

Primjena prirodnih niskotemperaturnih eutektskih otapala za poboljšanje topljivosti djelatne tvari

Pacina, Dragana

Undergraduate thesis / Završni 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:149:903478>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Dragana Pacina

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2024.

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

Kandidatkinja Dragana Pacina

Predala je izrađen završni rad dana: 30. kolovoza 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 4. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Dragana Pacina

PRIMJENA PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA POBOLJŠANJE TOPLJIVOSTI
DJELATNE TVARI
ZAVRŠNI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

prof. dr. sc. Aleksandra Sander


izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, rujan 2024.

*Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije na Zavodu
za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo pod mentorstvom prof. dr. sc.
Jasne Prlić Kardum.*

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum, na prenesenom znanju, pomoći, savjetima te vremenu i trudu uloženom u izradu ovog završnog rada.

Zahvaljujem asistentici Ivi Zokić, mag. ing. oecoing., na velikoj pomoći oko provedbe eksperimentalnog dijela ovog rada, stvaranju ugodnog i poticajnog radnog okruženja i svakom savjetu i podršci.

Svojoj obitelji i prijateljima zahvaljujem na pruženoj podršci, uljepšavanju i uveseljavanju mojih dosadašnjih studentskih dana. 

SAŽETAK

Niskotemperaturna eutektička otapala nova su klasa otapala dobivena jednostavnim miješanjem najmanje dviju komponenti, donora i akceptora vodikove veze. Karakterizira ih značajno snižena temperatura tališta u odnosu na tališta čistih komponenata, nizak tlak para i veća gustoća od gustoće vode. Zbog povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava u farmaceutskoj se industriji koriste za poboljšanje topljivosti, permeabilnosti, stabilnosti i apsorpcije djelatne tvari, što vodi do povećanja bioraspoloživosti.

U ovome su radu pripravljena i karakterizirana niskotemperaturna eutektička otapala nastala miješanjem različitih netoksičnih komponenata u određenim omjerima. U tako pripravljena otapala dodana je određena masa djelatne tvari, ceritiniba. Cilj je dobiti stabilno niskotemperaturno otapalo boljih svojstava koje će povećati topljivost djelatne tvari. Pripremljenim otapalima određena su gustoća, viskoznost i pH vrijednost. Kako bi se potvrdio nastanak vodikovih veza među komponentama, provedena je analiza na infracrvenom spektrofotometru s Fourierovom transformacijom. Primjenom UV/VIS spektrofotometrijske analize i određivanjem indeksa loma na refraktometru praćena je koncentracija pri ispitivanju topljivosti ceritiniba.

Ključne riječi: ceritinib, djelatna tvar, terapijsko niskotemperaturno eutektičko otapalo, topljivost

ABSTRACT

Deep eutectic solvents are a new class of solvents obtained by simply mixing at least two components, a hydrogen bond donor and an acceptor. They have a significantly lower melting point than pure components, a lower vapor pressure and a higher density than water. As a result of their physicochemical characteristics, they are utilized in the pharmaceutical industry to enhance drug solubility, permeability, stability and absorption, which leads to increased bioavailability.

This paper prepared and characterized deep eutectic solvents by mixing different non-toxic components in a specific molar ratio. A certain amount of an active pharmaceutical ingredient, ceritinib, was added to the prepared solvents. The purpose of the work is to prepare a stable, deep eutectic solvent with better properties that will increase the solubility of an active pharmaceutical ingredient. The densities, viscosities, and pH values of the prepared solvents were determined. In order to confirm the formation of hydrogen bonds between the mixed components, an analysis was performed on an infrared spectrophotometer with Fourier transformation. The solubility of ceritinib was tested by measuring its concentration using refractive index and UV/VIS spectrophotometric analysis.

Key words: active pharmaceutical ingredient, ceritinib, solubility, therapeutic deep eutectic solvent

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Djelatna tvar	3
2.1.1. Topljivost djelatne tvari.....	3
2.1.2. Klasifikacija djelatne tvari	4
2.1.3. Problemi vezani uz nisku topljivost i bioraspoloživost.....	5
2.2. DES	6
2.2.1. Metode priprave	7
2.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva	8
2.2.3. Podjela DES-ova	10
2.2.4. Primjena DES-ova u farmaceutskoj industriji.....	12
2.2.5. Svojstva djelatne tvari koja poboljšavaju THEDES-i	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Svrha rada.....	14
3.2. Materijali	14
3.3. Priprema DES-a.....	15
3.4. Karakterizacija DES-a.....	16
3.4.1. Gustoća.....	17
3.4.2. Viskoznost	17
3.4.3. pH vrijednost.....	18
3.4.4. Fourierova pretvorna infracrvena spektroskopija	18
3.5. Određivanje topljivosti API-ja u DES-u.....	18
3.5.1. UV/VIS spektrofotometrija	19
3.5.2. Određivanje indeksa loma	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Karakterizacija pripremljenih DES-ova	21
4.2. Određivanje topljivosti CRT-a.....	25
4.2.1. UV/VIS spektrofotometrija	27
4.2.2. Određivanje indeksa loma	30
4.3. FTIR analiza pripremljenih API-DES-ova	32
5. ZAKLJUČAK	36
6. POPIS SIMBOLA I KRATICA	37
Simboli	37
Kratice	38
7. LITERATURA	40

1. UVOD

Slaba topljivost djelatne tvari (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API) u vodi glavni je problem s kojim se farmaceutska industrija suočava prilikom proizvodnje lijekova. Posljedice slabe topljivosti u vodi niska su bioraspoloživost i permeabilnost API-ja. Zbog toga je primarni cilj farmaceutske industrije poboljšati djelotvornost postojećih, klinički ispitanih lijekova. Kao inovativna metoda unaprjeđenja farmaceutskih formulacija razvijena su niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *deep eutectic solvents*, DES). [1,2]

DES-ovi su klasa otapala nastala miješanjem dviju ili više organskih komponenata međusobno povezanih vodikovim vezama. Takve mješavine karakterizira temperatura tališta niža od one pojedinačnih komponenata. Glavne prednosti DES-a u odnosu na tradicionalna otapala su: niska citotoksičnost, dobra biorazgradnja i mogućnost otapanja u vodi netopljivih ili slabo topljivih kemijskih komponenata. Povećanje topljivosti i stabilnosti API-ja dva su glavna načina povećanja bioraspoloživosti nekog lijeka. [3]

Prikladan odabir komponenata, donora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond donor*, HBA) i akceptora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond acceptor*, HBA) ključan je korak u pripravi DES-a. Terapeutski učinak lijeka moguće je znatno poboljšati ako jednu od komponenata DES-a čini API. Tako pripravljeno otapalo pripada skupini terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *therapeutic deep eutectic solvents*, THEDES). Pripravljaju se miješanjem API-ja s nekom netoksičnom komponentom u određenom molarnom omjeru, pri čemu nastaje kapljevinna stabilna na sobnoj temperaturi. Primjena THEDES-a danas je zastupljena u području medicine, farmacije i biotehnologije. Pripadaju skupini zelenih otapala zbog svoje netoksičnosti i dobre biorazgradivosti, a uz to su i relativno jeftina i jednostavna za pripravu. [1,4] Osim navedenog, moguće je pripremiti otopine API-ja u DES-u. Ovakvi sustavi nazivaju se API-DES, a u dosadašnjim istraživanjima pokazali su znatno povećanje topljivosti API-ja i dobru stabilnost tijekom vremena. [5]

Većina API-ja, čija se topljivost i stabilnost nastoje povećati prethodno opisanim otapalima, pripadaju drugoj skupini Biofarmaceutskog sustava klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS). [1]

U ovome je radu pripremljeno šest različitih DES-ova, provedena je njihova karakterizacija te je u pripremljenim otapalima određena topljivost ceritiniba (CRT), komercijalnog imena

Zykadia. CRT je API koji se koristi za liječenje raka pluća nemalih stanica, a pripada IV. skupini po BCS klasifikaciji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Djelatna tvar

Svaka vrsta lijeka sačinjena je od dviju osnovnih komponenata, pomoćne i djelatne tvari. Pomoćna je tvar kemijski inertna komponenta koja lijeku daje boju i okus, povećava njegovu stabilnost i apsorpciju prilikom konzumacije. API je dio lijeka koji izaziva željeni terapijski učinak u dijagnozi, prevenciji ili liječenju bolesti. Nositelj je bioloških svojstava lijeka. U farmaceutskoj industriji djelatne tvari podijeljene su u nekoliko skupina. Svaku skupinu API-ja karakteriziraju specifična svojstva i jedinstveni način proizvodnje kako bi se osigurala stabilnost i sigurnost farmaceutskih proizvoda. Standardne metode pripreme API-ja uključuju kemijsku sintezu, izolaciju djelatne tvari iz biljnih i životinjskih izvora, klasičnu fermentaciju i biotehnologiju. [6,7]

Topljivost i permeabilnost djelatne tvari ključna su svojstva koja određuju terapijski učinak lijeka. Ovisno o izraženosti tih svojstava u BCS-u postoje četiri skupine djelatnih tvari. [1]

2.1.1. Topljivost djelatne tvari

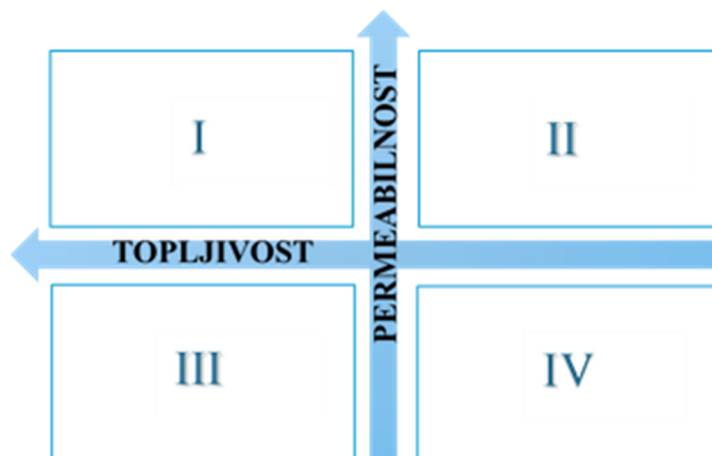
Kako bi konzumacija lijekova bila što jednostavnija i dostupnija, farmaceutska industrija usmjerena je na proizvodnju tekućih formulacija lijekova. Zbog netoksičnosti i nezapaljivosti, vodene otopine predstavljaju najbolji izbor. Unatoč tome, slaba sposobnost otapanja organskih tvari, visoko talište i visoka molarna entalpija isparavanja glavni su ograničavajući faktori primjene vode kao otapala. [7] Otprilike 40 % klinički testiranih lijekova i gotovo 90 % lijekova u razvoju slabo su topljivi u vodi. API se razgrađuje i postaje nestabilan u vodenom okruženju. Uslijed dugog skladištenja lijeka u vodi, API često podliježe postupku hidrolize. [1,3]

Slaba topljivost API-ja u vodi odgovorna je za nisku bioraspoloživost lijeka. Bioraspoloživost se definira kao omjer koncentracije lijeka koji nepromijenjen dopire u krvotok nakon primjene bilo kojim putem i koncentracije lijeka u krvi nakon intravenske primjene. U određenoj je mjeri bioraspoloživost moguće povećati prikladnim odabirom pomoćne tvari lijeka. Slabo topljivi lijekovi u svome sastavu trebaju sadržavati pomoćne tvari poput površinski aktivnih tvari ili tvari za vlaženje kako bi se ubrzalo oslobađanje i otapanje lijeka. Takve tvari aktivno doprinose bioraspoloživosti slabo topljivih tvari i povećavaju permeabilnost kroz biološke barijere. Učinak koji određena pomoćna tvar ima na apsorpciju lijeka ovisi o količini

i vrsti lijeka, kao i njegovoj formulaciji. Osim promjena unutar sastava lijeka, proizvodnja farmaceutskih proizvoda usmjerena je razvoju otapala koja će omogućiti veću topljivost API-ja u odnosu na vodu. [8,9]

2.1.2. Klasifikacija djelatne tvari

BCS klasificira API-je u četiri biofarmaceutske skupine s obzirom na njihovu topljivost i permeabilnost (Slika 2.1.) Korištenje BCS-a u razvoju farmaceutskih proizvoda veliki je iskorak na području oralne primjene lijekova. Prvoj skupini pripadaju dobro topljivi i permeabilni API-ji koji se brzo oslobađaju iz lijeka i osiguravaju visoku bioraspodivnost. Zbog povoljnih svojstava, API-ji prve skupine zahtijevaju jednostavan formulacijski pristup. Za slabo topljive i dobro permeabilne API-je druge skupine formulacijski je pristup znatno složeniji. Poboljšanje topljivosti tih tvari zahtijeva različite farmaceutsko-tehnološke pristupe, poput prilagodbe kristalnog oblika djelatne tvari, prilagodbe pH vrijednosti, prevođenja API-ja u amorfno stanje i izrade farmaceutskih oblika zasnovanih na lipidima. Smanjenje veličina čestica API-ja, mikronizacija, postupak je kojim se u određenoj mjeri povećava brzina otapanja API-ja druge skupine, s ograničenim učinkom na bioraspodivnost. Većina API-ja pripada upravo drugoj skupini. Treća su skupina API-ji dobre topljivosti i slabe permeabilnosti, što ograničava apsorpciju lijeka. Posljednja skupina BCS-a obuhvaća API-je svojstava nepoželjnih za razvoj lijekova za oralnu primjenu. Karakterizira ih niska razina topljivosti i vrlo slaba permeabilnost. Njihova je primjena zbog toga vrlo ograničena. Ovakav sustav klasifikacije prihvatila su regulatorna tijela: Europska agencija za lijekove (EMA), Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO). Pozitivan učinak kategorizacije prema BCS-u predstavlja skraćeno vrijeme proizvodnje farmaceutskih proizvoda, kao i znatno smanjenje proizvodnih troškova. [10-12]



Slika 2.1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije API-ja.

