

Fenamátok és hidroxipropil- β -ciklodextrin kölcsönhatásának vizsgálata

Fülöp Ibolya¹, Gyéresi Árpád², Hobai Ştefan³

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Toxicológia, Biofarmácia és Farmakokinetika Tanszék,

²Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék, ³Orvosi Biokémia Tanszék

Studii privind interacţiunile între fenamaţi şi hidroxipropil- β -ciklodextrină

Ciclodextrinele sunt oligozaharide ciclice nereducătoare în a căror structură moleculară există cavităţi cilindrice în care se pot acomoda moleculele medicamentelor. Complexarea cu ciclodextrine este o metodă de îmbunătăţire a solubilităţii şi a biodisponibilităţii medicamentelor. Scopul lucrării noastre este analiza produselor cu conţinut de acid mefenamic (MA) şi acid flufenamic (FA) – antiinflamatoare nesteroidiene cu hidrosolubilitate redusă – şi hidroxipropil- β -ciklodextrină (HP- β -CD). Am preparat produse cu MA, FA şi HP- β -CD prin metoda malaxării şi coprecipitării în rapoarte molare 1:1 şi 1:2. Produsele obţinute au fost analizate prin calorimetrie diferenţială cu scanare termică (DSC). Am calculat constantele de stabilitate din izoterme de solubilitate. Din termograme se poate calcula rata de includere, care variază între 1 şi 23% în cazul produselor cu FA şi între 6-58% în cazul produselor cu MA. Rezultatele studiului solubilităţii de fază sugerează formarea unui complex cu raport stoichiometric 1:1. Constantele de stabilitate sunt $70 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ pentru MA şi $470 \pm 5 \text{ M}^{-1}$ pentru FA. În concluzie putem afirma că HP- β -CD măreşte solubilitatea MA şi a FA.

Cuvinte cheie: acid mefenamic, acid flufenamic, hidroxipropil- β -ciklodextrină, calorimetrie diferenţială cu scanare termică

Characterisation of the interaction between fenamates and hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Cyclodextrins are non-reducing cyclic oligosaccharides able to enclose drug molecules into their central lipophilic cavity. Forming complexes with cyclodextrins is used to solubility and bioavailability enhancement of drugs. The aim of our paper is the analysis of the mixtures containing mefenamic acid (MA), flufenamic acid (FA) – poorly water-soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs – and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD). We prepared mixtures containing MA, FA and HP- β -CD in 1:1 and 1:2 molar ratios by kneading and co-precipitation methods. The mixtures were analysed by differential scanning calorimetry (DSC) and the stability constants were calculated from the phase solubility diagrams. Using DSC thermograms can be calculated the complexed drug amount that varies between 1 and 23% in the case of FA and 6-58% at the MA mixtures. The phase solubility studies indicate that complexes with 1:1 stoichiometric ratio are formed. The stability constants are $70 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ for MA and $470 \pm 5 \text{ M}^{-1}$ for FA. In conclusion we can affirm that HP- β -CD increases the solubility of MA and FA. The results obtained by the DSC analysis show the formation of inclusion complexes.

Key words: mefenamic acid, flufenamic acid, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, differential scanning calorimetry

Orvostudományi Értesítő, 2010, 83 (1): 58-62

www.orvtudert.ro

Számos kutatás igazolja, hogy különböző farmakonok ciklodextrin-komplexei széles körben alkalmazhatóak a gyógyszer technológiában. Előállításuk alapanyaga a keményítő, a gyártástechnológia enzimátikus eljárásan alapszik, kivitelezése viszonylag könnyű és nincs környezetszennyező hatása [9]. A ciklodextrinek (CD) hat (α -CD), hét (β -CD), vagy nyolc (γ -CD) α -D-glükopiranoz egységből álló ciklikus, nem redukáló oligozaharidok, ezek „alpiciklodextrin” néven ismertek. A glükopiranoz egységek szék konformációja miatt csonka kúp alakú, belső üreggel rendelkező molekulák. A primér hidroxil-csoportjaik a kisebb, a szekundér hidroxil-csoportjaik a nagyobb alapkör peremén találhatóak, ennek következtében a CD-ek külső felülete hidrofíli tulajdonságú, vízben oldódnak. A molekula belső üregét hidrogénatomok és glikozilkötésű oxigénatomok alkotják, ezért ez a felület apoláros, hidrofób. Ez a szerkezeti elrendezés következtében zárványkomplexeiket képezhetnek különböző kémiai szerkezetű (elsősorban apoláros, rossz vízdékonyságú) molekulákkal, amikor is

