



UNIwersytet ŁÓDZKI
Wydział Chemii, Katedra Chemii Fizycznej

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Marta Biernacka

*Badania powstawania kompleksów inkluzyjnych
cyklodekstryn z wybranymi związkami
biologicznie aktywnymi*

Promotor: **prof. dr hab. Bartłomiej Pałecz**

Promotor pomocniczy: **dr Artur Stępnia**

Praca wykonana w Zakładzie Chemii Biofizycznej

Łódź 2022

Dziękuję

*Promotorowi, Panu profesorowi Bartłomiejowi Pałeczowi,
za opiekę promotorską i nieocenioną pomoc podczas wykonywania niniejszej pracy.*

*Panu doktorowi Arturowi Stępniaкови,
za ogromne wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość oraz
pomoc w rozwiązywaniu wszystkich problemów,
cenne uwagi i dyskusje prowadzone w czasie przygotowywania rozprawy.*

*Panu doktorowi Dariuszowi Waliszewskiemu,
za pozytywną motywację i dobre słowo w chwilach zwątpienia.*

*Wszystkim pracownikom Katedry Chemii Fizycznej,
za stworzenie miłej atmosfery w ciągu ostatnich 4 lat.*

*Na końcu dziękuję mojej Rodzinie, w szczególności mamie,
bez Waszego wsparcia nie udałoby mi się tutaj dotrzeć.*

SPIS TREŚCI

Wykaz używanych skrótów	6
Wprowadzenie	7
1. WSTĘP TEORETYCZNY.....	9
1.1. Cyklodekstryny i ich rola w układach makrocyklicznych	10
1.1.1. Chemia związków makromolekularnych	10
1.1.2. Układy typu gość – gospodarz	10
1.1.3. Cyklodekstryny – budowa i właściwości.....	11
1.1.4. Naturalne cyklodekstryny	13
1.1.5. Modyfikowane pochodne naturalnych cyklodekstryn	15
1.1.6. Farmakokinetyka i toksyczność	16
1.1.7. Cyklodekstryny w roli receptorów makromolekularnych - zastosowanie.....	16
1.2. Charakterystyka badanych ligandów	19
1.2.1. Ezetymib	19
1.2.2. Cilostazol.....	20
1.2.3. Flawanony.....	21
1.3. Właściwości stosowanych rozpuszczalników	24
1.3.1. Woda.....	24
1.3.2. Dimetylosulfotlenek.....	26
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	29
2.1. Metody badawcze i aparatura	30
2.1.1. Spektroskopia UV-Vis	30
2.1.1.1. Metoda Higuchi – Connors	32
2.1.2. Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC)	35
2.1.3. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)	39
2.1.4. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)	41
2.2. Wykorzystane odczynniki, przygotowanie próbek i procedura pomiarowa	42
2.2.1. Badane substancje.....	42
2.2.2. Spektroskopia UV-Vis.....	42
2.2.3. Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC)	43

2.2.4. Przygotowanie kompleksów w formie stałej (DSC, FT-IR)	43
2.2.5. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)	43
2.2.6. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)	44
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW	45
3.1. Spektrofotometryczne badania rozpuszczalności w wodzie wybranych ligandów w obecności cyklodekstryn	46
3.1.1. Badanie wzrostu rozpuszczalności ezetymibu w wodzie	46
3.1.2. Badanie wzrostu rozpuszczalności cilostazolu w wodzie	50
3.1.3. Badanie wzrostu rozpuszczalności flawanonu (FLO) w wodzie	54
3.1.4. Badanie wzrostu rozpuszczalności 4'-metoksyflawanonu (FL1) w wodzie.....	57
3.1.5. Badanie wzrostu rozpuszczalności 4'-chloroflawanonu (FL2) w wodzie	60
3.1.6. Badanie wzrostu rozpuszczalności 7-metoksyflawanonu (FL3) w wodzie.....	64
3.2. Kalorymetryczne badania oddziaływań wybranych ligandów z cyklodekstrynami	67
3.2.1. Oddziaływania ezetymibu (EZE) z cyklodekstrynami w DMSO	67
3.2.2. Oddziaływania cilostazolu (CILO) z cyklodekstrynami w DMSO	69
3.2.3. Oddziaływania flawanonu (FLO) z cyklodekstrynami w wodzie	72
3.2.4. Oddziaływania 4'-metoksyflawanonu (FL1) z cyklodekstrynami w wodzie	74
3.2.5. Oddziaływania 4'-chloroflawanonu (FL2) z cyklodekstrynami w DMSO.....	76
3.2.6. Oddziaływania 7-metoksyflawanonu (FL3) z cyklodekstrynami w wodzie	79
3.3. Analiza kompleksów inkluzyjnych ligandów z cyklodekstrynami w fazie stałej.....	82
3.3.1. Analiza powstałych kompleksów w podczerwieni.....	82
3.3.2. Badania trwałości termicznej kompleksów metodą DSC	87
4. PODSUMOWANIE	94
Streszczenie.....	103
Abstract	105
Załączniki	107
Dorobek naukowy:	148

Wykaz używanych skrótów

α CD	– α -cyklodekstryna
β CD	– β -cyklodekstryna
HP β CD	– hydroksypropylo- β -cyklodekstryna
SBE β CD	– sulfobutylo- β -cyklodekstryna (sól sodowa eteru sulfobutylowego)
EZE	– ezetymib
CILO	– cilostazol
FL0	– flawanon
FL1	– 4'-metoksyflawanon
FL2	– 4'-chloroflawanon
FL3	– 7-metoksyflawanon
DMSO	– dimetylosulfotlenek
ITC	– izotermiczna kalorymetria miareczkowa (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
FTIR	– spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
DSC	– różnicowa kalorymetria skaningowa (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
K	– stała tworzenia kompleksu
n	– stechiometria kompleksu (liczba cząsteczek receptora związanych z jedną cząsteczką liganda)
ΔS	– molowa entropia badanego procesu
ΔG	– molowa entalpia swobodna badanego procesu
ΔH	– molowa entalpia badanego procesu
ε	– molowy współczynnik ekstynkcji

Wprowadzenie

Choroby cywilizacyjne są jednym z istotniejszych problemów współczesnej medycyny. Zaliczyć do nich można choroby układu krążenia, takie jak miażdżyca, nadciśnienie tętnicze, zawał serca, ale także cukrzycę, otyłość oraz nowotwory. Substancje wykorzystywane w leczeniu schorzeń układu sercowego czy chorób onkologicznych często charakteryzują się ograniczoną rozpuszczalnością w wodzie, co może znacząco ograniczać ich przyswajalność przez organizm ludzki, a co za tym idzie uniemożliwiać efektywne leczenie. Dlatego zastosowanie nośników, zwiększających rozpuszczalność tych związków, będących równocześnie obojętnymi, nietoksycznymi dodatkami do leków może stanowić sposób na rozwiązanie tego problemu. Rolę takich nośników mogą pełnić cyklodekstryny, naturalne, nietoksyczne cukrowe makromolekuły, które dzięki swojej hydrofilowo-hydrofobowej budowie, mogą z powodzeniem być wykorzystywane jako związki kompleksujące niewielkie, apolarne cząsteczki leków, zwiększając tym samym ich działanie.

Celem niniejszej pracy była próba charakterystyki kompleksów inkluzyjnych wybranych cyklodekstryn ze związkami biologicznie aktywnymi. Do badań wybrane zostały dwa leki, stosowane w leczeniu chorób układu krążenia: ezetymib i cilostazol oraz cztery flawanony, mające potencjalne zastosowanie w medycynie onkologicznej.

Przeprowadzone zostały spektrofotometryczne badania rozpuszczalności fazowej, które pozwoliły określić wpływ cyklodekstryn na wzrost rozpuszczalności badanych substancji w wodzie, oszacować stosunek molowy *ligand - receptor* tworzonych połączeń oraz określić ich stałe tworzenia. Wykonano również serie pomiarów wykorzystując izotermiczny kalorymetr miareczkujący ITC, umożliwiając dokonywanie termodynamicznej charakterystyki procesów kompleksowania. Otrzymane wyniki pozwoliły wyznaczyć molowe entalpie oraz entropie badanych procesów, stechiometrię powstałych kompleksów *ligand - cyklodekstryna* oraz ich stałe tworzenia. Dodatkowo podjęto też próbę utworzenia kompleksów w formie stałej, przeprowadzono ich analizę wykorzystując metodę spektroskopii w podczerwieni FT-IR oraz różnicową kalorymetrię skaningową (DSC).

Uzyskane w pracy wielkości termodynamiczne potwierdziły tworzenie się kompleksów cyklodekstryn z wybranymi substancjami biologicznie aktywnymi, dodatkowo dokonano uszeregowania makrocykli pod względem najlepszego dopasowania *ligand - receptor*. Analiza utworzonych przez flawanony kompleksów dała możliwość porównania zdolności kompleksujących cyklodekstryn, w zależności od rodzaju podstawnika znajdującego się w cząsteczce flawanonu.

WSTĘP TEORETYCZNY

1.1. Cyklodekstryny i ich rola w układach makrocyklicznych

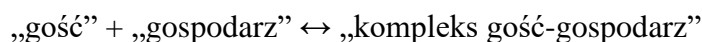
1.1.1. Chemia związków makromolekularnych

Chemia supramolekularna, zwana także chemią poza cząsteczką (ang. chemistry beyond the molecule) [1] zajmuje się badaniem dużych układów cząsteczkowych wykazujących właściwości samoorganizujące [2], w których molekuly samorzutnie łączą się ze sobą za pomocą niekowalencyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych. Do naturalnie występujących struktur makromolekularnych zaliczyć można błony komórkowe, układy enzymatyczne oraz łańcuchy kwasów nukleinowych. W oparciu o naturalnie występujące układy supramolekularne projektowane i badane są nowe związki makrocząsteczkowe, które mają zdolność do tworzenia podobnych struktur.

Takimi makrocząsteczkami są między innymi: dendrymery, etery koronowe, kryptandy oraz cyklodekstryny. Tworzą one połączenia z innymi cząsteczkami pełniąc rolę receptora w układzie kompleksowym. Makrocząsteczki działają podobnie jak naturalny katalizator, enzym, który łączy się z białkiem. Nie tworzą one trwałych połączeń, a jedynie tymczasowy kompleks, dzięki odpowiedniemu dopasowaniu przestrzennemu, oddziaływaniom hydrofobowym oraz obecności grup funkcyjnych, umożliwiających powstawanie wiązań wodorowych.

1.1.2. Układy typu gość – gospodarz

W tworzeniu kompleksów supramolekularnych zwanych potocznie kompleksami „gość – gospodarz” biorą udział różnego rodzaju oddziaływania niekowalencyjne. Należą do nich oddziaływania jonowe (jeśli któraś z cząsteczek występuje w postaci jonowej), wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa, a także efekty hydrofobowe. Utworzenie kompleksu wymaga odpowiedniego dopasowania oraz obecności ugrupowań, umożliwiających tworzenie oddziaływań międzycząsteczkowych. Dopasowanie pomiędzy cząsteczkami nazywane jest rozpoznaniem molekularnym. Wzajemną komplementarność receptora (gospodarza) do gościa można oszacować na podstawie porównania wartości stałych tworzenia (K) układu:



Im większe wartości osiąga stała trwałości tym lepsze dopasowanie pomiędzy cząsteczkami tworzącymi kompleks.

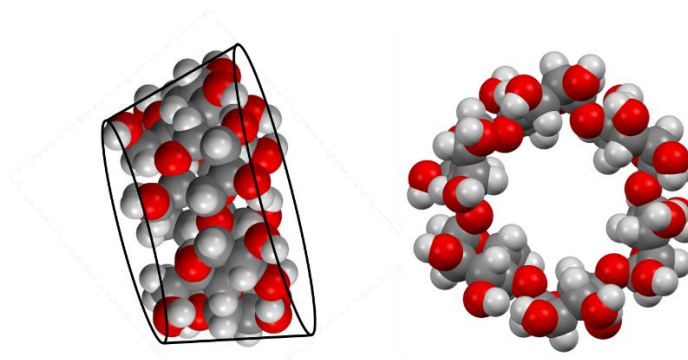
Ze względu na budowę makrocząsteczek możemy wyróżnić dwa typy kompleksów: inkluzyjne i addycyjne.

Kompleksy inkluzyjne [3,4] (włączeniowe) występują w przypadku, gdy cząsteczka gospodarza posiada w swojej budowie wnękę, w której lokować się może ligand. Do tego typu cząsteczek, zwanych też makrocyklami zaliczane są między innymi etery koronowe, cyklodekstryny, kukurbituryle i kaliksareny. Ważną rolę w przypadku kompleksów inkluzyjnych pełnią oddziaływania van der Waalsa, hydrofobowe oraz wiązania wodorowe. W kompleksach addycyjnych tworzonych między innymi przez dendrymery [5], główną rolę pełnią wiązania jonowe oraz wodorowe dzięki którym cząsteczki łączą się ze sobą.

1.1.3. Cyklodekstryny – budowa i właściwości

Cyklodekstryny stanowią jeden z głównych filarów chemii supramolekularnej. Są to naturalne polisacharydy, powstające w wyniku bakteryjnej degradacji skrobi. Pierwsza wzmianka w literaturze na temat tych związków pochodzi z 1891 roku. Francuz Antoine Villers, który badał procesy fermentacji węglowodanów, podczas prowadzonych eksperymentów odkrył, że w trakcie bakteryjnego rozkładu skrobi powstaje nieznan produkt, w postaci lekko słodkiego, białego, krystalicznego proszku [6]. Pełnego opisu i charakterystyki dokonał 12 lat później, Franz Schardinger, który wyizolował szczep bakterii odpowiedzialny za tworzenie cyklodekstryn [7]. Od jego nazwiska cyklodekstryny nazywa się dekstrynami Schardingera.

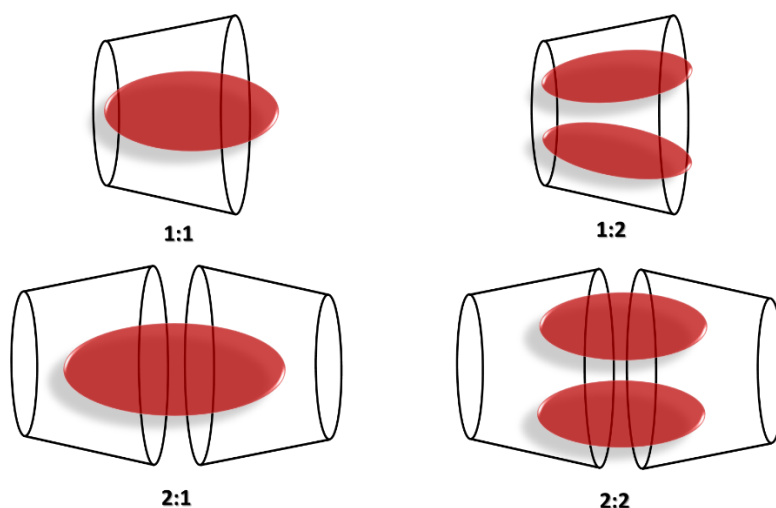
Strukturalnie cyklodekstryny są polimerami, zbudowanymi z pojedynczych merów glukozy, połączonych wiązaniem α -1,4-glikozydowym, które tworzą zamkniętą formę pierścieniową. Pierścienie glukozy połączone są ze sobą w taki sposób, że na jednej z krawędzi pierścienia występuje zagęszczenie grup hydroksylowych połączonych z II rzędownymi węglami C2 i C3 w cząsteczce glukozy, natomiast na drugiej krawędzi znajdują się grupy hydroksylowe należące do I rzędownych węgli C6. Taka budowa sprawia, że cząsteczka przyjmuje kształt ściętego stożka (Rysunek 1).



Rysunek 1. Model strukturalny cząsteczki β -cyklodekstryny.

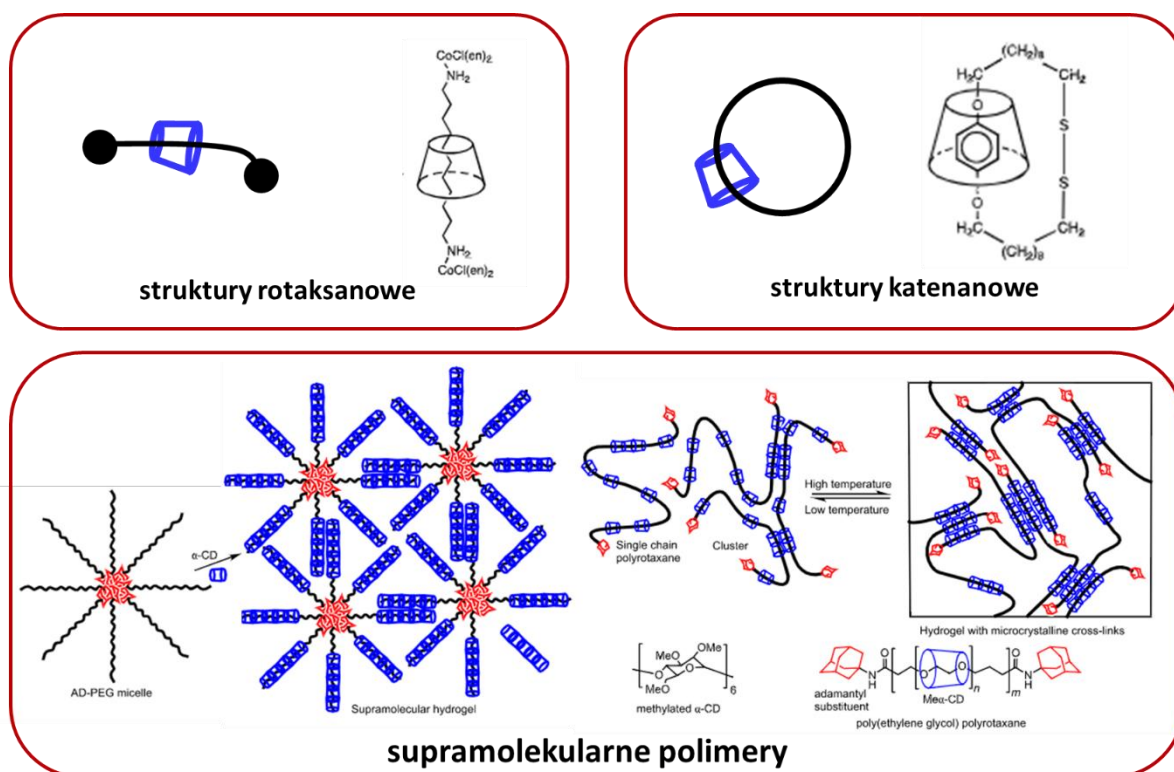
Cykliczna budowa cyklodekstryn sprawia, że posiadają one charakterystyczną wnękę, dzięki czemu mają zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Obecność grup hydroksylowych na krawędziach pierścienia powoduje, że cząsteczki cyklodekstryn są bardzo dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych, takich jak woda. Wnętrze cyklodekstryny, z uwagi na obecność mostków tlenowych i atomów wodoru, wykazuje właściwości hydrofobowe, dzięki czemu cyklodekstryny mogą stanowić supramolekularne nośniki cząsteczek apolarnych, lokujących się w ich wnętrzu.

W roztworze wodnym tworzenie kompleksu jest procesem samorzutnym, za którego powstawanie odpowiadają oddziaływania hydrofobowe, van der Waalsa, elektrostatyczne oraz wiązania wodorowe [8]. Kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn zazwyczaj tworzą się w stosunku molowym 1:1, jednak występują również połączenia o innej stechiometrii (Rysunek 2). Tworzyć się mogą również inne struktury supramolekularne takie jak rotaksany i pseudorotaksany [9,10], katenany [11,12] czy supramolekularne polimery [13,14] (Rysunek 3).



Rysunek 2. Kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn w najczęściej spotykanych stosunkach stechiometrycznych.

Wyróżnia się kilka sposobów otrzymywania kompleksów w formie stałej. Do najczęściej stosowanych zaliczyć można metodę współrozpuszczania, w której zarówno ligand jak i makrocykl rozpuszczane są w odpowiednich rozpuszczalnikach, a następnie mieszane ze sobą. W ten sposób po odparowaniu rozpuszczalników otrzymuje się stały kompleks. Inną metodą jest mechaniczne ucieranie cyklodekstryny z ligandem, podczas tego procesu ligand jest fizycznie wciskany do wnętrza makrocykla.



Rysunek 3. Przykładowe struktury molekularne tworzone przez cyklodekstryny [11,13]

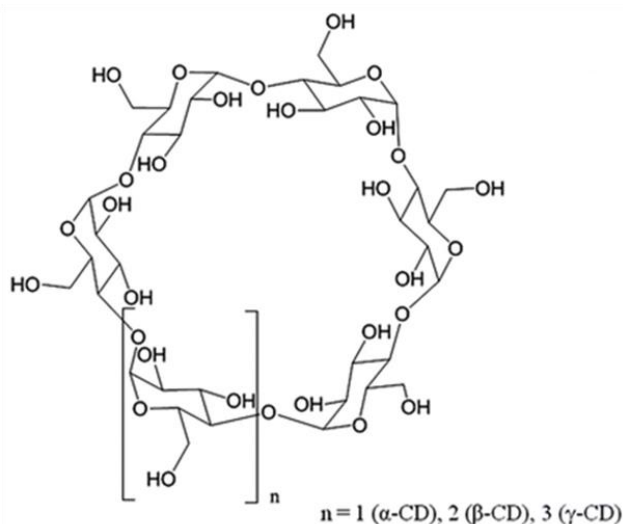
1.1.4. Naturalne cyklodekstryny

Naturalne cyklodekstryny produkowane są poprzez poddanie skrobi ziemniaczanej enzymatycznej degradacji [15]. Wykorzystywany jest w tym celu specjalny enzym cykloglukotransferaza (CGT), wytwarzany przez bakterie z rodziny *Bacillus*, który rozcina łańcuch skrobi na mniejsze fragmenty i łączy je ze sobą w formę pierścieniową.

Cyklodekstryny różnią się między sobą jedynie ilością cząsteczek glukozy budujących pierścień. Wraz ze wzrastającą ilością merów nazywane są one kolejno literami alfabetu greckiego. Najmniejsza z naturalnie występujących cyklodekstryn (α -cyklodekstryna) zbudowana jest z sześciu cząsteczek glukozy, jednak znane są cząsteczki zawierające w swojej strukturze nawet do 30 merów [16]. Cyklodekstryny składające się z mniej niż 6 merów nie powstają naturalnie, ze względu na występowanie zbyt dużych naprężeń wewnątrzcząsteczkowych. W literaturze znane są jednak próby syntezy mniejszych cyklodekstryn, nawet trzyczłonowych [17].

Z punktu widzenia wykorzystania cyklodekstryn jako receptorów do tworzenia kompleksów, zastosowanie znalazły, obok α -cyklodekstryny, formy beta i gamma, zbudowane odpowiednio z 7 i 8 cząsteczek glukozy (Rysunek 4).

Porównując trzy podstawowe cyklodekstryny (Tabela 1) zauważyć można, że wysokość cząsteczki pozostaje stała, a powiększeniu ulega jedynie średnica pierścienia, co za tym idzie ilość miejsca dla potencjalnego liganda lokującego się w jego wnętrzu. Dzięki temu możliwe jest dobranie odpowiedniej cząsteczki cyklodekstryny tak, by zapewnić najlepsze dopasowanie przestrzenne powstającego kompleksu.



Rysunek 4. Budowa strukturalna naturalnych cyklodekstryn.

Charakterystyczną cechą β -cyklodekstryny jest jej zmniejszona rozpuszczalność w wodzie, względem pozostałych dwóch naturalnie występujących makrocząsteczek. Podczas gdy forma alfa i gamma rozpuszczają się w wodzie swobodnie (ponad 100 g/dm^3), β -cyklodekstryna osiąga wartość stężenia zaledwie 18.5 g w litrze wody. Wynika to najprawdopodobniej z geometrii cząsteczki, która umożliwia tworzenie się zwiększonej ilości wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych [18]. Zwiększone oddziaływanie grup hydroksylowych między sobą sprawia, że w mniejszym stopniu oddziałują one z cząsteczkami wody. Innym możliwym wyjaśnieniem obniżonej rozpuszczalności jest tworzenie przez β -cyklodekstrynę agregatów i ich niekorzystne oddziaływanie z cząsteczkami wody [19].

Tabela 1. Porównanie podstawowych właściwości trzech naturalnych cyklodekstryn.

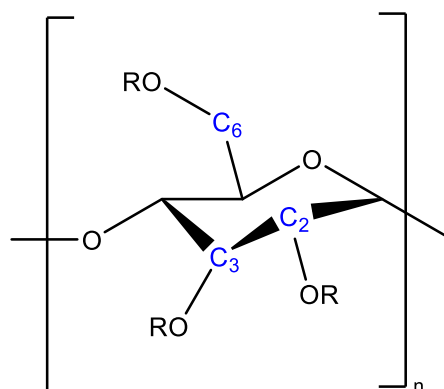
Nazwa cyklodekstryny		$\alpha\text{CD (CD}_6\text{)}$	$\beta\text{CD (CD}_7\text{)}$	$\gamma\text{CD (CD}_8\text{)}$
Masa molowa	$[\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$	972	1135	1297
Wysokość pierścienia CD	$[\text{nm}]$	0.78	0.78	0.78
Średnica wnęki wewnętrznej	$[\text{nm}]$	0.47 – 0.53	0.60 – 0.65	0.75 – 0.83
Rozpuszczalność w wodzie 25°C	$[\text{mg/ml}]$	145	18.5	232

Źródło [20]

1.1.5. Modyfikowane pochodne naturalnych cyklodekstryn

Dla większości cząsteczek organicznych optymalna pod względem geometrycznym jest β -cyklodekstryna. Jednak jej największą wadą jest niska rozpuszczalność w wodzie, co w wielu przypadkach może ograniczać jej stosowanie. Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie jej modyfikowanych pochodnych.

Modyfikacje cyklodekstryn obejmują podstawienie grup funkcyjnych w miejscach wolnych grup hydroksylowych. W każdej jednostce glukozowej występują trzy możliwe miejsca (pozycja 2, 3 i 6), które konkurują ze sobą w reakcji podstawienia (Rysunek 5). Z tego względu oraz z powodu obecności w cząsteczce cyklodekstryny kilku jednostek glukozy, selektywne podstawienie jest stosunkowo trudne [21].



Rysunek 5. Ogólna budowa modyfikowanych pochodnych cyklodekstryn.

Wyróżnić można pochodne podstawione całkowicie, pojedynczo, selektywnie oraz losowo, w których nie da się dokładnie określić ilości przyłączonych jednostek. Ze względu na cenę oraz satysfakcjonującą poprawę właściwości fizykochemicznych najczęściej stosowane są losowo podstawione pochodne. Określa się wtedy jedynie uśrednioną ilość przyłączonych grup funkcyjnych. Najczęściej wykorzystywanymi podstawnikami są grupa metoksyłowa, hydroksypropylova, a także sulfobutylova, wykorzystywana na szeroką skalę w produkcji leków [22].

Tabela 2. Modyfikowane pochodne β -cyklodekstryny.

Nazwa cyklodekstryny	Stosowany skrót	Grupa funkcyjna (R)
metylo- β -cyklodekstryna	Me β CD	R= -CH ₃ lub H
hydroksypropylo- β -cyklodekstryna	HP β CD	R= -CH ₂ CH(OH)CH ₃ lub H
sól sodowa eteru sulfobutylowego β -cyklodekstryny	SBE β CD	R= -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ Na lub H

W Tabeli 3 zamieszczone zostały parametry dla pochodnych wykorzystywanych w badaniach w przedstawionej dysertacji.

Tabela 3. Porównanie podstawowych właściwości pochodnych β -cyklodekstryny.

		HP β CD	SBE β CD
Ilość podstawionych grup (uśredniona)		4.2 - 4.3	6.5
Masa molowa (uśredniona)	[g · mol ⁻¹]	1380	2162
Średnica wnęki wewnętrznej	[nm]	0.60 - 0.65	0.60 - 0.65
Rozpuszczalność w wodzie 25°C	[mg/ml]	>1200	>1200

Źródło [23]

1.1.6. Farmakokinetyka i toksyczność

Przyswajalność cyklodekstryn przez organizm ludzki jest bardzo ograniczona. Przy podaniu doustnym praktycznie nie są trawione w układzie pokarmowym, rozkładane są dopiero przez bakterie znajdujące się w okrężnicy [24]. Niewielka ilość wchłaniana jest w przewodzie pokarmowym i w niezmienionej formie wydalona wraz z moczem [25]. Naturalne α - i β -cyklodekstryna odporne są, zarówno na działanie kwasu żołądkowego, jak i enzymów ślinowych oraz trzustkowych. Jedynie γ -cyklodekstryna jest częściowo trawiona przez enzymy układu pokarmowego. Przy podaniu pozajelitowym cyklodekstryny są praktycznie całkowicie wydalane wraz z moczem.

Cyklodekstryny jako naturalne związki cukrowe uznawane są za nietoksyczne dla organizmu. Istnieją jedynie doniesienia o nefrotoksycznym działaniu β -cyklodekstryny przy podaniu iniekcyjnym [26], co spowodowane jest jej niską rozpuszczalnością w wodzie i możliwością odkładania się w postaci złogów w nerkach. Ryzyko takie nie występuje przy podaniu doustnym, ze względu na znikomą przyswajalność cyklodekstryn przez układ pokarmowy. Spośród przedstawionych modyfikowanych cyklodekstryn (Tabela 2), największą toksycznością charakteryzuje się metylo- β -cyklodekstryna, podczas gdy pochodne hydroksypropylowa i sulfobutylowa uznawane są za bezpieczne i nietoksyczne [27,28]. Zarówno naturalne jak i modyfikowane cyklodekstryny nie wykazują działania mutagennego ani genotoksycznego [29].

1.1.7. Cyklodekstryny w roli receptorów makromolekularnych - zastosowanie

Cyklodekstryny, dzięki zdolności do tworzenia kompleksów inkluzyjnych znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu. Ze względu na brak toksyczności i dobrą

tolerancję przez organizm ludzki cyklodekstryny stosuje się w medycynie i farmacji, przy produkcji leków i suplementów diety oraz w przemyśle spożywczym jako dodatki do żywności.

Medycyna i farmacja

W przemyśle farmaceutycznym cyklodekstryny pełnią rolę nośników leków, rozcieńczalników oraz solubilizatorów. Poprzez utworzenie kompleksu inkluzyjnego poza rolą nośnika leku, makrocykl może wpływać między innymi na wzrost rozpuszczalności leku w środowisku wodnym, a co się z tym wiąże zwiększać jego biodostępność [30]. Cyklodekstryny mogą maskować nieprzyjemny smak substancji leczniczych [31,32], które w większości przypadków charakteryzują się gorzkim posmakiem. Dodatkowo mogą wpływać na kontrolowanie czasu uwalniania leku [33] oraz minimalizować efekty uboczne ich stosowania [34]. Skompleksowanie z cyklodekstryną daje możliwość nadania stałej formy substancjom ciekłym, co umożliwia produkcję leków w postaci tabletek. W tabletkach cyklodekstryny pełnią rolę swoistego wypełniacza, spoiwa [35]. Mogą być również stosowane jako samodzielne środki lecznicze. Przykładowo, modyfikowana pochodna γ -cyklodekstryny, pod komercyjną nazwą *Sugammadex*, wykorzystywana jest do usuwania z organizmu leków zwiotczających mięśnie, stosowanych w trakcie operacji [36].

Żywność

Ze względu na swoją znikomą toksyczność cyklodekstryny znalazły szerokie zastosowanie w produkcji żywności. Wykorzystywane są jako dodatki do żywności zatwierdzone przez WHO. β -cyklodekstryna występuje na liście E dodatków do żywności jako numer E459 [37]. Cyklodekstryny używane są jako konserwanty oraz nośniki substancji zapachowych i smakowych. Stosowanie ich może stabilizować smak i zapach substancji, mogą być również stosowane w celu pozbycia się niepożądanych smaków [38], zapachów oraz innych związków z produktów spożywczych np. cholesterolu [39]. Cyklodekstryny wykorzystywane są również w celu usuwania zanieczyszczeń mikrobiologicznych oraz zapobiegania reakcji enzymatycznego brązowienia produktów spożywczych [40].

Wykazano, że dodatek cyklodekstryny do soków owocowych poprawia jakość produktu poprzez zwiększenie intensywności barwy, aktywności przeciwutleniającej, zawartości witaminy C, a także ekwiwalentów retinolu [41].

Inne

Poza podstawowymi zastosowaniami cyklodekstryny znalazły miejsce w takich dziedzinach jak przemysł kosmetyczny, tekstylny, a także w agrochemii i laboratoriach chemicznych.

W produkcji kosmetyków stosuje się je, jako składniki produktów poprawiające trwałość i aktywność substancji odżywczych zawartych w kosmetykach, ale także stabilizujące formuły produktów.

W przemyśle tekstylnym wykorzystuje się właściwości cyklodekstryny do inkludowania mniejszych cząsteczek substancji zapachowych, umożliwiając tworzenie tkanin niwelujących nieprzyjemne zapachy, np. potu czy dymu tytoniowego, ale również materiały perfumowane o wydłużonym czasie uwalniania zapachu [42–44]. Cyklodekstryny umożliwiają tworzenie materiałów o właściwościach antybakteryjnych [45].

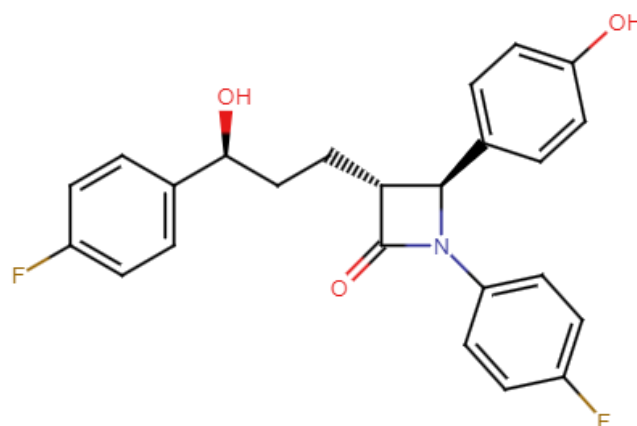
Cyklodekstryny stosuje się także w agrochemii. Kompleksy fungicydów, herbicydów oraz innych środków ochrony roślin wspomagają działanie i pozwalają na ograniczenie stosowania rozpuszczalników organicznych w opryskach, zarówno w uprawie roślin, jak i transporcie płodów rolnych [46–48].

W laboratoriach chemicznych cyklodekstryny stosuje się między innymi jako katalizatory reakcji, dodatki do elektrod w elektrochemii i wypełnienia faz w kolumnach HPLC oraz do rozdzielania związków chiralnych.

1.2. Charakterystyka badanych ligandów

1.2.1. Ezetymib

Ezetymib to organiczny związek chemiczny stosowany w leczeniu hipercholesterolemii w celu obniżenia poziomu stężenia lipidów we krwi. Jego działanie opiera się na hamowaniu wchłaniania cholesterolu, zarówno pochodzenia pokarmowego jak i endogennego, bez wpływu na wchłanianie składników odżywczych rozpuszczalnych w tłuszczach [49]. Związek ten selektywnie blokuje białko (NPC1L1) odpowiedzialne za transport cholesterolu w jelitach, co doprowadza do hamowania wchłaniania lipidów w przewodzie pokarmowym, powodując obniżenie stężenia cholesterolu we krwi [50]. Stosowanie ezetymibu wpływa na spadek zawartości stężenia tzw. złego cholesterolu (LDL) oraz trójglicerydów nie wpływając na stężenie frakcji cholesterolu HDL [51]. Ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie (Tabela 4), przyswajalność ezetymibu w organizmie może być jednak ograniczona [52].



Rysunek 6. Budowa strukturalna cząsteczki ezetymibu.

Tabela 4. Właściwości fizykochemiczne ezetymibu.

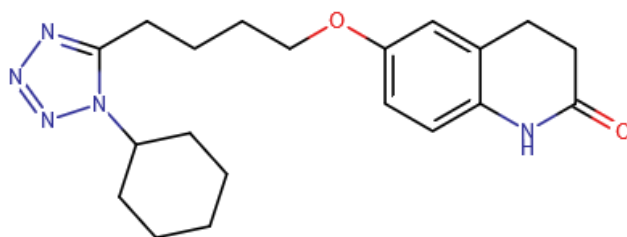
Nazwa związku	Ezetymib	
Wzór strukturalny	C ₂₄ H ₂₁ F ₂ NO ₃	
Masa molowa	[g · mol ⁻¹]	409.43
Rozpuszczalność [25°C]:		
woda		praktycznie nierozpuszczalny
etanol	[mg/ml]	swobodnie rozpuszczalny >15 mg/ml
DMSO		swobodnie rozpuszczalny >15 mg/ml
Temperatura topnienia	[°C]	162

Źródło: [53,54]

1.2.2. Cilostazol

Cilostazol jest to związek organiczny, pochodna chinolonu, wykorzystywany jako lek hipotensyjny o nazwie handlowej Pletal. Jego działanie polega na selektywnej inhibicji enzymu - fosfodiesterazy III (PDE3). Wykorzystywany jest w celu rozszerzenia naczyń krwionośnych, hamowania agregacji płytek krwi i zapobiegania powstawaniu zakrzepów. Znajduje zastosowanie w profilaktyce zapobiegania wtórnym udarom mózgu, a także w leczeniu chromania przestankowego [55]. Choroba ta objawia się nawracającym bólem, drętwieniem i uczuciem ciężkości nóg podczas wysiłku. Spowodowane jest to przewlekłym niedokrwieniem mięśni kończyn dolnych wskutek zwężania tętnic w wyniku postępujących zmian miażdżycowych [56].

Do skutków ubocznych stosowania cilostazolu należą m.in. bóle głowy, biegunki, mdłości, zaburzenia rytmu serca, wybroczyny, jadłowstręt czy bóle brzucha. Badania wykazują, że ograniczona rozpuszczalność cilostazolu może wpływać na szybkość jego wchłaniania przez organizm, co uniemożliwia oznaczenie bezwzględnej biodostępności. Niska rozpuszczalność wyklucza stosowanie leku w postaci roztworu podawanego dożylnie [57].



Rysunek 7. Budowa strukturalna cząsteczki cilostazolu.

Tabela 5. Właściwości fizykochemiczne cilostazolu.

Nazwa związku	Cilostazol	
Wzór strukturalny	C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂	
Masa molowa	[g · mol ⁻¹]	369.47
Rozpuszczalność [25°C]: woda etanol DMSO	[mg/ml]	praktycznie nierozpuszczalny swobodnie rozpuszczalny swobodnie rozpuszczalny 10 mg/ml
Temperatura topnienia	[°C]	160

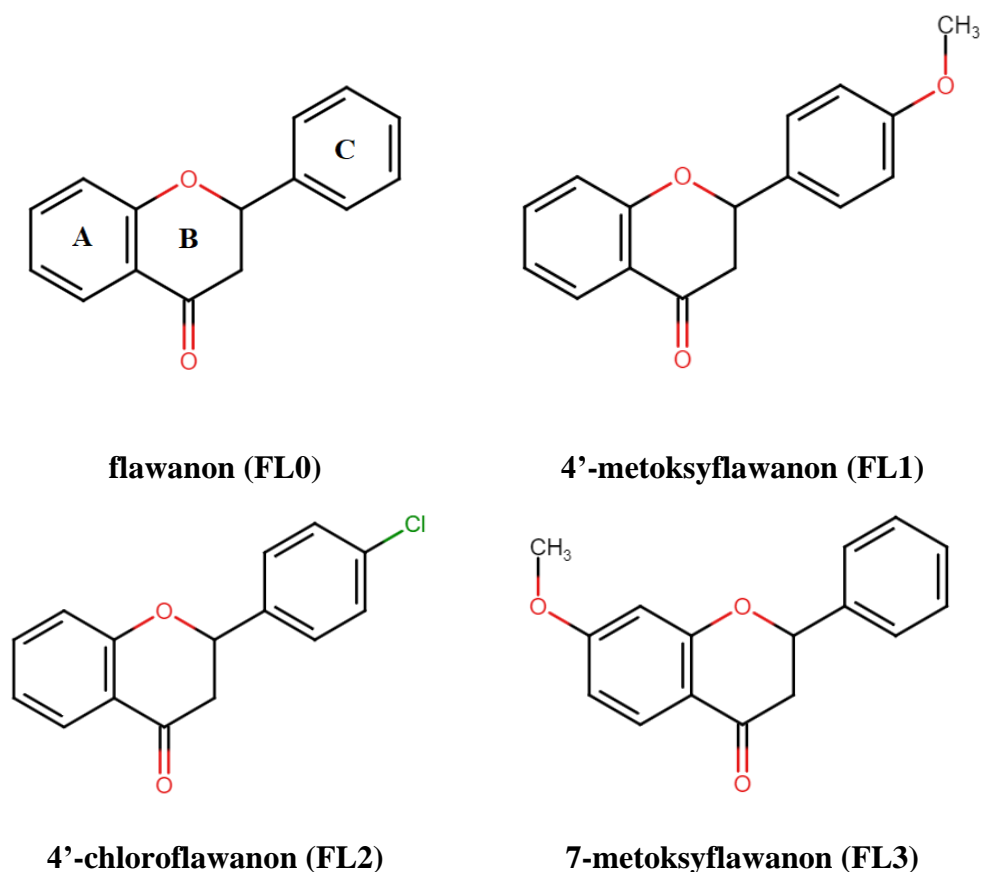
Źródło: [58]

1.2.3. Flawanony

Flawanony to związki zaliczane do grupy flawonoidów. Ich struktura przestrzenna opiera się na pierścieniu 4-chromanonu. Do naturalnie występujących flawanonów należą między innymi naringenina czy hesperetyna.

Naturalne flawanony, jak wszystkie inne flawonoidy, są metabolitami wtórnymi wytwarzanymi przez rośliny. Ich głównym źródłem są owoce cytrusowe, na przykład: grejpfruty, pomarańcze czy cytryny. Związki te wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, antynowotworowe, a także kardioprotekcyjne. Badania dowodzą, że mogą one regulować stężenie frakcji cholesterolu LDL w organizmie [59].

W przedstawionej dysertacji badania dotyczą syntetycznych pochodnych flawanonu, które wykazują potencjalne zastosowanie w medycynie. Do badań wybrano cztery związki: podstawową, niepodstawioną cząsteczkę flawanonu oraz jej trzy pochodne - dwie podstawione w pozycji 4' (w pierścieniu C), odpowiednio grupami metoksyową i atomem chloru oraz podstawioną grupą metoksyową w pozycji 7 (w pierścieniu A) (Rysunek 8).



Rysunek 8. Struktura cząsteczek wybranych flawanonów.

Tabela 6. Właściwości fizykochemiczne wybranych flawanonów.

Nazwa związku	Wzór strukturalny	Masa molowa [g · mol ⁻¹]	Temperatura topnienia [°C]
flawanon	C ₁₅ H ₁₂ O ₂	224.26	76-77 [60] ; 77-79 [61]
4'-metoksyflawanon	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254.28	88-89 [62]; 91-93[63]
4'-chloroflawanon	C ₁₅ H ₁₂ ClO ₂	258.70	95-97 [62], 94-96 [64]
7 - metoksyflawanon	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254.28	84-86 [65]

Wybrane związki wykazują potencjalne zastosowanie w medycynie. 4'-metoksyflawanon zapobiega powstawaniu katarakty [66], a także wykazuje właściwości przeciwgrzybiczne [67]. Związek ten charakteryzuje się wysoką toksycznością względem wybranych nowotworowych linii komórkowych: MCF-7 (linia komórkowa nowotworu piersi) i TK-10 (linia komórkowa nowotworu piersi), nie wykazując przy tym działania kancerogennego, mutagennego ani drażniącego na organizm [68].

4'-chloroflawanon hamuje proliferację komórek nowotworowych raka piersi, zarówno linii MCF-7, jak i MDA-MB231 [69] oraz wykazuje działanie toksyczne przeciwko wielu ludzkim komórkowym liniom nowotworowym: MCF-7, MDA-MB23, LNCaP i PC3 (linie komórkowe nowotworów prostaty), HepG2 (linia komórkowa nowotworu wątroby), SK-N-MC (linia komórkowa nerwiaka), K-562 (linia komórkowa białaczki) oraz KB (linia komórkowa nowotworu naskórka nosogardzieli) [70].

7-metoksyflawanon ma bardzo wysoki potencjał działania antyproliferacyjnego wobec komórek MCF-7 [71], działa jako inhibitor aromatazy [72], a dodatkowo wykazuje właściwości przeciwgrzybicze [73].

Wybrane flawanony, podobnie jak duża część flawonoidów, charakteryzują się niską rozpuszczalnością w wodzie, co powodować może ograniczanie biodostępności tych związków w organizmie człowieka, a tym samym zmniejszać ich aktywność.

Flawanony zostały dobrane w taki sposób, aby móc określić wpływ poszczególnych podstawników na proces inkluzji w cyklodekstrynie:

a) 4'-metoksyflawanon i 4'-chloroflawanon to pochodne flawanonu podstawione w tej samej pozycji (pozycja para pierścienia fenyłowego C) dwiema różnymi grupami. Taki dobór związków umożliwił ocenę wpływu rodzaju podstawnika, znajdującego się w pozycji para, na właściwości powstałych kompleksów inkluzyjnych.

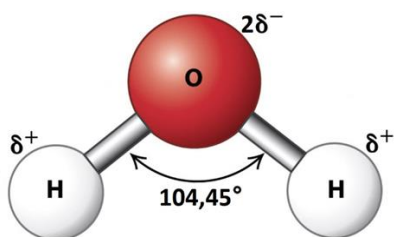
b) 4'-metoksyflawanon i 7-metoksyflawanon to para flawanonów z tym samym podstawnikiem - grupą metoksyłową, ale zlokalizowaną w różnych miejscach cząsteczki. Dobór takich

związków pozwolił ocenić wpływ podstawienia grupy $-OCH_3$ na zdolności tworzenia kompleksów inkluzyjnych *receptor – ligand*, w zależności od jej pozycji w pierścieniu flawanonu.

1.3. Właściwości stosowanych rozpuszczalników

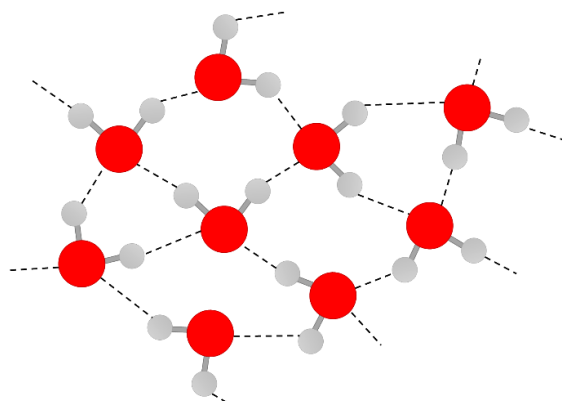
1.3.1. Woda

Woda jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych związków w przyrodzie. W temperaturze pokojowej występuje w postaci bezbarwnej, przezroczystej cieczy, nieprzejawiającej smaku ani zapachu. Cząsteczki wody składają się z dwóch atomów wodoru połączonych z pojedynczym atomem tlenu, wiązania w cząsteczce wody tworzą kąt $104,45^\circ$, a cała cząsteczka przyjmuje kształt tetraedryczny (Rysunek 9).



Rysunek 9. Budowa cząsteczki wody.

Na atomie tlenu, który posiada wolne pary elektronowe, tworzy się częściowy ładunek ujemny, natomiast na atomach wodoru, które charakteryzują się mniejszą elektroujemnością, powstaje częściowy ładunek dodatni, co powoduje, że cząsteczka wykazuje charakter polarny. Taka budowa sprzyja tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Atomy tlenu stanowiąc mogą donory wiązania wodorowego dla atomów tlenu, dwóch sąsiadujących cząsteczek wody, jednocześnie będąc akceptorem wiązań wodorowych dla dwóch innych cząsteczek wody, w ten sposób powstaje sieć międzycząsteczkowych wiązań wodorowych (Rysunek 10). Wiązania te, mimo że należą do jednych ze słabszych oddziaływań, to obecne w dużej ilości mają znaczący wpływ na budowę i właściwości wody. Zakłada się, że to właśnie dzięki istnieniu sieci oddziaływań wodorowych, woda posiada swoje charakterystyczne, anomalne właściwości.



Rysunek 10. Sieć wiązań wodorowych tworzona przez cząsteczki wody.

Na tle innych cieczy woda charakteryzuje się bardzo dużym napięciem powierzchniowym, a także wysokimi wartościami ciepła topnienia i krzepnięcia. Ze względu na dużą ilość wiązań wodorowych występujących pomiędzy jej cząsteczkami wartość ciepła właściwego wody jest wyjątkowo wysoka (1 cal/g°C). Dodatkowo charakteryzuje ją nietypowa rozszerzalność temperaturowa, bowiem, w przeciwieństwie do innych związków, woda zmniejsza swoją objętość w procesie topnienia.

Woda jest uniwersalnym rozpuszczalnikiem protycznym, może powodować dysocjację wielu substancji i stanowi środowisko reakcji dla ważnych biologicznie i chemicznie procesów. Jest głównym składnikiem wszystkich organizmów żywych, cząsteczką niezbędną do istnienia życia na Ziemi i podstawowym elementem środowiska naturalnego.

Tabela 7. Fizykochemiczne właściwości wody.

Właściwości		
wzór strukturalny		H ₂ O
masa molowa	[g · mol ⁻¹]	18.02
temperatura wrzenia [pod ciśnieniem 1 atm]	[°C]	100
temperatura topnienia [pod ciśnieniem 1 atm]	[°C]	0
gęstość [w temp 20°C]	[g · cm ⁻³]	0.997
napięcie powierzchniowe	[10 ³ · Pa · s]	71.98
lepkość	[10 ⁻³ · J · m ⁻²]	0.8905
moment dipolowy	[D]	1.84

Źródło: [74]

Od wielu lat prowadzone są badania nad modelami opisującymi strukturę wody, które tłumaczyłyby jej specyficzne właściwości.

Jeden z pierwszych modeli został zaproponowany w 1933 roku przez Bernela i Fowlera [75]. Przedstawiał on strukturę wody jako idealną sieć połączeń, w której każda z cząsteczek łączyła się z czterema innymi, tworząc struktury tetraedryczne.

Model Pople'a z 1951 roku, nazwany także modelem *zniekształconego wiązania*, zakładał, że wiązania wodorowe ulegają zginaniu i zniekształcaniu [76]. Pople założył, że wraz ze wzrostem temperatury wiązania stają się coraz bardziej elastyczne, co powoduje, że podczas zmiany stanu skupienia, ze stałego na ciekły, struktura zmienia się w mniej regularną.

Inny model, *zmiennych grup cząsteczek*, zaproponowany przez Frank'a i Wen'a postulował, że wiązania wodorowe nieustannie powstają i rozpadają się jednocześnie dla całych grup cząsteczek wody [77].

Jednym z ciekawszych modeli jest tzw. *model góry lodowej*, autorstwa Frank'a i Evans'a, opisujący strukturę wody jako rozpuszczalnika [78]. Woda, w otoczeniu

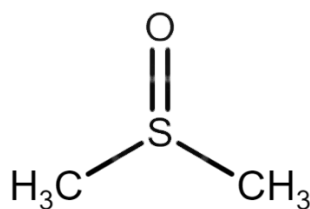
znajdujących się w niej cząstek innej substancji, miałyby zmieniać swoją strukturę na bardziej uporządkowaną, bardziej zbliżoną do struktury ciała stałego niż cieczy.

Znane są również modele, zakładające tworzenie się dużych agregatów cząsteczek wody w postaci klastrów [79] lub wielocząsteczkowych hydratów [80]. W ostatnich latach rozwój chemii teoretycznej i zastosowanie symulacji komputerowych dały nowe możliwości tworzenia modelowych struktur, próbujących opisać budowę ciekłej wody. Liu, He i Zang, wykorzystując symulacje dynamiki molekularnej ab initio (AIMD), zaproponowali model struktury wody, w którym jest ona dynamiczną mieszaniną dwóch form: łańcuchowej i tetraedrycznej. Wykazali, że wybrane właściwości wody wyznaczone dla tego modelu, (np. moment dipolowy i współczynnik dyfuzji), są zgodne z danymi eksperymentalnymi [81,82].

Pomimo, że woda jest prostą cząsteczką, nadal jej budowa nie została do końca opisana tak, by wyjaśnić wszystkie właściwości jakie wykazuje. W dalszym ciągu prowadzone są badania nad jej strukturą i próby wyjaśnienia anomalnego zachowania [83].

1.3.2. Dimetylosulfotlenek

Dimetylosulfotlenek (DMSO) jest organicznym związkiem chemicznym, o wzorze sumarycznym C_2H_6SO . W temperaturze pokojowej występuje w postaci bezbarwnej cieczy o charakterystycznym zapachu. Cząsteczka DMSO zbudowana jest z centralnego atomu siarki, połączonego z dwiema grupami metylowymi oraz z pojedynczym atomem tlenu (Rysunek 11).



Rysunek 11. Budowa cząsteczki DMSO

DMSO jest rozpuszczalnikiem aprotycznym, tzn. nie posiadającym w swojej strukturze „kwaśnych protonów” mogących ulegać oderwaniu. Wiązanie między tlenem a siarką jest silnie spolaryzowane w kierunku tlenu, co sprawia, że związek ma charakter silnie polarny.

Dimetylosulfotlenek jest rozpuszczalnikiem uniwersalnym, stosowany zarówno dla związków polarnych, jak i niepolarnych. Często używany jest jako zamiennik, w przypadku związków nierozpuszczalnych w wodzie. Jest to silnie higroskopijny związek, który miesza się z wodą bez ograniczeń. Charakteryzuje się stosunkowo niewielką toksycznością ($LD_{50} = 28$ g/kg masy ciała) [84], w porównaniu do innych rozpuszczalników organicznych np.

etanolu ($LD_{50} = 10$ g/kg masy ciała) [85]. DMSO stosowany jest również w medycynie, pomocniczo w leczeniu niektórych schorzeń, powodując zwiększenie wchłaniania substancji przez błony biologiczne. Wykorzystywany jest również jako nośnik niektórych leków w dermatologii [86] oraz jako krioprotektant w procesach zamrażania komórek [87].

Tabela 8. Fizykochemiczne właściwości DMSO.

Właściwości		
<i>wzór strukturalny</i>		C_2H_6SO
<i>masa molowa</i>	$[g \cdot mol^{-1}]$	78.13
<i>temperatura wrzenia [pod ciśnieniem 1 atm]</i>	$[^{\circ}C]$	189
<i>temperatura topnienia [pod ciśnieniem 1 atm]</i>	$[^{\circ}C]$	18.5
<i>gęstość [w temp 20°C]</i>	$[g \cdot cm^{-3}]$	1.0958
<i>napięcie powierzchniowe</i>	$[10^3 \cdot Pa \cdot s]$	43
<i>lepkość</i>	$[10^{-3} \cdot J \cdot m^{-2}]$	1.996
<i>moment dipolowy</i>	$[D]$	3.9

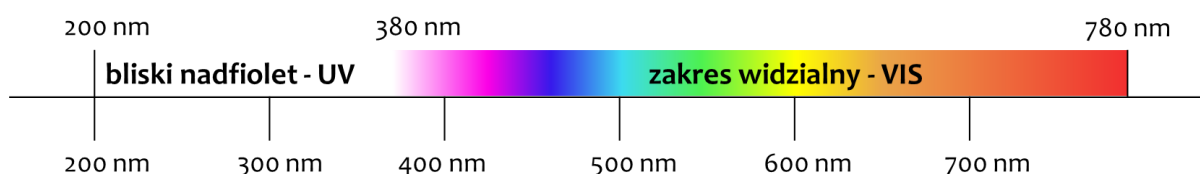
Źródło: [74]

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. Metody badawcze i aparatura

2.1.1. Spektroskopia UV-Vis

Spektroskopia absorpcyjna UV-Vis jest jedną z podstawowych metod wykorzystywanych w analizie chemicznej. Technika ta polega na analizie światła, z zakresu promieniowania ultrafioletowego i widzialnego (Rysunek 12), absorbowanego przez badaną substancję. Absorbacja promieniowania związana jest z wykorzystaniem pochłoniętej energii do przeniesienia elektronów walencyjnych ze stanu podstawowego do wzbudzonego. Zdolność do absorpcji wykazują głównie związki organiczne, posiadające wiązania wielokrotne czy układy aromatyczne. Takie ugrupowania nazywane są grupami chromoforowymi, czyli „nadającymi barwę” związkom. Obecność w strukturze cząsteczki ugrupowań typu: -OH, -NH₂, czy -Cl, nazywanych grupami auksochromowymi, może wpływać na zwiększenie (efekt hiperchromowy) lub zmniejszenie intensywności absorpcji (efekt hipochromowy) oraz jej przesunięcie w kierunku fal dłuższych lub krótszych (odpowiednio przesunięcia bato- i hipsokromowe).



Rysunek 12. Zakres promieniowania elektromagnetycznego dla światła widzialnego i bliskiego nadfioletu.

Selektywna absorbcja promieniowania przez niektóre związki wykorzystywana jest do ich identyfikacji oraz ilościowego oznaczenia w badanej próbce. Może też służyć do badania kinetyki reakcji, określania stałych szybkości oraz stałych równowagi badanych reakcji.

Wyniki otrzymane przy użyciu tej techniki przedstawiane są w postaci widm zależności absorbancji (ekstynkcji) (A) od długości fali (λ). Kształt widma jest charakterystyczny dla danego związku.

Podstawowym prawem absorbcji jest prawo Lamberta-Beera, które mówi, że absorbancja (A) roztworu danej próbki jest wprost proporcjonalna do jego stężenia (c), długości drogi optycznej (l), przez którą przechodzi promieniowanie oraz od molowego współczynnika ekstynkcji (ϵ) badanej substancji (Równanie 1).

$$A = c \cdot l \cdot \epsilon \quad (1)$$

Molowy współczynnik ekstynkcji (ϵ) jest współczynnikiem proporcjonalności, który odpowiada wartości absorpcji promieniowania przechodzącego przez 1 cm roztworu danego związku, o stężeniu $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Współczynnik ten wyznaczyć można poprzez obliczenie tangensa kąta α prostej kalibracyjnej w układzie zależności absorpcji od stężenia związku. Współczynnik ekstynkcji jest wartością charakterystyczną dla związku w danej długości fali.