BCS karakterizaciju provodi kvantifikacijom dvaju svojstava, topljivosti i permeabilnosti API-ja. Ako se najveća doza API-ja otapa u manje od 250 mL vodenog medija u pH području između 1,2 i 6,8 pri temperaturi 37 °C, API se smatra dobro topivim. API pokazuje dobru permeabilnost ako njegova apsorpcija dosegne 90 ili više posto primijenjene doze. Kako bi se procijenio opseg intestinalne apsorpcije, koriste se *in vivo* i *ex vivo* modeli intestinalnih barijera. [10]

2.1.3. Problemi vezani uz nisku topljivost i bioraspoloživost

Kako bi se povećala bioraspoloživost lijekova druge skupine BCS-a potrebno je pronaći otapala čija će fizikalno-kemijska svojstva omogućiti veću topljivost API-ja. Iako organska otapala pružaju veću topljivost i stabilnost API-ja, njihova primjena nije poželjna. Riječ je o toksičnim i zapaljivim otapalima koja nisu u skladu sa zahtjevima zelene kemije. Mnoga organska otapala imaju i neugodan okus i miris. Ionske kapljevine potencijalna su otapala takvih, u vodi slabo topljivih, API-ja. Koriste se za pripremu stabilnih mikroemulzija koje omogućuju transdermalnu primjenu slabo topljivih lijekova. Uz prednosti koje nude, ionske kapljevine stvaraju i određene izazove farmaceutskoj proizvodnji. Njihova slaba biorazgradivost, održivost i biokompatibilnost glavna su prepreka njihovoj široj konzumaciji i razvoju. U okviru zelene kemije od velike je važnosti razvoj i pronalazak odgovarajuće zamjene za štetna organska otapala. [3]

Pažnja znanstvenika sve je više usmjerena ekološki prihvatljivim i prilagodljivim otapalima, dobivenim iz prirodnih izvora. Zbog niske toksičnosti, nezapaljivosti i dobre biorazgradivosti,

u posljednje se vrijeme istražuju DES-ovi kao nova otapala u području kemijske sinteze, biomedicine i biokatalize. Svojim specifičnim fizikalno-kemijskim svojstvima omogućuju puno veću topljivost i permeabilnost API-ja. [13]

2.2. DES

Eutektička se otapala definiraju kao smjese dviju ili više komponenata koje zbog prisutnosti jakih vodikovih veza između komponenata mogu tvoriti kapljevinu. U jedinstvenom molarnom omjeru takve smjese postižu znatno nižu temperaturu tališta u odnosu na pojedinačne komponente. Pojam niskotemperaturno otapalo odnosi se na otapalo koje postiže značajno sniženje temperature tališta, a pri sobnoj se temperaturi nalazi u kapljevitom stanju. Kemijske vrste koje u većini slučajeva tvore DES su: alkoholi, amini, ugljikohidrati i karboksilne kiseline.

Na temelju kemijskih vrsta koje čine strukturu vodikovih veza, niskotemperaturna eutektička otapala mogu se podijeliti u sljedeće četiri kategorije:

Tip 1: kvaterna amonijeva sol i halogenid metala (Zn, Sn, Fe)

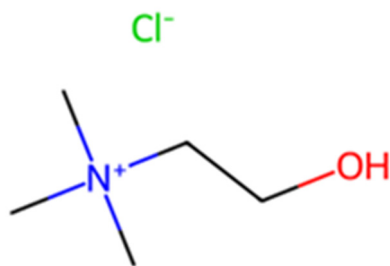
Tip 2: kvaterna amonijeva sol i halogenid metala (Cr, Co, Fe)

Tip 3: kvaterna amonijeva sol i donor vodikove veze (amid, kiselina, alkohol)

Tip 4: halogenid metala i donor vodikove veze (amid, alkohol). [13]

Većina DES-ova pripada trećem tipu koji se temelji na mješavini lako dostupnih i relativno jeftinih kemijskih spojeva. Netoksična kvaterna amonijeva sol predstavlja HBA komponentu, dok je HBD komponenta najčešće organska kiselina. Zbog karakterističnih bioloških, kemijskih i fizikalnih svojstava karboksilne su kiseline posebno značajne u razvoju DES-ova. U sastavu DES-a može se nalaziti i voda, upravo zbog mogućnosti tvorbe vodikovih veza. Voda se u DES dodaje kada je potrebno smanjiti viskoznost i gustoću otapala. Pažljivim odabirom komponenata i omjera u kojem se uzimaju, moguće je prirediti DES specifičnih, željenih svojstava. [1,13,14]

Najzastupljenija kvaterna sol upotrebljavana kao HBA komponenta jest kolin klorid (Slika 2.2.) Riječ je o netoksičnoj, biorazgradivoj i relativno jeftinoj kemijskoj komponenti zastupljenoj u različitim vrstama farmaceutskih, kozmetičkih i prehrambenih proizvoda. [13]

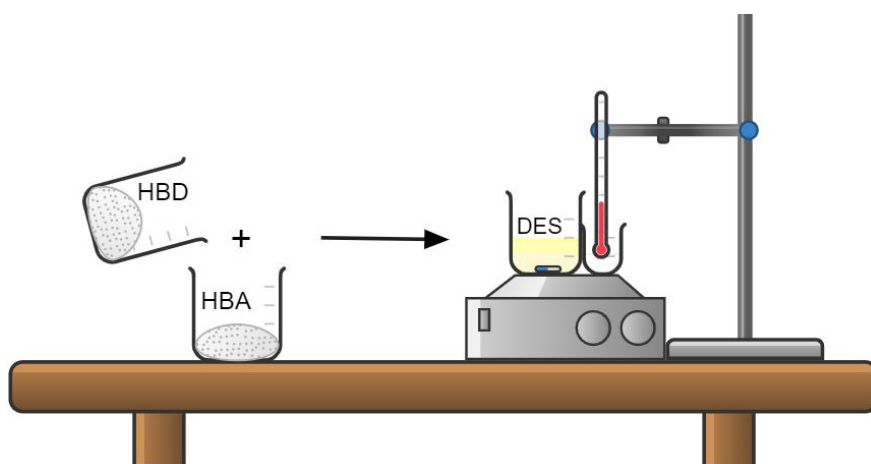


Slika 2.2. Struktura kolin klorida.

2.2.1. Metode priprave

Priprava DES-a relativno je jednostavan postupak. U najjednostavnijem slučaju uključuje samo miješanje najmanje dviju komponenata (Slika 2.3.), uz zagrijavanje. Krute ili kapljevite komponente, HBA i HBD, pripremaju se u točno određenom molarnom omjeru kako bi se dobilo otapalo željenih fizikalno-kemijskih karakteristika i visoke stabilnosti. [1]

Nakon što se vaganjem odredi potrebna masa, komponente se neprestano miješaju pri povišenoj temperaturi (od 50 do 80 °C), čime se postiže homogenizacija. Ako je voda nužna za pripravu DES-a, dodaje ju se izravno s ostalim komponentama ili se nakon priprave dodaje u otapalo. Temperaturu na kojoj se odvija miješanje potrebno je kontrolirati kako bi se izbjegla moguća razgradnja kemijskih komponenata. Budući da ovakvim postupkom priprave ne dolazi do kemijske reakcije, a time ni do stvaranja međuprodukata, priprava DES-a zadovoljava zahtjeve održive, zelene kemije. [1-3,13]



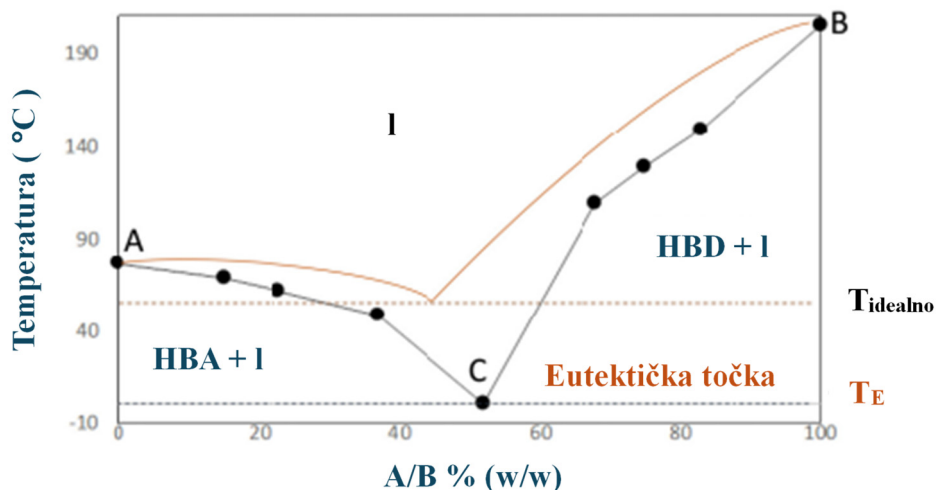
Slika 2.3. Shematski prikaz formiranja DES-a.

Čistoća pripremljenih otapala ovisi isključivo o čistoći polaznih, čistih komponenata i mogućih produkata kemijske razgradnje. Postoji još nekoliko metoda pripreme kojima je prvi korak zajednički – miješanje HBA i HBD u određenom molarnom omjeru. Metoda usitnjavanja uz homogenizaciju podrazumijeva usitnjavanje komponenata pri sobnoj temperaturi, uz neprestano miješanje do nastanka eutektičke smjese. Ovom se metodom priređuju otapala najviše čistoće jer je zbog sobne temperature izbjegnuta mogućnost degradacije komponenata. Također je moguće prirediti DES otapanjem komponenata u vodi. Voda se potom uklanja uparavanjem na 50 °C pri sniženom tlaku ili liofilizacijom, pri čemu zaostaje nehlapivi DES. Primjenom alternativnih izvora energije, komponente se pomiješaju, a zatim se homogenizacija i zagrijavanje provode primjenom mikrovalnog zračenja ili ultrazvuka. Vrijeme pripreme time je znatno skraćeno, no metoda nije praktična poput onih kojima se homogenizacija postiže miješanjem. Nagli lokalni porasti temperature smjese karakteristični su za primjenu mikrovalova i ultrazvuka. Do njih dolazi uslijed lokalnog povišenja temperature zbog visokih dielektričnih konstanti, odnosno pojave kavitacije. Suprotno tome, klasični postupci pripreme DES-a održavaju stalne vrijednosti temperature u cijelom uzorku, zbog čega se u praksi najčešće koriste. [1,13]

2.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva

Pri specifičnom molarnom omjeru DES postiže temperaturu tališta znatno nižu od tališta čistih komponenata. Pri toj se temperaturi DES i dalje može nalaziti u kapljevitom stanju. Općenito je karakteristično za ova otapala da im je talište ispod 50 °C, a prema nekim podacima riječ je o temperaturnom rasponu od 20 do 36 °C, što je povoljno za većinu biomedicinskih zahtjeva. Vrijednost eutektičke točke u direktnoj je vezi sa strukturom DES-a koju čini složena mreža vodikovih veza. Takva je struktura odgovorna za sljedeća fizikalno-kemijska svojstva: nizak tlak para, visoka viskoznost i obično veća gustoća od gustoće vode. Budući da postoji velik broj HBA i HBD komponenti, moguće je prirediti DES-ove raznolikih struktura, svojstava i primjene. [9,13]

Faznim dijagramom (Slika 2.4.) grafički se prikazuju uvjeti pri kojima su faze nekoga sustava stabilne.



Slika 2.4. Fazni dijagram binarnog DES-a s naznačenom eutektskom točkom.

DES-ovima je svojstvena gustoća veća od gustoće vode i ponekih organskih otapala (etanol, metanol, etil-acetat i n-heksan). Za većinu DES-ova to je raspon od 1,1 do 1,4 g cm⁻¹. Osim visoke gustoće, većina otapala ima visoke vrijednosti viskoznosti, čiji je raspon pri 40 °C od 0,02 do 0,5 Pa s. Najgušća i najviskozija su ona otapala na bazi kolin klorida, sa šećerom kao HBD komponentom. Otapala na bazi poliola najmanje su viskozna i gusta. Iako je dodavanjem vode moguće po želji mijenjati vrijednosti ovih dvaju svojstava, prevelika količina vode može razbiti kompleksnu strukturu vodikovih veza što rezultira gubitkom pojedinih vodikovih veza među komponentama i nastajanjem vodenih otopina. Pri većim masenim udjelima vode prevladat će interakcije voda – voda i otapalo – voda. [13]

Kiselost otapala ističe se kao važno svojstvo. Ona otapala koja sadrže organsku kiselinu kao HBD komponentu kisela su, a njihove pH vrijednosti manje su od 3. Primjer je takvog DES-a otapalo koje čine kolin klorid i limunska kiselina, čiji je pH 0,83. Suprotno tome, ako je HBD komponenta amid, otapala su vrlo bazična, s pH vrijednostima iznad 8. Urea i kolin klorid tvore bazični DES, s pH vrijednosti 8,51. Sljedeće važno svojstvo jest polarnost. Najpolarnija su ona otapala na bazi organskih kiselina, dok su najmanje polarna na bazi šećera i poliola. Većina, u literaturi opisanih, DES-ova hidrofilnog su karaktera. [13]

2.2.3. Podjela DES-ova

Kako bi se bolje razumjela potreba za razvojem DES-ova, provedena je njihova podjela u nekoliko skupina. Podjela se temelji na podrijetlu vrsta unutar strukture DES-a i/ili njihovoj primjeni, kako slijedi:

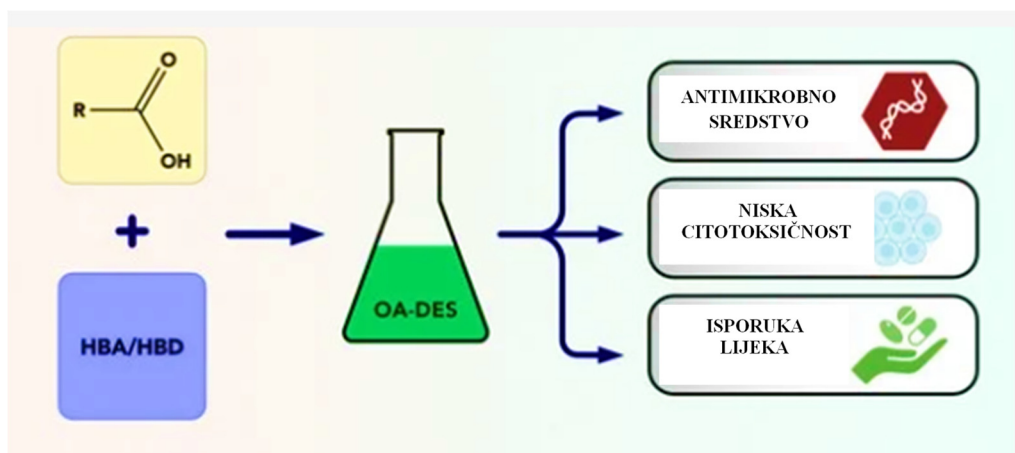
1. prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *natural deep eutectic solvents*, NADES)
2. terapijska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *therapeutic deep eutectic solvents*, THEDES)
3. hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *hydrophobic deep eutectic solvents*, HDES)
4. niskotemperaturna eutektička otapala na bazi organskih kiselina (engl. *organic acid-deep eute ctic solvents*, OA-DES).

