

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET**

**ALEKSANDRA M. STOJKOVIĆ**

**BIOFARMACEUTSKA  
KARAKTERIZACIJA INTERAKCIJE  
CIPROFLOKSACINA I JONA METALA**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2014**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY**

**ALEKSANDRA M. STOJKOVIĆ**

**BIOPHARMACEUTICAL  
CHARACTERISATION OF  
CIPROFLOXACIN METALLIC CATION  
INTERACTION**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2014**

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta.

### **Mentor**

---

Dr sc Jelena Parojčić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

### **Članovi komisije**

---

Dr sc Zorica Đurić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Dr sc Owen I. Corrigan, professor emeritus  
*School of Pharmacy and Pharmaceutical  
Sciences, Trinity College, University of Dublin,*  
gostujući profesor na Univerzitetu u Beogradu

Datum odbrane \_\_\_\_\_

# BIOFARMACEUTSKA                      KARAKTERIZACIJA                      INTERAKCIJE CIPROFLOKSACINA I JONA METALA

## Rezime

Biofarmaceutska karakterizacija podrazumeva sprovođenje odgovarajućih *in vitro*, *in vivo* i *in silico* ispitivanja s ciljem da se deo *in vivo* ispitivanja u ljudi zameni reproduktivnim i dobro standardizovanim laboratorijskim testovima. Mogućnost *in vitro* simuliranja dešavanja u ljudskom organizmu dobila je veći značaj sa primenom Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova i primenom *in vitro* metoda u cilju predviđanja lek/lek interakcija i otkrivanja potencijalnih uzroka koji dovode do promena u apsorpciji lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu. U *in vitro* uslovima se ne mogu u potpunosti reprodukovati uslovi koji postoje u organizmu, ali pažljiv odabir eksperimentalnih uslova može dati korisne podatke koji su u korelaciji sa *in vivo* podacima. Takođe, razvoj računarskih programa koji simuliraju proces apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta, omogućio je korišćenje *in silico* metoda u predviđanju potencijalnih interakcija.

Rezultati *in vivo* studija ukazuju na smanjenje biorasploživosti ciprofloksacina nakon istovremene primene sa preparatima koji sadrže jone metala, a kao uzrok interakcije se navodi građenje kompleksa koji ne mogu da permeiraju membranu gastrointestinalnog trakta. Rezultati objavljenih *in vitro* studija su prilično kontradiktorni. Ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta u prisustvu jona metala pokazuju usporeno i nepotpuno oslobađanje ciprofloksacina, dok izvesni autori izveštavaju o povećanju rastvorljivosti u prisustvu jona metala.

Cilj ove studije je bio da se otkrije mehanizam interakcije ciprofloksacina i jedinjenja gvožđa, aluminijuma, kalcijuma i cinka i razviju *in vitro* i *in silico* modeli za njihovu karakterizaciju kroz pregled rezultata *in vivo*, *in vitro* (ispitivanje rastvorljivosti, brzine rastvaranja, karakterizacija nastalih produkata interakcije) i *in silico* studija.

U okviru eksperimentalnog rada, analizirani su literaturni *in vivo* podaci, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja ciprofloksacina bez, kao i u prisustvu jedinjenja koja sadrže jone metala (gvožđe, aluminijum, kalcijum, cink). Čvrste faze prikupljene u toku *in vitro* ispitivanja su analizirane primenom odgovarajućih analitičkih metoda (XRD, DSC, TGA i FTIR). Za *in silico* simulaciju interakcije između ciprofloksacina i jona metala primenjen je GastroPlus<sup>™</sup> softverski paket. Kao ulazni parametri neophodni za simulaciju (fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine ciprofloksacina) korišćeni su literaturni podaci, eksperimentalno

dobijene vrednosti i *in silico* predviđene vrednosti.

Na osnovu rezultata ispitivanja rastvorljivosti, brzine rastvaranja i karakterizacije čvrstih faza zaključeno je da se mehanizmi interakcije razlikuju u zavisnosti od vrste i količine jona metala uključenih u interakciju. Za interakciju ciprofloksacin-hidrohlorida i jona metala, prilikom ispitivanja brzine rastvaranja, neophodno je obezbediti visoke koncentracije reaktanata u medijumu, a u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije veliki značaj ima korišćenje aparature sa mini lopaticom i malih zapremina medijuma. U *in vitro* uslovima nije uočena interakcija između ciprofloksacin-hidrohlorida i jona aluminijuma. U interakciji ciprofloksacin-hidrohlorida i jona kalcijuma dolazi do izdvajanja hidratisanog oblika ciprofloksacin baze, usled značajnog povećanja pH vrednosti sredine. Kao proizvod interakcije ciprofloksacin-hidrohlorida sa gvožđe(II)-sulfatom i cink-sulfatom izolovani su slabo rastvorljivi kompleksi, sa strukturom istog tipa  $Me(SO_4)_2(Cl)_2(cf)_2 \times 12H_2O$  (Me = Fe ili Zn) koji do sada nisu opisani u literaturi. U interakciji ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-hlorida izolovan je slabo rastvorljiv kompleks čija je struktura  $(cfH_2)_2(ZnCl_4) \times 2H_2O$ .

U *in silico* ispitivanju, rastvorljivost i permeabilnost leka su identifikovani kao kritični faktori koji utiču na brzinu i obim apsorpcije pri čemu je pokazano da na biološku raspoloživost ciprofloksacina u prisustvu jona metala najviše utiče promena rastvorljivosti.

Dobijeni rezultati pokazuju da sveobuhvatna analiza *in vivo* rezultata, uz primenu odgovarajućih *in vitro* i *in silico* metoda predstavlja korisno sredstvo za simulaciju potencijalnih fizičkohemijskih interakcija lekova.

**Ključne reči:** brzina rastvaranja, ciprofloksacin, *in silico* simulacija interakcije, karakterizacija čvrste faze, lek-lek interakcija, rastvorljivost

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK broj:** 615.33 : 542.2 (043.3)

615.033 : 615.2 (043.3)

# BIOPHARMACEUTICAL CHARACTERISATION OF CIPROFLOXACIN METALLIC IONS INTERACTION

## Abstract

Biopharmaceutical characterisation involves relevant *in vitro* and *in silico* methods that have been recognized as key tools that should provide an insight into the dosage form *in vivo* performance. With the introduction of Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the increased understanding of gastrointestinal physiology *in vitro* methodology is increasingly considered as biorelevant and predictive of drug product bioperformance. There is an increased interest for *in vitro* investigation of drug–drug and food–drug interactions and it has been shown that *in vitro* studies can be used to predict physicochemical interactions that are likely to influence drug absorption rate *in vivo*.

Although, *in vivo* conditions can't be adequately reproduced *in vitro*, it is expected that in certain situations, *in vitro* tests can reflect *in vivo* drug performance and may be used as a surrogate for *in vivo* bioequivalence studies. In addition, gastrointestinal simulation technology can be successfully used as a tool for investigating the mechanism of drug-drug interactions observed *in vivo*.

Numerous *in vivo* studies have shown reduced bioavailability of ciprofloxacin after simultaneous administration of metallic cations containing preparations. Formation of a nonabsorbable complex has been postulated as the interaction mechanism. However, literature *in vitro* data related to ciprofloxacin interaction with metallic ions are somewhat contradictory. Ciprofloxacin tablet dissolution has been shown to be retarded, while some solubility studies indicate increased solubility in the presence of metallic ions containing preparations.

The aim of this study was to investigate the potential mechanisms of ciprofloxacin metallic ions interaction observed *in vivo* by performing *in vitro* solubility and dissolution studies in the reactive media containing different metallic compounds. Different compounds of iron, calcium, aluminium and zinc have been used throughout the study. In order to identify the nature of any physicochemical interactions, characterisation of the solid phases formed was performed. Gastrointestinal mechanistic simulation model was employed in order to simulate interactions between ciprofloxacin and the selected metallic ions and elucidate potential interaction mechanism/s.

A detailed survey of the literature data available on ciprofloxacin–metallic ions interaction has been performed. Solubility and dissolution studies were performed without and with metallic compounds addition. The solid phases generated from the interaction mixture of ciprofloxacin hydrochloride and metallic compounds were examined by powder XRD, DSC, TGA, and FTIR. Commercially available software GastroPlus<sup>™</sup> was used for gastrointestinal simulations of drug absorption. The required input parameters related to ciprofloxacin physicochemical and

pharmacokinetic characteristics were experimentally determined, *in silico* generated or taken from the literature.

Ciprofloxacin hydrochloride-metallic ion *in vitro* interaction studies revealed that drug solubility and dissolution were impaired to a different extent depending on the type and the amount of the metallic compound present. Interaction occurs in mixtures containing relatively high drug concentration and the results obtained emphasize the importance of using mini scale apparatus in biopharmaceutical characterisation of drug-drug interactions. In the case of aluminium, no phase changes were observed. The solid phase generated in the presence of calcium carbonate was identified as hydrated ciprofloxacin base. In the presence of ferrous sulfate and zinc sulfate, a novel complex consistent with a stoichiometry of  $\text{Me}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$  (Me = Fe or Zn) was formed. Interaction between ciprofloxacin hydrochloride and zinc chloride resulted in low soluble complex formation with chemical structure  $(\text{cfH}_2)_2(\text{ZnCl}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}$ .

The results obtained from gastrointestinal simulation identified solubility and permeability as critical parameters affecting the rate and extent of ciprofloxacin absorption. It was found that reduced ciprofloxacin absorption in the presence of metallic cations was accounted for by reduced drug solubility.

Comprehensive analysis of *in vivo*, *in vitro* and *in silico* data is necessary for biopharmaceutical characterisation of drug-drug interaction and the approach presented could be applied to other fluorquinolone–metal interactions showing reduced absorption *in vivo*.

**Keywords:** ciprofloxacin, dissolution, drug-drug interaction, *in silico* simulation, solid state characterisation, solubility

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical technology

**UDC number:** 615.33 : 542.2 (043.3)

615.033 : 615.2 (043.3)

## Sadržaj:

I OPŠTI DEO.....	1
1. Interakcije lekova.....	2
1.1 Farmakodinamičke interakcije.....	3
1.2 Farmakokinetičke interakcije.....	3
1.2.1 Mehanizam interakcija koje utiču na proces apsorpcije.....	5
1.2.1.1 Fizičko-hemijske interakcije.....	5
1.2.1.2 Fiziološke interakcije.....	7
1.2.1.3 Ostale interakcije.....	8
1.3 Ispitivanja interakcija lekova.....	9
2. Biofarmaceutska karakterizacija interakcije lekova.....	11
2.1 Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova.....	11
2.1.1. Primena Biofarmaceutskog sistema klasifikacije u ispitivanju interakcija lekova.....	12
2.2 <i>In vivo</i> metode u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije lekova.....	14
2.3 <i>In vitro</i> metode u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije lekova.....	15
2.3.1 Rastvorljivost.....	16
2.3.2 Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata.....	17
2.3.3 Određivanje permeabilnosti.....	20
2.4 <i>In silico</i> metode u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije lekova.....	22
2.4.1 Unapređeni prostorni model apsorpcije i tranzita.....	22
3. Ciprofloksacin.....	26
3.1 Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike ciprofloksacina.....	26
3.1.1 Soli, polimorfizam i kristalni oblici, građenje kompleksa.....	26
3.1.2 Konstante disocijacije.....	27
3.1.3 Rastvorljivost.....	27
3.1.4 Particioni i distribicioni koeficijent.....	29
3.1.5 Permeabilnost.....	29
3.1.6 Klasifikacija prema BSK.....	30
3.2 Farmakokinetičke karakteristike.....	30
3.3 Interakcije ciprofloksacina sa jonima metala.....	31
3.3.1 Pregled <i>in vivo</i> studija.....	31



3.3.2 Pregled <i>in vitro</i> studija.....	35
4. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	38
II EKSPERIMENTALNI DEO.....	39
5. MATERIJAL I METODE.....	40
5.1 Materijal.....	40
5.2 Metode.....	40
5.2.1 <i>In vivo</i> podaci.....	40
5.2.2 Ispitivanje rastvorljivosti.....	41
5.2.3 Ispitivanje brzine rastvaranja.....	42
5.2.4 Građenje kompleksa.....	43
5.2.5 Metode karakterizacije čvrste faze.....	43
5.2.5.1 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	43
5.2.5.2 Termogravimetrija (TGA).....	43
5.2.5.3 Difrakcija X-zraka (XRD).....	44
5.2.5.4 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	44
5.2.5.5 Kvantitativno određivanje cinka.....	44
5.2.5.6 Kvantitativno određivanje gvožđa, sulfata i hlorida.....	44
5.2.6 <i>In silico</i> metode.....	45
5.2.6.1 Numerička dekonvolucija.....	45
5.2.6.2 GastroPlus <sup>tm</sup> programski paket.....	45
6 REZULTATI I DISKUSIJA.....	47
6.1. <i>In vivo</i> ispitivanja.....	47
6.1.1 <i>In vivo</i> interakcija ciprofloksacina sa jonima metala.....	50
Soli gvožđa.....	50
Jedinjenja aluminijuma i kalcijuma.....	51
Jedinjenja cinka.....	52
6.2. <i>In vitro</i> ispitivanja.....	58
6.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti ciprofloksacina i ciprofloksacin-hidrohlorida.....	58
6.2.2 Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta.....	60
6.2.3. Interakcija ciprofloksacina i jona gvožđa.....	63
6.2.3.1 Interakcija između ciprofloksacina i gvožđe(II)-sulfata.....	63
Ispitivanje rastvorljivosti.....	63

Ispitivanje brzine rastvaranja.....	64
Građenje kompleksa.....	69
Karakterizacija čvrste faze.....	70
6.2.3.2 Interakcija između ciprofloksacina i gvožđe(II)-glukonata/ gvožđe(II)-fumarata.....	74
Ispitivanje rastvorljivosti.....	74
Ispitivanje brzine rastvaranja.....	75
6.2.4 Interakcija između ciprofloksacina i jedinjenja aluminijuma.....	77
Ispitivanje rastvorljivosti.....	78
Ispitivanje brzine rastvaranja.....	80
Karakterizacija čvrstih faza.....	85
6.2.5 Interakcija između ciprofloksacina i jedinjenja kalcijuma.....	88
Ispitivanje rastvorljivosti.....	88
Ispitivanje brzine rastvaranja.....	90
Građenje kompleksa.....	95
Karakterizacija čvrstih faza.....	95
6.2.6 Interakcija između ciprofloksacina i jona cinka.....	99
Ispitivanje rastvorljivosti.....	99
Ispitivanje brzine rastvaranja.....	102
Građenje kompleksa.....	106
Karakterizacija čvrstih faza.....	108
6.3 <i>In silico</i> ispitivanja.....	131
6.3.1 Gastrointestinalna simulacija apsorpcije ciprofloksacina.....	131
6.3.2 Simulacija interakcije ciprofloksacina i jona gvožđa.....	136
Simulacija interakcije ciprofloksacina sa gvožđe(II)-sulfatom.....	137
Simulacija interakcije ciprofloksacina sa gvožđe(II)-glukonom.....	140
6.3.3 Simulacija interakcije ciprofloksacina sa aluminijum-hidroksidom.....	143
6.3.4 Simulacija interakcije ciprofloksacina sa kalcijum-karbonatom.....	148
6.3.5 Simulacija interakcije ciprofloksacina i jona cinka.....	152
7. ZAKLJUČCI.....	166
8. LITERATURA.....	171
BIOGRAFIJA.....	188
Prilog 1 IZJAVA O AUTORSTVU	

Prilog 2 IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE  
VERZIJE DOKTORSKOG RADA  
Prilog 3 IZJAVA O KORIŠĆENJU

## **I OPŠTI DEO**

## 1. Interakcije lekova

Apsorpcija lekovite supstance iz gastrointestinalnog trakta (GIT) zavisi od velikog broja faktora koji se odnose na karakteristike same lekovite supstance, formulaciju farmaceutskog oblika, kao i fiziološke uslove u GIT-u. S obzirom da se u toku terapije, lekovi često kombinuju ili se primenjuju uz obrok u cilju poboljšanja komplijanse, promene u GIT-u, nastale kao posledica prisustva drugog leka ili komponenata hrane, mogu uticati na biološku raspoloživost lekovite supstance i dovesti do varijacija u terapijskoj efikasnosti. Apsorpcija lekovite supstance u prisustvu druge lekovite supstance ili nekog od sastojaka hrane može biti ubrzana, odložena, smanjena ili povećana usled fizioloških promena, kao i usled fizičkih i/ili hemijskih interakcija. Usled promene uslova u GIT-u može doći do promene rastvorljivosti, hemijske stabilnosti i/ili permeabilnosti lekovite supstance.

U savremenoj farmakoterapiji nije moguće izbeći istovremeno propisivanje većeg broja lekova jednom bolesniku, pa "polifarmacija" značajno povećava potencijal za pojavu interakcija. Prisustvo hrane u GIT-u može u značajnoj meri uticati na brzinu pražnjenja želuca, dovesti do promene intestinalne pH vrednosti, intraluminalnog viskoziteta, kao i stepena solubilizacije slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. Takođe, nakon uzimanja obroka može doći do promena u lučenju želudačne kiseline, žuči i pankreasnog soka, promena u pokretljivosti, kao i promena u viscelarnom protoku krvi i limfe, što može dovesti do promene u apsorpciji lekovite supstance i uticati na njen metabolizam.

Interakcije se mogu definisati kao promene u farmakodinamičkim i/ili farmakokinetičkim osobinama lekovitih supstanci, koje su izazvane istovremenom primenom sa drugim lekovitim supstancama ili komponentama hrane (1).

Veliko interesovanje za ispitivanje interakcije lekova je počelo kada je, na osnovu rezultata odgovarajućih studija, pokazano da interakcije lekova predstavljaju važan činiac u pojavi neželjenih dejstava lekova (1-7). U literaturi se mogu pronaći brojne studije koji se bave lek-lek i lek-hrana interakcijama. Primena jedne lekovite supstance može promeniti dejstvo druge lekovite supstance jednim od dva mehanizma:

- modifikacija farmakološkog efekta lekovite supstance bez promene koncentracije u telesnim tečnostima (farmakodinamičke interakcije);
- promena koncentracije lekovite supstance koja dospeva na mesto dejstva

(farmakokinetičke interakcije) (1).

### **1.1 Farmakodinamičke interakcije**

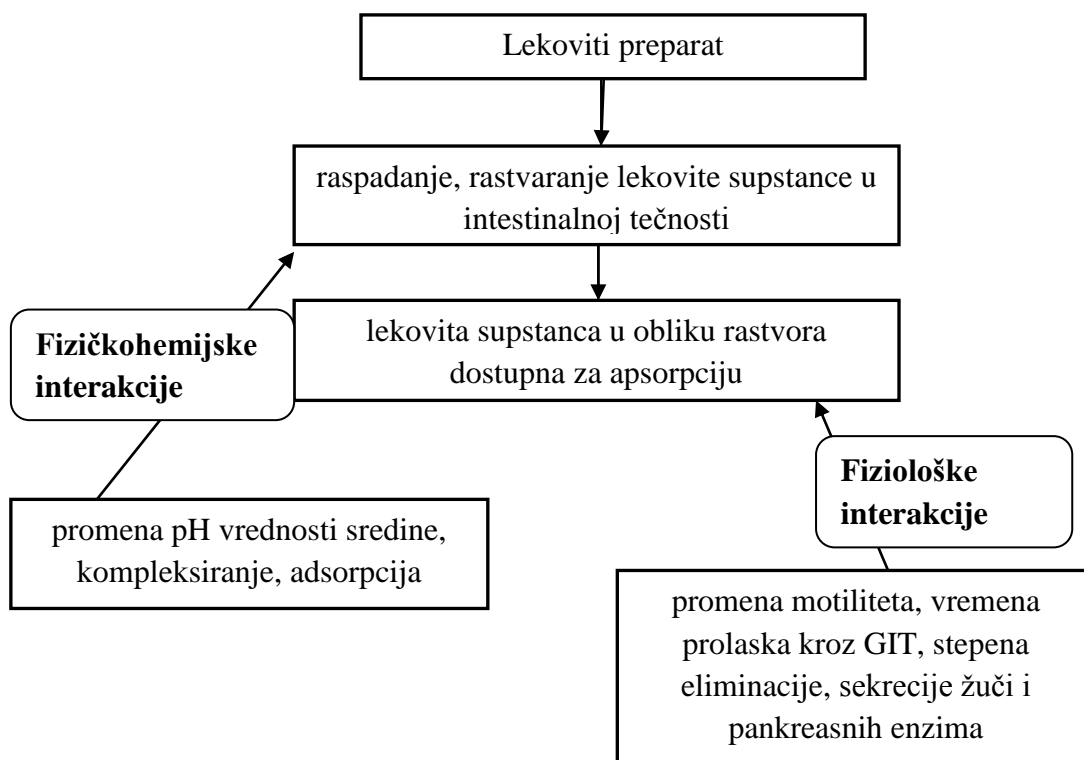
Karakteristika ovog tipa interakcije jeste da lekovite supstance stupaju u interakciju ili na mestu dejstva (direktne) ili na različitim mestima (indirektne). Direktne interakcije se dešavaju kada dve lekovite supstance deluju na isti organ kao sinergisti ili antagonisti (1, 8). Indirektne interakcije se dešavaju kada lek „izazivač“ na posredan način menja dejstvo „glavnog“ leka.