a CD mint „gazdamolekula” magába zárja – teljesen, vagy részlegesen – a „vendégmolekulát”. Gyenge fizikai kötés jön létre közöttük (hidrogénhid-, Van der Waals-kötés), emiatt bizonyos körülmények között a zárványkomplex könnyen disszociálhat és a vendégmolekula visszanyeri eredeti fiziko-kémiai tulajdonságait. A komplexképzés legfontosabb következménye a bezárt molekulák vízdékonyságának növekedése, reaktivitásának csökkenése, stabilizálódása UV-fénnyel, oxidáló anyagokkal szemben; a szublimáció és az illékonyság alacsony szintre csökken [8, 9, 13].

A három alapvegyület mellett léteznek kémiaiilag módosított CD származékok is, közülük az egyik legjelentősebb a hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), amely az alapvegyülethez képest jobb vízdékonyságú (65% 25°C-on). Egyaránt használható orális, parenterális és szemészeti készítményekben. Toxicitása nagyon alacsony, a szervezetben könnyen glükózzá bomlik le [2, 9].

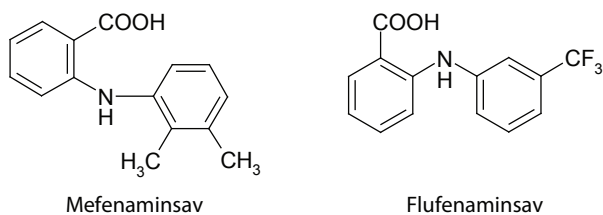
A mefenaminsav (MA) és flufenaminsav (FA) (1. ábra) a fenamátok csoportjába tartozó nemszteroid gyulladáscsökkentők [14, 15]. Hatékony vegyületek ízületi gyulladások, fogászati-, mozgásszervi-, menstruációs fájdalom ellen. Rossz vízdékonyságuk következtében számos gyomor-bélrendszeri mellékhatást okoznak

Fülöp Ibolya

540311 Marosvásárhely - Târgu Mureş

Aleea Carpaţii 51/602

e-mail: fulopibolya@yahoo.com



1. ábra. A mefenaminsav és flufenaminsav szerkezete képlete [15]

(hányinger, hányás, gyomorégés, gyomorfájdalom), emiatt a terápiában viszonylag ritkábban alkalmazzák őket, hatákonyságuk ellenére. Oldékonyságuk növelése a felsorolt mellékhatások enyhítésére szolgál.

Munkánk célja a felsorolt hatóanyagok vízoldékonyságának növelése HP- β -CD-el, valamint a hatóanyagok és a segédanyag közötti kölcsönhatások vizsgálata.

Anyag és módszer

A mefenaminsav (2-((2,3-dimetilfenil)aminobenzoészav) és flufenaminsav (2-{{3-(trifluorometil)fenil}amino}benzoészav) a Sigma Aldrich termékei, a használt oldószerek és reagensek analitikai minőségűek voltak.

A termékek készítése

Termékeket készítettünk MA, FA és HP- β -CD tartalommal 1:1 és 1:2 molarányban a következő módszerekkel:

1. *Gyúrással*: a pontosan bemért hatóanyagot és segédanyagot az össztömeg felének megfelelő 50%-os etanollal mozsárban 15 percig kevertük, majd 100 °C-on állandó tömegig szárítottuk. Az etanol a hatóanyag jobb nedvesedését, ezáltal a hatóanyag és segédanyag interakcióit segíti elő.

2. *Kicsapással*: a pontosan bemért ciklodextrint vízben, a hatóanyagot etanolban oldottuk, az összekevert oldatot 1 óráig mágneses keverővel kevertettük, majd az oldószert 100 °C-on elpárologtattuk.

Oldékonyság-izoterma vizsgálatok

A HP- β -CD oldékonyságnövelő hatásának vizsgálatát és a stabilitási állandók értékeinek kiszámítását a Higuchi–Connors-féle módszerrel végeztük. Ehhez 10 ml növekvő koncentrációjú HP- β -CD oldatokat készítettünk (50 és 200 mM közötti tartományban), amelyekhez fölös mennyiségű hatóanyagot adtunk (50 mg). Az oldatokat 3 napig – az egyensúly beálltáig – szobahőmérsékleten kevertettük mágneses keverővel. Ezután meghatároztuk az oldatok MA illetve FA koncentrációját spektrofotometriás módszerrel: szűrés után (0,45 μ m-es membránszűrő) a MA esetében 288 nm-en, a FA esetében 284 nm-en leolvastva az oldatok abszorbanációját. Ezeket a hullámhosszakon a CD-nek nincs UV-elnyelése. A vizsgálatokat háromszor ismételtük meg (variációs koefficiens <5%).

Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatok

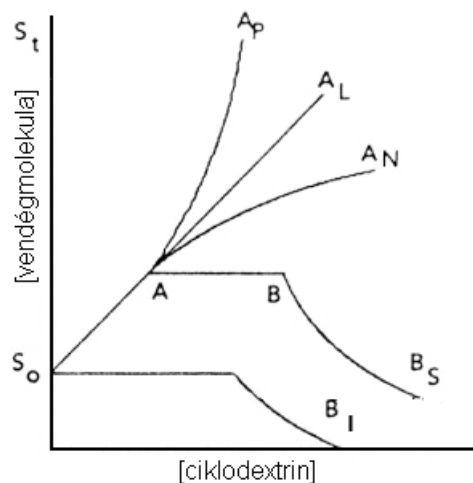
A zárványkomplex-képződés tényének igazolására differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) vizsgálatokat is végeztük Shimadzu TA-60WS készülékkel. A méréseket az MA esetében 20-300 °C, az FA esetében 20-150 °C hőmérséklet-tartományban 10 °C/perc fűtési sebességgel végeztük. A 40 μ l-es alumínium tartályba bemért anyagmennyiség 3,3-11,8 mg között változott.

Eredmények

Oldékonysági izoterma-vizsgálatok

A ciklodextrinek oldékonyságnövelő hatása és a képződött komplexek stabilitási állandói legegyszerűbben Higuchi–Connors (1965) módszerével határozhatók meg. Eszerint ha növekvő mennyiségű ciklodextrint tartalmazó oldatokhoz fölös mennyiségű rosszul oldódó potenciális vendégmolekulát adunk, majd a néhány napig tartó rázással elért egyensúlyi állapotban a vendégmolekula oldékonysága megnövekszik oly mértékben, amely egy oldékonysági izoterma-típussal jellemezhető (az oldott vendégmolekula koncentrációja a ciklodextrin-koncentráció függvényében). A lehetséges oldékonysági izoterma típusokat a 2. ábrán láthatjuk.

Az oldékonyság-növekedés lehet monoton (A_L típusú izoterma) a linearitástól pozitív (A_P) vagy negatív eltéréssel (A_N), növekedhet valamely meghatározott határértékig (B_S típusú izoterma), és csökkenhet is (B_I típusú izoterma). Az oldékonysági izoterma kezdeti lineáris szakaszának iránytangenséből és a vendégmolekula intrinszik oldékonyságából kiszámítható az 1:1 molarányban képződött komplex stabilitási állandója ($K_{1:1}$) az 1. képlet alapján,



2. ábra. Izoterma-típusok

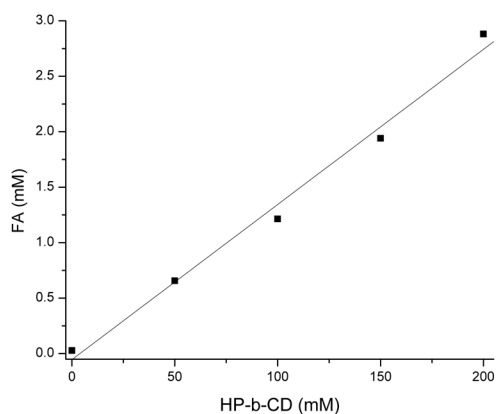
$$K_{1:1} = \frac{tg\alpha}{S_0(1 - tg\alpha)} \quad (1)$$

ahol $tg\alpha$ az iránytangens, S_0 a vendégmolekula intrinszik oldékonyságát jelöli.