NADES-i su skupina DES-ova pripremljena od prirodnih spojeva, kao što su ugljikohidrati, amini i karboksilne kiseline. Karakterizira ih niska toksičnost i visoka biorazgradivost, zbog čega se smatraju najzelenijom skupinom DES-ova. Takve su biomolekule u prirodi vrlo rasprostranjene i time lako dostupne, što ih čini pogodnima za primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Ovoj skupini pripadaju smjesa glukoze i saharoze, kao i otapalo sačinjeno od kolin klorida i maleinske kiseline. Smatraju se vrlo efikasnim otapalima za povećanje topljivosti. [14,15]

Ako se u strukturi DES-a kao jedna od komponenata nalazi API, otapalo pripada skupini THEDES-a. Osnovna je prednost ovih otapala u odnosu na ostale skupine mogućnost otapanja slabo topljivih lijekova, povećanje njihove bioraspoloživosti i terapijskog učinka. Primjeri THEDES-a jesu smjesa metanola i ibuprofena, kao i smjesa kolin klorida i geranske kiseline. U navedenim primjerima API čini samo jednu komponentu DES-a, dok je druga komponenta neki organski spoj. Moguće su kombinacije u kojima THEDES čine dva različita API-ja, čime takvo otapalo poprima dualnu terapijsku funkciju. [14,15] Ako se u već pripremljenom DES-u otopi API, dobiveni se sustav naziva API-DES. Za takve je sustave karakteristično znatno povećanje topljivosti i stabilnosti tijekom vremena. U novijim studijama istražuje se njihova primjena kao poboljšani način unosa i isporuke API-ja. Osim poboljšanja bioraspoloživosti, primjenom ovakvih otopina nastoji se izbjeći nepravilna apsorpcija lijeka i povećati njegova koncentracija nakon unosa. [5]

HDES-i su skupina DES-ova, koja zbog prisutnosti hidrofobne komponente ima nisku topljivost u vodi. Potreba za njihovim razvojem javila se u okviru zelene kemije, kako bi se ekstrahirale nepolarne komponente iz raznih prirodnih izvora. To uključuje ekstrakciju iz esencijalnih ulja, masnih kiselina i drugih lipofilnih tvari. HDES-i su sintetizirani i testirani kao potencijalna otapala za ekstrakciju mikro zagađivača iz vodenog okoliša. [15]

Kao posebna skupina DES-ova mogu se istaknuti ona na bazi organskih kiselina, OA-DES. Najčešće je riječ o karboksilnim kiselinama. Prisutnost karboksilne skupine obogaćuje molekulu hidrofilnošću, što je vrlo važno kemijsko svojstvo za primjenu otapala u medicini. Antibakterijsko djelovanje važno je svojstvo organskih kiselina. Neke od kiselina te skupine mogu reagirati sa lipidnim slojem bakterija, pri tome ih otapaju i mijenjaju njihov naboj i permeabilnost. Zahvaljujući njihovoj strukturi, koja dozvoljava formiranje mreže vodikovih veza, organske su kiseline česte HBA i HBD komponente u formaciji DES-a (Slika 2.5.) Takve su formulacije dobro topive u vodi, sa visokom permeabilnosti organskih kiselina, što svrstava OA-DES u prvu skupinu BCS-a. [14]



Slika 2.5. Shematski prikaz pripreme DES-a na bazi organske kiseline (OA-DES), karakteristike i primjena.

2.2.4. Primjena DES-ova u farmaceutskoj industriji

Isporuka lijeka obuhvaća formuliranje, proizvodne tehnike, skladištenje i tehnologije uključene u transport API-ja do ciljnog mjesta na kojemu je potrebno ostvariti određeni terapijski učinak. Prilikom isporuke lijeka često se nailazi na problem niske bioraspoloživosti, čiji uzroci mogu biti: niska permeabilnost i stabilnost, slaba topljivost ili pogrešan način primjene lijeka. Nekoliko je različitih strategija kojima farmaceutska industrija nastoji riješiti ovaj problem, no cilj je uvijek isti – postići primjenu što manje koncentracije lijeka. Ključno je povećati permeabilnost i topljivost lijeka i omogućiti njegovu stabilnost. [14]

DES-ovi su u farmaceutskoj industriji predstavljeni kao obećavajuće rješenje za probleme vezane uz razvoj i proizvodnju lijekova. Ta su otapala od iznimnog potencijala za industrijsku primjenu. U pravilu je riječ o jeftinim i za pripravu jednostavnim otapalima koja se mogu dizajnirati za određenu svrhu. Kako bi se izbjegli dodatni proizvodni troškovi i *in vivo* testiranja, DES-ovi se pripremaju od onih tvari čiji su toksikološki profili već ispitani. Njihova je glavna prednost poboljšanje topljivosti slabo topljivih spojeva, a u farmaceutskom se inženjerstvu sve više koriste kao sustavi za kontroliranu isporuku lijekova. Imaju mogućnost ugradnje API-ja u svoju formulaciju, pri čemu daju određeni terapijski učinak koji se može po želji modificirati. Primjenom ovih otapala poboljšava se fizikalna i kemijska stabilnost API-ja tijekom dužeg perioda skladištenja u vodi, čime se izbjegava kemijska razgradnja. Ako molekula lijeka sadrži polarnu funkcionalnu grupu, HBD iz DES-a s tom grupom može dijeliti vodikovu vezu stabilizirajući tako molekulu i sprječavajući njezino taloženje. Suprotno tome, ako molekula lijeka sadrži nepolarnu grupu, HBA komponenta DES-a s njom može tvoriti van der Waalove interakcije i na taj način otapati molekulu lijeka. [1,4,13,14,16,17]

Budući da ova otapala znatno povećavaju topljivost API-ja i biomolekula u vodenom mediju, omogućila su nove načine primjene već testiranih i korištenih lijekova. Novija istraživanja ukazala su na postojanje DES-a kao medija u organizmu, uz vodu i lipide. Unutar stanice imaju važnu kemijsku i fiziološku ulogu koja im omogućuje sudjelovanje u biosintezi i procesima otapanja nestabilnih spojeva i metabolita. Iz tih su razloga u farmaceutskoj industriji DES-ovi od iznimnog značaja za razvoj i unaprjeđenje lijekova. [13]

2.2.5. Svojstva djelatne tvari koja poboljšavaju THEDES-i

Otapala koja u svome sastavu sadrže API kao jednu od komponenata, THEDES-i, proizvest će željeni terapijski učinak samo uz povoljna svojstva API-ja. Da bi se takva otapala mogla koristiti u procesu razvoja lijekova, moraju poboljšati sljedeća svojstva:

- topljivost
- permeabilnost i
- stabilnost.

Posljedično, poboljšanje navedenih triju svojstava rezultirat će povećanjem bioraspoloživosti lijeka, što je primarni cilj farmaceutske proizvodnje.

Iako je voda najpoželjnije otapalo za farmaceutike, slaba topljivost ograničavajući je faktor u njezinoj primjeni. Nova klasa otapala omogućila je znatno poboljšanje topljivosti API-ja, a time i lakše prodiranje kroz biološke barijere. Dobra permeabilnost važna je za transport API-ja kroz gastrointestinalnu membranu do tkiva i organa kojima je potrebno ciljano terapijsko djelovanje. Velika brzina otapanja i brzo oslobađanje API-ja iz lijeka osiguravaju visok stupanj apsorpcije lijeka. Navedene karakteristike od velike su važnosti u slučaju oralne apsorpcije lijeka, čija se učinkovitost nastoji što više povećati.

Nedovoljna stabilnost još je jedan od nedostataka vode i tradicionalnih organskih otapala. Stabilnost lijeka odnosi se na njegovu sposobnost da zadrži svoju strukturu u danom okruženju, odnosno biološkim uvjetima unutar organizma. DES-ovi osiguravaju znatno veću kemijsku stabilnost API-ja i sprječavaju njegovu toplinsku razgradnju. [4,16,18]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

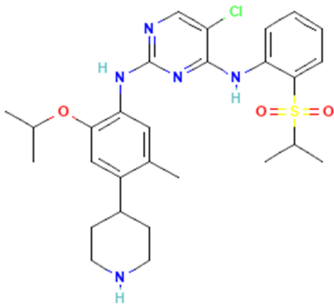

3.1. Svrha rada

U radu je pripremljeno i karakterizirano 6 DES-ova. Ispitivanjem topljivosti CRT-a u pripremljenim DES-ovima određeni su pogodni DES-ovi za pripravu API-DES-a. Ovisno o komponentama od kojih su pripremljeni DES-ovi primjenjene su različite metode za određivanje koncentracije CRT-a: UV spektrofotometrija ili mjerenje indeksa loma na refraktometru.

3.2. Materijali

CRT se koristi kao monoterapija za liječenje odraslih bolesnika, oboljelih od raka pluća nemalih stanica. Komercijalno dostupni lijek je *Zykadia*, a riječ je o kemijskom spoju molekulske formule $C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$. To je praškasta kruta tvar bijele do žute boje s dobrom topljivosti u kiselom, organskom mediju. Topljivost CRT-a u vodi iznosi tek 0,002 mg/mL, dok je u organskim otapalima znatno veća: etanol (16 mg/mL), dimetil sulfoksid (1 mg/mL) i dimetilformamid (12 mg/mL). Molekulska masa iznosi 558,1 g/mol, a temperatura tališta 174 °C. Prema BCS-u CRT pripada četvrtoj skupini, tvarima niske topljivosti i niske permeabilnosti. [19-22] Osnovna fizikalno-kemijska svojstva, kao i struktura molekule CRT-a, prikazana su u tablici 1.

Tablica 1. Struktura i svojstva molekule CRT-a.

Strukturna formula	Molekulska formula	$C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$
	Izgled	kruta tvar, bijela/žuta boja
	Molekulska masa	558,1 g/mol
	Gustoća	$1.251 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$
	Talište	174 °C
	Piktogrami	

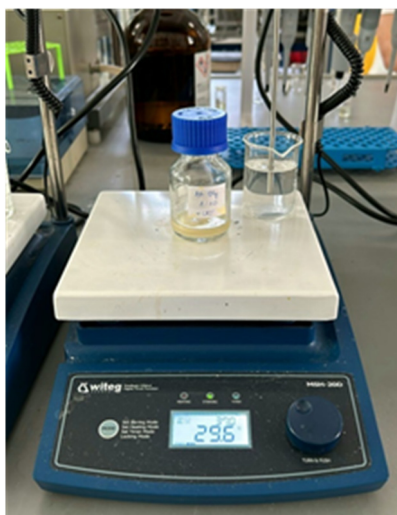
U tablici 2. prikazane su kemijske komponente upotrebene za pripremu DES-a, kao i njihova osnovna fizikalno-kemijska svojstva.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva komponenata korištenih za pripremu DES-a.

Ime komponente	Oznaka	Molekulska formula	M , g/mol	T_i , °C	Donorska mjesta	Aceptorska mjesta
Mliječna kiselina	LA	$C_3H_6O_3$	90,08	16,8	2	3
Glicerol	Gly	$C_3H_8O_3$	92,09	18,0-20,0	3	3
Askorbinska kiselina	AA	$C_6H_8O_6$	176,12	189,0-193,0	4	6
Kolin klorid	ChCl	$C_5H_{14}ClNO$	139,60	302,0	1	2
Glicin	Gne	$C_2H_5NO_2$	75,07	233,0	2	3
Fruktoza	Fru	$C_6H_{12}O_6$	180,16	103,0	5	6
Limunska kiselina	CA	$C_6H_8O_7$	192,12	153,0	4	7
Voda	W	H_2O	18,02	0,0	1	1

3.3. Priprema DES-a

DES-ovi su pripremljeni miješanjem netoksičnih komponenata (Tablica 2.) prikladnih svojstava s obzirom na broj HBA i HBD mjesta u molekulama. Komponente su izvagane prema molarnim omjerima i zatim pomiješane na magnetskoj miješalici uz zagrijavanje (Slika 3.1.) Zagrijavanje je trajalo do nastanka kapljevine, na temperaturama do 70 °C. U DES-ove Gly:LA 1:2, ChCl:CA 2:1 i Fru:Gly 1:2 dodan je određeni maseni udio vode, kao što je vidljivo iz tablice 3, kako bi se dobila kapljevina manje gustoće i viskoznosti te time olakšao daljnji rad.



Slika 3.1. Miješanje pripravljenog DES-a na magnetskoj miješalici uz zagrijavanje.

Tablica 3. Popis pripravljenih DES-ova.

DES	Oznaka	Molarni omjer	Maseni udio vode w_{H_2O} , %
glicerol-mliječna kiselina	Gly: LA	1:2	10
glicerol-askorbinska kiselina	Gly:AA	10:1	/
glicin-mliječna kiselina	Gne:LA	1:9	/
kolin klorid-mliječna kiselina	ChCl:LA	1:1	/
fruktoza-glicerol	Fru:Gly	1:2	13
kolin klorid-limunska kiselina	ChCl:CA	2:1	30

3.4. Karakterizacija DES-a

U eksperimentalnom dijelu karakterizirano je šest pripravljenih DES-ova. Gustoća, viskoznost i pH vrijednost određene su mjerenjem pri temperaturi od 37 °C. Nastanak DES-a (prisutnost karakterističnih pikova) potvrđen je FTIR analizom.

3.4.1. Gustoća

Gustoće pripremljenih DES-ova određene su digitalnim uređajem za mjerenje gustoće *Mettler Toledo Densitometer 30PX*, prikazanom na slici 3.2. Mjerenje gustoće za svaki je DES provedeno tri puta i izračunata je srednja vrijednost.



