2019
26. N. Fantozzi, J. N. Volle, A. Porcheddu, D. Virieux, F. Garcia, E. Colacino, *Green metrics in mechanochemistry*, *Chem. Soc. Rev.* 52, 2023

27. M. Alrbaihat, A Review of Solid State Mechanochemistry for Drug Synthesis and Modification, AIP Conf. Proc., 2023
28. V.V. Boldyrev, Mechanochemical modification and synthesis of drugs, Journal of Materials Science, 39, 2004
29. M. R. Alrbaihat, Mechanochemical Synthesis of Host-Guest Inclusion Complex of Cyclodextrin: A Review, Biomedicine and Chemical Sciences, 2(2) 2023
30. M. Jug, P. A. Mura, Grinding as Solvent-Free Green Chemistry Approach for Cyclodextrin Inclusion Complex Preparation in the Solid State, Pharmaceutics, 10(4), 2018
31. FDA Administration, mrežna stranica:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021986s7s8lbl.pdf
(pristup 2. lipnja 2024.)
32. A. Cutrignelli, F. Sanarica, A. Lopalco, A. Lopedota, V. Laquintana, M. Franco, Dasatinib / HP- β -CD Inclusion Complex Based Aqueous Formulation as a Promising tool for the Treatment of Pediatric Neuromuscular Disorders, Int J Mol S, 2(3), 2019
33. European Medicines Agency, Mrežna stranica:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/sprycel-epar-scientific-discussion_en.pdf (pristup 2. lipnja 2024.)
34. P. K. Mondal, M. Miremehrabi, S. Rohani, Insight into the Formation of Heteromolecular Hydrogen Bonds between Dasatinib and GRAS Molecules, Organic Process Research & Development, 25 (7), 2021
35. H. H. Patel, M. Trivedi, M. Manier, C. Ren, R. H. Dave, Effect of β -cyclodextrin and Hydroxypropyl β -cyclodextrin on Aqueous Stability, Solubility and Dissolution of Novel Anti-cancer Drug Rigosertib, Journal of Pharmaceutical Research International, 21(3), 2018
36. S. Pedotti, L. Ferreri, R. Migliore, C. G. Leotta, G. M. Pitari, A novel cationic β -cyclodextrin decorated with a choline-like pendant exhibits Iodophor, Mucoadhesive and bactericidal properties, Carbohydrate Polymers, 328, 2024
37. J. Cha, T. Gilmore, P. Lane, J. S. Ranweiler, Stability Studies, Separation Science and Technology, 2011
38. H. L. Ohrem, E. Schornick, A. Kalivoda, R. Ognibene, Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceutical excipient in solid dosage forms?, Pharmaceutical Development and Technology, 19 (3), 2013

39. Mrežna stranica:
<https://www.drugs.com/inactive/polyethylene-glycol-177.html> (pristup 3. lipnja 2024.)
40. Mrežna stranica:
<https://pharmacentral.com/product/croscarmellose-sodium-pharmaceutical-excipient/> (pristup 3. lipnja 2024.)
41. I. K. Ivanković, Napredne metode sinteze nanokristaliničnoga cerijeva(IV) oksida dopiranoga manganom, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
42. P. Gill, T. T. Moghadam, B. Ranjbar, Differential Scanning Calorimetry Techniques Applications in Biology and Nanoscience, J Biomol Tech, 21(4), 2010
43. T. H. Grgurić, Struktura i svojstva materijala, Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu , str: 27-34
44. Mrežna stranica:
[https://chem.libretexts.org/Courses/Franklin and Marshall College/Introduction to Materials Characterization CHM 412 Collaborative Text/Diffraction Techniques /X-ray diffraction \(XRD\) basics and application](https://chem.libretexts.org/Courses/Franklin_and_Marshall_College/Introduction_to_Materials_Characterization_CHM_412_Collaborative_Text/Diffraction_Techniques/X-ray_diffraction_(XRD)_basics_and_application) (pristup 12. lipnja 2024.)
45. Pavkov, G. Bakić, V. Maksimović, B. Matović, Rendgenska difraktometrija praha-XRPD, Sinteza 2019, International scientific conference on information technology and data related research (2019), str: 341-348
46. Mrežna stranica:
[https://chem.libretexts.org/Courses/Franklin and Marshall College/Introduction to Materials Characterization CHM 412 Collaborative Text/Diffraction Techniques /X-ray diffraction \(XRD\) basics and application](https://chem.libretexts.org/Courses/Franklin_and_Marshall_College/Introduction_to_Materials_Characterization_CHM_412_Collaborative_Text/Diffraction_Techniques/X-ray_diffraction_(XRD)_basics_and_application) (pristup 13. lipnja 2024.)
47. Mrežna stranica:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical Chemistry/Physical Methods in Chemistry and Nano Science \(Barron\)/04%3A Chemical Speciation/4.07%3A NMR Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/04%3A_Chemical_Speciation/4.07%3A_NMR_Spectroscopy) (pristup 14. lipnja 2024.)
48. L.G. Wade, Jr., Organic chemistry, 7th Edition, Pearson Prentice Hall, Boston, 2010, str: 169–211, 561–611