### **1.2 Farmakokinetičke interakcije**

Farmakokinetičke interakcije se mogu javiti u toku svih farmakokinetičkih procesa (apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje). Farmakokinetičke interakcije su predmet velikog interesovanja, a dejstvo lekovitih supstanci, usled interakcije, može biti oslabljeno ili pojačano (1). U fazi apsorpcije, sastojci hrane ili drugi lekovi, uglavnom, usporavaju prelazak lekova u cirkulaciju ili smanjuju biološku raspoloživost lekovitih supstanci stvarajući u intestinumu nerastvorljive ili slabo permeabilne komplekse. Primena vazokonstriktora na mestu odakle se apsorbuje lek dovodi do usporavanja apsorpcije drugog leka, a takođe i lekovi koji usporavaju motilitet GIT-a (spazmolitici) mogu da uspore apsorpciju drugih lekova. Apsorpcija može biti ubrzana posle primene lekova koji ubrzavaju pražnjenje želuca (metoklopramid, na primer) (1, 8). U fazi distribucije, jedna lekovita supstanca može promeniti distribuciju druge, paralelno primenjene lekovite supstance, ali su takve interakcije retko klinički značajne. Istiskivanje leka sa njegovih mesta za vezivanje na proteinima plazme ili u tkivima, prolazno povećava količinu slobodnog (nevezanog) leka, ali je to praćeno povećanim izlučivanjem, pa nastupa novo stanje ravnoteže. Posledice ovakvih interakcija su pojačanje dejstva i, potencijalno, toksičnosti, a one se mogu izbeći pravilnim izborom lekova i postepenim uvođenjem novog leka u terapiju (1, 4, 8). U fazi metabolizma postoji najviše mogućnosti za interakcije lekova, budući da se lekovite supstance dominantno metabolišu u jetri, koristeći pri tome često iste metaboličke puteve, odnosno, konkurišući za iste grupe enzima. Kao posledica interakcije može doći do

indukcije ili inhibicije enzima, što smanjuje, odnosno, povećava farmakološku aktivnost drugih lekovitih supstanci (1, 8, 9). Česte su i interakcije u fazi izlučivanja jer lekovi konkurišu za procese aktivnog transporta ili sekrecije u tubulima. Zato u plazmi dolazi do povećanja koncentracije lekovite supstance, pa se pojačava njihovo dejstvo i toksičnost. Ukoliko je dominantni put eliminacije leka ekskrecijom preko bubrega, interakcije se mogu događati na nivou promena u vezivanju za proteine plazme i na nivou brzine glomerularne filtracije. Pored toga, uticaj na pH urina, proces pasivne reapsorpcije lekova, kao i proces tubularne sekrecije može biti od značaja za promenu koncentracije leka u plazmi (1).

Sa biofarmaceutskog aspekta su značajne interakcije na nivou apsorpcije. Šematski prikaz faktora koji mogu uticati na proces apsorpcije oralno primenjenih lekova dat je na slici 1.



*Slika 1. Šematski prikaz faktora koje utiču na proces apsorpcije (prema ref. 10)*

**Fig. 1.** Factors that lead to potential interactions in oral drug absorption (according to ref. 10)

### **1.2.1 Mehanizam interakcija koje utiču na proces apsorpcije**

Interakcije koje se dešavaju na nivou procesa apsorpcije mogu uticati na brzinu rastvaranja lekovite supstance, difuziju rastvorene lekovite supstance do mesta apsorpcije, pražnjenje sadržaja iz GIT-a i vreme prolaska kroz intestinalni trakt i permeabilnost lekovite supstance. Kao posledica interakcije mogu se javiti ubrzanje procesa apsorpcije lekovite supstance, odložen početak apsorpcije, smanjen ili povećan obim apsorpcije (10). Kod većine lekova proces apsorpcije kroz epitel creva se odvija pasivnom difuzijom i prolaz lekovite supstance je direktno proporcionalan koncentracionom gradijentu i particionom koeficijentu lekovite supstance. Promena pH vrednosti sredine, interakcija sa jonima prisutnim u GIT-u ili prisustvo lekova koji usporavaju pražnjenje želuca mogu uticati na proces apsorpcije pasivnom difuzijom (7). Interakcije lekova i/ili interakcije lekova sa hranom se mogu klasifikovati kao: (I) fizičko-hemijske i (II) fiziološke (10).

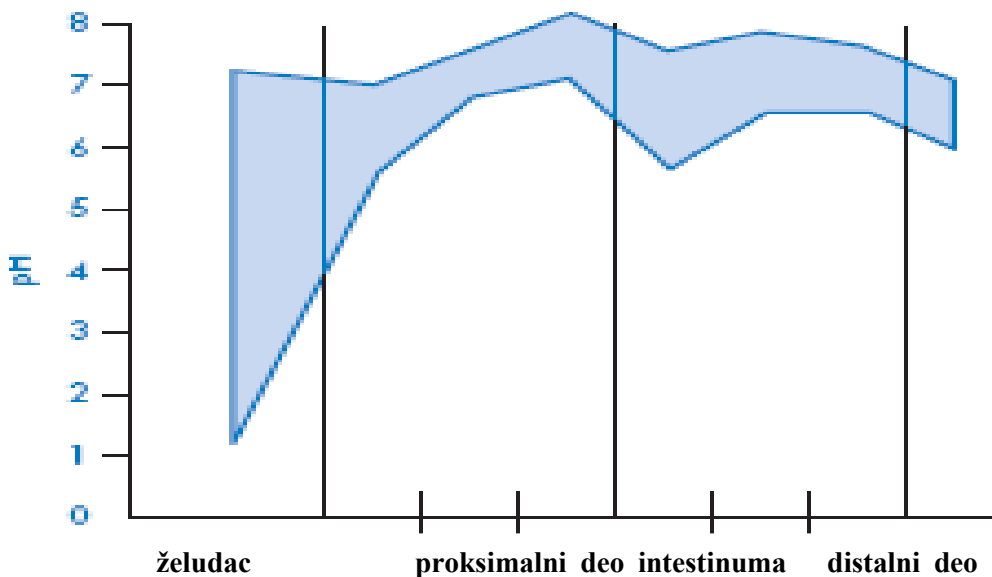
#### **1.2.1.1 Fizičko-hemijske interakcije**

Fizičko-hemijske interakcije se mogu javiti između lekova i hrane, između dva lekovita preparata ili lekovite supstance i nekog od prisutnih ekscipijensa. Brzina i obim apsorpcije oralno datog leka zavisi od brzine oslobađanja aktivne supstance iz preparata, njene rastvorljivosti i permeabilnosti. Svi faktori koji mogu uticati na ove parametre, potencijalno, mogu dovesti i do promene u biološkoj raspoloživosti, a time i ispoljavanju terapijskog efekta leka. Na brzinu rastvaranja lekovite supstance može uticati promena pH vrednosti sredine, kompleksiranje sa jonima metala poreklom iz hrane, drugih lekovitih preparata ili dijetetskih suplemenata ili adsorbovanje na sastojke hrane ili sastojke drugih lekovitih preparata. Hemijska degradacija lekovite supstance u GIT-u takođe može uticati na proces apsorpcije. Fizičke barijere, kao što je povećan viskozitet u lumenu intestinuma mogu da uspore difuziju lekovite supstance kroz intestinalnu membranu i da smanje stepen apsorpcije (10).

Promena pH vrednosti sredine može dovesti do promene u stabilnosti lekovite supstance i do različitih fizičkih ili hemijskih promena. pH vrednost u želucu varira u rasponu 1-3 kod zdravih osoba, a prelaskom u druge delove GIT-a dolazi do porasta pH vrednosti.



Na slici 2 dat je šematski prikaz promena pH vrednosti u različitim delovima GIT-a (5). Promena pH vrednosti dovodi do promene odnosa jonizovanog i nejonizovanog oblika lekovite supstance što može uticati na njenu apsorpciju (5).



*Slika 2: pH vrednosti u različitim delovima GIT-a (prema ref. 5)*

*Fig. 2. pH values in different GIT compartments (according to ref. 5)*

Primena antacida i hrane dovodi do promene pH vrednosti u želucu. Jedinjenja koja imaju karakteristike slabih kiselina ne jonizuju u želucu i uglavnom se apsorbuju pasivnom difuzijom. Istovremena primena antacida povećava pH vrednost u želucu, pri čemu slaba kiselina jonizuje, što dovodi do smanjenja apsorpcije. Osim antacida, u ovim interakcijama mogu učestvovati i lekovi koji direktno deluju na sekreciju želudačne kiseline (ranitidin, famotidin, cimetidin i H<sub>2</sub>-antagonisti) i time indirektno utiču na pH vrednost želuca (5, 9).

Interakcija između jonizovanih supstanci može dovesti do nastanka i precipitacije slabo rastvorljivih soli i kompleksa. Kompleksiranje i precipitacija mogu biti uslovljeni promenama u jonskoj jačini, temperaturi ili pH vrednosti sredine. Da bi se sprečile ove interakcije potrebno je poznavati fizičke i hemijske karakteristike supstanci koje stupaju u interakciju (5).

U formiranju kompleksa najčešće učestvuju joni metala i, kao ligand, lekovita supstanca

koja poseduje u strukturi grupe koje mogu biti helirane. Da bi se nagradio kompleks, potrebno je da postoje najmanje dva liganda koja mogu da vežu jon metala. Nakon stvaranja kompleksa, rastvorljivost i permeabilnost supstance-liganda može biti promenjena, pa dolazi do smanjenja ili povećanja apsorpcije lekovite supstance (5). U literaturi se navodi primer građenja kompleksa tetraciklina sa jonima metala, pri čemu dolazi do smanjenja apsorpcije tetraciklina (11). Interakcija kumarina sa jonima magnezijuma dovodi do građenja kompleksa i apsorpcija kumarina se povećava (12). U literaturi se mogu naći i podaci o interakciji jona metala i fluorohinolonskih antibiotika, pri čemu se kao mehanizam interakcije navodi građenje kompleksa koji ne mogu da permeiraju membranu GIT-a (13-17).

Supstance koje poseduju sposobnost adsorbovanja, kao što su hidroksidi magnezijuma i aluminijuma se često upotrebljavaju istovremeno sa drugim lekovima, pri čemu mogu stupiti u interakciju sa njima. Ove interakcije su nespecifične, a istovremena upotreba može u manjem ili većem stepenu uticati na proces apsorpcije. Ukoliko do adsorpcije dođe pre dolaska do mesta apsorpcije, koncentracija supstance dostupna na mestu apsorpcije biće smanjena. Pod uticajem elektrolita u GIT-u, lekovita supstanca se može odvojiti od adsorbensa pre mesta apsorpcije i proces apsorpcije se u tom slučaju odvija nesmetano (5).

### **1.2.1.2 Fiziološke interakcije**

Istovremena primena većeg broja lekova ili primena lekova sa hranom može uticati na fiziološke uslove u GIT-u i na proces apsorpcije, pa se takve interakcije svrstavaju u fiziološke (10). Fiziološke karakteristike pojedinih regiona GIT-a (motilitet, pH vrednost) takođe mogu doprineti pojavi interakcija. Usled interakcije sa hranom/lekovima, uslovi u lumenu GIT-a mogu biti promenjeni, pa može doći do promena u motilitetu, vremenu prolaska kroz intestinum, brzini pražnjenja ili promena u sekreciji pankreasnih ili žučnih sokova. Na apsorpciju lekovite supstance prisutne u rastvoru nakon oslobađanja iz lekovitog oblika značajno utiče varijabilno vreme prolaska i zadržavanja u različitim delovima GIT-a (10).

Većina lekovitih supstanci se apsorbuje u proksimalnim delovima intestinuma, pa supstance koje utiču na pražnjenje želuca mogu uticati na oslobađanje lekovite

supstance i na njenu dostupnost na mestu apsorpcije. Brzina pražnjenja želuca zavisi od sadržaja u želucu, pH, osmolarnosti, viskoziteta i temperature (10). Obrok bogat proteinima može uticati na pH vrednost u želucu, pa se menja i brzina pražnjenja želuca. Ukoliko se brzina pražnjenja želuca smanji, to može dovesti do smanjenja apsorpcije lekovitih supstanci koje su nestabilne u kiseloj sredini. Ukoliko dođe do povećanja pH vrednosti u želucu, slabo bazne lekovite supstance mogu da precipitiraju što, takođe, utiče na proces apsorpcije. Sporije pražnjenje želuca može da ima povoljan uticaj u slučaju nejonizovanih, slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, s obzirom da može pospešiti njihovo rastvaranje i apsorpciju (10).

Interakcije koje se dešavaju u proksimalnim delovima intestinuma u najvećoj meri utiču na proces apsorpcije lekovite supstance. Vreme prolaska kroz intestine uglavnom traje između 3 i 4 h i ne zavisi u velikoj meri od primene hrane (10). Razlozi za smanjenje apsorpcije mogu biti precipitacija lekovitih supstanci koje pokazuju pH zavisnu rastvorljivost, degradacija pod dejstvom enzima pankreasa i kompleksiranje. Usled prisustva hrane, dolazi do povećanja lučenja žučnih soli. Žučne soli solubilizuju slabo rastvorljive supstance, pa dolazi do povećanja obima apsorpcije (10).

### **1.2.1.3 Ostale interakcije**

Poseban tip interakcija predstavljaju interakcije koje se dešavaju na zidu creva i ispoljavaju kao promena permeabilnosti membrane (10). U ovaj tip interakcija spadaju interakcije sa mukusom i epitelom GIT-a, interakcije koje dovode do promena u paracelularnom transportu, promena u transportnim enzimima, protoku krvi, kao i promene u putevima eliminacije (10, 18).

Kompeticija između lekovitih supstanci ili komponenata hrane za transportere u intestinalnoj membrani takođe može dovesti do promena u procesu apsorpcije. Do smanjenja količine apsorbovanog leka dolazi usled zasićenja kapaciteta transportera koji se nalaze na membrani (10).

Na proces apsorpcije može uticati i proces intestinalne eliminacije koji obuhvata sekreciju i metabolizam. Intestinalna eliminacija supstanci pod dejstvom P-glikoproteina ograničava apsorpciju velikog broja lekovitih supstanci (10). Utvrđeno je da se P-glikoprotein nalazi na velikom broju enterocita gde ispoljava zaštitnu ulogu tako

što transportuje toksične supstance ili metabolite izvan ćelija. Povećana ekspresija P-glikoproteina u intestinumu može da ograniči apsorpciju supstrata ovog transportnog proteina, smanjujući, na taj način, njegovu bioraspoloživost i otežavajući održavanje terapijskih koncentracija u plazmi (9).

### 1.3 Ispitivanje interakcija lekova

Istovremena primena lekova može dovesti do toga da lekovite supstance stupe u interakciju, pri čemu dolazi do potenciranja ili slabljenja njihovog dejstva. Razvoj nauke u oblasti farmakokinetike i proučavanje farmakodinamičkih osobina lekovite supstance doveo je do pojave ciljanih studija o interakcijama lekova u postupku razvoja novog leka. U zavisnosti od strukturnih i fizičko-hemijskih osobina supstanci, potrebno je sprovesti odgovarajuća *in vitro* ispitivanja, kao i određena *in vivo* ispitivanja u fazi kliničkih studija. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se predvideti klinički značajne interakcije.

Pojava sve većeg broja zabeleženih slučajeva lek-lek ili lek-hrana interakcija koje utiču na terapijsku efikasnost primenjenog leka, bila je podsticaj da EMA 1997. godine izda regulatorne smernice za ispitivanje interakcija (19), koje su dopunjene 2012. godine (20). Takođe, FDA je izdala dokument sa regulatornim smernicama za ispitivanje interakcija lekova (21). Ove regulatorne smernice sadrže uputstva za ispitivanje lek-lek ili lek-hrana interakcija i preporuke kako prilagoditi način primene i dozu leka da bi se izbegla pojava interakcija. Zahvaljujući smernicama moguće je, uz korišćenje određenog broja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja, predvideti pojavu klinički značajnih interakcija lekova. Preporuka je da se mogućnost pojave interakcija ispita u fazi razvoja leka i trebalo bi da bude sastavni deo dokumentacije o bezbednosti i efikasnosti leka. Da bi se sprečila pojava neželjenih efekata ili promena u terapijskoj efikasnosti potrebno je utvrditi potencijal za stupanje u interakciju. EMA regulatorne smernice daju preporuke za ispitivanje kako farmakokinetičkih, tako i farmakodinamičkih interakcija, dok su smernice FDA usmerene samo na ispitivanje farmakokinetičkih interakcija koje se javljaju na nivou metabolizma.

Preporuka je da se ispitivanje farmakokinetičkih interakcija *in vivo* obavlja u ljudi, jer je teško uspostaviti korelaciju između pojedinih životinjskih vrsta i čoveka. Ispitivanje

lek-hrana interakcije bi trebalo da se sprovodi u ljudi, ispitivanjem uticaja obroka bogatog mastima na apsorpciju primenjenog leka.

Trebalo bi razmotriti i pojavu interakcija na nivou apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije. Ukoliko je *in vivo* uočena pojava interakcije, u cilju otkrivanja potencijalnog mehanizma interakcije potrebno je sprovesti odgovarajuće *in vitro* i *in vivo* studije.

Ispitivanje interakcija na nivou apsorpcije može pomoći u otkrivanju kritičnih faktora koji utiču na rastvorljivost, brzinu rastvaranja ili permeabilnost lekovite supstance *in vivo*. Ova ispitivanja se rade za preparate za oralnu primenu, ali i za pojedine inhalacione preparate. Lek-lek ili lek-hrana interakcije koje utiču na proces apsorpcije su relativno česta pojava, pa se prilikom proučavanja ovog tipa interakcija moraju analizirati fizičko-hemijske karakteristike supstanci i njihovih formulacija (pH zavisna rastvorljivost, brzina rastvaranja, adsorpcija i mogućnost građenja kompleksa), farmakokinetičke osobine (mehanizam apsorpcije, biološka raspoloživost, metabolizam prvog prolaza, enterohepatička cirkulacija), farmakodinamičke karakteristike (efekat na pokretljivost i pražnjenje u GIT-u, sekrecija žuči, pH vrednost u želucu, protok krvi i gastrointestinalna flora), kao i toksični efekti i mogućnost oštećenja GIT membrana. U slučaju lek-hrana interakcija se mora uzeti u obzir da dejstvo hrane na apsorpciju može trajati nekoliko sati, pa se u *in vivo* studijama mora ispitati trajanje efekta, kako bi se adekvatno podesilo doziranje (19). Ukoliko lekovita supstanca pokazuje pH zavisnu rastvorljivost, potrebno je ispitati njenu rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti, kako bi se procenio uticaj na apsorpciju istovremeno primenjenih lekova koji dovode do povećanja pH vrednost u želucu.

## 2. Biofarmaceutska karakterizacija interakcije lekova

Pod biofarmaceutskom karakterizacijom se podrazumeva sprovođenje *in vivo*, *in vitro* i *in silico* ispitivanja lekovitih supstanci i lekovitih preparata sa ciljem da se deo *in vivo* ispitivanja u ljudi zameni reproduktivnim i dobro standardizovanim laboratorijskim testovima.

Ovim su obuhvaćena *in vitro* ispitivanja vezana za klasifikaciju lekovite supstance u skladu sa konceptom Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova (određivanje rastvorljivosti i permeabilnosti), kao i karakterizaciju samog preparata u pogledu brzine rastvaranja lekovite supstance. Poželjno je da se lekovita supstanca okarakteriše i svrsta u odgovarajuću grupu Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (BSK) kako bi se predvideli ograničavajući faktori za njenu apsorpciju i olakšao rad na razvoju odgovarajuće formulacije lekovitog preparata, kao i razvoj biorelevantne metodologije za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata.

### 2.1 Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova

Polazeći od biofarmaceutskih principa i mehanističkih modela koji opisuju proces apsorpcije lekovitih supstanci nakon oralne primene preparata, 1995. godine je predložen, takozvani, Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova (22). Ovaj sistem je zasnovan na podeli prema rastvorljivosti i permeabilnosti lekovite supstance, i, za sada, se odnosi na konvencionalne farmaceutske oblike lekova za oralnu primenu. Kada se govori o konvencionalnim preparatima za oralnu primenu, podrazumeva se da brzina oslobađanja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika zavisi od njene rastvorljivosti, a brzina apsorpcije u organizmu od permeabilnosti same lekovite supstance. BSK je takođe osnova za prihvatanje *biowaivera*, odnosno izostavljanje *in vivo* ispitivanja biološke ekvivalentnosti (BE) na osnovu *in vitro* karakterizacije farmaceutskog preparata (22, 23).

S obzirom da se, u većini slučajeva, lekovita supstanca primenjuje u čvrstom stanju, kao preduslov za apsorpciju, potrebno je da se lekovita supstanca oslobodi iz lekovitog oblika i rastvori u telesnim tečnostima. Zbog toga se najveći broj ispitivanja u okviru biofarmaceutske karakterizacije lekova odnosi na procenu rastvorljivosti i brzine

rastvaranja lekovite supstance. Karakterizacija lekovite supstance u pogledu brzine rastvaranja i brzine apsorpcije se može izvršiti na osnovu bezdimenzionih parametra kao što su: dozni broj ( $D_0$ ), broj brzine rastvaranja ( $D_n$ ) i apsorpcioni broj ( $A_n$ ) (22-24). Ovi parametri su definisani imajući u vidu uticaj različitih fizičko-hemijskih (*in vitro*) i fizioloških (*in vivo*) parametara i predstavljaju osnov za klasifikaciju lekovitih supstanci, kao i predviđanje frakcije apsorbovanog leka ( $F_a$ ). Rastvorljivost, kao i permeabilnost, se mogu opisati kao „visoka“ ili „niska“, pa su, u okviru predloženog sistema klasifikacije, formirane četiri grupe.

### **2.1.1. Primena Biofarmaceutskog sistema klasifikacije u ispitivanju interakcija lekova**

Kao što je već napomenuto, prednost BSK je identifikacija ključnih faktora koji kontrolišu proces apsorpcije lekovite supstance iz preparata. Takođe je definisana mogućnost uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK) (25, 26).