Slika 3.2. Mettler Toledo Densitometer 30PX.

3.4.2. Viskoznost

Viskoznost ispitivanih DES-ova određena je na termostatisiranom viskozimetru *Brookfield DV-111 ULTRA* (Slika 3.3.) Izmjereni podatci obrađeni se putem računalnog programa *Rheocalc* povezanog s viskozimetrom. Mjerenjem se prati ovisnost smičnog naprezanja o smičnoj brzini, iz čega se određuje reološki model ponašanja i viskoznost otapala.



Slika 3.3. Viskozimetar *Brookfield DV-111 ULTRA*.

3.4.3. pH vrijednost

Mjerenje pH vrijednosti provedeno je pomoću pH elektrode *Sentix 91* i uređaja *WTW InoLab pH/Cond 740*. Elektroda je uronjena u 0,5 M otopinu svakog DES-a i s uređaja je očitana prikazana vrijednost.

3.4.4. Fourierova pretvorna infracrvena spektroskopija

Kako bi se potvrdio nastanak vodikovih veza između komponenata pripremljenih DES-ova, provedena je analiza na FTIR uređaju *Vertex 70* (Slika 3.4.) U komoru za uzorak postavi se čisti DES, pokrene se snimanje, a kao rezultat dobije se interferogram s karakterističnim pikovima. Isti postupak potom se ponavlja s API-DES sustavom. Na taj je način izmjerena apsorbancija API-DES-a i čistog otapala.



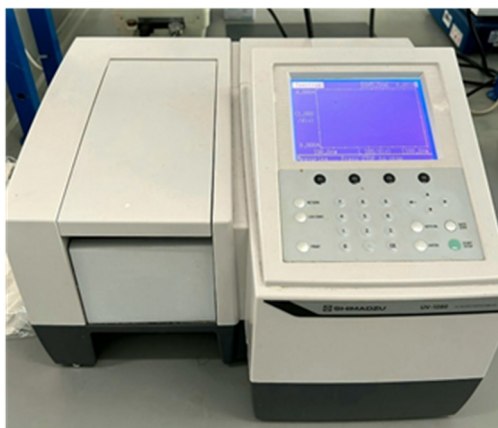
Slika 3.4. FTIR uređaj *Vertex 70* i pripadajuća komora za postavljanje uzorka.

3.5. Određivanje topljivosti API-ja u DES-u

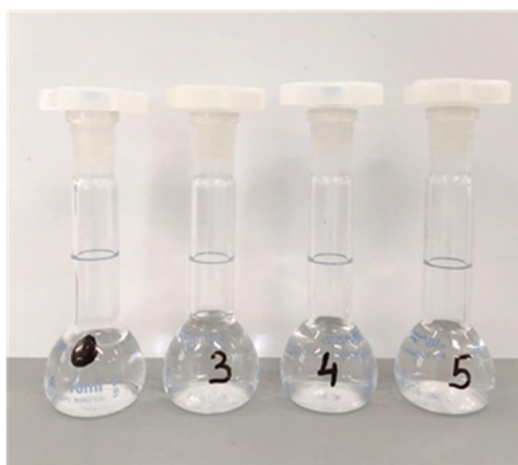
U prethodno pripravljene DES-ove dodane su određene odvage CRT-a i nastavljeno je miješanje na magnetskoj miješalici pri temperaturi 25 °C. Prilikom određivanja topljivosti koncentracija otopljenog CRT-a praćena je mjerenjem apsorbancije na UV/VIS spektrofotometru ili mjerenjem indeksa loma na refraktometru.

3.5.1. UV/VIS spektrofotometrija

Koncentracija otopljenog API-ja u DES-ovima Gly:LA 1:2 i Gly:AA 10:1 određena je mjerenjem apsorbancije na UV/VIS spektrofotometru (Slika 3.5.) pri valnoj duljini od 277 nm. Za određivanje koncentracije CRT-a API-DES sustavi otapani su u metanolu. Iz vrijednosti dobivenih apsorbancija i baždarnog pravca moguće je odrediti koncentraciju CRT-a u API-DES sustavima. Kako bi se konstruirao baždarni dijagram potrebno je prirediti otopine poznatih koncentracija CRT-a razrjeđivanjem standardne otopine koncentracije 55 ppm. Priređene su otopine koncentracija 10, 20 i 30 ppm, a zatim je određena njihova apsorbancija. Kako bi se snimio spektar za Gly:LA 1:2 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT sustave zasićene otopine razrijeđene su da bi se dobile koncentracije koje je moguće odrediti pomoću uređaja. Prije snimanja na spektrofotometru uzorci su profiltrirani kako bi se uklonile potencijalne nečistoće koje bi mogle utjecati na analizu.



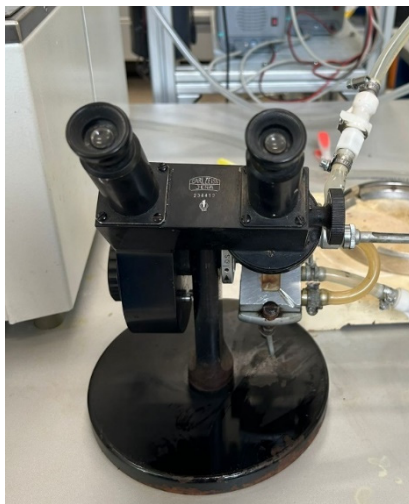
Slika 3.5. Spektrofotometar *UV-1280*, Shimadzu.



Slika 3.6. Razrjeđenja otopine Gly:LA 1:2 + CRT pripremljena za UV/VIS analizu.

3.5.2. Određivanje indeksa loma

Za praćenje koncentracije otopljenog CRT-a u sustavu Gne:LA 1:9 + CRT korišten je refraktometar prikazan na slici 3.7. U prvom se koraku određuju indeksi loma čistog DES-a i odvaganog API-DES-a, a zatim se pripremaju otopine API-DES-a različitih koncentracija. Za svaki uzorak indeks loma očitani su tri puta, a kao konačna vrijednost uzeta je srednja vrijednost izmjerenih rezultata. Kao rezultat mjerenja dobiven je baždarni pravac koji prikazuje ovisnost indeksa loma o masenom udjelu CRT-a. Iz dobivene ovisnosti moguće je odrediti koncentraciju otopljenog CRT-a. Isti postupak proveden je i za sustave Gly:LA 1:2 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT.

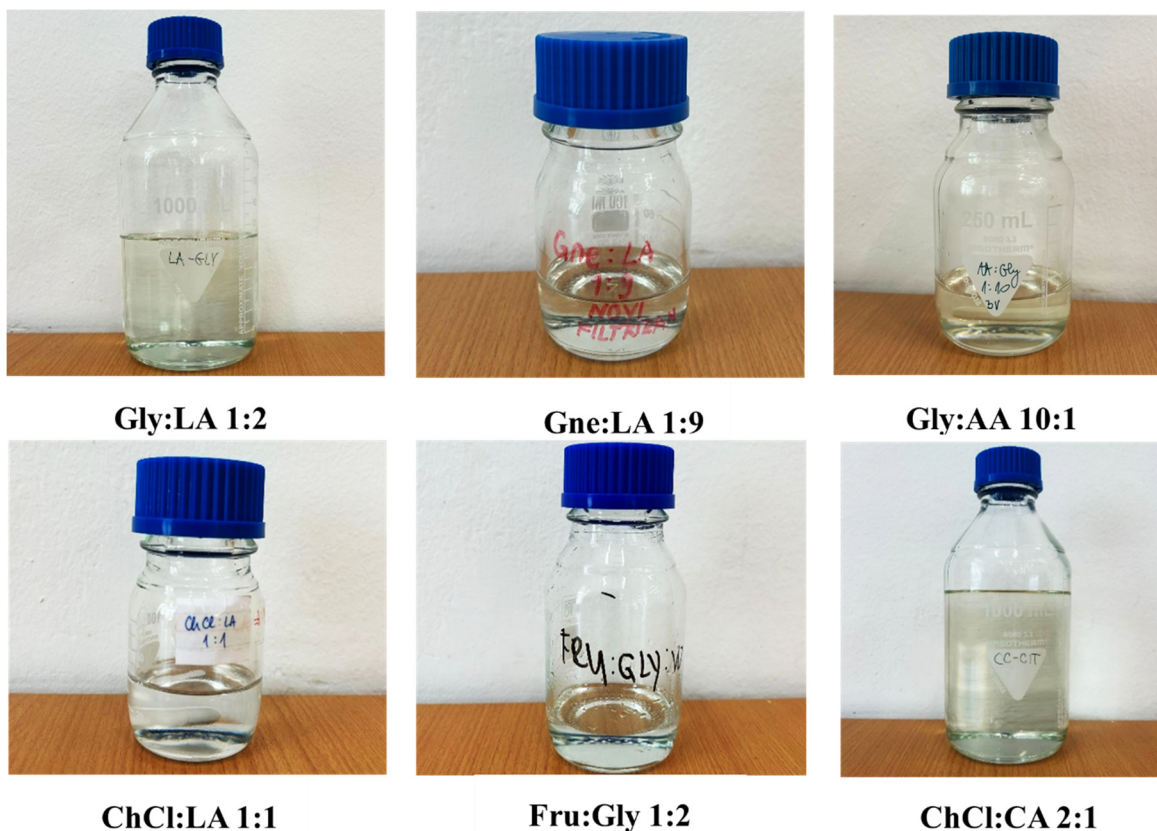


Slika 3.7. Refraktometar.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija pripremljenih DES-ova

U radu je pripremljeno 6 DES-ova miješanjem različitih netoksičnih organskih komponenata. Ovisno o vrsti HBA i HBD komponenata, njihovom molarnom omjeru i masenom udjelu dodane vode dobivena su otapala različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Kako bi se ispitala mogućnost primjene pripremljenih DES-ova u farmaceutskoj industriji, mjerenje gustoće, viskoznosti i pH vrijednosti provedeno je pri 37 °C. Provedena je FTIR analiza pripremljenih DES-ova, a onim DES-ovima u kojima je ispitana topljivost CRT-a određen je i indeks loma pri 25 °C.



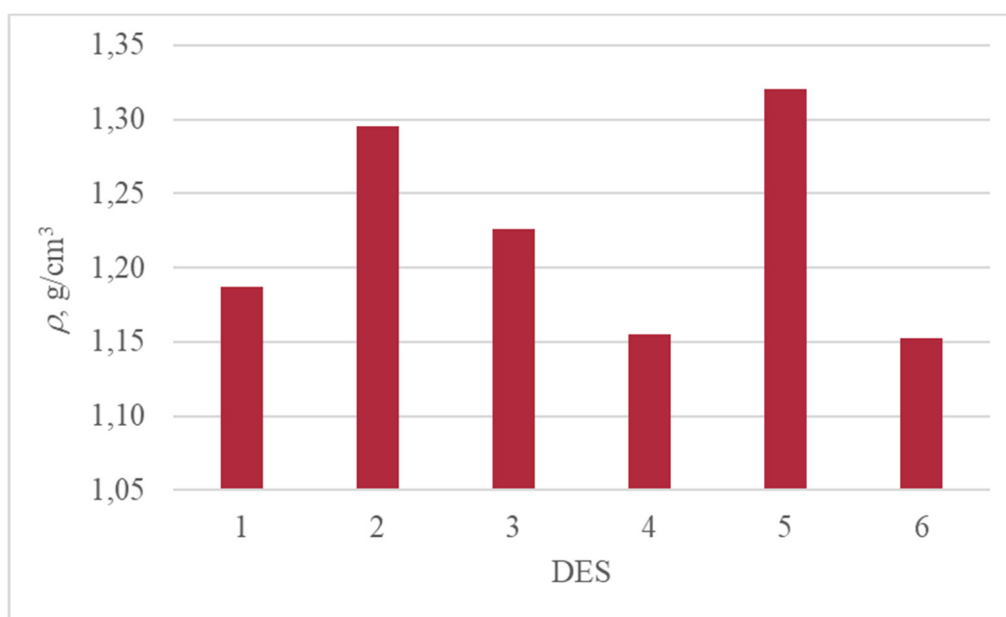
Slika 4.1. DES-ovi dobiveni miješanjem.

Na slici 4.1. prikazani su pripremljeni DES-ovi. Na sobnoj se temperaturi nalaze u kapljevitom stanju, bezbojni su ili blago žućkaste boje. Prilikom pripreve u DES-ove Gly:LA 1:2, ChCl:CA 2:1 i Fru:Gly 1:2 dodano je 10, 30 i 13 mas% vode kako bi se smanjila viskoznost dobivene kapljevine. Smanjenje viskoznosti važno je zbog postizanja dobrog miješanja prilikom otapanja API-ja, a kasnije i manipulacije tijekom pripreve formulacije.

U tablici 4. prikazani su rezultati mjerenja gustoće, viskoznosti, pH vrijednosti i indeksa loma pripremljenih DES-ova.

Tablica 4. Izmerene gustoće, viskoznosti i pH vrijednosti pri 37 °C i indeks loma pri 25 °C.

OZNAKA	DES	w_{H_2O} / %	ρ / $g\ cm^{-3}$	η / $Pa\ s$	pH	n_D
1	Gly:LA 1:2	10	1,187	0,0150	2,366	1,4293
2	Gly:AA 10:1	/	1,295	0,8624	1,446	1,4840
3	Gne:LA 1:9	/	1,226	0,0719	1,370	1,4389
4	ChCl:LA 1:1	/	1,155	0,1422	0,843	/
5	Fru:Gly 1:2	13	1,320	0,2978	5,399	/
6	ChCl:CA 2:1	30	1,152	0,0158	2,344	/

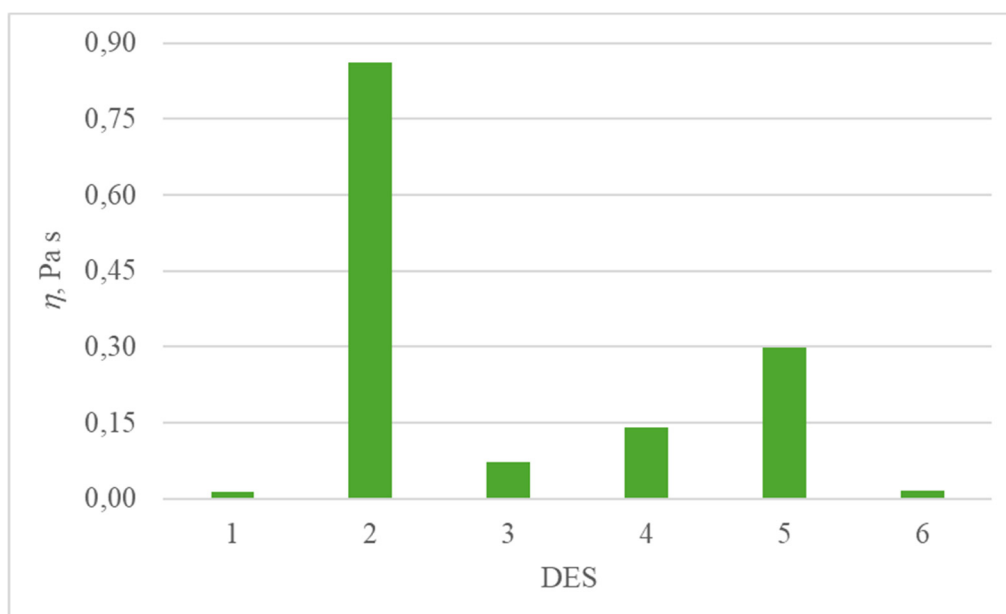


Slika 4.2. Gustoće pripremljenih DES-ova.