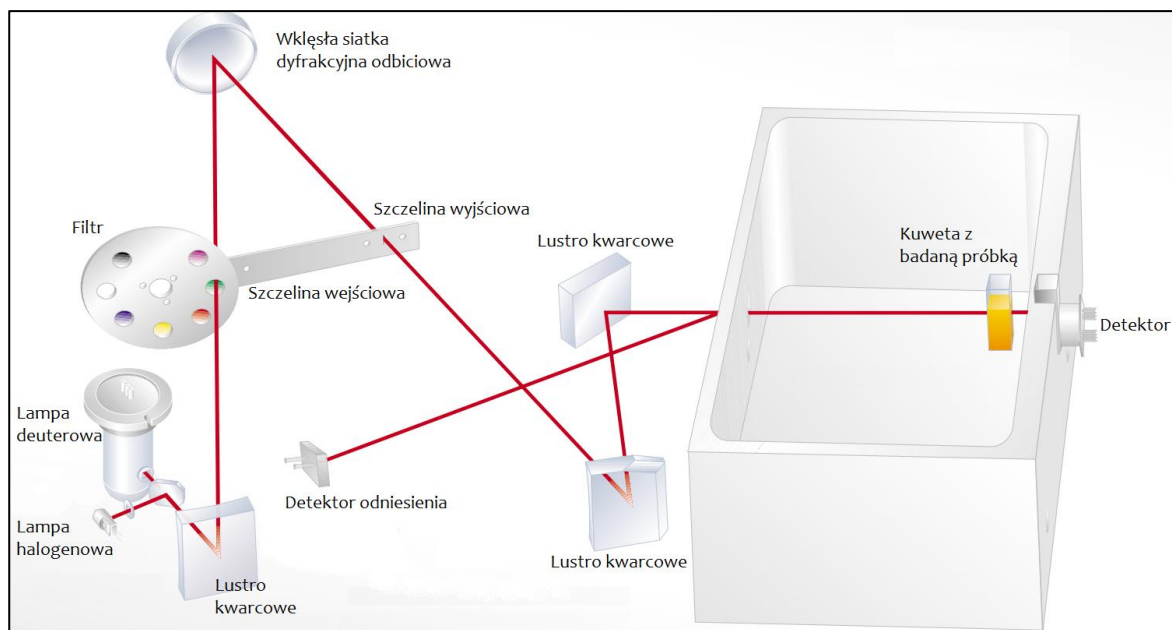
Pomiary w przedstawionej pracy wykonane zostały przy użyciu spektrofotometru UV-Vis SPECORD 50, firmy Analytik Jena (Rysunek 13).



Rysunek 13. Spektrofotometr SPECORD 50

Jest to spektrofotometr jednowiązkowy, który jako źródło promieniowania wykorzystuje dwie lampy: deuterową, pracującą w zakresie UV i halogenową, stosowaną w zakresie promieniowania widzialnego. Promieniowanie emitowane przez lampę zostaje rozszczepione przez siatkę dyfrakcyjną i poprzez układ lusterek kwarcowych pada na badaną próbkę znajdującą się w kuwecie kwarcowej, a następnie dociera do detektora. Zastosowanie detektora odniesienia umożliwia kompensowanie zmian wydajności lampy, powodowane jej nagrzewaniem się bądź zmianą temperatury otoczenia w trakcie trwania pomiaru. Przebieg drogi optycznej w omawianym spektrofotometrze przedstawiony został na Rysunku 14. Spektrofotometr połączony jest z komputerem, który dzięki wykorzystaniu oprogramowania WinAspect umożliwia sterowanie parametrami eksperymentu.

Pomiary prowadzone były w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm, z szybkością skanowania 5 nm/s , a wartość absorpcji rejestrowana była z rozdzielczością 0.2 nm . Zakres promieniowania dobierany był indywidualnie dla każdego związku. Pomiary rejestrowane były względem odnośnika, który stanowił stosowany rozpuszczalnik, lub w przypadku widm kompleksów roztwór czystej cyklodekstryny o odpowiednim stężeniu.



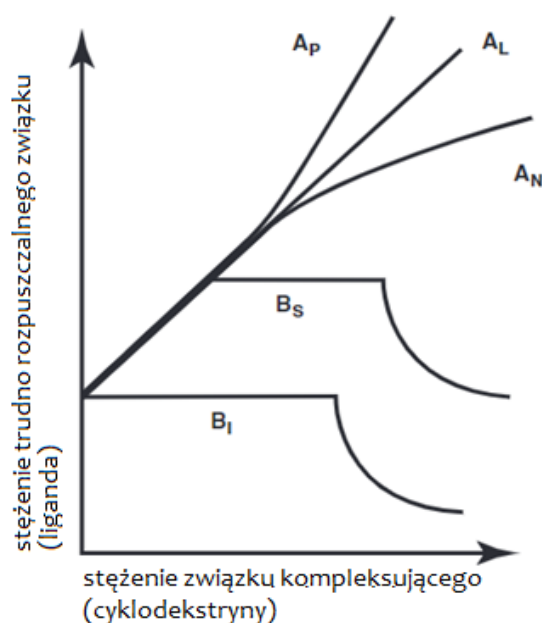
Rysunek 14. Schemat budowy spektrofotometru SPECORD 50 [88].

2.1.1.1. Metoda Higuchi – Connorsa

W badaniach spektroskopowych kompleksów cyklodekstryn z wybranymi związkami, zastosowana została technika rozpuszczalności fazowej Higuchi-Connorsa [89]. Dotyczy ona badania oddziaływań molekularnych w roztworze pomiędzy dwoma związkami, z których jeden charakteryzuje się ograniczoną rozpuszczalnością w badanym rozpuszczalniku (L), a drugi, dobrze rozpuszczalny, nazywany jest czynnikiem kompleksującym (M), powodującym solubilizację związku trudno rozpuszczalnego. W przedstawionej dysertacji rolę czynnika kompleksującego, dla trudno rozpuszczalnych ligandów, pełniły cyklodekstryny.

Metoda pomiarowa polega na przygotowaniu serii roztworów zawierających: słabo rozpuszczalny związek (w ilości znacznie przekraczającej jego rozpuszczalność w danym rozpuszczalniku), sukcesywnie zwiększające się porcje związku kompleksującego oraz stałą objętość rozpuszczalnika. Roztwory doprowadzane są do stanu równowagi w stałej temperaturze, a następnie określane jest całkowite stężenie związku słabo rozpuszczalnego. Różnice w rozpuszczalności powodowane są powstawaniem oddziaływań molekularnych ze związkiem kompleksującym (utworzeniem kompleksu).

Uzyskane wyniki przedstawiane są na diagramach fazowych, powstałych poprzez wykreślenie zależności całkowitego stężenia molowego związku (L), w funkcji stężenia molowego związku kompleksującego (M). Otrzymywane diagramy fazowe dzielą się na dwa typy, nazywane odpowiednio A i B (Rysunek 15).



Rysunek 15. Diagramy rozpuszczalności typu A i B.

Diagramy typu A wykazują wyraźny wzrost rozpuszczalności związku spowodowany dodatkiem solubilizatora. Obrazują one tworzenie się dobrze rozpuszczalnych kompleksów, między cząsteczkami związków L i M.

- Diagramy A_L w przypadku cyklodekstryn otrzymuje się głównie dla kompleksów o stosunku 1:1 (LM).
- Diagramy typu A_P otrzymywane są dla kompleksów, które tworzą się z przewagą związku kompleksującego (LM_2 , LM_3 ...).
- Diagramy typu A_N nie zostały jednoznacznie scharakteryzowane. Ich tworzenie może być spowodowane samo-asocjacją cząsteczek związku kompleksującego przy wyższych stężeniach lub zmianą natury rozpuszczalnika w obecności dużych stężeń związku M, co prowadzić może do zmiany stałej tworzenia kompleksu.

Zdarza się, że dla diagramów typu A, przy wyższych stężeniach, zaobserwować można występowanie plateau, a dodawanie coraz większych ilości związku kompleksującego nie powoduje dalszego wzrostu rozpuszczalności. Zjawisko to może być obserwowane w przypadku wysycenia się kompleksów i zazwyczaj spowodowane jest ograniczoną rozpuszczalnością solubilizatora.

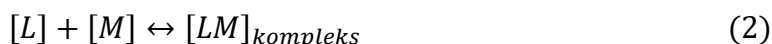
Diagramy typu B (Rysunek 15) obserwuje się w przypadku tworzenia kompleksów trudno rozpuszczalnych w wodzie.

- Początkowy przebieg krzywej B_S jest podobny do typu A, jednak przy pewnym stężeniu następuje wysycenie i wytrącenie kompleksu.

- W przypadku krzywej B₁, powstający kompleks charakteryzuje się tak ograniczoną rozpuszczalnością, że już przy niskich stężeniach wytrąca się z roztworu.

Wyznaczanie stałej równowagi

W przypadku liniowej zależności między stężeniem liganda, a solubilizatora (typ A_L lub początkowy przebieg typu B_s) możliwe jest wyznaczenie stałej trwałości powstającego kompleksu. Zakładając powstawanie kompleksu w stosunku stechiometrycznym 1:1:



stałą trwałości kompleksu opisuje zależność:

$$K_{1:1} = \frac{[LM]}{[L][M]} \quad (3)$$

gdzie:

$$L_c = L_0 + [LM] \quad (4)$$

$$M_c = M_0 + [LM] \quad (5)$$

L_c - całkowite stężenie związku trudno rozpuszczalnego w badanym roztworze.

$L_0 = [L]$ - stężenie związku trudno rozpuszczalnego w równowadze w czystym rozpuszczalniku.

M_c - całkowite stężenie cyklodekstryny w badanym roztworze.

$M_0 = [M]$ - stężenie cyklodekstryny w roztworze w postaci wolnej.

Łącząc równania 3, 4 i 5 otrzymujemy równanie 6:

$$L_c = L_0 + \frac{KL_0M_c}{1 + KL_0} \quad (6)$$

Wyznaczoną zależność stężenia badanego związku (L_c) w roztworze, od stężenia związku kompleksującego (M_c), opisuje równanie prostej, której współczynniki kierunkowe a i b wynoszą odpowiednio:

$$a = \frac{KL_0}{1 + KL_0} \quad (7)$$

$$b = L_0 \quad (8)$$

Stała K wyznaczana jest jako tangens kąta α uzyskanej prostej do osi OX:

$$K_{1:1} = \frac{a}{L_0(1 - a)} \quad (9)$$

2.1.2. Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC)

Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ang. Isothermal Titration Calorimetry) to technika umożliwiająca analizę efektów cieplnych, towarzyszących reakcjom zachodzącym w roztworze. Omawiana technika pozwala wyznaczyć parametry opisujące zachodzący proces: stałą reakcji (K), stechiometrię (n) oraz zmianę entalpii (ΔH). Izotermiczna kalorymetria miareczkowa umożliwia dokonanie termodynamicznej charakterystyki badanego procesu.

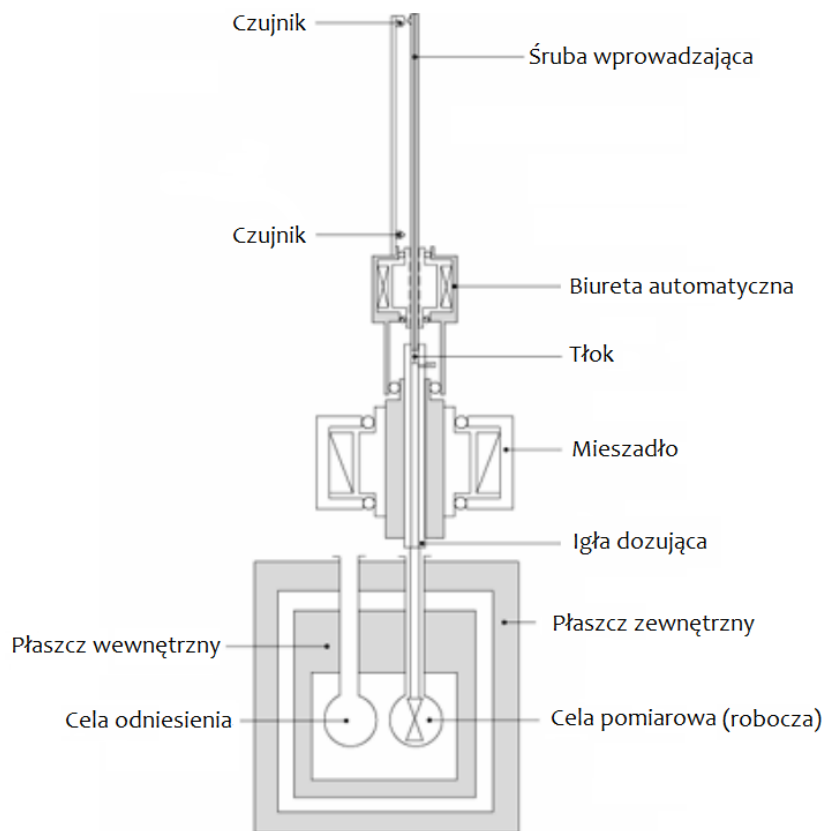


Rysunek 16. Kalorymetr MicroCal VP-ITC

W pomiarach wykorzystywano mikrokalorymetr MicroCal VP-ITC, składający się z dwóch identycznych cel (pomiarowej i odniesienia) o pojemnościach 1.4275 ml. Każda z cel kalorymetru otoczona jest adiabaticznym płaszczem, uniemożliwiającym wymianę ciepła z otoczeniem. Cella odniesienia wypełniana jest rozpuszczalnikiem, natomiast w celi pomiarowej zachodzi badany proces. Cella robocza wypełniana jest roztworem liganda, do którego wmiareczkowany jest porcjami roztwór makrocykla. Do tego celu służy biureta automatyczna, o pojemności 287.37 μl , umieszczana w celi pomiarowej. Biureta ma za zadanie dozować zadane objętości titranta, w określonych odstępach czasu. Dzięki odpowiedniemu wyprofilowaniu, igła dozująca pełni dodatkowo rolę mieszadła, zapewniając równomierne mieszanie się reagentów.

W czasie zachodzącej reakcji (egzotermicznej/endotermicznej) czujnik ciepła, znajdujący się pomiędzy celami, rejestruje pojawiającą się różnicę temperatur. W celu zachowania równowagi termicznej, układ pomiarowy, poprzez ogrzanie lub schłodzenie celi

roboczej wyrównuje temperaturę pomiędzy celami. Budowa kalorymetru MicroCal VP-ITC przedstawiona została na Rysunku 17.

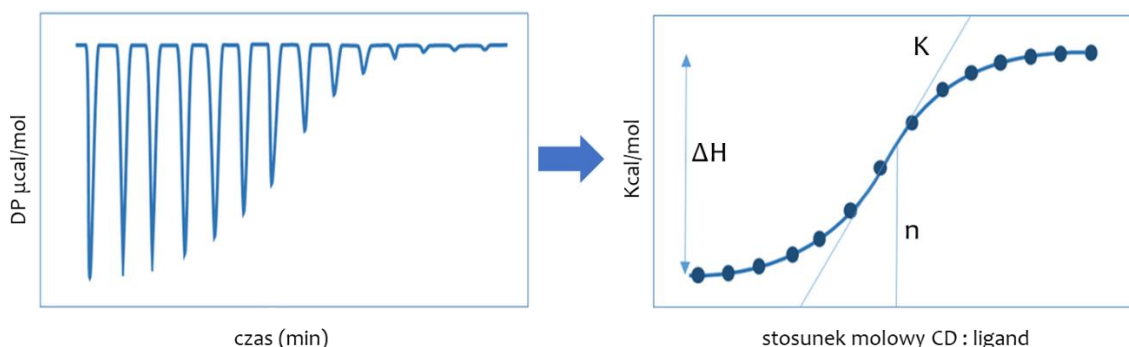


Rysunek 17. Schemat budowy kalorymetru MicroCal VP-ITC

Kalorymetr połączony jest z komputerem i sterowany za pomocą oprogramowania VPViewer 2000 (MicroCal), umożliwiającego kontrolowanie parametrów eksperymentu takich jak: temperatura, ilość, objętość oraz czas trwania nastrzyków, odstęp pomiędzy pojedynczymi nastrzykami i szybkość obrotu igły.

Wartością rejestrowaną bezpośrednio przez układ pomiarowy jest moc różnicowa (ang. Differential Power, DP), potrzebna do utrzymania zerowej różnicy temperatur, między celą odniesienia, a celą pomiarową, w czasie trwania zachodzącej reakcji. Termogram, czyli wykres zależności DP ($\mu\text{cal/s}$) od czasu (min), przedstawiany jest w postaci serii pików odpowiadających efektom cieplnym towarzyszącym nastrzykom. Oprogramowanie umożliwia wyznaczenie zmian ciepła dla każdego z nastrzyków, poprzez scałkowanie pola powierzchni pojedynczych pików i otrzymanie tzw. izoterm miareczkowania - zależności zmiany entalpii (kcal/mol) w funkcji stosunku molowego (Rysunek 18). Wykorzystując odpowiedni model matematyczny możliwe jest wyznaczenie takich wartości jak: stała wiązania (K), zmiana

entalpii (ΔH) i stechiometria (n) reakcji, a pośrednio również zmiana entropii (ΔS) oraz entalpii swobodnej (ΔG).



Rysunek 18. Przykładowy termogram oraz odpowiadająca mu izoterma miareczkowania kalorymetrycznego.

Model jednego rodzaju miejsc aktywnych

Oprogramowanie Origin7 (OriginLab), wykorzystywane do opracowania uzyskanych wyników, umożliwia dopasowanie danych eksperymentalnych do wybranych modeli matematycznych. Modele te umożliwiają wyznaczenie parametrów termodynamicznych reakcji, w oparciu o ilość i rodzaj miejsc aktywnych w cząsteczce makromolekuły. Ze względu na to, że cyklodekstryny tworzą kompleksy poprzez inkluzję liganda wewnątrz wnęki, do analizy otrzymanych wyników wykorzystany został model jednego typu miejsc aktywnych (ang. one set of sites). Stała wiązania w tym modelu wynosi:

$$K = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)[L]} \quad (10)$$

Łącząc ją z zależnością na całkowite stężenie liganda:

$$L_t = [L] + n\Theta M_t \quad (11)$$

otrzymujemy zależność:

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad (12)$$

gdzie:

- K - stała wiązania
- Θ - część miejsc aktywnych makromolekuły zajętych przez ligand
- $[L]$ - stężenie wolnego liganda w stanie równowagi
- L_t - całkowite stężenie liganda

M_t - całkowite stężenie receptora

n - liczba miejsc aktywnych

Całkowite ciepło rozтворu (Q), znajdującego się w celi pomiarowej (V_0), przy stopniu wysycenia Θ wynosi:

$$Q = n\Theta M_t \Delta H V_0 \quad (13)$$

gdzie ΔH jest to molowa entalpia wiązania liganda z miejscem aktywnym receptora. Rozwiązując równanie kwadratowe (12) i podstawiając wartość Θ do równania (13), otrzymujemy zależność:

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4L_t}{nM_t}} \right] \quad (14)$$

W procesie dopasowania danych eksperymentalnych do przedstawionego modelu, wyznaczane są wartości K , ΔH i n .

Należy pamiętać, że wyliczone efekty odnoszą się do rozтворu znajdującego się w celi pomiarowej (V_0). W czasie dodawania kolejnych nastrożków, całkowita rzeczywista objętość rozтворu zwiększa się, a część rozтворu wypychana jest z celi pomiarowej, do znajdującej się nad nią przestrzeni retencyjnej. Oprogramowanie uwzględnia odpowiednie poprawki, na zmianę wartości spowodowanych zmianą objętości rozтворu.

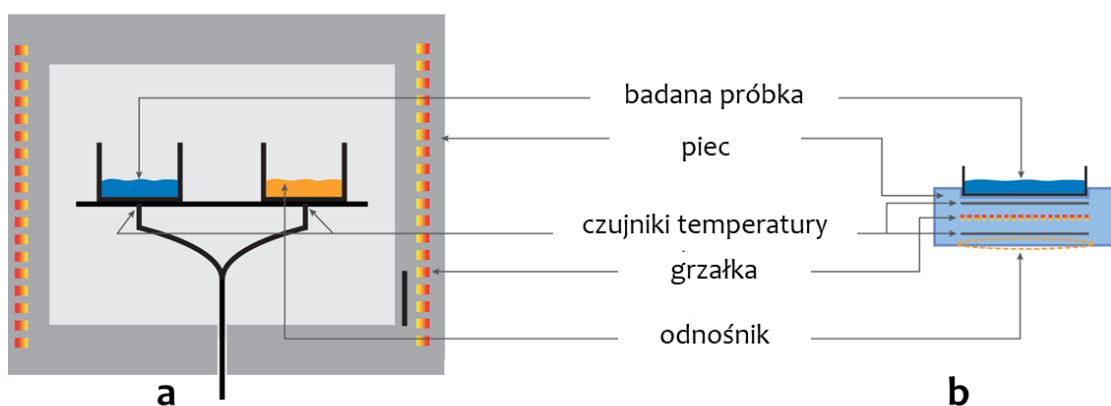
2.1.3. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. Differential Scanning Calorimetry) umożliwia analizę dowolnej przemiany termicznej, pozwala na obserwację przemian fazowych i strukturalnych, zachodzących w próbce, podczas jej ogrzewania lub chłodzenia. W technice tej wartością mierzoną jest różnica strumieni ciepła, przepływających przez badaną próbkę i odnośnik, w zadanym zakresie temperatury.

Wykorzystany do badań kalorymetr Chip-DSC 100 firmy Linseis, jest kalorymetrem typu przepływowego (ang. Heat-flow). Do wyznaczenia różnicy strumieni ciepła wykorzystywany jest sygnał pomiarowy, wynikający z powstawania różnicy temperatur, pomiędzy badaną próbką, a odnośnikiem. Obydwie próbki umieszczone są we wspólnym piecu (Rysunek 19a). Podczas zmiany temperatury (ogrzewanie/chłodzenie pieca), do momentu wystąpienia przemiany fazowej w próbce układ jest symetryczny cieplnie, a różnica pomiędzy temperaturami próbki i odnośnika jest zerowa. Gdy pojawia się różnica w pojemności cieplnej próbki, wywołana zachodzącą przemianą, obserwowana jest różnica temperatur (ΔT). Wartość ta jest wprost proporcjonalna do różnicy strumieni cieplnych (Φ). Jest ona przeliczana automatycznie przez oprogramowanie kalorymetru, w oparciu o stałą (k), która jest wyznaczana eksperymentalnie poprzez kalibrację urządzenia:

$$\Phi = k\Delta T \quad (15)$$

Kalorymetr Chip-DSC 100 wykorzystuje zminiaturyzowany układ pomiarowy, mieszczący się w pojedynczym chipie (Rysunek 19), na którym umieszczana jest próbka, znajdująca się w aluminiowym tyglu.



Rysunek 19. Schemat klasycznego kalorymetru przepływowego (a) i kalorymetru w technologii Chip-DSC (b) [90]

Kalorymetr połączony jest z komputerem i sterowany za pomocą oprogramowania Chip-DSC (Linseis), które umożliwia dobór parametrów pomiaru takich jak czas, temperatura i szybkość grzania/chłodzenia próbki. Dodatkowo oprogramowanie pozwala na opracowanie otrzymanych wyników. Dane uzyskane metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej przedstawiane są na termogramach, w postaci zależności przepływu ciepła [mW] w funkcji temperatury [°C].

Różnicowa kalorymetria skaningowa pozwala na wyznaczenie przemian fazowych, takich jak: topnienie, krystalizacja, zeszklenie czy przejścia amorficzne oraz umożliwia wyznaczenie wartości ciepł wymienionych przemian. Technika DSC pozwala również wyznaczyć kinetykę reakcji, a także obliczyć pojemności cieplne oraz stabilność termiczną badanych próbek.

2.1.4. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Spektroskopia w podczerwieni jest jedną z podstawowych technik, wykorzystywanych w analizie strukturalnej, pozwala określać struktury badanych związków, ich czystość, a także sposób oddziaływania z otoczeniem.

Technika ta wykorzystuje promieniowanie z zakresu podczerwieni podstawowej - od 2500-25000 nm. W spektroskopii IR zakres ten, najczęściej wyrażany jest za pomocą liczb falowych, czyli odwrotności długości fali (od 400 do 4000 cm^{-1}). W tym zakresie, absorbowane jest jedynie promieniowanie o częstotliwości odpowiadającej częstotliwości drgania danego wiązania, występującego w cząsteczce. Wyróżnić możemy drgania rozciągające, odpowiadające ruchowi wzdłuż osi wiązania i deformacyjne, które powodują zmianę kąta wiązania. Poszczególne wiązania cechują się charakterystyczną dla siebie energią oscylacji, przez co absorbują tylko promieniowanie o określonej częstotliwości. Na widmie IR (zależność absorpcji lub transmitancji w funkcji liczby falowej) widoczne są pasma absorpcyjne, przy częstotliwości charakterystycznej dla tego wiązania, które pozwalają na jego identyfikację.

Pomiary wykonywane były przy użyciu spektrometru Nicolet iS5 firmy Thermo Fisher Scientific (Rysunek 20), z transformacją Fouriera. Spektrometr połączony jest z komputerem i obsługiwany przy pomocy oprogramowania OMNIC, które umożliwia sterowanie pracą urządzenia oraz pozwala na opracowanie wyników.



Rysunek 20. Spektrometr FT-IR Nicolet iS5.

2.2. Wykorzystane odczynniki, przygotowanie próbek i procedura pomiarowa

2.2.1. Badane substancje

Związki wykorzystywane w badaniach:

- **α -cyklodekstryna** – Tokio Chemical Industry (TCI) (>98.0 %)
- **β -cyklodekstryna** – Tokio Chemical Industry (TCI) (>98.0 %)
- **HP- β -cyklodekstryna** – Tokio Chemical Industry (TCI) (99.0 %)
- **SBE- β -cyklodekstryna** – Cyclolab (Budapeszt, Węgry) (>95.0 %)
- **Ezetymib** – Sigma Aldrich (>98%)
- **Cilostazol** – Sigma Aldrich (>98%)
- **Flawanon, 4'-metoksyflawanon, 4'-chloroflawanon i 7-metoksyflawanon** – związki otrzymane dzięki uprzejmości dr hab. Bogumiły Kupcewicz prof. UMK, z Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Farmaceutycznego UMK. (Czystość otrzymanych flawanonów potwierdzona została przez wykonanie pomiarów $^1\text{HNMR}$)

Rozpuszczalniki:

- DMSO – Sigma Aldrich cz.d. a.
- Etanol – Sigma Aldrich cz.d. a
- Woda trójкратно destylowana – otrzymana w Zakładzie Chemii Biofizycznej UŁ

Cyklodekstryny suszone były w temperaturze 90°C, natomiast pozostałe związki wykorzystywane do badań, w temperaturze 50 °C, w suszarce próżniowej Binder VP-23, przez 72h. Wszystkie substancje odważane były z dokładnością 0,00001 g na wadze analitycznej Mettler Toledo AE240.

2.2.2. Spektroskopia UV-Vis

W celu określenia równowagi fazowej, pomiędzy cyklodekstrynami a wybranymi ligandami, przeprowadzono serie pomiarów, które polegały na umieszczeniu sproszkowanego liganda (ezetymib, cilostazol, flawanony) w formie stałej, w zamykanych probówkach (Eppendorf Safe-Lock) o pojemności 1.5 ml. Ligand zalewany był równymi objętościami wodnych roztworów cyklodekstryny, w zakresach stężeń: dla β CD od 0 do 15 mM, natomiast dla α CD, HP β CD i SBE β CD 0 – 90 mM. Probówki zamykano, wytrząsano i odstawiano w temperaturze pokojowej, do czasu ustalenia się stanu równowagi. Po siedmiu dniach próbki

odwirowywano, za pomocą wirówki laboratoryjnej Microcentrifuge MPW-55, przez 5 minut z szybkością 13,000 RPM. Znad osadu pobierano klarowny roztwór, który rozcieńczano wodą tak, aby rejestrowane widma mieściły się w zakresie pracy spektrofotometru. Przeprowadzono po 3 serie pomiarowe, dla każdej pary *ligand-cyklodekstryna*.

2.2.3. Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC)

Pomiary izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, dla kompleksów flawanonów, prowadzone były w roztworach wodnych, natomiast dla ezetymibu, cilostazolu i 4'-chloroflawanonu, ze względu na brak możliwości przygotowania roztworu o odpowiednim stężeniu (zbyt niska rozpuszczalność w wodzie), przeprowadzone zostały w DMSO. W każdym układzie przeprowadzone zostały trzy niezależne pomiary: miareczkowanie roztworu liganda roztworem receptora (CD) oraz dwa rozcieńczenia (rozcieńczanie rozpuszczalnika roztworem cyklodekstryny oraz miareczkowanie roztworu liganda czystym rozpuszczalnikiem), mające na celu wyeliminowanie efektów związanych z rozcieńczaniem roztworów liganda i receptora w rozpuszczalniku. Stężenia oraz ilość i objętość nastrzyków, dobierane były indywidualnie, dla każdego połączenia *ligand-cyklodekstryna*. Wszystkie pomiary przeprowadzane były w temperaturze 25°C, z szybkością mieszania 351 obrotów na minutę, a czas odstępu pomiędzy pojedynczymi nastrzykami wynosił 600 sekund.

2.2.4. Przygotowanie kompleksów w formie stałej (DSC, FT-IR)

Kompleksy w formie stałej (wykorzystywane w badaniach różnicowej kalorymetrii skaningowej oraz spektroskopii w podczerwieni) przygotowane zostały metodą współrozpuszczania. Cyklodekstryna rozpuszczana była w wodzie, a następnie do roztworu wkraplany był etanolowy roztwór liganda, w ilości odpowiadającej stosunkowi molowemu kompleksu. Roztwór ten mieszany był 72 h, w temperaturze około 40 °C, a następnie odparowywany do sucha. Kompleks w formie stałego osadu wykorzystywany był w dalszych badaniach.

2.2.5. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Na każdą serię pomiarową składało się widmo kompleksu oraz widma tworzących go czystych związków. Pomiary wykonane zostały metodą transmisyjną, z użyciem bromku potasu jako nośnika. Próbki przygotowane były poprzez dodanie 200-krotnego nadmiaru KBr, względem badanego związku. Następnie dokładnie mieszane i ucierane w moździerzu agatowym.

2.2.6. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

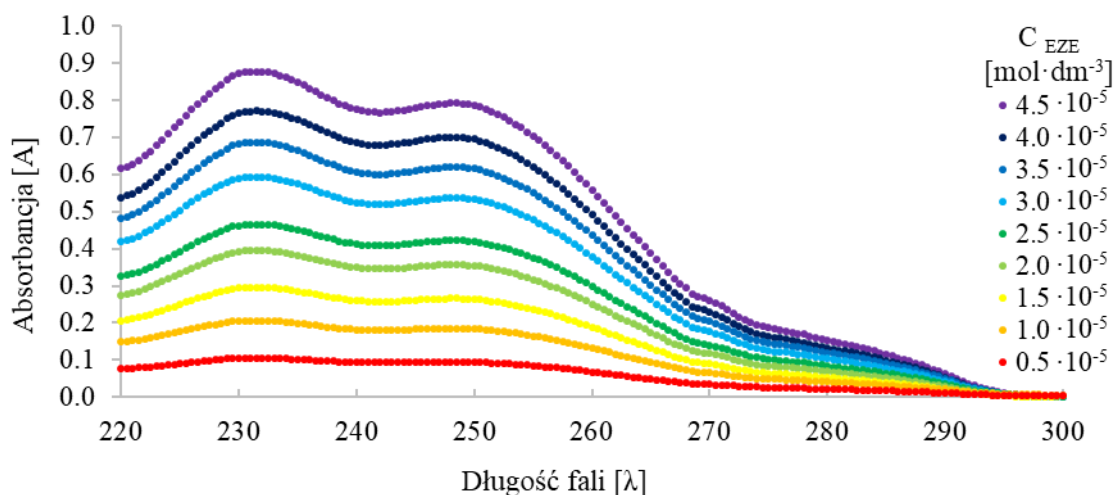
Na każdą serię pomiarową składały się trzy pomiary kalorymetryczne – czystej cyklodekstryny, liganda oraz kompleksu, przygotowanego metodą współrozpuszczania, opisaną w podrozdziale (2.2.4.). Naważki, umieszczane w aluminiowych tyglach, o pojemności 20 μL , analizowane były w zakresie temperatur od 40°C to 300°C, z szybkością grzania 10 stopni/min.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

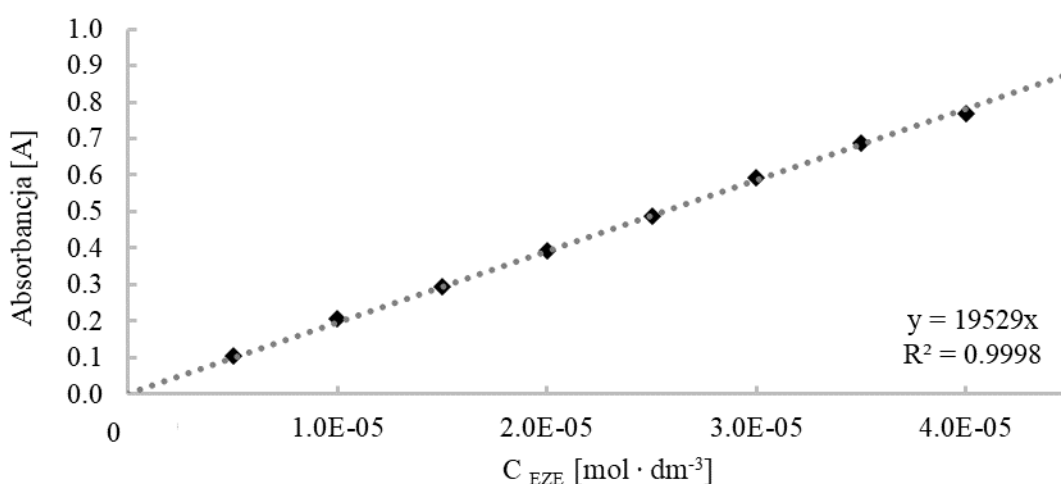
3.1. Spektrofotometryczne badania rozpuszczalności w wodzie wybranych ligandów w obecności cyklodekstryn

3.1.1. Badanie wzrostu rozpuszczalności ezetymibu w wodzie

W celu spektrofotometrycznego oznaczenia zmian stężenia ezetymibu w wodzie wykonano krzywą wzorcową leku. Pomiary przeprowadzono w zakresie stężeń ezetymibu od $0.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $4.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ w wodnych roztworach etanolu (25% v/v). Maksimum absorpcji wyznaczono dla analitycznej długości fali wynoszącej 232 nm. Widmo UV w zakresie 220 – 300 nm przedstawiono na Rysunku 21. Zależność absorbancji roztworów ezetymibu w funkcji stężenia molowego opisano równaniem linii prostej $y = 19529x$, dla której współczynnik korelacji wynosił $R^2 = 0.9998$ (Rysunek 22).



Rysunek 21. Widmo UV ezetymibu w zakresie stężeń $0.5 \cdot 10^{-5}$ - $4.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

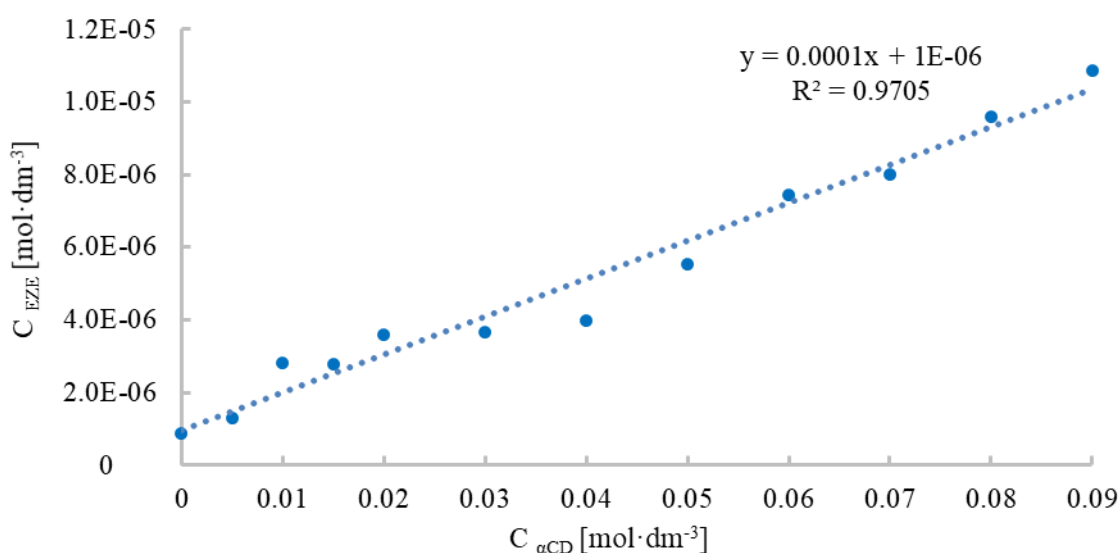


Rysunek 22. Krzywa kalibracyjna ezetymibu. Zależność absorbancji roztworów ezetymibu od ich stężenia molowego.

Współczynnik kierunkowy prostej odpowiada molowemu współczynnikowi ekstynkcji i dla analitycznej długości fali 232 nm i wynosi $\varepsilon = 19529 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$. Rozpuszczalność leku w wodzie, wyznaczona eksperymentalnie w oparciu o współczynnik ekstynkcji i prawo Lamberta-Beera, wynosi w przybliżeniu 0.37 mg/dm^3 .

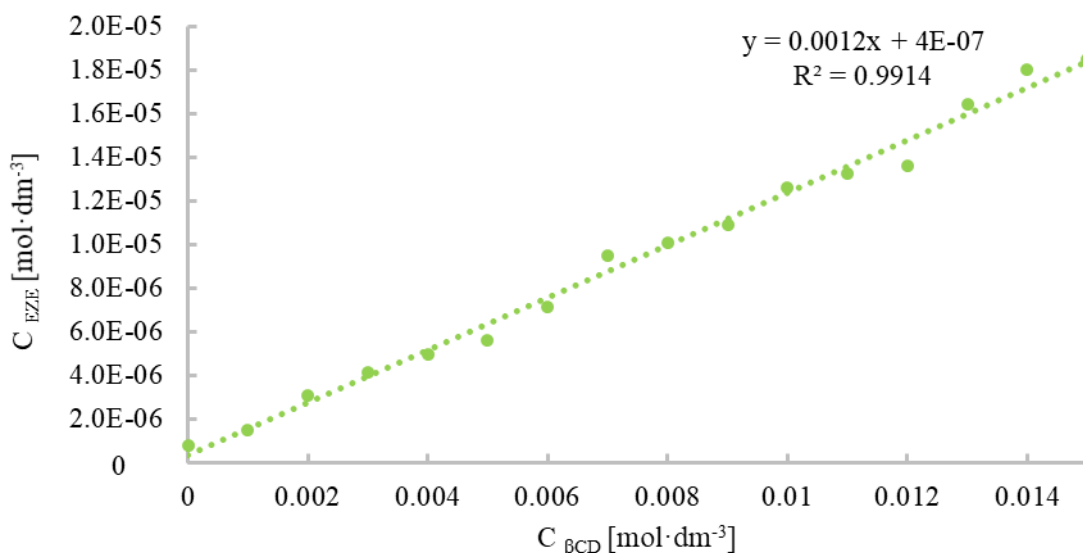
Badania wzrostu rozpuszczalności wykonano metodą rozpuszczalności fazowej, opisaną w podrozdziale (2.2.2.). W przypadku ezetymibu pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem naturalnej α -cyklodekstryny i β -cyklodekstryny oraz hydroksypropylo- β -cyklodekstryny i sulfobutylo- β -cyklodekstryny.

W celu określenia wzrostu rozpuszczalności ezetymibu w wodzie, wywołanego obecnością α -cyklodekstryny, wykonano pomiary w zakresie stężeń roztworów makrocykla od 5 mM do 90 mM, do których wprowadzano nadmiar stałego ezetymibu. Wzrost rozpuszczalności liganda wskazuje na powstawanie oddziaływań między cząsteczkami ezetymibu i α -cyklodekstryny (tworzenie kompleksu inkluzyjnego). Na Rysunku 23 przedstawiono przykładową zależność funkcji stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia α -cyklodekstryny (α CD), otrzymaną dla jednej z trzech serii pomiarowych. Wykorzystując metodę najmniejszych kwadratów, zależność opisana została równaniem linii prostej: $y = 1.04 \cdot 10^{-4} x + 9.51 \cdot 10^{-7}$ ($R^2 = 0.9705$). Liniowy wzrost stężenia ezetymibu odpowiada występowaniu krzywej rozpuszczalności typu A_L i świadczy o tworzeniu połączenia, między cząsteczkami liganda i makrocykla, w stosunku 1:1. Wyznaczony wzrost rozpuszczalności ezetymibu w wodzie w badanym zakresie stężeń α -cyklodekstryny wyniósł 13 (Tabela 9).



Rysunek 23. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od zawartości α -cyklodekstryny (α CD) w wodzie (seria 1).

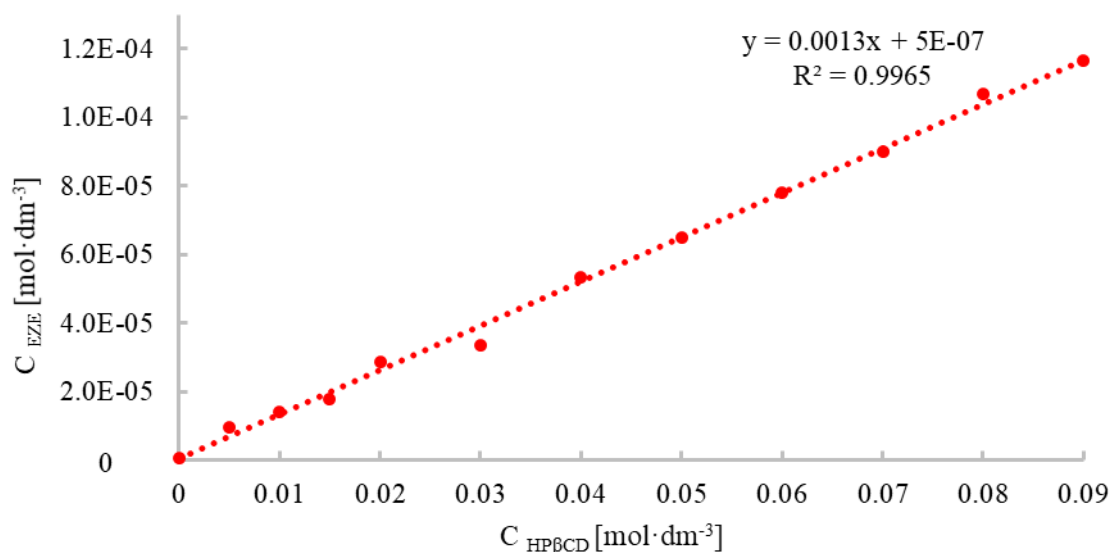
Ze względu na stosunkowo niską rozpuszczalność β -cyklodekstryny w wodzie, pomiary dla tego makrocykla wykonane zostały w zakresie stężeń od 1mM do 15 mM (maksymalne stężenie β -cyklodekstryny). Otrzymano liniową zależność wzrostu stężenia ezetymibu w funkcji stężenia cyklodekstryny, która przedstawiona została na Rysunku 24.



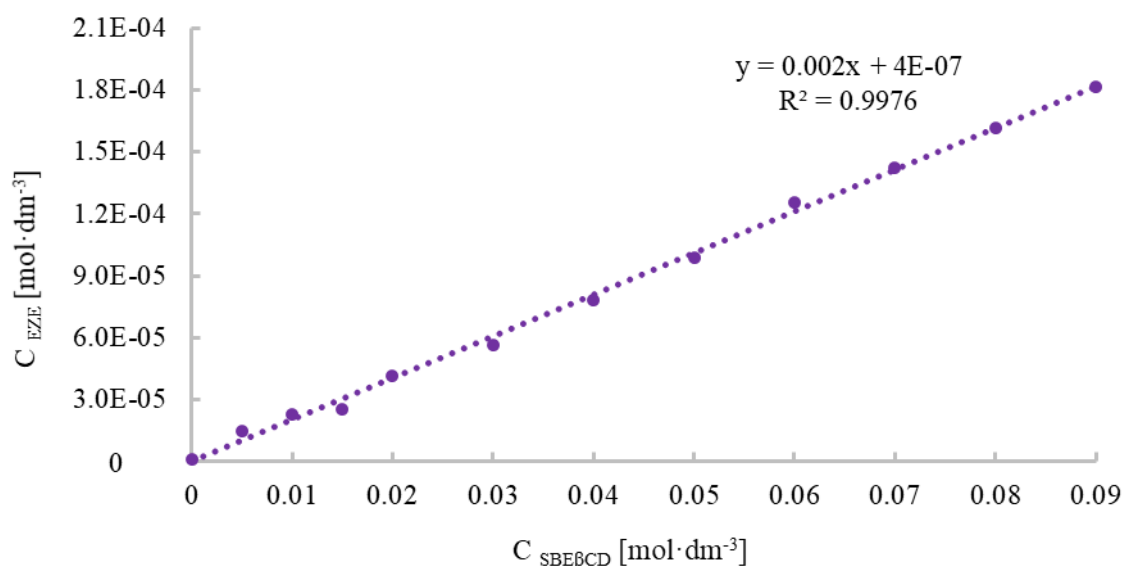
Rysunek 24. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od zawartości β -cyklodekstryny (βCD) w wodzie (seria 1).

Liniowy przebieg, podobnie jak w przypadku α -cyklodekstryny, potwierdza powstawanie kompleksu 1:1 (krzywa typu A_L), jednak wzrost rozpuszczalności w wodzie, mimo zastosowania niższych stężeń cyklodekstryny, jest większy (21-krotny).

Zastosowanie pochodnych β -cyklodekstryny: hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP βCD) oraz sulfobutylo- β -cyklodekstryny (SBE βCD), charakteryzujących się większą rozpuszczalnością w wodzie, umożliwiło wykonanie pomiarów w zakresie stężeń do 90 mM. W obydwu przypadkach otrzymano liniową zależność pomiędzy stężeniem leku, a wzrastającą zawartością cyklodekstryny (Rysunki 25 i 26). Równania linii prostych wynosiły odpowiednio, dla HP βCD : $y = 1.29 \cdot 10^{-3} x + 5.24 \cdot 10^{-7}$ ($R^2 = 0.9965$), dla SBE βCD : $y = 2.01 \cdot 10^{-3} x + 3.62 \cdot 10^{-7}$ ($R^2 = 0.9976$). Na podstawie otrzymanych wyników oszacowano, że hydroksypropylo- β -cyklodekstryna powoduje 142, natomiast sulfobutylo- β -cyklodekstryna 213-krotny wzrost rozpuszczalności ezetymibu w wodzie.



Rysunek 25. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od zawartości HP- β -cyklodekstryny (HP β CD) w wodzie (seria 1).



Rysunek 26. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od zawartości SBE- β -cyklodekstryny (SBE β CD) w wodzie (seria 1).

We wszystkich badanych układach *ezetymib - cyklodekstryna* uzyskano liniowe zależności wzrostu rozpuszczalności, co umożliwiło wyznaczenie stałych trwałości powstałych kompleksów. Na podstawie równań prostych i danych zawartych w Tabelach UV 1-4 (Załączniki) wyznaczono wartości stałych tworzenia kompleksów (K), wykorzystując równanie Higuchi – Connorsa (9). Uśrednione wartości zamieszczono w Tabeli 9.

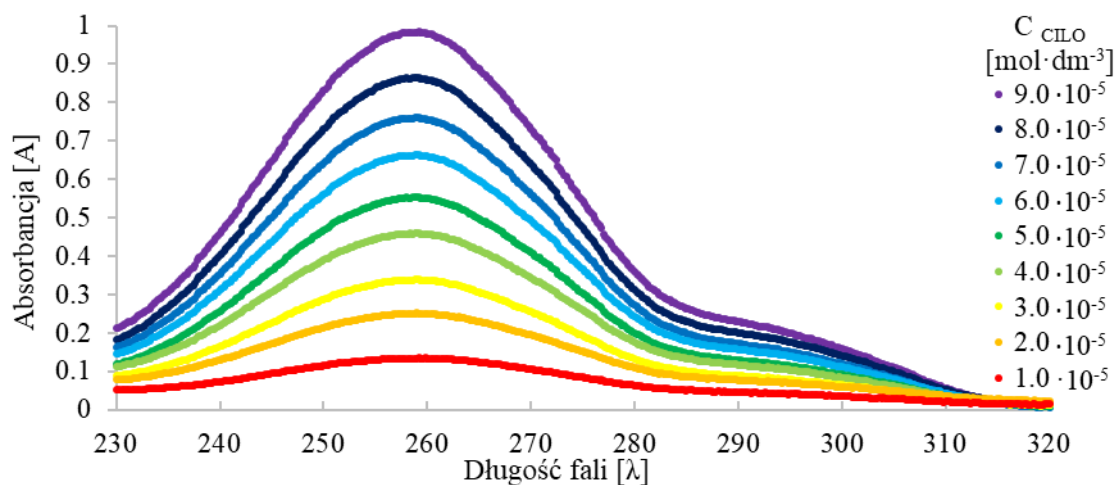
Tabela 9. Wyznaczone wartości wzrostu rozpuszczalności ezetymibu w wodzie w obecności wybranych cyklodekstryn w zakresie do 15 mM i do 90 mM oraz wartości stałych trwałości powstających kompleksów inkluzyjnych.

	α CD	β CD	HP β CD	SBE β CD
Wzrost rozpuszczalności 0-15 mM	2.86 ± 0.51	21.20 ± 1.21	21.22 ± 0.68	31.40 ± 1.99
Wzrost rozpuszczalności 0- 90 mM	13.07 ± 0.60	-	142.41 ± 2.88	212.87 ± 3.58
K [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$]	124.15 ± 7.55	1324.37 ± 130.70	1575.61 ± 34.03	2382.20 ± 103.63

Porównując dane z Tabeli 9, dla dwóch naturalnych cyklodekstryn, zauważyć można, że β -cyklodekstryna, mimo swojej ograniczonej rozpuszczalności w wodzie, powoduje większy wzrost stężenia ezetymibu niż mniejsza α -cyklodekstryna. Wynika to najprawdopodobniej z lepszego dopasowania przestrzennego pomiędzy cząsteczką ezetymibu i β -cyklodekstryną. Wartość stałej trwałości mniejsza niż $1000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, również potwierdza, że ezetymib nie tworzy tak trwałego połączenia z α -cyklodekstryną jak z formą β . Zastosowanie dobrze rozpuszczalnych, modyfikowanych pochodnych β -cyklodekstryny pozwala otrzymać trwalsze połączenia, o dużo większej wartości solubilizacji ezetymibu.

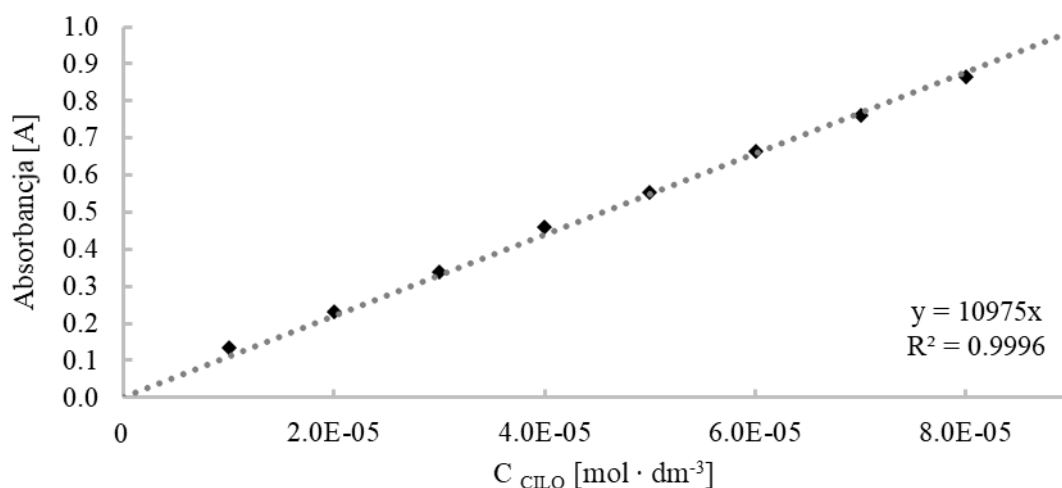
3.1.2. Badanie wzrostu rozpuszczalności cilostazolu w wodzie

Widmo UV cilostazolu w zakresie 230 - 320 nm przedstawione zostało na Rysunku 27. Związek wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 259 \text{ nm}$. Podobnie jak w przypadku ezetymibu, ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie cilostazolu, pomiary przeprowadzone zostały w wodnych roztworach etanolu (25% v/v).



Rysunek 27. Widmo UV cilostazolu w zakresie stężeń $1.0 \cdot 10^{-5} - 9.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

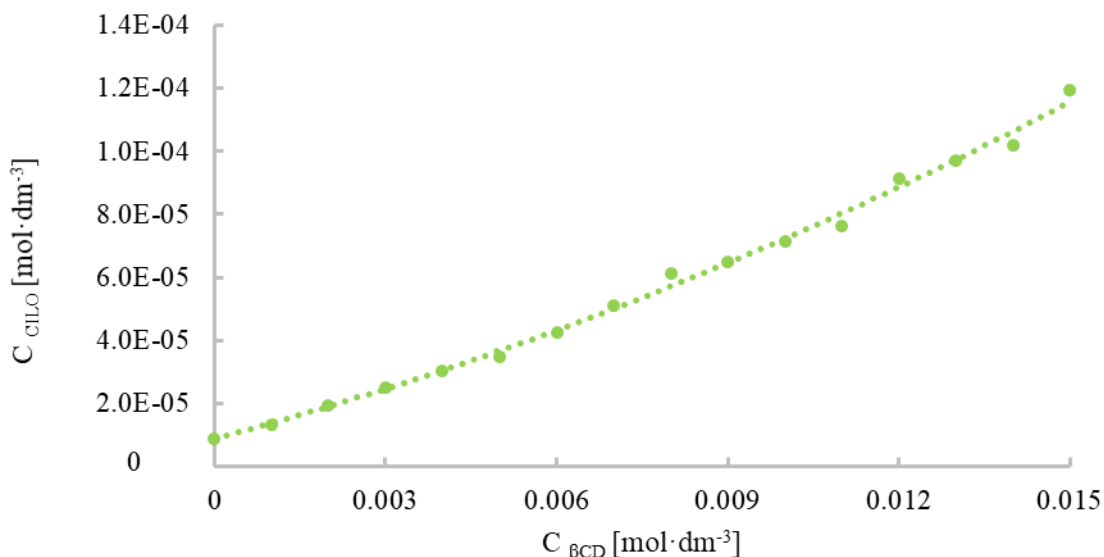
Kalibrację wykonano w zakresie stężenia liganda od $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ do $9.0 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³. Krzywa wzorcowa, wykonana dla analitycznej długości fali, przedstawiona została na Rysunku 28 i opisana równaniem: $y = 10975x$ ($R^2 = 0.9996$). Współczynnik kierunkowy wyznaczonego równania odpowiada molowemu współczynnikowi ekstynkcji cilostrazolu, który wynosi $\epsilon = 10975$ mol⁻¹dm³cm⁻¹. Wyznaczona eksperymentalnie maksymalna rozpuszczalność w wodzie cilostrazolu wynosi 3.33 mg/dm⁻³.



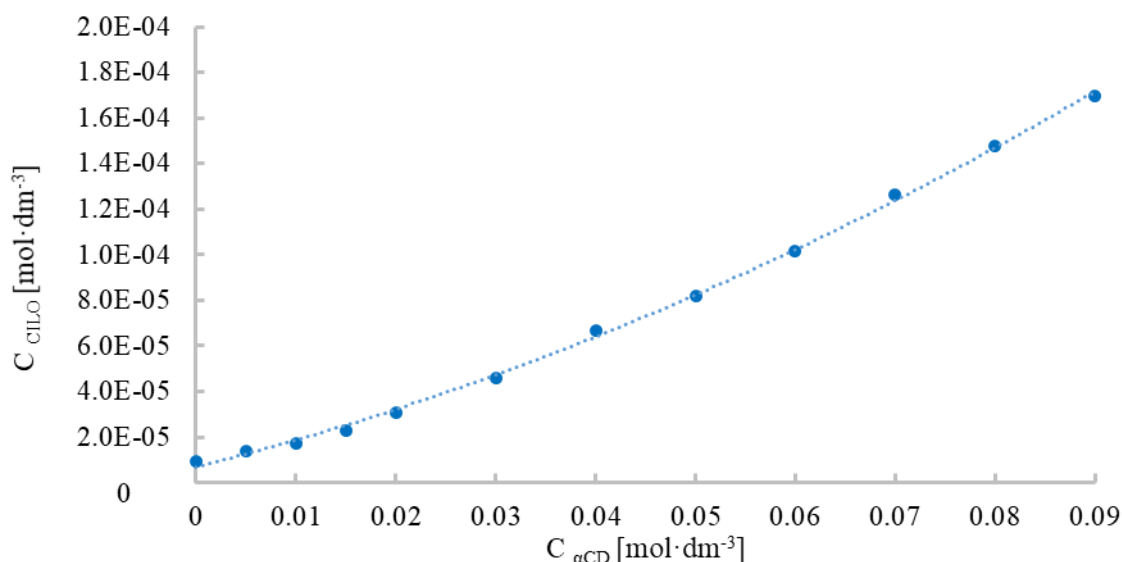
Rysunek 28. Krzywa kalibracyjna cilostrazolu. Zależność absorbancji roztworów cilostrazolu od ich stężenia molowego.

Badania wpływu cyklodekstryn na wzrost rozpuszczalności cilostrazolu w wodzie wykonano analogicznie jak w przypadku ezetymibu. Zbadano wpływ α - i β -cyklodekstryny oraz dwóch modyfikowanych cyklodekstryn: hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) i sulfobutylo- β -cyklodekstryny (SBE β CD) na solubilizację cilostrazolu. Otrzymane zależności przedstawione zostały na Rysunkach 29-32.

W przypadku β -cyklodekstryny (Rysunek 29) zaobserwować można pozorną liniowość krzywej, natomiast we wszystkich trzech pozostałych przypadkach odchylenia od liniowości w kierunku wyższych wartości (typ krzywej A_p) są wyraźnie widoczne, co świadczy o powstawaniu kompleksów o stechiometrii większej niż 1:1, z przewagą cyklodekstryny. Można zaobserwować dla nich liniowy przebieg do stężenia wynoszącego ok. 15-20 mM, co tłumaczy pozorną liniowość uzyskaną dla naturalnej β -cyklodekstryny. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność tej cyklodekstryny odchylenie występujące w wyższych stężeniach może być niewidoczne.