Supstance koje pripadaju BSK grupi 1 karakteriše visoka rastvorljivost i visoka permeabilnost. Apsorpcija lekova iz ove grupe, primenjenih u obliku preparata sa trenutnim oslobađanjem ne zavisi od brzine rastvaranja lekovite supstance i/ili vremena prolaska kroz GIT, već zavisi od brzine pražnjenja želuca (22). Uspostavljanje IVIVK je moguće ukoliko je brzina rastvaranja lekovite supstance sporija od brzine pražnjenja želuca (22, 23, 25, 26). Lekovite supstance koje pripadaju ovoj grupi su dobri kandidati za formulaciju lekova sa modifikovanim oslobađanjem. S obzirom da brzina pražnjenja želuca kontroliše brzinu i obim apsorpcije ovih lekova, očekuje se da će interakcije koje odlažu pražnjenje želuca odložiti i proces apsorpcije (10).

Supstance koje pripadaju BSK grupi 2 karakteriše niska rastvorljivost i visoka permeabilnost. Rastvorljivost i/ili brzina rastvaranja u *in vivo* uslovima je kritični faktor koji ograničava apsorpciju lekova BSK grupe 2 (22). Preporuka je da se prilikom ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata sa trenutnim oslobađanjem u *in vitro* uslovima koriste medijumi različitih pH vrednosti (1.2 - 6.8). Takođe je, kada je opravdano, dozvoljen dodatak surfaktanata u medijum ili korišćenje fiziološki zasnovanih medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja (22, 27). Apsorpcija lekova iz ove grupe je često poboljšana u prisustvu obroka koji je bogat mastima, jer dolazi do

solubilizacije slabo rastvorljive lekovite supstance (10). Takođe, interakcije koje dovode do povećanja rastvorljivosti ili brzine rastvaranja u GIT-u, imaju pozitivan efekat na proces apsorpcije (10).

U slučaju lekovitih supstanci BSK grupe 3, permeabilnost je ograničavajući faktor za apsorpciju (22). Supstance koje pripadaju ovoj grupi često poseduju „prozor za apsorpciju“ u gornjim delovima intestinuma (10). Proces apsorpcije lekova iz ove klase se uglavnom odvija u gornjim delovima intestinuma, tako da svaka interakcija koja ometa apsorpciju u tom delu intestinuma, dovodi do smanjene bioraspoloživosti lekovite supstance. Uticaj hrane na apsorpciju lekova ove grupe se može objasniti tako što hrana stvara fizičku barijeru koja ometa proces difuzije kroz membranu ili prisustvo hrane povećava viskozitet intestinalne tečnosti pri čemu se smanjuje apsorpcija (10). Smatra se da su lekovite supstance koji pripadaju ovoj grupi dobri kandidati za *biowaiver* ukoliko se nalaze u obliku preparata sa trenutnim oslobađanjem koji sadrži standardnu količinu ekscipijenasa, koje nisu supstrat za transportne sisteme prisutne u zidu intestinuma (inluks/efluks proteinske pumpe) i koje ne podležu metabolizmu prvog prolaska (28).

Lekovite supstance iz BSK grupe 4 ne poseduju ni dovoljnu rastvorljivost, ni permeabilnost da bi proces apsorpcije bio kompletan. Praktično je mali broj ovih supstanci koje su namenjene za oralnu primenu (22). Lekovite supstance ove grupe *in vivo* ispoljavaju veliku varijabilnost i ne mogu se smatrati kandidatima za uspostavljanje IVIVK.

U tabeli 1 dat je prikaz očekivanog uticaja hrane i lekova na apsorpciju supstanci koje pripadaju različitim grupama BSK prema Fleisher i sar. (10).



**Tabela 1.** Biofarmaceutska klasifikacija lekova: uticaj hrane i interakcije lekova na proces apsorpcije (prema ref. 10)

**Table 1.** Biopharmaceutical Classification System: food and drug-drug interaction effect on absorption (10)

<b>BSK grupa</b>	<b>Uticaj hrane</b>	<b>Interakcije lekova</b>
<b>1</b>	nema uticaja ili odložena apsorpcija	odložena apsorpcija usled odloženog pražnjenja želuca
<b>2</b>	primena sa hranom bogatom mastima povećava apsorpciju	promena rastvorljivosti i brzine rastvaranja; građenje kompleksa
<b>3</b>	smanjena apsorpcija	uticaj na proces apsorpcije u gornjem delu intestinuma
<b>4</b>	slaba apsorpcija sa/bez hrane	građenje kompleksa

## **2.2 In vivo metode u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije lekova**

*In vivo* ispitivanje interakcije lekova je najpouzdaniji način da se utvrdi mogućnost ispoljavanja lek-lek i lek-hrana interakcija. Međutim, ova ispitivanja su dugotrajna, skupa i podrazumevaju angažovanje ispitanika/dobrovoljaca. Ispitivanje se najčešće izvodi u grupi zdravih dobrovoljaca, mada se ispitivanje može izvesti i u grupi pacijenata. Prilikom ispitivanja interakcija potrebno je razmotriti klinički značaj lek-lek interakcija. Potrebno je odrediti koncentraciju leka u plazmi u funkciji vremena ili se prati kumulativno izlučivanje leka urinom. Takođe, prati se brzina apsorpcije određivanjem maksimalne koncentracije i vremena pri kome je postignuta maksimalna koncentracija leka u plazmi ( $C_{max}$  i  $t_{max}$ ) i stepen apsorpcije određivanjem površine ispod krive koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena (AUC) u prisustvu i u odsustvu interagujućeg leka. Dizajn studije može biti paralelan ili randomiziran ukršteni dizajn. Kod paralelnog dizajna, jedna grupa dobrovoljaca primenjuje samo lek-supstrat, dok druga grupa primenjuje istovremeno lek-supstrat i interagujući lek. Kod randomiziranog ukrštenog dizajna jedna grupa dobrovoljaca prima prvo lek-supstrat, a zatim oba leka koja interaguju istovremeno, dok druga grupa prima prvo oba leka, a zatim samo lek-supstrat. Ispitivanje lek-lek interakcija se najčešće izvodi na gladno. Ukoliko se ispituje lek-hrana interakcija, uticaj hrane se procenjuje nakon istovremene primene preparata i obroka bogatog mastima. Takođe se mora ispitati i pojava lek-lek interakcija, na različitim nivoima ADME procesa (25, 26).

Razvojem Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (BSK) i procenom apsorpcije lekovitih supstanci na osnovu njihove rastvorljivosti, permeabilnosti kroz membrane i brzine rastvaranja iz farmaceutskog preparata, proširene su mogućnosti za sagledavanje *in vivo* ponašanja lekova i postavljena osnova za savremeni, zasnovan na analizi rizika pristup ispitivanju biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti.

### **2.3 *In vitro* metode u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije lekova**

Na početku ovog poglavlja navedeno je da biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci i preparata obuhvata *in vitro* ispitivanja rastvorljivosti i permeabilnosti, kao i karakterizaciju preparata u pogledu brzine rastvaranja lekovite supstance. Sa aspekta primene saznanja o rastvorljivosti leka u cilju predviđanja njegovog ponašanja u *in vivo* sredini, ključnu ulogu ostvaruju „osnovna“ rastvorljivost (primarni parametar koji zavisi od hemijske strukture), kao i pH-zavisni profil rastvorljivosti i rastvorljivost supstance u prisustvu surfaktanata (micele žučnih soli, fosfolipidi). Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata je *in vitro* ispitivanje koje je osmišljeno s ciljem da omogući predviđanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog preparata u organizmu, nakon njegove primene.

Takođe, ispitivanje brzine rastvaranja u *in vitro* uslovima dobija sve veći značaj prilikom ispitivanja i predviđanja lek-hrana i interakcija između lekova, što će biti razmatrano u daljem tekstu.

FDA preporučuje da se uticaj hrane na apsorpciju lekovite supstance ispituje u *in vivo* studijama bioraspoloživosti nakon istovremene primene preparata lekovite supstance sa obrokom bogatim mastima (29). Dizajniranje fiziološki zasnovanih medijuma omogućilo je da se ispitivanje uticaja hrane vrši *in vitro*, ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance u medijumima koji simuliraju stanje nakon obroka i stanje gladovanja (27).

Jedan od novijih pristupa *in vitro* simulacije uticaja hrane predstavlja razvoj, takozvanog, "veštačkog gastrointestinalnog sistema" (*Artificial gastrointestinal system*). Aparatura ima nekoliko segmenata koji predstavljaju pojedine delove gastrointestinalnog trakta (želudac, tanko i debelo crevo) u kojima su pažljivo kontrolisani temperatura, pH vrednost, hidrodinamika, lučenje enzima i apsorpcija vode,

lekova i svarenih komponenata hrane (30).

### 2.3.1 Rastvorljivost

Rastvorljivost se definiše kao maksimalna količina supstance koja može da se rastvori u datoj zapremini određenog rastvarača pri konstantnoj temperaturi. Rastvorljivost lekovite supstance je jedan od osnovnih faktora koji utiču na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz preparata, pa time i na biološku raspoloživost leka. Prema principima BSK, kada govorimo o rastvorljivosti lekovite supstance, posmatramo njenu rastvorljivost pri uslovima koji postoje u GIT-u, pri čemu moramo uzeti u obzir i terapijsku dozu primenjene supstance.

pH profil rastvorljivosti se eksperimentalno određuje u opsegu pH 1-7.5 i pri temperaturi od 37°C u puferskim rastvorima koje preporučuje Američka farmakopeja (USP) (32). Kao referentna vrednost za rastvorljivost se uzima najmanja vrednosti za rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti. Dobro rastvorljiva supstanca ima dozni broj veći od 1, tj. u predloženom opsegu pH vrednosti, najveća doza se rastvara u  $\leq 250$  ml vodenog medijuma (25).

Postojeće preporuke koje propisuje EMA (26) navode da je, za farmaceutske preparate sa trenutnim oslobađanjem, koji sadrže dobro rastvorljivu lekovitu supstancu, moguće, u određenim situacijama, izostaviti *in vivo* ispitivanja biološke ekvivalencije na osnovu rezultata ispitivanja brzine rastvaranja *in vitro*.

Prilikom razmatranja rastvorljivosti u *in vivo* uslovima, mora se ispitati i potencijalni uticaj hrane, što može dovesti do promene rastvorljivosti i precipitacije lekovite supstance.

Dodatak površinski aktivnih materija u medijum može poboljšati rastvorljivost lekovitih supstanci sa niskom rastvorljivošću. S obzirom da su micelle žučnih kiselina i fosfolipida fiziološki prisutne površinski aktivne materije, ove supstance su iskorišćene za razvoj, takozvanih, fiziološki zasnovanih medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja. Za lekovite supstance koje ne podležu jonizaciji, rastvorljivost u disperziji micela tauroholne kiseline i lecitina u odnosu 4:2, može se odrediti na osnovu sledeće jednačine (31):

$$SR = 0,75 \times \log K_{ow} + 2,27$$

SR - odnos rastvorljivosti supstance u disperziji površinski aktivnih materija i rastvorljivosti supstance u vodi

$K_{ow}$  - particioni koeficijent oktanol-voda

Odnos lecitina i tauroholne kiseline u *in vivo* uslovima je obično 1:2 ili 1:5 (27), a s obzirom da su one prirodni surfaktanti u GIT-u, prisustvo određene koncentracije ovih supstanci u fiziološki zasnovanim medijumima utiče na brzinu rastvaranja lekovite supstance. U fiziološki zasnovanim medijumima odnos lecitina i natrijum-tauroholata (so tauroholne kiseline) je približno 1:3. U medijumu koji simulira uslove u organizmu na gladno žučne soli su prisutne u koncentraciji do 5 mM, dok je u medijumu koji simulira uslove u organizmu nakon obroka njihova koncentracija 15 mM (27).

Pored pH vrednosti i prisustva površinski aktivnih supstanci, na rastvorljivost mogu uticati i drugi faktori, kao što je uticaj zajedničkog jona i puferski kapacitet medijuma. Prilikom ispitivanja interakcija lekova treba dodatno razmotriti njihovu mogućnost kompleksiranja i građenja novih jonskih vrsta (33-36).

Pojedine lekovite supstance imaju sposobnost da se ponašaju kao ligandi, pri čemu grade sa jonima metala, helatni kompleks. Ova kompleksna jedinjenja su često karakteristično obojena, slabo disosovana i vrlo često slabo rastvorljiva u vodi (33, 34).

### **2.3.2 Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata**

Mogućnost predviđanja kinetike oslobađanja i rastvaranja leka *in vivo* na osnovu rezultata dobijenih *in vitro*, dobila je veći značaj nakon uvođenja Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova (22) i sve većeg rada vezanog za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacija. Dobro osmišljen test za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance treba da omogući smanjenje vremena i troškova razvoja formulacije, smanjenje broja eksperimenata *in vivo*, poboljšan biofarmaceutski kvalitet proizvoda, što dovodi do bolje kliničke efikasnosti i bezbednosti (25, 26, 37). U zavisnosti od cilja ispitivanja, zahtevi i uslovi za ispitivanje brzine rastvaranja mogu biti različiti, ali je uvek preporučljivo da se pokuša da se uspostavi veza između *in vitro* i *in vivo* dobijenih

rezultata.

Uporedo sa rastućim značajem *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata u predviđanju kinetike apsorpcije lekovite supstance *in vivo*, pojavio se i interes za razvoj, takozvanog, biorelevantnog *in vitro* testa. Iako je usvojen stav da rezultati dobijeni *in vitro* treba da ukažu na *in vivo* ponašanje supstance, metode koje se mogu naći u farmakopejama (32, 38) ne pružaju dovoljno uvida u *in vivo* situaciju.

S obzirom da uslovi definisani farmakopejom, ne mogu uvek da prikažu *in vivo* situaciju, prilikom razvoja biorelevantnog *in vitro* testa mora se izvesti:

- identifikacija odgovarajućeg profila brzine rastvaranja lekovite supstance koji se postavlja kao ciljni profil. Identifikaciju ciljnog profila je moguće postići koristeći dostupne podatke vezane za fizičko-hemijska, farmakokinetička i farmakodinamička svojstva lekovite supstance ili preparata i važeće farmakopejske propise i zahteve ili, na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih u okviru *in vivo* ispitivanja biološke raspoloživosti preparata u maloj grupi dobrovoljaca;
- opsežna ispitivanja uticaja različitih eksperimentalnih uslova s ciljem identifikacije i optimizacije faktora koji utiču na kinetiku oslobađanja lekovite supstance (23, 25).

Na brzinu rastvaranja supstance u GIT-u utiču dva ključna faktora: sastav i volumen tečnosti i hidrodinamički uslovi. U tabeli 2 dat je prikaz fizičko-hemijskih i fizioloških parametara koji mogu uticati na brzinu rastvaranja lekovite supstance u GIT-u. Očekuje se da je, kada se ovi uslovi adekvatno reprodukuju u *in vitro* uslovima, moguće da se na osnovu profila brzine rastvaranja, definišu ograničavajući faktori za apsorpciju leka (27). Veličina čestica i prisustvo prirodnih surfaktanata u GIT-u utiču na površinu koja je dostupna za rastvaranje, a samim tim i na brzinu rastvaranja (27). pH vrednost u GIT-u zavisi od prisustva hrane i njene zapremine, lučenja želudačnog soka, žuči i drugih digestivnih tečnosti i varira u toku prolaska kroz različite delove intestinuma. Uticaj pH vrednosti na rastvorljivost je razmatran u prethodnom poglavlju i prilikom dizajna biorelevantnog testa mora se razmotriti očekivana pH vrednost regiona u kojem se lekovita supstanca apsorbuje, uticaj hrane na apsorpciju, kao i rastvorljivost u prisustvu surfaktanata.

U literaturi su prisutni različiti pristupi razvoju biorelevantnog *in vitro* testa, pa su dizajnirani testovi koji imaju zadatak da direktno oponašaju uslove u želucu ili tankom crevu (27, 39-44) i oni koji koriste jednostavnije medijume različitih pH vrednosti uz

dodatak površinski aktivnih materija (45). Vodeni rastvori pH vrednosti koje odgovaraju fiziološkom rasponu u GIT-u, koji se koriste kao medijumi prilikom ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata ne mogu u potpunosti da reprodukuju fiziološke uslove u GIT-u. Smatra se da fiziološki zasnovani medijumi koji oponašaju uslove u želucu ili tankom crevu, mogu bolje da predvide ponašanje supstance *in vivo* (27, 39-44). Fiziološki zasnovani medijumi koji simuliraju sadržaj u GIT-u u uslovima na gladno i u prisustvu hrane (*Fasted State Simulated Intestinal Fluid* - FaSSIF i *Fed State Simulated Intestinal Fluid* – FeSSIF) su dizajnirani tako da mogu da "oponašaju" pH, osmolarnost i prisustvo fizioloških surfaktanata u intestinalnim tečnostima i pružaju biorelevantne uslove za ispitivanje uticaja hrane i predviđanje lek-hrana interakcija (41, 42, 44). Ovi medijumi bi mogli biti iskorišćeni i u predviđanju interakcija lekova. Ipak, postoje brojni nedostaci vezani za praktičnu primenu ovih medijuma (visoka cena prirodnih surfaktanata, komplikovana priprema, varijabilnost u kvalitetu sirovina u zavisnosti od izvora dobijanja), pa se ovi medijumi često zamenjuju puferovanim vodenim rastvorima uz dodatak sredstava za povećanje viskoziteta i/ili površinski aktivnih materija (46). Uobičajena eksperimentalna procedura koja se koristi u ispitivanju brzine rastvaranja podrazumeva obezbeđenje *sink* uslova, ali se u poslednje vreme ovaj zahtev sve češće zanemaruje, jer se smatra da *sink* uslovi ne odlikavaju u potpunosti *in vivo* situaciju (47). Da bi se adekvatno definisalo vreme trajanja testa, treba poznavati regionalnu apsorpciju lekovite supstance duž intestinuma, kao i vreme prolaska kroz intestine (27).

Ispitivanje brzine rastvaranja u *in vitro* uslovima može se iskoristiti i u cilju predviđanja lek-lek interakcija i otkrivanja potencijalnih uzroka koji prethode promeni u apsorpciji lekovite supstance u GIT-u (10, 48-52).

Preparati koji sadrže jon metala mogu uticati na proces apsorpcije kada se primene istovremeno sa pojedinim lekovima (tetraciklini, ibuprofen, fluorohinoloni). U literaturi se mogu naći podaci o *in vitro* ispitivanjima uticaja jona metala na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz tableta uz primenu medijuma u koji se dodaje so ili preparat koji sadrži jon metala (49-51, 53). Na sličan način, pojedini autori su pokušali da simuliraju uticaj hrane koristeći kao medijum komponente hrane, ali priprema ovog medijuma i detekcija rastvorene lekovite supstance je otežana usled heterogenosti smeše (46). U literaturi su opisani i pokušaji upotrebe gotovih dijetetskih napitaka kao medijuma za

ispitivanje brzine rastvaranja, kao i upotreba mleka kao medijuma (39, 49, 54-56).

**Tabela 2.** Fizičko-hemijski i fiziološki parametri koji utiču na brzinu rastvaranja lekovite supstance u GIT-u (prema ref 27)

**Table 2.** Physicochemical and physiological parameters important for drug dissolution in GIT (ref 27)

Faktor	Fizičko-hemijski parametar	Fiziološki parametar
kontaktna površina	veličina čestica, stepen kvašenja	surfaktanti u želudačnom soku i žuči
difuzioni koeficijent	veličina molekula	viskozitet luminalnog sadržaja
rastvorljivost	hidrofilnost, kristalna struktura, solubilizacija	motilitet i brzina protoka
količina leka koja je već rastvorena		pH, kapacitet pufera, žučne soli, prisustvo hrane
volumen raspoloživog medijuma		permeabilnost, sekrecija, tečnost uneta kao hrana ili piće

### 2.3.3 Određivanje permeabilnosti

Permeabilnost je, pored rastvorljivosti i brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata, najznačajniji faktor koji utiče na apsorpciju lekovite supstance. Prema BSK konceptu, supstanca se smatra dobro permeabilnom ako je ispitivanjem u ljudi pokazano da poseduje obim apsorpcije veći od 90 % primenjene doze (25, 26).

Pokazano je da supstance sa vrednošću za distribicioni koeficijent ( $\log D$ ) u opsegu 0-3, predstavljaju idealne kandidate sa aspekta apsorpcije mehanizmom pasivne difuzije. Vrednosti za particioni koeficijent ( $\log P$ ) i  $\log D$  koje su manje od 0 odgovaraju hidrofilnim supstancama, koje su slabo permeabilne. Vrednosti ovih parametara iznad 3 su karakteristične za liposolubilne supstance, usled čega njihova raspodela između ćelijske membrane i vodene sredine ograničava permeaciju supstanci kroz enterocite (57).

Brzina permeacije leka kroz membranu je određena vrednošću efektivne permeabilnosti membrane ( $P_{\text{eff}}$ ), vrednošću efektivne površine intestinalne membrane za permeaciju ( $A_{\text{GI}}$ ) i koncentracijom lekovite supstance u određenom segmentu GIT-a ( $C_{\text{GI}}$ )

Apsorbovana količina supstance ( $X_{abs}$ ) se može izračunati iz sledeće jednačine (22):

$$\frac{dX_{abs}(t)}{dt} = -\frac{dX_{solu}(t)}{dt} = P_{eff} \times A_{GI} \times C_{GI}(t)$$

$P_{eff}$  - brzina permeacije leka kroz membranu

$A_{GI}$  - vrednost efektivne površine intestinalne membrane za permeaciju

$C_{GI}$  - koncentracija lekovite supstance u određenom segmentu GIT-a

Količina apsorbovane supstance u toku vremena zavisi i od odnosa doze i brzine rastvaranja, hemijske degradacije i metabolizma u lumenu GIT-a, građenja kompleksa u lumenu i vremena prolaska kroz intestinum.