Brojčane vrijednosti gustoća važan su parametar za određivanje povoljnih jednadžbi stanja i izračuna termodinamičkih svojstava potrebnih za razvoj i optimizaciju nekog industrijskog procesa. Ovisno o prirodi i koncentraciji komponenata u sastavu DES-a vrijednosti gustoće mogu znatno varirati, no većina DES-ova ima gustoću veću od vode. Dodatkom vode gustoću

otapala moguće je smanjivati. Međutim, previsok udio vode u DES-u (40-50 mas%) rezultira narušavanjem kompleksa donor-akceptor vodikovih veza i stvaranjem vodenih otopina pojedinih komponenata. [23,24]

Gustoće pripremljenih DES-ova u rasponu su od 1,152 do 1,320 g/cm³ (Tablica 4.) Najmanju vrijednost gustoće ima otapalo ChCl:CA 2:1 u koje je dodano 30 mas% vode. Dvokomponentni sustav Fru:Gly 1:2 ima najveću gustoću, unatoč dodanoj vodi, zbog prisustva fruktoze. U takvom sustavu veći je broj hidroksilnih skupina koje rezultiraju stvaranjem većeg broja vodikovih veza unutar kapljevine. Time je smanjen raspoloživi slobodan prostor u strukturi DES-a, a njegova je gustoća zbog toga veća. [23]

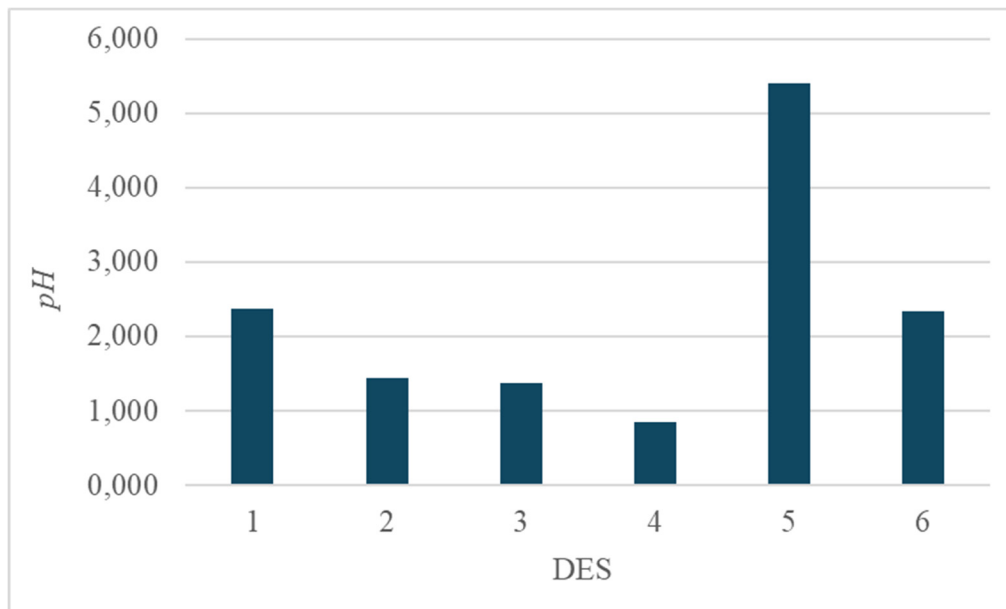


Slika 4.3. Viskoznosti pripremljenih DES-ova.

Uz gustoću, viskoznost je važno fizikalno-kemijsko svojstvo čija se brojčana vrijednost uzima kao kriterij pri odabiru pogodnog otapala. Vrijednost viskoznosti ovisi o vrsti HBD i HBA komponenata, njihovom omjeru i temperaturi. Velika viskoznost nepovoljno utječe na procese u kojima se primjenjuju otapala, posebno u farmaceutskoj industriji. Smanjenje viskoznosti DES-a postiže se zagrijavanjem i dodatkom određenog udjela vode. [25]

Viskoznosti pripremljenih DES-ova (Tablica 4.) variraju od 0,015 do 0,8624 Pa s zbog različitih HBD komponenti i dodanog udjela vode. Najviskoznije je otapalo Gly:AA 10:1 u koje nije dodana voda. Zbog većeg broja hidroksilnih skupina askorbinske kiseline u odnosu na ostala

otapala u koja nije dodana voda, viskoznost DES-a Gly:AA 10:1 je veća. Unatoč dodanoj vodi u sustavu Fru:Gly 1:2 otapalo je viskoznije zbog većeg broja hidroksilnih skupina koje potječu od fruktoze. Najmanje su viskozna otapala Gly:LA 1:2 i ChCl:CA 2:1 u koja je dodano 10, odnosno 30 mas% vode.



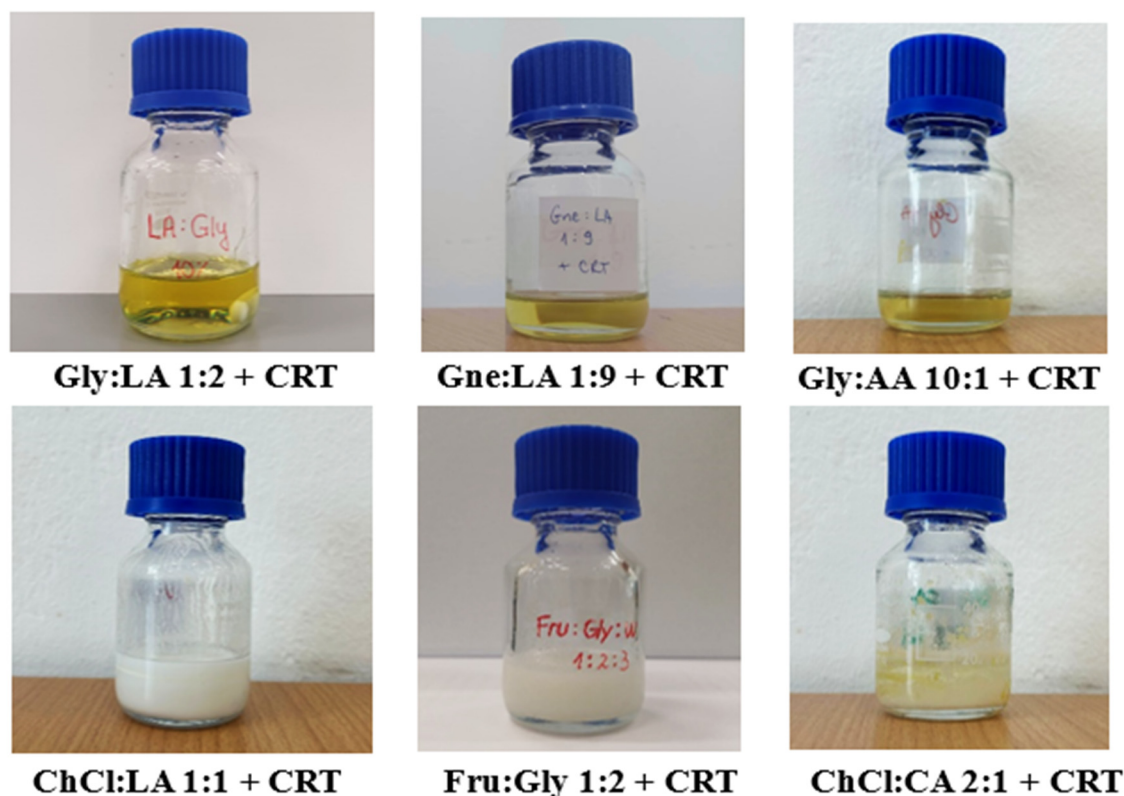
Slika 4.4. pH vrijednosti pripremljenih DES-ova.

pH vrijednost važan je parametar DES-a koji određuje njegovu primjenu u području katalize i biokemijskih reakcija. Odabir HBD komponente prilikom pripreme DES-a ima velik utjecaj na kiselost. [26]

Prema izmjerenim podacima u tablici 4. vidljivo je da su sve vodene otopine pripremljenih DES-ova kisele, s pH vrijednostima od 1,370 do 5,399. Organska kiselina (mliječna, askorbinska i limunska) kao HBD komponenta prisutna je u većini pripremljenih DES-ova zbog čega je njihova pH vrijednost ispod 3. Na povećanje kiselosti također utječe i dodatak vode. [13] Najveću kiselost ima otapalo ChCl:LA 1:1, dok je najmanje kiselo otapalo Fru:Gly 1:2 koje u svojoj strukturi sadrži alkohol glicerol i šećer fruktozu. Ako je HBD komponenta alkohol, pH vrijednost je veća jer je alkoholima svojstvena manja kiselost u odnosu na organske kiseline. [26]

4.2. Određivanje topljivosti CRT-a

API-DES sustavi priređeni su dodatkom određenih odvaga CRT-a u pripremljene DES-ove i zagrijavanjem do postizanja zasićenja otapala. Za određivanje topljivosti CRT-a odabrana su sljedeća tri DES-a koja su pokazala dobru stabilnost tijekom vremena: glicerol-mliječna kiselina (Gly:LA 1:2), glicerol-askorbinska kiselina (Gly:AA 10:1) i glicin-mliječna kiselina (Gne:LA 1:9).



Slika 4.5. Pripremljeni API-DES sustavi.

Na slici 4.5. prikazani su rezultati otapanja CRT-a u DES-ovima, odnosno pripremljeni API-DES sustavi. Vizualnim se opažanjem može zaključiti da otapanje CRT-a nije rezultiralo nastankom povoljnih API-DES sustava u svim otapalima. Otapanje CRT-a u otapalu Fru:Gly 1:2 rezultiralo je nastankom bijele guste paste, dok je sustav u otapalu ChCl:LA 1:1 stajanjem prešao iz žute kapljevine u gustu bijelu pastu. Smanjenjem temperature u tome sustavu došlo je do kristalizacije CRT-a. U DES-u ChCl:CA 2:1 potencijalno je došlo do kemijske reakcije i nastanka čvrste tvari žute boje. Navedeni sustavi neuspješno su pripremljeni uzorci koji su pokazali slabu topljivost i stabilnost tijekom vremena. Uspješno su pripremljena tri API-DES

sustava koji su na sobnoj temperaturi kapljevine žute boje, bez prisustva kristala: Gly:LA 1:2 + CRT, Gne:LA 1:9 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT.

U tablici 5. prikazane su koncentracije otopljenog CRT-a izračunate iz poznatih masa DES-a i CRT-a. Kako bi se opisala i definirala topljivost većine lijekova, prihvaćena je kategorizacija topljivosti definirana u Farmakopeji Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Pharmacopeia*, USP). Navedenom kategorizacijom opisuje se topljivost API-ja u rasponu od praktički netopljivih pa sve do onih izrazito topljivih. Topljivost ovisi o kemijskoj strukturi komponenata i omjeru u kojemu su pomiješane, kao i o polarnosti otapala. [27]

Iz dobivenih se rezultata može uočiti da je najveća koncentracija CRT-a (182,54 g/l) otopljena u DES-u Gly:LA 1:2, odnosno da se u njemu CRT najbolje otapa. Dobra topljivost ostvarena je u DES-ovima Gly:AA 10:1 i Gne:LA 1:9. Može se zaključiti da se CRT dobro otapa u sustavima s mliječnom kiselinom. U otapalima koja nisu bila pogodna za pripravu API-DES-a topljivost CRT-a je najniža, što je rezultiralo nastankom gustih i viskoznih kapljevina uz prisutnost taloga ili pasti. Pri određivanju maksimalne koncentracije, dodavanje CRT-a nije zaustavljeno nakon dodatka suviška, nego se zbog velike gustoće i viskoznosti nastalih API-DES-ova odustalo od daljnjeg otapanja CRT-a.

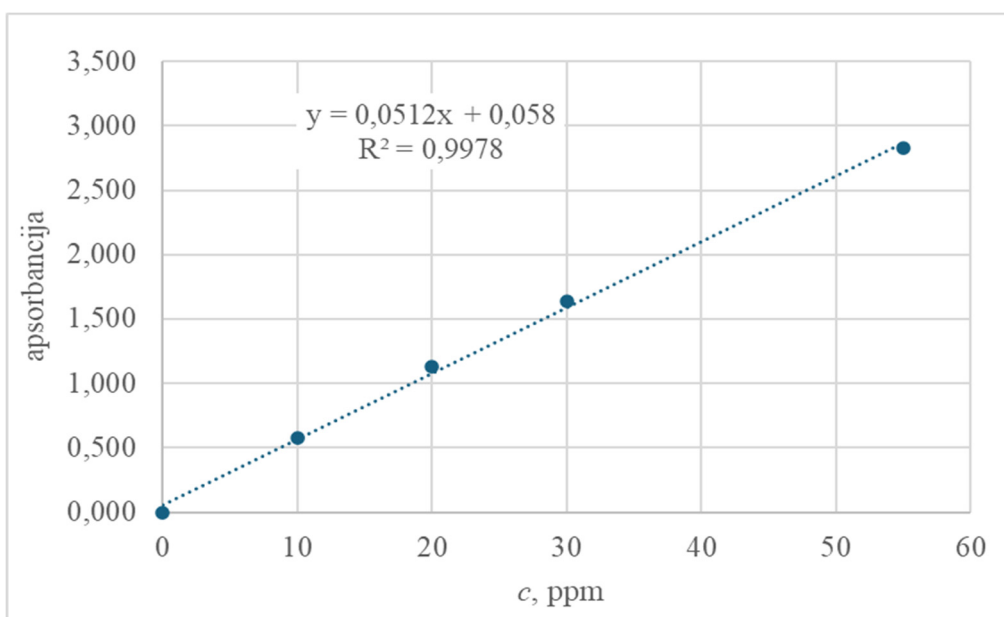
Tablica 5. Koncentracije otopljenog CRT-a i napomena o topljivosti.