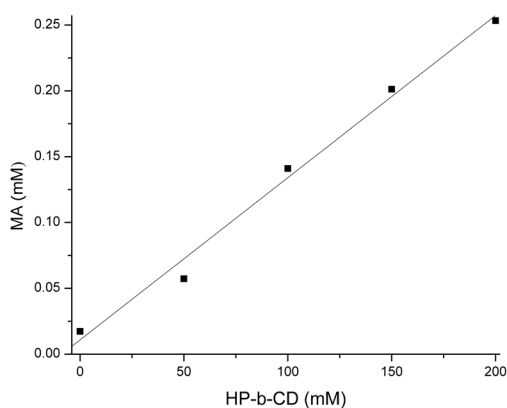
Mindkét hatóanyag esetében A_L típusú izotermát figyelhetünk meg (**3., 4. ábrák**), a korrelációs együttható értéke mindkét esetben +1-hez közeli érték ($r = 0,994$). Ez azt jelenti, hogy a vendégmolekulák vízdékonysága lineárisan növekszik a HP- β -CD koncentrációjával 1:1 mólarányú komplex képződése mellett. Az egyenesek korrelációs egyenleteiből (MA: $C_{MA} = 0,0012C_{HP-\beta-CD} + 0,01$; FA: $C_{FA} = 0,0014C_{HP-\beta-CD} + 0,05$) kiolvasható iránytangens értéke arra utal, hogy az FA és HP- β -CD között stabilabb komplex képződik. A stabilitási állandók értékei $70 \pm 3 M^{-1}$ az MA és $470 \pm 5 M^{-1}$ az FA esetében.

Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatok

A vizsgálatok során felvettük a két hatóanyag valamint a gyúrással és a kicsapással készített termékek DSC-görbéit (**5., 6. ábrák**). A ciklodextrinek 100 °C alatt vizet veszítenek,