Permeabilnost zida tankog creva je važan faktor jer ostvaruje značajnu ulogu u obezbeđenju *sink* uslova (koncentracija supstance u rastvoru je znatno manja od koncentracije zasićenja, pa je njen uticaj na brzinu rastvaranja zanemarljiv). Utvrđeno je da se proces rastvaranja *in vivo* odvija pod *sink* uslovima kod lekovitih supstanci koje karakteriše visoka permeabilnost (27).

Permeabilnost lekovite supstance se određuje na osnovu rezultata

- farmakokinetičkih studija u ljudi (određivanje apsolutne biološke raspoloživosti, studija balansa mase- *Mass balance study*);
- *in vivo* studija intestinalne perfuzije u ljudi;
- *in situ* studija intestinalne perfuzije u animalnim modelima;
- *in vitro* ispitivanja permeacije na humanom/animalnom tkivu intestinuma, monosloju epitelnih ćelija u kulturi (Caco-2) ili veštačkim membranama (PAMPA);
- matematičkih predviđanja/izračunavanja na osnovu hemijske strukture molekula.

Iako su prva direktna ispitivanja permeabilnosti urađena osamdesetih godina prošlog veka, *in vivo* studije u ljudi su retke, jer su takva ispitivanja dugotrajna i skupa. Validirana metoda ispitivanja je tehnika jejunalne perfuzije, pa dobijeni rezultati ne daju jasnu sliku procesa apsorpcije u drugim delovima intestinuma. Validirana tehnika je zasnovana na jednostrukoj (*single-pass*) perfuziji kroz segment jejunuma koji je



izolovan između dva balona (58). U poslednje vreme se intenzivno radi na proceni primene *in silico* pristupa u proučavanju permeabilnosti lekovitih supstanci, tako da su ispitivanja usmerena na određivanje permeabilnosti na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance (molekulska masa, particioni koeficijent, površina polarnog dela molekula, afinitet uspostavljanja vodoničnih veza) (59).

Potencijalan uzrok promene permeabilnosti lekovite supstance može biti interakcija između lekova. U *in vitro* uslovima predviđanje interakcija lekova bi moglo da se vrši ispitivanjem permeabilnosti na izolovanom crevu pacova, u kulturi Caco-2 ćelija ili veštačkim membranama. Dostupni podaci u literaturi uglavnom prikazuju ispitivanje interakcije lekovite supstance sa membranom intestinuma i njen uticaj na transportne proteine, dok postoji malo podataka o ispitivanju mehanizma interakcije lekova (60, 61).

Kmetec i sar. (60) su ispitivali i upoređivali *in vitro* permeabilnost ciprofloksacina i ciprofloksacina u kompleksu sa jonima gvožđa koristeći Sartorijusov simulator apsorpcije, dok su Žakelj i sar. (61) permeabilnost ciprofloksacin/metal kompleksa ispitivali na izolovanom delu creva (jejunum) pacova.

## **2.4 *In silico* metode u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije lekova**

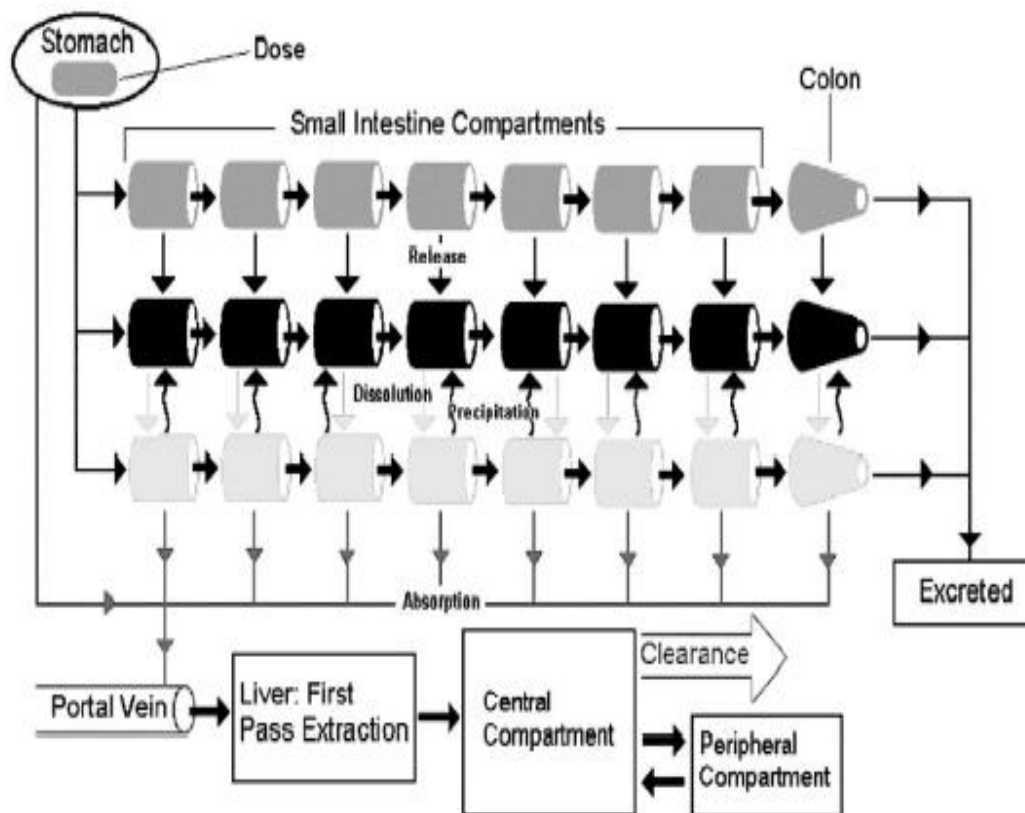
*In silico* metode obuhvataju računarsku simulaciju apsorpcije, modelovanje mehanizma i kinetike procesa sa ciljem da se na osnovu teorijskih saznanja i eksperimentalnih *in vitro* rezultata predvidi ponašanje leka u *in vivo* uslovima, odnosno u organizmu čoveka. U poslednje vreme razvijeni su i matematički modeli koji se koriste za *in silico* predviđanje apsorpcije lekova iz GIT-a. Ovi modeli zasnivaju se na karakteristikama lekovite supstance i fiziologiji GIT-a i na taj način omogućavaju simulaciju ovog procesa uz identifikaciju ključnih i ograničavajućih faktora koji na njega utiču (63).

### **2.4.1 Unapređeni prostorni model apsorpcije i tranzita**

Unapređeni prostorni model apsorpcije i tranzita (*Advanced Compartmental Absorption and Transit Model* - ACAT) obuhvata analizu sledećih faktora koji mogu uticati na proces apsorpcije: brzina rastvaranja, pH-zavisna rastvorljivost, modifikovano

oslobađanje lekovite supstance iz preparata, apsorpcija u želucu ili kolonu, efekti prvog prolaska kroz jetru, degradacija u digestivnom traktu, izmene u površini za apsorpciju, promene u aktivnosti efluks proteina (64). ACAT model opisuje oslobađanje, brzinu rastvaranja, degradaciju, metabolizam i apsorpciju u toku prolaska leka kroz različite delove GIT-a. Apsorpcija lekovite supstance je jednaka ukupnoj apsorpciji u svakom od prostora GIT-a. Apsorpcioni faktori proporcionalnosti - ASF ukazuju na stepen promene permeabilnosti u toku prolaska leka kroz gastrointestinalni trakt. ASF se izračunavaju na osnovu fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance, ali se mogu dodatno podešavati na osnovu podataka dobijenih iz *in vivo* studija. U ACAT model su uključeni linearna kinetika transfera leka, nelinearna kinetika metabolizma, 6 stanja u kojima lek može da se nađe u prostoru (neosloboden, nerastvoren, rastvoren, razgrađen, metabolisan i apsorbovan), 9 prostora (želudac, 7 prostora za tanko crevo i jedan za kolon), kao i tri stanja ekskretovanog materijala (neosloboden, nerastvoren, rastvoren) (slika 3). Na osnovu *in vitro* parametara za aktivnost enzima i transportnih proteina ( $V_{max}$  i  $k_{max}$ ) simulira se nelinearna, saturabilna Michaelis-Mentenova kinetika metabolizma i transporta. Za simulaciju je neophodno poznavati odgovarajuće fizičko-hemijske parametre (rastvorljivost, pKa, logP, veličina i gustina čestica), fiziološke parametre (vreme zadržavanja u želucu, brzina prolaska kroz intestinum, metabolizam prvog prolaska, luminalni transport) i farmaceutsko-tehnološke karakteristike lekovitog preparata (64).

## (ACAT) Model



Slika 3. Šematski prikaz ACAT modela (prema ref. 64)

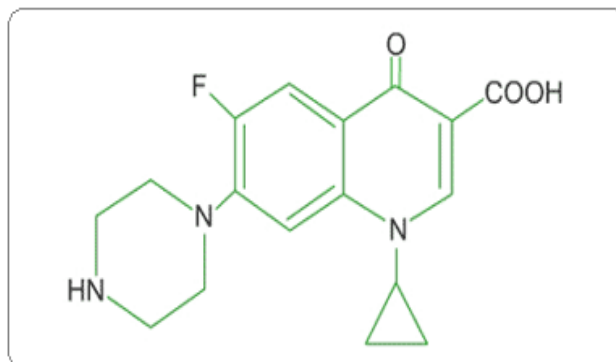
Fig. 3. ACAT model schematic (according to ref 64)

Komercijalno dostupna verzija ACAT modela, GastroPlus<sup>™</sup> (65) obuhvata više različitih modula koji omogućavaju *in silico* simuliranje gastrointestinalne apsorpcije i eliminacije, hepatičkog metabolizma, metabolizma u enterocitima/zidu creva, aktivnog transporta i efekta efluks procesa. Model se može koristiti za simuliranje i predviđanje apsorpcionih profila različitih lekovitih supstanci, kao i za uspostavljanje IVIVK (66, 67).

Primena računarskih programa koji simuliraju proces apsorpcije leka iz gastrointestinalnog trakta, omogućila je simuliranje interakcija u *in silico* uslovima (51, 68-70). Na osnovu rezultata *in silico* studija, pokazano je da metode gastrointestinalne simulacije mogu biti primenjene kako bi jasnije bio sagledan uticaj fizičko-hemijskih, fizioloških i farmaceutsko-tehnoloških faktora na apsorpciju leka.

Analiza osetljivosti parametara (*Parameter Sensitivity Analysis*, PSA) omogućava procenu značaja varijabilnosti ulaznih parametara na predviđanje parametara koji mogu uticati na proces apsorpcije. Parametri, čiji se uticaj na dispoziciju leka, uključuju parametre kompartmenta, ACAT parametre, farmakokinetičke parametre, svojstva lekovite supstance i farmaceutsko-tehnološke faktore. Primenom ove metodologije se mogu identifikovati faktori koji su od kritičnog značaja za biološku raspoloživost, a identifikacija tih faktora može biti korisno sredstvo za otkrivanje potencijalnog mehanizma interakcije. U PSA analizi uticaj svakog parametra se procenjuje nezavisno, a simulacije se sprovode od najmanje do najveće izabrane vrednosti parametra. Simuliranje farmakokinetičkih interakcija u fazi metabolizma može ukazati na eventualnu pojavu neželjenih efekata nakon primene lekovite supstance i posebno su interesantne u fazama ispitivanja novog leka (71-74). U novijim verzijama programskog paketa GastroPlus<sup>tm</sup> postoji poseban modul za simuliranje interakcija na nivou metabolizma, što govori o aktuelnosti problema i značaju ispitivanja interakcija lekova.

### 3 Ciprofloksacin



*Slika 4. Strukturna formula ciprofloksacina (1-ciklopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4 okso-7-(piperazin-1-il)-hinolin-3-karbonska kiselina)*

*Fig. 4. Ciprofloxacin structural formula. IUPAC name 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-quinoline-3-carboxylic acid*

Ciprofloksacin je antibiotik širokog spektra dejstva iz grupe fluorohinolona, efikasan protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih mikroorganizama. Mehanizam dejstva se zasniva na inhibiciji aktivnosti enzima topoizomeraze II (DNK giraze) koji omogućava transkripciju i replikaciju DNK osetljivih bakterija. Ciprofloksacin je veoma efikasan protiv enterobakterija, uključujući i mnoge druge mikroorganizme rezistentne na peniciline, cefalosporine i aminoglikozide, a takođe je efikasan i protiv H. influenzae, N. gonorrhoeae, Campilobacter i Pseudomonas vrsta (75-77).

#### 3.1 Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike ciprofloksacina

##### 3.1.1 Soli, polimorfizam i kristalni oblici, građenje kompleksa

U važećim farmakopejama su oficinalni ciprofloksacin i so ciprofloksacin-hidrohlorid (32, 38). Ciprofloksacin se koristi u formulaciji suspenzija i parenteralnih preparata, dok se u formulaciji tableta koristi ciprofloksacin-hidrohlorid.

Literaturni podaci pokazuju da ciprofloksacin nema polimorfne oblike, ali pokazuje pseudopolimorfizam, odnosno postoji u bezvodnom i u obliku heksahidrata. Ovi oblici

ciprofloksacina pokazuju različitu rastvorljivost i brzinu rastvaranja. Ciprofloksacin-hidrohlorid se javlja u dva kristalna oblika u zavisnosti od upotrebljenog rastvarača i uslova kristalizacije (78, 79). U formulaciji tableta najviše se koristi ciprofloksacin-hidrohlorid u vidu monohidrata.

Kompleksiranje ciprofloksacina sa jonima metala i karakterizacija nastalih kompleksa bila je tema brojnih istraživanja (15, 51, 80-99). U strukturi ciprofloksacina postoje dve grupe koje mogu da jonizuju, karboksilna grupa i sekundarna amino grupa iz piperazinskog prstena i smatra se da ove grupe učestvuju u građenju kompleksa sa jonima metala. Rastvorljivost ciprofloksacina je najmanja u opsegu pH vrednosti 6.5-8.5 i tada se on dominantno nalazi u obliku cviter-jona. U opsegu pH vrednosti 3.5-4.5 ciprofloksacin se nalazi u protonovanom obliku i kompleksiranje je praćeno oslobađanjem protona sa piridinske karboksilne grupe (85, 86). Turel i sar. (83) navode da je u kiseljoj sredini favorizovano građenje kompleksa molarnog odnosa 1:1, dok se u sredini sa  $\text{pH} > 5$  obično grade kompleksi u odnosu 1:2. Sintaza kompleksa se u najvećem broju studija odvija uz korišćenje organskih rastvarača i katalizatora, mešanjem rastvora ciprofloksacina ili soli ciprofloksacin-hidrohlorida i soli metala (hloridi, acetati, sulfati, perhlorati) u različitim molarnim odnosima.

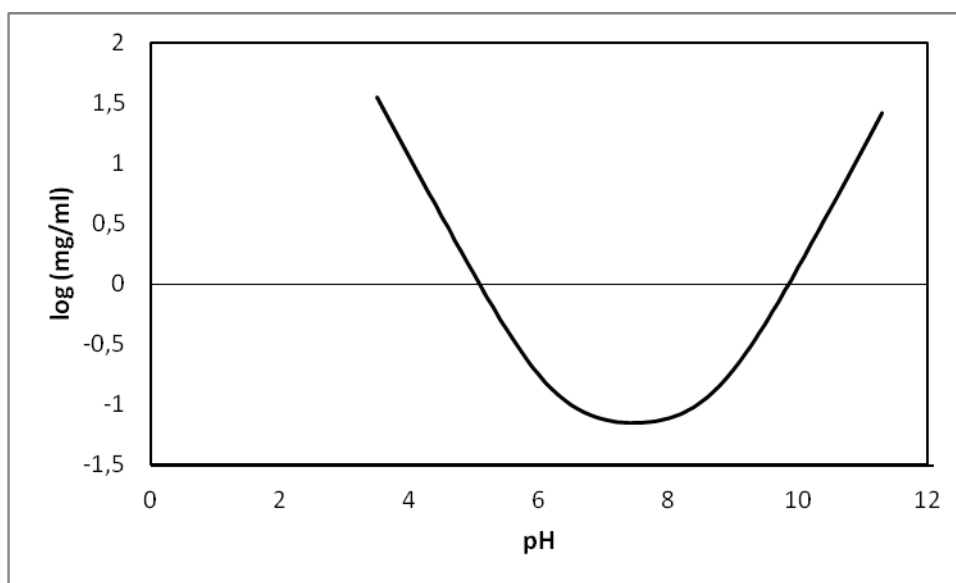
### 3.1.2 Konstante disocijacije

Ciprofloksacin karakteriše cviterjonska struktura i dve pKa vrednosti,  $\text{pKa}_1$  6.16 i  $\text{pKa}_2$  8.62 (100). Eksperimentalno dobijene vrednosti za  $\text{pKa}_1$  i  $\text{pKa}_2$  ciprofloksacina se donekle razlikuju u zavisnosti od metode kojom je vršeno određivanje. Potenciometrijskom titracijom su dobijene sledeće vrednosti za  $\text{pKa}_1$  6.09 i  $\text{pKa}_2$  8.62; UV-spektrofotometrijskim određivanjem  $\text{pKa}_1$  6.42 i  $\text{pKa}_2$  8.29, a kapilarnom elektroforezom  $\text{pKa}_1$  6.35 i  $\text{pKa}_2$  8.95 (101). Vrednosti određene na temperaturi 37°C iznose  $\text{pKa}_1$  6.20 i  $\text{pKa}_2$  8.59 (102).

### 3.1.3 Rastvorljivost

Ciprofloksacin je gotovo nerastvorljiv u vodi, a vrlo teško rastvorljiv u etanolu i metilenhloridu (38). S obzirom da ima dve pKa vrednosti, pokazuje pH-zavisnu

rastvorljivost u vodenim medijumima (100). U zavisnosti od pH vrednosti, ciprofloksacin može postojati u četiri oblika: katjonski, anjonski, neutralan i cviterjonski. Neutralni oblik spontano prelazi u cviterjon, a izoelektrična tačka je na pH 7.4. U literaturi se mogu naći podaci da rastvorljivost ciprofloksacina na pH 5 iznosi 6.9 mg/ml, a na pH 7 je 0.15 mg/ml, na temperaturi od 37°C (103). Građenjem soli hidrohlorida poboljšava se rastvorljivost, pa je ciprofloksacin-hidrohlorid umereno rastvorljiv u vodi, teško rastvorljiv u metanolu, vrlo teško rastvorljiv u etanolu, a gotovo nerastvorljiv u metilenhloridu (38). Rastvorljivost ciprofloksacina i njegove soli hidrohlorida u vodi se menja sa promenom temperature, pa je rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida na 20°C 30 mg/ml, na 30°C 40 mg/ml, a na 40°C 55 mg/ml, dok je rastvorljivost ciprofloksacina na 20°C ~ 0.08 mg/ml, na 30°C ~ 0.09 mg/ml, a na 40°C ~ 0.12 mg/ml (104, 105). Osnovna rastvorljivost (*intrinsic solubility*) ciprofloksacina na pH 7 je 0.037 mg/ml na 6°C, 0.086 mg/ml na 25°C, 0.14 mg/ml na 30°C i 0.17 mg/ml na 40°C (106).



**Slika 5.** Prikaz pH zavisne rastvorljivosti ciprofloksacina

**Fig. 5.** Ciprofloxacin pH dependent solubility profile

### 3.1.4 Particioni i distribucionni koeficijent

Određivanje partitionog i distribucionog koeficijenta može da ukaže kakva je rastvorljivost supstance u lipidima i na sposobnost prolaska kroz lipidne membrane. Takođe, ove vrednosti imaju značajnu ulogu i prilikom određivanja MIC (minimalne inhibitorne koncentracije) jer antibiotik, da bi ispoljio svoje dejstvo, mora proći kroz lipidnu membranu bakterijske ćelije. Eksperimentalno određena vrednost za distribucionni koeficijent (logD) ciprofloksacin-hidrohlorida pri pH 4.8 je -1.17, pri pH 7.4 je -1.13, a pri pH 9.1 je -1.5 (107). Eksperimentalno određena vrednost za partitionni koeficijent (logP) je -0.94 na 37°C, -1.7 na 25°C pri pH 7.2. Na ovoj pH vrednosti ciprofloksacin bi trebao da se dominantno nalazi u neutralnom obliku, ali s obzirom da neutralni oblik brzo prelazi u cviterjonski, mala vrednost partitionog koeficijenta se može objasniti činjenicom da cviter-jon ciprofloksacina slabije prelazi u n-oktanol fazu (107). *In silico* (CLogP program) određena vrednost partitionog koeficijenta ciprofloksacin-hidrohlorida je 1.32 (108). Ovako male vrednosti distribucionog i partitionog koeficijenta ukazuju na nisku permeabilnost ciprofloksacina.