49. M. Mlakić, D. Barić, A. Ratković, I. Šagud, I. Čipor, I. Piantanida, I. Odak, I. Škorić, New Charged Cholinesterase Inhibitors: Design, Synthesis, and Characterization. *Molecules* 2024, 29
50. T. K. Špehar, M. Pocrnić, D. Klarić, B. Bertoša, A. Čikoš, M. Jug, J. Padovan, S. Dragojević, N. Galić, Investigation of Praziquantel/Cyclodextrin Inclusion Complexation by NMR and LC-HRMS/MS: Mechanism, Solubility, Chemical Stability, and Degradation Products, *Molecular Pharmaceutics* 18(11)2021
51. I. Škorić, Molekulska spektroskopija, Nastavni tekst, Zavod za organsku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
52. K. H. Ramteke, P. A. Dighe, A. R. Kharat, S. V. Patil, Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review, *Sch. Acad. J. Pharm.* 3(5) (2014) 388-396
53. J. Siepman, F. Siepman, Mathematical modeling of drug delivery, *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 328-343
54. K. Jozinović, Priprava i karakterizacija minitableta, Diplomski rad, 2021., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

8. POPIS SIMBOLA I AKRONIMA

Simboli korišteni u radu:

| | |
|------------|---|
| A | površina sustava (cm^2) |
| B_0 | magnetsko polje (T) |
| c | molna koncentracija (mol L^{-1}) |
| C | početna koncentracija lijeka (mg cm^{-3}) |
| C_s | topljivost lijeka u matrici (mg cm^{-3}) |
| D | difuzijski koeficijent molekule lijeka ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$) |
| K_0 | konstanta brzine oslobađanja u modelu nultog reda ($\% \text{min}^{-1}$) |
| K_1 | konstanta brzine oslobađanja u modelu prvog reda, ($\% \text{min}^{-1}$) konstanta brzine oslobađanja 1 u Peppas-Sahlin modelu koja se odnosi na doprinos difuzije, ($\% \text{min}^{-m}$) |
| K_2 | konstanta brzine oslobađanja 2 u Peppas-Sahlin modelu koja se odnosi na doprinos erozije, ($\% \text{min}^{-2m}$) |
| K_H | konstanta brzine oslobađanja u Higuchi modelu, ($\% \text{min}^{-0.5}$) |
| K_{KP} | konstanta brzine oslobađanja u Korsmeyer-Peppas modelu, ($\% \text{min}^{-n}$) |
| E | energija (J) |
| F | funkcija (-) |
| h | Planckova konstanta (Js) |
| m | masa tablete (mg) eksponent koji ovisi o geometriji dozirnog oblika lijeka, parametar Peppas-Sahlin modela (-) |
| M_0 | količina neoslobođene djelatne tvari na početku procesa oslobađanja, $t = 0$ (ppm) |
| M_t | količina oslobođene djelatne tvari nakon nekog vremena t (ppm) |
| M_∞ | količina oslobođene djelatne tvari u beskonačnom vremenu, $t = \infty$ (ppm) |
| N | difuzijski koeficijent oslobađanja, parametar Korsmeyer-Peppas modela (-) |
| pH | mjera kiselosti/lužnatosti (-) |
| R | otpornost termoelktričnog diska (Ω) |
| R^2 | vrijednost srednjeg kvadratnog odstupanja (-) |
| Q | topliski tok (W) Količina oslobođenog lijeka po jedinici površine (mg cm^{-2}) |
| T | temperatura ($^\circ\text{C}$) |
| t | vrijeme (min) |

Grčki simboli:

| | |
|-----------|---|
| α | parametar skale koji opisuje vremensku ovisnost parametar Weibull modela (-) |
| β | oblik krivulje topljivosti, parametar Weibull modela (-) |
| γ | žir magnetski omjer (-) |
| θ | kut difrakcije ($^\circ$) |
| λ | valna duljina zračenja (nm, Å) |

Akronimi korišteni u radu:

| | |
|------|---|
| BCD | β -ciklodekstrin |
| BCS | <i>Biopharmaceutics Classification System</i> Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari u oralnim dozirnim oblicima |
| DAS | dasatinib |
| DCS | <i>Differential Scanning Calorimetry</i> Diferencijalna pretražna kalorimetrija |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> Američka agencija za hranu i lijekove |
| FTIR | <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> Nuklearna Magnetska rezonancija |
| PEG | poli(etilen-glikol) |
| PFTE | politertaflouroetilen |
| TMS | tetrametilsilan |
| UV | ultraljubičasto zračenje |
| Vis | vidljivi spektar elektromagnetskog zračenja |
| XRPD | <i>X-ray Power Diffraction</i> Rendgenska difrakcijska analiza praha |