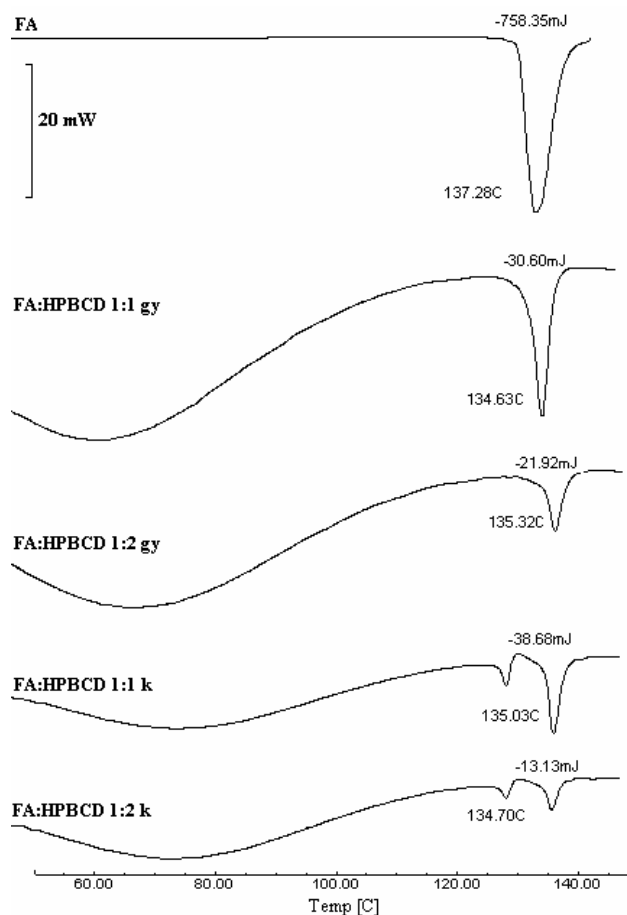


3. ábra. Az FA (flufenaminsav) oldékonysági izotermája HP- β -CD jelenlétében

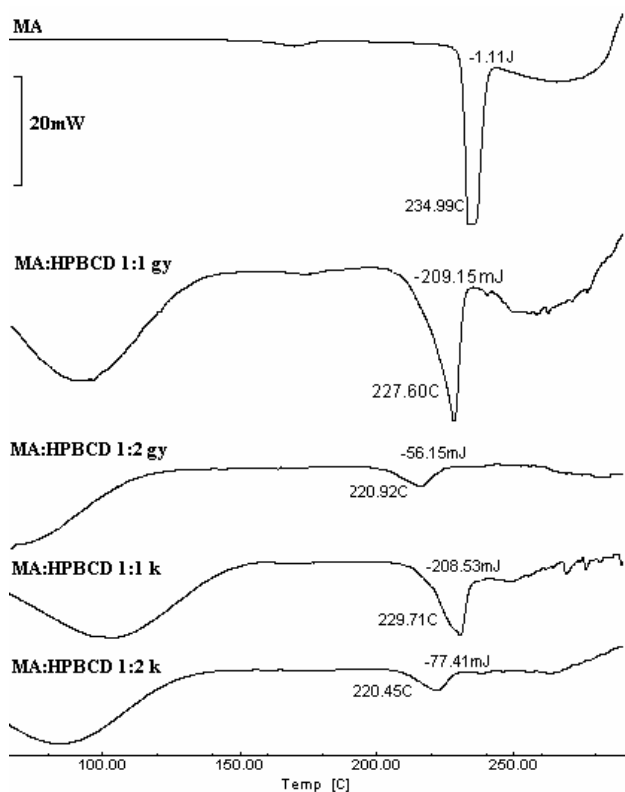


4. ábra. Az MA (mefenaminsav) oldékonysági izotermája HP- β -CD jelenlétében

ezért a termékek DSC görbéin elnyújtott csúcs látható 30-100 °C tartományban. Éles endoterm csúcs figyelhető az MA termogramján 234,9 °C-nál, az FA esetében 137,2 °C-nál, amely – az irodalmi adatokkal összhangban – a farmakon olvadáspontját jelzi. Az olvadás közben mérhető entalpiaváltozás (ΔH) megfelel az olvadáspontban kapott DSC csúcs és az alapvonal által bezárt területnek. Mivel értéke függ a bemért anyagmennyiségtől, összehasonlításra az egységnyi tömrege vonatkoztatott értéke használható, az ún. normatizált entalpiaváltozás (J/g). A termékek esetében a tiszta hatóanyaghoz viszonyítva kisebb normatizált entalpiaváltozást mérhetünk, ami arra utal, hogy a hatóanyag egy része a ciklodextrin üregében helyezkedik el. Ugyanakkor megfigyelhető hogy a termékek termogramján a hatóanyag alacsonyabb hőfokon olvad, ez a jelenség arra utal, hogy a hatóanyag és a ciklodextrin között kölcsönhatás jön létre. Az olvadáspont-csökkenés hangsúlyosabb az MA 1:2 mólarányban képzett termékeinél. Ismerve ezen normatizált entalpiaváltozás-értékeket az alábbi képlettel (**2. képlet**) közelítően megbecsülhető a bezáródási határfok, azaz hogy a molekulák hány százaléka komplexálódott ($C_k\%$ a bezáródási határfok, %; ΔH_0 a hatóanyag normatizált entalpiaválto-



5. ábra. Az FA (flufenaminsav) és termékeinek DSC görbéi



6. ábra. Az MA (mefenaminsav) és termékeinek DSC görbéi

zása, J/g; ΔH_t a termék normatizált entalpiaváltozása, J/g; p a hatóanyag százalékos aránya a termékben).

$$C_k \% = \frac{\Delta H_0 \cdot p}{\Delta H_t} 10^3 \quad (2)$$

Mindkét hatóanyagnál a legjobb bezáródási hatásfokot az 1:2 molarányban kicsapással előállított termékek esetében észleltünk.

A fent leírtakat az 1. táblázat szemlélteti.

Megbeszélés, következtetések

A CD-es komplexképzést gyakran alkalmazzák oldékonyságnövelésre, számos irodalmi adat igazolja az HP-β-CD hatékonyságát is a nemsteroid gyulladásgátlók esetében, amikor az oldékonyságnövelés mellé a gyomorirritáció enyhítése is társul [1, 4, 5, 8, 11]. Ismertek irodalmi adatok az MA és különböző ciklodextrinek kölcsönhatásairól [3, 7, 12]. Viszonylag kevés tanulmány áll rendelkezésre az irodalomban, amely az FA oldékonyságnövelésére irányul. Korábbi kísérleteink során vizsgáltuk a β-CD-szulfobutil-éter, egy ionos ciklodextrin és az FA interakcióit [6], Mura P. és munkatársai bukkális tabletták előállításához segédanyagként HP-β-CD-t használtak [10]. Vizsgálatainkkal arra kerestünk választ, hogy a HP-β-CD alkalmas-e az MA