### 3.1.5 Permeabilnost

Na osnovu ispitivanja permeabilnosti ciprofloksacina na Caco-2 kulturi ćelija, Volpe i sar. (109) su zaključili da ciprofloksacin pokazuje nisku permeabilnost kroz apikalnu i bazolateralnu membranu intestinuma. Vrednost za  $P_{app}$ , kada je ciprofloksacin prisutan u koncentraciji od 3 mg/ml, je bila  $2.49 \pm 0.43 \times 10^6$  cm/s, a kada je prisutan u koncentraciji od 0.3 mg/ml  $0.42 \pm 0.06 \times 10^6$  cm/s (109). Slični rezultati su dobijeni i nakon ispitivanja permeabilnosti kroz izolovan jejunum pacova (110, 111). Ispitivanje permeabilnosti PAMPA metodom pri različitim pH vrednostima je pokazalo da je permeabilnost ciprofloksacina kroz lipidne membrane intestinuma pH zavisna (112). Transport ciprofloksacina prilikom apsorpcije se odvija i paracelularno kroz pore koje imaju veći afinitet ka prolasku katjona (110). U intestinumu je moguća i sekrecija ciprofloksacina. Smatra se da se sekrecija odvija pomoću dva proteina, P-glikoproteina i MRP2 (*Multidrug resistance associated protein 2*) pri čemu se jedan nalazi na bazolateralnoj membrani epitelne ćelije, a drugi na apikalnoj membrani. Rezultati



studija izvedenih na izolovanom crevu pacova i Caco-2 ćelijama, u prisustvu inhibitora ova dva proteina, su pokazali da oni ne učestvuju u sekreciji ciprofloksacina, a kao mogući mehanizam sekrecije se navodi "specifičan put sekrecije ciprofloksacina" (*ciprofloxacin sensitive pathway*) (110, 113, 114).

### **3.1.6 Klasifikacija prema BSK**

Ciprofloksacin pokazuje pH zavisnu rastvorljivost, pri čemu je dobro rastvorljiv u kiseloj sredini, a slabo rastvorljiv pri pH vrednostima koje su prisutne u intestinumu. Prema zahtevima FDA (25) da bi se supstanca smatrala visoko permeabilnom mora da pokazuje obim apsorpcije veći od 90 %, dok je zahtev EMA (26) za visoko permeabilne supstance obim apsorpcije veći od 85 %. Ciprofloksacin pokazuje varijabilnu permeabilnost i smatra se da postoji "prozor za apsorpciju" u gornjim delovima intestinuma. Imajući u vidu rezultate ispitivanja permeabilnosti na Caco-2 ćelijama i izolovanom jejunumu pacova i vrednost za particioni koeficijent, ciprofloksacin se može svrstati u supstance sa niskom permeabilnošću. S obzirom da pokazuje nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost većina autora svrstava ciprofloksacin u BSK grupu 4 (98, 115, 116).

### **3.2 Farmakokinetičke karakteristike**

Ciprofloksacin se, nakon oralne primene, relativno dobro i brzo apsorbuje u GIT-u. Bioraspoloživost ciprofloksacina nakon oralne primene varira u rasponu od 52-90 % (117-122). Koncentracije ciprofloksacina u plazmi su dozno-zavisne i dostižu maksimum 0.58-1.75 h nakon primene leka. Studija sa hf-kapsulom koja je dizajnirana da oslobađa sadržaj u pojedinačnim delovima GIT-a je pokazala da se ciprofloksacin dominantno apsorbuje u gornjim delovima intestinuma (duodenum, jejunum i ileum), pri čemu je više od 78 % doze apsorbovano u duodenumu i jejunumu (123).

Ciprofloksacin se brzo distribuira po tkivima i telesnim tečnostima u kojima dostiže visoku koncentraciju (pluća, jetra, bubrezi i reproduktivni organi) (75). Vezivanje za proteine plazme je 30 % (124). Volumen distribucije je visok i kod zdravih osoba iznosi oko 2.27 l/kg kada se primeni doza od 100 mg i 2.44 l/kg nakon primene doze od 200

mg (120).

Metabolizam ciprofloksacina se odvija u jetri dejstvom enzima CYP-450 i biotransformacijom nastaju metaboliti koji poseduju izvesnu antimikrobnu aktivnost. Samo 10-20 % pojedinačne oralne ili intravenske doze se eliminiše u obliku metabolita. Utvrđena su četiri različita antimikrobno-aktivna metabolita, desetilenciprofloksacin ( $M_1$ ), sulfociprofloksacin ( $M_2$ ), oksaciprofloksacin ( $M_3$ ) i formilciprofloksacin ( $M_4$ ).  $M_2$  i  $M_3$  čine po jednu trećinu metabolisane supstance, a  $M_1$  se nalazi u malim količinama (1.3-2.6 % doze) (75-77). Poluvreme eliminacije je od 3.5 - 4.5 h, dok kod pacijenata sa renalnom insuficijencijom poluvreme eliminacije može biti produženo ( $t_{1/2} = 5-8$  h) (75-77, 125).

Ciprofloksacin i njegovi metaboliti se posle pojedinačne ili intravenske doze eliminišu prvenstveno putem bubrega (55 %, odnosno 75 % doze), dok se 39 %, odnosno 14 % eliminiše putem fecesa (75-77). Glavni metabolit u urinu je oksiciprofloksacin, a u fecesu sulfociprofloksacin (75-77). Bubrežni klirens iznosi 0.18 - 0.3 l/h/kg, a ukupni klirens 0.48 - 0.60 l/h/kg (75-77, 126, 128). Približno 1 % doze ciprofloksacina se izluči putem žuči (75-77).

### **3.3 Interakcije ciprofloksacina sa jonima metala**

#### **3.3.1 Pregled *in vivo* studija**

Interakcije između lekova su klinički značajne ukoliko dolazi do promene u biološkoj raspoloživosti i/ili farmakološkom efektu leka. Uticaj različitih jona metala na bioraspoloživost ciprofloksacina varira u zavisnosti od oblika u kome se nalazi jon metala (hrana, lek, dijetetski suplement), vremena primene i primenjene doze preparata koji sadrži jon metala. Interesovanje za interakcije ciprofloksacina sa jonima metala je počelo 1985. godine kada su Hoffken i sar. prvi put ukazali na značajno smanjenje biološke raspoloživosti ciprofloksacina nakon istovremene primene sa preparatima aluminijuma i magnezijuma (13). To je podstaklo istraživače da pokušaju da otkriju potencijalni mehanizam interakcije, ne samo sa preparatima aluminijuma i magnezijuma, nego i sa preparatima gvožđa, cinka i kalcijuma poreklom iz hrane, lekova ili dijetetskih suplemenata (14-17, 132-148). Iako su rezultati sprovedenih studija varijabilni, često i kontradiktorni, jasno se uočava smanjen obim apsorpcije

ciprofloksacina primenjenog istovremeno sa preparatima koji sadrže jone metala. Na osnovu dobijenih rezultata, usvojena je generalna preporuka da se preparati koji sadrže jone metala ne primenjuju u isto vreme sa preparatima ciprofloksacina, već sa određenim vremenskim intervalom, tako da je moguće kombinovati ih poštujući preporuke o vremenskom razmaku (17, 75).

Na apsorpciju ciprofloksacina može uticati prisustvo hrane (129-131), s obzirom da je uočeno produženo vreme dostizanja maksimalne koncentracije u plazmi, a nije uočen uticaj na ostale farmakokinetičke parametre ( $C_{max}$ , AUC) (130). Pokazano je, takođe, da kalcijum prisutan u hrani može da utiče na biološku raspoloživost ciprofloksacina (131, 140, 147, 148).

Frost i sar. (147) su ispitivali uticaj sira kao namirnice bogate mastima i kalcijumom na bioraspoloživost ciprofloksacina i zabeleženo je povećanje biološke raspoloživosti nakon primene leka uz obrok koji sadrži sir. Za razliku od Frosta (147), Neuvonen (148) beleži smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina za 30-36 % kada se primeni istovremeno sa mlekom ili jogurtom. Rezultati dobijeni u ove dve studije se prilično razlikuju, a uzrok tome može biti i vrsta hrane u kojoj je jon kalcijuma prisutan, što može uticati na stepen oslobađanja jona i stupanja u interakciju sa ciprofloksacinom.

Istovremena primena ciprofloksacina sa sokovima obogaćenim kalcijum-laktatom može smanjiti bioraspoloživost ciprofloksacina za 36 % (140). Takođe, primena ciprofloksacina sa sokom od pomorandže obogaćenim kalcijumom smanjuje koncentraciju ciprofloksacina u plazmi za 41 % (131).

Interakcija između jona kalcijuma i ciprofloksacina je ispitivana nakon istovremene primene ciprofloksacina i antacidnih preparata koji sadrže kalcijum-karbonat. Fleming i sar. (139) su zabeležili smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi za 7.3 % (doza kalcijum-karbonata nije navedena) kod pacijenata na peritonealnoj dijalizi. Smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina za oko 40 % je uočeno nakon istovremene primene tableta sa ciprofloksacinom i 4 tablete sa po 850 mg kalcijum-karbonata (136). Sa druge strane, Lomaestro i sar. (137) su pokazali da primena tableta sa 500 mg kalcijuma (1250 mg kalcijum-karbonata) ne utiče na biološku raspoloživost ciprofloksacina ako se primeni 2 h pre doze antibiotika, dok Sahai i sar. (146) navode da hronična upotreba kalcijum-karbonata u istoj dozi smanjuje bioraspoloživost ciprofloksacina za 43 %.

Interakcija između ciprofloksacina i gvožđa je uočena nakon istovremene primene

preparata koji sadrže različite soli gvožđa (sulfat, fumarat, glukonat) (14-16, 99, 133-135). U većini navedenih studija je ispitivan uticaj gvožđa nakon oralne primene, a smanjenje biološke raspoloživosti se objašnjava građenjem slabo permeabilnih kompleksa, pri čemu u interakciji učestvuje 4-okso i karboksilna grupa ciprofloksacina koje su odgovorne i za antibiotsku aktivnost ovog fluorohinolona (14-16, 133, 141). Neki autori navode da i drugi fizičko-hemijski faktori, kao što je rastvorljivost, mogu uticati na smanjenje biološke raspoloživosti ciprofloksacina (14), ali i da soli gvožđa mogu ispoljiti takozvani "nespecifični efekat" na apsorpcioni kapacitet u GIT-u i na taj način uticati na bioraspoloživost ciprofloksacina (16). Lehto i sar. (14) su ispitivali uticaj tableta sa gvožđe(II)-sulfatom (100 mg elementarnog gvožđa) na farmakokinetiku ciprofloksacina nakon istovremene primene i dobijeni rezultati su ukazali na smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi za 54 %. Polk i sar. (16) su smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi, nakon istovremene primene sa tabletom koja sadrži 325 mg gvožđe(II)-sulfata, objasnili građenjem kompleksa koji se ne apsorbuje, u čijem građenju učestvuju 4-keto i 3-karboksilna grupa ciprofloksacina. U studiji Kara i sar. (15) uočeno je smanjenje maksimalne koncentracije ciprofloksacina u plazmi za 37-57 % nakon istovremene primene sa različitim solima gvožđa. Smanjenje biološke raspoloživosti ciprofloksacina za oko 50 % nakon istovremene primene sa gvožđe(II)-glukonom uočili su i Pazzucconi i sar. (141), dok su Brouwers i sar. (133) ukazali na smanjenje biološke raspoloživosti ciprofloksacina za 70 % nakon istovremene primene sa 200 mg gvožđe(II)-fumarata.

S obzirom da se građenje slabo permeabilnih kompleksa navodi kao glavni uzrok smanjene biološke raspoloživosti ciprofloksacina, Kozjek i sar. (99) su sprovedi *in vivo* ispitivanje u grupi od sedam pasa kojima su davali prethodno sintetisane komplekse ciprofloksacin-gvožđe, ciprofloksacin-cink ili ciprofloksacin-bizmut. Rezultati studije su pokazali da je apsolutna biološka raspoloživost ciprofloksacina, kada se primeni kao kompleks sa gvožđem 12.33 %, 31.44 % kada se primeni kao kompleks sa cinkom i 84.28 % kada se primeni kao kompleks sa bizmutom (99).

U studiji Hoffken i sar. (13) zabeleženo je smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi za 94 % nakon primene 500 mg ciprofloksacina 24 h nakon visoke doze antacidnog preparata (9 g aluminijum-hidroksida i 6 g magnezijum-hidroksida). Fleming i sar. (139) su zabeležili smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi za

više od 50 % prilikom primene sa preparatima koji su sadržavali jedinjenja aluminijuma i magnezijuma kod pacijenata na peritonealnoj dijalizi. Frost i sar. (136) su dobrovoljcima, u razmaku od 5 minuta, davali tablete ciprofloksacina i tablete aluminijum-hidroksida i uočili smanjenje bioraspoloživosti za oko 85 %. Zabeleženo je, da kod dobrovoljaca koji su primenjivali tablete sa aluminijum-hidroksidom nema značajnih interindividualnih razlika u smanjenju koncentracije ciprofloksacina u plazmi, dok kod dobrovoljaca koji su primenjivali tablete sa kalcijum-karbonatom postoje značajne interindividualne razlike.

Nix i sar. (17) su ispitivali kako vreme između primene antacida i ciprofloksacina utiče na pojavu interakcije. Ispitanici su primenjivali antacidni preparat sa aluminijum-hidroksidom i magnezijum-hidroksidom (30 ml suspenzije Maloox<sup>®</sup>) ili ranitidin tablete 10 minuta i 2, 4 ili 6 sati pre doziranja ciprofloksacina. Najveće smanjenje biološke raspoloživosti (za 80 %) je zabeleženo kada je Maloox<sup>®</sup> primenjen 10 minuta pre ciprofloksacina, a nije zabeležen značajan uticaj kada je Maloox<sup>®</sup> primenjen 6 h pre ciprofloksacina ili kada je primenjen sa ranitidinom (17, 144). Hoffken i sar. (13) i Lode (144) su u svojim studijama koristili visoke doze preparata Maloox<sup>®</sup> što je uslovalo smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi za 94 % (13), odnosno smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina za 91 % (144). Sa druge strane, rezultati o biološkoj raspoloživosti dobijeni u studiji Frost i sar. (136) su slični rezultatima Nix i sar. (17), pa je pretpostavljeno da aluminijum-hidroksid ima najveći uticaj na smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi. Nix i sar. su pokazali da primena sukralfata istovremeno ili 2 sata pre ciprofloksacina može da smanji biološku raspoloživost ciprofloksacina za 30 % (132). Takođe, Garrelts i sar. (145) su pokazali da je smanjenje biološke raspoloživosti ciprofloksacina čak 90 % nakon istovremene primene 1 g sukralfata.

*In vivo* ispitivanja interakcije ciprofloksacina sa cinkom su rađena sa dijetetskim suplementima u kojima se cink nalazi u sastavu kompleksa vitamina i minerala. Cink se u dijetetskim suplementima može naći u obliku cink-laktata, cink-glukonata, cink-acetata ili cink-sulfata. Polk i sar. (16) su zabeležili smanjenje biološke raspoloživosti ciprofloksacina za 24 % kada se primeni sa preparatom koji sadrži 23.9 mg cinka, dok su Kara i sar. (15) zabeležili smanjenje biološke raspoloživosti ciprofloksacina za 53 % kada se primeni preparat koji u svom sastavu ima 15 mg cinka u kombinaciji sa jonima

gvožđa, magnezijuma, kalcijuma, bakra i mangana.

### 3.3.2 Pregled *in vitro* studija

U literaturi se mogu naći brojni podaci koji govore o *in vitro* interakciji jona metala i ciprofloksacina. U okviru *in vitro* studija proučavano je građenje kompleksa, ispitivana je stabilnost kompleksa, rastvorljivost i brzina rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu jona gvožđa, aluminijuma, kalcijuma i cinka, kao i permeabilnost nastalih kompleksa (49, 51, 60, 61, 84, 88, 94, 96-98, 149-160).

Dok se rezultati *in vivo* studija slažu da prilikom istovremene primene sa jonima metala dolazi do smanjenja biološke raspoloživosti ciprofloksacina, u rezultatima *in vitro* studija koji se bave prirodom kompleksa i rastvorljivošću ciprofloksacina u prisustvu jona metala mogu se uočiti značajne razlike. Ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta u prisustvu jona metala pokazuju usporeno i nepotpuno oslobađanje ciprofloksacina (51, 97, 155), dok izvesni autori izveštavaju o porastu rastvorljivosti u prisustvu jona metala (98, 149, 150).

Kompleksiranje ciprofloksacina sa jonima metala i karakterizacija nastalih kompleksa bila je tema brojnih istraživanja (80-89). Sa biofarmaceutskog aspekta, kompleksiranje ciprofloksacina sa jonima metala u prisustvu organskih rastvarača ili katalizatora nije relevantno, pa su razmatrani samo kompleksi koji nastaju u interakciji ciprofloksacina i jedinjenja metala koja se primenjuju u terapiji.

Treba istaći da, prilikom ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacina u prisustvu različitih soli metala, istraživači obično koriste ciprofloksacin čija je rastvorljivost u vodi više od četiri stotine puta manja u odnosu na rastvorljivost soli hidrohlorida koja se koristi u formulaciji tableta. Rezultati tih ispitivanja ukazuju na povećanje rastvorljivosti ciprofloksacina u prisustvu jona metala (149, 150). Na promenu rastvorljivosti ciprofloksacina može uticati više faktora: promena pH sredine, građenje kompleksa, pa do danas sam mehanizam interakcije nije do kraja razjašnjen. Potencijalan uzrok smanjene bioraspoloživosti može biti i smanjena permeabilnost nastalih kompleksa.

Prilikom interakcije ciprofloksacina i jona gvožđa, neki istraživači su zabeležili pomeranje u spektru ciprofloksacina ka većim talasnim dužinama (15, 84, 153). Kara i sar. (15) su tu pojavu objasnili pretpostavkom da u građenju kompleksa učestvuje

gvožđe(III) jon koji nastaje oksidacijom gvožđe(II) jona u puferu koji je korišćen u studiji.

Sanchez i sar. (84) su ispitivali interakciju između ciprofloksacina i jona gvožđa, aluminijuma, magnezijuma i kalcijuma mešanjem rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida sa solima metala, a zatim su vršili karakterizaciju dobijenih precipitata. Na osnovu dobijenih rezultata odbacili su tvrdnju da se između ciprofloksacina i metala gradi kompleks. Ovu tvrdnju su potkrepili činjenicom da su za građenje kompleksa koristili veći odnos između ciprofloksacina i metala nego što je to u organizmu kada se ove dve supstance nađu zajedno (84).

Allemandi i sar. (153) i Alovero i sar. (154) su se bavili sintezom ciprofloksacin-aluminijum kompleksa koji bi imao veću rastvorljivost u odnosu na ciprofloksacin-hidrohlorid. Dobijeni kompleks, čija je hemijska formula  $(\text{HCl cf})_3\text{Al}$  je zatim zaštićen patentom (155).

Prema Breda i sar. (98), rastvorljivost kompleksa ciprofloksacina sa aluminijum-hloridom je oko 10 puta veća od rastvorljivosti ciprofloksacina u fiziološkom rasponu pH vrednosti. Takođe, ciprofloksacin-aluminijum kompleks se za oko 65 % brže oslobađa iz tableta u odnosu na ciprofloksacin-hidrohlorid u medijumu pH 6.8 (98).

Zupančič i sar. (95) su sintetisali komplekse ciprofloksacina i jona cinka mešanjem rastvora ciprofloksacina i cink-hlorida ili cink-sulfata u molarnom odnosu 2:1. Uočeno je da je pogodan pH za nastanak kompleksa veći od 7 i da se, shodno tome, kompleksiranje *in vivo* verovatno odvija u intestinumu. Kozjek i sar. (99) su ispitivali rastvorljivost ciprofloksacin-cink kompleksa i utvrdili da je kompleks rastvorljiviji od ciprofloksacin baze i da, kao hidrofilniji, teže permeira kroz intestinalne membrane.

Patel i sar. (96, 159) su u svojim studijama pokazali da kompleksi dobijeni mešanjem metanolnih rastvora cink-acetata i ciprofloksacin-hidrohlorida u opsegu pH vrednosti 6-7.5 poseduju veću antibakterijsku aktivnost od ciprofloksacin baze.

Rodriguez Cruz i sar. (97) su uočili da se u toku *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja, oslobađanje ciprofloksacina iz tableta smanjuje sa povećanjem procenta rastvorenog gvožđa iz tableta i da se u prisustvu 2 tablete sa produženim oslobađanjem sa 525 mg gvožđe(II)-sulfata oslobađanje ciprofloksacina smanjilo za više od 40 %, dok je oslobađanje ciprofloksacina iz tableta smanjeno za oko 20 % u prisustvu aluminijum-hidroksida (količina koja sadrži 2.5 g aluminijuma).

Arayne i sar. (156) su ispitivali uticaj aluminijum-hidroksida, Magaldrat<sup>tm</sup> tableta (koje predstavljaju kombinaciju aluminijum-hidroksida, aluminijum-sulfata i magnezijum-hidroksida, magnezijum-sulfata), kalcijum-hidroksida i kalcijum-karbonata na brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u veštačkom želudačnom soku (0.1 M HCl + pepsin) i u puferu pH 6.8. Brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida je bila značajno smanjena u prisustvu jedinjenja aluminijuma i jedinjenja kalcijuma. U toku ispitivanja nisu uočene promene pH vrednosti medijuma kada su u njemu prisutna jedinjenja aluminijuma ili kalcijuma, a adsorpcija ciprofloksacina na jedinjenja kalcijuma i aluminijuma se navodi kao potencijalni mehanizam interakcije (156-158).

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u 500 ml medijuma različitih pH vrednosti (1.2, 4.5, 6.8) uz dodatak mleka sa niskim procentom masti, kazeina ili kalcijuma (510 mg kalcijuma u obliku kalcijum-hlorida, heksahidrata) je pokazalo da je procenat oslobođenog ciprofloksacin-hidrohlorida u različitim medijumima smanjen u prisustvu mleka, kazeina i kalcijuma (49). S obzirom da je brzina rastvaranja ciprofloksacina u različitim medijumima u prisustvu mleka i kazeina slična, Papai i sar. (49) smatraju da je ta komponenta mleka odgovorna za smanjenje biorasploživosti ciprofloksacina u prisustvu mleka *in vivo*, a da je uticaj kalcijuma slabije izražen.