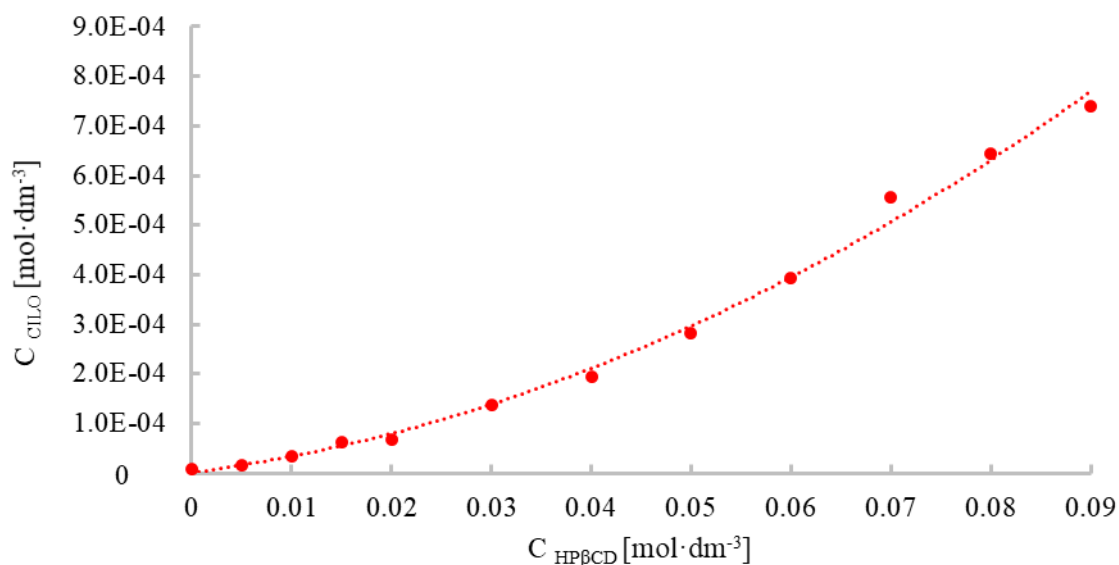


Rysunek 29. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od zawartości β -cyklodekstryny (βCD) w wodzie (seria 1).

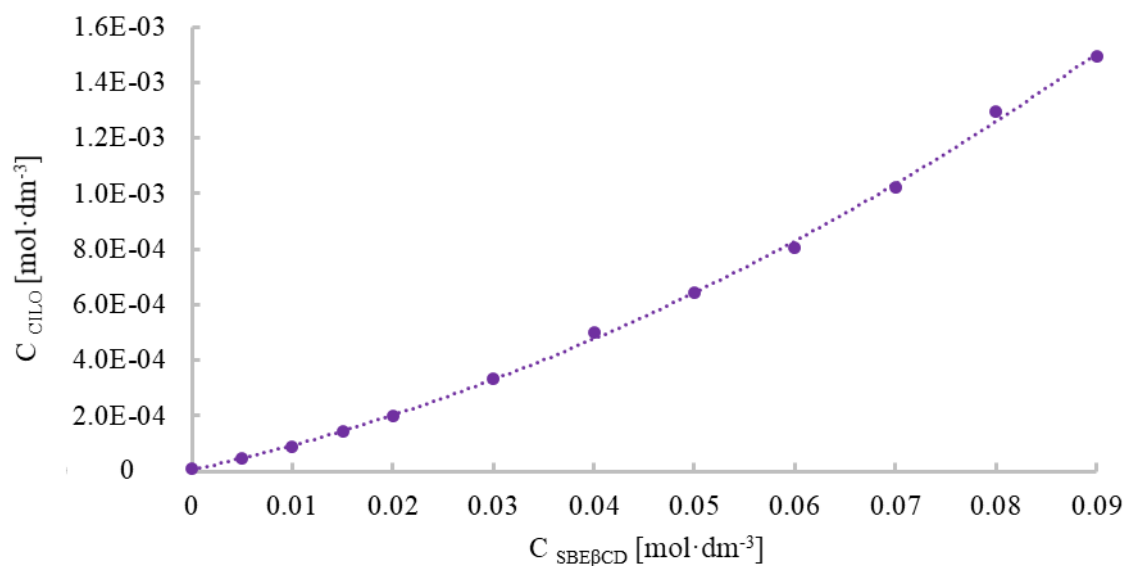


Rysunek 30. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od zawartości α -cyklodekstryny ($\alpha\text{-CD}$) w wodzie (seria 1).

Ze względu na nieliniowy przebieg zależności stężenia cilostazolu od stężenia cyklodekstryn, nie udało się wyznaczyć stałych trwałości powstających kompleksów. O trwałości poszczególnych połączeń wnioskować można na podstawie wzrostu stężenia w wodzie cilostazolu (Tabela 10). Uzyskane wartości pozwalają sądzić, że β -cyklodekstryny tworzą z cilostazolem bardziej trwałe połączenia, ponieważ powodują większy wzrost rozpuszczalności leku w wodzie. Porównując dwie modyfikowane pochodne β -cyklodekstryny, widoczne jest, że pochodna sulfobutylova powoduje prawie dwa razy większy wzrost rozpuszczalności niż hydroksypropylo- β -cyklodekstryna.



Rysunek 31. Zależność stężenia cilostrazolu (CILO) od zawartości HP-β-cyklodekstryny (HPβCD) w wodzie (seria 1).



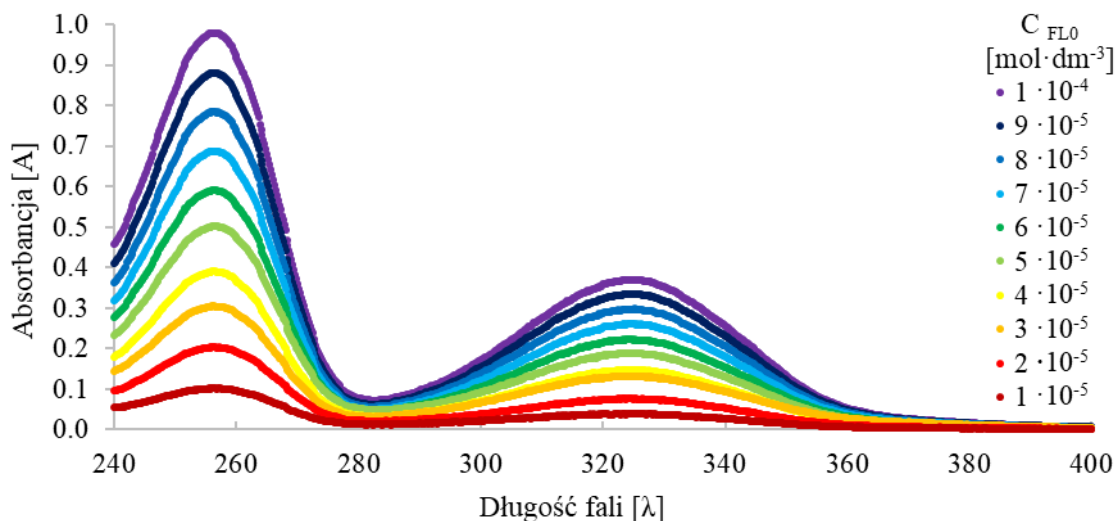
Rysunek 32. Zależność stężenia cilostrazolu (CILO) od zawartości SBE-β-cyklodekstryny (SBEβCD) w wodzie (seria 1).

Tabela 10. Wyznaczone wartości wzrostu rozpuszczalności cilostrazolu w wodzie w obecności wybranych cyklodekstryn w zakresie do 15 mM i do 90 mM.

	αCD	βCD	HPβCD	SBEβCD
Wzrost rozpuszczalności 0-15 mM	2.75 ± 0.27	12.60 ± 1.45	7.29 ± 0.47	15.73 ± 0.53
Wzrost rozpuszczalności 0-90 mM	21.31 ± 3.01	-	85.85 ± 5.23	162.15 ± 4.36

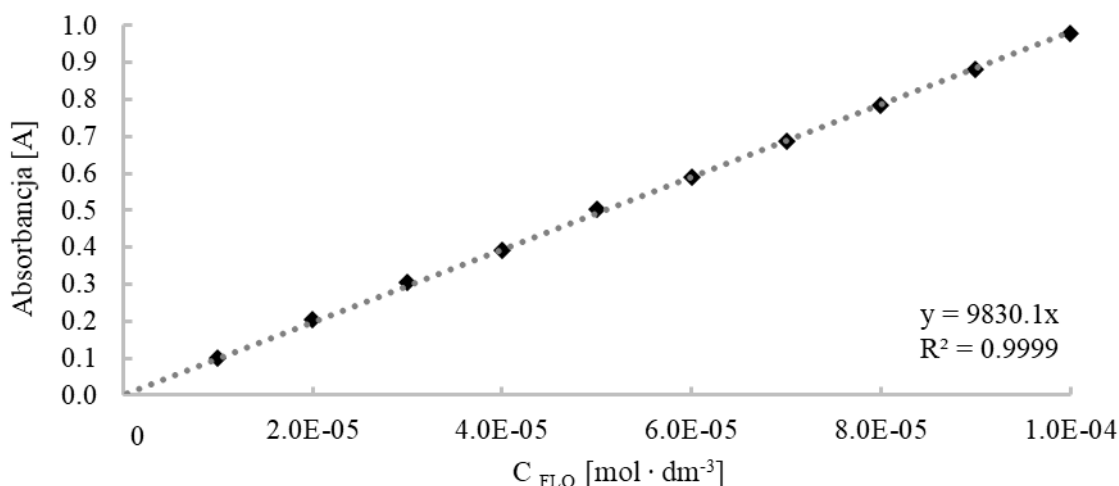
3.1.3. Badanie wzrostu rozpuszczalności flawanonu (FLO) w wodzie

Prostą wzorcową dla flawanonu (FLO) zarejestrowano w zakresie stężeń od $1.0 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1.0 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ w 20 % wodnych roztworach etanolu (v/v). Jako analityczną długość fali wybrano 256 nm. Widmo UV w zakresie 240 – 400 nm przedstawiono na Rysunku 33.



Rysunek 33. Widmo UV flawanonu (FLO) w zakresie stężeń $1.0 \cdot 10^{-5}$ - $1.0 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

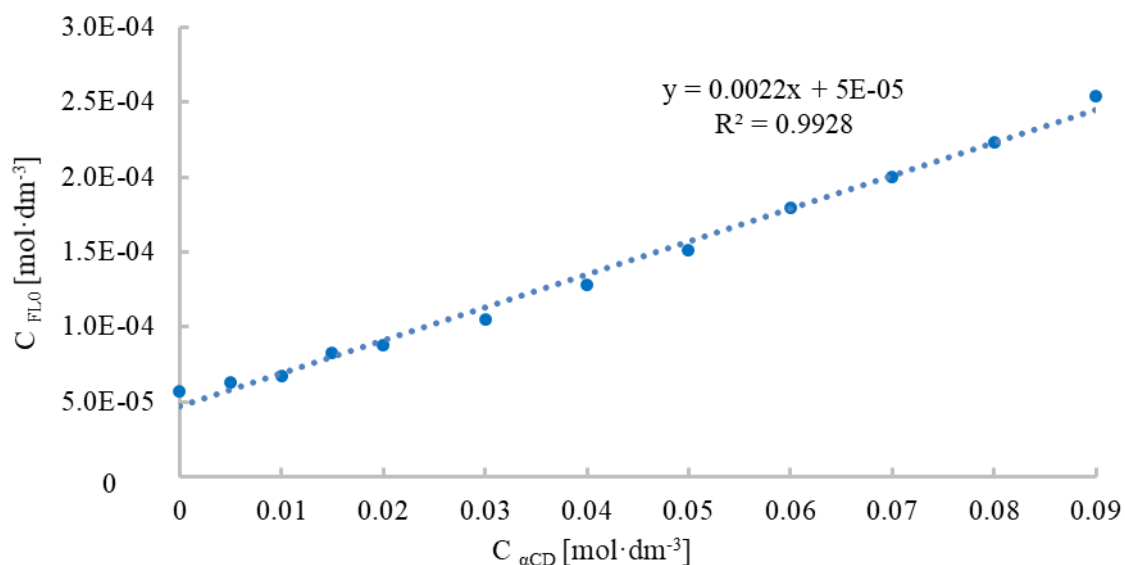
Zależność absorbancji od stężenia molowego flawanonu opisana została równaniem linii prostej: $y = 9830.1x$ ($R^2 = 0.9999$) (Rysunek 34), współczynnik kierunkowy równy jest wartości molowego współczynnika absorpcji $\epsilon = 9830.1 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Wyznaczona eksperymentalnie rozpuszczalność w wodzie badanego związku wynosi $12.33 \text{ mg} / \text{dm}^3$.



Rysunek 34. Krzywa kalibracyjna flawanonu (FLO). Zależność absorbancji roztworów flawanonu od ich stężenia molowego.

Badania równowagi fazowej dla flawanonu (FL0) oraz wszystkich jego pochodnych (FL1, FL2 i FL3) wykonano dla trzech makrocząsteczek (α -cyklodekstryny, β -cyklodekstryny oraz HP- β -cyklodekstryny) zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale (2.2.2.).

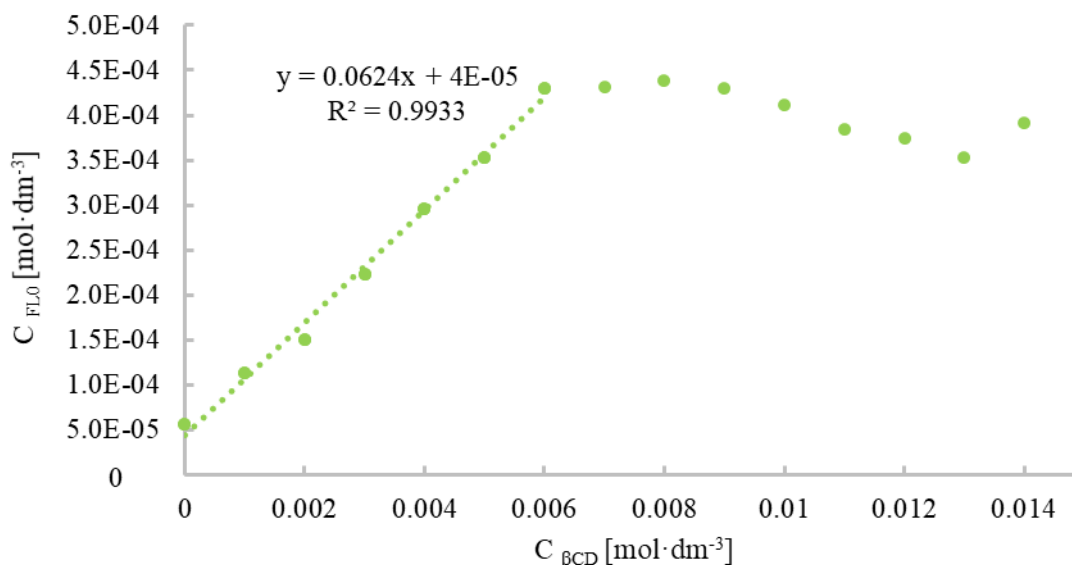
Pomiary wykonane z zastosowaniem α -cyklodekstryny jako solubilizatora pozwoliły osiągnąć w przybliżeniu 5-krotny wzrost rozpuszczalności flawanonu, a otrzymana zależność stężenia związku w funkcji stężenia cyklodekstryny miała charakter liniowy (krzywa typu A_L) (Rysunek 35).



Rysunek 35. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od zawartości α -cyklodekstryny (α CD) w wodzie (seria 1).

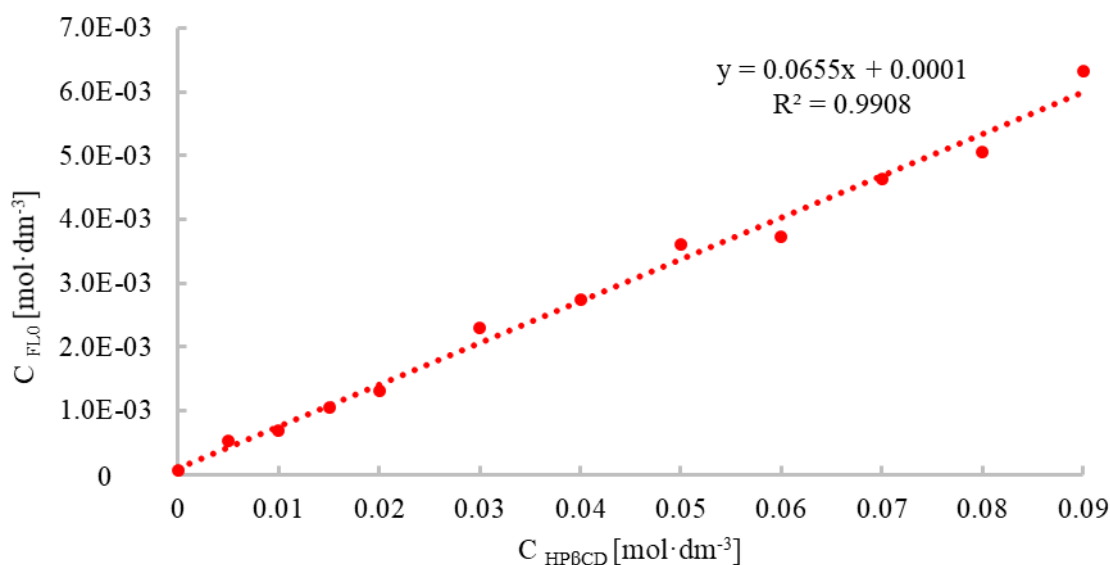
W przypadku β -cyklodekstryny uzyskano 8-krotny wzrost rozpuszczalności flawanonu, jednak otrzymana zależność (Rysunek 36) miała charakter liniowy jedynie w zakresie stężeń makrocykla do 6 mM, a wyższe stężenie β -cyklodekstryny nie powodowało dalszego wzrostu rozpuszczalności flawanonu.

Występowanie plateau, dla krzywych typu A_L , obserwowane jest w przypadku, gdy związek kompleksujący (cyklodekstryna) nie jest swobodnie rozpuszczalny w wodzie [89], następuje wtedy wysycenie związku kompleksowanego i osiągnięcie maksimum rozpuszczalności. Ze względu na stosunkowo niską rozpuszczalność w wodzie β -cyklodekstryny, można przypuszczać, że taka sytuacja ma miejsce w przypadku połączenia *flawanon – β -cyklodekstryna*.



Rysunek 36. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od zawartości β -cyklodekstryny (β CD) w wodzie (seria 1).

Wyniki badań dla kompleksu flawanonu z dobrze rozpuszczalną, hydroksypropylową pochodną β -cyklodekstryny potwierdzają tą tezę. Otrzymano liniowe zależności w pełnym zakresie stężenia makrocykla (do 90 mM), co pozwoliło osiągnąć 100-krotne zwiększenie rozpuszczalności liganda w wodzie (Rysunek 37).



Rysunek 37. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od zawartości HP- β -cyklodekstryny (HP β CD) w wodzie (seria 1).

Wszystkie cyklodekstryny powodują liniowy wzrost rozpuszczalności flawanonu (FL0) w wodzie, a ich diagramy rozpuszczalności wskazują na tworzenie się krzywych typu A_L , co świadczy o powstawaniu kompleksów o stosunku stechiometrycznym 1:1. Równania otrzymanych prostych umożliwiły wyznaczenie stałych trwałości kompleksów wykorzystując równanie Higuchi-Connors. Wartości stałych trwałości kompleksów oraz wzrost

rozpuszczalności w wodzie flawanonu wywołany inkluzją w cząsteczce cyklodekstryny przedstawiony został w Tabeli 11.

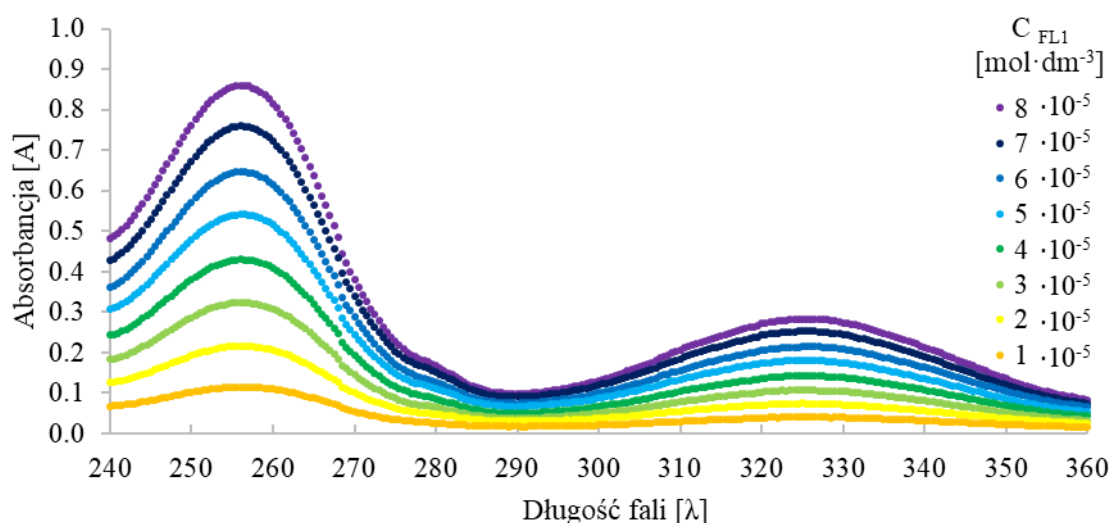
Tabela 11. Wyznaczone wartości wzrostu rozpuszczalności flawanonu w wodzie w obecności wybranych cyklodekstryn w zakresie do 15 mM i do 90 mM oraz wartości stałych trwałości powstających kompleksów inkluzyjnych.

	α CD	β CD	HP β CD
Wzrost rozpuszczalności 0-15 mM	1.55 ± 0.15	8.29 ± 0.55	17.32 ± 0.56
Wzrost rozpuszczalności 0-90 mM	4.59 ± 0.40	-	98.73 ± 8.76
K [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$]	39.50 ± 4.97	1286.28 ± 84.85	1106.81 ± 84.48

Porównując wyniki otrzymane dla naturalnych cyklodekstryn można zauważyć, że większa cząsteczka β -cyklodekstryny, mimo zastosowania mniejszego stężenia, jest w stanie wywołać dwukrotnie większy wzrost rozpuszczalności w porównaniu z α -cyklodekstryną. Stałe tworzenia również wskazują na występowanie połączenia o znikomej trwałości, między formą alfa a flawanonem, w porównaniu z β -cyklodekstryną, dla której stała przyjmuje wartość $> 1000 \text{ dm}^3 \text{mol}^{-1}$, co świadczy o tworzeniu stabilnego kompleksu. Zastosowanie pochodnej β -cyklodekstryny powoduje zwiększenie zdolności solubilizacji flawanonu, z zachowaniem trwałości kompleksu.

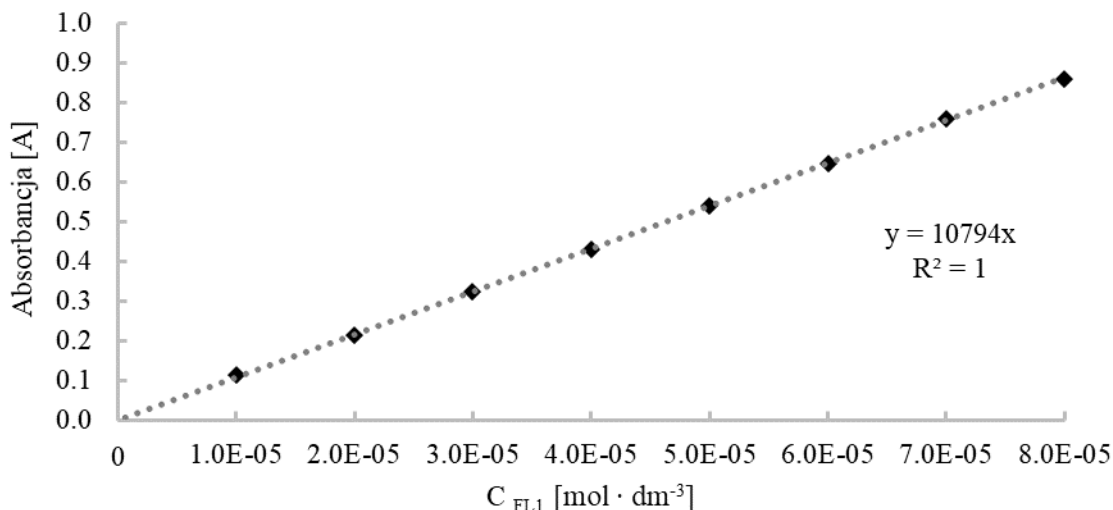
3.1.4. Badanie wzrostu rozpuszczalności 4'-metoksyflawanonu (FL1) w wodzie

Kalibrację 4'-metoksyflawanonu (FL1) wykonano w 20 % wodnym roztworze etanolu, dla zakresu stężeń związku od $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Widmo, w przedziale długości fali od 240 nm do 360 nm, przedstawiono na Rysunku 38. Analityczną długość fali, dla której wykonywano dalsze pomiary, wyznaczono na 256 nm.



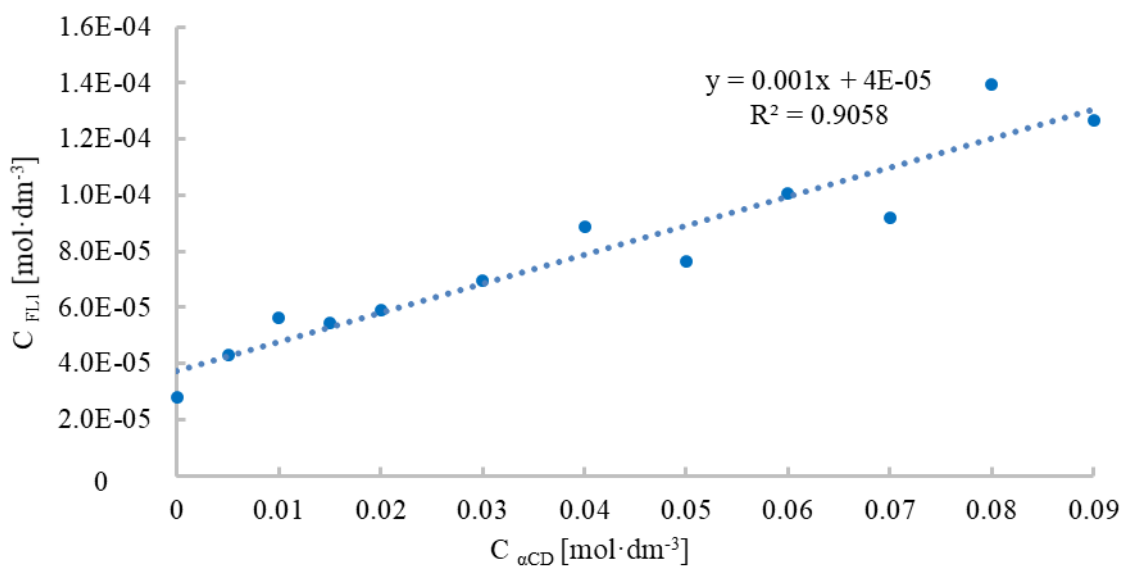
Rysunek 38. Widmo UV 4'-metoksyflawanonu (FL1) w zakresie stężeń $1 \cdot 10^{-5} - 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Prosta kalibracyjna (Rysunek 39), o równaniu $y = 10794x$ ($R^2 = 1.0000$), posłużyła do wyznaczenia molowego współczynnika absorpcji badanego związku $\varepsilon = 10794 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$. Eksperymentalnie wyznaczona rozpuszczalność w wodzie 4'-metoksyflawanonu wynosi ok. 6.36 mg/dm^3 .



Rysunek 39. Krzywa kalibracyjna 4'-metoksyflawanonu (FL1). Zależność absorbancji roztworów 4'-metoksyflawanonu od ich stężenia molowego.

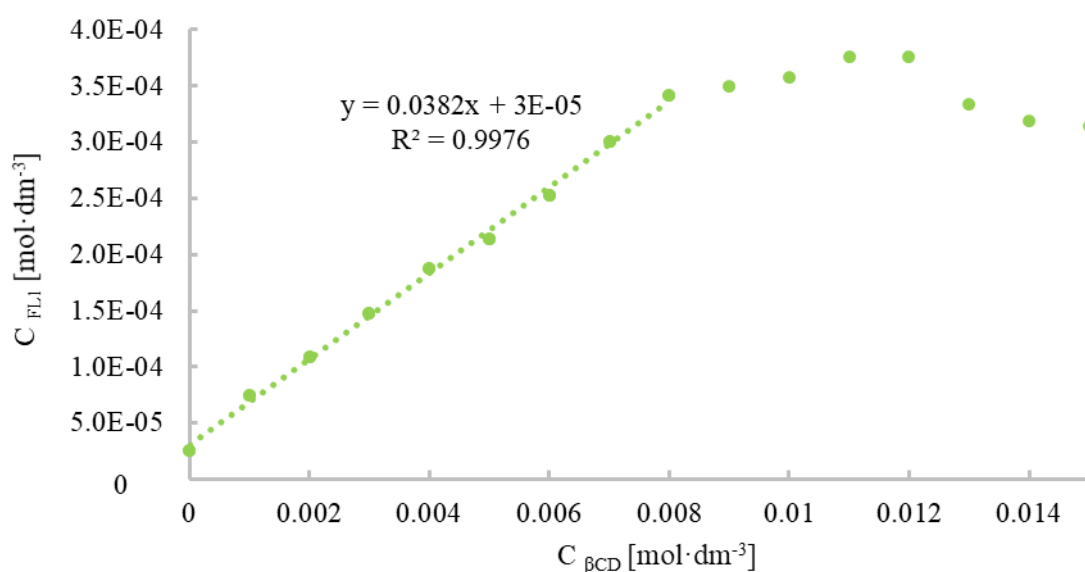
Pomiary rozpuszczalności fazowej 4'-metoksyflawanonu, dla α -cyklodekstryny jako solubilizatora, dały wyniki zbliżone do flawanonu podstawowego (FL0). Zależność stężenia związku od stężenia cyklodekstryny miała charakter liniowy, otrzymano 5-krotny wzrost rozpuszczalności liganda. Przykładowy diagram rozpuszczalności otrzymany dla α -cyklodekstryny przedstawiono na Rysunku 40.



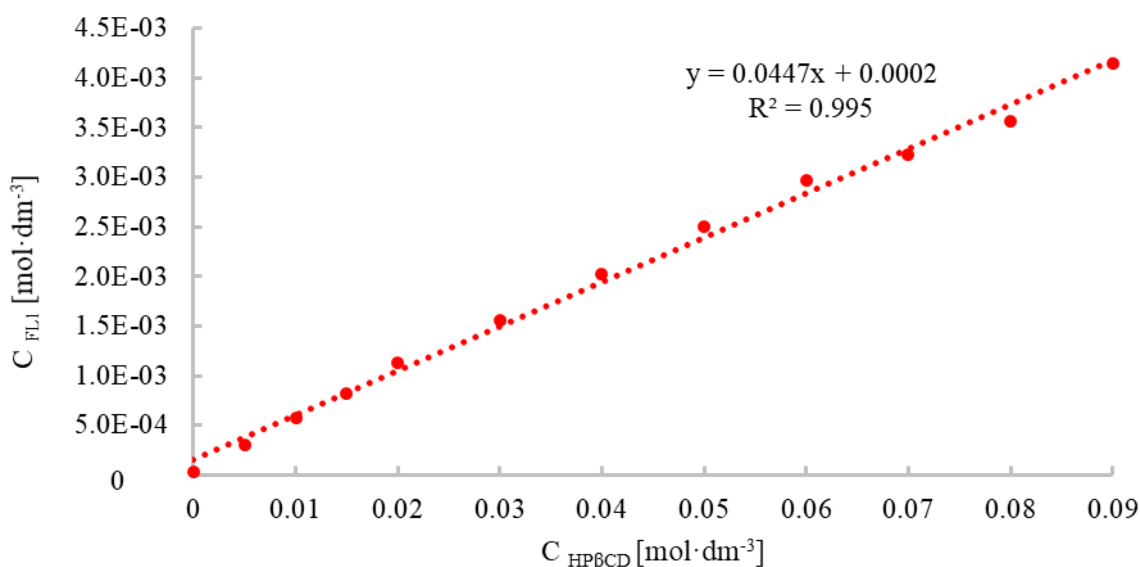
Rysunek 40. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od zawartości α -cyklodekstryny (α CD) w wodzie (seria 1).

Diagram rozpuszczalności 4'-metoksyflawanonu otrzymany dla β -cyklodekstryny charakteryzuje się liniowym wzrostem stężenia liganda, z wystąpieniem plateau przy stężeniu cyklodekstryny wynoszącym 8 mM (Rysunek 41). W danym zakresie stężeń otrzymano 13-krotny wzrost rozpuszczalności 4'-metoksyflawanonu w wodzie.

Zastosowanie hydroksypropylo- β -cyklodekstryny, jako czynnika kompleksującego, pozwoliło uzyskać liniowy przebieg krzywej w zakresie do 90 mM cyklodekstryny, co skutkowało ponad 140-krotnym wzrostem rozpuszczalności liganda w wodzie. Przykładowy diagram rozpuszczalności otrzymany dla hydroksypropylo- β -cyklodekstryny przedstawiono na Rysunku 42.



Rysunek 41. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od zawartości β -cyklodekstryny (βCD) w wodzie (seria 1).



Rysunek 42. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od zawartości HP- β -cyklodekstryny (HP βCD) w wodzie (seria 1).

We wszystkich trzech analizowanych połączeniach 4'-metoksyflawanon - cyklodekstryna otrzymano zależności liniowe, obrazujące typ krzywej A_L i powstawanie kompleksu o stosunku stechiometrycznym 1:1. Wyznaczone stałe trwałości badanych połączeń dla każdej cyklodekstryny przedstawione zostały w Tabeli 12.

Tabela 12. Wyznaczone wartości wzrostu rozpuszczalności 4'-metoksyflawanonu w wodzie w obecności wybranych cyklodekstryn w zakresie do 15 mM i do 90 mM oraz wartości stałych trwałości powstających kompleksów inkluzyjnych.

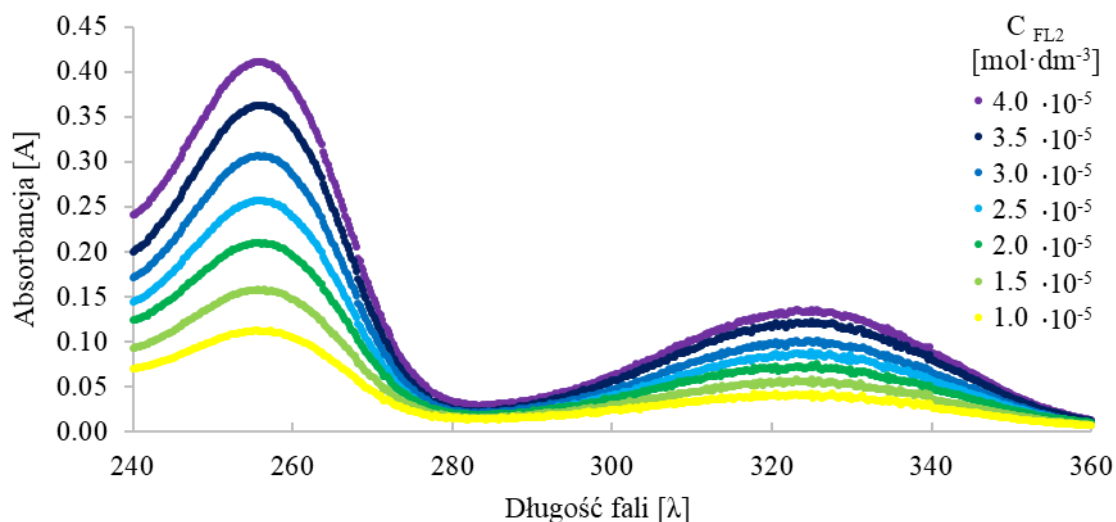
	α CD	β CD	HP β CD
Wzrost rozpuszczalności 0 - 15 mM	1.74 ± 0.28	12.81 ± 0.37	25.93 ± 1.74
Wzrost rozpuszczalności 0 - 90 mM	4.59 ± 0.13	-	131.89 ± 5.64
K [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$]	35.64 ± 1.44	1514.16 ± 23.68	1509.11 ± 49.78

Porównanie otrzymanych stałych trwałości badanych cyklodekstryn wskazuje, że 4'-metoksyflawanon tworzy najmniej trwałe połączenie z α -cyklodekstryną. Dla β -cyklodekstryny wartości stałej trwałości wskazują na dużo lepsze dopasowanie cząsteczek i tworzenie trwalszego kompleksu. Zastosowanie hydroksypropylowej pochodnej β -cyklodekstryny pozwala na ponad 10 krotne zwiększenie rozpuszczalności 4'-metoksyflawanonu (FL1), względem otrzymanego dla natywnej makromolekuły, zachowując trwałość powstającego kompleksu.

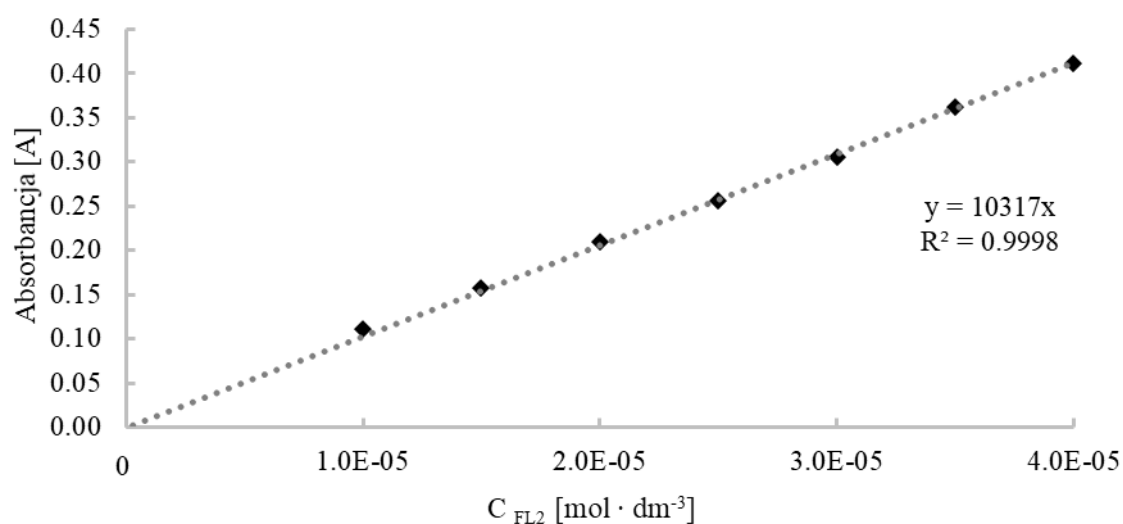
3.1.5. Badanie wzrostu rozpuszczalności 4'-chloroflawanonu (FL2) w wodzie

Kalibrację 4'-chloroflawanonu (FL2) przeprowadzono w zakresie stężeń od $1.0 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $4.0 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jako rozpuszczalnik stosując 20 % roztwór etanolu w wodzie (v/v) dla analitycznej długości fali 256 nm. Widmo UV 4'-chloroflawanonu w zakresie 240 – 360 nm przedstawione zostało na Rysunku 43.

Otrzymana zależność liniowa: $y = 10317x$ ($R^2 = 0.9998$) umożliwiła wyznaczenie współczynnika ekstynkcji badanego związku $\epsilon = 10317 \text{ mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ (Rysunek 44). Wyznaczona eksperymentalnie wartość rozpuszczalności 4'-chloroflawanonu w czystej wodzie wynosi 1.42 mg/dm^3 .

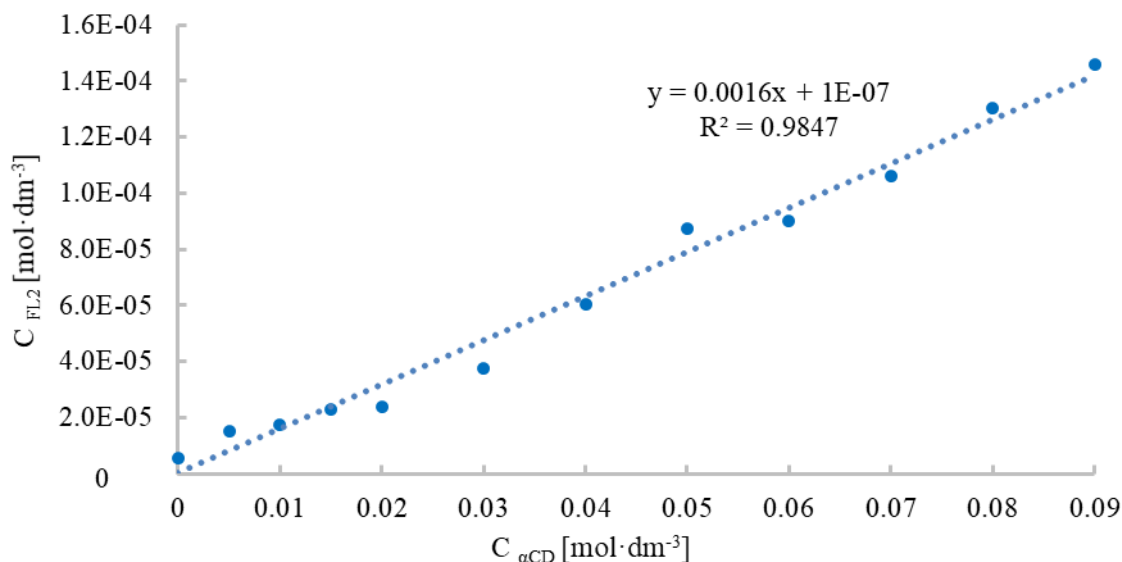


Rysunek 43. Widmo UV 4'-chloroflwanonu w zakresie stężeń $1.0 \cdot 10^{-5}$ - $4.0 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



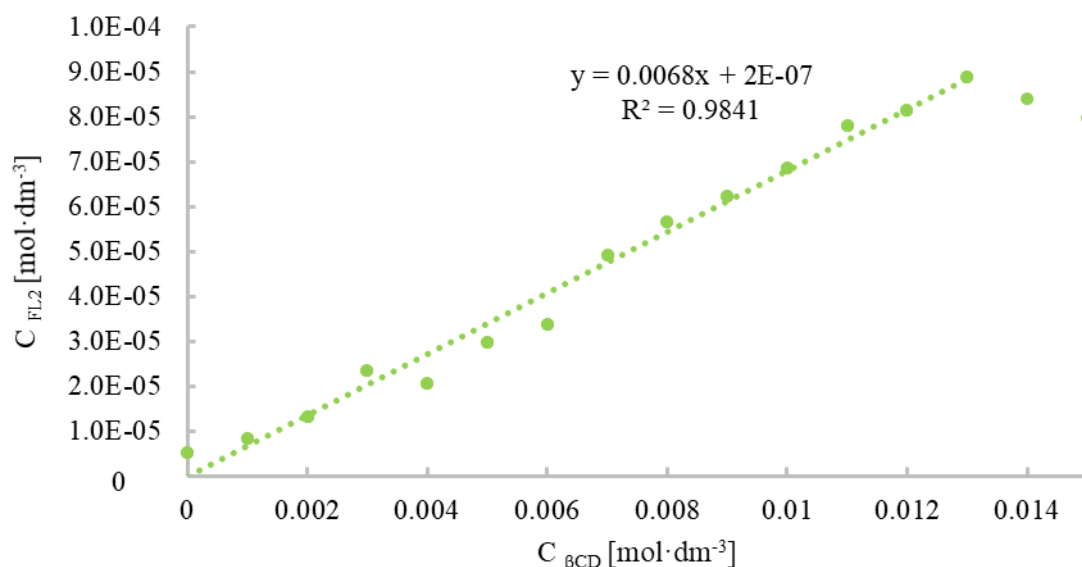
Rysunek 44. Krzywa kalibracyjna 4'-chloroflwanonu (FL 2). Zależność absorbancji roztworów 4'-chloroflwanonu od ich stężenia molowego.

Badania rozpuszczalności fazowej wykonane dla α -cyklodekstryny (zależność liniowa - typ krzywej A_L) wskazują na powstawanie kompleksu o stosunku stechiometrycznym 1:1, a maksymalny wzrost rozpuszczalności liganda w wodzie spowodowany obecnością makrocykla wynosi 27 (Rysunek 45).



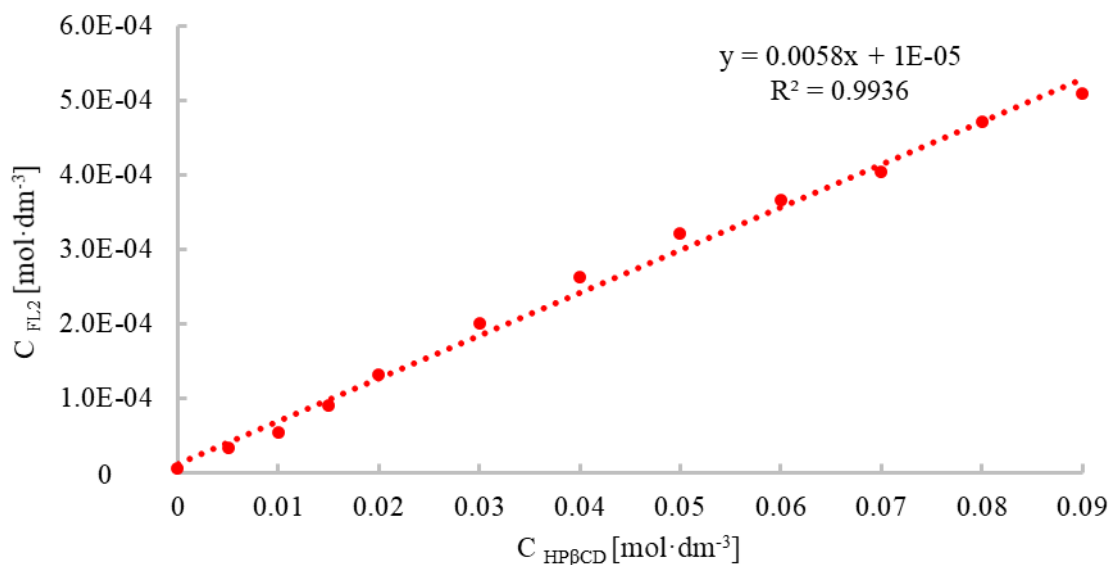
Rysunek 45. Zależność stężenia 4'-chloroflwanonu (FL2) od zawartości α -cyklodekstryny (α CD) w wodzie (seria 1).

W przypadku β -cyklodekstryny jako solubilizatora, podobnie jak dla wcześniej omawianych flawanonów, otrzymano zależność liniową z wyraźnym wypłaszczeniem, występującym przy stężeniu makrocykla wynoszącym 13mM (Rysunek 46). Zastosowanie β -cyklodekstryny pozwoliło uzyskać 17-krotny wzrost stężenia 4'-chloroflwanonu w wodzie.



Rysunek 46. Zależność stężenia 4'-chloroflwanonu (FL2) od zawartości β -cyklodekstryny (β CD) w wodzie (seria 1).

Hydroksypropylo- β -cyklodekstryna pozwala osiągnąć 140-krotny wzrost rozpuszczalności w wodzie 4'-chloroflwanonu, a otrzymana zależność przyjmuje przebieg typowy dla krzywych A_L w całym badanym zakresie stężenia cyklodekstryny. Zależność stężenia liganda w funkcji stężenia HP- β -cyklodekstryny przedstawiono na Rysunku 47.



Rysunek 47. Zależność stężenia 4'-chloroflawanonu (FL2) od zawartości HP- β -cyklodekstryny (HP β CD) w wodzie (seria 1).

Liniowe zależności wzrostu stężenia liganda otrzymane dla wszystkich cyklodekstryn pozwalają wnioskować o tworzeniu kompleksów o stechiometrii 1:1, wyznaczone wartości stałych tworzenia zamieszczone w Tabeli 13.

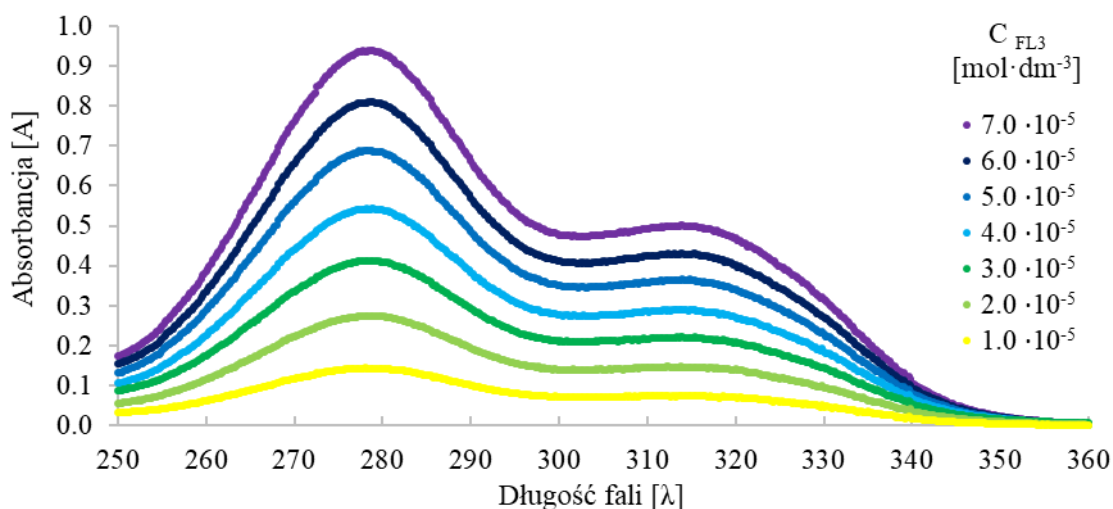
Tabela 13. Wyznaczone wartości wzrostu rozpuszczalności 4'-chloroflawanonu w wodzie w obecności wybranych cyklodekstryn w zakresie do 15 mM i do 90 mM oraz wartości stałych trwałości powstających kompleksów inkluzyjnych.

	αCD	βCD	HP βCD
Wzrost rozpuszczalności 0-15 mM	5.12 ± 1.03	17.06 ± 1.07	19.62 ± 1.03
Wzrost rozpuszczalności 0-90 mM	27.43 ± 1.14	-	109.07 ± 6.90
K [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$]	299.37 ± 18.51	1252.00 ± 158.85	1185.89 ± 93.06

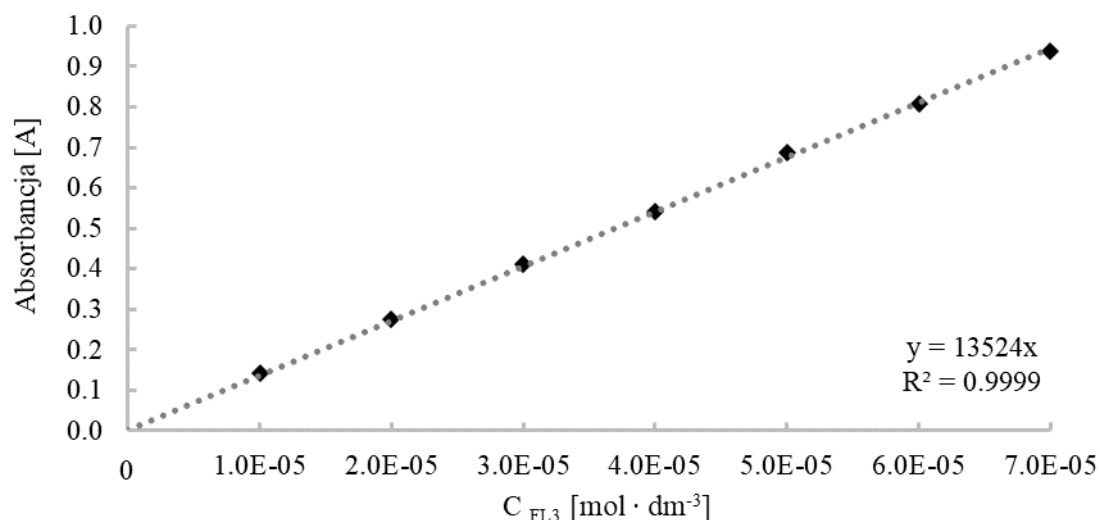
Wyliczona stała trwałości kompleksu inkluzyjnego α -cyklodekstryny z 4'-chloroflawanonem (FL2) ma wartość większą od kompleksów tworzonych z pozostałymi flawanonami, jednak trwałość tego kompleksu w dalszym ciągu jest dużo mniejsza od kompleksów β -cyklodekstryny i jej pochodnej (Tabela 13).

3.1.6. Badanie wzrostu rozpuszczalności 7-metoksyflawanonu (FL3) w wodzie

Kalibracja 7-metoksyflawanonu (FL3) wykonana została w roztworach wodno - etanolowych (20% v/v) w zakresie stężeń od $1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $7.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Widmo UV w zakresie 220 – 370 nm przedstawiono na Rysunku 48. Prosta kalibracyjna wykonana dla maksimum absorpcji 278 nm przyjmuje postać: $y = 13524x$ ($R^2 = 0.9999$) (Rysunek 49), co pozwoliło wyznaczyć współczynnik absorpcji $\epsilon = 13524 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Rozpuszczalność 7-metoksyflawanonu w wodzie wyznaczona została na 22.89 mg/dm^3 .

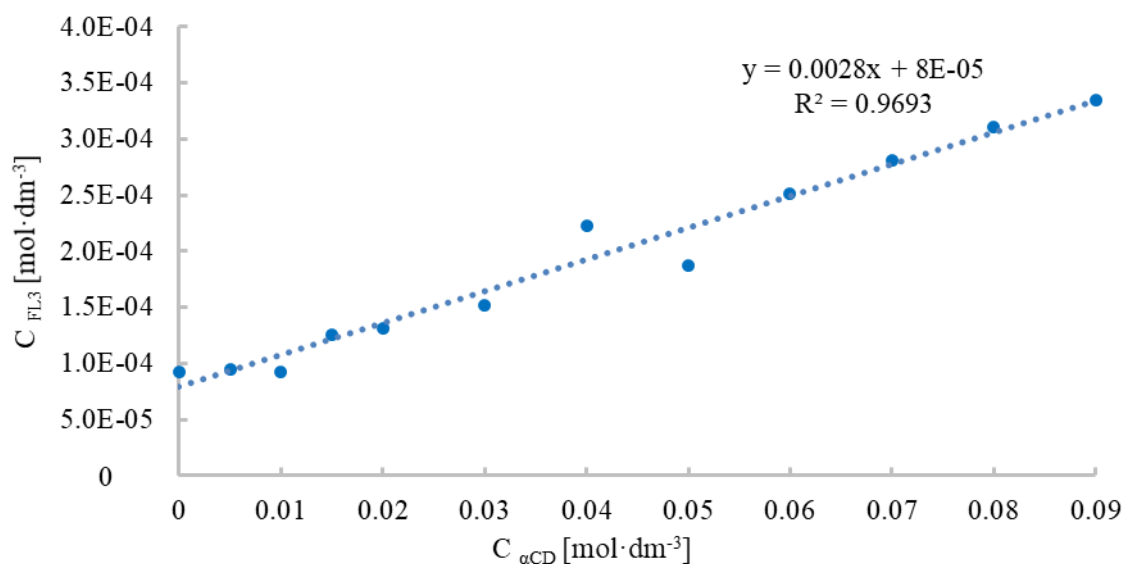


Rysunek 48. Widmo UV 7-metoksyflawanonu w zakresie stężeń $1.0 \cdot 10^{-5}$ - $7.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



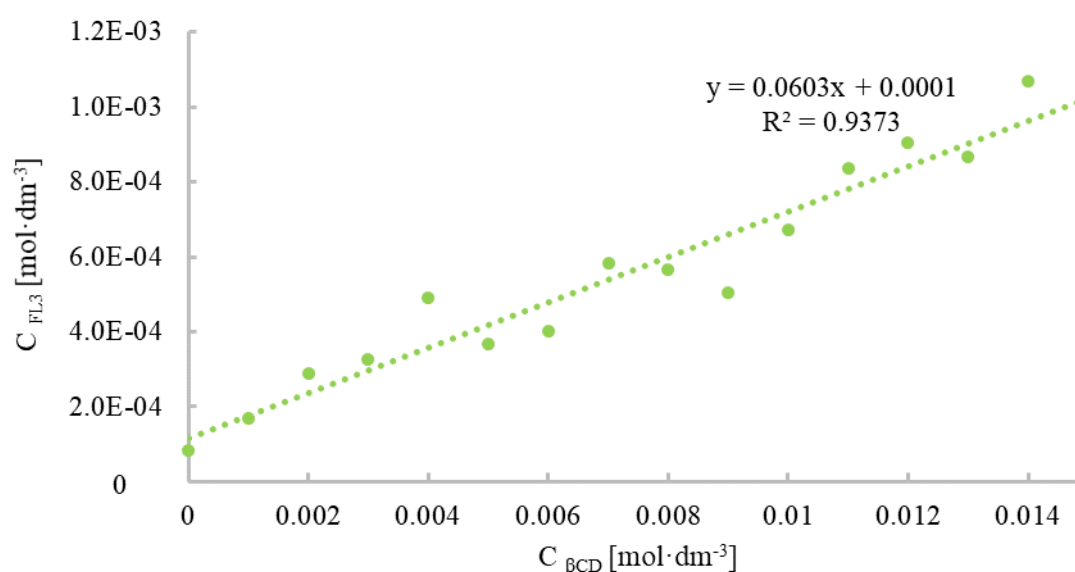
Rysunek 49. Krzywa kalibracyjna 7-metoksyflawanonu (FL 3). Zależność absorbancji roztworów 7-metoksyflawanonu od ich stężenia molowego.

Rejestrowane zmiany stężenia 7-metoksyflawanonu w obecności α -cyklodekstryny (Rysunek 50) wskazują na jego liniowy wzrost rozpuszczalności w wodzie (krzywa typu A_L). Zastosowanie cyklodekstryny umożliwiło osiągnięcie 4-krotnego zwiększenia stężenia w stosunku do czystej wody.

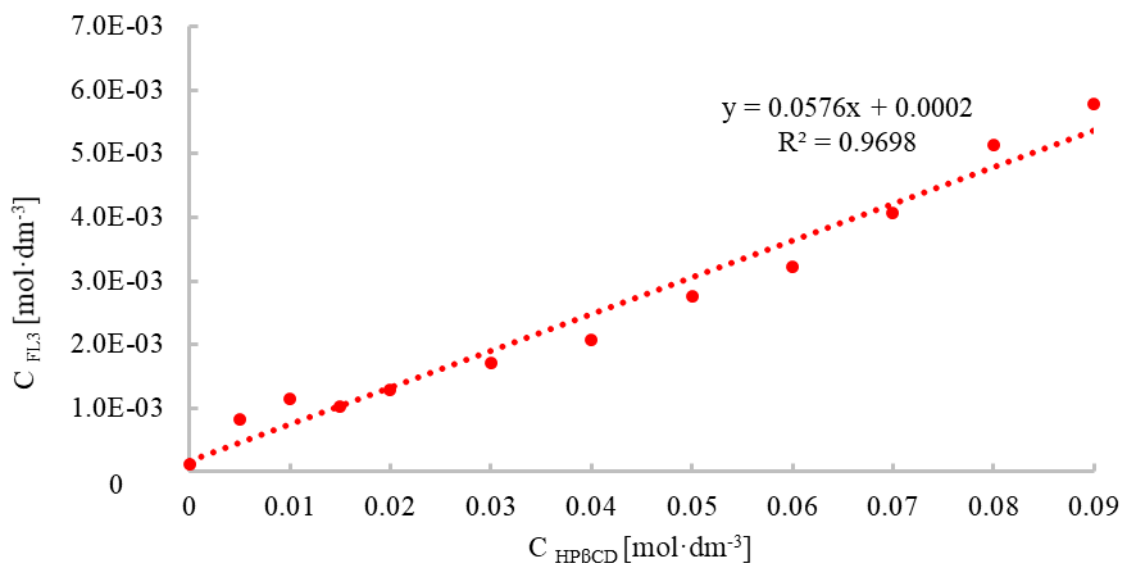


Rysunek 50. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od zawartości α -cyklodekstryny (α CD) w wodzie (seria 1).