1. táblázat. A DSC termogramok fontosabb paramétereit

Termék	Olvadáspont (°C)	Normalizált entalpiaváltozás*	Bezáródási hatásfok**
MA	234,9	129,6	
MA 1:1 gy	227,5	18,8	1,0
MA 1:2 gy	220,9	9,5	8,4
MA 1:1 k	229,4	17,4	9,5
MA 1:2 k	220,4	8,7	23,2
FA	137,2	96,2	
FA 1:1 gy	134,6	9,2	43,2
FA 1:2 gy	135,3	5,1	53,7
FA 1:1 k	135,0	9,5	41,4
FA 1:2 k	134,7	2,8	58,0

gy – gyúrással előállított termék; k – kicsapással előállított termék; */g; **%

és FA vízdoldékonyságának növelésére, illetve, képződik-e zárványkomplex a farmakonok és a segédanyag között. A fázis-oldhatósági vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy mindkét farmakon vízdoldékonysága növekszik HP-β-CD jelenlétében és vizes közegben 1:1 molarányú komplex képződik. Az MA esetében kisebb stabilitási állandót mértünk ($70 \pm 3 \text{ M}^{-1}$), ezt alátámasztják a DSC mérések is, mivel az MA termékeinél kisebb a bezáródási hatásfok az FA termékeihez viszonyítva. A termogramok igazolják a részleges zárványkomplex-képződést, illetve fizikai kölcsönhatás létrejöttét a hatóanyagok és a HP-β-CD között.

Irodalom

1. Alsarra I. A., Ahmed M. O., Alanazi F. K. et al. – *Influence of cyclodextrin complexation with NSAIDs on NSAID/cold stress-induced gastric ulceration in rats*, Int J Med Sci, 2010, 7(4): 232-239.
2. Baboota S., Agarwal S. P. – *Preparation and Characterisation of Meloxicam Hydroxy-Propyl β-Cyclodextrin Inclusion Complex*, J Incl Phenom Macro, 2005, 51: 219-224.
3. Derle D. V., Bele M., Kasliwal N. – *In vitro and in vivo evaluation of mefenamic acid and its complexes with β-Cyclodextrin and HP-β-Cyclodextrin*, Asian Journal of Pharmaceutics, 2008, 2(1): 30-34.
4. Fukuda M., Miller D.A., Peppas N.A. et al. – *Influence of sulfobutyl ether β-cyclodextrin (Captisol®) on the dissolution properties of a poorly soluble drug from extrudates prepared by hot-melt extrusion*, Int J Pharm, 2008, 350: 188-196.
5. Fülöp I., Gyéresi Á., Ludányi K. et al. – *Meloxicam ciklodextrinnekkel való kölcsönhatásának vizsgálata fizikai-kémiai módszerekkel*, Orvostudományi Értesítő, 2008, 81(3): 199-202.
6. Fülöp I., Gyéresi Á., Szabó-Révész P. et al. – *Physicochemical characterization of flufenamic acid and sulfobutyl-eter-β-cyclodextrin binary system*, Acta Medica Marisiensis, 2010, 2: 129-131.

7. Hladon T., Pawlacky J., Szafran B. – *Stability of mefenamic acid in the inclusion complex with β -cyclodextrin in the solid phase*, J Incl Phenom Macro, 1999, 35(3): 497-206.
8. Loftsson T., Hreinsdottir D., Masson M. – *Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs*, Int J Pharm, 2005, 302: 18-28.
9. Martin Del Valle E.M. – *Cyclodextrins and their uses: a review*, Process Biochem, 2004, 39: 1033-1046.
10. Mura P., Corti G., Cirri M. et al. – *Development of mucoadhesive film for buccal administration of flufenamic acid: Effect of cyclodextrin complexation*, J Pharm Sci, 2010, 99(7): 3019-3029.
11. Perlovich G. L., Skar M., Bauer-Brandl A. – *Driving forces and the influence of the buffer composition on the complexation reaction between ibuprofen and HPCD*, Eur J Pharm Sci, 2003, 20(2): 197-200.
12. Pop M.M., Goubitz K., Borodi G. et al. – *Crystal structure of the inclusion complex of beta-cyclodextrin with mefenamic acid from high-resolution synchrotron powder-diffraction data in combination with molecular-mechanics calculations*, Acta Crystallographica B, 2002, 58(6): 1036-1043.
13. Szejtli J. – *Ciklodextrinek és zárványkomplexeik a biotechnológiában és vegyiparban*, Magyar Kémikusok Lapja, 1990, 45(3-4): 98-106.
14. ****European Pharmacopoeia 6.6 Suppl.*, Council of Europe, Strasbourg, 2009.
15. ****Martindale. The Extra Pharmacopoeia 36 ed.*, Pharmaceutical Press, London, 2009.