Potencijalan uzrok smanjene biološke raspoloživosti ciprofloksacina u prisustvu jona metala može biti i smanjena permeabilnost nastalih kompleksa (60, 61, 160). Kmetec i sar. (60) nisu uočili značajne razlike u permeabilnosti između ciprofloksacina i ciprofloksacina u kompleksu sa gvožđem. Prilikom ispitivanja permeabilnosti ciprofloksacina kroz izolovan jejunum pacova, Sanchez-Navarro i sar. (160) su zabeležili smanjenje permeabilnosti ciprofloksacina za 35 % u prisustvu kalcijum-karbonata.

Žakelj i sar. (61) su pokušavali da u *in vitro* uslovima simuliraju proces apsorpcije *in vivo*. Pri tome su koristili visoke koncentracije ciprofloksacina i jona metala (gvožđe, kalcijum, aluminijum), a rezultati su pokazali da kompleksi ciprofloksacina i aluminijuma, gvožđa ili kalcijuma ne permeiraju membranu GIT-a (61)



## 4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opšti cilj istraživanja je da se utvrdi mehanizam/mehanizmi interakcije koja dovodi do smanjene apsorpcije ciprofloksacin-hidrohlorida primenjenog istovremeno sa drugim lekovima, dijetetskim suplementima ili hranom koja sadrži jedinjenja gvožđa, aluminijuma, kalcijuma i cinka i da se predlože biorelevantni uslovi za *in vitro* ispitivanje interakcije lekova.

Specifični ciljevi podrazumevaju:

- (i) ispitivanje uticaja različitih soli gvožđa, kao i kalcijuma, aluminijuma i cinka na rastvorljivost ciprofloksacina i njegovu brzinu rastvaranja iz tableta;
- (ii) fizičko-hemijsku karakterizaciju nastalih produkata interakcije da bi se utvrdilo da li je u pitanju isti interakcioni mehanizam ili su prisutni različiti mehanizmi u zavisnosti od vrste jona;
- (iii) *in silico* ispitivanje faktora koji mogu uticati na apsorpciju ciprofloksacin-hidrohlorida i mogućnost primene gastrointestinalne simulacije zasnovane na Unapređenom modelu prostorne apsorpcije i tranzita kao metode za predviđanje interakcije lekova i,
- (iv) razvoj biorelevantnog testa za *in vitro* ispitivanje interakcija lekova.

### Aim of the research

The general research aim is to identify interaction mechanism/s involved in the reduced ciprofloxacin hydrochloride absorption when co-administered with other drugs, dietary supplements or food containing iron, aluminium, calcium or zinc compounds and define biorelevant dissolution conditions for drug interaction studies.

Specific aims include:

- (i) investigation into the effect of various iron salts, as well as calcium, aluminium and zinc salts on ciprofloxacin solubility and tablet dissolution;
- (ii) solid state characterisation of the precipitates formed in order to identify if there is a common interaction mechanism, or an "ion specific" one;
- (iii) *in silico* study of factors affecting ciprofloxacin hydrochloride absorption and potential of gastrointestinal simulations using ACAT as a tool for drug interaction prediction, and
- (iv) development of biorelevant dissolution test for drug interaction studies.

## **II EKSPERIMENTALNI DEO**

## 5. MATERIJAL I METODE

### 5.1 Materijal

Za pripremu medijuma za ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta korišćene su sledeće supstance: hlorovodonična kiselina (Centrohem, Srbija), kalijum-dihidrogenfosfat (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka), natrijum-hidroksid (Centrohem, Srbija), glacijalna sirćetna kiselina (99.8 % p.a, Lachema, Češka), kalijum-hlorid (Centrohem, Srbija), natrijumova so tauroholne kiseline (Fluka Chemie AG, Buchs, Švajcarska), L- $\alpha$  fosfatidilholin poreklom iz jajeta (min 60 % TLC, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka).

Prilikom ispitivanja rastvorljivosti korišćen je ciprofloksacin (poklon od Hemofarm-STADA, Srbija) i ciprofloksacin-hidrohlorid (poklon od Zdravlje-Actavis, Srbija).

U ispitivanju brzine rastvaranja lekovite supstance korišćene su komercijalno dostupne film tablete ciprofloksacin-hidrohlorida od 500 mg (Hemofarm-STADA, Srbija).

Prilikom *in vitro* ispitivanja interakcije između ciprofloksacin-hidrohlorida i jona metala korišćene su sledeća jedinjenja analitičke čistoće: gvožđe(II)-sulfat, heptahidrat (Centrohem, Srbija), gvožđe(II)-glukonat (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka), gvožđe(II)-fumarat (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka), kalcijum-karbonat (Centrohem, Srbija), kalcijum-hlorid, dihidrat (Centrohem, Srbija), aluminijum-hlorid, heksahidrat (Centrohem, Srbija), aluminijum-hidroksid (Fluka, Buchs, Švajcarska), zink-hlorid, anhidrovani (Centrohem, Srbija), cink-sulfat, heptahidrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka).

### 5.2 Metode

#### 5.2.1 *In vivo* podaci

Da bi se stekao uvid u *in vivo* situaciju, sprovedeno je opsežno pretraživanje literaturnih podataka koji se odnose na (I) farmakokinetička svojstva ciprofloksacina, (II) njegovu biološku raspoloživost, kao i (III) studije u okviru kojih su proučavane interakcije ciprofloksacina nakon istovremene primene sa lekovima, hranom ili dijetetskim

suplementima koji sadrže jone metala.

Korišćene su baze podataka: *PubMed Central, Scopus i Science Direct*. Za pretragu su primenjene sledeće ključne reči: *ciprofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride* kombinovane sa *absorption, absolute bioavailability (BA), bioequivalence, dissolution, partition coefficient, permeability, pharmacokinetics, solubility, drug interaction, metallic compounds interaction*. Pristup bazama podataka omogućen je posredstvom Konzorcijuma biblioteka Srbije za objedinjenu nabavku (KoBSON).

### 5.2.2 Ispitivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost ciprofloksacina i ciprofloksacin-hidrohlorida je određena u vodi, 0.1 M HCl, 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, fosfatnom puferu pH 6.8 i fiziološki zasnovanim medijumima (FaSSIF, FeSSIF). Ravnotežna rastvorljivost je određena dodavanjem praškaste supstance u višku u određenu zapreminu medijuma za ispitivanje i mešanjem do postizanja stanja ravnoteže. Uzorci su stavljeni na šejker (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Nemačka) i mešani u toku 6 sati. U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci medijuma, centrifugirani i profiltrirani kroz membranski filter (veličina pora 0.45 μm). Ispitivanja rastvorljivosti u prisustvu jona metala su sprovedena u vodi uz dodatak različitih jedinjenja koja u svom sastavu imaju jon metala (gvožđe(II)-sulfat, heptahidrat, gvožđe(II)-glukonat, gvožđe(II)-fumarat, aluminijum-hlorid, aluminijum-hidroksid, kalcijum-hlorid, kalcijum-karbonat, cink-hlorid, cink-sulfat, heptahidrat). Uzeti uzorci su analizirani UV spektrofotometrijski (Evolution 300, ThermoFisher, Madison, Wisconsin) na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije. Sva ispitivanja su rađena na sobnoj temperaturi.

Prilikom izračunavanja koncentracije ciprofloksacina u uzorcima medijuma korišćene su sledeće jednačine kalibracionih kriva:

- a)  $A = 0.1092c + 0.0138$ ,  $c$  (μg/ml),  $\lambda = 275$  nm (voda i 0.1 M HCl);
- b)  $A = 0.00956c + 0.0012$ ,  $c$  (μg/ml),  $\lambda = 270$  nm (fosfatni pufer pH 6.8)
- c)  $A = 0.106c + 0.0445$ ,  $c$  (μg/ml),  $\lambda = 276$  nm (0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- d)  $A = 0.0666c + 0.1004$ ,  $c$  (μg/ml),  $\lambda = 272$  nm (FaSSIF)
- e)  $A = 0.0781c + 0.2056$ ,  $c$  (μg/ml),  $\lambda = 278$  nm (FeSSIF)
- f)  $A = 0.0971c + 0.011$ ,  $c$  (μg/ml),  $\lambda = 275$  nm (acetatni pufer pH 4.5)

**Tabela 3.** Sastav fiziološki zasnovanih medijuma (FaSSIF i FeSSIF) (preuzeto iz ref. 27)

**Table 3.** Composition of media simulating Fasted State conditions in the Small Intestine (FaSSIF) and Fed State conditions in the Small Intestine (FeSSIF) (according to ref 27)

<b>Substance (mM)</b>	<b>FaSSIF</b>	<b>FeSSIF</b>
KCl	220	190
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , monobasic	29	-
Acetic acid		144
Sodium taurocholate	5	15
Lecithin	1.5	4
NaOH	q.s	q.s
Disstiled water q.s	1 l	1 l
<b>pH</b>	<b>6.8</b>	<b>5</b>
<b>osmolarity [mOsm]</b>	<b>280-310</b>	<b>485-535</b>
<b>buffer capacity[mEq/l/pH]</b>	<b>10±2</b>	<b>76±2</b>

### 5.2.3 Ispitivanje brzine rastvaranja

Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz komercijalno dostupnih tableta je sprovedeno u vodi, 0.1 M HCl, acetatnom puferu pH 4.5, fosfatnom puferu pH 6.8 i fiziološki zasnovanim medijumima (FaSSIF i FeSSIF). Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz komercijalno dostupnih tableta je sprovedeno u vodi, i fiziološki zasnovanim medijumima (FaSSIF i FeSSIF) u prisustvu jedinjenja koja sadrže jon metala (gvožđe, kalcijum, aluminijum, cink). Ispitivanja su izvršena u standardnoj aparaturi sa lopaticom i u aparaturi sa mini lopaticom (Erweka DT 600, Heusenstamm, Nemačka) pri brzini od 50 o/min i temperaturi  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , koristeći 900 ml, 250 ml, 150 ml i 50 ml medijuma. U tačno određenim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 min) je vršeno uzorkovanje, uzorci su filtrirani kroz membranski filter (veličina pora 0.45  $\mu\text{m}$ ), a neposredno pre određivanja sadržaja aktivne supstance su razblaživani. Određivanje sadržaja ciprofloksacin-hidrohlorida u uzorcima je sprovedeno UV spektrofotometrijski na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije (Evolution 300, ThermoFisher, Madison, Wisconsin).

## 5.2.4 Građenje kompleksa

Interakcija između ciprofloksacin-hidrohlorida i izabranih soli metala je praćena u *in vitro* uslovima mešanjem rastvora ispitivanih komponenata u različitim molarnim odnosima. Pripremljen je 0.05 M rastvor ciprofloksacin-hidrohlorida i 0.1 M rastvor gvožđe(II)-sulfata, 0.3 M rastvor kalcijum-hlorida, 0.2 M rastvor cink-hlorida ili 0.1 M rastvor cink-sulfata, heptahidrata. Rastvor ciprofloksacin-hidrohlorida je mešan sa rastvorom soli metala u odnosima 9:1; 7:3; 1:1; 3:7 i 1:9. U uzorcima u kojima je došlo do precipitacije, dobijeni talog je izolovan i analiziran metodama karakterizacije navedenim u odeljku 5.2.5.

## 5.2.5 Metode karakterizacije čvrste faze

Čvrsta faza prikupljena u okviru ispitivanja brzine rastvaranja i građenja kompleksa je analizirana pogodnim metodama karakterizacije: DSC, TGA, FTIR, difrakcija X-zraka. Takođe je sprovedena kvantitativna analiza izabranih uzoraka.

### 5.2.5.1 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Pri ispitivanju uzoraka korišćen je uređaj Mettler-Toledo DSC 821 (Schwerzenbach, Švajcarska) sa uređajem za hlađenje LabPlant RP-100. Uzorci su odmereni na vagi i masa uzorka je bila u rasponu 5-20 mg. Uzorci su zatvarani u aluminijumske posudice i termički tretirani pri različitim brzinama grejanja u temperaturnom intervalu od sobne pa do temperature od 400°C. Merenja su vršena u inertnoj, dinamičkoj atmosferi azota, brzinom od 10°C/min. Uređaj je kalibrisan pomoću standarda indijuma i cinka. Podaci su obrađeni pomoću softvera Mettler Toledo STAR<sup>®</sup> (verzija 6.1).

### 5.2.5.2 Termogravimetrija (TGA)

Pri ispitivanju uzoraka korišćen je uređaj Mettler TG 50 (Greifensee, Švajcarska). Uzorci mase 5-12 mg su zatvarani u aluminijumske posudice i grejani brzinom od 10°C/min. Merenja su vršena u inertnoj, dinamičkoj atmosferi azota. Podaci su obrađeni pomoću softvera Mettler Toledo STAR<sup>®</sup> (verzija 6.1).

### **5.2.5.3 Difrakcija X-zraka (XRD)**

Pri ispitivanju uzoraka korišćen je uređaj Miniflex II Desktop X-ray difraktometar Rigaku sa Ilaskris uređajem za hlađenje (Rigaku, Tokio, Japan). U sastavu uređaja se nalazi bakarna cev sa filterom od nikla koji suzbija K $\beta$  radijaciju. Merenja su vršena na 2 $\theta$  skali u rasponu 5-40 sa pomeranjem od 0.05° u sekundi.

### **5.2.5.4 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)**

Snimanje uzoraka je vršeno na Nicolet Magna IR 560 E.S.P spektrofotometru sa MCT/A detektorom (SpectraLab Scientific Inc, Kanada). Opseg snimanja je bio 650-4000 cm<sup>-1</sup>, rezolucija 2 cm<sup>-1</sup> i korišćena je metoda sa KBr diskovima. KBr diskovi su pripremani direktnom kompresijom pri pritisku od 8 bar-a i u trajanju od 1 minuta.

### **5.2.5.5. Kvantitativno određivanje cinka**

Određivanje sadržaja cinka u uzorcima je izvršeno primenom induktivno kuplovanog plazma masenog spektrometra (ICP-MS). Nakon digestije uzorka određene mase 69 % koncentrovanoj azotnoj kiselini i 30 % vodonik-peroksidom, reaktivna smeša je tretirana na 1000 W 20 minuta na 200°C. Uzorci su zatim razblaženi u prečišćenoj vodi i kvantitativni sadržaj cinka je određen na ICP-MS Varian 820 (Palo Alto, CA, USA).

### **5.2.5.6. Kvantitativno određivanje gvožđa, sulfata i hlorida**

Sadržaj gvožđa u uzorcima je određen masenom spektrofotometrijom. Razaranje uzorka se vrši u smeši koncentrovane azotne kiseline i vodonik-peroksida, uzorci su po potrebi razblaživani u prečišćenoj vodi i sadržaj je određivan na masenom spektrometru Varian 820 (Palo Alto, CA, USA).

Određivanje koncentracije sulfatnog anjona se zasniva na metodi građenja barijum-sulfata, a koncentracija sulfatnog anjona se određuje fotometrijski na talasnoj dužini od 430 nm.

Koncentracija hloridnih jona se takođe određuje fotometrijski na 468 nm, indirektno određivanjem Fe(III)-tiocijanata, koji nastaje u reakciji između hloridnog jona i živa-tiocijanata, a oslobođeni tiocijanatni jon se vezuje sa gvožđem gradeći gvožđe(III)-tiocijanat.

## 5.2.6 *In silico* metode

### 5.2.6.1 Numerička dekonvolucija

Stepen i brzina kojom lekovita supstanca dospeva u sistemska cirkulaciju se može proceniti numeričkom dekonvolucijom kao jednom od konvencionalnih farmakokinetičkih metoda. Numerička dekonvolucija *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez i nakon istovremene primene sa preparatima koji sadrže jone metala (15, 16, 136) je rađena u Kinetika 5.0 programu (Thermo Kinetica version 5.0, Thermo Fisher Scientific). Podaci o koncentraciji ciprofloksacina u plazmi nakon intravenske primene (161) su korišćeni kao težinska funkcija.

### 5.2.6.2 GastroPlus™ programski paket

*In silico* simuliranje interakcije je izvršeno uz primenu programa GastroPlus™ (GastroPlus 6.1, SimulationPlus, Lancaster, Kalifornija, SAD). Kao ulazni parametri neophodni za simulaciju (fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine ciprofloksacina) korišćeni su literaturni podaci, eksperimentalno dobijene i *in silico* predviđene vrednosti odgovarajućih parametara.

Da bi se generisao odgovarajući model bilo je neophodno uneti sledeće fizičko-hemijske parametre:  $P_{eff}$ , rastvorljivost i pH na kojoj je određena,  $pK_a$  vrednost, koeficijent difuzije,  $\log P$ , gustinu i radijus čestica. Kao ulazni parametar korišćena je eksperimentalno određena vrednost za rastvorljivost u vodi dok je vrednost efektivne permeabilnosti ( $P_{eff}$ ) dobijena korišćenjem literaturnih podataka za biološku raspoloživost ciprofloksacina uz korišćenje eksponencijalne jednačine (22):

$$F_a = (1 - e^{-1.47P_{eff}}) * 100$$

Sve simulacije su rađene sa setom fizioloških parametara koji opisuje primenu leka na gladno. ASF faktori su optimizovani u cilju što boljeg podudaranja *in vivo* i *in silico* dobijenog profila koncentracije leka u plazmi.

### Analiza osetljivosti parametara

Procenjen je uticaj četiri ulazna parametra (rastvorljivost, permeabilnost, vreme prolaska kroz želudac i vreme prolaska kroz tanko crevo) na procenat apsorpcije ciprofloksacina. U toku PSA analize jedan parametar se varira i uticaj svakog parametra



procenjuje se nezavisno.

Rastvorljivost je varirana u opsegu 0.1 - 100 mg/ml, a permeabilnost u opsegu 0.79 -  $3.14 \times 10^{-4}$  cm/s (što obuhvata opseg 0.5-2 puta veće vrednosti od vrednosti koja je korišćena kao ulazni parameter). Vreme prolaska kroz želudac je varirano u opsegu 0.25 - 3 h, dok je vreme prolaska kroz tanko crevo varirano u opsegu 3 – 4 h (163).

### **Validacija metode**

U situaciji kada su dostupne studije koje su sprovedene u *in vivo* uslovima, tačnost predviđanja programa procenjuje se na osnovu uporedne analize stvarnih i predviđenih vrednosti parametara izračunavanjem procenta greške predviđanja (*Percent Prediction Error, % PE*), koji se definiše kao relativni odnos razlike stvarne i simulirane vrednosti parametara.

Za procenu greške predviđanja pojedinačnih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $PIK_{0-\infty}$ ) korišćen je sledeći izraz:

$$PE(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

gde je  $PE(\%)$  – greška predviđanja izražena u procentima,  $A$  – uočena (eksperimentalna) vrednost i  $B$  – predviđena (simulirana) vrednost.

Predviđanje se smatra uspešnim ukoliko je prosečna greška predviđanja manja od 10 % (162).

*In vivo* uočeni i *in silico* simulirani profili koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena, su upoređeni i na osnovu vrednosti statističkih parametara (koeficijent korelacije  $r^2$ , sume kvadrata greške SSE, korena iz srednje vrednosti kvadrata greške RMSE, srednje vrednosti apsolutne greške MAE).

## 6. REZULTATI I DISKUSIJA

### 6.1. *In vivo* ispitivanja

U ovom poglavlju prikazana je analiza literaturnih podataka koji se odnose na *in vivo* ispitivanje biološke raspoloživosti ciprofloksacina, kao i njegove interakcije sa istovremeno primenjenim preparatima koji sadrže jone metala. Detaljna analiza *in vivo* studija dostupnih u literaturi pruža uvid u intenzitet promena u biološkoj raspoloživosti ciprofloksacina nakon istovremene primene sa preparatima koji sadrže jone metala. Na osnovu prikupljenih podataka sprovedena je identifikacija kinetike apsorpcije ciprofloksacina u uslovima primene bez, kao i pri istovremenoj primeni različitih preparata koji sadrže jone gvožđa, kalcijuma, aluminijuma i cinka, što je primenjeno kao osnov za *in vitro* i *in silico* modelovanje i simulaciju procesa koji se odvijaju *in vivo*.

U tabeli 4 je dat pregled *in vivo* studija biološke raspoloživosti ciprofloksacina. U tabeli 5 dat je pregled rezultata *in vivo* studija interakcije ciprofloksacina sa jonima metala.

*In vivo* određivanje bioraspoloživosti ciprofloksacina je bila tema brojnih istraživanja (117-122) i u studijama su korišćene doze ciprofloksacina u opsegu 50-1000 mg. Pokazano je da apsolutna bioraspoloživost ciprofloksacina varira u opsegu 52-90 % (tabela 4). Korišćenje različitih doza, dizajn studija, varijabilna permeabilnost i postojanje prozora za apsorpciju, kao i različita raspadljivost tableta i brzina rastvaranja aktivne supstance iz tableta koje sadrže različite doze ciprofloksacina predstavljaju potencijalne uzroke za uočenu varijabilnost u bioraspoloživosti ciprofloksacina.

Istovremena primena hrane, lekova ili dijetetskih suplemenata koji sadrže jone metala smanjuje maksimalnu koncentraciju ciprofloksacina u plazmi, dok neznatno utiče na vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi (tabela 5). Bioraspoloživost ciprofloksacina u prisustvu jona metala je smanjena u opsegu 40-85 % (14-17, 132-148). Istovremena primena ciprofloksacina sa preparatima koji sadrže aluminijum-hidroksid dovodi do smanjenja bioraspoloživosti ciprofloksacina za više od 80 %. Iako se, generalno, smatra da je smanjena biološka raspoloživost ciprofloksacina primenjenog sa preparatima koji sadrže jone metala posledica nastanka kompleksa sa smanjenom permeabilnošću i/ili smanjenom rastvorljivošću, ovakvi rezultati mogu

nastati i usled precipitacije ciprofloksacina u uslovima promenjene pH vrednosti u lumenu creva, kao i usled adsorpcije ciprofloksacina na nerastvorene komponente prisutne u GIT-u.