Użycie β -cyklodekstryny pozwoliło osiągnąć ponad 12-krotny wzrost rozpuszczalności liganda, przy zachowaniu liniowości w całym zakresie stężenia makrocykla (Rysunek 51). Zastosowanie hydroksypropylo- β -cyklodekstryny umożliwiło zwiększenie rozpuszczalności liganda ponad 50-krotnie (Rysunek 52).



Rysunek 51. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od zawartości β -cyklodekstryny (β CD) w wodzie (seria 1).



Rysunek 52. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od zawartości HP- β -cyklodekstryny (HP β CD) w wodzie (seria 1).

Otrzymane wartości stałych tworzenia (Tabela 14) przyjmują większe wartości dla β -cyklodekstryny w porównaniu z α -cyklodekstryną, co świadczy o lepszym dopasowaniu przestrzennym większej cyklodekstryny do struktury 7-metoksyflawanonu. Otrzymane wartości stałych dla kompleksu FL3 są jednak mniejsze w porównaniu z otrzymanymi dla innych flawanonów.

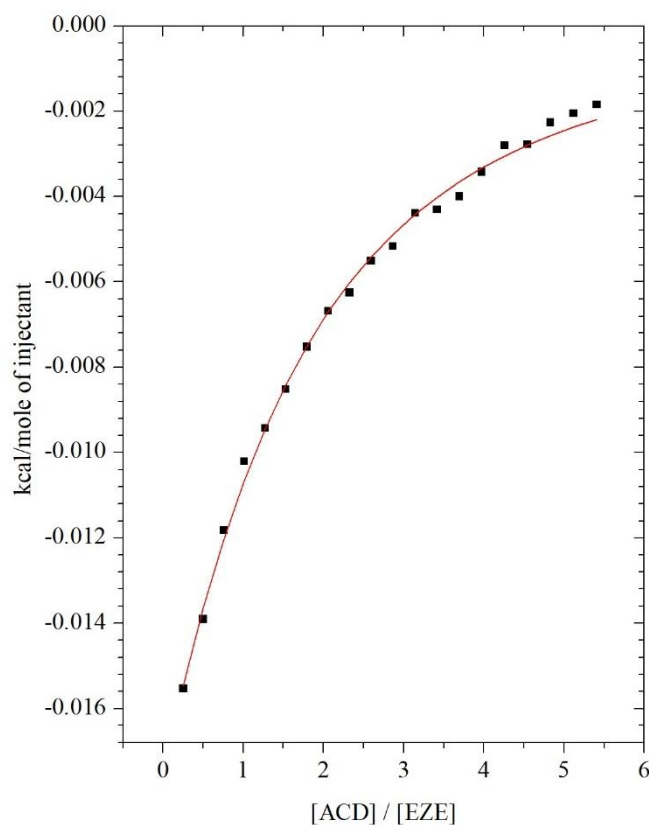
Tabela 14. Wyznaczone wartości wzrostu rozpuszczalności 7-metoksyflawanonu w wodzie w obecności wybranych cyklodekstryn w zakresie do 15 mM i do 90 mM oraz wartości stałych trwałości powstających kompleksów inkluzyjnych.

	α CD	β CD	HP β CD
Wzrost rozpuszczalności 0-15 mM	1.25 ± 0.09	12.55 ± 1.49	9.73 ± 0.75
Wzrost rozpuszczalności 0-90 mM	3.78 ± 0.37	-	53.03 ± 2.31
K [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$]	31.77 ± 1.59	782.88 ± 149.59	582.13 ± 44.11

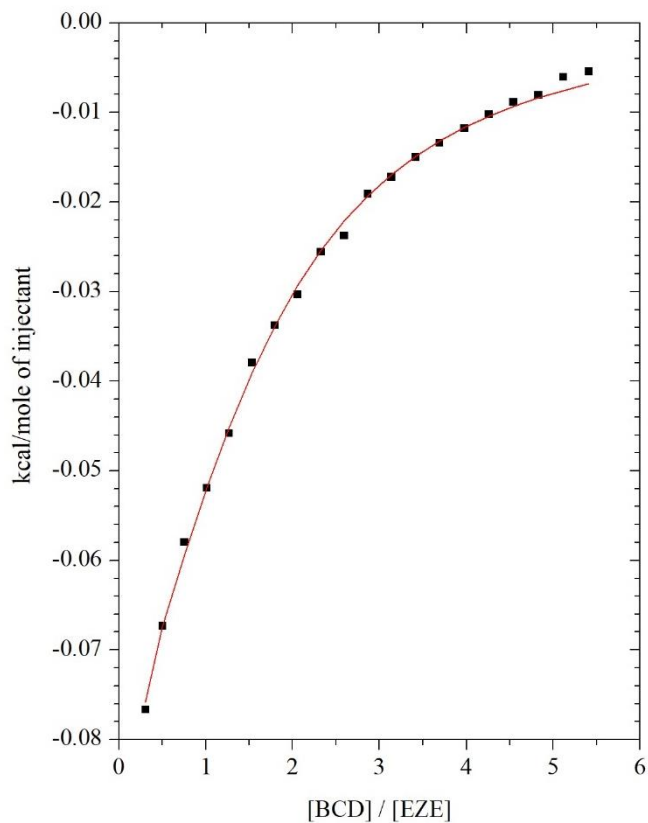
3.2. Kalorymetryczne badania oddziaływań wybranych ligandów z cyklodekstrynami

3.2.1. Oddziaływania ezetymibu (EZE) z cyklodekstrynami w DMSO

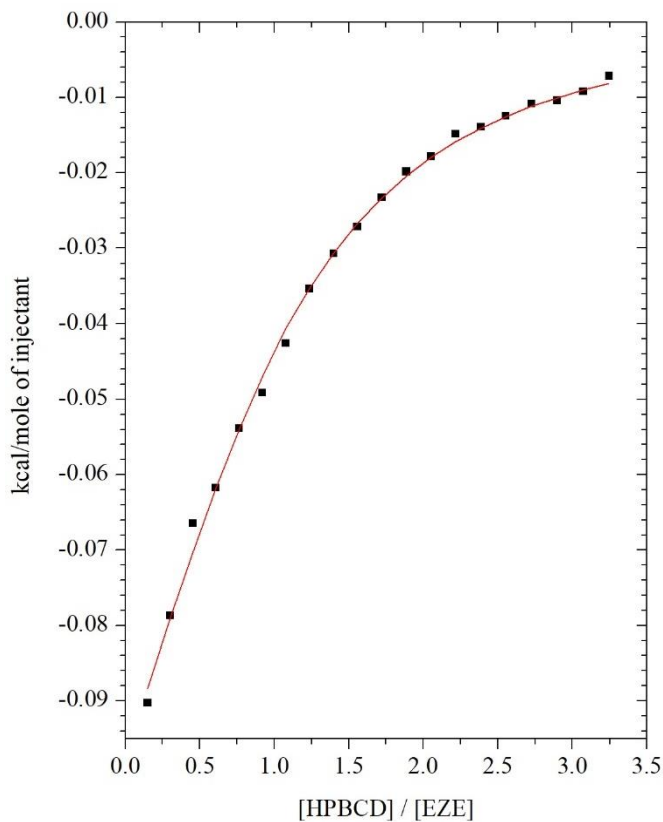
W celu wyznaczenia parametrów termodynamicznych, charakteryzujących powstawanie kompleksów inkluzyjnych ezetymibu z cyklodekstrynami, wykonano pomiary izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC). Badania, ze względu na bardzo ograniczoną rozpuszczalność ezetymibu w wodzie, wykonane zostały w dimetylosulfotlenku (DMSO) zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale (2.2.3.). Roztwór ezetymibu (EZE) o stężeniu 0.5 mM znajdował się w celi pomiarowej, do której wprowadzany był roztwór odpowiedniej cyklodekstryny: α CD o stężeniu 14.2 mM, β CD – 14.2 mM, HP β CD – 8.5 mM. Miareczkowanie składało się z 20 nstrzyków o objętości 12.5 μ l każdy. W celu wyznaczenia bezpośrednich efektów oddziaływania pomiędzy ezetymibem i cyklodekstrynami wykonano pomiary rozcieńczania ezetymibu czystym DMSO (znajdującym się w strzykawce) oraz miareczkowanie cyklodekstryn do czystego roztworu, znajdującego się w celi pomiarowej. Efekty związane z rozcieńczaniem badanych związków przedstawiono na Rysunkach ITC 1-3 (Załączniki). Krzywe zamieszczone na Rysunkach 53-55 ilustrują bezpośrednie efekty oddziaływania ezetymibu z cyklodekstrynami.



Rysunek 53. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania ezetymibu (EZE) z α -cyklodekstryną (α CD) w DMSO.



Rysunek 54. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania ezetymibu (EZE) z β -cyklodekstryną (β CD) w DMSO.



Rysunek 55. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania ezetymibu (EZE) z HP- β -cyklodekstryną (HP β CD) w DMSO.

Wyznaczone kalorymetrycznie wartości parametrów termodynamicznych, charakteryzujących oddziaływanie międzycząsteczkowe występujące pomiędzy ezetymibem a cyklodekstrynami, zamieszczono w Tabeli 15.

Tabela 15. Wartości parametrów termodynamicznych procesów kompleksowania ezetymibu z cyklodekstrynami.

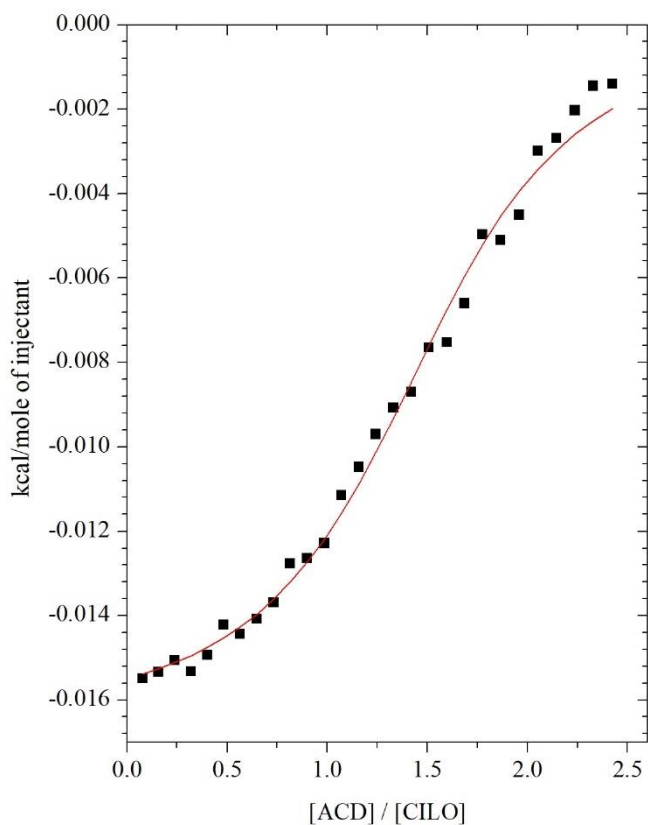
	α CD	β CD	HP β CD
n	0.85 \pm 0.22	1.08 \pm 0.06	0.82 \pm 0.25
K [dm ³ mol ⁻¹]	815 \pm 106	1710 \pm 122	2940 \pm 266
Δ H [J mol ⁻¹]	-267.83 \pm 80.39	-641.42 \pm 41.03	-710.92 \pm 53.17
Δ S [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	54.85	59.87	64.06
Δ G [kJ mol ⁻¹]	-16.24	-18.03	-19.35

Otrzymane wartości stałej tworzenia (K) kompleksów wskazują na powstanie trwalszych połączeń z β -cyklodekstryną i hydroksypropylo- β -cyklodekstryną niż z formą alfa. Uzyskane wartości zmian molowej entalpii oddziaływania receptora z ligandem przyjmują wartości ujemne (Δ H < 0), a zmiany entropii dodatnie (Δ S > 0). Obliczone wartości entalpii swobodnej (Δ G < 0) wskazują na samorzutność badanych procesów kompleksowania. Wyznaczony stosunek stechiometryczny (n) dla badanych układów potwierdza tworzenie się połączeń o stechiometrii 1:1 pomiędzy ligandem, a cyklodekstrynami.

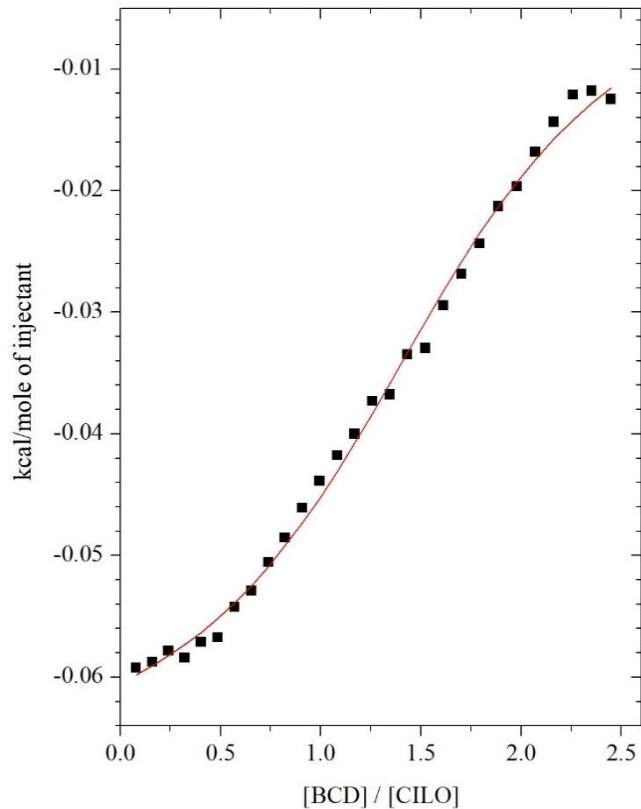
3.2.2. Oddziaływania cilostazolu (CILO) z cyklodekstrynami w DMSO

Pomiary izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego cilostazolu (CILO) roztworami cyklodekstryn prowadzone były również w dimetylosulfotlenku (DMSO), zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale (2.2.3.). Stężenia badanych roztworów wynosiły odpowiednio CILO (2.60mM): α CD (29.15 mM), CILO (1.10 mM): β CD (12.50 mM), CILO (1.10 mM): HP β CD (12.73 mM). Każde miareczkowanie składało się z 28 nastrzyków o objętości 10 μ l każdy.

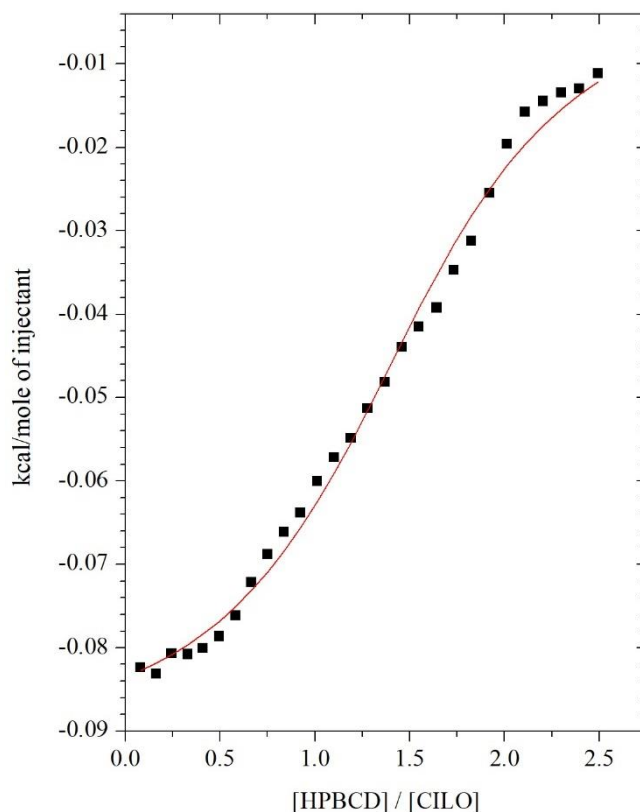
Efekty cieplne towarzyszące nastrzykom skorygowane zostały poprzez odjęcie efektów cieplnych rozcieńczenia leku i cyklodekstryn w czystym rozpuszczalniku (Rysunki ITC 4 – 6 Załączniki). Krzywe obrazujące bezpośrednie efekty oddziaływania cilostazolu z cyklodekstrynami przedstawione zostały na Rysunkach 56-58



Rysunek 56. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania cilostazolu (CILO) z α -cyklodekstryną (α CD) w DMSO.



Rysunek 57. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania cilostazolu (CILO) z β -cyklodekstryną (β CD) w DMSO.



Rysunek 58. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania cilostazolu (CILO) z HP- β -cyklodekstryną (HP β CD) w DMSO.

Dane eksperymentalne uzyskane z pomiarów miareczkowania kalometrycznego zostały wyznaczone za pomocą modelu jednego miejsca aktywnego. Wartości stałych trwałości oraz funkcji termodynamicznych przedstawione zostały w Tabeli 16.

Tabela 16. Wartości parametrów termodynamicznych procesów kompleksowania cilostazolu z cyklodekstrynami.

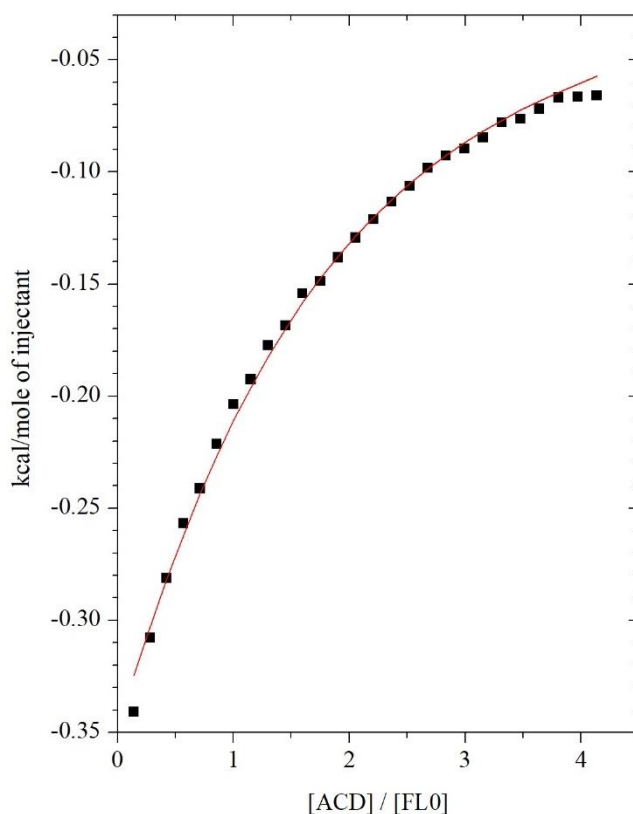
	α CD	β CD	HP β CD
n	1.54 ± 0.02	1.64 ± 0.02	1.57 ± 0.02
K [dm ³ mol ⁻¹]	3630 ± 389	4500 ± 361	9460 ± 958
ΔH [J mol ⁻¹]	-69.09 ± 1.17	-282.87 ± 4.52	-381.69 ± 7.12
ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	67.8	69.1	74.9
ΔG [kJ mol ⁻¹]	-20.28	-20.89	-22.71

Wartości stałych tworzenia wskazują na wzrost trwałości tworzonych kompleksów w kolejności $CILO - \alpha CD < CILO - \beta CD < CILO - HP\beta CD$. Stechiometria kompleksów wyznaczona tą metodą wynosi w przybliżeniu 1:1.5, oznacza to, że na jedną cząsteczkę cilostazolu przypada średnio 1.5 cząsteczki cyklodekstryny. Wszystkie badane reakcje są egzotermiczne ($\Delta H < 0$), a entropie molowe przyjmują wartości większe od zera ($\Delta S > 0$).

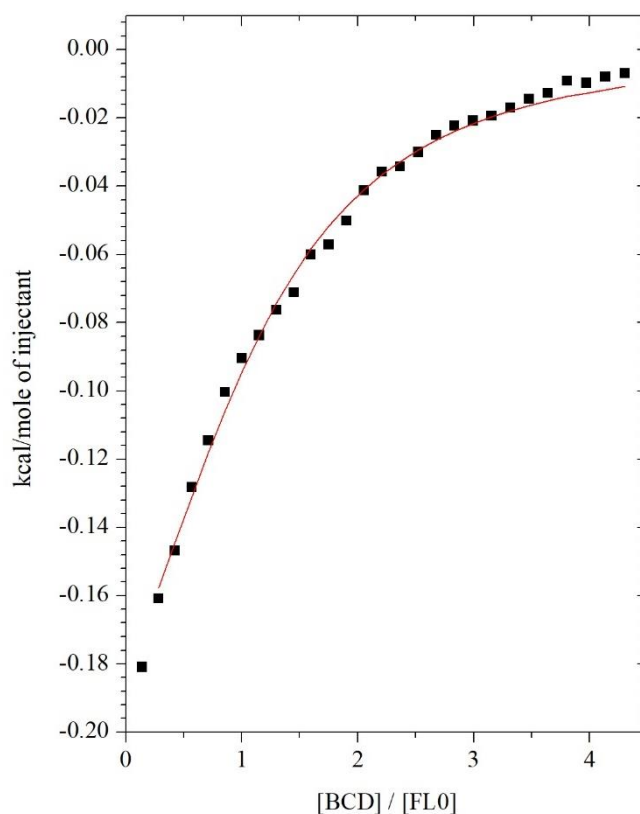
Molowe entalpie swobodne są ujemne ($\Delta G < 0$), a więc tworzenie kompleksów cilostrazolu z cyklodekstrynami ma charakter niewymuszony.

3.2.3. Oddziaływania flawanonu (FL0) z cyklodekstrynami w wodzie

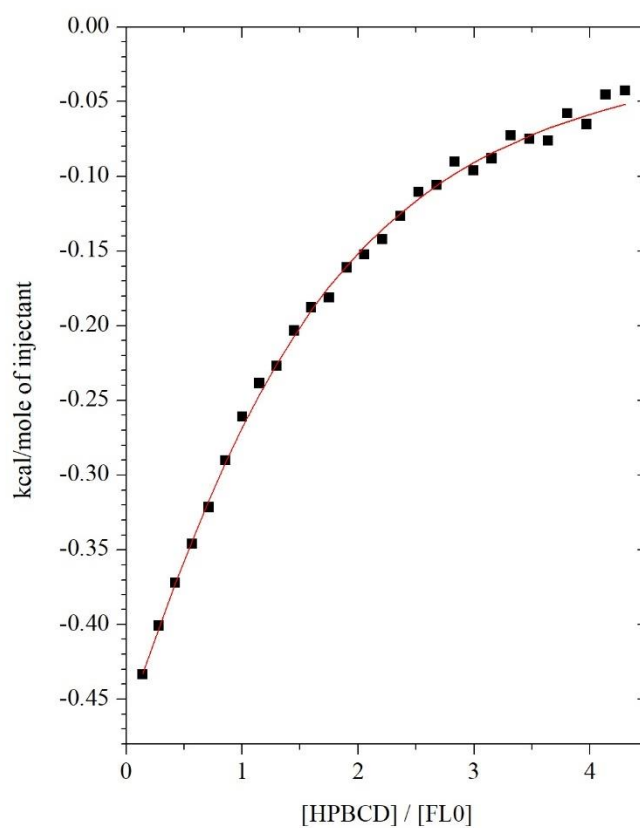
Miareczkowania flawanonu (FL0) przeprowadzono w roztworach wodnych, wykonując po 28 nstrzyków o objętości 10 μl . W celi pomiarowej umieszczony był 0.05 mM roztwór flawanonu (FL0), a w strzykawce znajdowały się roztwory cyklodekstryn (αCD , βCD i $\text{HP}\beta\text{CD}$) o stężeniach 1 mM. Pomiar przeprowadzone zostały zgodnie z procedurą pomiarową opisaną w podrozdziale (2.2.3.). Wykresy przedstawiające bezpośrednie efekty oddziaływania pomiędzy ligandem a makrocyklami przedstawione zostały na Rysunkach 59-61.



Rysunek 59. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania flawanonu (FL0) z α -cyklodekstryną (αCD) w wodzie.



Rysunek 60. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania flawanonu (FL0) z β -cyklodekstryną (β CD) w wodzie.



Rysunek 61. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania flawanonu (FL0) z HP- β -cyklodekstryną (HP β CD) w wodzie.

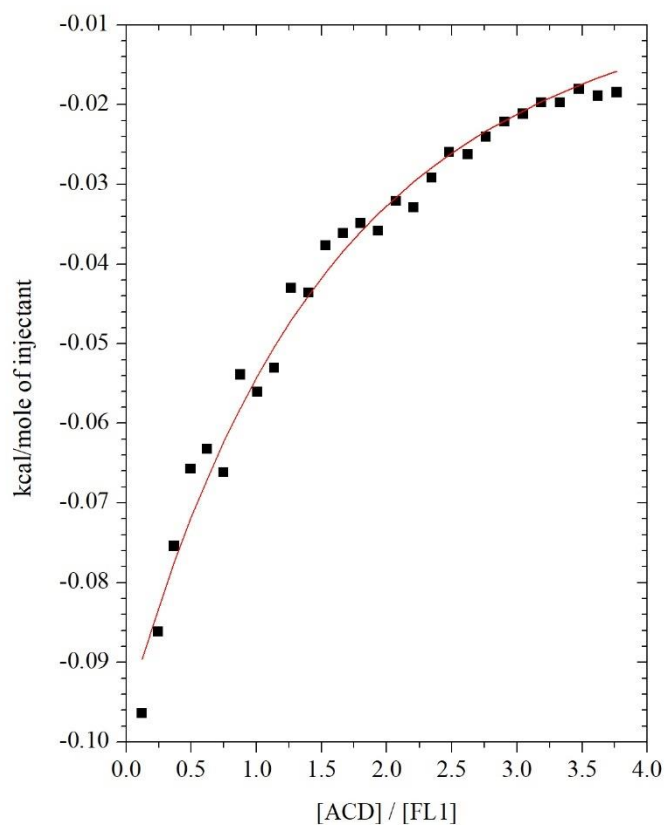
Tabela 17. Wartości parametrów termodynamicznych procesów kompleksowania flawanonu (FLO) z cyklodekstrynami.

	α CD	β CD	HP β CD
n	1.02 \pm 0.15	1.02 \pm 0.07	1.12 \pm 0.07
K [dm ³ mol ⁻¹]	9560 \pm 1120	30200 \pm 3150	15700 \pm 1160
Δ H [J mol ⁻¹]	-4295.86 \pm 798.04	-1226.37 \pm 101.41	-4011.98 \pm 302.01
Δ S [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	61.97	81.65	66.99
Δ G [kJ mol ⁻¹]	-22.77	-25.57	-23.99

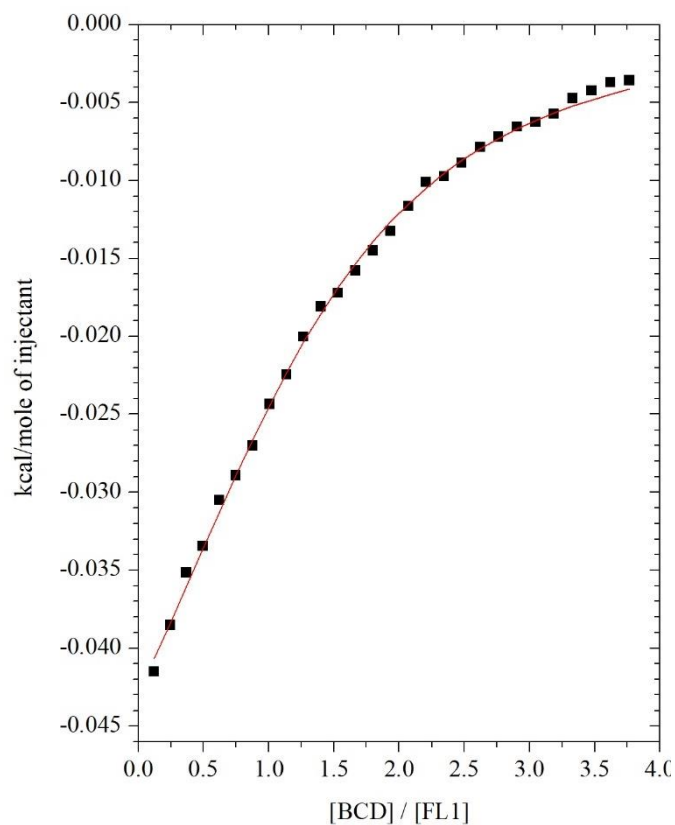
Otrzymane wartości (n) (Tabela 17) wskazują na powstawanie połączeń *flawanon - cyklodekstryna* w stosunku stechiometrycznym 1:1. Wszystkie analizowane procesy kompleksowania są egzotermiczne ($\Delta H < 0$) oraz mają charakter samorzutny ($\Delta G < 0$), wartości stałych tworzenia pozwalają wnioskować o silniejszym oddziaływaniu pomiędzy ligandem, a β -cyklodekstryną, niż α -cyklodekstryną. Stała reakcji procesu kompleksowania z hydroksypropylo- β -cyklodekstryną jest mniejsza w porównaniu z niepodstawioną molekułą.

3.2.4. Oddziaływania 4'-metoksyflawanonu z cyklodekstrynami w wodzie

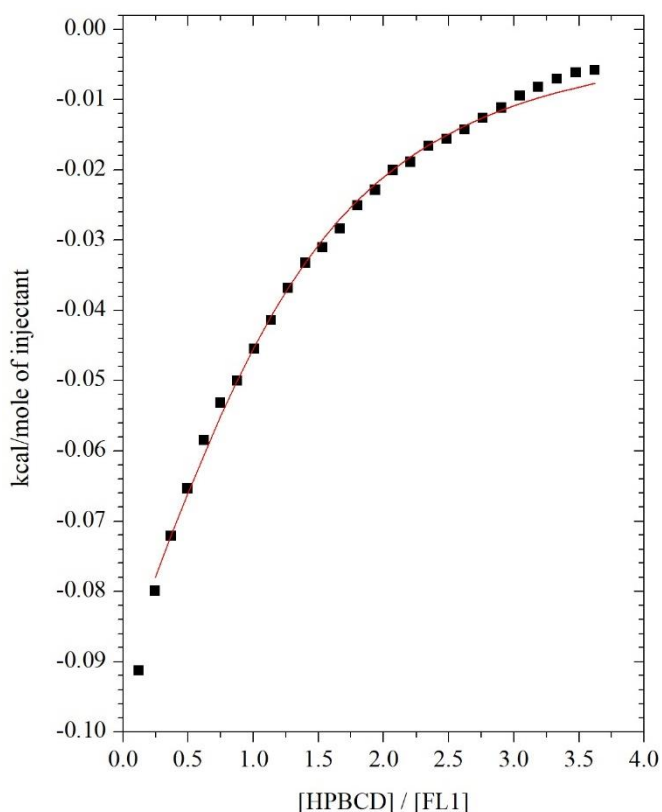
Badania izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego 4'-metoksyflawanonu roztworami cyklodekstryn (α CD, β CD i HP β CD) przeprowadzono w roztworach wodnych. Ligand o stężeniu 0.02 mM znajdujący się w celi pomiarowej miareczkowany był 28 nastrzykami 0.35 mM roztworów cyklodekstryn o objętości 10 μ l każdy. Na Rysunkach 62 – 64 przedstawione zostały izotermy miareczkowania, odpowiadające oddziaływaniom liganda z cyklodekstrynami po uwzględnieniu efektów związanych z rozcieńczeniem.



Rysunek 62. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 4'-metoksyflawanonu (FL1) z α -cyklodekstryną (α CD) w wodzie.



Rysunek 63. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 4'-metoksyflawanonu (FL1) z β -cyklodekstryną (β CD) w wodzie.



Rysunek 64. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 4'-metoksyflawanonu (FL1) z HP- β -cyklodekstryną (HP β CD) w wodzie.

Tabela 18. Wartości parametrów termodynamicznych procesów kompleksowania 4'-metoksyflawanonu (FL1) z cyklodekstrynami.

	α CD	β CD	HP β CD
n	0.76 ± 0.35	1.22 ± 0.03	0.99 ± 0.06
K [dm ³ mol ⁻¹]	23500 ± 6110	70000 ± 3970	68800 ± 5990
ΔH [J mol ⁻¹]	-1477.59 ± 802.23	-277.56 ± 9.67	-628.89 ± 45.09
ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	78.72	91.70	90.44
ΔG [kJ mol ⁻¹]	-24.95	-27.62	-27.59

Wszystkie badane procesy mają charakter egzotermiczny ($\Delta H < 0$) oraz samorzutny ($\Delta G < 0$). Wartości stałych tworzenia wskazują na tworzenie najsłabszych połączeń przez α -cyklodekstrynę, natomiast β -cyklodekstryna i HP- β -cyklodekstryna tworzą połączenia o większej trwałości, a wartości stałych są do siebie zbliżone. Współczynnik n wskazuje na tworzenie połączeń o stechiometrii 1:1.

3.2.5. Oddziaływania 4'-chloroflawanonu z cyklodekstrynami w DMSO

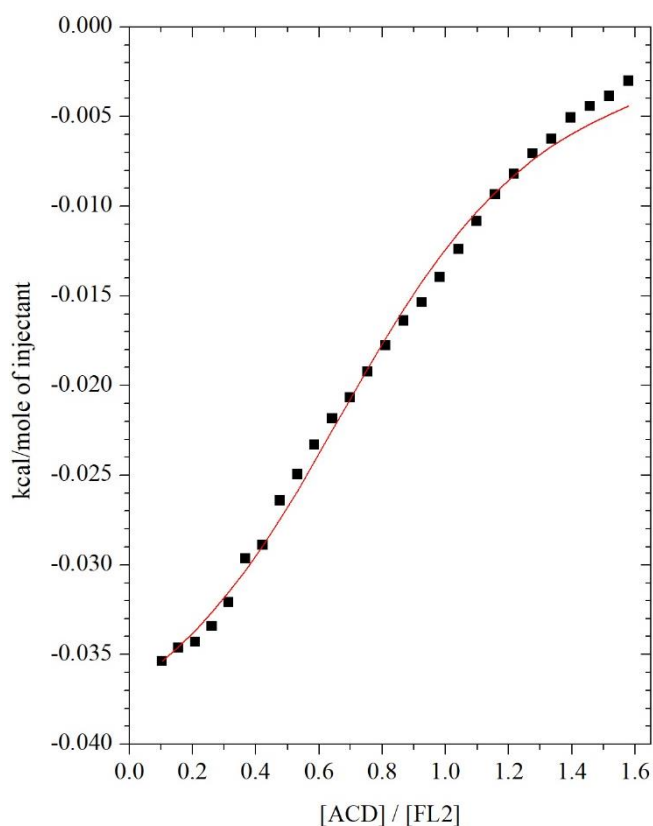
Ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność 4'-chloroflawanonu w wodzie miareczkowanie kalorymetryczne przeprowadzono w DMSO. Stężenie liganda znajdującego

się w celi pomiarowej wynosiło 5.23 mM, stężenia cyklodekstryn odpowiednio α CD – 38.36 mM, β CD – 37.70 mM, HP β CD – 37.85 mM. Na Rysunkach 65 – 67 przedstawiono efekty przeprowadzonych miareczkowań po uwzględnieniu pomiarów rozcieńczenia.

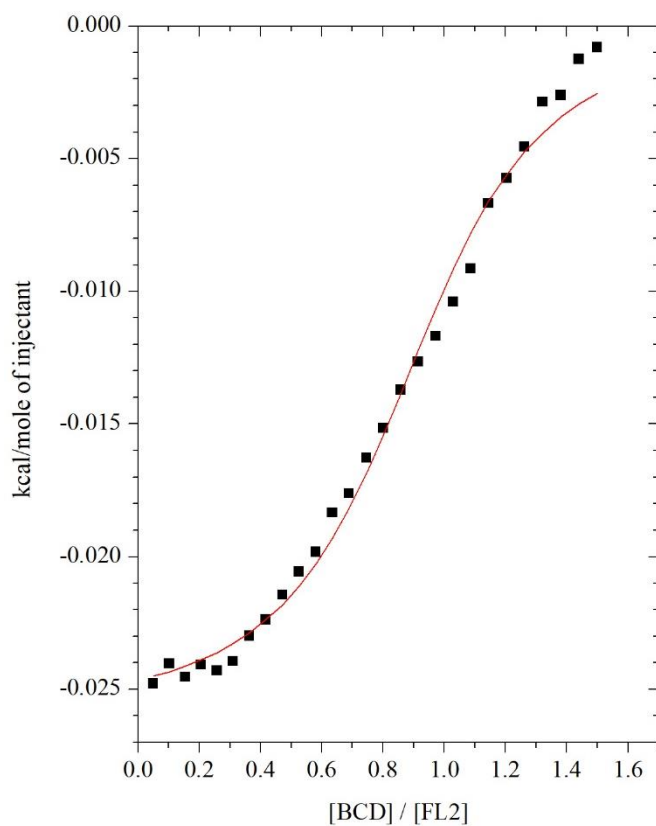
Wartości parametrów termodynamicznych otrzymane na podstawie modelu jednego miejsca aktywnego przedstawione zostały w Tabeli 19. Wyznaczone stosunki stechiometryczne wskazują na powstawanie kompleksów 1:1. Wartości molowych entalpii ($\Delta H < 0$) badanych reakcji świadczą o egzotermiczności procesów kompleksowania, a molowe entalpie swobodne ($\Delta G < 0$) o ich samorzutnym charakterze. Otrzymane stałe trwałości przyjmują najmniejsze wartości dla α CD, następnie HP β CD i β CD.

Tabela 19. Wartości parametrów termodynamicznych procesów kompleksowania 4'-chloroflawanonu (FL2) z cyklodekstrynami.

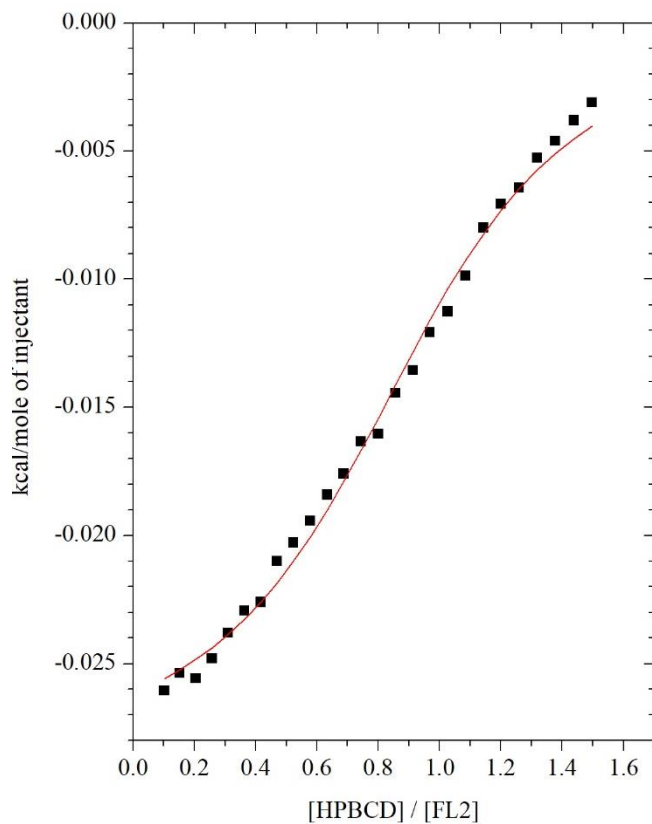
	α CD	β CD	HP β CD
n	0.83 ± 0.02	0.93 ± 0.01	0.95 ± 0.01
K [dm ³ mol ⁻¹]	1350 ± 129	3800 ± 490	1940 ± 186
ΔH [J mol ⁻¹]	-178.58 ± 4.73	-108.57 ± 2.05	-120.42 ± 2.30
ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	59.46	68.25	62.39
ΔG [kJ mol ⁻¹]	-17.91	-20.46	-18.78



Rysunek 65. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 4'-chloroflawanonu (FL 2) z α -cyklodekstryną (α CD) w DMSO.



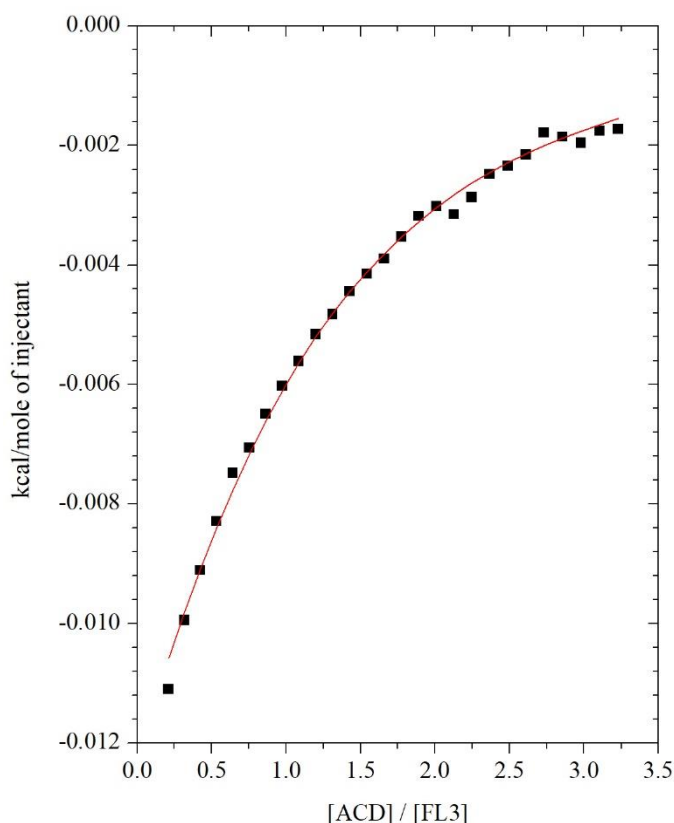
Rysunek 66. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 4'-chloroflawanonu (FL2) z β -cyklodekstryną (β CD) w DMSO.



Rysunek 67. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 4'-chloroflawanonu (FL2) z HP- β -cyklodekstryną (HP β CD) w DMSO.

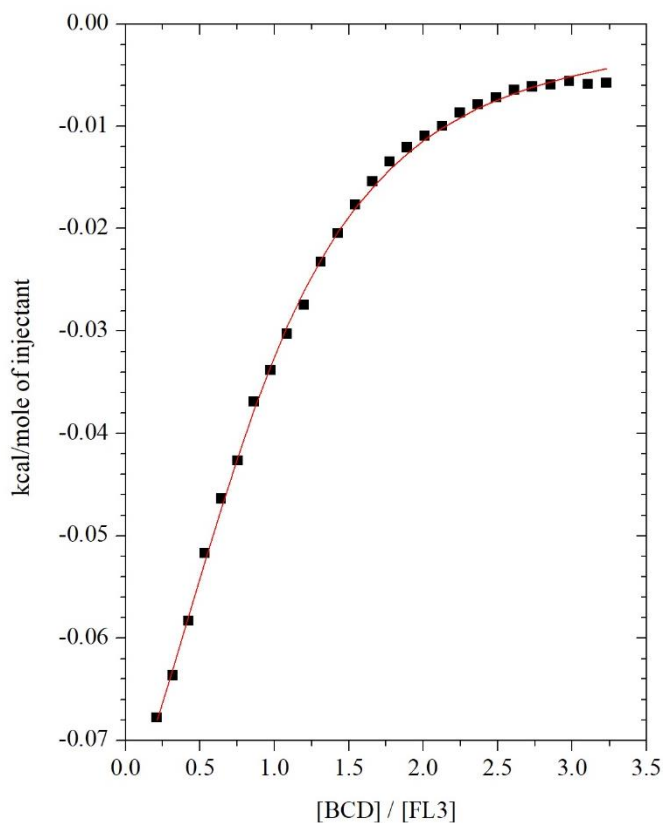
3.2.6. Oddziaływania 7-metoksyflawanonu z cyklodekstrynami w wodzie

Pomiary miareczkowania kalorymetrycznego dla 7-metoksyflawanonu przeprowadzono w środowisku wodnym. Stężenie liganda znajdującego się w celi pomiarowej wynosiło 0.08 mM, natomiast stężenia wszystkich cyklodekstryn (α CD, β CD i HP β CD), którymi napełniana była strzykawka wynosiły 1.20 mM. Wykresy obrazujące efekty termiczne przeprowadzonych miareczkowań przedstawiono na Rysunkach 68-70.

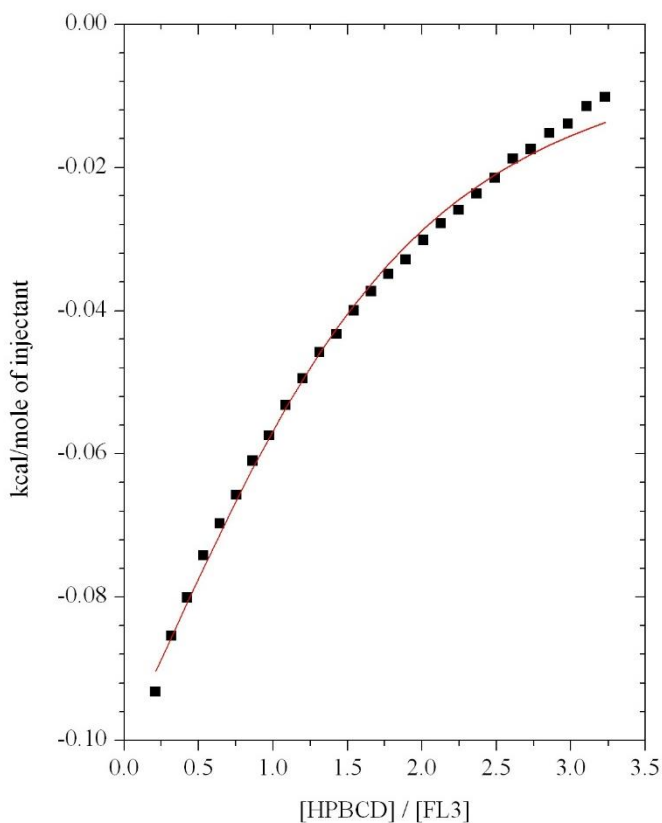


Rysunek 68. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 7-metoksyflawanonu (FL3) z α -cyklodekstryną (α CD) w wodzie.

Wartości parametrów termodynamicznych dla połączeń *7-metoksyflawanon - cyklodekstryna* wyznaczone na podstawie modelu jednego miejsca aktywnego przedstawiono w Tabeli 20. Podobnie jak we wcześniej analizowanych przypadkach, badane procesy mają charakter egzotermiczny oraz samorzutny. Wyznaczona stechiometria potwierdza powstawanie kompleksów, w których jedna cząsteczka liganda wiąże się z jedną cząsteczką makromolekuły. Wartości stałych tworzenia przyjmują najmniejsze wartości dla kompleksów tworzonych przez α -cyklodekstrynę. Podobnie jak w przypadku pozostałych flawanonów natywna β -cyklodekstryna tworzy połączenia o większych wartościach stałych trwałości w porównaniu do swojej modyfikowanej pochodnej.



Rysunek 69. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 7-metoksyflawanonu (FL3) z β -cyklodekstryną (β CD) w wodzie.



Rysunek 70. Efekt energetyczny bezpośredniego oddziaływania 7-metoksyflawanonu (FL3) z HP- β -cyklodekstryną (HP β CD) w wodzie.

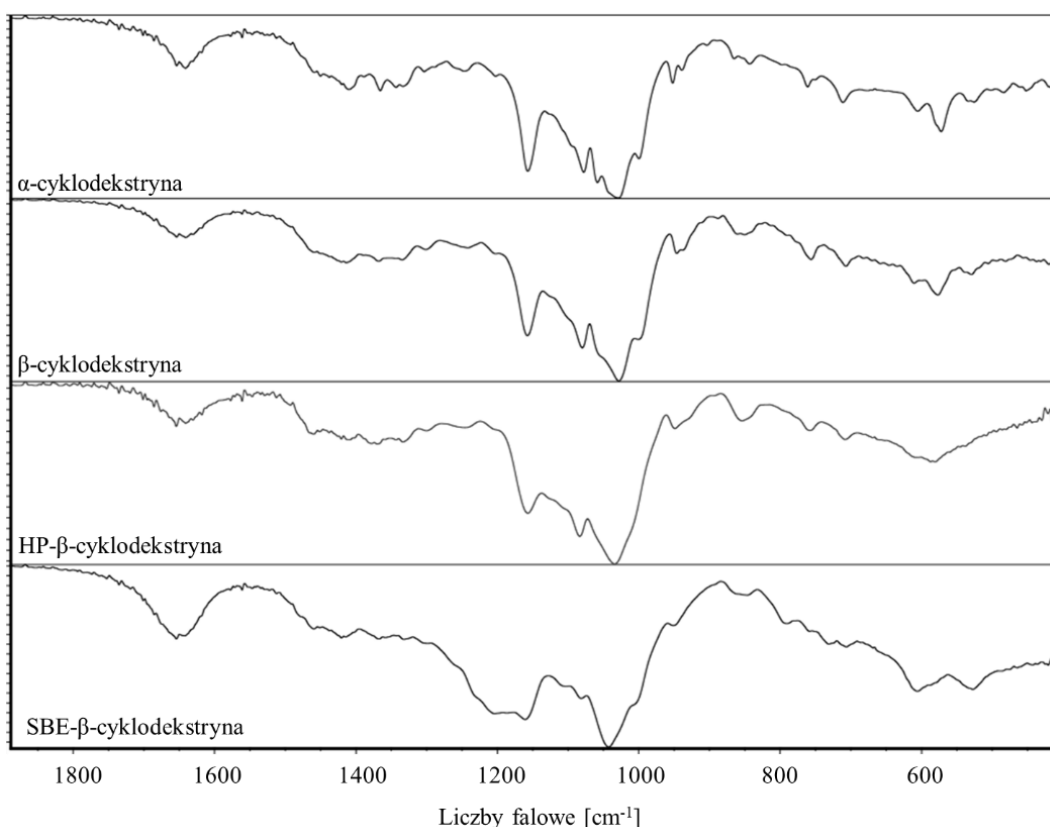
Tabela 20. Wartości parametrów termodynamicznych procesów kompleksowania 7-metoksyflawanonu (FL3) z cyklodekstrynami.

	α CD	β CD	HP β CD
n	0.82 ± 0.09	0.85 ± 0.02	1.22 ± 0.06
K [dm ³ mol ⁻¹]	11000 ± 1221	30100 ± 1520	15400 ± 1570
ΔH [J mol ⁻¹]	-116.98 ± 16.45	-467.27 ± 14.91	-678.71 ± 47.73
ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	77.04	84.16	77.88
ΔG [kJ mol ⁻¹]	-23.09	-25.56	-23.90

3.3. Analiza kompleksów inkluzyjnych ligandów z cyklodekstrynami w fazie stałej

3.3.1. Analiza powstałych kompleksów w podczerwieni

Pomiary spektroskopii w podczerwieni wykonano wykorzystując metodę opisaną w podrozdziale (2.2.5.). Na zarejestrowanych widmach czystych cyklodekstryn (Rysunek 71) obecne są charakterystyczne pasma: $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ (O-H), $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$ (C-H), $1630\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (H-O-H), $\sim 1160\text{ cm}^{-1}$ (C-O) i $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C), których wartości odpowiadają danym literaturowym [91].



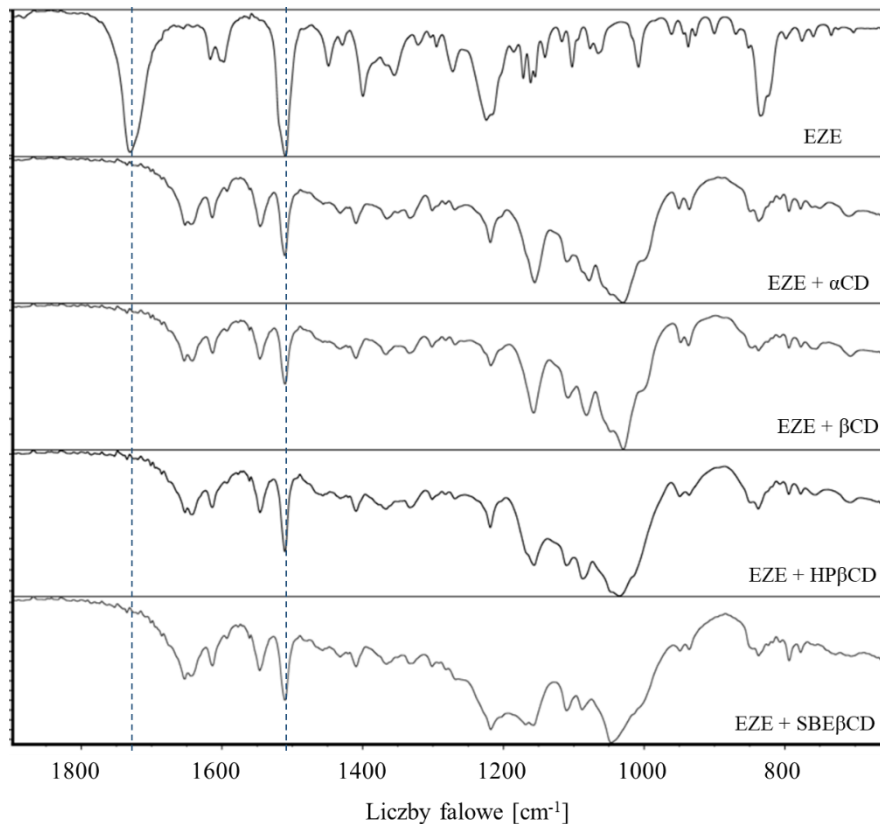
Rysunek 71. Widma FT-IR badanych cyklodekstryn w zakresie $1900\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

Ezetymib

Zarejestrowane widmo ezetymibu zgodne jest z literaturą [53,92], z charakterystycznymi pasmami przy: 3437.5 cm^{-1} , 3275.2 cm^{-1} (O-H), 2928 cm^{-1} (C-H); 1730.6 cm^{-1} (C = O), 1509.7 cm^{-1} (C = C arom.), 1399.5 cm^{-1} (C-N), 1224.0 cm^{-1} (C-F), 834.5 cm^{-1} (pierścień benzenowy podstawiony w pozycji para).

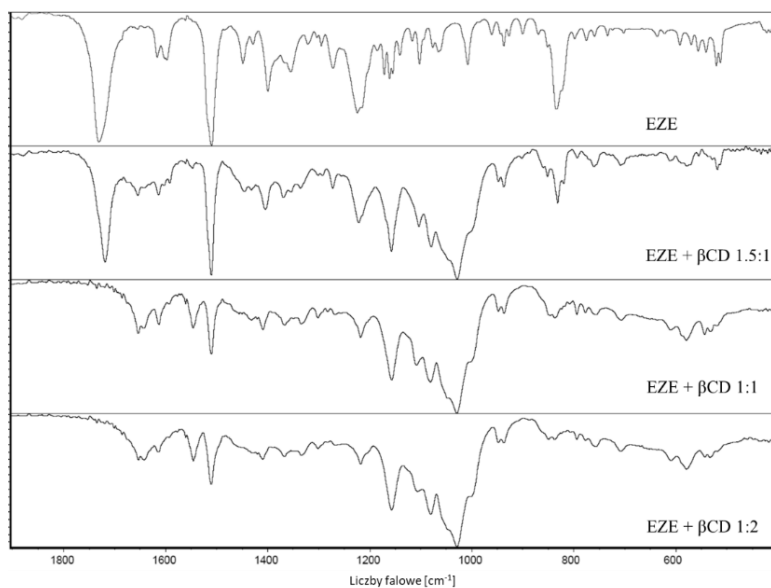
Widma FT-IR kompleksów ezetymibu z cyklodekstrynami są praktycznie całkowicie ekranowane przez szerokie i intensywne pasma pochodzące od makrocykli (Rysunek 72). Analiza spektrum pozwala jednak zaobserwować charakterystyczne pasma dla ezetymibu, pasma przy długości 1224.0 cm^{-1} (C-F) oraz 1509.7 cm^{-1} (C = C arom) są widoczne, podczas

gdy to, przy 1730.6 cm^{-1} (C=O) ulega całkowitemu zanikowi. Dobrze widoczne pasmo 1509 cm^{-1} (C = C arom.) wskazywać może, że przynajmniej jeden z pierścieni aromatycznych pozostaje odsłonięty.



Rysunek 72. Widma FT-IR ezetymibu (EZE) oraz jego kompleksów z wybranymi cyklodekstrynami.

Zanik pasma (C=O) cząsteczki ezetymibu sugeruje całkowite inkludowanie tego fragmentu liganda we wnętrzu cyklodekstryny. W celu potwierdzenia tej obserwacji przeprowadzono dodatkowe pomiary dla kompleksów β -cyklodekstryny w innych stosunkach stechiometrycznych: 1.5:1 (nadmiar ezetymibu) oraz 1:2 (nadmiar cyklodekstryny) (Rysunek 73). Na widmie kompleksu 1.5:1 wspomniane pasmo jest obecne, natomiast widmo kompleksu 1:2 nie różni się praktycznie od 1:1. Zjawisko to jednoznacznie potwierdza tworzenie się kompleksów *ezetymib - cyklodekstryna* w stosunku 1:1.