DES	$c_{\text{CRT}}, g_{\text{CRT}}/g_{\text{DES}}$	$c_{\text{CRT}}, g_{\text{CRT}}/l_{\text{DES}}$	TOPLJIVOST
Gly:LA 1:2	0,1538	182,54	slobodno topiv
Gly:AA 10:1	0,0391	50,66	topiv
Gne:LA 1:9	0,0752	92,16	topiv
ChCl:LA 1:1	-	-	stajanjem prešao iz žute kapljevine u bijelu pastu
Fru:Gly 1:2	-	-	nastala gusta pasta bijele boje
ChCl:CA 2:1	-	-	istaložio se CRT (promjena strukture)

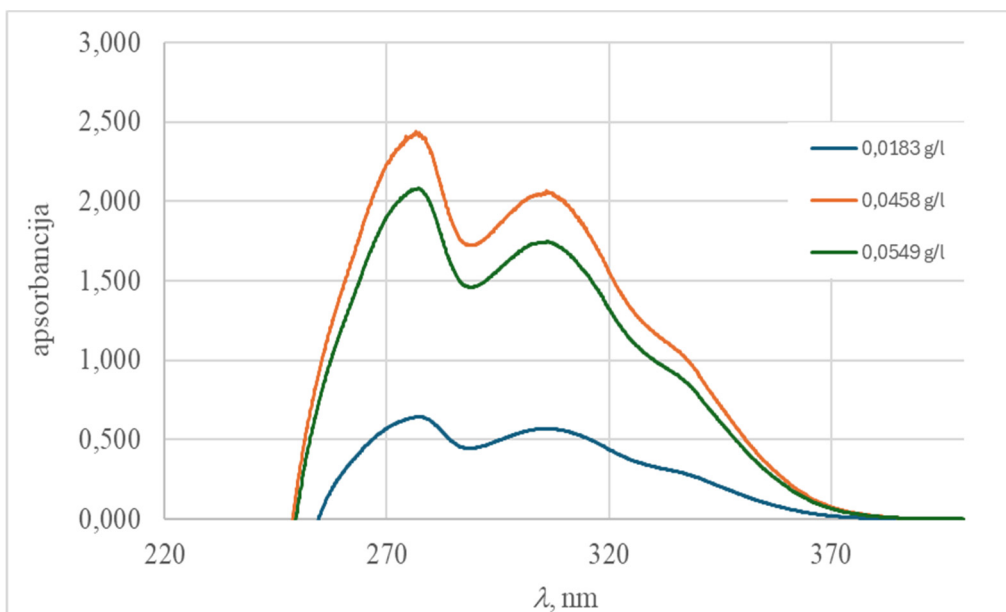
4.2.1. UV/VIS spektrofotometrija

Priređeni API-DES sustavi otapani su u metanolu kako bi se konstruirao baždarni pravac kojeg nije bilo moguće napraviti u čistome DES-u. UV/VIS spektar standardne otopine CRT-a u metanolu pokazuje karakterističan pik, odnosno maksimum apsorbancije pri valnoj duljini od 277 nm. Karakterističan je i pik pri valnoj duljini od 304 nm, kao i granična vrijednost apsorbancije (engl. *absorption cut-off*) pri 370 nm. [28]

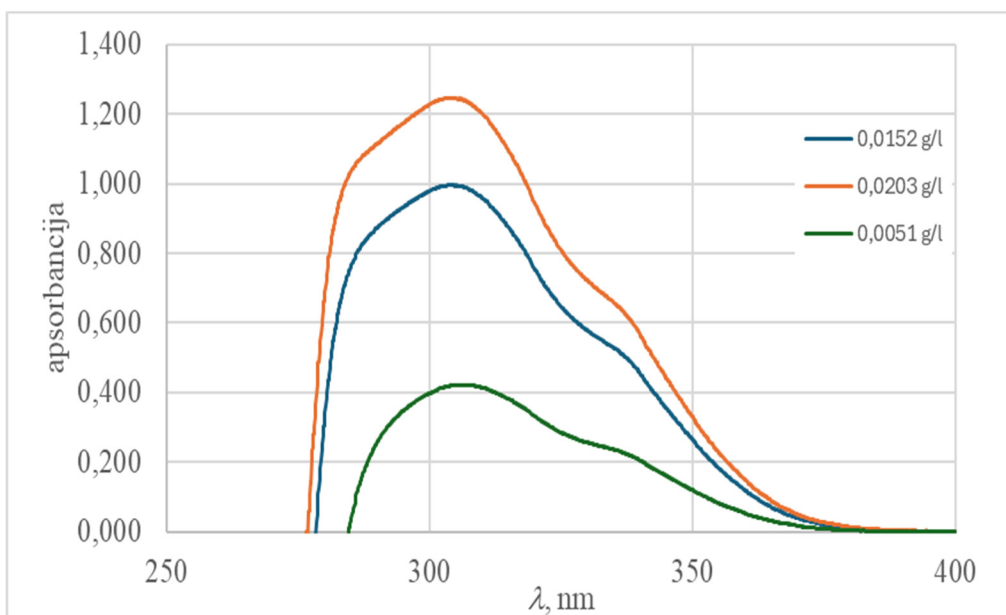
Ovisnost dobivenih apsorbancija priređenih razrjeđenja standardne otopine o koncentraciji CRT-a prikazana je baždarnim dijagramom na slici 4.6. Pomoću dobivene jednadžbe i vrijednosti apsorbancija snimljenih spektara (Slike 4.7. i 4.8.) određena je koncentracija otopljenog CRT-a u sustavima Gly:LA 1:2 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT pri ispitivanju topljivosti CRT-a.



Slika 4.6. Baždarni pravac za određivanje koncentracije CRT-a u sustavima Gly:LA 1:2 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT.

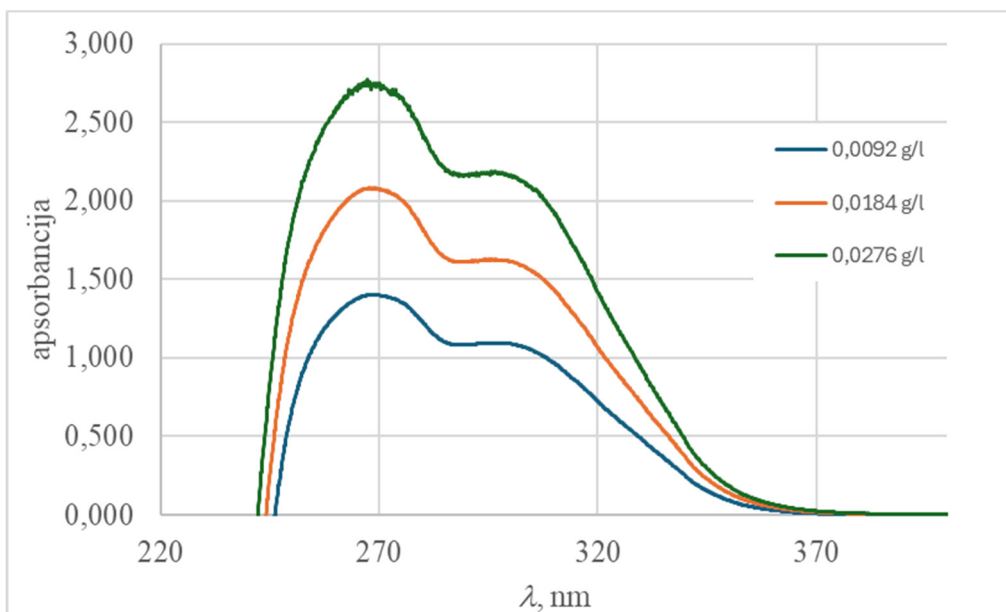


Slika 4.7. UV/VIS spektar sustava Gly:LA 1:2 + CRT.



Slika 4.8. UV/VIS spektar sustava Gly:AA 10:1 + CRT.

Na apsorbanjskom spektru sustava Gly:AA 10:1 + CRT prikazanom na slici 4.8. uočava se pomak glavnog apsorbanjskog pika s 277 nm. Čista askorbinska kiselina pokazuje apsorbanjski maksimum na 289 nm pri pH vrijednosti 2, dok apsorbanjski spektar L-askorbinske kiseline varira između 220 i 330 nm. Budući da pripremljeni DES ima pH vrijednost nižu od 2 (1,446), glavni pik pojavljuje se pri valnoj duljini većoj od 289 nm. [29,30]



Slika 4.9. UV/VIS spektar sustava Gne:LA 1:9 + CRT.

Za API-DES sustav Gne:LA 1:9 + CRT nije provedeno razrjeđenje u metanolu. U metanolu dolazi do kristalizacije glicina jer je CRT netopljiv u metanolu koji onda djeluje kao antiotapalo. Razrjeđenje nije bilo moguće postići s vodom, u kojoj je glicin topiv, jer bi se u tom slučaju istaložio CRT. Iz navedenih razloga koncentracija CRT-a u sustavu Gne:LA 1:9 + CRT praćena je određivanjem indeksa loma na refraktometru. Slikom 4.9. prikazan je apsorbančni spektar sustava Gne:LA 1:9 + CRT dobiven otapanjem API-DES-a u vodi.

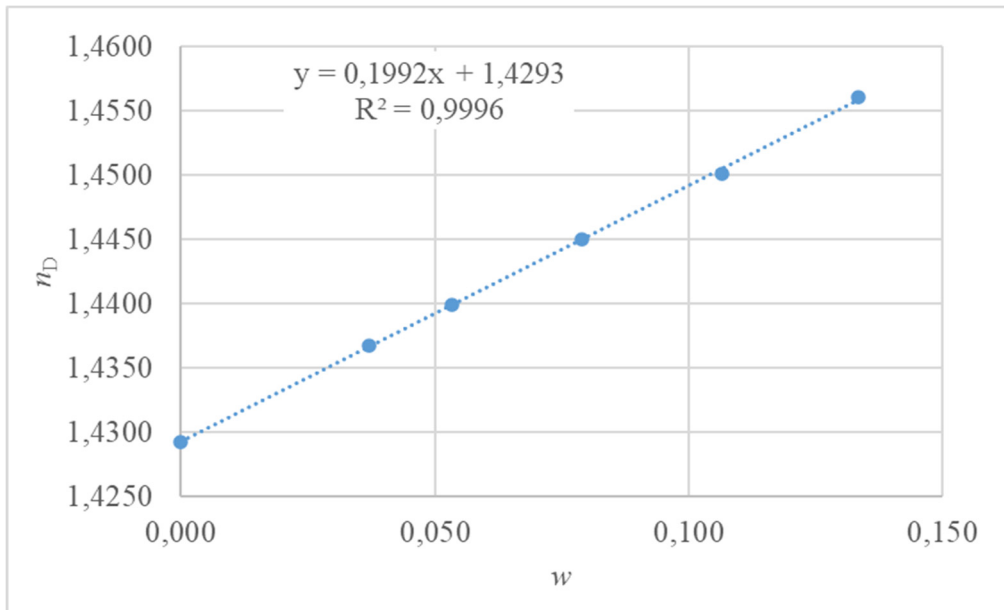
U tablici 6. prikazane su relativne pogreške dobivene pri određivanju koncentracije CRT-a UV/VIS metodom u sustavima Gly:LA 1:2 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT.

Tablica 6. Relativne pogreške pri određivanju koncentracije CRT-a u sustavima Gly:LA 1:2 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT.

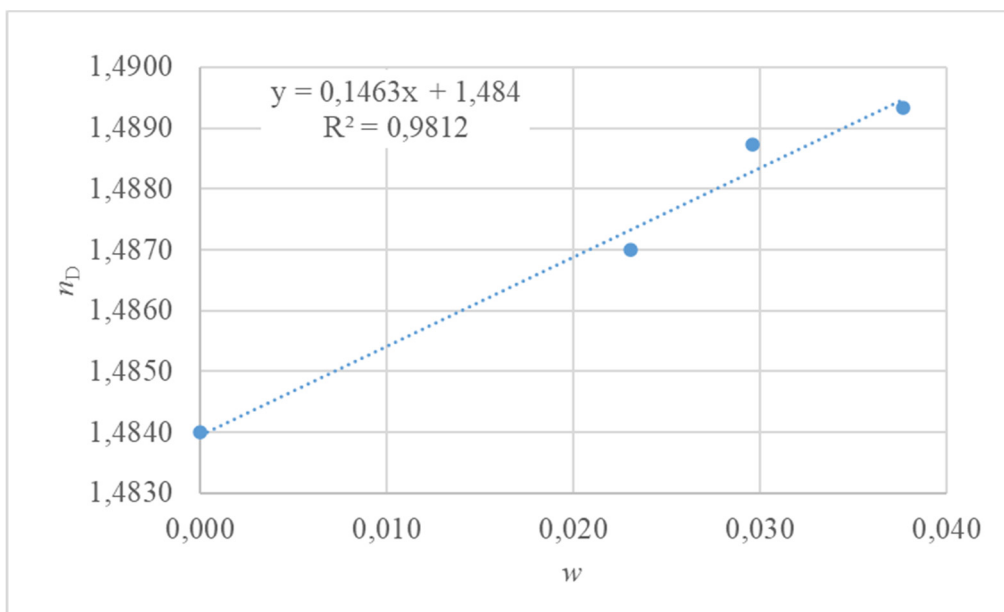
Gly:LA 1:2 – 10 % W + CRT		Gly:AA 10:1 + CRT	
c_{CRT} , g/l	RP, %	c_{CRT} , g/l	RP, %
0,0183	-37,46	0,0152	20,54
0,0458	1,61	0,0203	14,59
0,0549	-27,85	0,0051	40,33