**Tabela 4.** Pregled literaturnih in vivo studija bioraspoloživosti ciprofloksacina

**Table 4.** Summary of the literature in vivo data on ciprofloxacin bioavailability

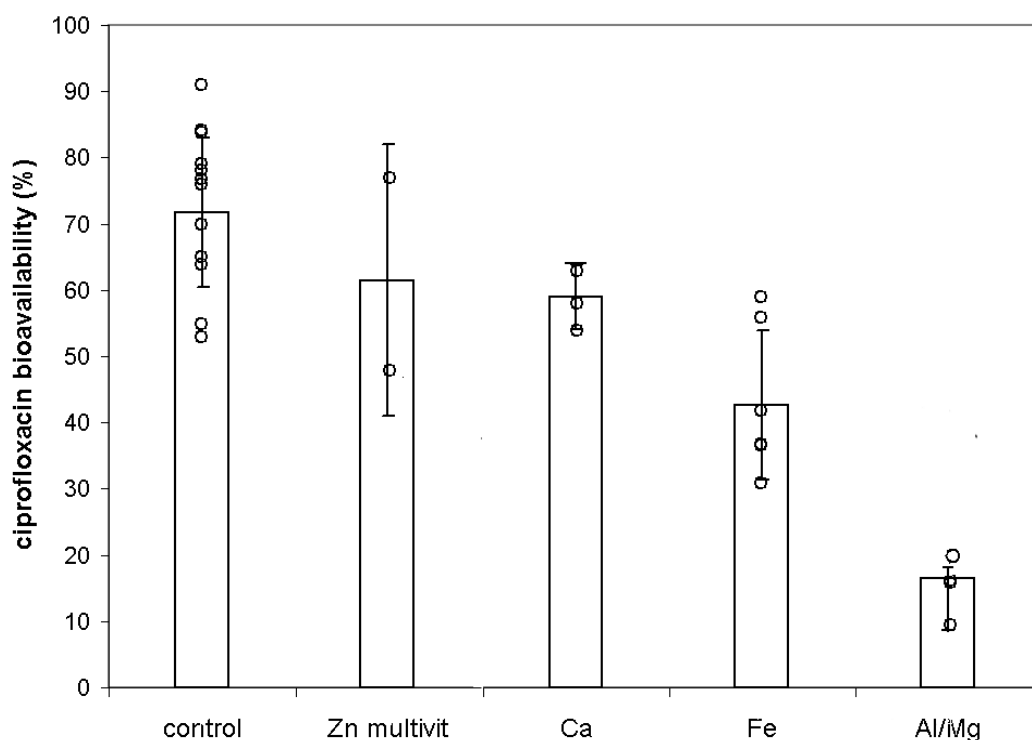
Dose (mg)	C <sub>max</sub> (mg/l)	t <sub>max</sub> (h)	k <sub>a</sub> (h <sup>-1</sup> )	k <sub>el</sub>	AUC (mgh/l)	BA (%)	No of volunteers	Ref.
50	0.28	0.58	NA	NA	1.00	77.0	12	117
100	0.49	0.82	NA	NA	1.90	63.0		
750	2.65	1.16	NA	NA	12.20	54.0		
100	0.73	1	3.633	0.545	2.10	82.7	12	118
250	1.59	1.25	3.367	0.441	5.28	83.1		
500	2.77	1.54	3.120	0.283	9.61	75.7		
1000	5.57	1.75	2.433	0.302	22.84	89.9		
100	0.37	1.16	1.782	NA	1.77	64.0	12	119
250/fasting	1.04	1.00	2.034	NA	4.23	NA	10	
250/fed	0.83	1.34	2.142	NA	3.58	NA	10	
500	1.51	1.18	1.476	NA	6.78	52.0	10	
750	1.97	1.26	1.842	NA	8.77	-	12	
200	1.20	0.71	-	-	-	69.0	12	120
200	1.18	0.69	8.580	--	4.18	69.0	8	121
750	2.97	1.38	1.480	-	15.30	69.1		
500	2.70	-	-	-	10.70	75.0	12	122
750	3.80	-	-	-	16.80	78.0		

**Tabela 5.** Pregled *in vivo* rezultata interakcije ciprofloksacina sa jonima metala nakon oralne primene 500 mg ili 750 mg ciprofloksacin-hidrohlorida u obliku tableta

**Table 5.** Summary of the *in vivo* data on ciprofloxacin – metal ion interaction following oral administration of 500 mg or 750 mg ciprofloxacin tablets

Study description	Dose/ metal (mg)	Dose/ ciprofloxacin (mg)	C <sub>max</sub> (mg/l)	t <sub>max</sub> (h)	AUC (mgh/l)	No of volunt.	Ref .
Control 1	-	500	2.80	-	14.66	12	16
Control 2	-	500	3.20	-	15.71		
Ferrous sulfate	65.0	500	0.70	-	5.37		
Multivitamins with zinc	23.9	500	1.90	-	11.29		
Control	-	500	2.10	1.50	13.30	8	133
Ferrous fumarate	70.0	500	0.60	1.50	4.00		
Control	-	500	3.00	1.20	16.20	8	15
Ferrous sulfate	60.0	500	2.00	0.90	9.40		
Ferrous gluconate	69.6	500	1.30	1.10	5.80		
Oligominerals with zinc	15.0	500	1.40	0.90	7.70		
Control	-	500	2.15	1.30	12.20	8	14
Ferrous sulfate	100.0	500	0.95	1.00	5.00		
Control	-	750	3.18	1.24	13.50	12	136
Calcium carbonate	1360.0	750	1.69	1.29	7.82		
Aluminium hydroxide	623.0	750	0.60	1.61	2.08		
Control	-	750	3.42	1.25	16.07	12	17
Maloox (aluminium/magnesi um hydroxide suspension 30 ml)	-	750	0.68	0.66	2.42		

Grafički prikaz dostupnih literaturnih podataka dat je na slici 6. U rezultatima *in vivo* studija biorasploživosti ciprofloksacina nakon oralne primene može se uočiti velika varijabilnost, kako za vrednosti biorasploživosti ciprofloksacina bez (*control*), tako i nakon istovremene primene sa lekovima, dijetetskim suplementima ili hranom koja sadrži jone metala (slika 6). Može se uočiti da je biorasploživost ciprofloksacina smanjena u prisustvu jona metala (gvožđe, kalcijum, aluminijum, cink).



*Slika 6. Bioraspoloživost ciprofloksacina bez/nakon istovremene primene sa preparatima koji sadrže jone metala: rezime literaturnih podataka ("control" predstavlja apsolutnu bioraspoloživost ciprofloksacina; "Zn multivit, Ca, Fe, Al/Mg," predstavljaju relativnu bioraspoloživost ciprofloksacina nakon istovremene primene sa preparatima koji sadrže jone metala; srednja vrednost  $\pm$ SD su prikazani za svaki set podataka)*

*Fig. 6. Ciprofloxacin bioavailability with and without metal ion containing products co-administration: summary of available literature data ("control" denotes absolute bioavailability of ciprofloxacin tablets; "Zn multivit, Ca, Fe, Al/Mg," denote relative bioavailability of ciprofloxacin when co-administered with preparations containing different metallic ions; average value  $\pm$ SD for each data set is included).*

### **6.1.1. In vivo interakcija ciprofloksacina sa jonima metala**

#### **Soli gvožđa**

*In vivo* studija Kara i sar. (15) pružila je uvid u intenzitet promena u farmakokinetičkim parametrima i bioraspoloživosti ciprofloksacina bez, kao i nakon istovremene primene sa različitim solima gvožđa. Srednji profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez, kao i nakon primene sa preparatom gvožđe(II)-sulfata/gvožđe(II)-glukonata su korišćeni za *in silico* simulaciju interakcije između ciprofloksacina i jona gvožđa (poglavlje 6.3.2).

U studiji je učestvovalo 8 zdravih dobrovoljaca kod kojih je ispitivan uticaj istovremeno primenjene tablete ciprofloksacina (500 mg) sa 300 mg gvožđe(II)-sulfata (60 mg gvožđa), tablete sa 600 mg gvožđe(II)-glukonata (69.6 mg gvožđa) ili Centrum tablete sa 10 mg elementarnog gvožđa. Smanjenje maksimalne koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene sa tabletom gvožđe(II)-sulfata je bilo 37 %, dok je u slučaju tableta gvožđe(II)-glukonata smanjenje bilo čak 57 %. Biološka raspoloživost ciprofloksacina je bila smanjena za 46 % u prisustvu gvožđe(II)-sulfata, a za 67 % u prisustvu gvožđe(II)-glukonata. Razlike u smanjenju biološke raspoloživosti ciprofloksacina se objašnjavaju različitom brzinom rastvaranja tableta gvožđa u *in vivo* uslovima, pa je zbog toga interakcija jače izražena sa gvožđe(II)-glukonom (15). Kao potencijalni mehanizam interakcije je predloženo građenje kompleksa između ciprofloksacina i jona gvožđa. Profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez, kao i nakon primene sa preparatom gvožđe(II)-sulfata su prikazani na slici 7a.

### **Jedinjenja aluminijuma i kalcijuma**

U *in vivo* studijama je uglavnom ispitivana bioraspoloživost ciprofloksacina nakon istovremene primene sa preparatima aluminijuma i magnezijuma. Frost i sar. (136) su *in vivo* ispitivali uticaj aluminijum-hidroksida i kalcijum-karbonata na bioraspoloživost ciprofloksacina. Ova studija je izabrana kao model za *in silico* ispitivanje interakcije između ciprofloksacina i jona aluminijuma, kao i ciprofloksacina i jona kalcijuma. Srednji profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez, kao i nakon primene sa preparatom aluminijuma/kalcijuma su korišćeni za *in silico* simulaciju.

U studiji Frost i sar. je učestvovalo 12 zdravih dobrovoljaca. Ispitivan je uticaj aluminijum-hidroksida na biološku raspoloživost ciprofloksacina kada se tableta sa 750 mg ciprofloksacina primeni 5 minuta nakon doze od 1800 mg (3 tablete po 600 mg) aluminijum-hidroksida. Uočeno je značajno smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina (za 85 %) u prisustvu aluminijum-hidroksida. U zaključku autori daju preporuku da se preparati sa aluminijum-hidroksidom, koji se koriste u lečenju gastritisa, ne primenjuju istovremeno sa preparatima ciprofloksacina. Kao predlog potencijalnog uzroka smanjene bioraspoloživosti ciprofloksacina pominje se mogućnost građenja kompleksa i promene u gastričnoj pH vrednosti (136).

U istom istraživanju uočeno je i značajno smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina

(za oko 40 %) nakon primene četiri tablete sa po 850 mg kalcijum-karbonata. Interesantno je to da su, kod dobrovoljaca koji su primenjivali tablete sa kalcijum-karbonatom, zabeležene značajne interindividualne razlike ( $C_{max}$  u opsegu 0.9-1.7  $\mu\text{g/ml}$ ), dok kod dobrovoljaca koji su primenjivali tablete sa aluminijum-hidroksidom nisu zabeležene značajne interindividualne razlike u smanjenju koncentracije ciprofloksacina u plazmi ( $C_{max} \sim 0.6 \mu\text{g/ml}$ ) (136). Profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez, kao i nakon primene sa preparatima aluminijum-hidroksida i kalcijum-karbonata su prikazani na slici 7b.

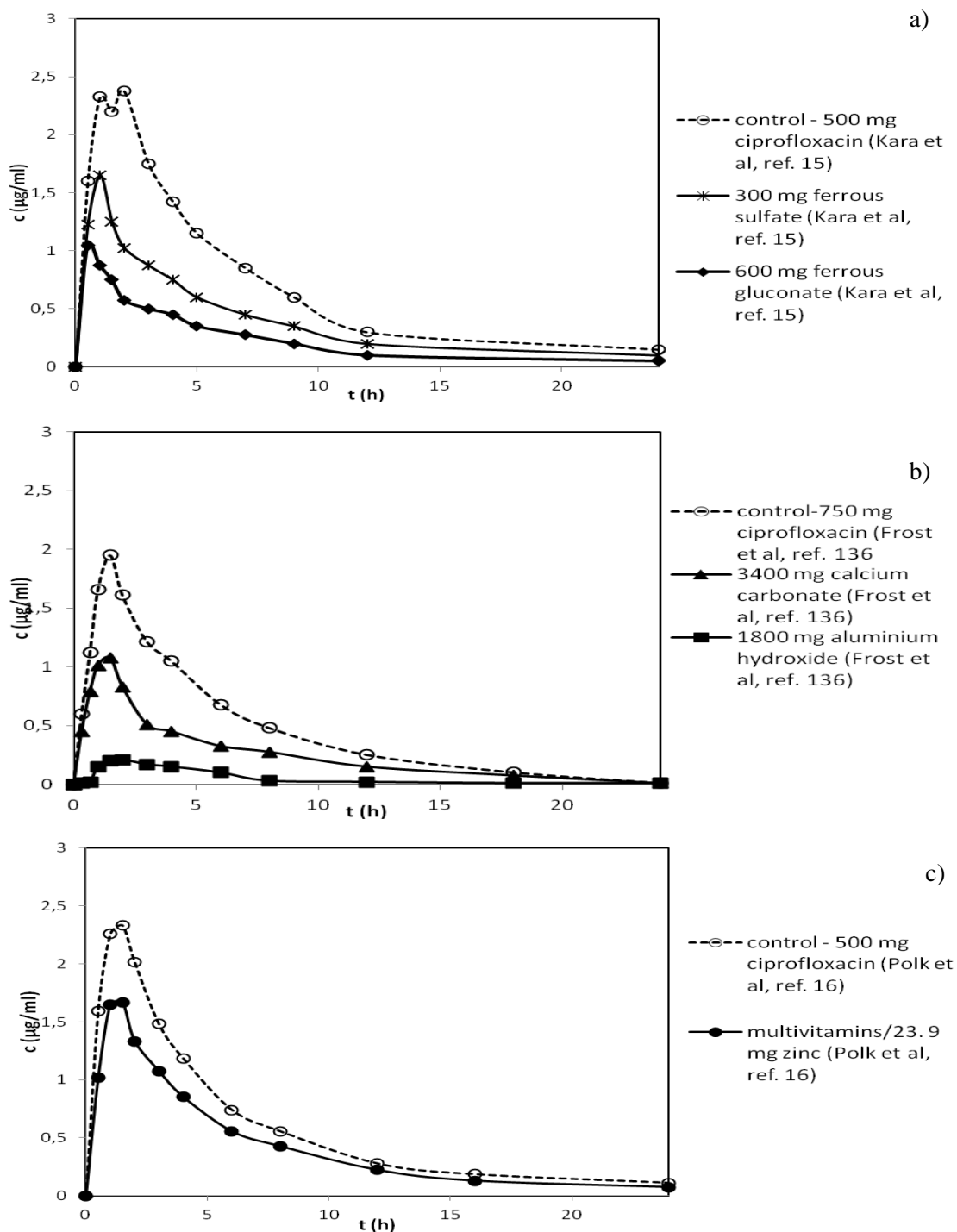
### **Jedinjenja cinka**

U *in vivo* studijama nije ispitivan uticaj preparata koji sadrže samo jedinjenja cinka na bioraspoloživost ciprofloksacina. Kara i sar. (15) i Polk i sar. (16) su u *in vivo* ispitivanjima koristili multivitaminske/oligomineralne preparate koji sadrže različite količine soli cinka u kombinaciji sa jedinjenjima drugih metala ili vitamina B-grupe.

U studiji Polka i sar. (16) korišćeni preparat sa cinkom sadržavao je 23.9 mg cinka i vitamine, dok je oligomineralni preparat korišćen u studiji Kara i sar. (15) pored 15 mg cinka, sadržavao i 10 mg gvožđa, 100 mg magnezijuma, 162 mg kalcijuma, 2 mg bakra i 5 mg mangana koji, takođe, mogu da stupe u interakciju sa ciprofloksacinom i doprinesu smanjenju njegove koncentracije u plazmi. Za *in silico* simulaciju interakcije ciprofloksacina i jona cinka korišćeni su srednji profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez, kao i nakon istovremene primene sa multivitaminским preparatom koji sadrži cink (16). Polk i sar. (16) su smanjenje koncentracije ciprofloksacina u plazmi objasnili građenjem kompleksa koji se ne apsorbuje, a u čijem građenju učestvuju 4-keto i 3-karboksilna grupa ciprofloksacina. U ovoj studiji učestvovalo je 12 dobrovoljaca i zabeleženo je smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina za 24 %, nakon istovremene primene sa dijetetskim suplementom koji sadrži 23.9 mg cinka. S obzirom da nije uočen uticaj primenjenih preparata na promenu pH vrednosti u GIT-u, autori su istakli da je glavni mehanizam interakcije građenje kompleksa (16). Profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez, kao i nakon primene sa preparatom cinka su prikazani na slici 7c.

Na osnovu prikaza farmakokinetičkih parametara za sve tri *in vivo* studije (tabela 5), može se uočiti da nema značajnih razlika u vrednosti maksimalnih koncentracija

ciprofloksacina u plazmi, bez obzira na razliku u primenjenoj dozi ciprofloksacina.

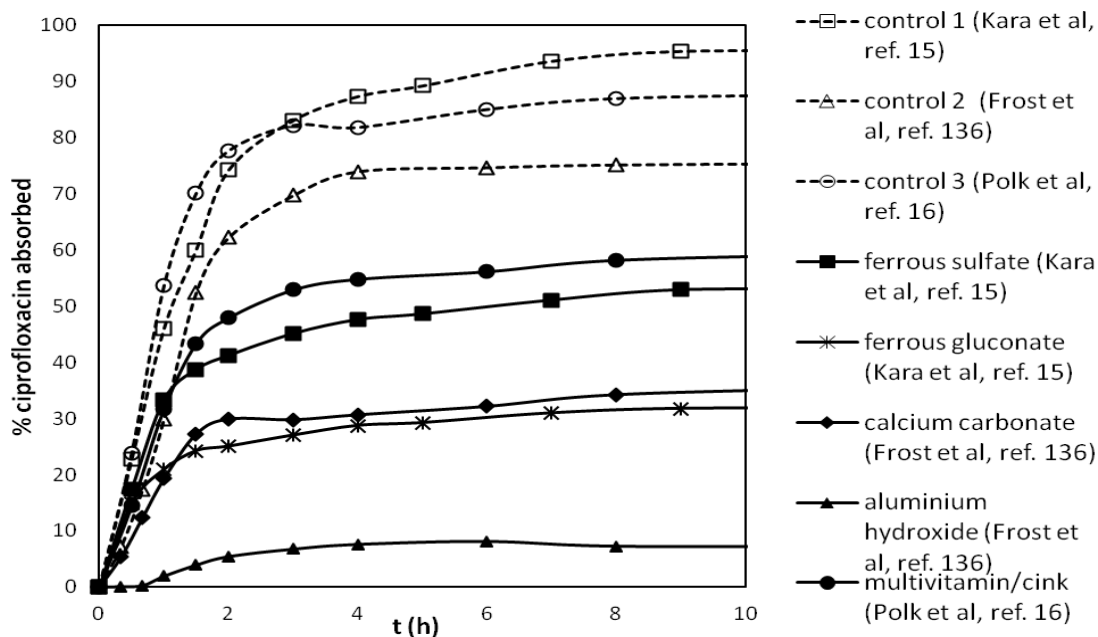


*Slika 7a-c. Profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene 500/750 mg ciprofloksacin-hidrohlorida u obliku tableta bez/sa preparatima: a) gvožđa b) kalcijum-karbonata ili aluminijum-hidroksida c) cinka*

*Fig. 7a-c. Ciprofloxacin plasma concentration profiles following oral administration of 500/750 mg ciprofloxacin tablets without (control) and with a) iron salts b) calcium carbonate or aluminium hydroxide, c) multivitamins with zinc*



Na slici 7a-c dati su grafički prikazi *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete od 500 mg ili 750 mg ciprofloksacina sa gvožđe(II)-sulfatom, kalcijum-karbonatom, aluminijum-hidroksidom ili preparatom koji sadrži cink i može se uočiti da se profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene ciprofloksacina sa preparatom koji sadrži jon metala poprilično razlikuju.



*Slika 8. Profili apsorpcije ciprofloksacina bez/nakon istovremene primene sa preparatima gvožđe(II)-sulfata, gvožđe(II)-glukonata, kalcijum-karbonata, aluminijum-hidroksida ili multivitamina sa cinkom dobijeni numeričkom dekonvolucijom*

*Fig. 8. Ciprofloxacin absorption profiles without and with ferrous sulfate, ferrous gluconate, calcium carbonate, aluminium hydroxide or multivitamin zinc tablets co-administration calculated by numerical deconvolution*

Na slici 8 dat je prikaz profila apsorpcije ciprofloksacina za kontrolne studije (15, 16, 136) i studije interakcije sa jedinjenjima gvožđa, aluminijuma, kalcijuma i cinka dobijene numeričkom dekonvolucijom u odnosu na profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi uočen nakon intravenske primene ciprofloksacin-hidrohlorida u dozi od 10 mg (161). Može se uočiti da je apsorpcija ciprofloksacina brza i da se dešava u najvećem stepenu u prvih 2 - 4 sata nakon primene. Istovremena primena preparata koji sadrže gvožđe, kalcijum, aluminijum ili cink, utiče na procenat apsorbovanog ciprofloksacina u različitom stepenu, u zavisnosti od vrste i doze jona metala.

## 6. Results and discussion

### 6.1 *In vivo* data

Detailed survey of the literature data related to ciprofloxacin bioavailability without, as well as with metallic cations containing preparations co-administered is given in this chapter.