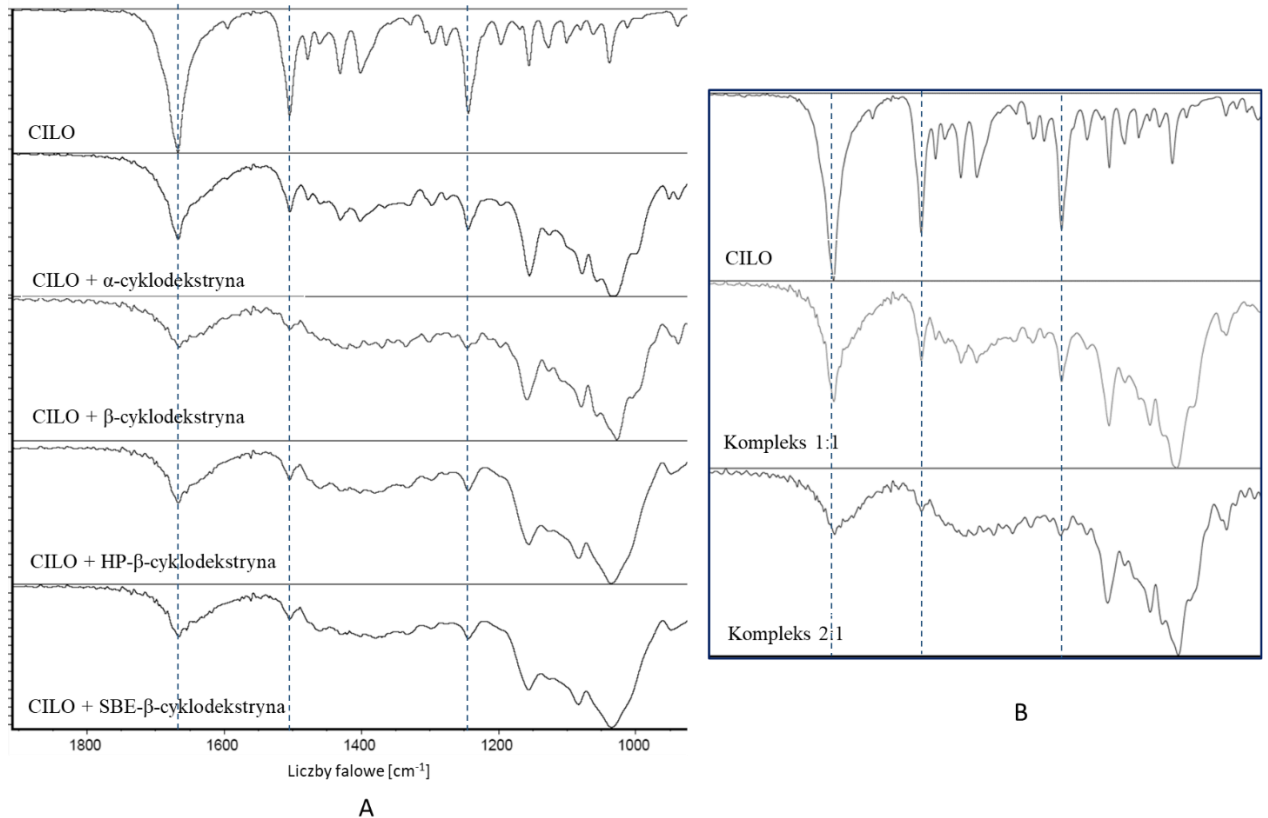


Rysunek 73. Widma FT-IR kompleksów ezetymibu z β -cyklodekstryną w różnych stosunkach molowych.

Cilostazol

Widmo cilostazolu charakteryzuje się pasmami przy długościach : 3300 cm^{-1} (N-H), 2934.4 cm^{-1} (C-H), 1667.4 cm^{-1} (C=O), 1595.0 cm^{-1} (C=C arom), 1504.6 cm^{-1} (N-H), 1243 cm^{-1} (C-O). Wartości te odpowiadają danym literaturowym [93].

Widma dla kompleksów cilostazolu o stosunku stechiometrycznym 1:2 przedstawione zostały na rysunku 74A. Podobnie jak w przypadku ezetymibu, pasma pochodzące od cząsteczki cilostazolu są ekranowane przez cyklodekstrynę. Niektóre z pasm pozostają jednak widoczne, są one wyraźnie zmniejszone, co spowodowane jest tworzeniem kompleksów inkluzyjnych *cilostazol-cyklodekstryny*. Porównując widma dla kolejnych cyklodekstryn zauważyć można, że pasma pochodzące od cilostazolu są wyraźniej widoczne na widmie kompleksu z α -cyklodekstryną, co pozwala wnioskować o tworzeniu się słabszych oddziaływań między cilostazolem i α -cyklodekstryną niż pozostałymi cyklodekstrynami. Na Rysunku 74B przedstawiono zestawienie widm kompleksów β -cyklodekstryny i cilostazolu w stosunku 1:2, z wykonanym dodatkowo dla kompleksu 1:1. Można zauważyć, że na widmie kompleksu w stosunku 1:1 pasma cilostazolu widoczne są wyraźniej i są w mniejszym stopniu ekranowane. Potwierdza to powstawanie kompleksów o stechiometrii z przewagą cyklodekstryny.



Rysunek 74. (A) Widma FT-IR ciprofloksazolu (CILO) oraz jego kompleksów z cyklodekstrynami o stechiometrii 1:2; (B) Widma FT-IR kompleksów ciprofloksazolu z β -cyklodekstryną w stosunku stechiometrycznym 1:2 i 1:1.

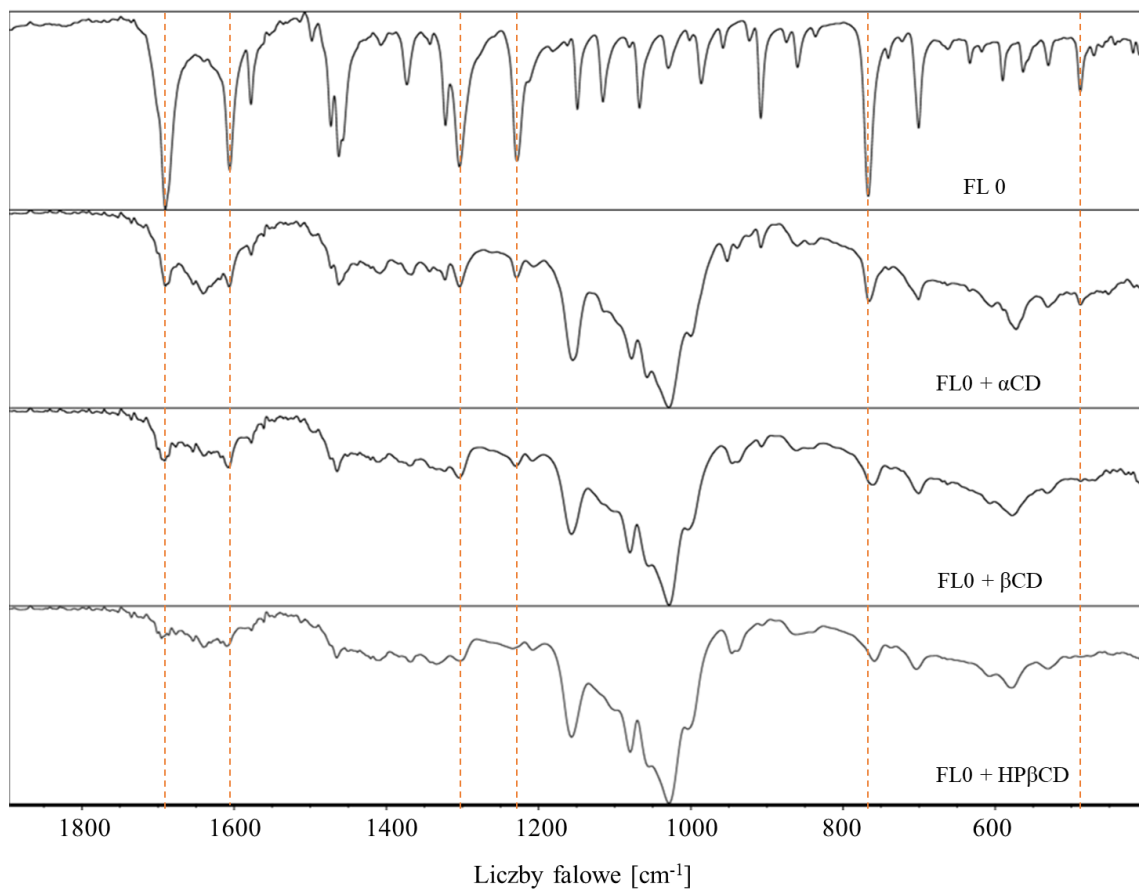
Flawanony

Widma czystych flawanonów charakteryzują typowe dla nich pasma, odpowiadające istniejącym danym literaturowym. Wartości otrzymane dla poszczególnych flawanonów przedstawione zostały poniżej:

flawanon	- 1690.2 cm^{-1} ; 1605.8 cm^{-1} ; 1462.4 cm^{-1} ; 1303.7 cm^{-1} ; 766.7 cm^{-1} ; 487.8 cm^{-1} [94]
4'-metoksyflawanon	- 1681.3 cm^{-1} ; 1602.0 cm^{-1} ; 1516.9 cm^{-1} ; 1462.1 cm^{-1} ; 1306.7 cm^{-1} ; 1258.3 cm^{-1} ; 905.6 cm^{-1} [95]
4'-chloroflawanon	- 1693.9 cm^{-1} ; 1599.2 cm^{-1} ; 1461.9 cm^{-1} ; 1300.2 cm^{-1} ; 1121.1 cm^{-1} ; 905.9 cm^{-1} ; 847.5 cm^{-1} ; 773.1 cm^{-1} [62]
7-metoksyflawanon	- 1671.1 cm^{-1} ; 1611.7 cm^{-1} ; 1574.4 cm^{-1} ; 1258.8 cm^{-1} [96]

Na widmach kompleksów (Rysunek 75 i Załączniki IR 1-3) zaobserwować można zmniejszanie się pasm charakterystycznych dla flawanonów. Sugeruje to inkludowanie się cząsteczek badanych flawanonów w hydrofobowym wnętrzu makrocykla. Charakterystyczne dla flawanonów pasma są bardziej widoczne w kompleksach z α -cyklodekstryną w porównaniu do kompleksów tworzonych przez β - i HP- β -cyklodekstrynę. Może to świadczyć, że mniej

cząsteczek liganda trwale łączy się z α -cyklodekstryną, w porównaniu do jej większych pochodnych, a w konsekwencji potwierdzać tworzenie się bardziej trwałych kompleksów z wykorzystaniem formy β gdzie większa ilość cząsteczek flawanonu została zainkludowana wewnątrz makrocykla.



Rysunek 75. Widma FT-IR flawanonu (FLO) oraz jego kompleksów z cyklodekstrynami o stechiometrii 1:1.

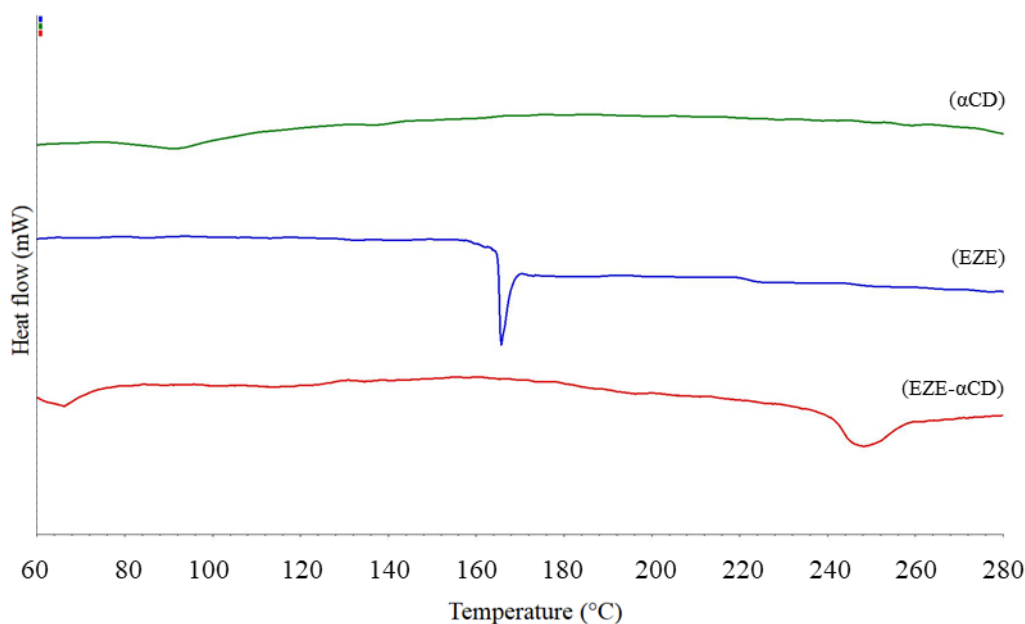
3.3.2. Badania trwałości termicznej kompleksów metodą DSC

Badania techniką różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale (2.2.6.). W pierwszym etapie wykonano pomiary dla cyklodekstryn w zakresie temperatur 40 - 280°C. Ich termogramy zostały przedstawione na Rysunkach 76-79. W analizowanym zakresie widoczne są jedynie niewielkie endotermiczne efekty w okolicach 100 °C, które spowodowane są odparowaniem wody krystalicznej, występującej w strukturze cyklodekstryn. W przypadku modyfikowanych cyklodekstryn (SBE β CD i HP β CD) w temperaturze powyżej 260°C widoczne są efekty rozkładu związków, które występują w temperaturach niższych niż w przypadku naturalnych cyklodekstryn (>280°C).

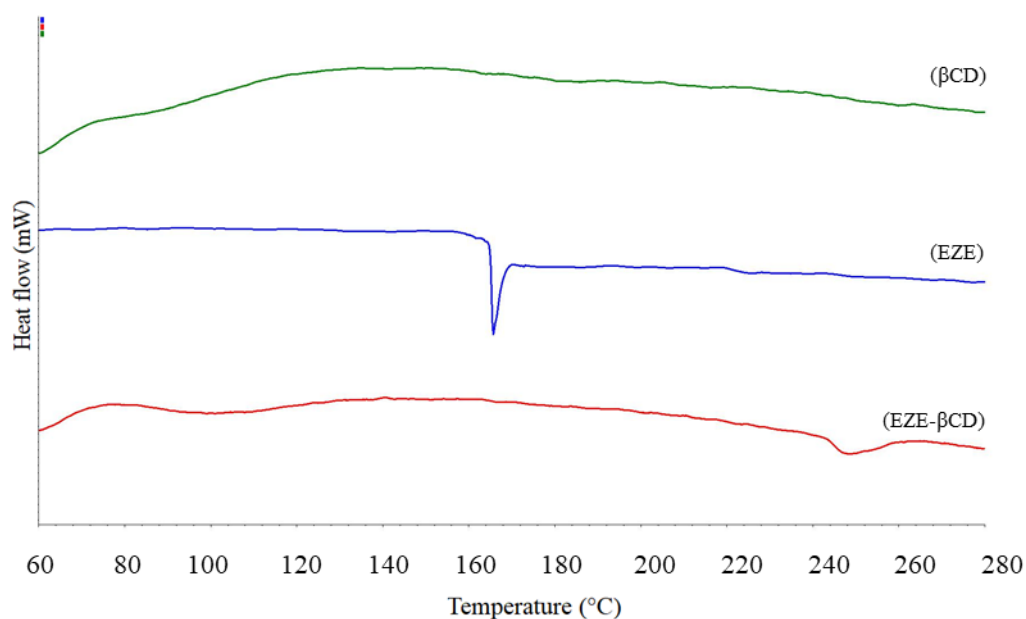
Kolejnym etapem badań były pomiary czystych związków oraz kompleksów przygotowanych metodą współrozpuszczania opisaną w podrozdziale 2.2.4. Kompleksy do pomiarów DSC odważono w taki sposób, by zawartość badanego związku w kompleksie odpowiadała ilościowo naważce czystego liganda.

Analiza termiczna ezetymibu (EZE) oraz jego kompleksów

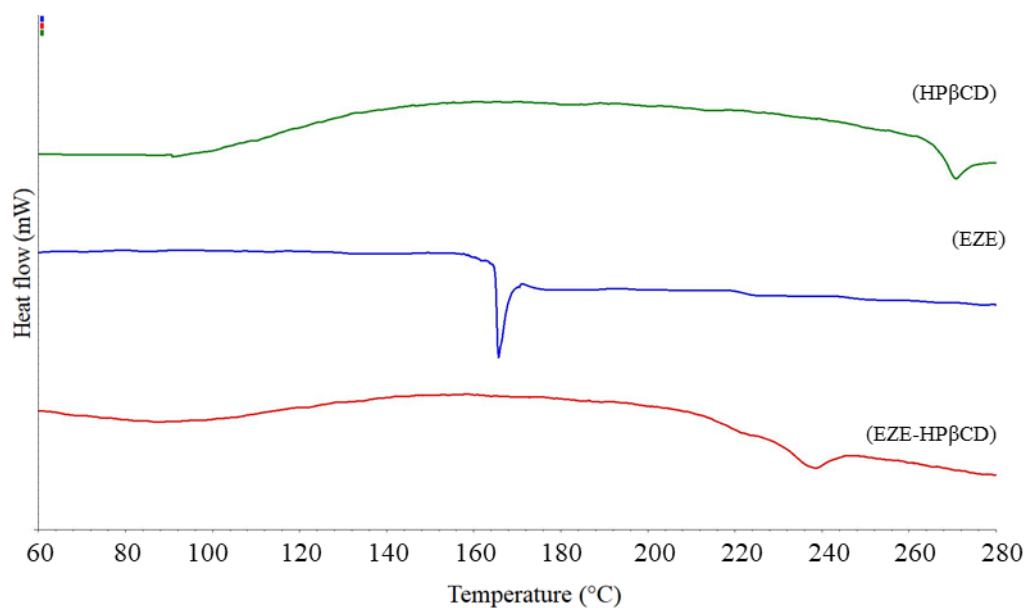
Termogramy ezetymibu i jego kompleksów w stosunku stechiometrycznym 1:1 przedstawione zostały na Rysunkach 76-79. Otrzymany termogram leku (EZE) charakteryzuje się ostrym, endotermicznym pikiem w temperaturze 165 °C (lit 162°C [53]) odpowiadającym topnieniu ezetymibu.



Rysunek 76. Termogramy α -cyklodekstryny (α CD), ezetymibu (EZE) oraz kompleksu ezetymib – α -cyklodekstryna (EZE – α CD).

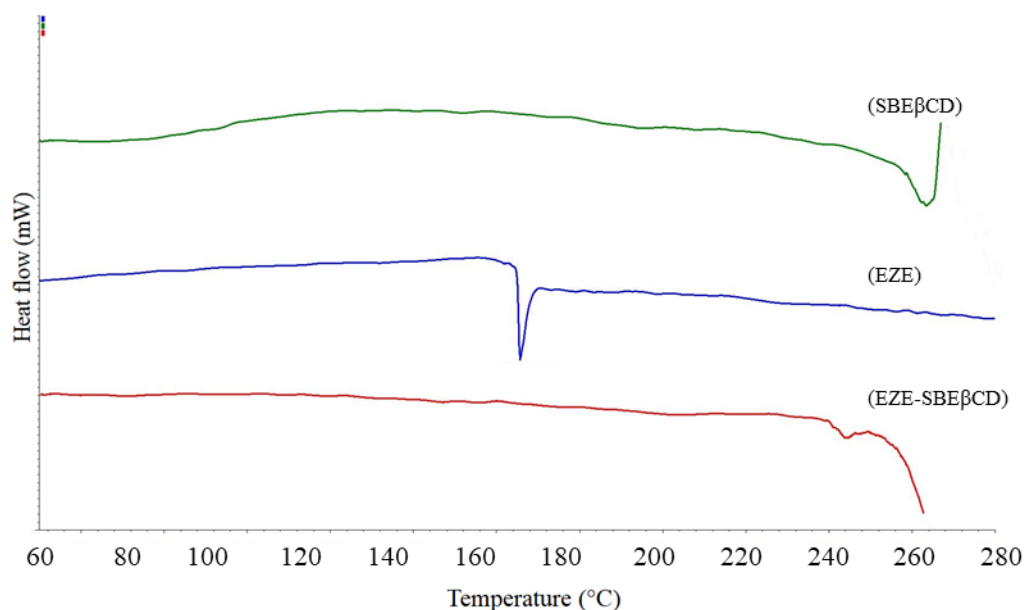


Rysunek 77. Termogramy β-cyklodekstryny (βCD), ezetymibu (EZE) oraz kompleksu ezetymib – β-cyklodekstryna (EZE – βCD).



Rysunek 78. Termogramy HP-β-cyklodekstryny (HPβCD), ezetymibu (EZE) oraz kompleksu ezetymib – HP-β-cyklodekstryna (EZE – HPβCD).

Na termogramach kompleksów przedstawionych na Rysunkach 76-79 zaobserwować można występowanie endotermicznych pików w zakresie temperatur 230 – 250 °C, które związane są z topnieniem. Otrzymane wartości odbiegają o ok. 100 stopni od wartości literaturowej dla czystego ezetymibu. Dodatkowo piki są rozciągnięte, a ich intensywność wyraźnie zmniejszona.

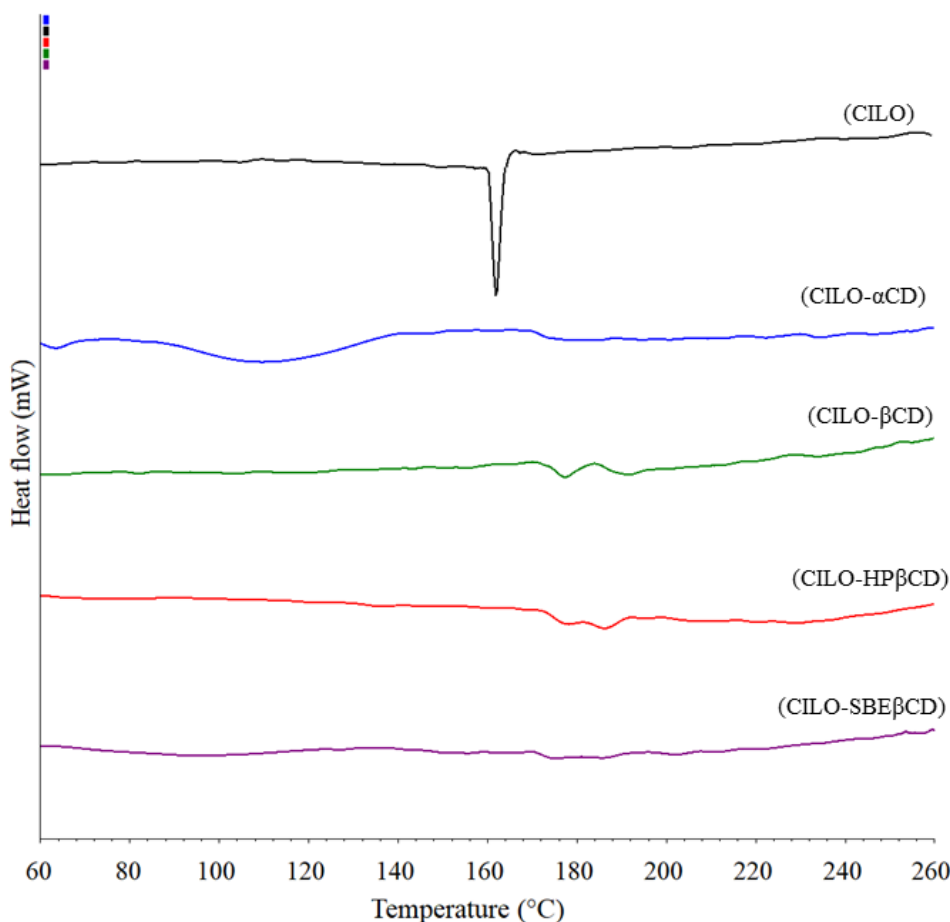


Rysunek 79. Termogramy SBE- β -cyklodekstryny (SBE β CD), ezetymibu (EZE) oraz kompleksu ezetymib – SBE- β -cyklodekstryna (EZE – SBE β CD)

Analiza termiczna cilostrazolu (CILO) oraz jego kompleksów

W przypadku cilostrazolu pomiary DSC wykonano dla kompleksów przygotowanych w stosunku stechiometrycznym 1 (CILO): 2 (CD). Z badań rozpuszczalności i miareczkowań kalorymetrycznych wynika, że cilostrazol tworzy połączenia, w których liczba cząsteczek cyklodekstryn przypadających na jedną cząsteczkę ezetymibu jest większa niż 1, natomiast nie większa niż 2 (stechiometria z ITC 1:1.5). Otrzymane termogramy w zakresie temperatur 60°C – 260°C przedstawiono na Rysunku 80.

Na termogramie (CILO), widoczny jest efekt związany z topnieniem czystego cilostrazolu. Temperatura wyznaczona odpowiada wartościom literaturowym dla badanego leku [97]. W przypadku kompleksu z α -cyklodekstryną widoczny jest endotermiczny efekt w okolicy 100–120 °C związany z odparowaniem wody ze struktury cyklodekstryny, dla pozostałych kompleksów te efekty nie są widoczne. Topnienie cilostrazolu dla próbek kompleksów można zauważyć w zakresie temperatur 170–190 °C. Efekty są przesunięte o około 10-20 stopni, rozmyte i dodatkowo mniej intensywne. Dla α CD i SBE β CD efekty związane z topnieniem cilostrazolu są prawie niewidoczne. Otrzymane termogramy potwierdzają powstawanie kompleksów inkluzyjnych pomiędzy cilostrazolem a cyklodekstrynami. Przesunięcie efektów topnienia w kierunku wyższych temperatur oraz zmniejszenie intensywności samego procesu świadczy o ochronnym wpływie cyklodekstryn na badany związek.

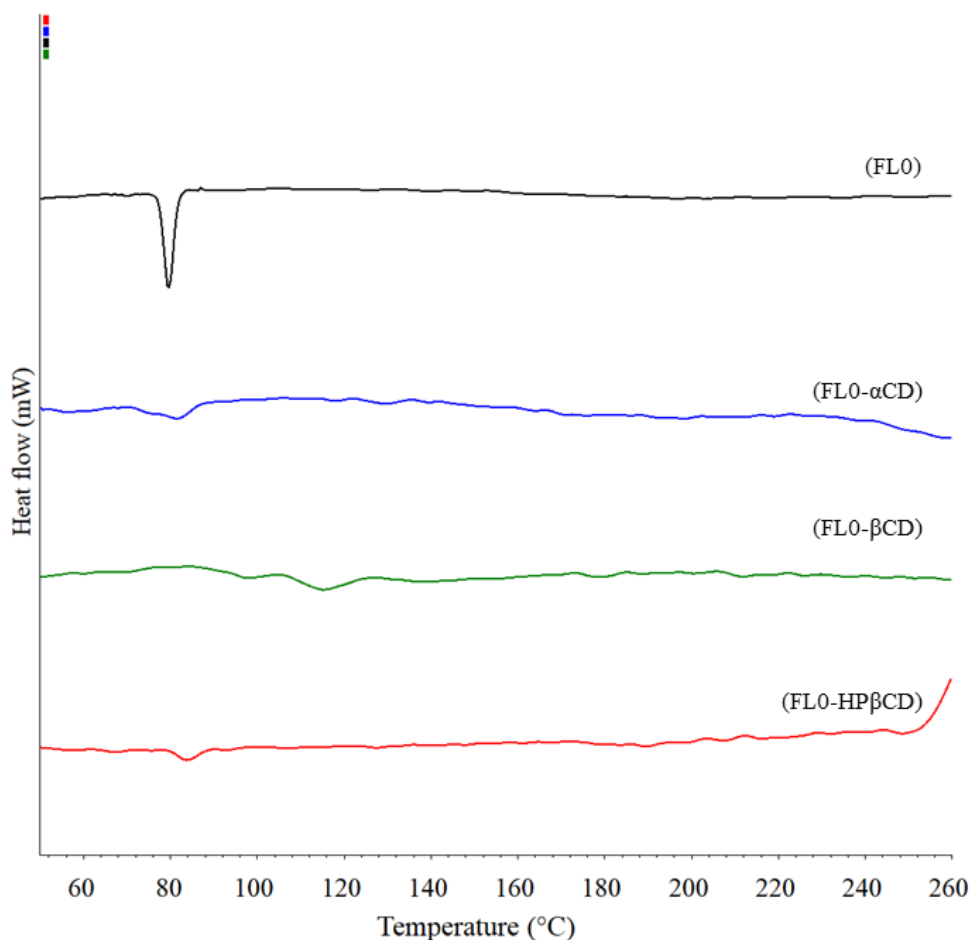


Rysunek 80. Termogramy ciprofloksazolu (CILO) oraz jego kompleksów w stosunku molowym 1:2, CILO – α CD, CILO – β CD, CILO – HP β CD, CILO – SBE β CD.

Analiza termiczna flawanonów oraz ich kompleksów.

Pomiary metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej dla flawanonów wykonano dla kompleksów przygotowanych w stosunku stechiometrycznym 1:1. Na termogramie czystego flawanonu (FL 0) przedstawionym na Rysunku 81 (krzywa FL0) widoczny jest endotermiczny pik w temperaturze 77-78°C odpowiadający temperaturze topnienia związku (Tabela 21). Na termogramach kompleksów flawanonu z α -, β - i hydroksypropylo- β -cyklodekstryną zaobserwować można wyraźne zmniejszenie i rozciągnięcie się efektów związanych z topnieniem związku, zauważalne jest również przesunięcie ich w kierunku wyższych wartości temperatur (*FL0 - β CD*).

Podobne efekty zaobserwować można dla pozostałych trzech flawanonów (Rysunki DSC 1 – 3, Załączniki), wyznaczone temperatury topnienia czystych związków pokrywają się z temperaturami literaturowymi (Tabela 21). W przypadku kompleksów zaobserwować można przesunięcia temperatur topnienia w kierunku wyższych wartości (maksymalnie o 20 – 40°C), a także wyraźne zmniejszenie powierzchni endotermicznych pików w stosunku do czystych związków.



Rysunek 81. Termogram flawanonu (FL0) oraz jego kompleksów w stosunku molowym 1:1, FL0 – α CD, FL0 – β CD, FL0 – HP β CD.

Tabela 21. Wartości temperatur topnienia badanych flawanonów.

	Temperatury topnienia flawanonów	
	Wartości eksperymentalne	Wartości literaturowe
FL 0	77-78	75-77 [62] 76-77 [60]
FL 1	90-91	88-89 [62], 91-93 [63]
FL 2	96-97	95-97 [62], 94-96 [64]
FL 3	79-82	84-86 [65]

Zmniejszenia intensywności pików oraz ich przesunięcia w kierunku wyższych temperatur świadczą o tworzeniu połączeń kompleksowych, w których zainkludowana do wnętrza cyklodekstryny cząsteczka liganda jest osłaniana termicznie przez makromolekulę cyklodekstryny.

Podsumowanie

Podsumowanie

Badania wykonane w przedstawionej pracy miały na celu analizę oddziaływań pomiędzy wybranymi ligandami (lekami – cilostazolem i ezetymibem oraz pochodnymi flawanonu), a cyklodekstrynami. Wykonane zostały serie pomiarów spektroskopowych oraz kalorymetrycznych w celu wyznaczenia trwałości powstających połączeń (kompleksów inkluzyjnych), a także określenia wpływu cyklodekstryn na właściwości zainkludowanych ligandów.

Spektroskopia UV

Spektrofotometryczne badania wodnych roztworów wybranych ligandów w obecności cyklodekstryn, miały na celu określenie wpływu makrocząsteczek na solubilizację badanych związków, a tym samym potwierdzenie tworzenia się kompleksów inkluzyjnych. We wszystkich badanych układach uzyskano wzrost rozpuszczalności liganda w wodzie, co potwierdza istnienie oddziaływań kompleksowych. Wartości wzrostu rozpuszczalności wybranych związków w obecności poszczególnych cyklodekstryn zamieszczono w Tabeli 22.

Tabela 22. Wartości maksymalnego wzrostu stężenia ligandów dla wybranych cyklodekstryn.

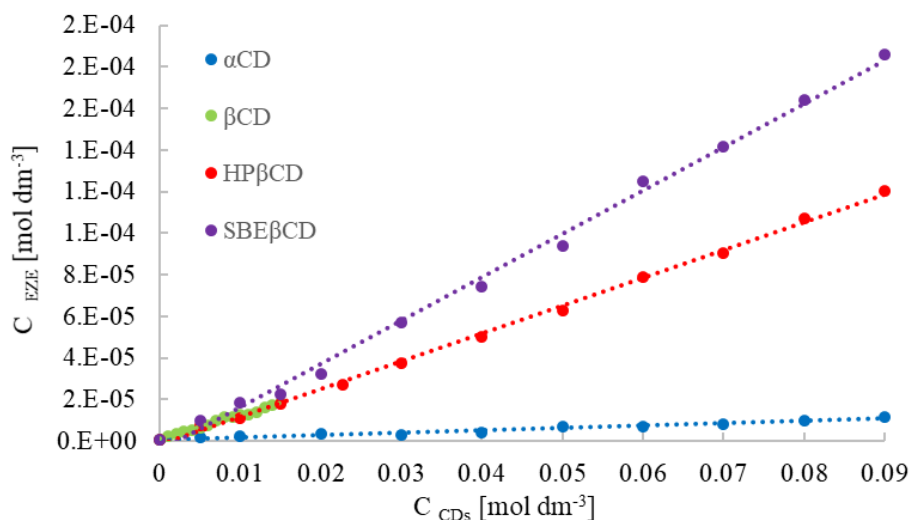
	α CD (0-90mM)	β CD (0-15 mM)	HP β CD (0-90mM)	SBE β CD (0-90mM)
Ezetymib	13.07 \pm 0.60	21.20 \pm 1.21	142.41 \pm 2.88	212.87 \pm 3.58
Cilostazol	21.31 \pm 3.01	12.60 \pm 1.45	85.85 \pm 5.23	162.15 \pm 4.36
Flawanon (FL0)	4.59 \pm 0.40	8.29 \pm 0.55	98.73 \pm 8.76	-
4'-metoksyflawanon (FL1)	4.59 \pm 0.13	12.81 \pm 0.37	131.89 \pm 5.64	-
4'-chloroflawanon (FL2)	27.43 \pm 1.14	17.06 \pm 1.07	109.07 \pm 6.90	-
7-metoksyflawanon (FL3)	3.78 \pm 0.37	12.55 \pm 1.49	53.03 \pm 2.31	-

Ezetymib:

Wzrost stężenia ezetymibu w funkcji stężenia cyklodekstryny we wszystkich analizowanych przypadkach miał charakter liniowy, co sugeruje tworzenie się połączeń *gość - gospodarz* w stosunku molowym 1:1. Porównując α -cyklodekstrynę i β -cyklodekstrynę zauważyć można, że pomimo większego zakresu stężenia α -cyklodekstryny, powoduje ona dużo mniejszy wzrost rozpuszczalności liganda w porównaniu do β -cyklodekstryny. Świadczy to o lepszym dopasowaniu cząsteczki ezetymibu do większej wnęki β -cyklodekstryny, potwierdzają to ponad 10 krotnie większe wartości stałych trwałości otrzymane dla kompleksu β -cyklodekstryny. α -cyklodekstryna tworzy kompleks o stałej trwałości ok. 120 dm³ mol⁻¹, podczas gdy β -cyklodekstryna 1300 dm³ mol⁻¹.

Zastosowanie pochodnych β -cyklodekstryny w widoczny sposób (Rysunek 82) zwiększa możliwości solubilizacyjne. Badania przeprowadzone dla dwóch jej

modyfikowanych pochodnych w stężeniach do 90 mM w roztworach wodnych umożliwiły osiągnięcie nawet ponad 200-krotnego wzrostu rozpuszczalności ezetymibu w stosunku do czystej wody. Przebieg zależności stężenia liganda w stosunku do stężenia makrocykla w zakresie 0-15 mM otrzymany dla HP β CD ma identyczny przebieg jak ten, otrzymany dla naturalnej β CD. Sulfobutyłowa pochodna pozwala na osiągnięcie jeszcze większego wzrostu rozpuszczalności i uzyskanie trwalszych połączeń w porównaniu z hydroksypropylo- β -cyklodekstryną.



Rysunek 82. Diagram rozpuszczalności ezetymibu dla poszczególnych cyklodekstryn (wartości uśrednione).

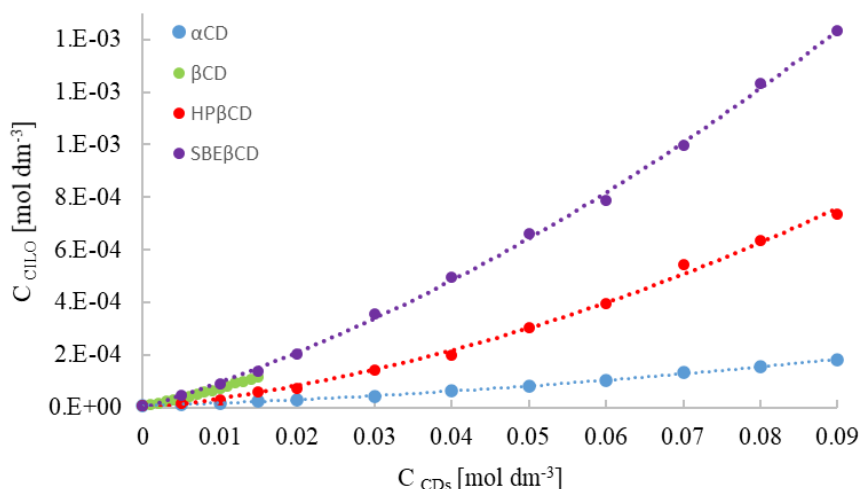
Cilostazol:

Badania rozpuszczalności fazowej przeprowadzone dla cilostazolu wskazują na tworzenie się kompleksów, w stosunku molowym z większością udziałem cyklodekstryn. Otrzymane krzywe w zakresie do 90mM (α CD, HP β CD i SBE β CD) wykazują wyraźne odchylenia w kierunku wartości dodatnich osi OY. Dla β -cyklodekstryny odchylenie od liniowości może nie być tak wyraźnie widoczne, ale spowodowane jest to małym zakresem stężenia cyklodekstryny. Na Rysunku 83 przedstawiono zbiorczy diagram fazowy cilostazolu, na którym można zauważyć, że do około 15 mM wykresy dla wszystkich cyklodekstryn przejawiają pozornie liniowy przebieg.

Mimo braku możliwości wyznaczenia stałych tworzenia badanych kompleksów o ich trwałości można wnioskować na podstawie wzrostu stężenia. Porównując dwie naturalne cyklodekstryny, większy wzrost w zakresie 0-15 mM powoduje forma beta, więc ona najprawdopodobniej będzie tworzyła trwalsze połączenie z cząsteczką cilostazolu.

Pozostałe dwie pochodne β -cyklodekstryny w początkowym zakresie mają podobny przebieg do naturalnej dekstryny, jednak zastosowanie większych stężeń pozwoliło osiągnąć

wzrost stężenia liganda rzędu 80 (dla HP β CD) i 160 (SBE β CD). Większy wzrost stężenia cilostazolu uzyskany dla pochodnej sulfobutylowej pozwala wnioskować o większej trwałości kompleksów tworzonych z tą pochodną.



Rysunek 83. Diagram rozpuszczalności cilostazolu dla poszczególnych cyklodekstryn (wartości uśrednione).

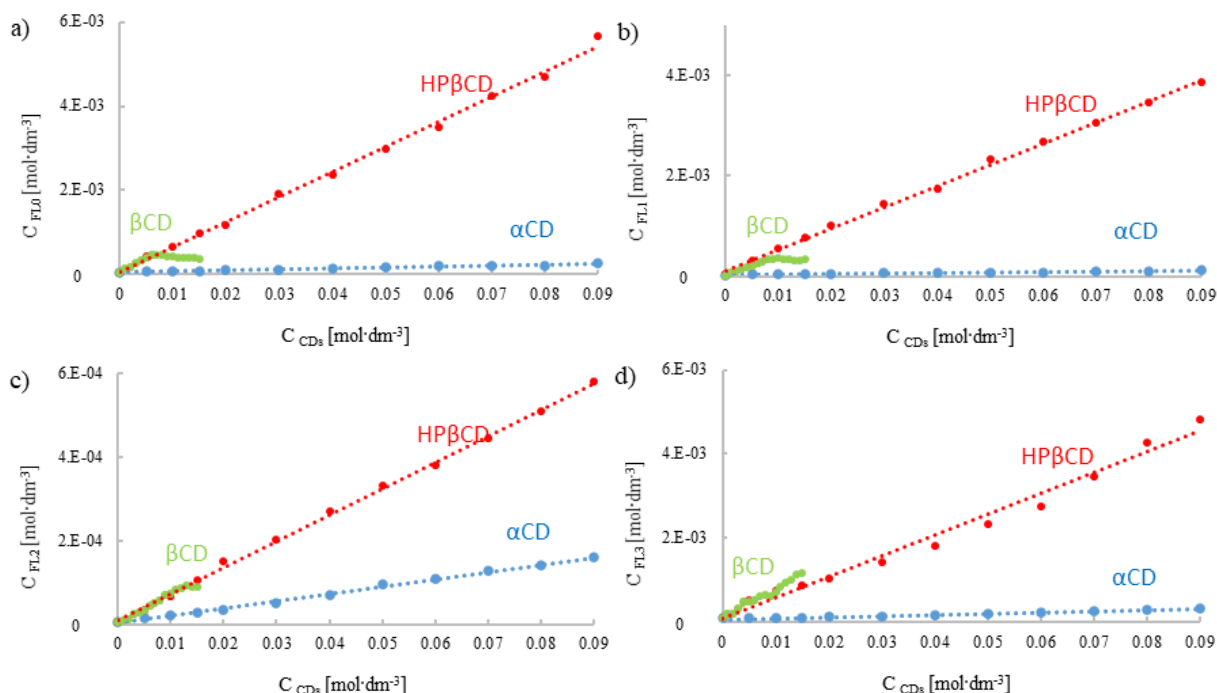
Flawanony:

We wszystkich omawianych przypadkach uzyskano liniową zależność wzrostu rozpuszczalności w wodzie flawanonów w funkcji stężenia cyklodekstryn. Wskazuje to na tworzenie połączeń o stechiometrii 1:1.

W przypadku niepodstawionego flawanonu (FL0) i podstawionych przy pierścieniu C 4'-metoksyflawanonu (FL1) i 4'-chloroflawanonu (FL2) dodatek β -cyklodekstryny powodował plateau na krzywych rozpuszczalności, co ograniczało dalszy wzrost stężenia liganda. Takie zjawisko obserwowane jest przy zastosowaniu solubilizatora (β -cyklodekstryna) o stosunkowo małej rozpuszczalności [89]. Stężenie β -cyklodekstryny, przy którym występuje wypłaszczenie związane może być z rozpuszczalnością czystego związku w wodzie. Im dany flawanon ma większą rozpuszczalność, tym przy niższym stężeniu cyklodekstryny występuje plateau. Zastosowanie dobrze rozpuszczalnej, hydroksypropylowej pochodnej β -cyklodekstryny nie powodowało ograniczenia wzrostu rozpuszczalności.

Porównując otrzymane zależności w zakresie 0-15 mM (Rysunek 84) dla dwóch naturalnych cyklodekstryn, można zauważyć, że β -cyklodekstryna powoduje większy wzrost rozpuszczalności niż forma α . Świadczy to o lepszym dopasowaniu przestrzennym pomiędzy cząsteczkami flawanonów, a molekułami większego makrocykla. Zależność tą potwierdzają wyznaczone stałe trwałości, które dla α -cyklodekstryny przyjmują mniejsze wartości (Tabela 23). Większy wzrost rozpuszczalności dla β -cyklodekstryny zaobserwować można

nawet biorąc pod uwagę zakres stężenia cyklodekstryn do 90 mM, z wyjątkiem 4'-chloroflwanonu (FL2).



Rysunek 84. Diagramy rozpuszczalności flawanonów (wartości uśrednione) a) FL0; b) FL1; c) FL2; d) FL3.

W przypadku tego związku α -cyklodekstryna powoduje dużo większy wzrost rozpuszczalności oraz posiada prawie 10-krotnie większe wartości stałych trwałości w porównaniu do pozostałych flawanonów. Spowodowane jest to obecnością atomu chloru w pozycji para w pierścieniu C cząsteczki flawanonu. Podstawnik ten stabilizuje najprawdopodobniej kompleks poprzez utworzenie wiązań wodorowych między atomem chloru, a atomami wodoru występującymi w cząsteczce cyklodekstryny.

Analizując wartości wzrostu stężenia flawanonów dla β -cyklodekstryny i hydroksypropylo- β -cyklodekstryny w zakresie 0-15 mM, zauważyć można niemal identyczny przebieg krzywych, różnice we wzroście stężenia wynikają jedynie z występowania plateau dla natywnej formy β . Zastosowanie hydroksypropylo- β -cyklodekstryny umożliwia prowadzenie badań w zakresie stężeń 0-90 mM, który pozwala osiągnąć nawet 100-krotny wzrost rozpuszczalności liganda w wodzie. Stałe trwałości otrzymane dla β -cyklodekstryny i podstawionej pochodnej przyjmują zbliżone wartości.

Tabela 23. Wartości stałych trwałości kompleksów cyklodekstryn z flawanonami

	α CD	β CD	HP β CD
Flawanon (FL0)	39.50 ± 4.97	1286.28 ± 84.85	1106.81 ± 84.48
4'-metoksyflawanon (FL1)	35.64 ± 1.44	1514.16 ± 23.68	1509.11 ± 49.78
4'-chloroflwanon (FL2)	299.37 ± 18.51	1252.00 ± 158.85	1185.89 ± 93.06
7-metoksyflawanon (FL3)	31.77 ± 1.59	782.88 ± 149.59	582.13 ± 44.11

Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC)

Przeprowadzone serie miareczkowań kalorymetrycznych umożliwiły termodynamiczną analizę procesów tworzenia kompleksów inkluzyjnych *ligand-cyklodekstryna*. Wyznaczone wartości parametrów termodynamicznych charakteryzujących zachodzące procesy przedstawiono w Tabeli 24.

Wyznaczone zmiany podstawowych funkcji termodynamicznych mają podobny charakter dla wszystkich analizowanych procesów. Molowe entalpie przyjmują wartości ujemne ($\Delta H < 0$), co wskazuje na egzotermiczny charakter zachodzących przemian, natomiast molowe entropie są zawsze dodatnie ($\Delta S > 0$), wszystkie procesy sterowane są entalpowo. Zmiany molowej entalpii swobodnej ($\Delta G < 0$) jednoznacznie wskazują na spontaniczność procesów tworzenia kompleksów badanych ligandów z cyklodekstrynami.

Tabela 24. Wartości parametrów termodynamicznych dla kompleksów ezetymibu (DMSO), cilostazolu (DMSO), flawanonu (woda), 4'-metoksyflawanonu (woda); 4-chloroflawanonu (DMSO) i 7-metoksyflawanonu (woda) z wybranymi cyklodekstrynami.

		n	K [dm ³ mol ⁻¹]	ΔH [J mol ⁻¹]	ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]
EZE (DMSO)	α CD	0.85 ± 0.22	815 ± 106	-267.83 ± 80.39	54.85	-16.24
	β CD	1.08 ± 0.06	1710 ± 122	-641.42 ± 41.03	59.87	-18.03
	HP β CD	0.82 ± 0.25	2940 ± 266	-710.92 ± 53.17	64.06	-19.35
CILO (DMSO)	α CD	1.54 ± 0.02	3630 ± 389	-69.09 ± 1.17	67.8	-20.28
	β CD	1.64 ± 0.02	4500 ± 361	-282.87 ± 4.52	69.1	-20.89
	HP β CD	1.57 ± 0.02	9460 ± 958	-381.69 ± 7.12	74.9	-22.71
FL0 (woda)	α CD	1.02 ± 0.15	9560 ± 1120	-4295.86 ± 798.04	61.97	-22.77
	β CD	1.02 ± 0.07	30200 ± 3150	-1226.37 ± 101.41	81.65	-25.57
	HP β CD	1.12 ± 0.07	15700 ± 1160	-4011.98 ± 302.01	66.99	-23.99
FL1 (woda)	α CD	0.76 ± 0.35	23500 ± 6110	-1477.59 ± 802.23	78.72	-24.95
	β CD	1.22 ± 0.03	70000 ± 3970	-277.56 ± 9.67	91.70	-27.62
	HP β CD	0.99 ± 0.06	68800 ± 5990	-628.89 ± 45.09	90.44	-27.59
FL2 (DMSO)	α CD	0.83 ± 0.02	1350 ± 129	-178.58 ± 4.73	59.46	-17.91
	β CD	0.93 ± 0.01	3800 ± 490	-108.57 ± 2.05	68.25	-20.46
	HP β CD	0.95 ± 0.01	1940 ± 186	-120.42 ± 2.30	62.39	-18.78
FL3 (woda)	α CD	0.82 ± 0.09	11000 ± 1221	-116.98 ± 16.45	77.04	-23.09
	β CD	0.85 ± 0.02	30100 ± 1520	-467.27 ± 14.91	84.16	-25.56
	HP β CD	1.22 ± 0.06	15400 ± 1570	-678.71 ± 47.73	77.88	-23.90

Ezetymib:

Stechiometria wyznaczona przy pomocy tej metody potwierdza tworzenie się połączeń *ezetymib-cyklodekstryna* w stosunku 1:1.

Wartości stałych tworzenia otrzymane metodą miareczkowania kalorymetrycznego wykazują wzrastającą tendencję, jak w przypadku wartości otrzymanych metodą spektrofotometryczną ($\alpha\text{CD} < \beta\text{CD} < \text{HP}\beta\text{CD}$). Należy pamiętać, że wartości stałych otrzymane metodami ITC oraz UV nie mogą być ze sobą bezpośrednio porównywane. Wynika to z różnic pomiędzy metodami pomiarowymi. W przypadku rozpuszczalności mamy do czynienia z metodą statyczną, w której proces ustalenia się stanu równowagi trwa ok. 7 dni, natomiast miareczkowanie kalorymetryczne jest metodą dynamiczną, w której analizie podlega proces zachodzący w momencie trwania miareczkowania.

Największą trwałością charakteryzuje się kompleks z hydroksypropylo- β -cyklodekstryną, następnie z naturalną β -cyklodekstryną i najmniejszą z α -cyklodekstryną. Różnice między kompleksami naturalnych cyklodekstryn wynikają z lepszego dopasowania geometrycznego między cząsteczką liganda, a wnęką β -cyklodekstryny. Zwiększenie trwałości dla kompleksu modyfikowanej pochodnej spowodowane jest najprawdopodobniej utworzeniem dodatkowych wiązań wodorowych między obecnymi grupami hydroksypropylowymi, a atomami fluoru w cząsteczce ezetymibu, stabilizujących dodatkowo kompleks.

Cilostazol:

Miareczkowanie roztworów cilostazolu roztworami wybranych cyklodekstryn pozwoliło potwierdzić tworzenie się połączeń, w których więcej niż jedna cząsteczka makromolekuły (receptora) przypada na pojedynczą cząsteczkę cilostazolu. Stechiometria wyznaczona tą metodą wynosi w przybliżeniu 1:1.5 dla wszystkich trzech badanych cyklodekstryn. Taka wartość wynika z tworzenia się mieszaniny kompleksów 1:1 i 1:2 lub z tworzenia większych agregatów, w których dwie grupy funkcyjne cząsteczki cilostazolu inkludowane są wewnątrz makrocząsteczek cyklodekstryny (utworzenie połączenia 2:3). Cząsteczka cilostazolu jest cząsteczką liniową, na którą może nanizac się więcej niż 1 molekuła cyklodekstryny.

Otrzymane wartości stałych trwałości wskazują na tworzenie trwałych połączeń między cilostazolem, a wszystkimi cyklodekstrydami. Wartości stałych wzrastają w kolejności $\alpha\text{CD} < \beta\text{CD} < \text{HP}\beta\text{CD}$. Podobnie jak w przypadku ezetymibu największa wartość stałej trwałości dla kompleksów tworzonych przez HP- β -cyklodekstrynę wynika

najprawdopodobniej z utworzenia dodatkowych wiązań wodorowych pomiędzy wodorami obecnymi w grupach $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, a atomem tlenu znajdującym się na końcu cząsteczki cilostazolu.

Flawanony:

Analiza wyników ITC pozwoliła potwierdzić stechiometrię powstających kompleksów wyznaczoną metodą spektrofotometrii UV, we wszystkich analizowanych przypadkach wynosi ona 1:1. Ponadto otrzymane wartości stałych trwałości charakteryzują się podobną tendencją zmian, wartości stałych wzrastają w kolejności $\alpha\text{CD} < \text{HP}\beta\text{CD} < \beta\text{CD}$.

Niższe wartości stałych dla hydroksypropylo- β -cyklodekstryny względem natywnej formy są spowodowane najprawdopodobniej zawadą przestrzenną, powodowaną przez łańcuchy hydroksypropylowe modyfikowanej makromolekuły. Większe różnice w wartościach stałych (pomiędzy $\text{HP}\beta\text{CD}$, a βCD) w porównaniu z otrzymanymi metodą UV mogą być spowodowane dłuższym czasem osiągnięcia stanu równowagi metody statycznej. W tej metodzie flawanon ma więcej czasu by ułożyć się we wnęce makrocykla i zawada spowodowana łańcuchami hydroksypropylowymi jest mniej znacząca.

Porównując wartości stałych dla kompleksów badanych w środowisku wodnym (FL0, FL1 i FL3) można zauważyć, że podstawienie flawanonu grupą metoksyłową w pozycji para przy pierścieniu C (FL1) zwiększa trwałość powstających kompleksów ponad dwukrotnie, w porównaniu do niepodstawionego flawanonu (FL0) podczas gdy podstawienie tego samego podstawnika do pierścienia A, nie wpływa na stałe trwałości powstających kompleksów. Zwiększenie się trwałości dla kompleksów 4'-metoksyflawanonu względem flawanonu podstawowego zaobserwować można również dla wartości stałych otrzymanych metodą rozpuszczalności fazowej (spektroskopia UV).

Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Widma FT-IR badanych związków z cyklodekstrynami pozwoliły potwierdzić wytworzenie kompleksów w formie stałej. Charakterystyczne pasma dla badanych związków po skompleksowaniu z cyklodekstrynami ulegają zanikowi i są ekranowane przez pasma pochodzące od cyklodekstryn. Dodatkowo pomiary wykonane tą metodą w przypadku ezetymibu i cilostazolu pozwoliły potwierdzić stechiometrię badanych kompleksów.

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Na podstawie serii zarejestrowanych termogramów DSC dla badanych ligandów skompleksowanych z α CD, β CD, H β CD oraz SBE β CD zaobserwowano różnicę w efektach termicznych związanych z topnieniem związków. Pasma charakterystyczne odpowiadające topnieniu / dekompozycji danego związku we wszystkich przypadkach ulegało zdecydowanemu zmniejszeniu, rozmyciu i przesunięciu w kierunku wyższych temperatur. Największe przesunięcie ($\Delta T = 90$ stopni) zaobserwowano dla topnienia ezetymibu. Obserwowane efekty świadczą o ochronnym wpływie cyklodekstryn na wysoką temperaturę. Cząsteczka liganda zainkludowana we wnętrzu makrocykla jest odseparowana od środowiska zewnętrznego. Topnienie związku spowodowane wzrastającą temperaturą zachodzi wolniej, dlatego efekty są rozmyte i przesunięte w kierunku wyższych wartości temperatur.

Wyniki otrzymane w ramach przedstawionej dysertacji wskazują, że cyklodekstryny tworzą trwałe połączenia z badanymi ligandami i mogą być nośnikami dla wybranych substancji biologicznie aktywnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzić można, że najlepszym receptorem dla ezetymibu są β -cyklodekstryna i jej pochodne. Otrzymane wartości stałych tworzenia przyjmują wartości większe w porównaniu z mniejszą, sześcioczłonową α -cyklodekstryną. Połączenia *lek-cyklodekstryna* tworzą się w stosunku 1:1. Spośród badanych cyklodekstryn najlepszym potencjalnym nośnikiem dla ezetymibu wydaje się być sulfobutyłowa pochodna. Powoduje ona największą solubilizację (ponad 200 krotny wzrost rozpuszczalności leku w wodzie), charakteryzując się jednocześnie najwyższymi wartościami stałych trwałości.

Przedstawione w pracy badania oddziaływania ezetymibu z cyklodekstrynami zostały wzbogacone o dodatkowe pomiary ^1H NMR oraz MALDI-TOF MS, które potwierdziły tworzenie kompleksów w formie stałej, a także przeprowadzono wstępne badania biologiczne [98].

W przypadku cilostazolu również najlepsze dopasowanie lek-receptor wykazuje sulfobutyłowa pochodna β -cyklodekstryny. Powoduje ona największy, ponad 160 krotny, wzrost rozpuszczalności cilostazolu w wodzie. Przeprowadzone badania pozwoliły wyznaczyć stechiometrię kompleksów cilostazolu z cyklodekstryną. Otrzymane wyniki sugerują tworzenie połączeń w stosunku 1:2.

Bardzo duży wzrost rozpuszczalności badanych leków wywołany obecnością pochodnych β -cyklodekstryny przyczynić się może do zwiększenia biodostępności tych związków w organizmie, jak również ich wszechstronnego zastosowania w medycynie.

Wyniki otrzymane dla flawanonu oraz jego pochodnych wyraźnie wykazują, że struktura cząsteczki liganda ma wpływ na trwałość tworzonych kompleksów. Kompleksy α -cyklodekstryny stabilizowane są przez obecność małego, silnie elektroujemnego atomu chloru podstawionego w pierścieniu C cząsteczki flawanonu. Podczas gdy obecność w tym samym miejscu grupy metoksyłowej nie wpływa na trwałość kompleksu. Podstawienie flawanonu w pozycji para w pierścieniu C zwiększa trwałość tworzonych połączeń w przypadku kompleksów β -cyklodekstryn (szczególnie widoczne jest to dla 4'-metoksyflawanonu).

Dla wszystkich badanych flawanonów lepszym dopasowaniem przestrzennym (większy wzrost rozpuszczalności, wyższe stałe trwałości) charakteryzuje się β -cyklodekstryna i jej pochodne. Najbardziej odpowiednim nośnikiem dla tych związków, mimo nieznacznie mniejszych wartości stałych tworzenia jest pochodna hydroksypropylova, która dzięki zwiększonej rozpuszczalności nie powoduje ograniczeń w solubilizacji ligandów.

Zdolność tworzenia trwałych kompleksów badanych flawanonów z cyklodekstrynami, powoduje wzrost ich rozpuszczalności w wodzie, co skutkować może zwiększeniem ich biodostępności w organizmie. Może to potencjalnie zostać wykorzystane w produkcji leków o właściwościach przeciwutleniających, przeciwzapalnych oraz antynowotworowych.

Streszczenie

W pracy wykonane zostały serie pomiarów kalorymetrycznych oraz spektroskopowych, mające na celu analizę procesów powstawania kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi. Ligandami wybranymi do badań były leki (ezetymib i cilostazol) oraz flawanony (flawanon, 4'-metoksyflawanon, 4'-chloroflawanon i 7-metoksyflawanon), natomiast badanymi makrocyklami: α -cyklodekstryna, β -cyklodekstryna, hydroksypropylo- β -cyklodekstryna i sulfobutylo- β -cyklodekstryna.

Analizie poddane zostały zarówno procesy powstawania kompleksów w roztworach (metodami izotermicznej kalorymetrii miareczkowej ITC i spektrofotometrii UV-Vis), jak i w formie stałej (spektroskopia FT-IR i różnicowa kalorymetria skaningowa DSC).

Pomiary spektrofotometryczne:

- Wykonano kalibracje spektrofotometryczne metodą krzywej wzorcowej dla badanych ligandów, dzięki którym wyznaczone zostały molowe współczynniki ekstynkcji związków. Dodatkowo wyznaczono eksperymentalnie rozpuszczalności badanych związków w wodzie.
- Wykorzystując metodę rozpuszczalności fazowej Higuchi-Connors określono wzrost rozpuszczalności badanych ligandów w wodzie pod wpływem wzrastającego stężenia cyklodekstryn. Analiza otrzymanych diagramów rozpuszczalności pozwoliła na wstępne określenie stechiometrii oraz wyznaczenie stałych trwałości (K) kompleksów.