4.2.2. Određivanje indeksa loma

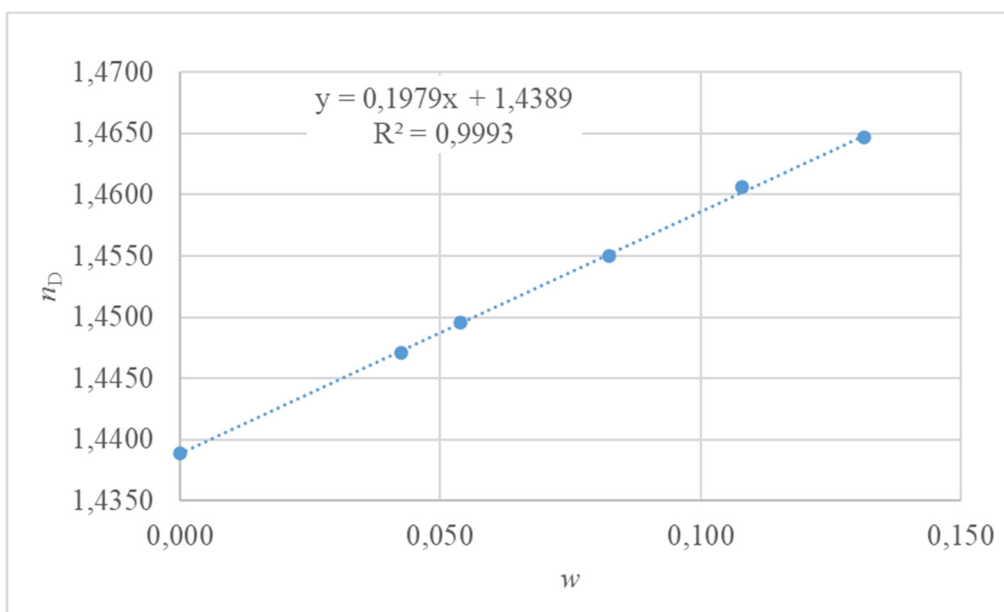
Budući da postupak određivanja koncentracije pomoću UV/VIS spektrofotometra zahtjeva razvoj metode za svaki pojedinačni sustav, koncentracija otopljenog CRT-a u sva tri API-DES sustava praćena je i određivanjem indeksa loma na refraktometru. Kao rezultat mjerenja dobiveni su baždarni dijagrami (Slike 4.10.-4.12.) kojima je prikazana ovisnost indeksa loma o masenom udjelu otopljenog CRT-a. Iz dobivene ovisnosti moguće je odrediti koncentraciju otopljenog CRT-a.



Slika 4.10. Baždarni pravac za određivanje koncentracije CRT-a u sustavu Gly:LA 1:2 + CRT.



Slika 4.11. Baždarni pravac za određivanje koncentracije CRT-a u sustavu Gly:AA 10:1 + CRT.



Slika 4.12. Baždarni pravac za određivanje koncentracije CRT-a u sustavu Gne:LA 1:9 + CRT.

Baždarni dijagram dobiven UV/VIS metodom (sustavi Gly:LA 1:2 + CRT i Gly:AA 10:1 + CRT) i baždarni dijagrami dobiveni mjerenjem indeksa loma (sustavi Gly:LA 1:2 + CRT i Gne:LA 1:9 + CRT) ukazuju na linearnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji otopljenog CRT-

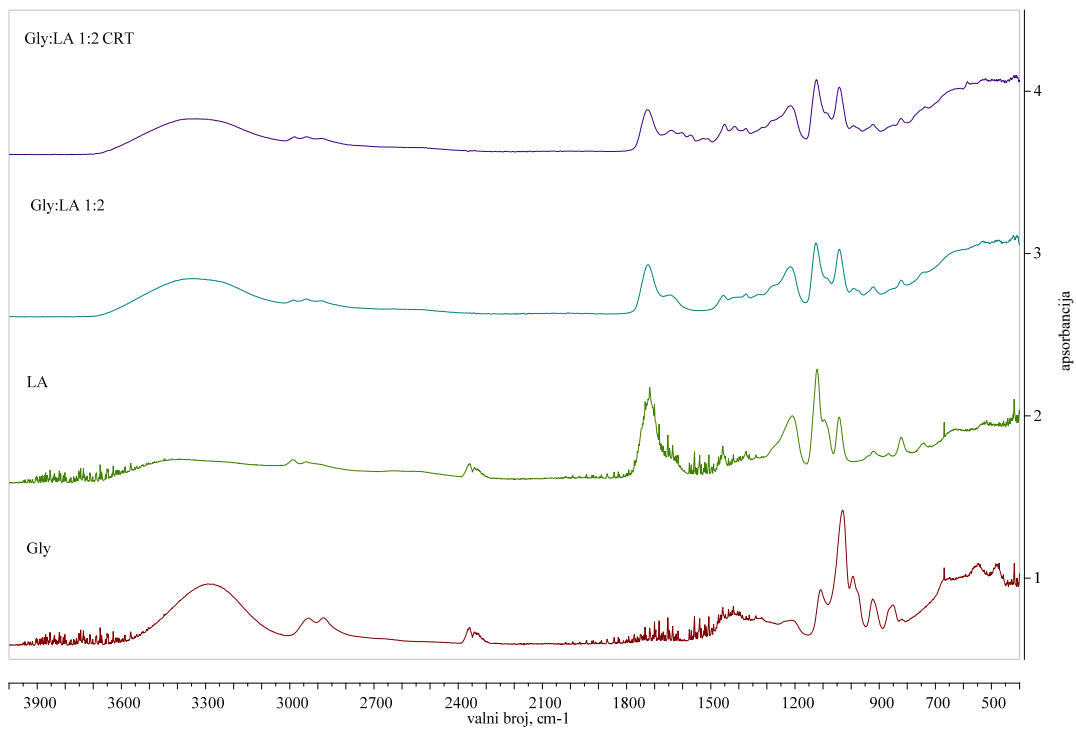
a, s koeficijentom determinacije R^2 većim od 0,99. R^2 vrijednost pokazuje dobro poklapanje dobivenih regresijskih modela (jednadžbe pravca) sa stvarnim podacima. Pri određivanju koncentracije CRT-a mjerenjem indeksa loma u sustavu Gly:AA 10:1 + CRT stvarni podatci najviše odstupaju od dobivenog pravca, na što ukazuje R^2 (0,98). Početna koncentracija CRT-a bila je relativno niska, što je utjecalo na preciznost mjerenja.

4.3. FTIR analiza pripremljenih API-DES-ova

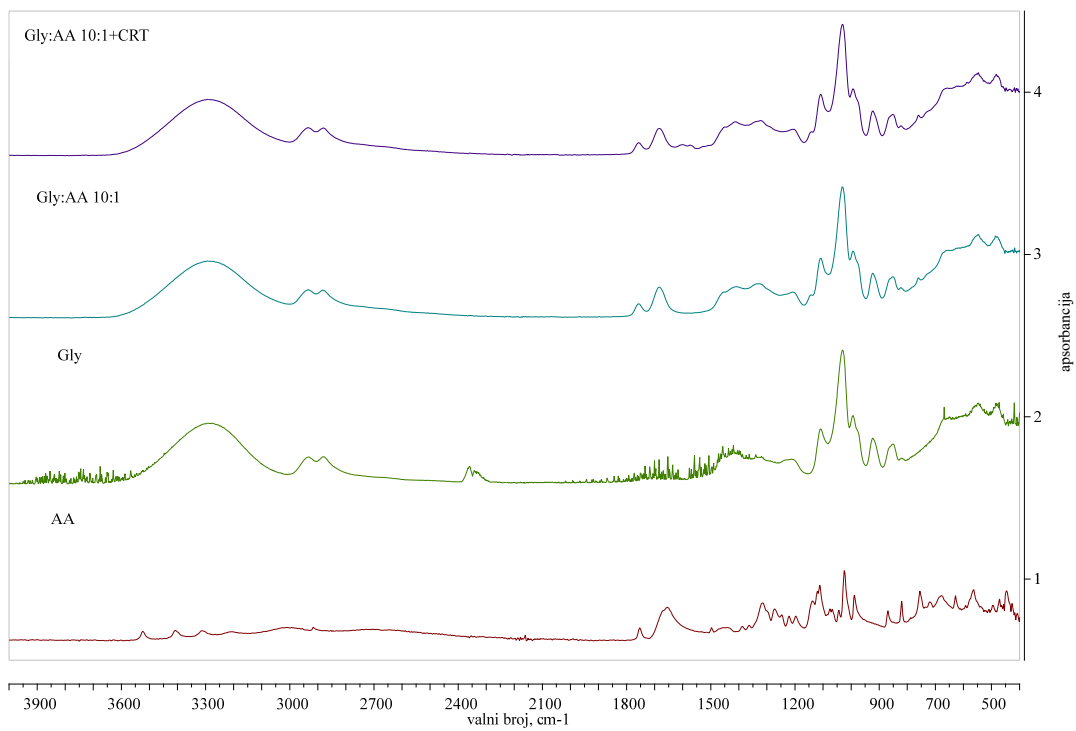
Prilikom pripreme DES-ova miješane su minimalno dvije komponente te su za svaku od njih snimljeni FTIR spektri koji su zatim uspoređeni s FTIR spektrom kapljevine dobivene njihovim miješanjem. Osim toga, snimljen je i spektar nakon otapanja API-ja u dobivenim kapljevinama. Spektri su uspoređeni na slikama od 4.13 do 4.16.

Na FTIR spektarima dobivenih kapljevina vidljivo je da su spektri rezultat mješovitih doprinosa komponenti od kojih su pripremljeni. Kod pripremljenih otapala vidljivi su svi odzivi karakteristični za komponente od kojih su otapala pripremljena. Neke vrpce otapala su pomaknute ili je došlo do njihovog širenja u odnosu na pojedinačne komponente. Na spektru otapala Gly:LA 1:2 vidljivi su pomaci na niže vrijednosti valnog broja u odnosu na čiste komponente (1217 i 1125 cm^{-1}) te smanjeni intenziteti pri valnim brojevima 991 , 920 i 846 cm^{-1} (Slika 4.13.) Slično se dogodilo i s druga dva otapala. FTIR spektar za sustav Gne:LA 1:9 pokazuje smanjenje intenziteta vrpce glicina, vjerojatno zbog velikog udjela mliječne kiseline. U sustavu Gly:AA 10:1 vidljivi su pomaci na vrpcama 1683 , 1327 , 760 i 486 cm^{-1} , koji mogu ukazivati na povezivanje komponenti i nastanak vodikovih veza koje rezultira nastankom DES-a.

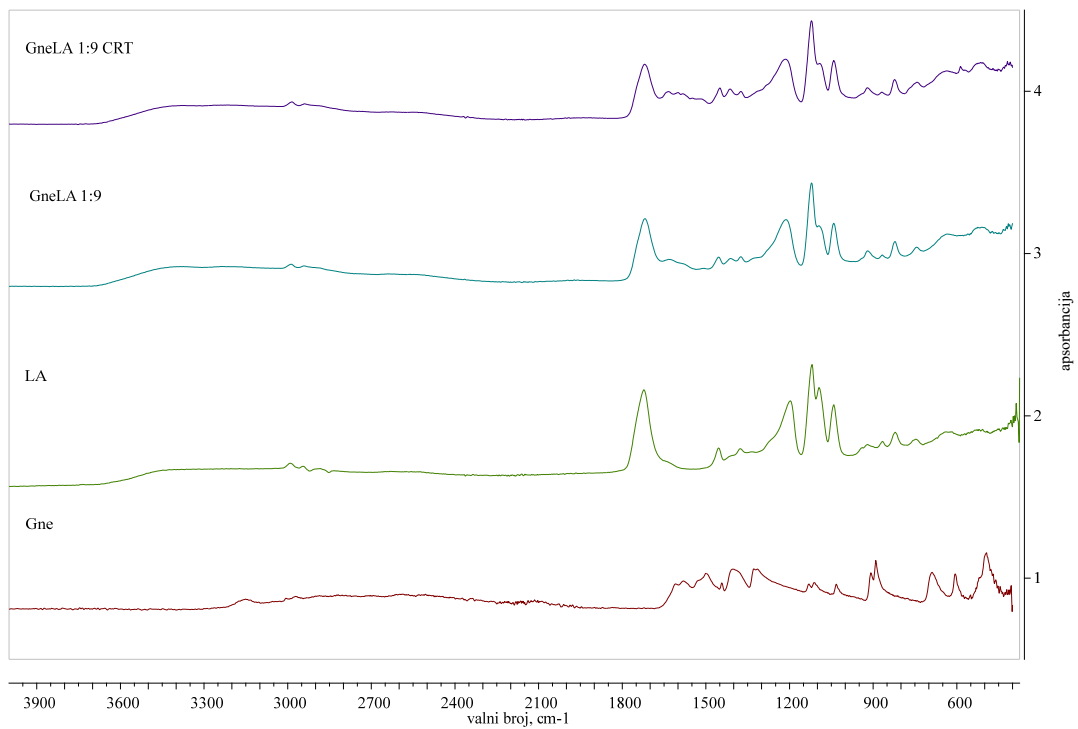
Slika 4.16. prikazuje usporedbu spektara u sustavu ChCl:CA 2:1, u kojem je nastao žuti talog nakon dodatka CRT-a. Spektri pokazuju slična odstupanja kao i otopina bez taloga, bez novonastalih vrpce. Ovo navodi na zaključak da u otopini nije došlo do kemijske reakcije, nego da se u otapalo istaložio CRT koji je eventualno promijenio strukturu (prešao u amorfni oblik). Na slici 4.17. prikazani su spektri otopina koje su nastale otapanjem CRT-a. U svim otopinama vidljive su novonastale vrpce koje se odnose na veze unutar CRT-a (oko 1602 , 1573 , 1527 , 1509 , 586 cm^{-1}).