Miareczkowanie kalorymetryczne:

- Przeprowadzono serie miareczkowań kalorymetrycznych badanych ligandów z α -cyklodekstryną, β -cyklodekstryną i hydroksypropylo- β -cyklodekstryną w roztworach wodnych lub dimetylosulfotlenku. Wyznaczono izotermy miareczkowania bezpośrednich efektów cieplnych towarzyszących omawianym procesom miareczkowania.
- W oparciu o model jednego rodzaju miejsc aktywnych, wyznaczono parametry termodynamiczne zachodzących procesów (molową entalpię ΔH , molową entropię ΔS , molową entalpię swobodną ΔG oraz stałą równowagi K), charakteryzujące powstające kompleksy inkluzyjne oraz wyznaczono dokładny stosunek stechiometryczny powstałych kompleksów.
- We wszystkich analizowanych połączeniach procesy kompleksowania miały charakter samorzutny oraz egzotermiczny.

Analiza kompleksów inkluzyjnych w formie stałej:

- Wykorzystując metodę współrozpuszczania udało się przygotować wszystkie kompleksy *ligand-cyklodekstryna* w formie stałej.
- Kompleksy poddano analizie spektroskopowej FT-IR, za pomocą której potwierdzono tworzenie się połączeń, a w przypadku cilostazolu i ezetymibu potwierdzono stechiometrię powstających kompleksów w fazie stałej.
- Wykonano analizę DSC wszystkich kompleksów w celu oceny wpływu procesu kompleksowania na stabilność termiczną badanych związków. We wszystkich badanych przypadkach wystąpiło wyraźne zredukowanie wielkości efektu związanego z topnieniem, a w znacznej ilości przypadków zauważalne było również przesunięcie piku w kierunku wyższych temperatur. Efekty te świadczą o inkludowaniu ligandów we wnętrzu cyklodekstryn i wskazują na ochronny wpływ cyklodekstryn na trwałość termiczną ligandów.

Abstract

The research includes a series of calorimetric and spectroscopic measurements aimed at analyzing the processes of formation of cyclodextrin inclusion complexes with selected compounds, which are biologically active. The ligands chosen for the studies were drugs (ezetimibe and cilostazol) and flavanones (flavanone, 4'-methoxyflavanone, 4'chloroflavanone, and 7-methoxyflavanone), while the tested macrocycles were: α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, and sulfobutyl- β -cyclodextrin.

Two processes of complex formation have been incorporated into the analysis. The process of complex formation in solutions has been analyzed using isothermal titration calorimetry (ITC) and UV-Vis spectrophotometry methods, while the process of complex formation in the solid form has been analyzed using FT-IR spectroscopy and DSC differential scanning calorimetry.

Spectrophotometric measurements:

- Spectrophotometric calibrations of tested ligands were undertaken using the standard curve method. The molar extinction coefficients of the selected compounds were determined. Additionally, the solubilities of all of the ligands in the water were determined experimentally.

- The increase of tested ligands' solubility in water under the influence of an increasing concentration of cyclodextrins has been determined using the Higuchi-Connors phase solubility method. The analysis of the dissolution diagrams allowed for the initial determination of the stoichiometry and the stability constants (K) of the obtained complexes.

Calorimetric titration measurements:

- A series of calorimetric titrations of tested ligands with α cyclodextrin, β -cyclodextrin, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in water or dimethyl sulfoxide were performed. The titration isotherms of the direct thermal effects, which are accompanied by discussed titration processes, were determined.

- Based on the 'one site of sites' model, the thermodynamic parameters of the processes, characterizing the formation of inclusion complexes (molar enthalpy ΔH , molar entropy ΔS , molar free enthalpy ΔG , and the equilibrium constant K), were determined. The exact stoichiometric ratio of the formed complexes was also determined.

- All analyzed complexing processes were spontaneous and exothermic.

Analysis of solid-state inclusion complexes:

- All *ligand-cyclodextrin* complexes were prepared in solid form using the co-precipitation method.
- The complexes were analyzed by FT-IR spectroscopy, which confirmed the formation of connections. In the case of cilostazol and ezetimibe, the stoichiometry of the resulting complexes in a solid phase was confirmed.
- In order to assess the effect's complexation process on the thermal stability of the selected compounds, a DSC analysis of all complexes was performed. In all tested samples, there was a clear reduction of the included compound's melting effects. In a significant number of cases, the shift of the peak towards higher temperatures was also noticeable. These effects indicate the inclusion of ligands inside cyclodextrins and indicate the protective effect of cyclodextrins on the ligands' thermal stability.

Załączniki

Tabela UV1. Wartości stężeń ezetymibu (EZE) dla α -cyklodekstryny.

$C_{\alpha CD}$ [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	1.09E-05	1.21E-05	1.20E-05
0.080	9.60E-06	1.01E-05	9.22E-06
0.070	7.99E-06	8.23E-06	8.15E-06
0.060	7.45E-06	6.13E-06	7.83E-06
0.050	5.54E-06	8.01E-06	6.60E-06
0.040	3.99E-06	4.25E-06	4.60E-06
0.030	3.68E-06	2.94E-06	2.78E-06
0.020	3.60E-06	4.00E-06	3.33E-06
0.015	2.79E-06	2.87E-06	2.00E-06
0.010	2.81E-06	2.33E-06	1.35E-06
0.005	1.28E-06	1.88E-06	1.52E-06
0	8.71E-07	9.23E-07	8.79E-07

Tabela UV2. Wartości stężeń ezetymibu (EZE) dla β -cyklodekstryny.

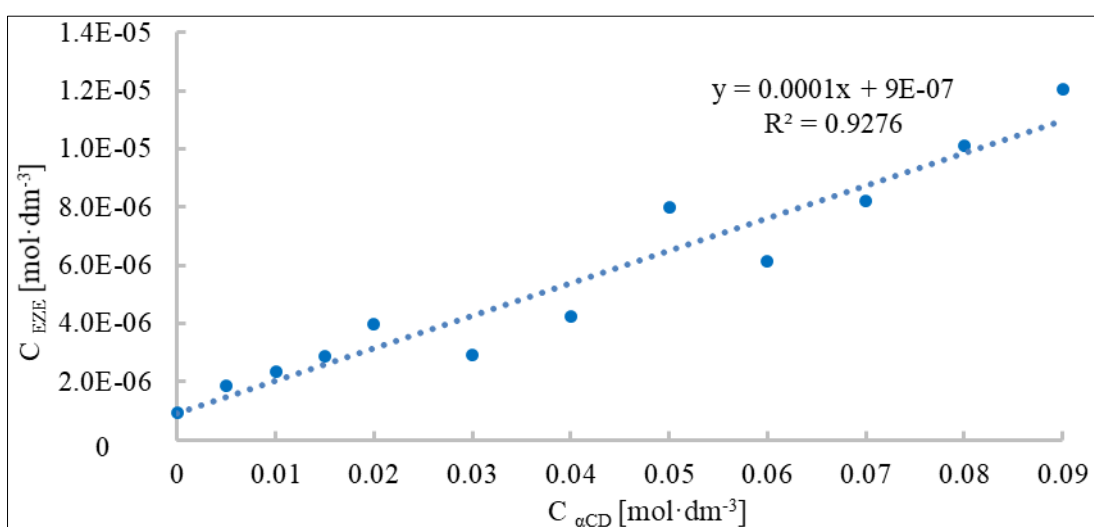
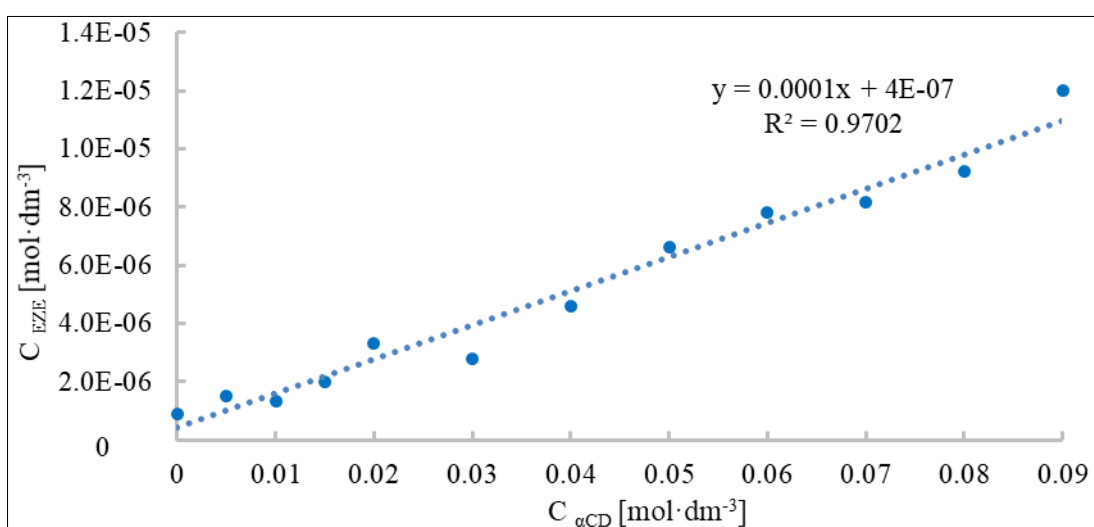
$C_{\beta CD}$ [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.015	1.85E-05	1.80E-05	1.88E-05
0.014	1.80E-05	1.58E-05	1.82E-05
0.013	1.64E-05	1.41E-05	1.81E-05
0.012	1.36E-05	1.29E-05	1.57E-05
0.011	1.32E-05	1.09E-05	1.41E-05
0.010	1.26E-05	1.19E-05	1.31E-05
0.009	1.09E-05	1.07E-05	1.33E-05
0.008	1.01E-05	1.16E-05	1.25E-05
0.007	9.52E-06	8.92E-06	1.11E-05
0.006	7.17E-06	6.94E-06	9.17E-06
0.005	5.61E-06	6.31E-06	7.52E-06
0.004	5.00E-06	4.71E-06	6.00E-06
0.003	4.14E-06	4.49E-06	5.27E-06
0.002	3.08E-06	2.75E-06	4.57E-06
0.001	1.47E-06	2.35E-06	2.96E-06
0	8.19E-07	8.71E-07	9.22E-07

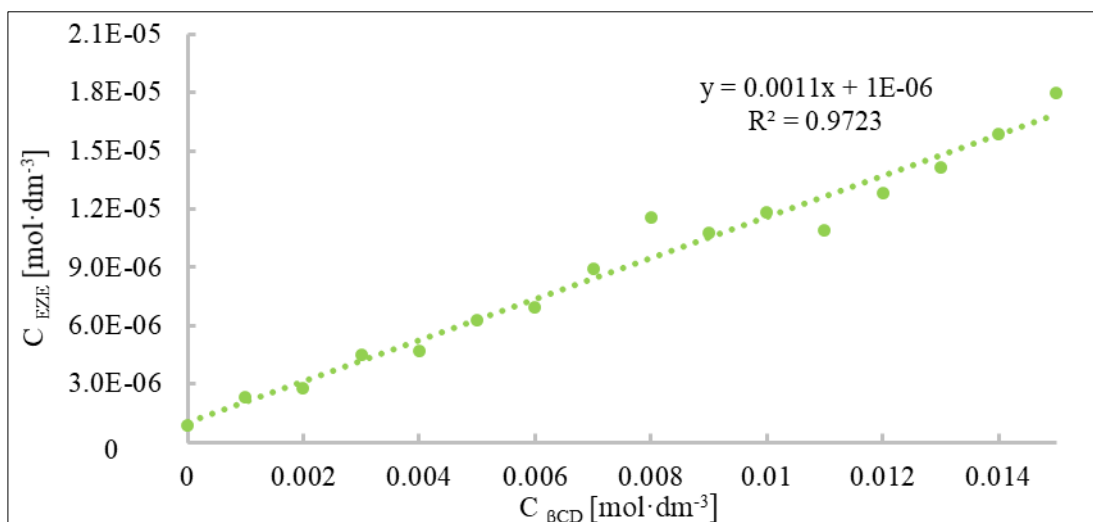
Tabela UV3. Wartości stężeń ezetymibu (EZE) dla HP- β -cyklodekstryny.

$C_{HP\beta CD}$ [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	1.16E-04	1.23E-04	1.21E-04
0.080	1.07E-04	1.09E-04	1.12E-04
0.070	9.00E-05	1.00E-04	9.21E-05
0.060	7.80E-05	8.10E-05	7.95E-05
0.050	6.51E-05	7.74E-05	6.25E-05
0.040	5.32E-05	5.77E-05	5.39E-05
0.030	3.36E-05	3.88E-05	4.15E-05
0.020	2.88E-05	3.26E-05	2.82E-05
0.015	1.77E-05	1.81E-05	1.79E-05
0.010	1.41E-05	1.62E-05	1.36E-05
0.005	9.57E-06	1.15E-05	1.00E-05
0	8.16E-07	8.86E-07	8.34E-07

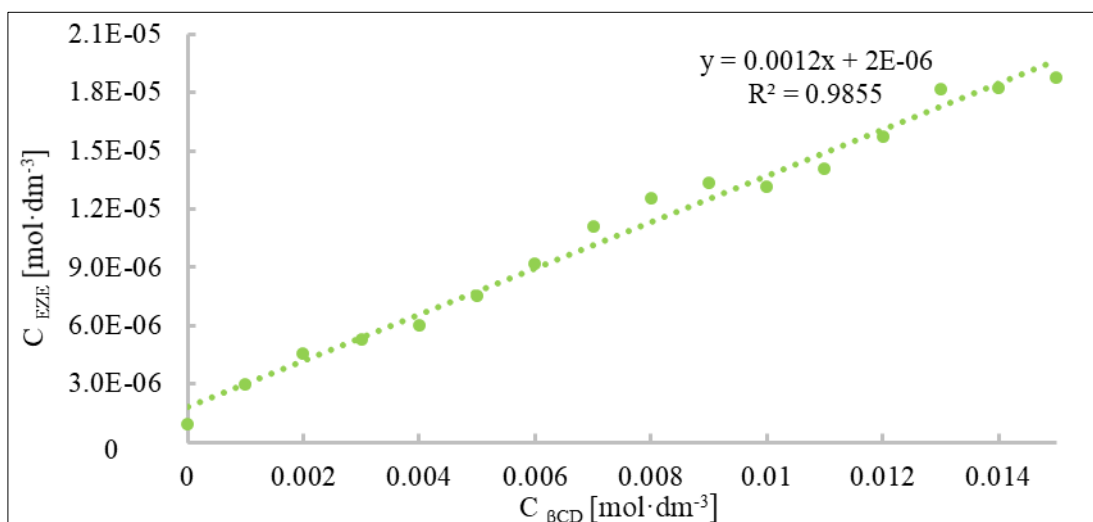
Tabela UV4. Wartości stężeń ezetymibu (EZE) dla SBE- β -cyklodekstryny.

$C_{SBE\beta CD}$ [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]	C_{EZE} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	1.82E-04	1.84E-04	1.94E-04
0.080	1.62E-04	1.58E-04	1.77E-04
0.070	1.42E-04	1.32E-04	1.70E-04
0.060	1.25E-04	1.28E-04	1.42E-04
0.050	9.87E-05	8.91E-05	1.14E-04
0.040	7.85E-05	8.08E-05	9.32E-05
0.030	5.65E-05	5.88E-05	8.13E-05
0.020	4.15E-05	3.72E-05	4.40E-05
0.015	2.55E-05	2.70E-05	3.00E-05
0.010	2.32E-05	2.30E-05	2.20E-05
0.005	1.49E-05	1.35E-05	8.45E-06
0	8.71E-07	8.54E-07	9.02E-07

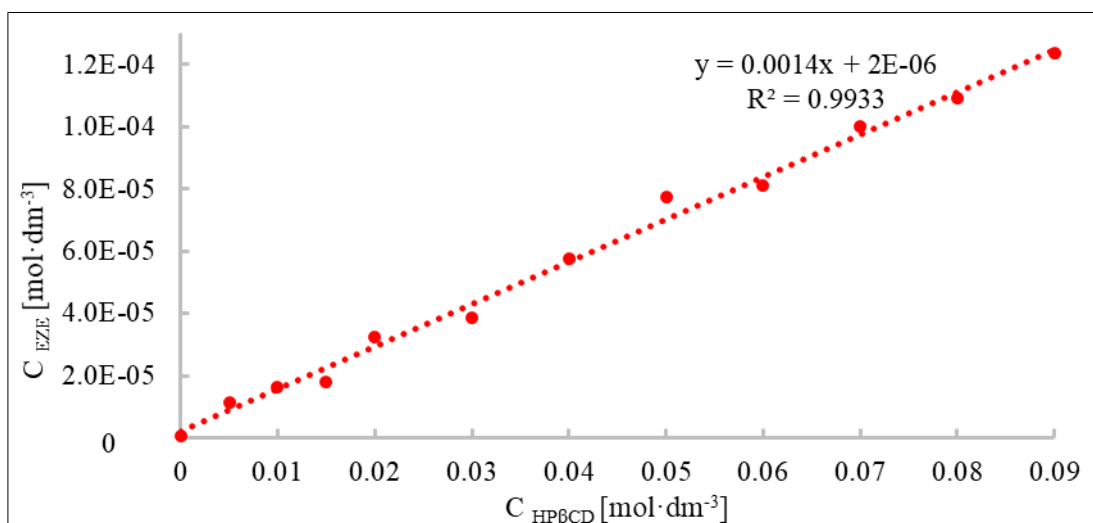
**Rysunek UV1.** Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia α -cyklodekstryny (α CD) - seria 2**Rysunek UV2.** Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia α -cyklodekstryny (α CD) - seria 3



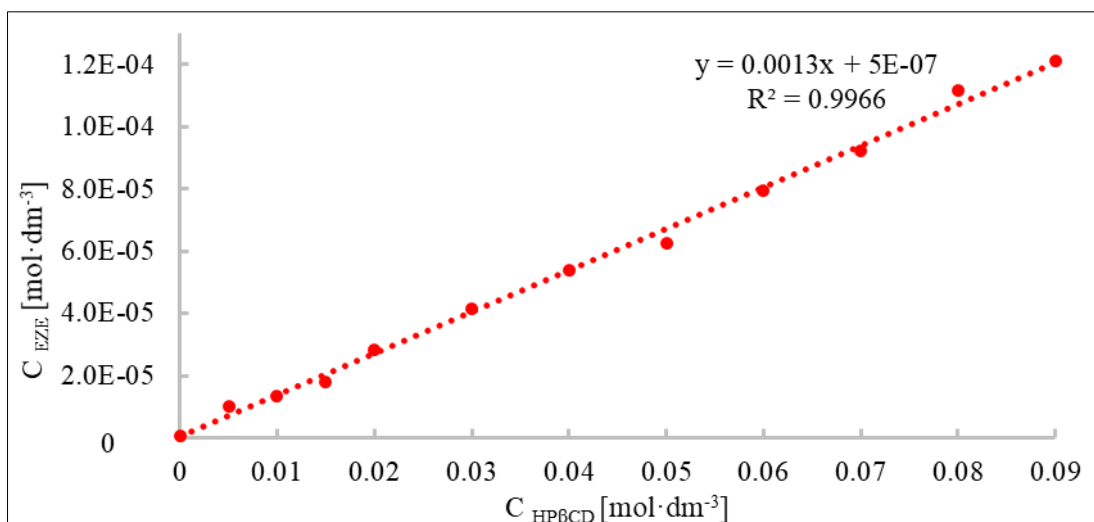
Rysunek UV3. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia β -cyklodekstryny (β CD) - seria 2



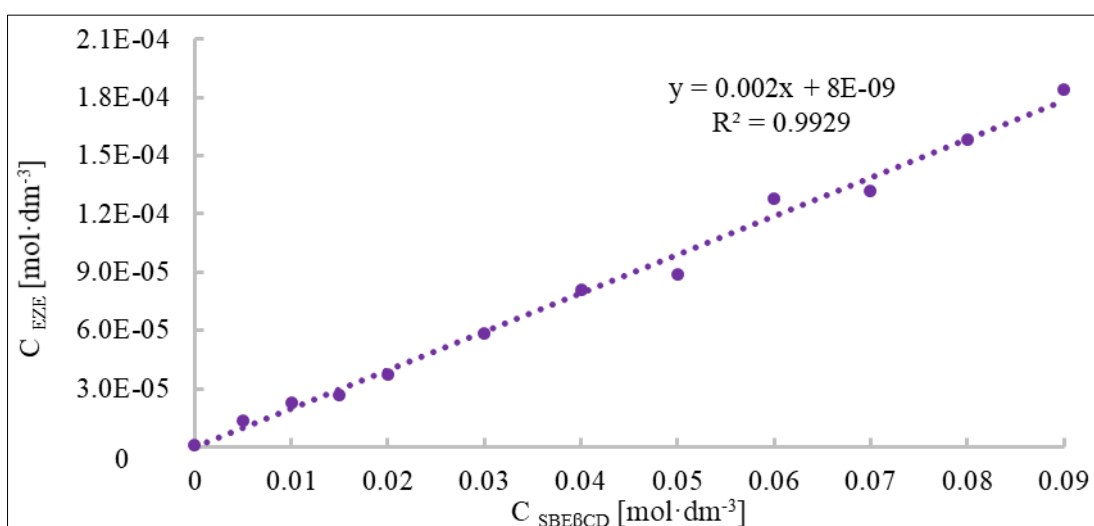
Rysunek UV4. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia β -cyklodekstryny (β CD) - seria 3



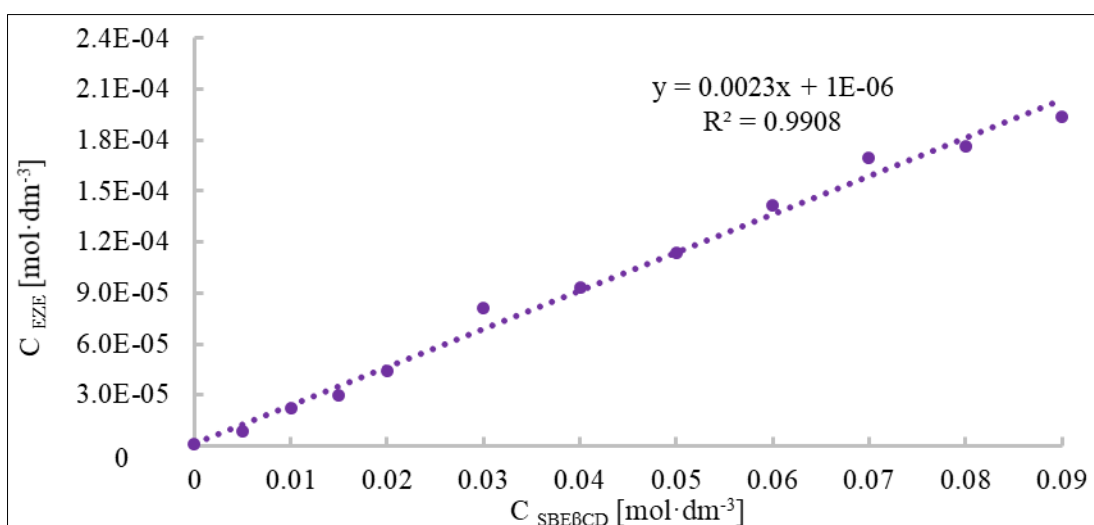
Rysunek UV5. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 2



Rysunek UV6. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 3



Rysunek UV7. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia sulfobutylo- β -cyklodekstryny (SBE β CD) - seria 2



Rysunek UV8. Zależność stężenia ezetymibu (EZE) od stężenia sulfobutylo- β -cyklodekstryny (SBE β CD) - seria 3

Tabela UV5. Wartości stałych K i wzrostu rozpuszczalności wyznaczone dla wszystkich serii kompleksów ezetymibu z cyklodekstrynami.

	K [dm ³ mol ⁻¹]	Wzrost rozpuszczalności do 15 mM	Wzrost rozpuszczalności do 90 mM
EZE + αCD – seria 1	119.88	3.20	12.47
EZE + αCD – seria 2	121.15	3.11	13.07
EZE + αCD – seria 3	133.54	2.27	13.67
EZE + βCD – seria 1	1468.22	22.59	-
EZE + βCD – seria 2	1212.91	20.62	-
EZE + βCD – seria 3	1291.98	20.38	-
EZE + HPβCD – seria 1	1588.06	21.74	142.78
EZE + HPβCD – seria 2	1537.11	20.45	139.35
EZE + HPβCD – seria 3	1601.68	21.46	145.08
EZE + SBEβCD – seria 1	2317.85	29.29	208.76
EZE + SBEβCD – seria 2	2327.00	31.64	215.64
EZE + SBEβCD – seria 3	2501.74	33.26	214.57

Tabela UV6. Wartości stężeń cilostazolu (CILO) dla α-cyklodekstryny.

C _{αCD} [mol·dm ⁻³]	C _{CILO} [mol·dm ⁻³]	C _{CILO} [mol·dm ⁻³]	C _{CILO} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	1.70E-04	1.90E-04	1.93E-04
0.080	1.48E-04	1.57E-04	1.61E-04
0.070	1.26E-04	1.34E-04	1.39E-04
0.060	1.02E-04	1.07E-04	1.09E-04
0.050	8.22E-05	8.05E-05	8.21E-05
0.040	6.65E-05	6.37E-05	6.31E-05
0.030	4.61E-05	4.29E-05	4.39E-05
0.020	3.05E-05	2.93E-05	3.02E-05
0.015	2.32E-05	2.43E-05	2.41E-05
0.010	1.75E-05	1.90E-05	1.89E-05
0.005	1.37E-05	1.40E-05	1.37E-05
0	9.35E-06	8.78E-06	8.01E-06

Tabela UV7. Wartości stężeń cilostazolu (CILO) dla β-cyklodekstryny.

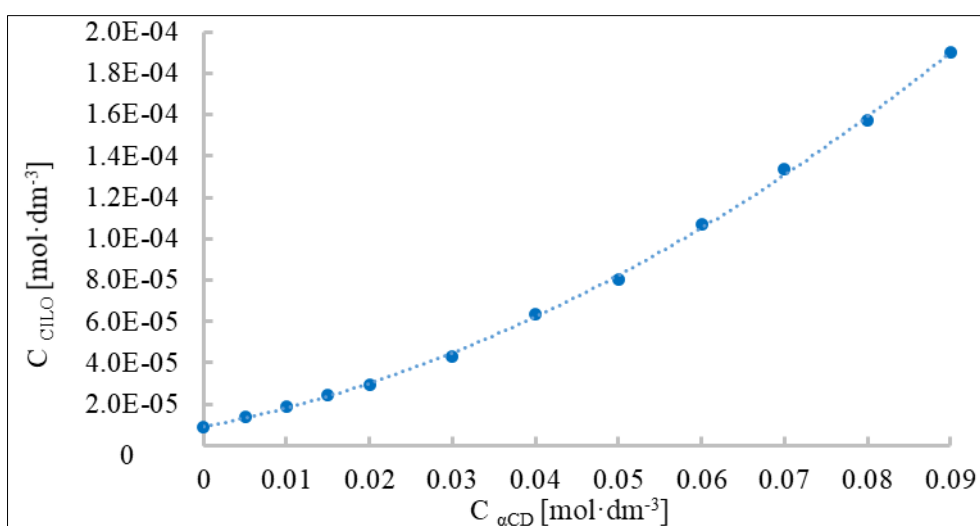
C _{βCD} [mol·dm ⁻³]	C _{CILO} [mol·dm ⁻³]	C _{CILO} [mol·dm ⁻³]	C _{CILO} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.015	1.19E-04	1.20E-04	1.19E-04
0.014	1.02E-04	1.15E-04	1.12E-04
0.013	9.70E-05	1.00E-04	1.02E-04
0.012	9.14E-05	9.37E-05	9.77E-05
0.011	7.64E-05	8.28E-05	8.33E-05
0.010	7.16E-05	7.23E-05	7.51E-05
0.009	6.50E-05	6.60E-05	6.54E-05
0.008	6.14E-05	5.66E-05	5.87E-05
0.007	5.10E-05	5.37E-05	5.24E-05
0.006	4.26E-05	4.58E-05	4.62E-05
0.005	3.50E-05	4.07E-05	3.98E-05
0.004	3.04E-05	2.95E-05	3.51E-05
0.003	2.50E-05	2.80E-05	2.63E-05
0.002	1.94E-05	1.77E-05	1.79E-05
0.001	1.35E-05	1.34E-05	1.35E-05
0	9.01E-06	8.78E-06	1.09E-05

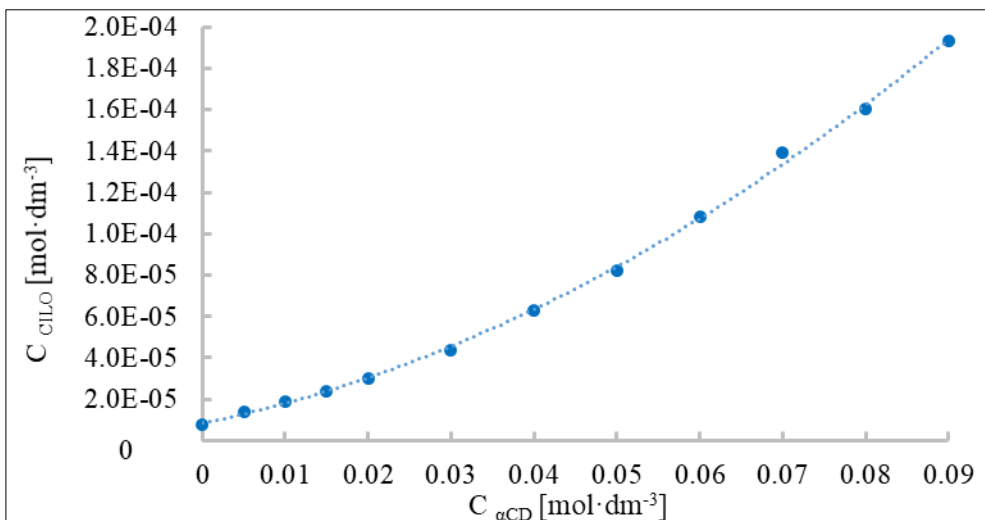
Tabela UV8. Wartości stężeń cilostrazolu (CILO) dla HP- β -cyklodekstryny.

$C_{\text{HP}\beta\text{CD}}$ [mol·dm ⁻³]	C_{CILO} [mol·dm ⁻³]		
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	7.41E-04	7.30E-04	7.39E-04
0.080	6.29E-04	6.33E-04	6.44E-04
0.070	5.35E-04	5.47E-04	5.57E-04
0.060	3.95E-04	4.04E-04	3.92E-04
0.050	3.09E-04	3.18E-04	2.81E-04
0.040	2.05E-04	2.03E-04	1.94E-04
0.030	1.50E-04	1.41E-04	1.38E-04
0.020	8.09E-05	7.34E-05	6.71E-05
0.015	6.26E-05	6.31E-05	6.21E-05
0.010	3.09E-05	3.09E-05	3.33E-05
0.005	1.65E-05	1.63E-05	1.68E-05
0	8.14E-06	8.50E-06	9.17E-06

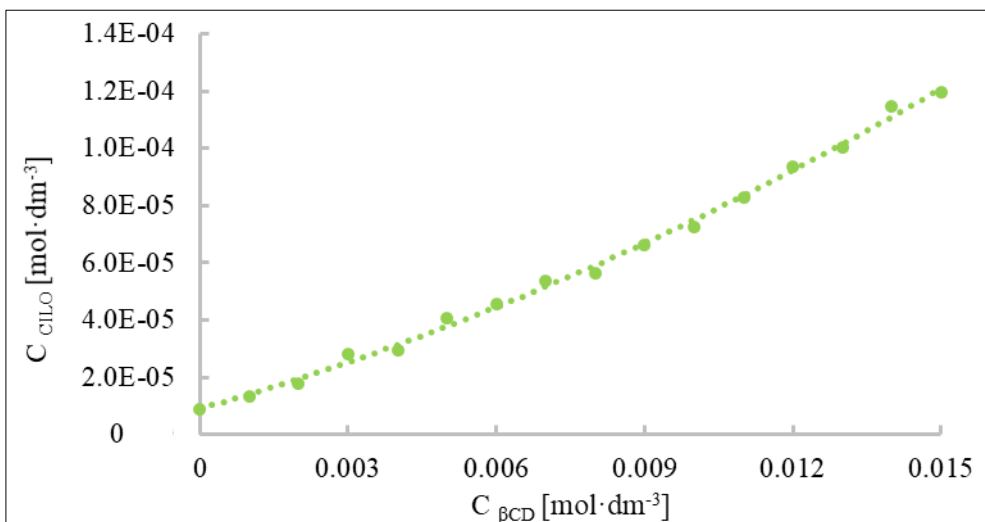
Tabela UV9. Wartości stężeń cilostrazolu (CILO) dla SBE- β -cyklodekstryny.

$C_{\text{SBE}\beta\text{CD}}$ [mol·dm ⁻³]	C_{CILO} [mol·dm ⁻³]		
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	1.49E-03	1.35E-03	1.45E-03
0.080	1.30E-03	1.20E-03	1.20E-03
0.070	1.02E-03	9.85E-04	9.87E-04
0.060	8.05E-04	7.86E-04	7.71E-04
0.050	6.42E-04	6.86E-04	6.54E-04
0.040	5.02E-04	5.30E-04	4.51E-04
0.030	3.32E-04	3.58E-04	3.82E-04
0.020	1.98E-04	2.13E-04	2.04E-04
0.015	1.45E-04	1.30E-04	1.42E-04
0.010	9.13E-05	8.77E-05	8.85E-05
0.005	4.70E-05	4.53E-05	4.69E-05
0	9.10E-06	8.60E-06	8.79E-06

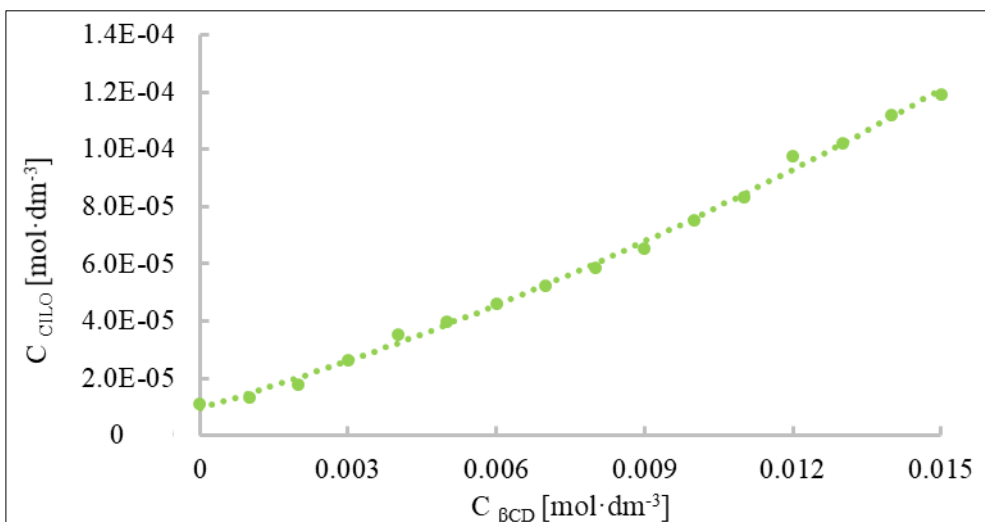
**Rysunek UV9.** Zależność stężenia cilostrazolu (CILO) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 2



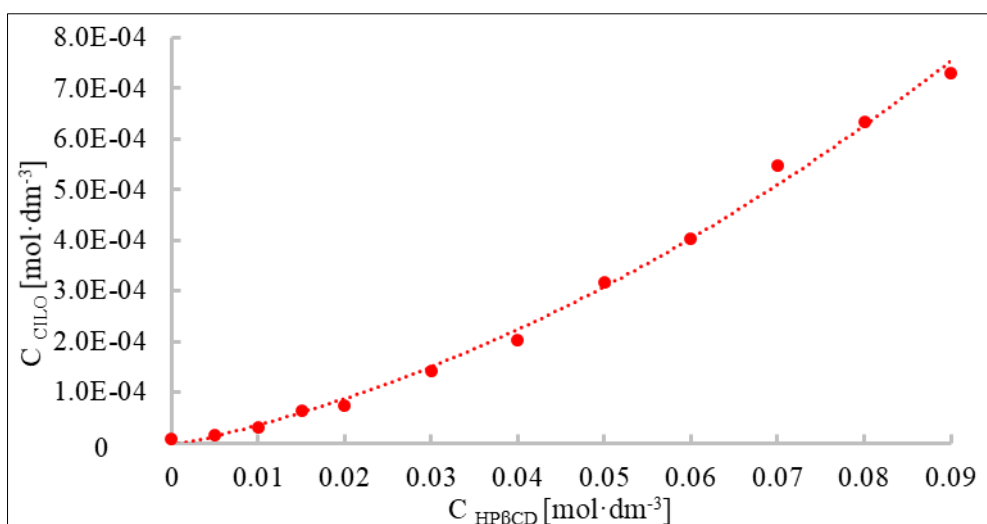
Rysunek UV10. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 3



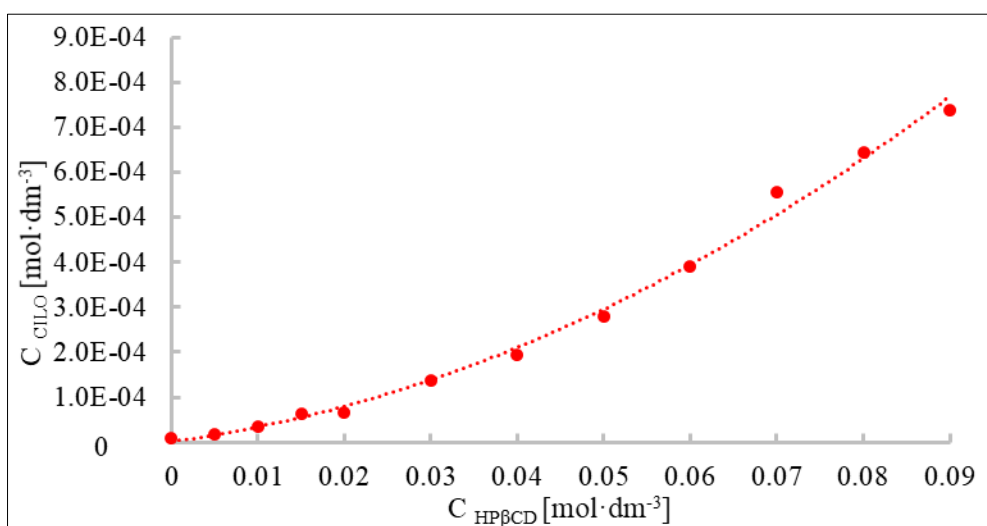
Rysunek UV11. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od stężenia β -cyklodekstryny (βCD) - seria 2



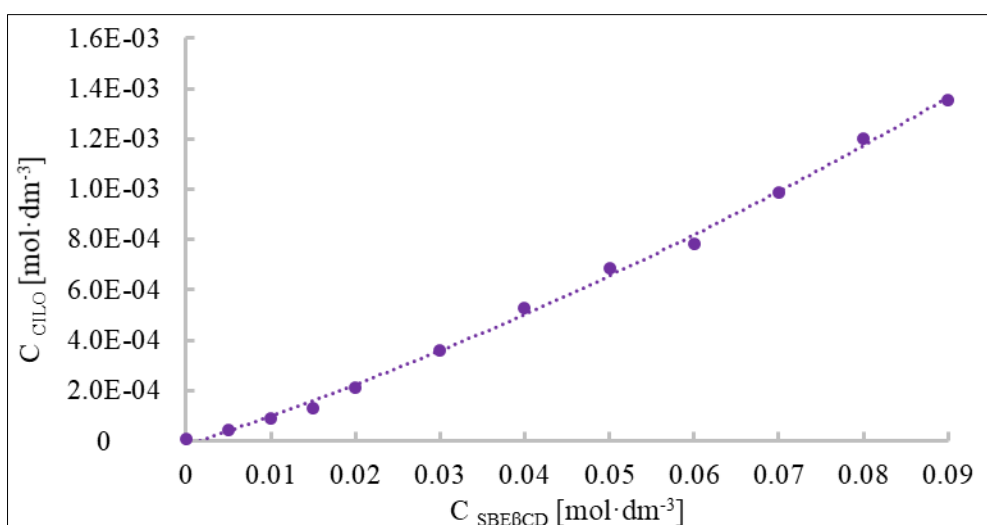
Rysunek UV12. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od stężenia β -cyklodekstryny (βCD) - seria 3



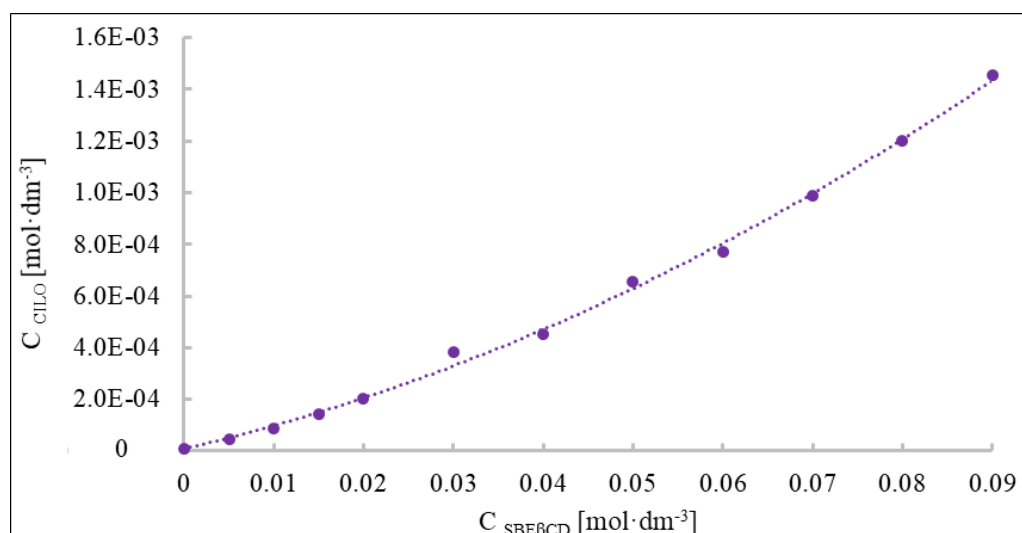
Rysunek UV13. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 2



Rysunek UV14. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 3



Rysunek UV15. Zależność stężenia cilostazolu (CILO) od stężenia sulfobutylo- β -cyklodekstryny (SBE β CD) - seria 2



Rysunek UV16. Zależność stężenia cilostrazolu (CILO) od stężenia sulfobutylo- β -cyklodekstryny (SBE β CD) - seria 3

Tabela UV10. Wartości stałych K i wzrostu rozpuszczalności wyznaczone dla wszystkich serii kompleksów cilostrazolu z cyklodekstrynami.

	K [dm ³ mol ⁻¹]	Wzrost rozpuszczalności do 15 mM	Wzrost rozpuszczalności do 90 mM
CILO + α CD – seria 1	-	2.48	18.14
CILO + α CD – seria 2	-	2.77	21.66
CILO + α CD – seria 3	-	3.01	24.14
CILO + β CD – seria 1	795.56	13.25	-
CILO + β CD – seria 2	849.23	13.61	-
CILO + β CD – seria 3	687.93	10.93	-
CILO + HP β CD – seria 1	-	7.69	91.08
CILO + HP β CD – seria 2	-	7.42	85.86
CILO + HP β CD – seria 3	-	6.77	80.62
CILO + SBE β CD – seria 1	-	15.93	163.93
CILO + SBE β CD – seria 2	-	15.13	157.18
CILO + SBE β CD – seria 3	-	16.15	165.35

Tabela UV11. Wartości stężeń flawanonu (FL0) dla α -cyklodekstryny

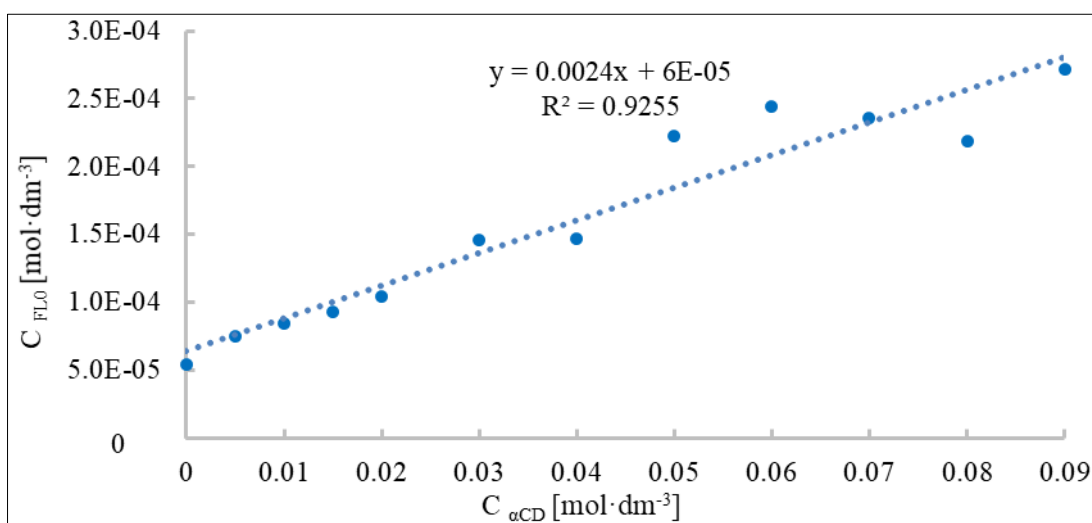
$C_{\alpha CD} [mol \cdot dm^{-3}]$	$C_{FL0} [mol \cdot dm^{-3}]$	$C_{FL0} [mol \cdot dm^{-3}]$	$C_{FL0} [mol \cdot dm^{-3}]$
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	2.5E-04	2.7E-04	2.6E-04
0.080	2.2E-04	2.2E-04	2.2E-04
0.070	2.0E-04	2.4E-04	2.0E-04
0.060	1.8E-04	2.4E-04	1.8E-04
0.050	1.5E-04	2.2E-04	1.5E-04
0.040	1.3E-04	1.5E-04	1.4E-04
0.030	1.0E-04	1.5E-04	1.1E-04
0.020	8.8E-05	1.0E-04	1.0E-04
0.015	8.3E-05	9.3E-05	8.9E-05
0.010	6.7E-05	8.5E-05	7.5E-05
0.005	6.3E-05	7.5E-05	6.8E-05
0	5.7E-05	5.4E-05	6.1E-05

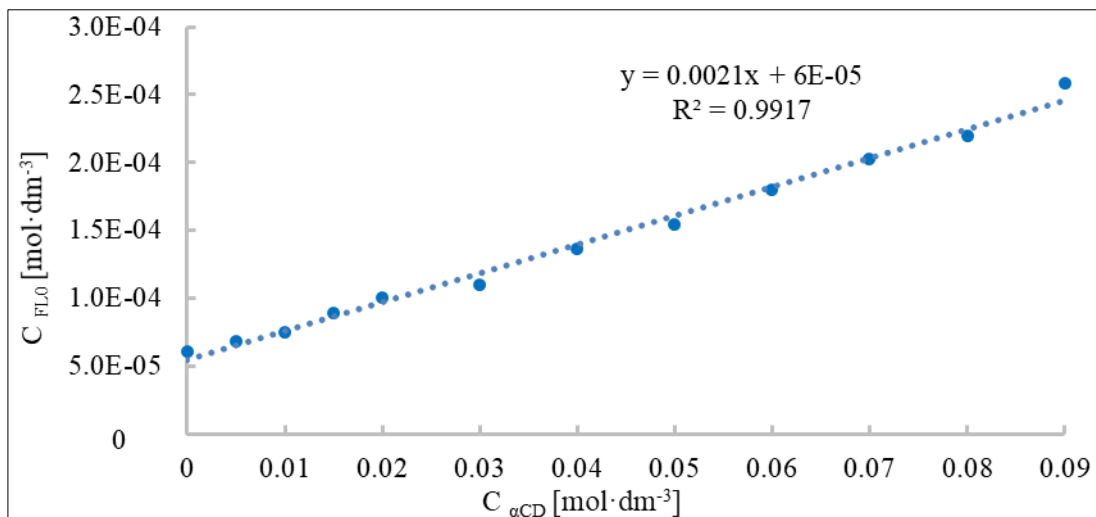
Tabela UV12. Wartości stężeń flawanonu (FL0) dla β -cyklodekstryny

$C_{\beta\text{CD}}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL0} [mol·dm ⁻³]	C_{FL0} [mol·dm ⁻³]	C_{FL0} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.015	3.7E-04	3.7E-04	4.1E-04
0.014	3.9E-04	3.6E-04	4.0E-04
0.013	3.5E-04	3.8E-04	4.8E-04
0.012	3.7E-04	3.8E-04	4.3E-04
0.011	3.8E-04	4.0E-04	4.4E-04
0.010	4.1E-04	4.4E-04	4.6E-04
0.009	4.3E-04	4.3E-04	4.6E-04
0.008	4.4E-04	4.5E-04	4.9E-04
0.007	4.3E-04	4.5E-04	4.8E-04
0.006	4.3E-04	4.8E-04	4.9E-04
0.005	3.5E-04	4.0E-04	4.1E-04
0.004	3.0E-04	3.2E-04	3.6E-04
0.003	2.2E-04	2.7E-04	2.8E-04
0.002	1.5E-04	2.0E-04	2.0E-04
0.001	1.1E-04	1.4E-04	1.4E-04
0	5.6E-05	5.5E-05	5.7E-05

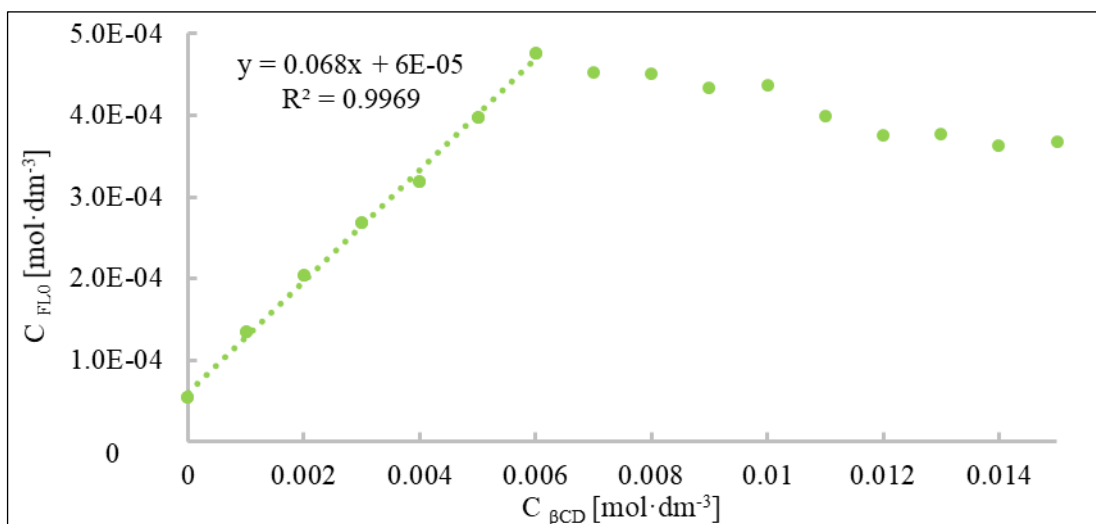
Tabela UV13. Wartości stężeń flawanonu (FL0) dla HP- β -cyklodekstryny

$C_{\text{HP}\beta\text{CD}}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL0} [mol·dm ⁻³]	C_{FL0} [mol·dm ⁻³]	C_{FL0} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	6.3E-03	5.2E-03	5.5E-03
0.080	5.1E-03	4.4E-03	4.6E-03
0.070	4.6E-03	4.0E-03	4.1E-03
0.060	3.7E-03	3.5E-03	3.3E-03
0.050	3.6E-03	2.5E-03	2.9E-03
0.040	2.7E-03	2.0E-03	2.3E-03
0.030	2.3E-03	1.7E-03	1.7E-03
0.020	1.3E-03	1.1E-03	1.1E-03
0.015	1.0E-03	9.7E-04	9.7E-04
0.010	6.9E-04	6.0E-04	7.0E-04
0.005	5.3E-04	4.1E-04	3.4E-04
0	5.9E-05	5.8E-05	5.5E-05

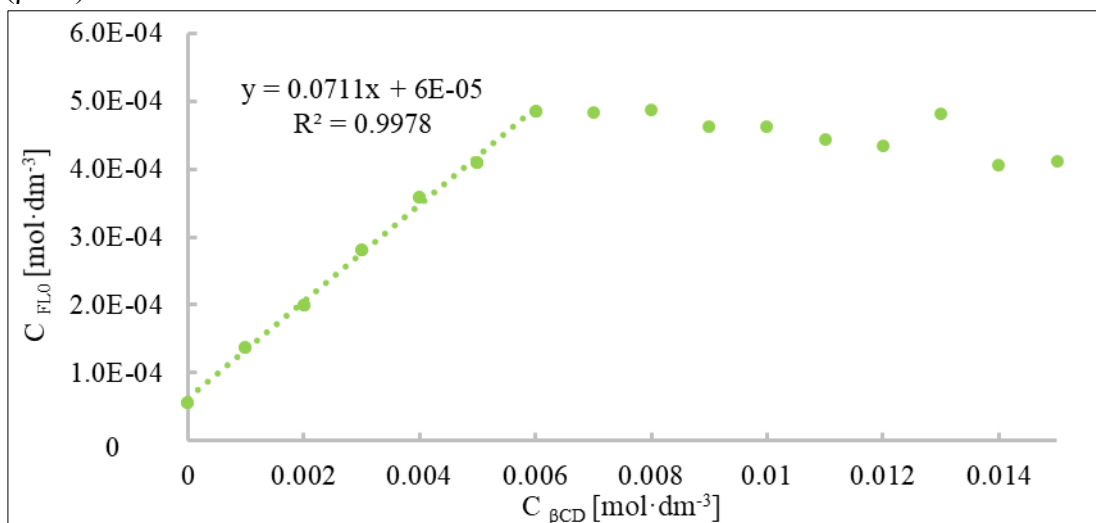
**Rysunek UV17.** Zależność stężenia flawanonu (FL0) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 2



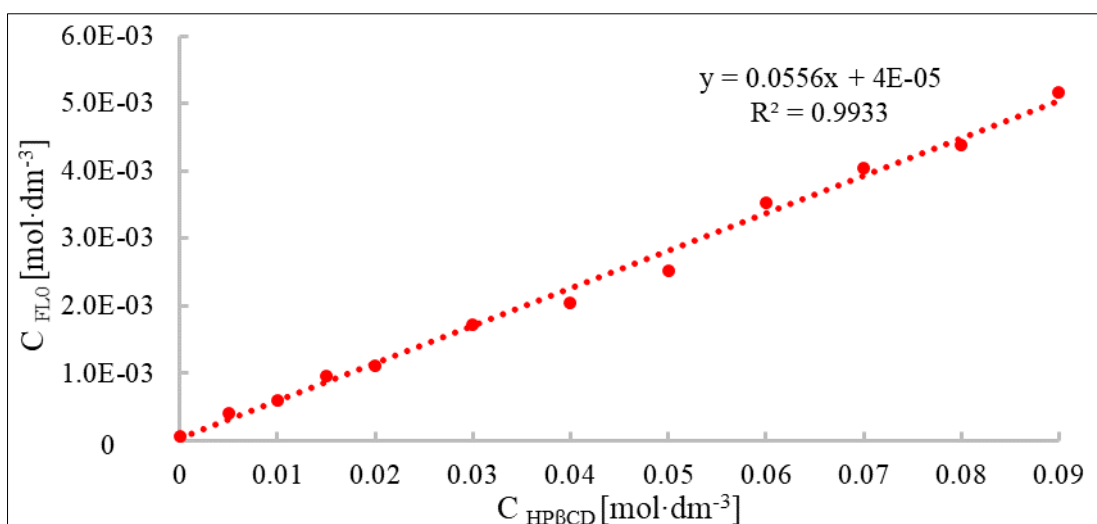
Rysunek UV18. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od stężenia α -cyklodekstryny (α CD) - seria 3



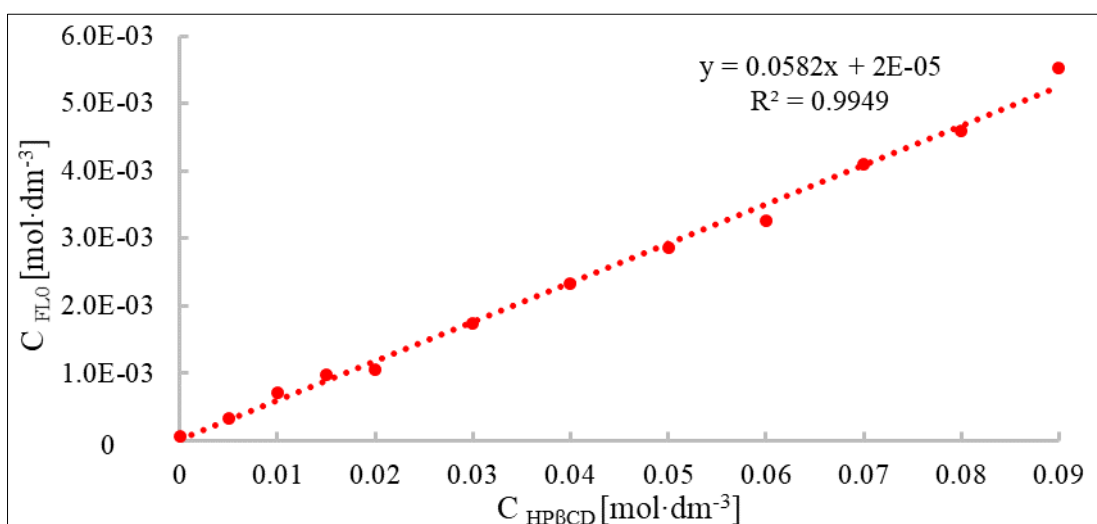
Rysunek UV19. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od stężenia β -cyklodekstryny (β CD) - seria 2



Rysunek UV20. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od stężenia β -cyklodekstryny (β CD) - seria 3



Rysunek UV21. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (β CD) - seria 2



Rysunek UV22. Zależność stężenia flawanonu (FL0) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (β CD) - seria 3

Tabela UV14. Wartości stałych K i wzrostu rozpuszczalności wyznaczone dla wszystkich serii kompleksów flawanonu (FL0) z cyklodekstrynami.

	K [dm ³ mol ⁻¹]	Wzrost rozpuszczalności do 15 mM	Wzrost rozpuszczalności do 90 mM
FL 0 + α CD – seria 1	38.95	1.47	4.49
FL 0 + α CD – seria 2	44.73	1.72	5.03
FL 0 + α CD – seria 3	34.84	1.47	4.25
FL 0 + β CD – seria 1	1188.40	7.67	-
FL 0 + β CD – seria 2	1338.91	8.73	-
FL 0 + β CD – seria 3	1331.54	8.45	-
FL 0 + HP β CD – seria 1	1180.52	17.61	106.37
FL 0 + HP β CD – seria 2	1014.62	16.68	89.16
FL 0 + HP β CD – seria 3	1125.28	17.67	100.65

Tabela UV15. Wartości stężeń 4'-metoksyflawanonu (FL1) dla α -cyklodekstryry

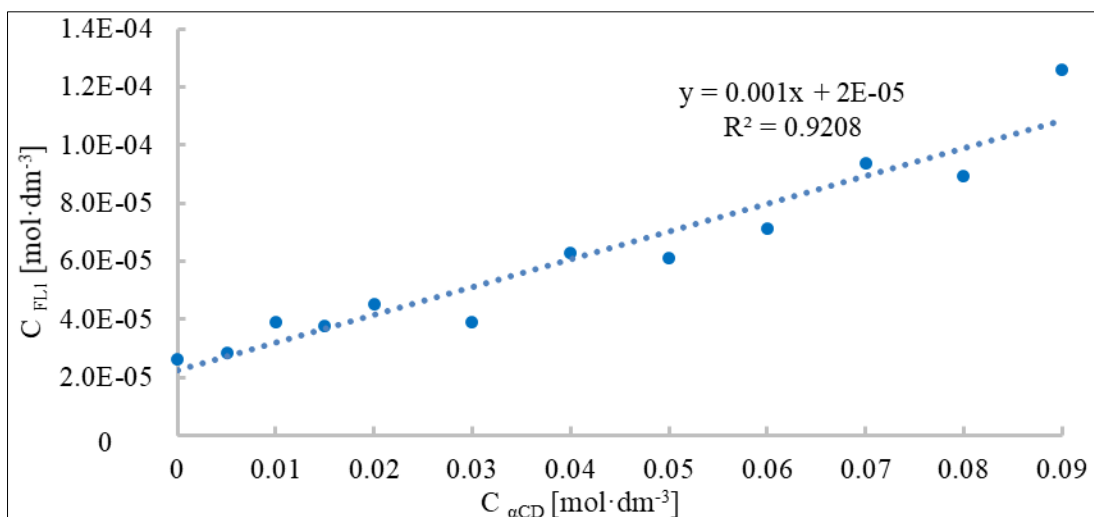
$C_{\alpha CD}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	1.3E-04	1.3E-04	1.1E-04
0.080	1.4E-04	8.9E-05	9.2E-05
0.070	9.2E-05	9.4E-05	8.1E-05
0.060	1.0E-04	7.1E-05	7.6E-05
0.050	7.6E-05	6.1E-05	5.9E-05
0.040	8.9E-05	6.3E-05	6.3E-05
0.030	7.0E-05	3.9E-05	6.1E-05
0.020	5.9E-05	4.5E-05	4.7E-05
0.015	5.4E-05	3.8E-05	4.4E-05
0.010	5.6E-05	3.9E-05	3.7E-05
0.005	4.3E-05	2.8E-05	3.1E-05
0	2.8E-05	2.6E-05	2.4E-05

Tabela UV16. Wartości stężeń 4'-metoksyflawanonu (FL1) dla β -cyklodekstryry

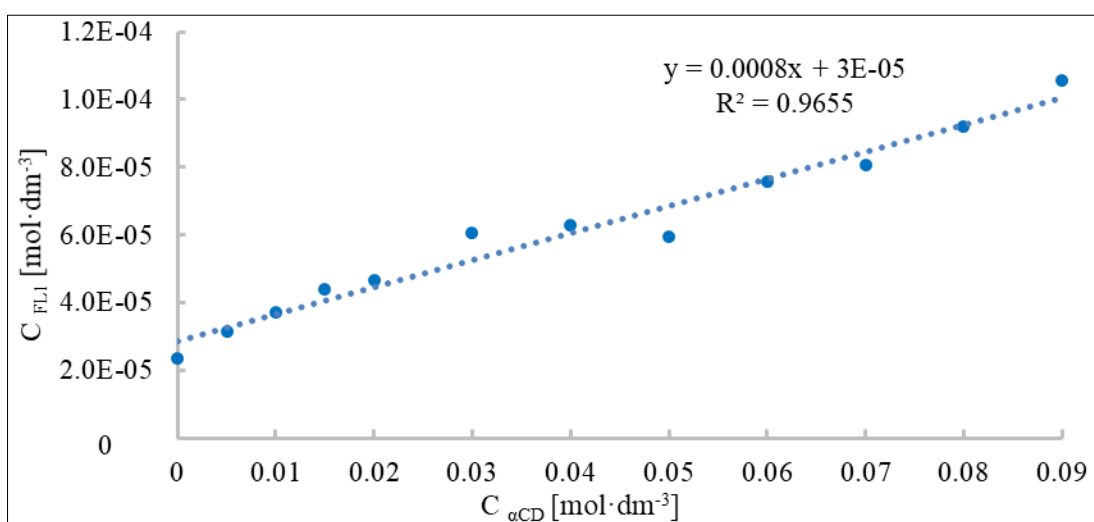
$C_{\beta CD}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.015	3.1E-04	3.2E-04	3.6E-04
0.014	3.2E-04	2.7E-04	3.7E-04
0.013	3.3E-04	3.0E-04	3.3E-04
0.012	3.8E-04	2.9E-04	3.4E-04
0.011	3.8E-04	3.1E-04	3.5E-04
0.010	3.6E-04	3.3E-04	3.7E-04
0.009	3.5E-04	3.5E-04	3.3E-04
0.008	3.4E-04	3.4E-04	3.2E-04
0.007	3.0E-04	3.1E-04	2.8E-04
0.006	2.5E-04	2.6E-04	2.6E-04
0.005	2.1E-04	2.2E-04	2.2E-04
0.004	1.9E-04	1.8E-04	1.9E-04
0.003	1.5E-04	1.3E-04	1.4E-04
0.002	1.1E-04	9.6E-05	9.8E-05
0.001	7.5E-05	6.1E-05	6.2E-05
0	2.6E-05	2.8E-05	2.6E-05

Tabela UV17. Wartości stężeń 4'-metoksyflawanonu (FL1) dla HP- β -cyklodekstryry

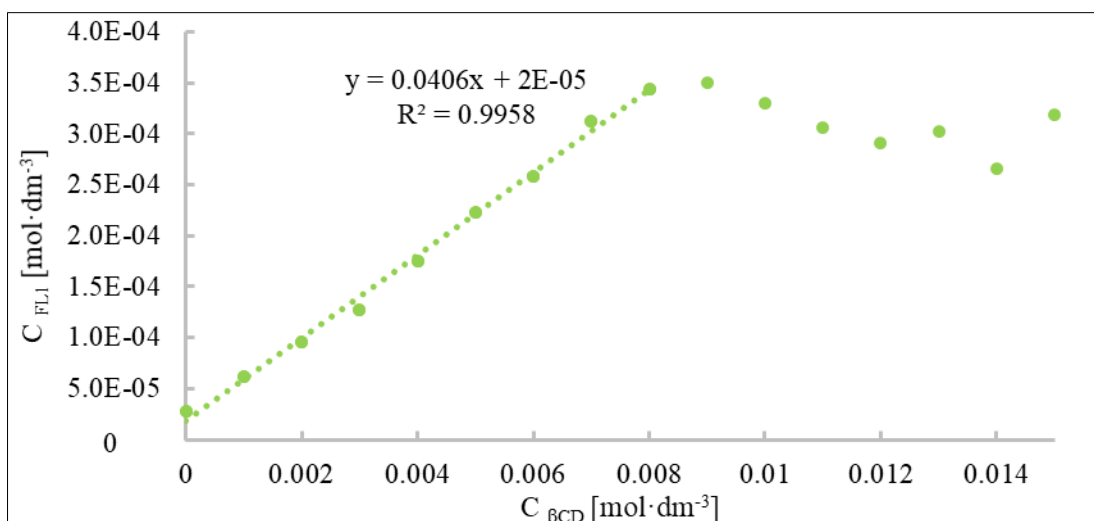
$C_{HP\beta CD}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]	C_{FL1} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	4.1E-03	3.9E-03	3.5E-03
0.080	3.6E-03	3.5E-03	3.4E-03
0.070	3.2E-03	3.0E-03	3.0E-03
0.060	3.0E-03	2.6E-03	2.4E-03
0.050	2.5E-03	2.4E-03	2.1E-03
0.040	2.0E-03	1.8E-03	1.4E-03
0.030	1.6E-03	1.5E-03	1.3E-03
0.020	1.1E-03	1.1E-03	7.9E-04
0.015	8.2E-04	7.9E-04	6.7E-04
0.010	5.8E-04	6.4E-04	4.2E-04
0.005	3.0E-04	2.9E-04	3.7E-04
0	3.2E-05	2.8E-05	2.7E-05



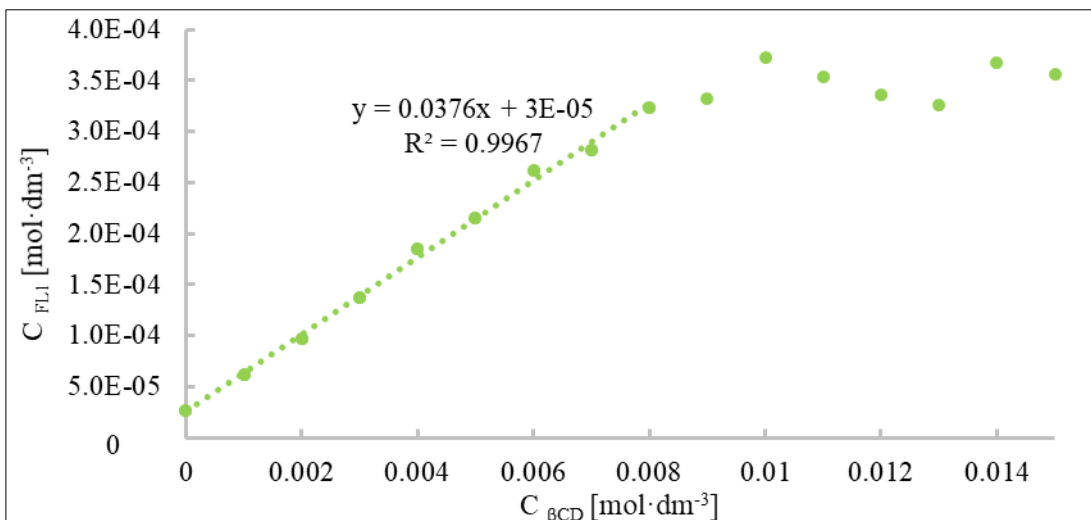
Rysunek UV23. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 2



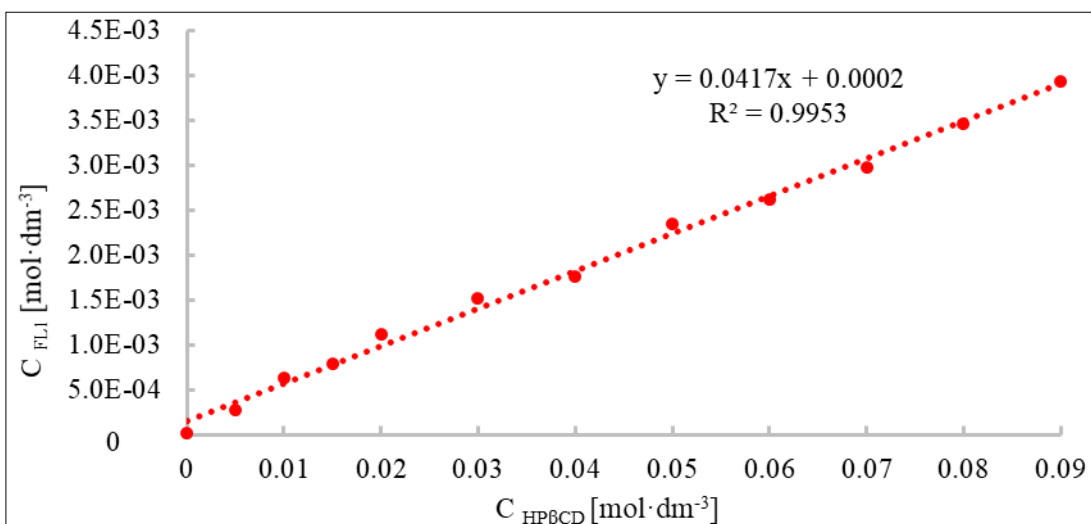
Rysunek UV24. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 3



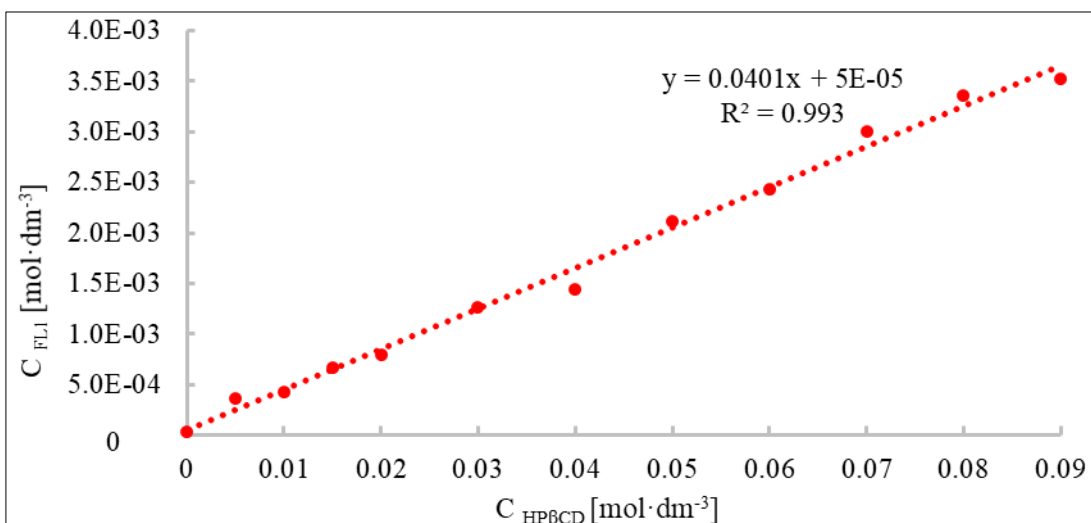
Rysunek UV25. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od stężenia β -cyklodekstryny (βCD) - seria 2



Rysunek UV26. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od stężenia β -cyklodekstryny (βCD) - seria 3



Rysunek UV27. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP βCD) - seria 2



Rysunek UV28. Zależność stężenia 4'-metoksyflawanonu (FL1) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP βCD) - seria 3

Tabela UV18. Wartości stałych K i wzrostu rozpuszczalności wyznaczone dla wszystkich serii kompleksów 4'-metoksyflawanonu (FL1) z cyklodekstrynami.

	K [dm ³ mol ⁻¹]	Wzrost rozpuszczalności do 15 mM	Wzrost rozpuszczalności do 90 mM
FL 1 + α CD – seria 1	37.16	1.95	4.55
FL 1 + α CD – seria 2	36.06	1.43	4.76
FL 1 + α CD – seria 3	33.71	1.84	4.44
FL 1 + β CD – seria 1	1540.22	13.23	-
FL 1 + β CD – seria 2	1508.30	12.51	-
FL 1 + β CD – seria 3	1493.96	12.68	-
FL 1 + HP β CD – seria 1	1452.51	25.44	128.69
FL 1 + HP β CD – seria 2	1528.67	27.87	138.40
FL 1 + HP β CD – seria 3	1546.14	24.49	128.58

Tabela UV19. Wartości stężeń 4'-chloroflawanonu (FL2) dla α -cyklodekstryny

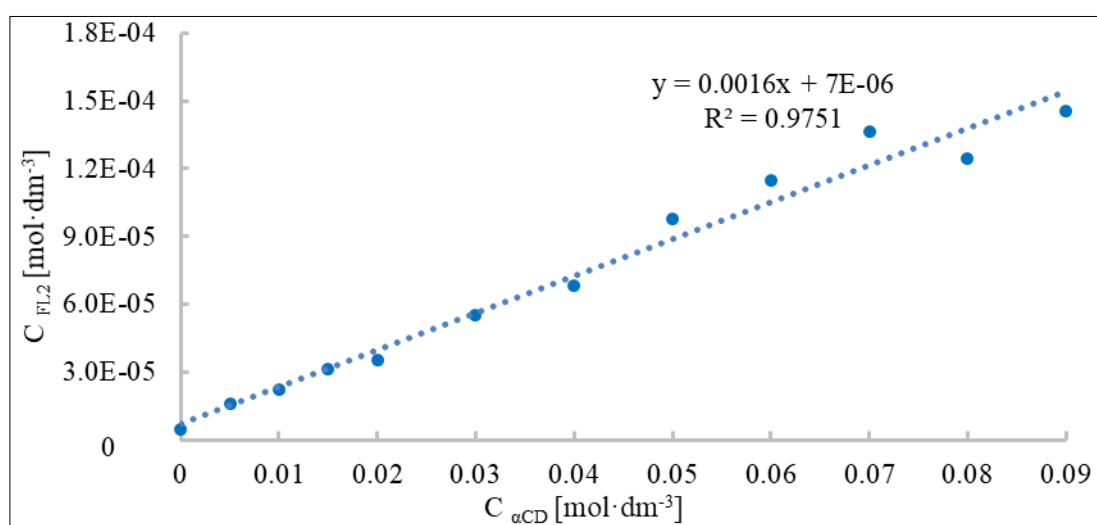
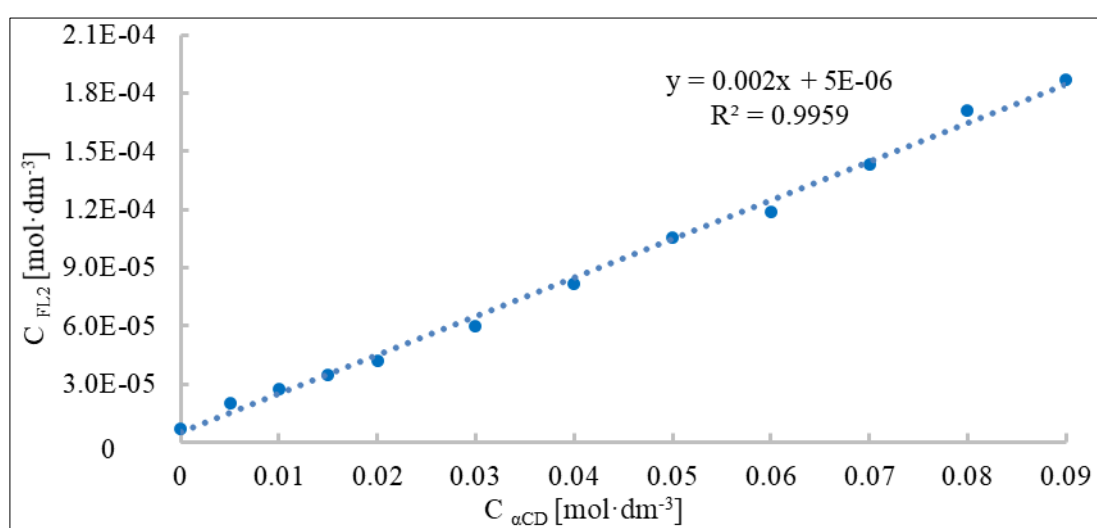
C _{αCD} [mol·dm ⁻³]	C _{FL2} [mol·dm ⁻³]	C _{FL2} [mol·dm ⁻³]	C _{FL2} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	1.5E-04	1.5E-04	1.9E-04
0.080	1.3E-04	1.2E-04	1.7E-04
0.070	1.1E-04	1.4E-04	1.4E-04
0.060	9.0E-05	1.2E-04	1.2E-04
0.050	8.8E-05	9.8E-05	1.1E-04
0.040	6.0E-05	6.9E-05	8.1E-05
0.030	3.8E-05	5.5E-05	6.0E-05
0.020	2.4E-05	3.6E-05	4.2E-05
0.015	2.3E-05	3.2E-05	3.5E-05
0.010	1.7E-05	2.2E-05	2.7E-05
0.005	1.5E-05	1.6E-05	2.0E-05
0	5.4E-06	5.0E-06	7.2E-06

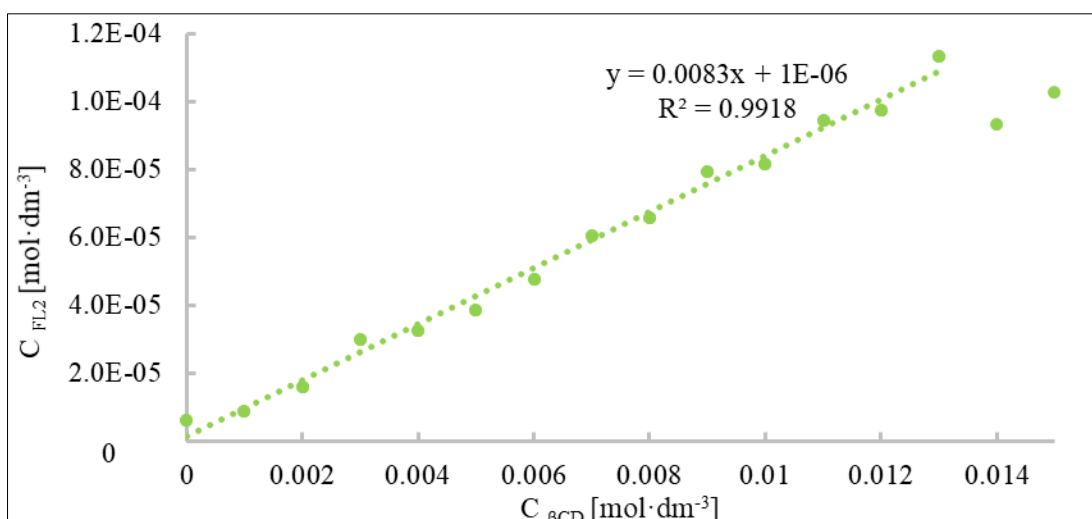
Tabela UV20. Wartości stężeń 4'-chloroflawanonu (FL2) dla β -cyklodekstryny

C _{βCD} [mol·dm ⁻³]	C _{FL2} [mol·dm ⁻³]	C _{FL2} [mol·dm ⁻³]	C _{FL2} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.015	8.0E-05	1.0E-04	8.8E-05
0.014	8.4E-05	9.3E-05	9.3E-05
0.013	8.9E-05	1.1E-04	8.2E-05
0.012	8.2E-05	9.8E-05	7.8E-05
0.011	7.8E-05	9.4E-05	7.7E-05
0.010	6.9E-05	8.2E-05	7.1E-05
0.009	6.2E-05	7.9E-05	6.9E-05
0.008	5.7E-05	6.6E-05	5.4E-05
0.007	4.9E-05	6.0E-05	4.7E-05
0.006	3.4E-05	4.8E-05	4.8E-05
0.005	3.0E-05	3.9E-05	4.1E-05
0.004	2.1E-05	3.2E-05	3.7E-05
0.003	2.4E-05	3.0E-05	1.9E-05
0.002	1.3E-05	1.6E-05	8.7E-06
0.001	8.5E-06	8.8E-06	9.9E-06
0	5.4E-06	6.2E-06	5.0E-06

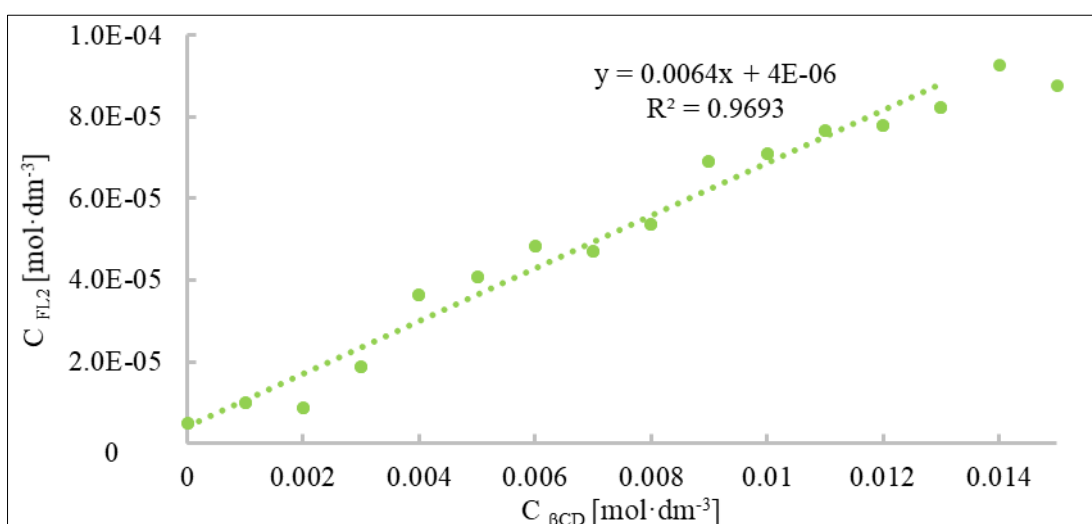
Tabela UV21. Wartości stężeń 4'-chloroflawanonu dla HP- β -cyklodekstryny

$C_{\text{HP}\beta\text{CD}}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL2} [mol·dm ⁻³]	C_{FL2} [mol·dm ⁻³]	C_{FL2} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	5.1E-04	6.0E-04	6.3E-04
0.080	4.7E-04	5.3E-04	5.2E-04
0.070	4.0E-04	4.5E-04	4.8E-04
0.060	3.7E-04	3.9E-04	3.9E-04
0.050	3.2E-04	3.1E-04	3.7E-04
0.040	2.6E-04	2.8E-04	2.6E-04
0.030	2.0E-04	1.9E-04	2.2E-04
0.020	1.3E-04	1.5E-04	1.7E-04
0.015	9.0E-05	1.0E-04	1.3E-04
0.010	5.4E-05	7.5E-05	7.5E-05
0.005	3.3E-05	4.0E-05	3.6E-05
0	4.8E-06	5.1E-06	6.0E-06

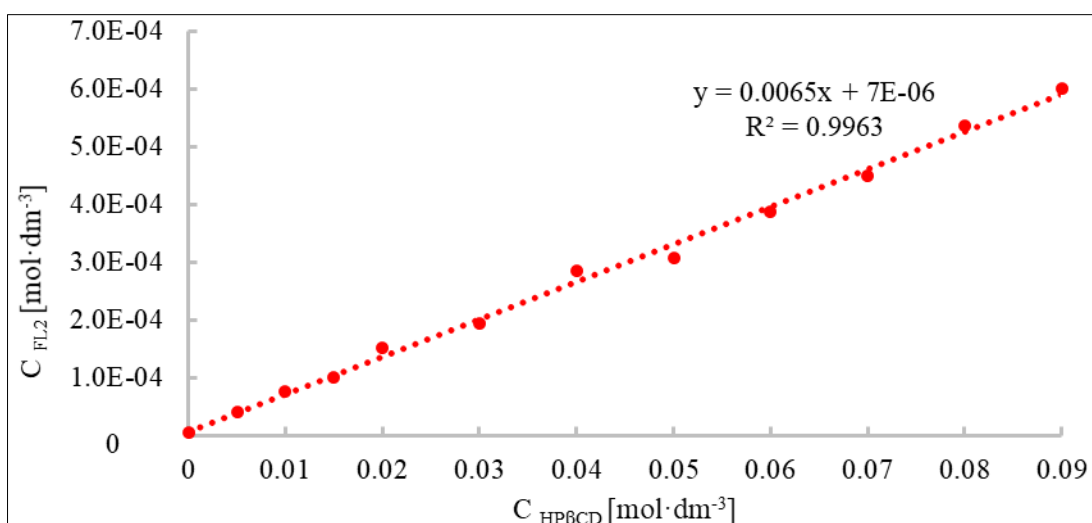
**Rysunek UV29.** Zależność stężenia 4'-chloroflawanonu (FL2) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 2**Rysunek UV30.** Zależność stężenia 4'-chloroflawanonu (FL2) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 3



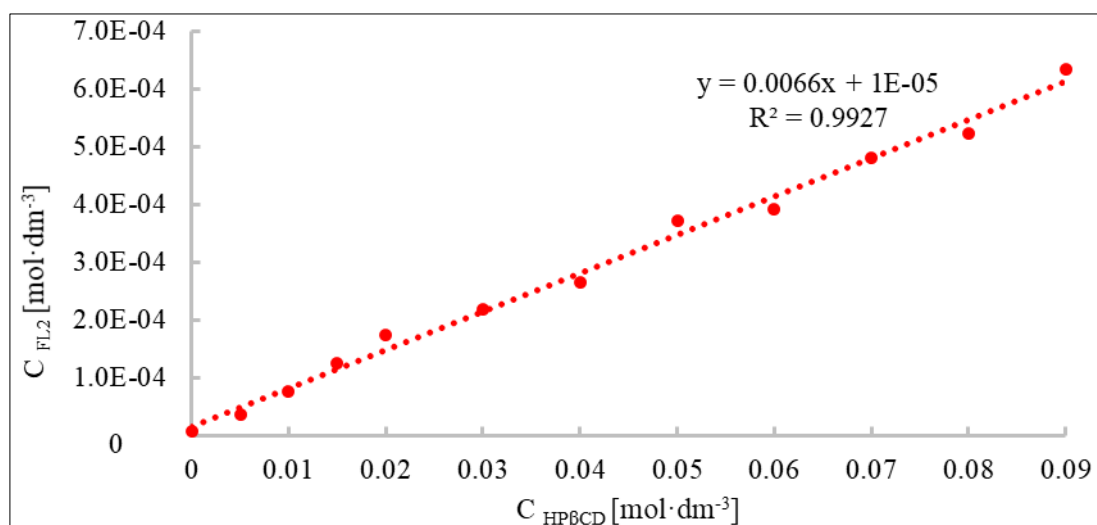
Rysunek UV31. Zależność stężenia 4'-chloroflwanonu (FL2) od stężenia β -cyklodekstryny (β CD) - seria 2



Rysunek UV32. Zależność stężenia 4'-chloroflwanonu (FL2) od stężenia β -cyklodekstryny (β CD) - seria 3



Rysunek UV33. Zależność stężenia 4'-chloroflwanonu (FL2) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 2



Rysunek UV34. Zależność stężenia 4'-chloroflawnonu (FL2) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 3

Tabela UV22. Wartości stałych K i wzrostu rozpuszczalności wyznaczone dla wszystkich serii kompleksów 4'-chloroflawnonu (FL2) z cyklodekstrynami.

	K [dm ³ mol ⁻¹]	Wzrost rozpuszczalności do 15 mM	Wzrost rozpuszczalności do 90 mM
FL 2 + α CD – seria 1	294.99	4.25	27.24
FL 2 + α CD – seria 2	323.91	6.26	28.24
FL 2 + α CD – seria 3	279.21	4.85	26.14
FL 2 + β CD – seria 1	1070.05	16.50	-
FL 2 + β CD – seria 2	1322.89	18.29	-
FL 2 + β CD – seria 3	1363.06	16.38	-
FL 2 + HP β CD – seria 1	1199.54	18.69	105.39
FL 2 + HP β CD – seria 2	1271.37	19.45	117.04
FL 2 + HP β CD – seria 3	1086.76	20.73	104.80

Tabela UV23. Wartości stężeń 7-metoksyflawnonu (FL3) dla α -cyklodekstryny

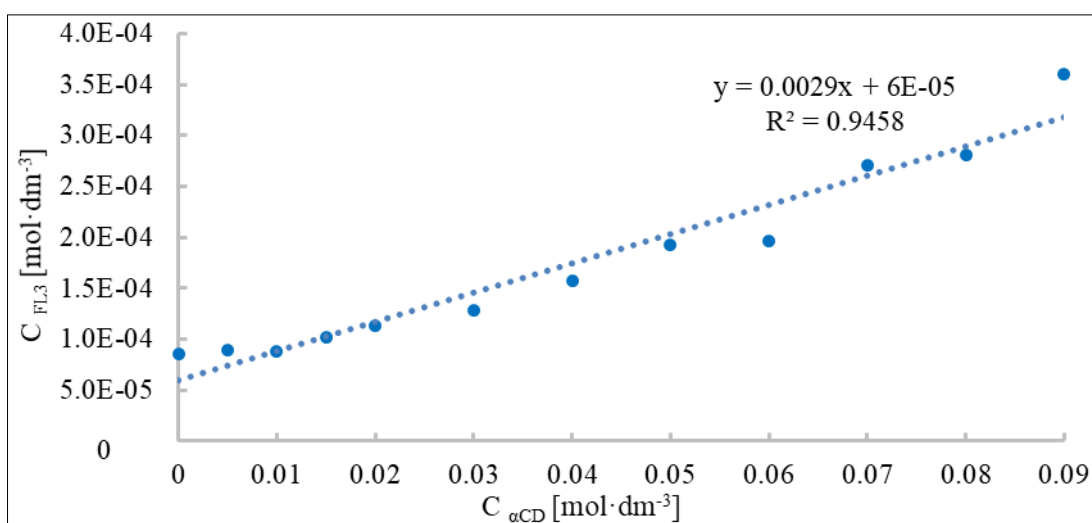
C _{αCD} [mol·dm ⁻³]	C _{FL3} [mol·dm ⁻³]	C _{FL3} [mol·dm ⁻³]	C _{FL3} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	3.3E-04	3.6E-04	3.3E-04
0.080	3.1E-04	2.8E-04	3.0E-04
0.070	2.8E-04	2.7E-04	2.6E-04
0.060	2.5E-04	2.0E-04	2.6E-04
0.050	1.9E-04	1.9E-04	2.4E-04
0.040	2.2E-04	1.6E-04	1.3E-04
0.030	1.5E-04	1.3E-04	1.2E-04
0.020	1.3E-04	1.1E-04	1.2E-04
0.015	1.3E-04	1.0E-04	1.1E-04
0.010	9.3E-05	8.8E-05	9.2E-05
0.005	9.5E-05	8.9E-05	8.8E-05
0	9.3E-05	8.6E-05	9.3E-05

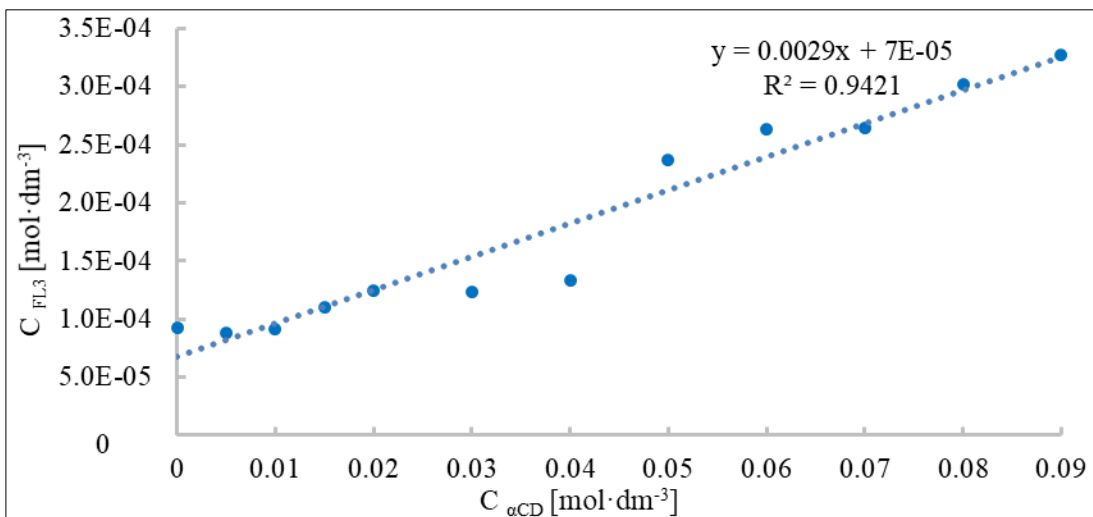
Tabela UV24. Wartości stężeń 7-metoksyflawanonu (FL3) dla β -cyklodekstryny

$C_{\beta\text{CD}}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL3} [mol·dm ⁻³]	C_{FL3} [mol·dm ⁻³]	C_{FL3} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.015	9.8E-04	1.1E-03	1.4E-03
0.014	1.1E-03	1.0E-03	1.3E-03
0.013	8.7E-04	8.8E-04	1.2E-03
0.012	9.0E-04	7.9E-04	1.1E-03
0.011	8.4E-04	7.8E-04	8.8E-04
0.010	6.7E-04	6.4E-04	8.6E-04
0.009	5.0E-04	6.4E-04	7.0E-04
0.008	5.6E-04	6.4E-04	7.1E-04
0.007	5.8E-04	6.7E-04	6.4E-04
0.006	4.0E-04	4.2E-04	7.4E-04
0.005	3.7E-04	4.0E-04	7.0E-04
0.004	4.9E-04	5.3E-04	4.0E-04
0.003	3.3E-04	3.9E-04	2.9E-04
0.002	2.9E-04	2.0E-04	1.4E-04
0.001	1.7E-04	2.0E-04	2.0E-04
0	8.3E-05	1.0E-04	9.3E-05

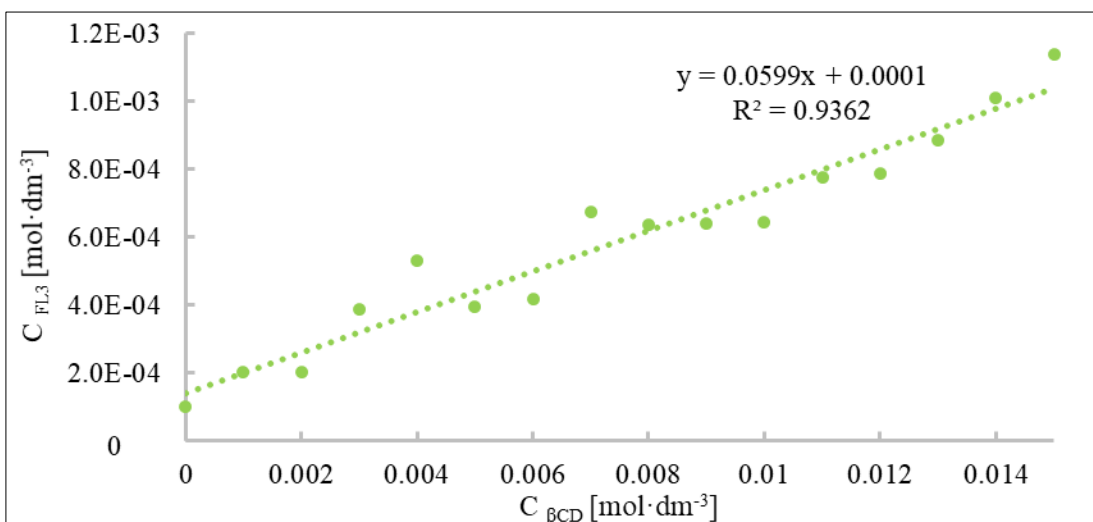
Tabela UV25. Wartości stężeń 7-metoksyflawanonu dla HP- β -cyklodekstryny

$C_{\text{HP}\beta\text{CD}}$ [mol·dm ⁻³]	C_{FL3} [mol·dm ⁻³]	C_{FL3} [mol·dm ⁻³]	C_{FL3} [mol·dm ⁻³]
	seria 1	seria 2	seria 3
0.090	5.77E-03	4.3E-03	4.4E-03
0.080	5.13E-03	3.9E-03	3.8E-03
0.070	4.06E-03	3.0E-03	3.3E-03
0.060	3.22E-03	2.4E-03	2.6E-03
0.050	2.77E-03	2.1E-03	2.2E-03
0.040	2.06E-03	1.7E-03	1.7E-03
0.030	1.72E-03	1.2E-03	1.3E-03
0.020	1.29E-03	1.0E-03	8.2E-04
0.015	1.02E-03	7.9E-04	8.3E-04
0.010	1.14E-03	5.3E-04	5.6E-04
0.005	8.28E-04	3.4E-04	4.1E-04
0	1.14E-04	8.0E-05	8.0E-05

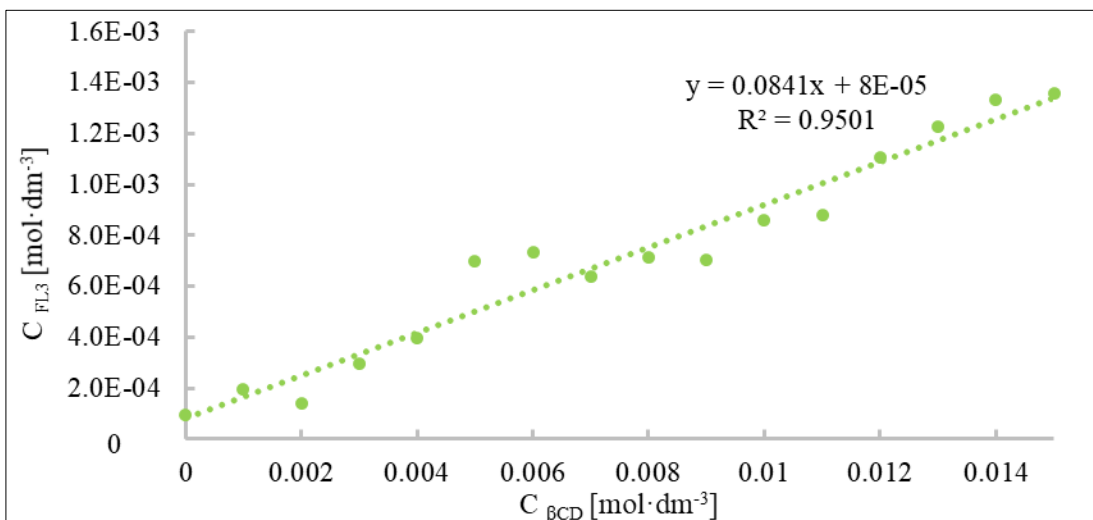
**Rysunek UV35.** Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 2



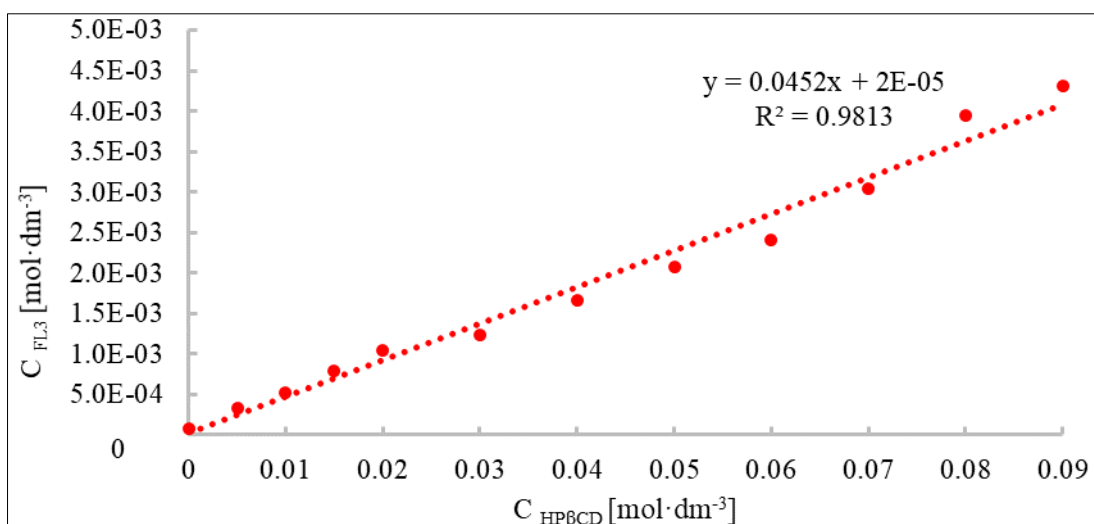
Rysunek UV36. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od stężenia α -cyklodekstryny (αCD) - seria 3



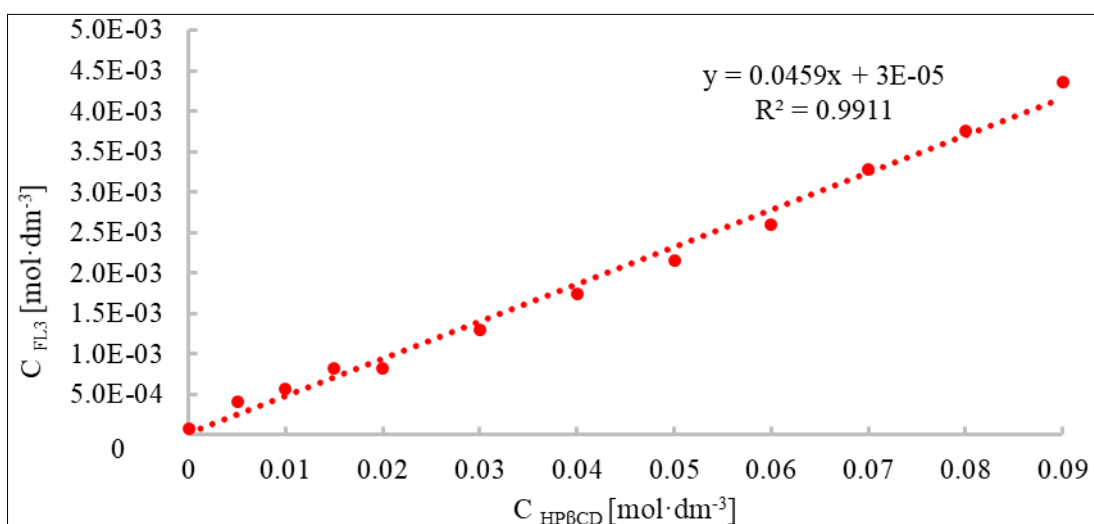
Rysunek UV37. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od stężenia β -cyklodekstryny (βCD) - seria 2



Rysunek UV38. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od stężenia β -cyklodekstryny (βCD) - seria 3



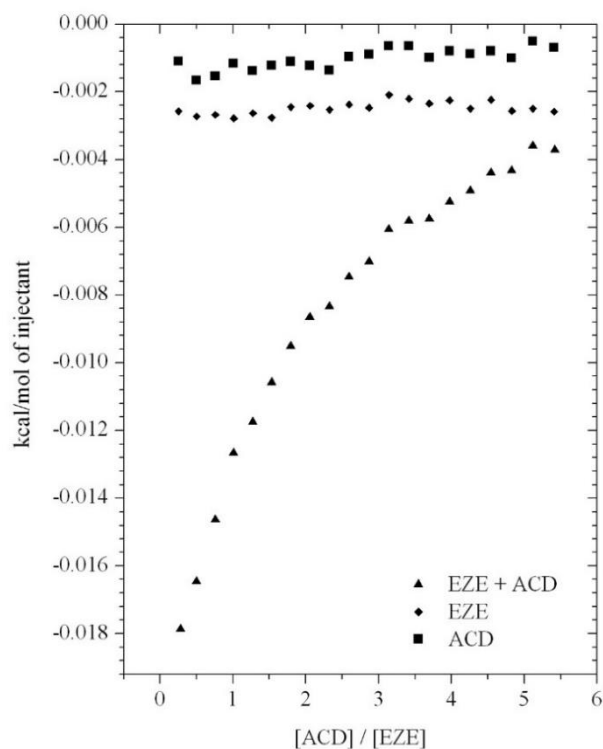
Rysunek UV39. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 2



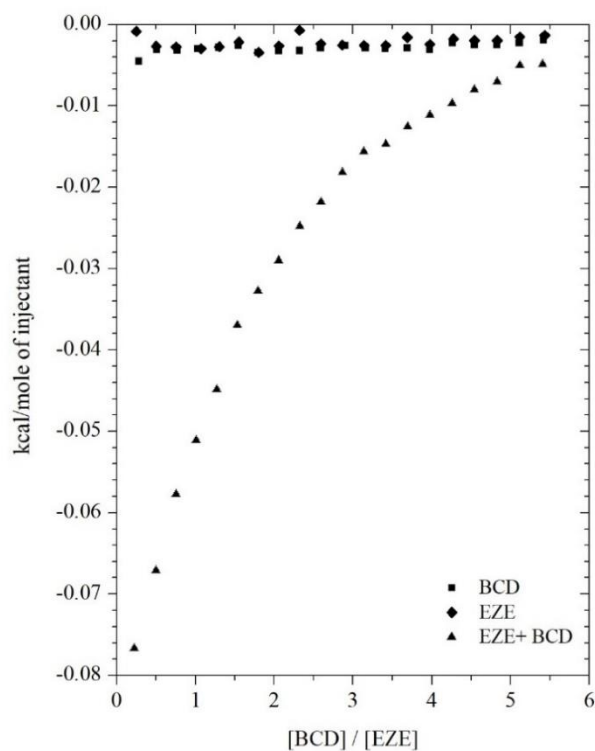
Rysunek UV40. Zależność stężenia 7-metoksyflawanonu (FL3) od stężenia hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) - seria 3

Tabela UV26. Wartości stałych K i wzrostu rozpuszczalności wyznaczone dla wszystkich serii kompleksów 7-metoksyflawanonu (FL3) z cyklodekstrynami.

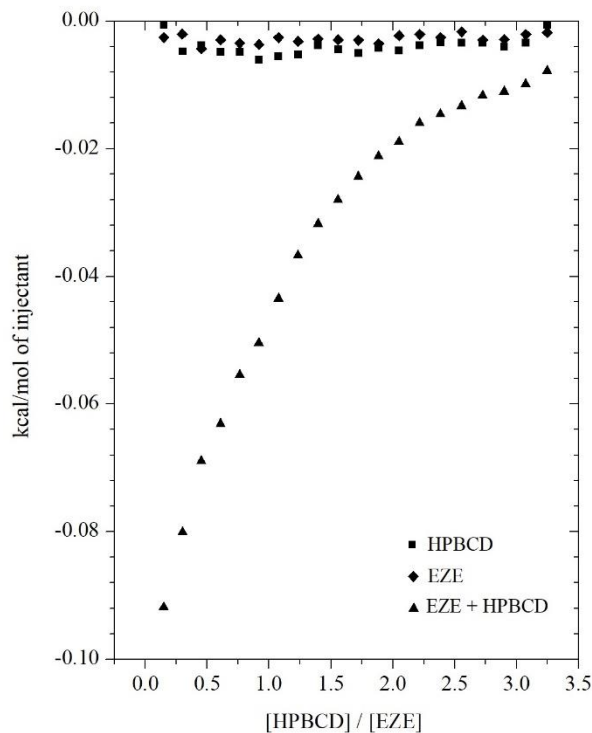
	K [dm ³ mol ⁻¹]	Wzrost rozpuszczalności do 15 mM	Wzrost rozpuszczalności do 90 mM
FL 3 + α CD – seria 1	30.57	1.36	3.61
FL 3 + α CD – seria 2	33.57	1.20	4.21
FL 3 + α CD – seria 3	31.15	1.19	3.53
FL 3 + β CD – seria 1	771.04	11.81	-
FL 3 + β CD – seria 2	628.97	11.17	-
FL 3 + β CD – seria 3	987.34	14.60	-
FL 3 + HP β CD – seria 1	534.23	8.92	50.44
FL 3 + HP β CD – seria 2	591.06	9.87	53.78
FL 3 + HP β CD – seria 3	621.09	10.41	54.87



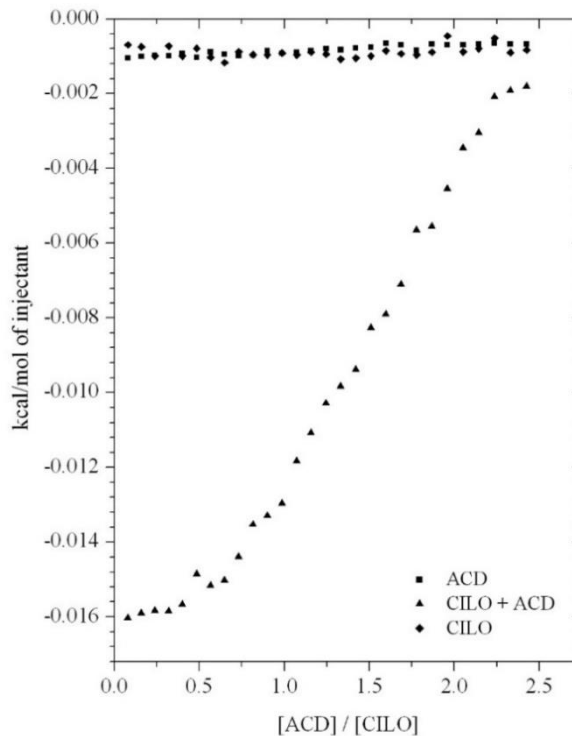
Rysunek ITC1. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu α -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczanie roztworu ezetymibu w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu ezetymibu roztworem α -cyklodekstryny w DMSO



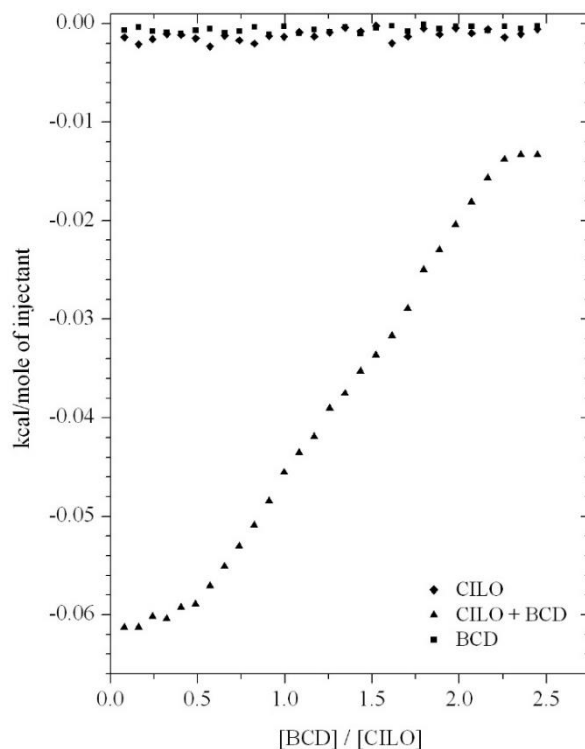
Rysunek ITC2. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu β -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczanie roztworu ezetymibu w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu ezetymibu roztworem β -cyklodekstryny w DMSO



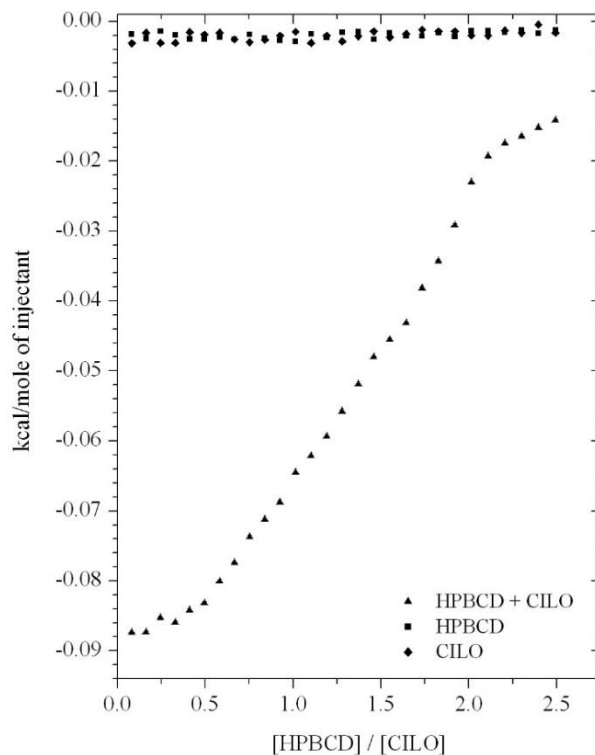
Rysunek ITC3. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu HP- β -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczanie roztworu ezetymibu w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu ezetymibu roztworem HP- β -cyklodekstryny w DMSO



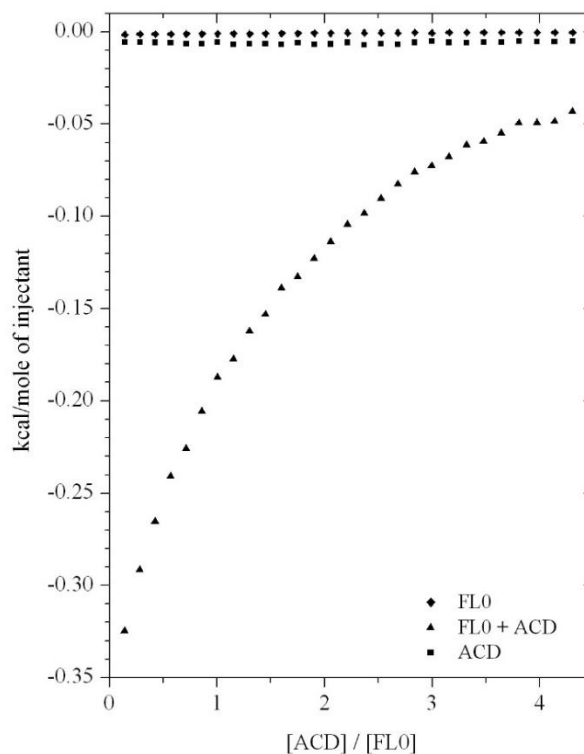
Rysunek ITC4. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu α -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczanie roztworu cilostazolu w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu cilostazolu roztworem α -cyklodekstryny w DMSO



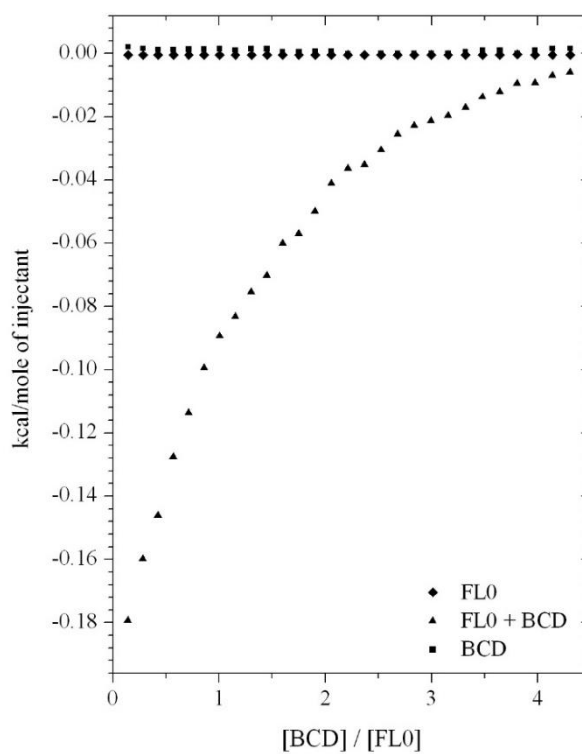
Rysunek ITC5. Efekty cieplne: ■ rozcieńczenie roztworu β -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczenie roztworu cilostazolu w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu cilostazolu roztworem β -cyklodekstryny w DMSO