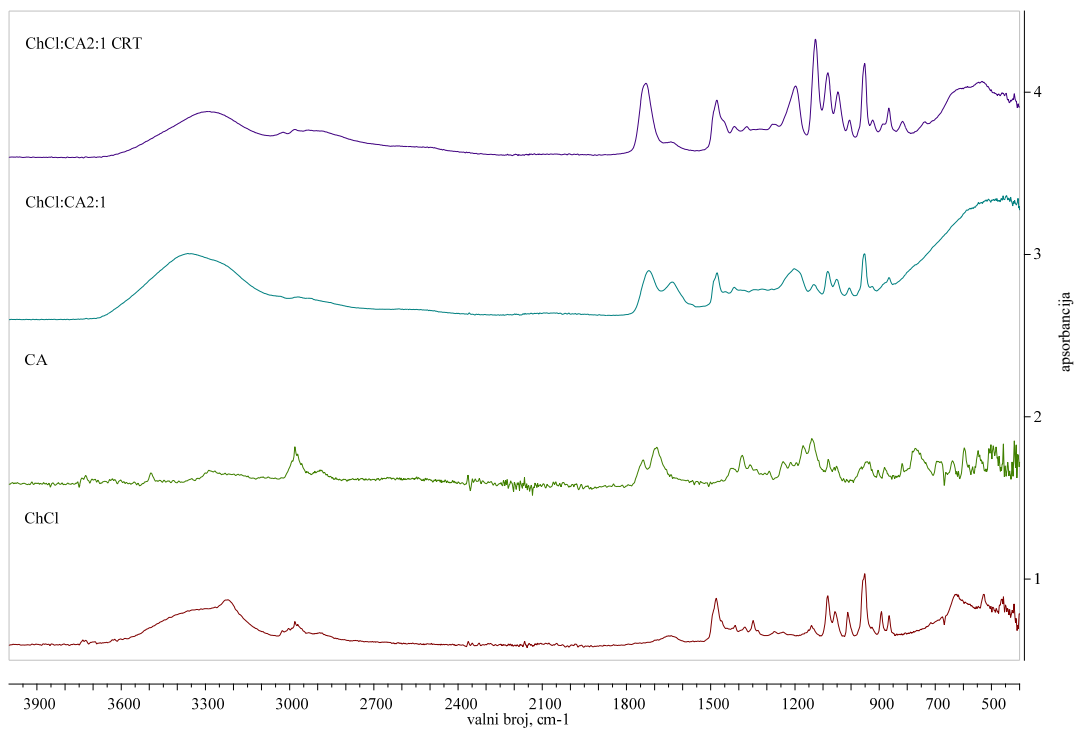
Slika 4.13. FTIR analiza sustava Gly:LA 1:2 + CRT, DES-a i čistih komponenata.



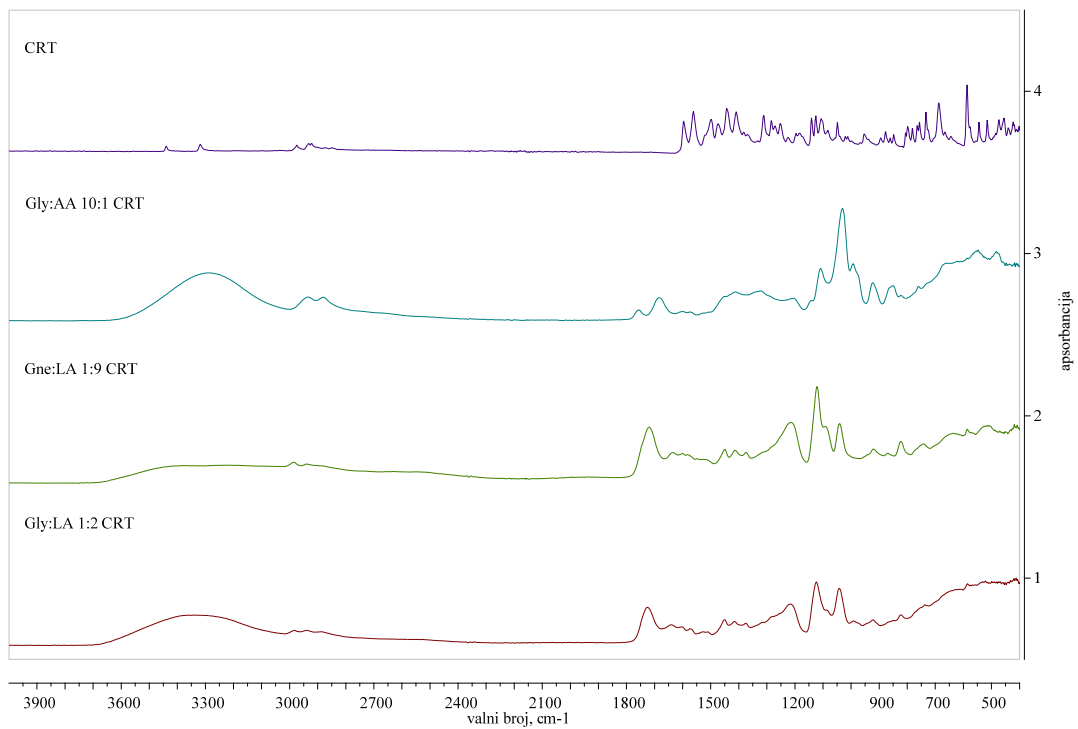
Slika 4.14. FTIR analiza sustava Gly:AA 10:1 + CRT, DES-a i čistih komponenata.



Slika 4.15. FTIR analiza sustava Gne:LA 1:9 + CRT, DES-a i čistih komponenata.



Slika 4.16. FTIR analiza sustava ChCl:CA 2:1 + CRT, DES-a i čistih komponenata.



Slika 4.17. FTIR analiza čistog CRT-a i sustava: Gly:LA 1:2 + CRT, Gly:AA 10:1 + CRT i Gne:LA 1:9 + CRT.

5. ZAKLJUČAK

Fizikalno-kemijskom karakterizacijom pokazano je da su pripremljeni DES-ovi kapljevine čija je gustoća veća od gustoće vode. Viskozniji su oni DES-ovi koji u svome sastavu sadrže komponentu s većim brojem hidroksilnih skupina, dok se dodatkom vode viskoznost pripremljenih otapala smanjuje. Sve dobivene kapljevine su kisele.

Otapanje CRT-a nije rezultiralo nastankom povoljnih API-DES sustava u svim DES-ovima. Nastanak pasti i taloga, promjena boje tijekom skladištenja u laboratoriju i eventualna promjena strukture CRT-a ukazuju na lošu stabilnost pojedinih sustava. Dobra topljivost i stabilnost CRT-a ostvarena je u sustavima s mliječnom kiselinom. Pokazano je da se u API-DES sustavima ostvaruje bolja topljivost CRT-a u odnosu na vodu, a uspješnost njihove pripreve ovisi o vrsti pomiješanih komponenata, njihovom molarnom omjeru i udjelu dodane vode.

Zbog složene provedbe mjerenja na UV/VIS spektrofotometru, povoljnija metoda za određivanje koncentracije CRT-a u svim sustavima je pomoću refraktometra.

FTIR analizom uspoređeni su karakteristični pikovi za DES-ove i API-DES sustave. U spektrima nastalih kapljevina dolazi do pomaka i smanjenja intenziteta pojedinih vrpca, ali nije došlo do nastanka novih što je pokazatelj uspostavljanja vodikovih veza između HBA i HBD. Otapanjem CRT-a u DES-u vidljive su nove vrpce karakteristične za CRT.

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

ρ , g/cm³ – gustoća

η , Pa s - viskoznost

A/B , % - molarni omjer komponenata u sastavu eutektičkog otapala

c , ppm – koncentracija

M , g/mol – molekulska masa

n_D - indeks loma

RP, % - relativna pogreška

T_E , °C – temperatura eutektičke točke

$T_{idealno}$, °C – temperatura idealne smjese

T_i , °C – temperatura tališta

w , % - maseni udio

Kratice

AA – engl. *ascorbic acid*, askorbinska kiselina

API – djelatna tvar

BCS – Biofarmaceutski sustav klasifikacije

CA – engl. *citric acid*, limunska kiselina

ChCl – engl. *choline chloride*, kolin klorid

Co – kobalt

Cr – krom

CRT - ceritinib

DES – niskotemperaturno eutektičko otapalo

EMA – Europska agencija za lijekove

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove

Fe – željezo

Fru – engl. *fructose*, fruktoza

FTIR - Fourierova pretvorna infracrvena spektroskopija

Gly – engl. *glycerol*, glicerol

Gne – engl. *glycine*, glicin

HBA – akceptor vodikove veze

HBD – donor vodikove veze

HDES – hidrofobno niskotemperaturno eutektičko otapalo

LA – engl. *lactic acid*, mliječna kiselina

NADES – prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo

OA-DES – niskotemperaturno eutektičko otapalo na bazi organskih kiselina

pH – engl. *potential of hydrogen*, mjera kiselosti, odnosno lužnatosti

Sn – kositar

THEDES – terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo

USP - engl. *United States Pharmacopeia*, Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

Zn – cink

7. LITERATURA

- [1] Pedro S. N., Freire M. G., Freire C. S. R., Silvestre J. D., Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16 (2019), 497-506.
- [2] Chakraborty S., Sathe R. Y., Chormale J. H., Dangi A., Bharatam P. V., Bansal A. K., Effect of Deep Eutectic System (DES) on Oral Bioavailability of Celecoxib: In Silico, In Vitro, and In Vivo Study, *Pharmaceutics*, 15 (2023), 2351.
- [3] Lu C., Cao J., Wang N., Su E., Significantly improving the solubility of non-steroidal anti-inflammatory drugs in deep eutectic solvents for potential non-aqueous liquid administration, *Med. Chem. Commun.*, 7 (2016), 955-959.
- [4] Javed S., Mangla B., Sultan M.H., Almoshari Y., Sivadasan D., Alqahtani S.S., Madkhali O.A., Ahsan W., Pharmaceutical applications of therapeutic deep eutectic systems (THEDES) in maximising drug delivery, *Heliyon*, 10 (2024), e29783.
- [5] Lomba L., García C.B., Ribate M.P., Giner B., Zuriaga E., Applications of Deep Eutectic Solvents Related to Health, Synthesis, and Extraction of Natural Based Chemicals, *Appl. Sci.*, 11 (2021), 10156.
- [6] <https://veeprho.com/active-pharmaceuticals-ingredients-and-excipients-in-pharmaceuticals/> (pristup 19. lipnja 2024.)
- [7] <https://www.verywellhealth.com/api-active-pharmaceutical-ingredient-2663020?print> (pristup 19. lipnja 2024.)
- [8] <http://struna.ihj.hr/naziv/bioraspolozivost/35628/> (pristup 20. lipnja 2024.)
- [9] Garcia-Arieta A., Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65 (2014), 89-97.
- [10] Lovrić J., Hafner A., Radiković A., Juretić M., Duerrigl M., Perina Lakoš G., Pepić I., Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva, *Farmaceutski glasnik*, 71 (2015), 355-384.

- [11] Chavda HV, Patel CN, Anand IS, Biopharmaceutics Classification System, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1 (2010), 62-69.
- [12] Charalabidis A., Sfouni M., Bergström C., Macheras P., The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) guidelines, *International Journal of Pharmaceutics*, 566 (2019), 264-281.
- [13] Radović M., Panić M., Radošević K., Bubalo M. C., Radojčić Redovniković I., Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti, *Kemija u industriji*, 70 (2021), 551-562.
- [14] Swebocki T., Barras A., Abderrahmani A., Haddadi K., Boukherroub R., Deep Eutectic Solvents Comprising Organic Acids and Their Application in Bio(Medicine), *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023), 8492.
- [15] Aguilar N., Moral A. M., Bol A., Atilhan M., Aparicio S., In silico study of therapeutic deep eutectic solvent for tetracaine liquid delivery, *Journal of Molecular Liquids*, 402 (2024), 124652.
- [16] Pedro S. N., Freire C. R., Silvestre A. J. D., Freire M. G., Deep Eutectic Solvents and Pharmaceuticals, *Encyclopedia*, 1 (2021), 942-963.
- [17] Hayyan M., Versatile applications of deep eutectic solvents in drug discovery and drug delivery systems: Perspective and opportunities, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18 (2023), 100780.
- [18] Wang J., Skolnik S., Permeability diagnosis model in drug discovery: a diagnostic tool to identify the most influencing properties for gastrointestinal permeability, *Curr Top Med Chem.*, 13 (2013), 1308-1316.
- [19] https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2017/20170623138212/anx_138212_hr.pdf (pristup 5. srpnja 2024.)
- [20] <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/19374.pdf> (pristup 5. srpnja 2024.)
- [21] <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-ceritinib-200304-pi.pdf> (pristup 5. srpnja 2024.)
- [22] <https://go.drugbank.com/drugs/DB09063> (pristup 5. srpnja 2024.)

- [23] Halder A.K., Haghbakhsh R., Voroshylova I.V., Duarte A.R.C., Corderio M.N.D.S., Density of Deep Eutectic Solvents: The Path Forward Cheminformatics-Driven Reliable Predictions for Mixtures, *Molecules*, 26 (2021), 5779.
- [24] Garcia G., Aparicio S., Ullah R., Atilhan M., Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications, *Energy & Fuels*, 29 (2015), 2616-2644.
- [25] Peng D., Minceva M., Predicting the density and viscosity of deep eutectic solvents at atmospheric and elevated pressures, *Fluid Phase Equilibria*, 582 (2024), 114086.
- [26] Skulcova A., Russ A., Jablonsky M., Sima J., The pH Behavior of Seventeen Deep Eutectic Solvents, *BioResources*, 13 (2018), 5042-5051.
- [27] Wolk O., Agbaria R., Dahan A., Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development, *Dove Press*, 8 (2014), 1563-1575.
- [28] Abuhejail R.M., Alzoman N.Z., Darwish I.A., Three Innovative Green and High-Throughput Microwell Spectrophotometric Methods for the Quantitation of Ceritinib, a Potent Drug for the Treatment of ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: An Application to the Analysis of Capsules and Drug Uniformity Testing, *Molecules*, 28 (2023), 7054.
- [29] Maniyar S.A., Jargar J.G., Das S.N., Dhundasi S.A., Das K.K., Alteration of chemical behavior of L-ascorbic acid in combination with nickel sulfate at different pH solutions *in vitro*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012 (2), 220-222.
- [30] Aguilar K., Garvin A., Lara-Sagahon A.V., Ibarz A., Ascorbic acid degradation in aqueous solution during UV-Vis irradiation, *Food Chemistry*, 2019 (297), 124864.