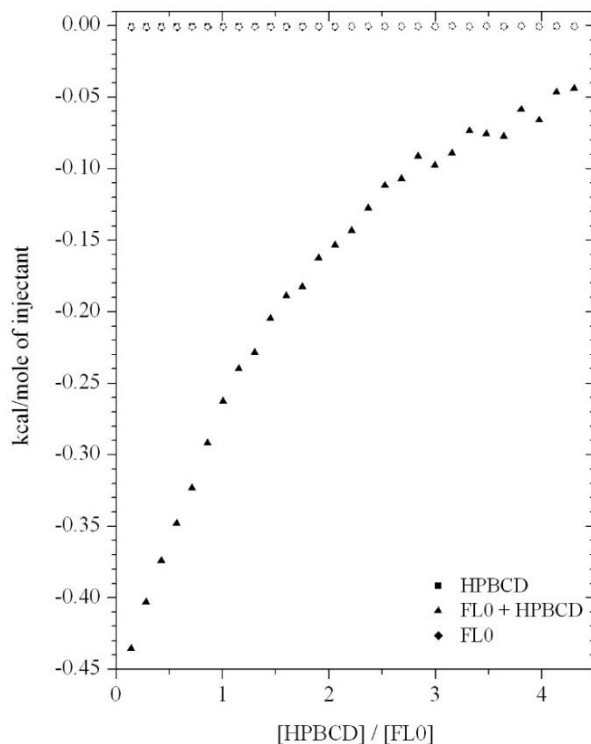
Rysunek ITC6. Efekty cieplne: ■ rozcieńczenie roztworu HP- β -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczenie roztworu cilostazolu w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu cilostazolu roztworem HP- β -cyklodekstryny w DMSO



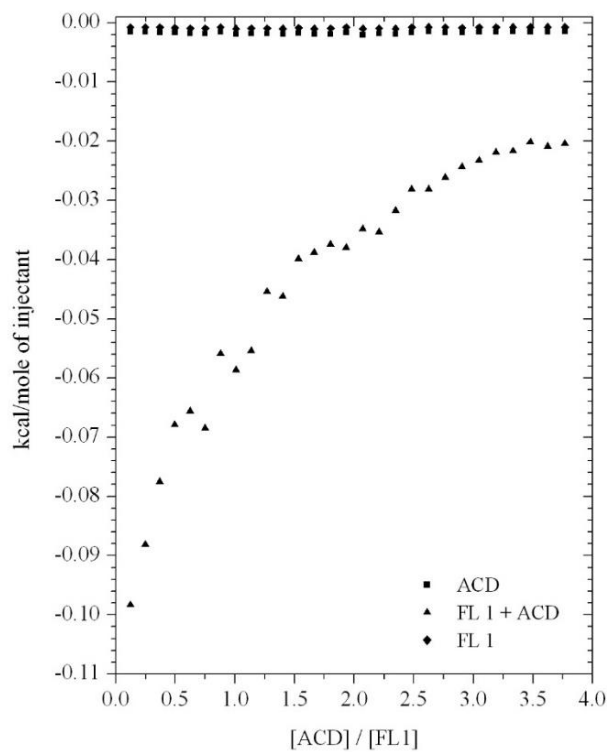
Rysunek ITC7. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu α -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczanie roztworu flawanonu w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu flawanonu roztworem α -cyklodekstryny w wodzie



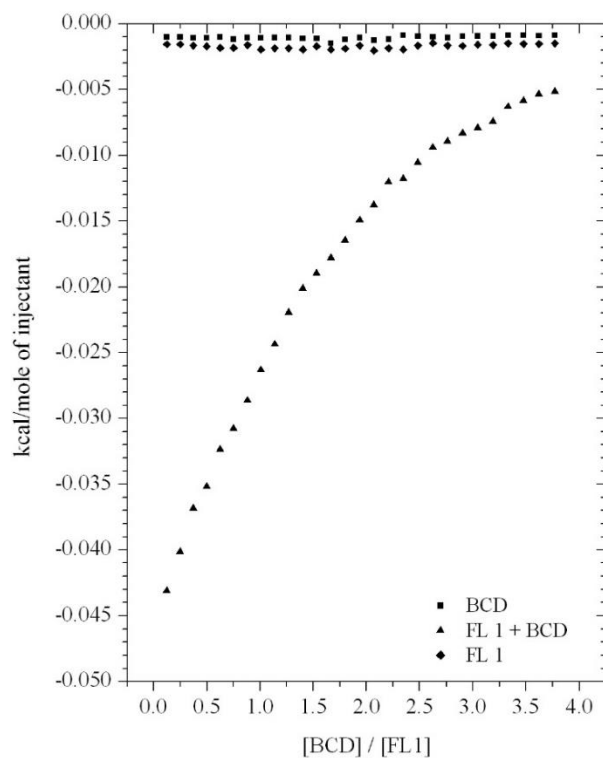
Rysunek ITC8. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu β -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczanie roztworu flawanonu (FL0) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu flawanonu (FL0) roztworem β -cyklodekstryny w wodzie



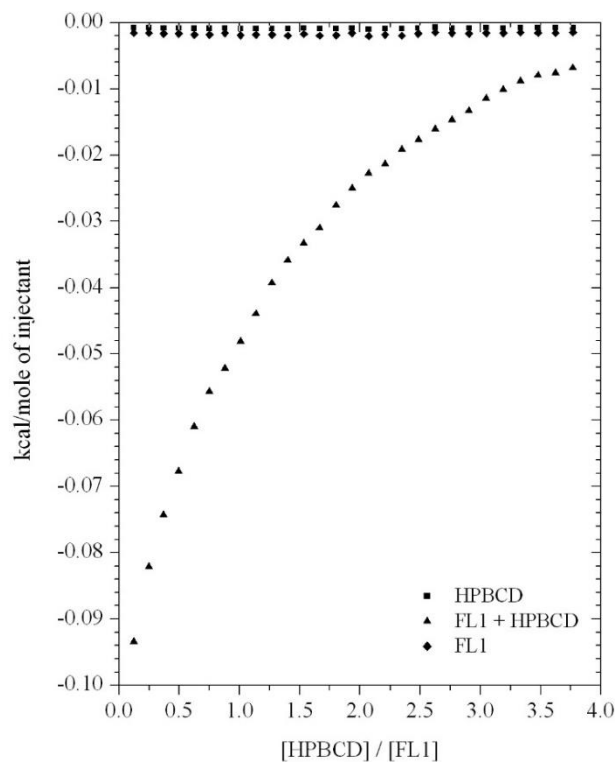
Rysunek ITC9. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu HP- β -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczanie roztworu flawanonu (FL0) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu flawanonu (FL0) roztworem HP- β -cyklodekstryny w wodzie



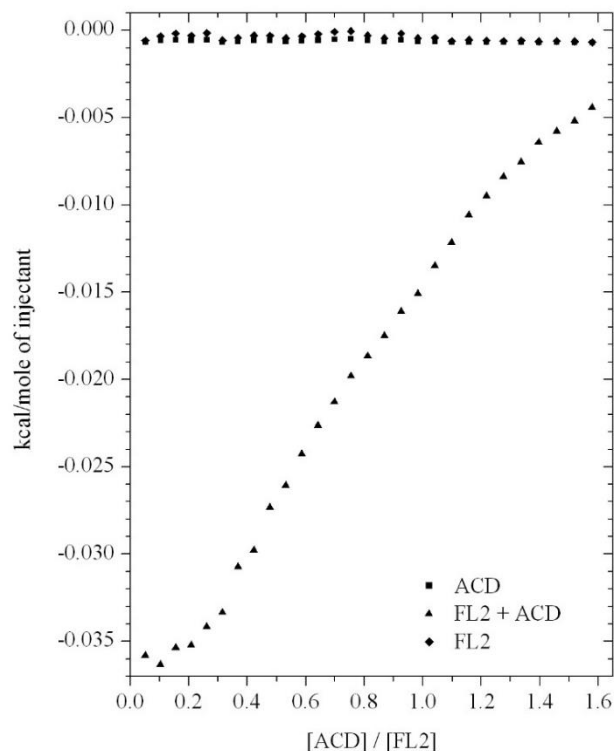
Rysunek ITC10. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu α -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczanie roztworu 4'-metoksyflawanonu (FL1) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu 4'-metoksyflawanonu (FL1) roztworem α -cyklodekstryny w wodzie



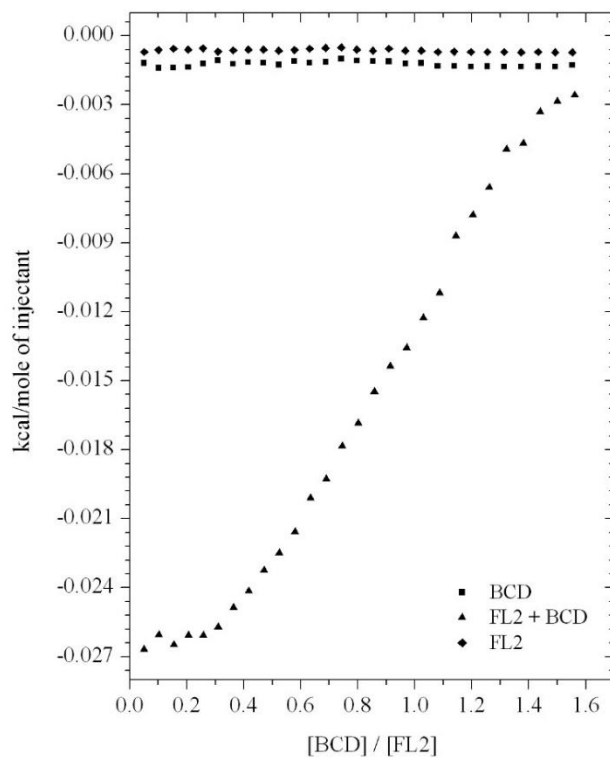
Rysunek ITC11. Efekty cieplne: ■ rozcieńczenie roztworu β -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczenie roztworu 4'-metoksyflawanonu (FL1) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu 4'-metoksyflawanonu (FL1) roztworem β -cyklodekstryny w wodzie



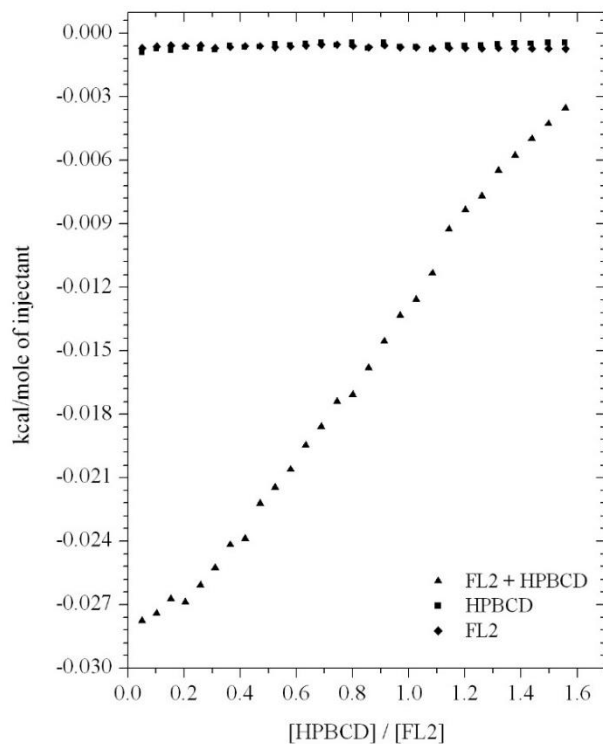
Rysunek ITC12. Efekty cieplne: ■ rozcieńczenie roztworu HP- β -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczenie roztworu 4'-metoksyflawanonu (FL1) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu 4'-metoksyflawanonu (FL1) roztworem HP- β -cyklodekstryny w wodzie



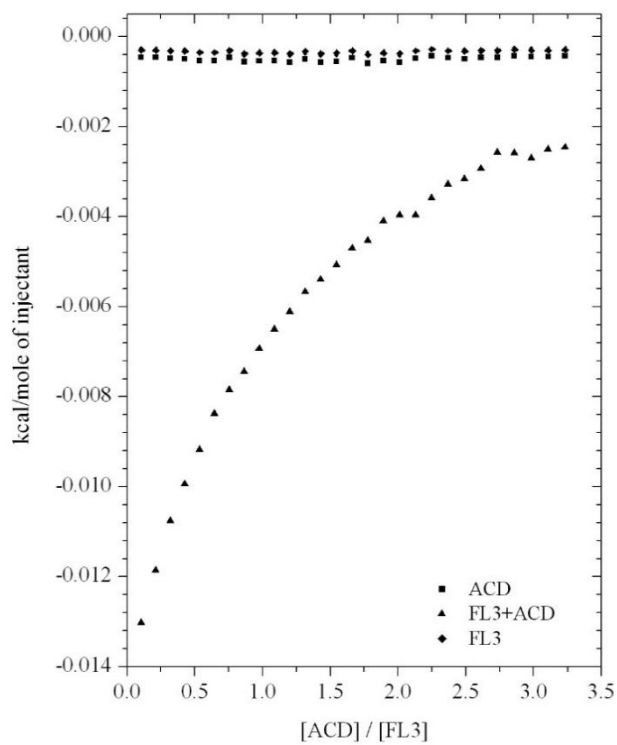
Rysunek ITC13. Efekty cieplne: ■ rozcieńczenie roztworu α -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczenie roztworu 4'-chloroflwanonu (FL2) w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu 4'-chloroflwanonu (FL2) roztworem α -cyklodekstryny w DMSO



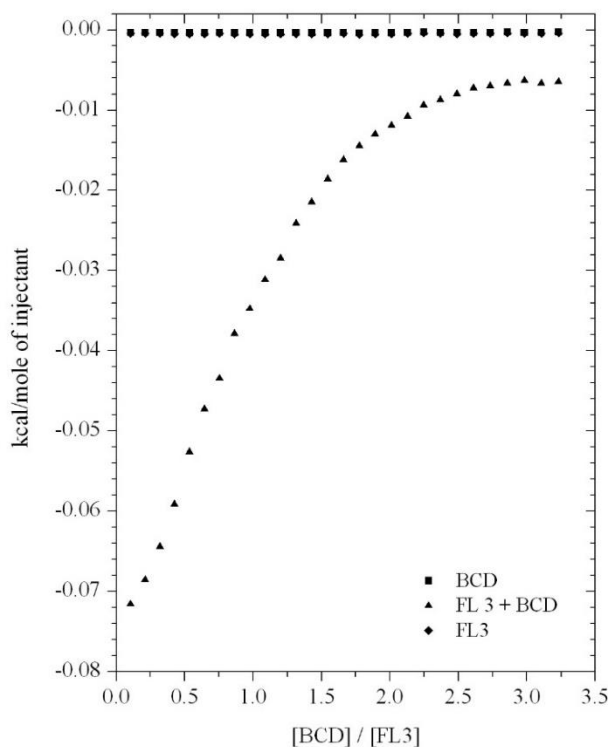
Rysunek ITC14. Efekty cieplne: ■ rozcieńczenie roztworu β -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczenie roztworu 4'-chloroflwanonu (FL2) w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu 4'-chloroflwanonu (FL2) roztworem β -cyklodekstryny w DMSO



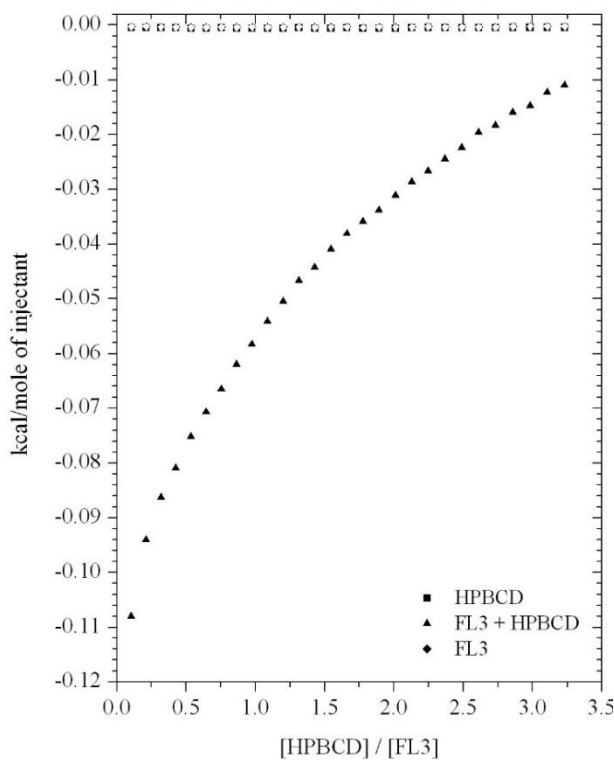
Rysunek ITC15. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu HP- β -cyklodekstryny w DMSO; ◆ rozcieńczanie roztworu 4'-chloroflawanonu (FL2) w DMSO; ▲ miareczkowanie roztworu 4'-chloroflawanonu (FL2) roztworem HP- β -cyklodekstryny w DMSO



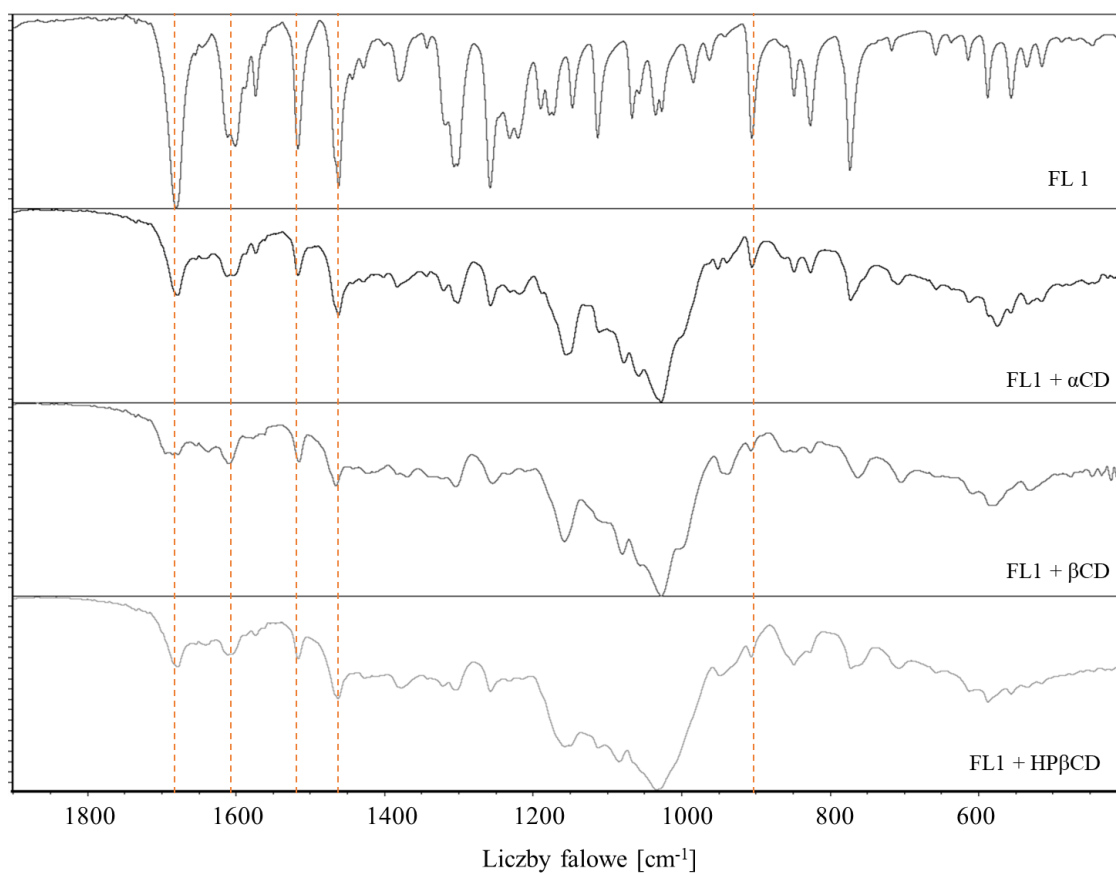
Rysunek ITC16. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu α -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczanie roztworu 7-metoksyflawanonu (FL3) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu 7-metoksyflawanonu (FL3) roztworem α -cyklodekstryny w wodzie



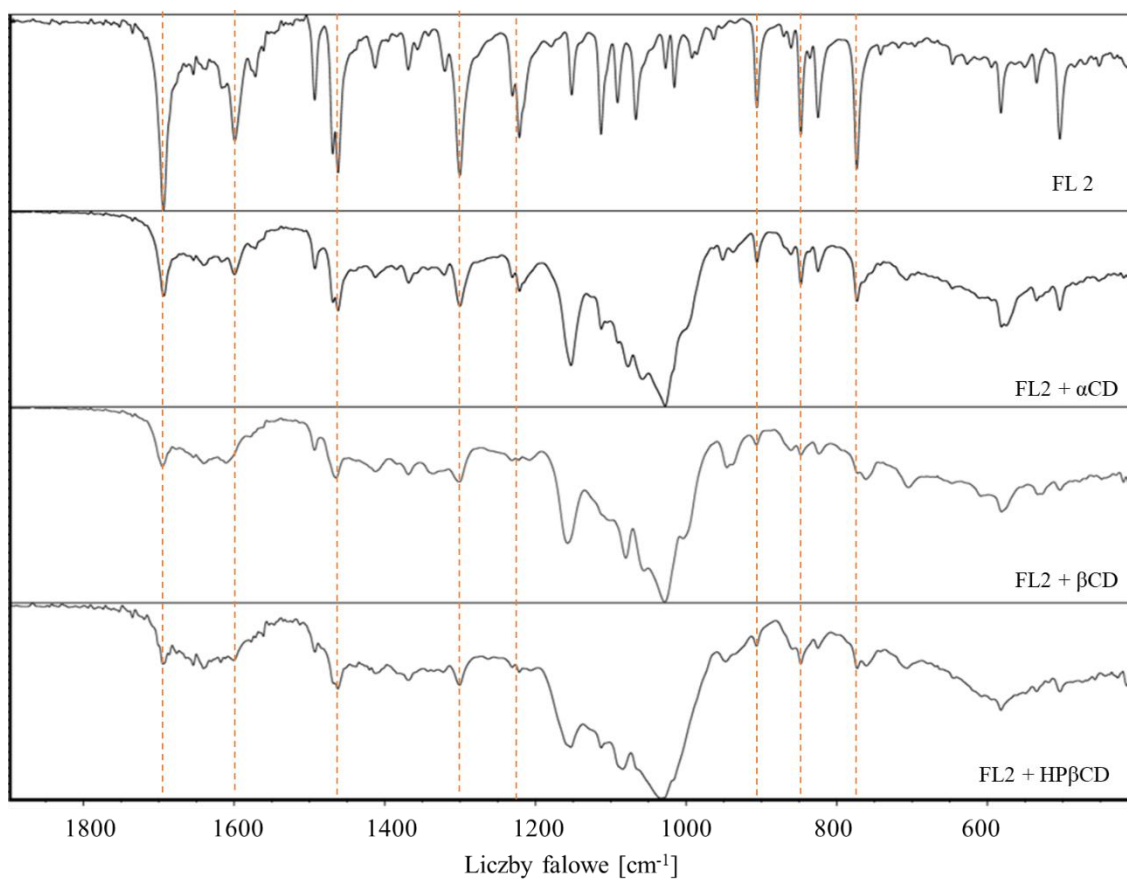
Rysunek ITC17. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu β -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczanie roztworu 7-metoksyflawanonu (FL3) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu 7-metoksyflawanonu (FL3) roztworem β -cyklodekstryny w wodzie



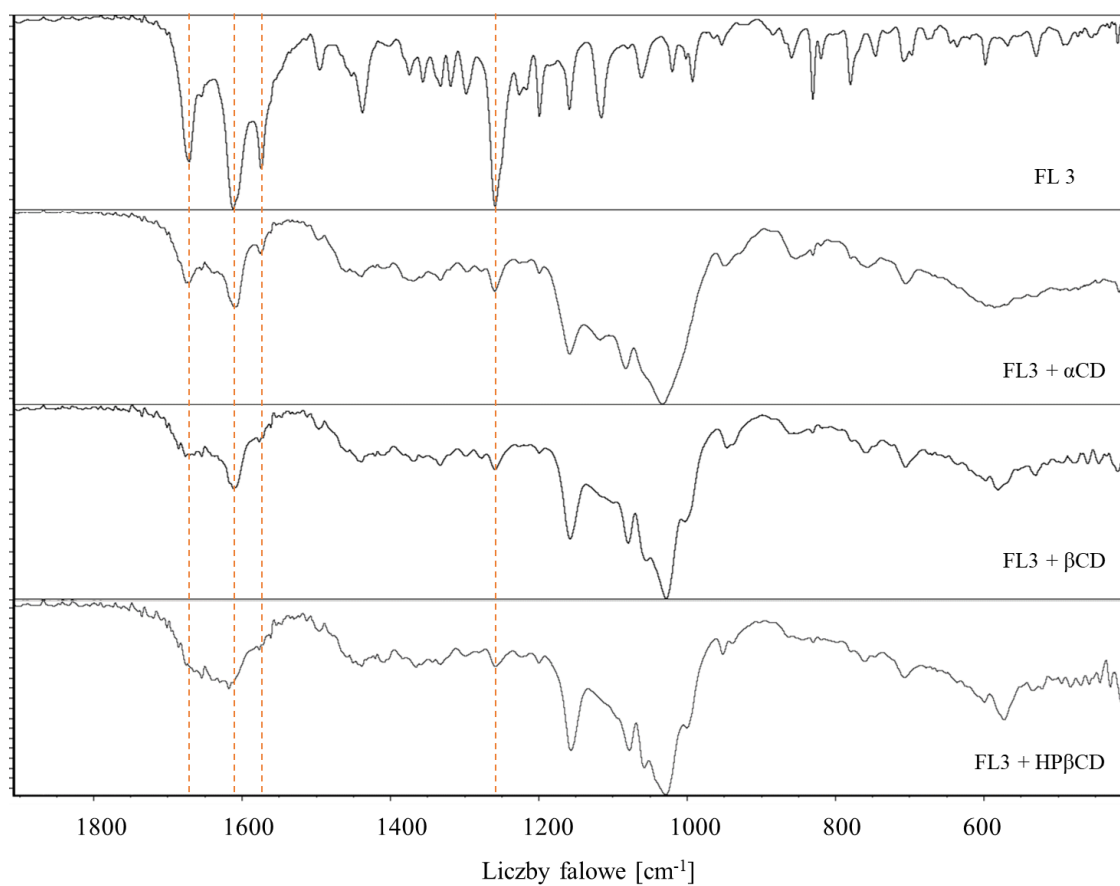
Rysunek ITC18. Efekty cieplne: ■ rozcieńczanie roztworu HP- β -cyklodekstryny w wodzie; ◆ rozcieńczanie roztworu 7-metoksyflawanonu (FL3) w wodzie; ▲ miareczkowanie roztworu 7-metoksyflawanonu (FL3) roztworem HP- β -cyklodekstryny w wodzie



Rysunek IR1. Widmo 4'-metoksyflawanonu (FL1) i jego kompleksów.



Rysunek IR2. Widmo 4'-chloroflawanonu (FL2) i jego kompleksów.



Rysunek IR3. Widmo 7-metoksyflawanonu (FL3) i jego kompleksów.

Bibliografia

1. Lehn, J.-M. Supramolecular Chemistry. *Science* (1979) **1993**, 260, 1762–1763, doi:10.1126/science.8511582.
2. Press Release. NobelPrize.Org. Nobel Prize Outreach AB 2022. Tue. 1 Feb 2022. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1987/press-release/>>.
3. al Tbakhi, B.; Nsairat, H.; Alshaer, W.; Al-Kadash, A.; Helal, W.; Alrawashdeh, L.; Day, A.; Assaf, K.I.; Hassouneh, R.; Odeh, F.; et al. Cinnamaldehyde–Cucurbituril Complex: Investigation of Loading Efficiency and Its Role in Enhancing Cinnamaldehyde in Vitro Anti-Tumor Activity. *RSC Advances* **2022**, 7540–7549, doi:10.1039/D2RA00044J.
4. Fahmy, S.A.; Ponte, F.; Fawzy, I.M.; Sicilia, E.; Azzazy, H.M.E.-S. Betaine Host–Guest Complexation with a Calixarene Receptor: Enhanced *in Vitro* Anticancer Effect. *RSC Advances* **2021**, 11, 24673–24680, doi:10.1039/D1RA04614D.
5. Buczkowski, A.; Waliszewski, D.; Urbaniak, P.; Palecz, B. Study of the Interactions of PAMAM G3-NH 2 and G3-OH Dendrimers with 5-fluorouracil in Aqueous Solutions. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, 505, 1–13, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.061.
6. Villiers, A. Sur La Transformation de La Fécule En Dextrine Par Le Ferment Butyrique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1891**, 112.
7. Schardinger, F. Über Thermophile Bakterien Aus Verschiedenen Speisen Und Milch - Sowie Über Einige Umsetzungsprodukte Derselben in Kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, Darunter Krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) Aus Stärke. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel* **1903**, 6, 865–880.
8. Liu, L.; Guo, Q.X. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2002**, 42, 1–14, doi:10.1023/A:1014520830813.
9. Gattuso, G.; Gargiulli, C.; Parisi, M.F. Threading Cyclodextrins in Chloroform: A [2]Pseudorotaxane. *International Journal of Molecular Sciences* **2007**, 8, 1052–1063, doi:10.3390/i8101052.
10. Qu, D.H.; Wang, Q.C.; Ren, J.; Tian, H. A Light-Driven Rotaxane Molecular Shuttle with Dual Fluorescence Addresses. *Organic Letters* **2004**, 6, 2085–2088, doi:10.1021/ol049605g.
11. Nepogodiev, S.A.; Stoddart, J.F. Cyclodextrin-Based Catenanes and Rotaxanes. *Chemical Reviews* **1998**, 98, 1959–1976, doi:10.1021/cr970049w.
12. Higashi, T.; Morita, K.; Song, X.; Zhu, J.; Tamura, A.; Yui, N.; Motoyama, K.; Arima, H.; Li, J. One-Pot Synthesis of Cyclodextrin-Based Radial Poly[n]Catenanes. *Communications Chemistry* **2019**, 2, doi:10.1038/s42004-019-0180-x.
13. Wang, J.; Qiu, Z.; Wang, Y.; Li, L.; Guo, X.; Pham, D.T.; Lincoln, S.F.; Prud'homme, R.K. Supramolecular Polymer Assembly in Aqueous Solution Arising from Cyclodextrin Host-Guest Complexation. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2016**, 12, 50–72, doi:10.3762/bjoc.12.7.
14. Mingyu, G.; Ming, J.; Pispas, S.; Wei, Y.; Chixing, Z. Supramolecular Hydrogels Made of End-Functionalized Low-Molecular-Weight PEG and α -Cyclodextrin and Their Hybridization with SiO₂ Nanoparticles through Host-Guest Interaction. *Macromolecules* **2008**, 41, 9744–9749, doi:10.1021/ma801975s.

15. Szerman, N.; Schroh, I.; Rossi, A.L.; Rosso, A.M.; Krymkiewicz, N.; Ferrarotti, S.A. Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus Circulans* DF 9R. *Bioresource Technology* **2007**, *98*, 2886–2891, doi:10.1016/j.biortech.2006.09.056.
16. Larsen, K.L. Large Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2002**, *43*, 1–13, doi:10.1023/A:1020494503684.
17. Ikuta, D.; Hirata, Y.; Wakamori, S.; Shimada, H.; Tomabechi, Y.; Kawasaki, Y.; Ikeuchi, K.; Hagimori, T.; Matsumoto, S.; Yamada, H. Conformationally Supple Glucose Monomers Enable Synthesis of the Smallest Cyclodextrins. *Science (1979)* **2019**, *364*, 674–677, doi:10.1126/science.aaw3053.
18. Fromming, K.-H.; Szejtli, J. *Cyclodextrin in Pharmacy*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1994;
19. Coleman, A.W.; Nicolis, I.; Keller, N.; Dalbiez, J.P. Aggregation of Cyclodextrins: An Explanation of the Abnormal Solubility of β -Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **1992**, *13*, 139–143, doi:10.1007/BF01053637.
20. Szejtli, J. Cyclodextrins: Properties and Applications. *Drug Investigation* **1990**, *2*, 11–21, doi:10.1007/BF03258222.
21. Fourmentin, S.; Crini, G.; Lichtfouse, E. *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*; Springer, 2005; ISBN 9783540228608.
22. Szente, L.; Puskás, I.; Sohajda, T.; Varga, E.; Vass, P.; Nagy, Z.K.; Farkas, A.; Várnai, B.; Béni, S.; Hazai, E. Sulfobutylether-Beta-Cyclodextrin-Enabled Antiviral Remdesivir: Characterization of Electrospun- and Lyophilized Formulations. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *264*, 118011, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118011.
23. Saokham, P.; Muankaew, C.; Jansook, P.; Loftsson, T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23051161.
24. Szejtli, J. Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research. *Pure and Applied Chemistry* **2004**, *76*, 1825–1845, doi:10.1351/pac200476101825.
25. Frijlink, H.W.; Visser, J.; Hefting, N.R.; Oosting, R.; Meijer, D.K.F.; Lerk, C.F. The Pharmacokinetics of β -Cyclodextrin and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in the Rat. *Pharmaceutical Research* **1990**, *7*, 1248–1252, doi:10.1023/A:1015929720063.
26. Tabata, S.; Ozono, S.; Yamaguchi, H.; Kitagawa, H.; Uemura, H.; Matsuki, H.; Samma, S.; Hirao, Y.; Okajima, E.; Kitahori, Y.; et al. Induction of Nephrosis by Beta-Cyclodextrin in Beagles. *Journal of Toxicologic Pathology* **1991**, *4*, 67–73, doi:10.1293/tox.4.67.
27. Luke, D.R.; Tomaszewski, K.; Damle, B.; Schlamm, H.T. Review of the Basic and Clinical Pharmacology of Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SBECD). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *99*, 3291–3301, doi:10.1002/jps.22109.
28. Gould, S.; Scott, R.C. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD): A Toxicology Review. *Food and Chemical Toxicology* **2005**, *43*, 1451–1459, doi:10.1016/j.fct.2005.03.007.
29. Stella, V.J.; He, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology* **2008**, *36*, 30–42, doi:10.1177/0192623307310945.
30. Ribeiro, L.S.S.; Falcão, A.C.; Patrício, J.A.B.; Ferreira, D.C.; Veiga, F.J.B. Cyclodextrin Multicomponent Complexation and Controlled Release Delivery Strategies to Optimize the Oral

- Bioavailability of Vinpocetine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *96*, doi:10.1002/jps.20294.
31. Labib, G.S. Novel Levocetirizine HCl Tablets with Enhanced Palatability: Synergistic Effect of Combining Taste Modifiers and Effervescence Technique. *Drug Design, Development and Therapy* **2015**, *9*, 5135–5146, doi:10.2147/DDDT.S92245.
32. Tan, Q.; Zhang, L.; Zhang, L.; Teng, Y.; Zhang, J. Design and Evaluation of an Economic Taste-Masked Dispersible Tablet of Pyridostigmine Bromide, a Highly Soluble Drug with an Extremely Bitter Taste. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *60*, 1514–1521, doi:10.1248/cpb.c12-00629.
33. Cevher, E.; Açma, A.; Sinani, G.; Aksu, B.; Zloh, M.; Mülazi moğlu, L. Bioadhesive Tablets Containing Cyclodextrin Complex of Itraconazole for the Treatment of Vaginal Candidiasis. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, *69*, 124–136, doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.033.
34. Piao, Z.Z.; Lee, M.K.; Lee, B.J. Colonic Release and Reduced Intestinal Tissue Damage of Coated Tablets Containing Naproxen Inclusion Complex. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *350*, 205–211, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.08.044.
35. Conceição, J.; Adeoye, O.; Cabral-Marques, H.M.; Lobo, J.M.S. Cyclodextrins as Excipients in Tablet Formulations. *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 1274–1284, doi:10.1016/j.drudis.2018.04.009.
36. Donati, F. Sugammadex: A Cyclodextrin to Reverse Neuromuscular Blockade in Anaesthesia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2008**, *9*, doi:10.1517/14656566.9.8.1375.
37. Mortensen, A.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; di Domenico, A.; Dusemund, B.; Frutos, M.J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; Leblanc, J.; et al. Re-evaluation of B-cyclodextrin (E 459) as a Food Additive. *EFSA Journal* **2016**, *14*, doi:10.2903/j.efsa.2016.4628.
38. Young, O.A.; Gupta, R.B.; Sadooghy-Saraby, S. Effects of Cyclodextrins on the Flavor of Goat Milk and Its Yogurt. *Journal of Food Science* **2012**, *77*, doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02557.x.
39. dos Santos, C.; Buera, M.P.; Mazzobre, M.F. Phase Solubility Studies and Stability of Cholesterol/ β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2011**, *91*, 2551–2557, doi:10.1002/jsfa.4425.
40. López-Nicolás, J.M.; Rodríguez-Bonilla, P.; García-Carmona, F. Cyclodextrins and Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2014**, *54*, 251–276, doi:10.1080/10408398.2011.582544.
41. Navarro, P.; Nicolas, T.S.; Gabaldon, J.A.; Mercader-Ros, M.T.; Calín-Sánchez, Á.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Pérez-López, A.J. Effects of Cyclodextrin Type on Vitamin C, Antioxidant Activity, and Sensory Attributes of a Mandarin Juice Enriched with Pomegranate and Goji Berries. *Journal of Food Science* **2011**, *76*, doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02176.x.
42. Ammayappan, L.; Moses, J.J. An Overview on Application of Cyclodextrins in Textile Product Enhancement. *Textile Chemicals* **2009**.
43. Martel, B.; Morcellet, M.; Ruffin, D.; Vinet, F.; Weltrowski, M. Capture and Controlled Release of Fragrances by CD Finished Textiles. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2002**, *44*, 439–442, doi:10.1023/A:1023028105012.

44. Abdel-Mohdy, F.A.; Fouda, M.M.G.; Rehan, M.F.; Aly, A.S. Repellency of Controlled-Release Treated Cotton Fabrics Based on Cypermethrin and Prallethrin. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *73*, 92–97, doi:10.1016/j.carbpol.2007.11.006.
45. Grigoriu, A.-M.; Health, S.; Lisa, G.; Asachi, G.; Grigoriu, A. Cyclodextrins' Applications in the Textile Industry. *Celulose Chemistry and Technology* **2008**, *42*, 103–112.
46. Benfeito, S.; Rodrigues, T.; Garrido, J.; Borges, F.; Garrido, E.M. Host-Guest Interaction between Herbicide Oxadiargyl and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *The Scientific World Journal* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/825206.
47. Stepniak, A.; Belica-Pacha, S.; Rozalska, S.; Dlugonski, J.; Urbaniak, P.; Palecz, B. Study on a Host-Guest Interaction of β -Cyclodextrin with Tebuconazole in Water. *Journal of Molecular Liquids* **2015**, *211*, 288–293, doi:10.1016/j.molliq.2015.07.023.
48. Petrović, G.M.; Stojanović, G.S.; Jovanović, O.P.; Dordević, A.S.; Palić, I.R.; Sovilj, S. v. Inclusion Complexes of Pesticides in Aqueous Solutions of Methylated- β -Cyclodextrin. *Hemijska Industrija* **2013**, *67*, 231–237, doi:10.2298/HEMIND120413068P.
49. Knopp, R.H.; Gitter, H.; Truitt, T.; Bays, H.; Manion, C. v.; Lipka, L.J.; LeBeaut, A.P.; Suresh, R.; Yang, B.; Veltri, E.P. Effects of Ezetimibe, a New Cholesterol Absorption Inhibitor, on Plasma Lipids in Patients with Primary Hypercholesterolemia. *European Heart Journal* **2003**, *24*, 729–741, doi:10.1016/S0195-668X(02)00807-2.
50. Phan, B.A.P.; Dayspring, T.D.; Toth, P.P. Ezetimibe Therapy: Mechanism of Action and Clinical Update. *Vascular Health and Risk Management* **2012**, *8*, 415–427, doi:10.2147/VHRM.S33664.
51. Sudhop, T.; Lütjohann, D.; Kodal, A.; Igel, M.; Tribble, D.L.; Shah, S.; Perevozskaya, I.; von Bergmann, K. Inhibition of Intestinal Cholesterol Absorption by Ezetimibe in Humans. *Circulation* **2002**, *106*, 1943–1948, doi:10.1161/01.cir.0000034044.95911.dc.
52. Kosoglou, T.; Statkevich, P.; Johnson-Levonas, A.O.; Paolini, J.F.; Bergman, A.J.; Alton, K.B. Ezetimibe A Review of Its Metabolism, Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Clin Pharmacokinet* **2005**, *44*, 467–494, doi:10.2165/00003088-200544050-00002.
53. Adin, I.; Iustain, C. Novel Crystalline Form of Ezetimibe and Processes for the Preparation Thereof 2006.
54. Sigma Aldrich, Katalog Produktów, Ezetymib.
55. Crouse, J.R.; Allan, M.C.; Elam, M.B. Clinical Manifestation of Atherosclerotic Peripheral Arterial Disease and the Role of Cilostazol in Treatment of Intermittent Claudication. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2002**, *42*, 1291–1298, doi:10.1177/0091270002042012002.
56. Fernandez, B.B. A Rational Approach to Diagnosis and Treatment of Intermittent Claudication. *American Journal of the Medical Sciences* **2002**, *323*, 244–251, doi:10.1097/00000441-200205000-00003.
57. Bramer, S.L.; Forbes, W.P. Relative Bioavailability and Effects of a High Fat Meal on Single Dose Cilostazol Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* **1999**, *37*, 13–23, doi:10.2165/00003088-199937002-00002.
58. Sigma Aldrich, Katalog Produktów, Cilostazol.
59. Bawazeer, N.A.; Choudhry, H.; Zamzami, M.A.; Abdulaal, W.H.; Middleton, B.; Moselhy, S.S. Role of Hesperetin in LDL-Receptor Expression in Hepatoma HepG2 Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2016**, *16*, doi:10.1186/s12906-016-1165-2.

60. Kostrzewa-Susłow, E.; Dmochowska-Gładysz, J.; Białońska, A.; Ciunik, Z. Microbial Transformations of Flavanone by *Aspergillus Niger* and *Penicillium Chermesinum* Cultures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2008**, *52–53*, 34–39, doi:10.1016/j.molcatb.2008.01.002.
61. Chang, M.Y.; Tsai, M.C.; Lin, C.Y. A Novel One-Pot Synthesis of Flavones. *RSC Advances* **2021**, *11*, 11655–11662, doi:10.1039/d1ra00534k.
62. Rao, V.K.; Rao, M.S.; Kumar, A. Ytterbium(III) Triflate: An Efficient and Simple Catalyst for Isomerization of 2'-Hydroxychalcone and 2'-Aminochalcones in Ionic Liquid. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2011**, *48*, 1356–1360, doi:10.1002/jhet.760.
63. Vaccaro, W.; Amore, C.; Berger, J.; Burrier, R.; Clader, J.; Davis, H.; Domalski, M.; Fevig, T.; Salisbury, B.; Sher, R. Inhibitors of Acyl CoA:Cholesterol Acyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 1704–1719, doi:10.1021/jm950833d.
64. Zheng, X.; Jiang, H.; Xie, J.; Yin, Z.; Zhang, H. Highly Efficient and Green Synthesis of Flavanones and Tetrahydroquinolones. *Synthetic Communications* **2013**, *43*, 1023–1029, doi:10.1080/00397911.2011.621096.
65. Yoo, H.S.; Son, S.H.; Cho, Y.Y.; Lee, S.J.; Jang, H.J.; Kim, Y.M.; Kim, D.H.; Kim, N.Y.; Park, B.Y.; Lee, Y.S.; et al. Synthesis of Flavanones via Palladium(II)-Catalyzed One-Pot β -Arylation of Chromanones with Arylboronic Acids. *Journal of Organic Chemistry* **2019**, *84*, 10012–10023, doi:10.1021/acs.joc.9b01162.
66. Patil, K.K.; Gacche, R.N. Inhibition of Glycation and Aldose Reductase Activity Using Dietary Flavonoids: A Lens Organ Culture Studies. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *98*, 730–738, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.129.
67. Wei, D.G.; Yang, G.F.; Wan, J.; Zhan, C.G. Binding Model Construction of Antifungal 2-Aryl-4-Chromanones Using CoMFA, CoMSIA, and QSAR Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1604–1611, doi:10.1021/jf048313r.
68. Cabrera, M.; Simoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; de Ceráin, A.L.; et al. Synthetic Chalcones, Flavanones, and Flavones as Antitumoral Agents: Biological Evaluation and Structure-Activity Relationships. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 3356–3367, doi:10.1016/j.bmc.2007.03.031.
69. Choi, E.J.; Lee, J.I.; Kim, G.H. Anti-Carcinogenic Effect of a New Analogue 4'-Chloroflavanone from Flavanone in Human Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Medicine* **2010**, *25*, 293–298, doi:10.3892/ijmm_00000344.
70. Safavi, M.; Esmati, N.; Ardestani, S.K.; Emami, S.; Ajdari, S.; Davoodi, J.; Shafiee, A.; Foroumadi, A. Halogenated Flavanones as Potential Apoptosis-Inducing Agents: Synthesis and Biological Activity Evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *58*, 573–580, doi:10.1016/j.ejmech.2012.10.043.
71. Pouget, C.; Lauthier, F.; Simon, A.; Fagnere, C.; Basly, J.-P.; Delage, C.; Jose'chulia, A.-J. Flavonoids: Structural Requirements for Antiproliferative Activity on Breast Cancer Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 3095–3097, doi:10.1016/s0960-894x(01)00617-5.
72. le Bail, J.C.; Laroche, T.; Marre-Fournier, F.; Habrioux, G. Aromatase and 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inhibition by Flavonoids. *Cancer Letters* **1998**, *133*, 101–106, doi:10.1016/S0304-3835(98)00211-0.

73. Bernini, R.; Mincione, E.; Provenzano, G.; Fabrizi, G.; Tempesta, S.; Pasqualetti, M. Obtaining New Flavanones Exhibiting Antifungal Activities by Methyltrioxorhenium-Catalyzed Epoxidation-Methanolysis of Flavones. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7561–7566, doi:10.1016/j.tet.2008.05.101.
74. Witold Mizerski *Tablice Chemiczne*; 2nd ed.; Wydawnictwo Adamantan.; Warszawa, 1997;
75. Bernal, J.D.; Fowler, R.H. A Theory of Water and Ionic Solution, with Particular Reference to Hydrogen and Hydroxyl Ions. *The Journal of Chemical Physics* **1933**, *1*, 515–548, doi:10.1063/1.1749327.
76. Molecular Association in Liquids II. A Theory of the Structure of Water. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1951**, *205*, 163–178, doi:10.1098/rspa.1951.0024.
77. Frank, H.S.; Wen, W.-Y. Ion-Solvent Interaction. Structural Aspects of Ion-Solvent Interaction in Aqueous Solutions: A Suggested Picture of Water Structure. *Discuss Faraday Soc* **1957**, *24*, 133, doi:10.1039/df9572400133.
78. Frank, H.S.; Evans, M.W. Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes. *The Journal of Chemical Physics* **1945**, *13*, 507–532, doi:10.1063/1.1723985.
79. Chaplin, M.F. A Proposal for the Structuring of Water. *Biophysical Chemistry* **2000**, *83*, 211–221, doi:10.1016/S0301-4622(99)00142-8.
80. Linus Pauling *The Nature of the Chemical Bond*; 3rd ed.; Cornell University Press: New York, 1960;
81. Liu, J.; He, X.; Zhang, J.Z.H. Structure of Liquid Water – a Dynamical Mixture of Tetrahedral and ‘Ring-and-Chain’ like Structures. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19*, 11931–11936, doi:10.1039/C7CP00667E.
82. Liu, J.; He, X.; Zhang, J.Z.H.; Qi, L.-W. Hydrogen-Bond Structure Dynamics in Bulk Water: Insights from Ab Initio Simulations with Coupled Cluster Theory. *Chemical Science* **2018**, *9*, 2065–2073, doi:10.1039/C7SC04205A.
83. Corti, H.R.; Appignanesi, G.A.; Barbosa, M.C.; Bordin, J.R.; Calero, C.; Camisasca, G.; Elola, M.D.; Franzese, G.; Gallo, P.; Hassanali, A.; et al. Structure and Dynamics of Nanoconfined Water and Aqueous Solutions. *The European Physical Journal E* **2021**, *44*, 136, doi:10.1140/epje/s10189-021-00136-4.
84. Merck Life Science Sp.z.o.o. Dimetylosulfotlenek - Karta Charakterystyki Zgodnie z Rozporządzeniem WE 1907/2006 2020.
85. Merck Life Science Sp.z.o.o. Etanol - Karta Charakterystyki Zgodnie z Rozporządzeniem WE 1907/2006 2021.
86. Otterbach, A.; Lamprecht, A. Enhanced Skin Permeation of Estradiol by Dimethyl Sulfoxide Containing Transdermal Patches. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 320, doi:10.3390/pharmaceutics13030320.
87. Goss, C.A. Frozen Blood Products. In *Transfusion Medicine and Hemostasis - Clinical and Laboratory Aspects*; Elsevier, 2013; pp. 283–286.
88. Manual SPECORO 50 (40)(30). Analytik Jena AG PC Edition 11-2001.

89. Higuchi, T.; Connors, K.A. Phase Solubility Techniques. *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation* **1965**, *4*, 117–212.
90. Linseis - Differential Scanning Calorimeter - Chip-DSC Product Brochure (10/19).
91. Menezes, P.P.; Serafini, M.R.; Santana, B. v.; Nunes, R.S.; Quintans, L.J.; Silva, G.F.; Medeiros, I.A.; Marchioro, M.; Fraga, B.P.; Santos, M.R.V.; et al. Solid-State β -Cyclodextrin Complexes Containing Geraniol. *Thermochimica Acta* **2012**, *548*, doi:10.1016/j.tca.2012.08.023.
92. Górnjak, A.; Czapor-Irzabek, H.; Złocińska, A.; Karolewicz, B. Physicochemical and Dissolution Properties of Ezetimibe–Aspirin Binary System in Development of Fixed-Dose Combinations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2021**, *144*, doi:10.1007/s10973-020-09543-9.
93. Pandeewaran, M.; El-Mossalamy, E.H.; Elango, K.P. Spectroscopic Studies on the Interaction of Cilostazole with Iodine and 2,3-Dichloro-5,6-Dicyanobenzoquinone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *78*, 375–382, doi:10.1016/j.saa.2010.10.023.
94. Jung, H.; Shin, S.Y.; Jung, Y.; Tran, T.A.; Lee, H.O.; Jung, K.Y.; Koh, D.; Cho, S.K.; Lim, Y. Quantitative Relationships between the Cytotoxicity of Flavonoids on the Human Breast Cancer Stem-Like Cells MCF7-SC and Their Structural Properties. *Chemical Biology and Drug Design* **2015**, *86*, 496–508, doi:10.1111/cbdd.12512.
95. Qiu, Y.; Ye, Y.; Song, X.; Zhu, X.; Yang, F.; Song, B.; Wang, J.; Hua, H.; He, Y.; Han, Y.; et al. Convenient and Highly Efficient Routes to 2 H - Chromene and 4-Chromanone Derivatives: Iodine-Promoted and p-Toluenesulfonic Acid Catalyzed Cascade Cyclizations of Propynols. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 3480–3487, doi:10.1002/chem.201406100.
96. Li, N.; Liu, L.; Luo, H.; Wang, H.; Yang, D.; He, F. Flavanone-Based Fluorophores with Aggregation-Induced Emission Enhancement Characteristics for Mitochondria-Imaging and Zebrafish-Imaging. *Molecules* **2020**, *25*, 3298, doi:10.3390/molecules25143298.
97. Tokyo Chemical Industries, Karta Charakterystyki Produktu, Cilostazol.
98. Biernacka, M.; Ilyich, T.; Zavodnik, I.; Pałecz, B.; Stepniak, A. Studies of the Formation and Stability of Ezetimibe-Cyclodextrin Inclusion Complexes. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *23*, 455, doi:10.3390/ijms23010455.

Dorobek naukowy:

Artykuły opublikowane w ramach rozprawy doktorskiej:

“Studies of the Formation and Stability of Ezetimibe - Cyclodextrin Inclusion Complexes”

M. Biernacka, T. Ilyich, I. Zavodnik, B. Pałecz, A. Stepniak

International Journal of Molecular Science (2022), 23(1), 455; doi: 10.3390/ijms23010455

Publikacje niezwiązane z pracą dokorską:

„Intermolecular interactions in pairs of flavanone-chalcone isomers”

M. Małeczka, L. Chęcińska, J. Kusz, M. Biernacka, B. Kupcewicz

Acta Crystallographica (2020) / C76, 212-224; doi: 10.1107/S2053229620001503

„Calorimetric studies of α -cyclodextrin inclusion complexes with carbendazim and thiabendazole”

A. Stepniak, B. Erdenebayar, M. Biernacka, A. Buczkowski, L. Zavodnik, I. Zavodnik, B. Pałecz

Physics and Chemistry of Liquids (2020), 59 (4) 495-502; doi:10.1080/00319104.2020.1737693

„Interactions of carbendazim and thiabendazole with β -cyclodextrin in aqueous solutions”

B. Pałecz, A. Stepniak, B. Erdenebayar, M. Biernacka, A. Buczkowski, M. Malinowska, L. Zavodnik, I. Zavodnik

Vesnik Hrodzenskaha Dziarzhavnaha Universiteta Imia Ianki Kupaly. Seryia 5. Ekanomika. Satsyialohiia. Biialohiia Vol.10, No. 1, 2020 ISSN 2221-5336

Konferencje:

21st International Symposium - Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds (23.11.2018r.)

„Enhancing the solubility of selected fungicides through cyclodextrins complexation”

M. Biernacka, A. Stępnik, P. Borgul, A. Buczkowski, B. Pałecz

„Study of the interaction between cucurbituril Q7 and metoclopramide in aqueous solution

P. Borgul, M. Biernacka, M. Malinowska, A. Buczkowski, A. Stępnik, B. Pałecz

Zimowy Zjazd SSPTChem (1.12.2019 r.)

„Badanie wzrostu rozpuszczalności wybranych środków ochrony roślin w wodzie”

M. Biernacka, A. Stępnik, P. Borgul, A. Buczkowski, B. Pałecz

„Badania oddziaływań kukurbiturilu Q7 z prokainamidem i metoklopramidem w roztworach wodnych”

P. Borgul, M. Malinowska, M. Biernacka, A. Stępnik, A. Buczkowski, B. Pałecz

XI Interdyscyplinarna konferencja Naukowa TYGIEL 2019 (23-24.03.2019 r.)

„Spektrofotometryczne badania wzrostu rozpuszczalności wybranych pestycydów w wodzie w obecności α – cyklodekstryny”

M. Biernacka, A. Stępnik, B. Erdenebayar

„Badania kalorymetryczne i spektroskopowe na kompleksie inkluzyjnym tiabendazolu z α -cyklodekstryną w wodzie”

B. Erdenebayar, M. Biernacka, A. Stępnia

Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej PTChem – Ustroń (10-14.04.2019 r.)

„Naturalne cyklodekstryny jako nono-kontenery naringeniny”

J. Adamczyk, M. Biernacka, A. Stępnia, B. Pałecz

„Badania wzrostu rozpuszczalności hesperetyny w obecności α i β -cyklodekstryny”

M. Cęcelek, M. Biernacka, A. Stępnia, B. Pałecz

VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii (9-10.06.2019 r.)

„Studies of inclusion complex between ezetimibe and β -cyclodextrin”

M. Biernacka, P. Borgul, A. Stępnia, B. Pałecz

„Study of the interaction between PPIG3 and selected drugs in aqueous solution”

P. Borgul, M. Biernacka, A. Buczkowski, B. Pałecz

„Badania oddziaływań 1,4-dichlorobenzenu z α -cyklodekstryną w wodzie”

B. Erdenebayar, M. Biernacka, A. Stępnia

III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii Nanomat (13-14.06. 2019 r.)

„Kalorymetryczne i spektrofotometryczne badania oddziaływań β -cyklodekstryny z ezetymibem”

M. Biernacka, P. Borgul, A. Stępnia, B. Pałecz

„Badania spektroskopowe oddziaływań dendrymeru PPI G3 z 6 – merkaptopuryną i 5-fluorouracylem”

P. Borgul, M. Biernacka, M. Malinowska, A. Buczkowski, B. Pałecz

22nd International Symposium - Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds

(22.11.2019r.)

„Improved aqueous solubility of ezetimibe through β -CD and HP- β -CD complication”

M. Biernacka, M. Malinowska-Michalak, A. Stępnia, B. Pałecz

„Calorimetric study of the interaction between 4-phenylphenol with α -cyclodextrin”

B. Erdenebayar, M. Biernacka, A. Stępnia, B. Pałecz

VI Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP (30.11.2019 r.)

„Wpływ wybranych cyklodekstryn na rozpuszczalność w wodzie ezetymibu”

M. Biernacka, M. Malinowska-Michalak, A. Stępnia

„Badania spektroskopowe oddziaływań dendrymeru PPI G4 z tegafurem w roztworze wodnym”

M. Malinowska-Michalak, M. Biernacka, A. Buczkowski

XI Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików (23.06.2020 r.)

„Spektrofotometryczne badania oddziaływań cilostazolu z wybranymi cyklodekstrynami”

J. Kowalik, M. Biernacka, B. Pałecz

VI Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki UW (24-28.06.2020 r.)

„Spektrofotometryczne badania cilostazolu z wybranymi cyklodekstrynami”

J. Kowalik, M. Biernacka, A. Stępnia, B. Pałecz

„Wpływ α - i β -cyklodekstryny na wzrost rozpuszczalności w wodzie katechiny”

A. Jachymek, A. Stępnia, M. Biernacka, B. Pałecz

I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego

(10-12.09.2020 r.)

„Badania stechiometrii procesu kompleksowania pochodnych kwasu cynamonowego z α i β -cyklodekstryną”

M. Biernacka, A. Stępnik, B. Pałecz

„Wpływ α -, β - i HP- β -cyklodekstryny na rozpuszczalność w wodzie cilostazolu”

J. Kowalik, M. Biernacka, A. Stępnik, B. Pałecz

„Badanie oddziaływań katechiny z naturalnymi cyklodekstrynami”

A. Jachymek, A. Stępnik, M. Biernacka, B. Pałecz

XII Sesja magistrantów i doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików (17.06.2021 r.)

„Wpływ modyfikacji β -cyklodekstryny na proces inkluzji ezetymibu”

M. Biernacka, D. Świątczak, M. Malinowska-Michalak, A. Stępnik, B. Pałecz

„Badania oddziaływań azydotymidyny z dendrymetrem PPI G4 w roztworze wodnym”

M. Malinowska-Michalak, D. Świątczak, M. Biernacka, A. Buczkowski, B. Pałecz

„Analiza pigmentów kosmetycznych w celu podwyższenia jakości wyrobów kosmetycznych”

D. Świątczak, M. Malinowska-Michalak, M. Biernacka, S. Belica-Pacha, J. Szmich, M. Małecka

63 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (13-17.09.2021 r.)

„Analiza oddziaływań supramolekularnych między ezetymibem i betacyklodekstryną”

M. Biernacka, A. Stępnik, B. Pałecz

„Badania procesu kompleksowania kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych z cyklodekstrynami”

M. Biernacka, A. Stępnik, I. Trzcńska, B. Pałecz

VIII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii (24.09.2021 r.)

„Termodynamiczna charakterystyka oddziaływań betacyklodekstryny z nebiwololem”

M. Biernacka, D. Świątczak, A. Stępnik, B. Pałecz

„Analiza dwutlenku tytanu jako pigmentu kosmetycznego”

D. Świątczak, M. Biernacka, M. Malinowska-Michalak, M. Małecka, S. Belica - Pacha