Summary of the literature data on ciprofloxacin absolute bioavailability (117-122) is given in Table 4. Doses of ciprofloxacin used were in the range 50-1000 mg. The *in vivo* data indicate rapid and somewhat variable ciprofloxacin absorption with the absolute bioavailability values ranging from 52 to 90 %. Ciprofloxacin variable bioavailability may depend on different doses of ciprofloxacin administered, different study designs, ciprofloxacin permeability and narrow absorption window in the upper small intestine and differences in disintegration and dissolution rates of tablets containing ciprofloxacin.

Reduced ciprofloxacin bioavailability ranging from 40-85 % from tablets containing ciprofloxacin hydrochloride when co-administered with metallic ion containing preparations has been reported in a number of *in vivo* studies (14-17, 132-148). Formation of a nonabsorbable complex has been postulated as the interaction mechanism, although some authors commented that other physicochemical factors, such as solubility (14) or adsorption (156), may also play a role. Overviews of the literature data related to ciprofloxacin bioavailability without/with concomitant administration of metallic cations containing preparations are given in Table 4 and Table 5, respectively. Graphical summary of the *in vivo* data is presented in Fig. 6, where the first column represents ciprofloxacin absolute bioavailability data obtained from a number of studies (117-122), while other columns represent ratio of average AUC values obtained following ciprofloxacin administration with and without different metallic ion containing preparations. Relatively high variability in drug bioavailability is evident, both in the pharmacokinetic studies following oral administration of ciprofloxacin hydrochloride tablets alone, as well as in the interaction studies in which various drug products or dietary supplements containing different metallic compounds were co-administered.

#### 6.1.1 *In vivo* interaction between ciprofloxacin and metallic cations

##### Iron

Kara et al. (15) investigated the effects of ferrous sulfate (300 mg), ferrous gluconate (600 mg), and Centrum tablets containing 10 mg of iron on ciprofloxacin bioavailability in eight healthy subjects. Co-administration of ferrous sulfate resulted in a 37 % decrease in peak serum drug concentration, while decrease in ciprofloxacin serum concentration was 57 % with ferrous gluconate. Ciprofloxacin bioavailability was reduced by 46 % and 67 % in the presence of ferrous sulfate and ferrous gluconate, respectively. However, effects of ferrous gluconate and ferrous sulfate co-administration were found to be different and this discrepancy was attributed

to differences in the dissolution rates of ferrous sulfate and ferrous gluconate tablets. The authors suggested that the formation of a ciprofloxacin-iron complex was probably the cause of the reduction in ciprofloxacin bioavailability in the presence of iron. Mean plasma profiles observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets with iron salt (i.e sulfate, gluconate) were used for *in silico* simulation of ciprofloxacin/iron interaction. The respective profiles are presented in Fig. 7a.

### **Aluminium and calcium compounds**

Reduced ciprofloxacin bioavailability after concomitant administration of preparations containing mixture of aluminium hydroxide and magnesium hydroxide has been reported (13, 17). Frost et al. (136) investigated effects of aluminium hydroxide and calcium carbonate on ciprofloxacin bioavailability. In the study of Frost et al. (136), 750 mg of ciprofloxacin was administered orally to 12 healthy volunteers alone and with: (I) four 850-mg calcium carbonate tablets taken 5 min before ciprofloxacin or (II) three 600-mg aluminium hydroxide tablets taken 5 min before ciprofloxacin. Relative bioavailability of ciprofloxacin when given with calcium carbonate was approximately 60 % of the control value. When ciprofloxacin was given with aluminium hydroxide, the relative bioavailability was approximately 15 %. Although ciprofloxacin bioavailability was reduced after concomitant calcium carbonate administration, the effect in individual subjects varied ( $C_{max}$  was in range 0.9-1.7  $\mu\text{g/ml}$ ) and interaction with calcium was not observed in all volunteers. In contrast, the effects of aluminium hydroxide on ciprofloxacin bioavailability were similar in all volunteers. Authors concluded that aluminium hydroxide should not be given concomitantly with ciprofloxacin. The mechanism for ciprofloxacin-aluminium or ciprofloxacin-calcium interaction according to Frost et al. (136) includes formation of chelate complexes. Frost et al. (136) suggested that carboxyl group of ciprofloxacin was the most likely site for chelation and that the gastric pH would need to be elevated sufficiently to ionize the carboxyl group in the presence of cations. Mean plasma profiles observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets without and with aluminium hydroxide or calcium carbonate were used for *in silico* simulation of ciprofloxacin/aluminium and ciprofloxacin/calcium interaction. The respective profiles are presented in Fig. 7b.

### **Zinc**

Kara et al (15) and Polk et al (16) evaluated the effects of multivitamins/oligominerals with zinc co-administration on ciprofloxacin bioavailability in healthy volunteers.

Polk et al (16) used multivitamin containing 23.9 mg of zinc, while Kara et al (15) used dietary supplement containing 15 mg of zinc, 10 mg of iron, 100 mg of magnesium, 162 mg of calcium, 2 mg of copper and 5 mg of manganese. In the study of Polk et al. (16) 500 mg of ciprofloxacin was administered orally to 12 healthy volunteers alone and with multivitamins containing zinc. Concomitant administration of multivitamins containing zinc reduced the mean bioavailability of

ciprofloxacin by 24 %. Polk et al (16) suggested that formation of nonabsorbable chelates was the potential mechanism of ciprofloxacin-zinc interaction observed *in vivo* and that chelation probably occurred between the cation and the 4-keto oxygen and 3-carboxylic acid groups of ciprofloxacin. For *in silico* simulation of ciprofloxacin-zinc interaction, mean plasma profiles observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets without and with zinc containing multivitamin were used. The respective profiles are presented in Fig. 7c.

Ciprofloxacin absorption profiles without and with ferrous sulfate, ferrous gluconate, calcium carbonate, aluminium hydroxide or multivitamins with zinc co-administration calculated by numerical deconvolution are presented in Fig. 8. The *in vivo* input profiles obtained suggest that after oral administration, either with or without metallic compounds, ciprofloxacin absorption kinetics exhibit initial rapid absorption in the first 2 - 4 h after administration. Percent of drug absorbed was reduced with concomitant metallic compounds administration in different extent depending on the dose and type of metallic cation co-administered.

## 6.2 *In vitro* ispitivanja

Literaturni izvori navode da je osnovni uzrok smanjene biološke raspoloživosti ciprofloksacina u prisustvu jona metala građenje slabo permeabilnih kompleksa (13-17). Takođe, navodi se da i fizičko-hemijski parametri kao što je rastvorljivost mogu uticati na promenu bioraspoloživosti ciprofloksacina (14). Međutim, nijedan od ovih mehanizama interakcije nije eksperimentalno dokazan. Rezultati *in vitro* studija su relativno kontradiktorni i navodi se da kao produkt interakcije mogu nastati kompleksi koji imaju veću rastvorljivost u odnosu na polazno jedinjenje, da nastali kompleksi imaju smanjenu rastvorljivost, kao i da građenje kompleksa izostaje (80-84, 95, 98, 153-155). Iako je kompleksiranje ciprofloksacina sa jonima metala i karakterizacija nastalih kompleksa bila tema brojnih istraživanja, sa biofarmaceutskog aspekta, značajne su interakcije između ciprofloksacin-hidrohlorida i jedinjenja metala koja su prisutna u terapiji, kao lekovi ili dijetetski suplementi.

Na promenu rastvorljivosti može uticati promena pH sredine, kompleksiranje, uticaj zajedničkog jona, pa bi rezultati *in vitro* ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu jona metala trebalo da ukažu koji od navedenih faktora utiče na promenu u rastvorljivosti u prisustvu jona metala. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina i karakterizacija čvrstih faza prikupljenih u toku *in vitro* ispitivanja u prisustvu jona metala koji su opisani u okviru ovog poglavlja imaju ulogu u identifikaciji potencijalnih uzroka i mehanizama *in vivo* uočenih interakcija.

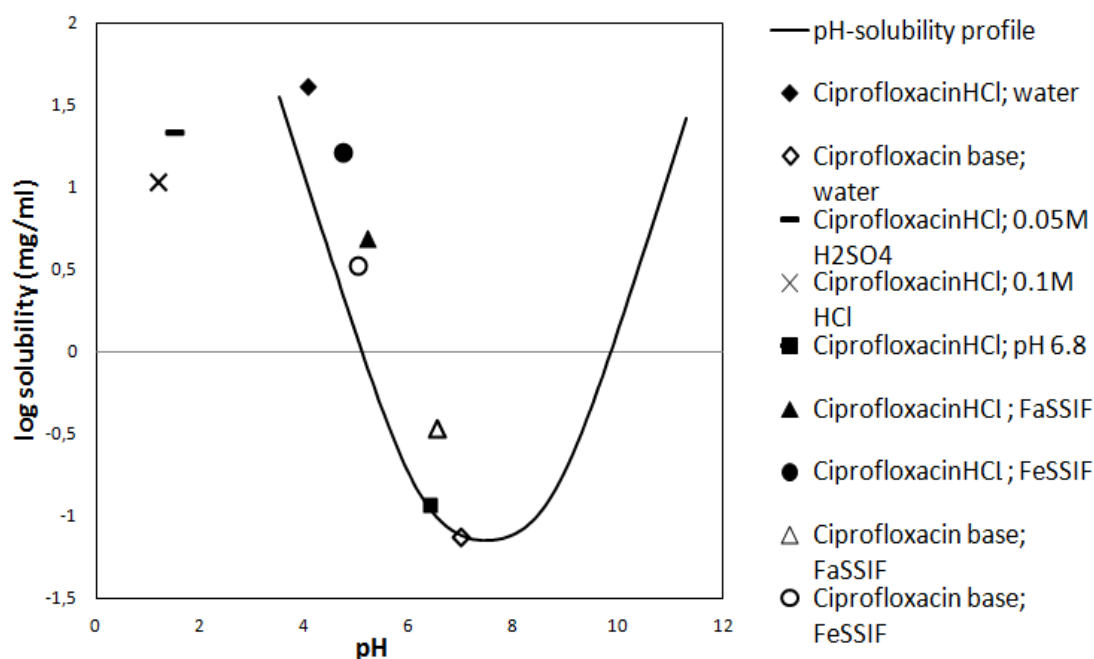
### 6.2.1 Ispitivanje rastvorljivosti ciprofloksacina i ciprofloksacin-hidrohlorida

Rastvorljivost ciprofloksacina i ciprofloksacin-hidrohlorida je određena u vodi, 0.1 M HCl, 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, fosfatnom puferu pH 6.8 i fiziološki zasnovanim medijumima za ispitivanje brzine rastvaranja (FaSSIF i FeSSIF). Eksperimentalno dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 6. Na slici 9 dat je prikaz pH zavisnog profila rastvorljivosti ciprofloksacina sa eksperimentalno određenim vrednostima za rastvorljivost ciprofloksacina i ciprofloksacin-hidrohlorida u različitim medijumima.

**Tabela 6.** Rastvorljivost ciprofloksacina i ciprofloksacin-hidrohlorida u različitim medijumima

**Table 6.** Solubility of ciprofloxacin and ciprofloxacin-hydrochloride in various media

Media	ciprofloxacin			ciprofloxacinHCl		
	mM	mg/ml	pH	mM	mg/ml	pH
water	0.29	0.099	7.0	109.0	42.00	4.04
0.1 M HCl	-	-	-	33.0	12.68	1.20
0.05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	55.0	21.20	1.52
phosphate buffer pH 6.8	0.30	0.117	6.8	0.3	0.12	6.79
FaSSIF	1.00	0.34	6.5	13.0	4.94	5.20
FeSSIF	9.97	3.30	5.0	43.0	16.40	4.70



**Slika 9.** Rastvorljivost ciprofloksacina

**Fig. 9.** Ciprofloxacin solubility

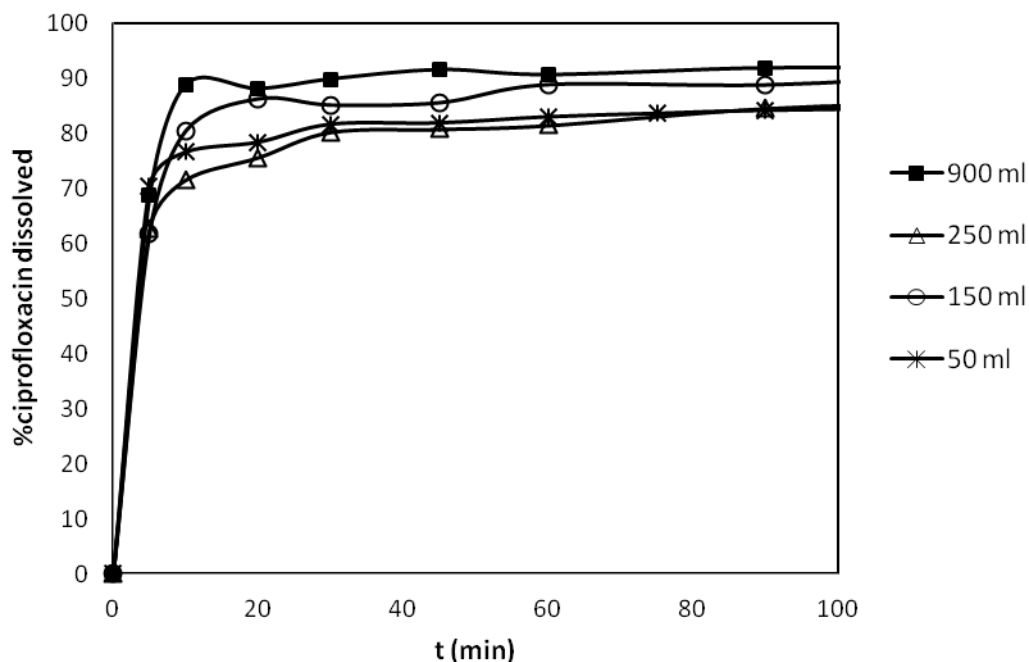
Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi je 42 mg/ml, u fosfatnom puferu pH 6.8 je 0.117 mg/ml, a rastvorljivost ciprofloksacin baze u vodi je 0.099 mg/ml. Uočava se da je rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu pH 6.8 i ciprofloksacina u vodi slična, pa se može očekivati da na pH 6.8, dolazi do taloženja i izdvajanja ciprofloksacin baze. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u 0.1 M HCl je niža u odnosu na rastvorljivost u vodi, što može biti uslovljeno prisustvom hloridnog jona koji

suzbija disocijaciju ciprofloksacin-hidrohlorida i smanjuje njegovu rastvorljivost (efekat zajedničkog jona). Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u 0.05 M sumpornoj kiselini je 21.2 mg/ml, a smanjenje rastvorljivosti može ukazati na eventualno građenje slabije rastvorljive soli ciprofloksacin-sulfata. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u FaSSIF-u je 4.94 mg/ml, dok je rastvorljivost ciprofloksacina u istom medijumu 0.34 mg/ml. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida je dosta veća od rastvorljivosti u puferu pH 6.8 verovatno usled prisustva solubilizatora (žučnih soli) u FaSSIF medijumu. Sa druge strane, rastvorljivost u FeSSIF-u (16.4 mg/ml) je skoro tri puta manja od rastvorljivosti u vodi. Rastvorljivost ciprofloksacina u FeSSIF-u je 3.3 mg/ml što je oko trideset puta više od njegove rastvorljivosti u vodi. Iako je rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u FaSSIF-u i FeSSIF-u znatno niža od one određene u vodi, viša je u odnosu na teorijski izračunatu vrednost za datu pH. Odnos između eksperimentalno dobijene i teorijske vrednosti za rastvorljivost na pH vrednostima medijuma je 6.4 za FaSSIF i 7.2 za FeSSIF. Uzrok nešto niže rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u FeSSIF-u u odnosu na vodu pored razlike u pH vrednosti može biti i prisustvo zajedničkog, hloridnog jona u medijumu. Uzimajući u obzir da ciprofloksacin ima dve pKa vrednosti, može se pretpostaviti da se u FaSSIF-u (pH 6.8) ciprofloksacin nalazi u obliku cviter-jona, dok je u FeSSIF-u (pH 5.0) u obliku katjona. U studiji Ottaviani i sar. (164) uočeno je da je rastvorljivost većine supstanci veća u FaSSIF-u u odnosu na pufer pH 6.8. Razlog tome je bolja solubilizacija pozitivno naelektrisanih supstanci, usled postojanja elektrostatičkih interakcija. Ako se uporedi odnos eksperimentalno dobijene i teorijski izračunate rastvorljivosti za supstance koje su analizirane u radu Ottaviani i sar. (164), može se uočiti da su eksperimentalno dobijene vrednosti do tri puta veće od teorijskih, što navodi na zaključak da rastvorljivost u FaSSIF-u zavisi od liposolubilnosti supstance, jer se u FaSSIF-u povećava rastvorljivost slabo rastvorljivih supstanci.

### **6.2.2 Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta**

Brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta je određena u aparaturi sa standardnom lopaticom i zapreminom od 900 ml vode kao medijuma i aparaturi sa mini lopaticom i zapreminama vode 250, 150 i 50 ml, pri brzini okretanja lopatice od 50

o/min (slika 10). Na slici 11 prikazani su profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u aparaturi sa mini lopaticom, u 50 ml vode, 0.1 M HCl, USP fosfatnom puferu pH 6.8, acetatnom puferu pH 4.5, FaSSIF i FeSSIF-u.

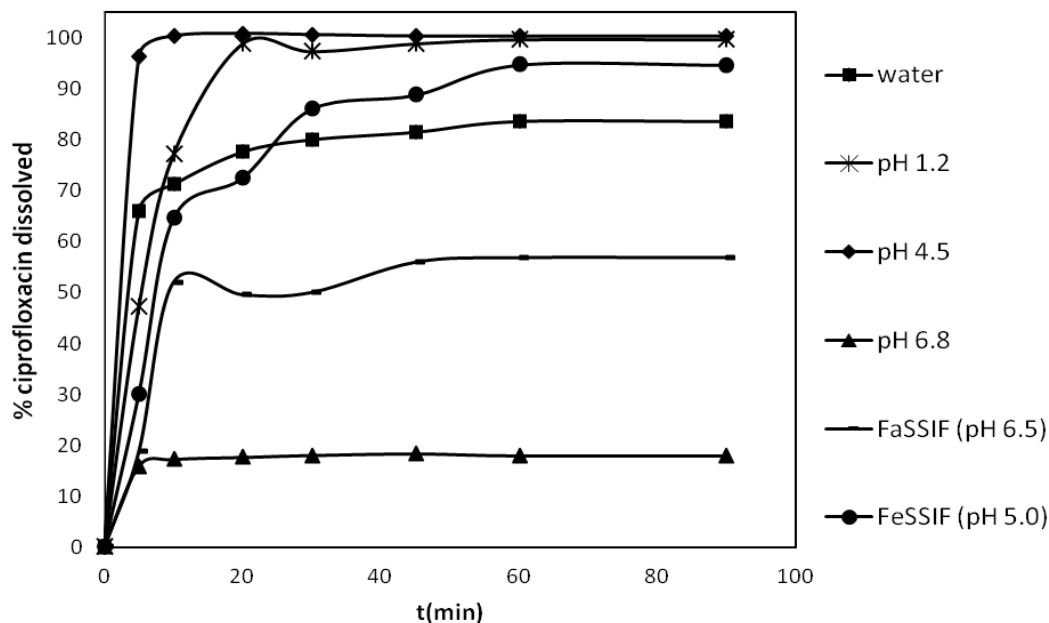


**Slika 10.** Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u vodi u aparaturi sa standardnom (900 ml) i mini lopaticom (250, 150 i 50 ml)

**Fig. 10.** Ciprofloxacin tablet dissolution in water as dissolution media in standard paddle (900 ml) and mini paddle apparatuses (250, 150, 50 ml)

Na osnovu rezultata ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta u aparaturi sa standardnom i aparaturi sa mini lopaticom, pri različitim zapreminama vode kao medijuma, može se uočiti da su profili brzine rastvaranja slični i da promena hidrodinamike i zapremine medijuma ne utiče značajno na oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta. Takano i sar. (165) preporučuju korišćenje aparature sa mini lopaticom u biofarmaceutskoj karakterizaciji preparata, pa je, brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta ispitana u aparaturi sa mini lopaticom u 50 ml medijuma različitih pH vrednosti. Ciprofloksacin-hidrohlrid se brzo oslobađa iz tableta u vodi i kiselim medijumima, dok je oslobađanje u fosfatnom puferu pH 6.8 nepotpuno, usled ograničene rastvorljivosti na toj pH vrednosti (slika 11).





*Slika 11. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u 50 ml različitih medijuma*

*Fig. 11. Ciprofloxacin tablet dissolution in 50 ml of various media (water, pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, FaSSIF, FeSSIF)*

Brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u FeSSIF-u dostiže plato u prvih 10 minuta. U FaSSIF-u je nakon 90 minuta oslobođeno 57 % (pH 5.3) ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta. Početna pH vrednost FaSSIF-a je 6.5, pa se može pretpostaviti da je brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u ovom medijumu ograničena njegovom rastvorljivošću pri  $\text{pH} > 6$ . Kada se uporede profili brzine rastvaranja ciprofloksacina u puferu pH 6.8 i FaSSIF-u, može se uočiti da prisustvo solubilizatora u FaSSIF-u utiče na brzinu rastvaranja ciprofloksacina u ovom medijumu. U FeSSIF-u se nakon 90 minuta oslobodilo 94.7 % ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta, a pH vrednost medijuma se nije značajno promenila. Može se uočiti da se ciprofloksacin-hidrohlorid sporije oslobađa iz tableta u FeSSIF-u u odnosu na vodu, mada je više od 85 % supstance oslobođeno za 30 minuta.

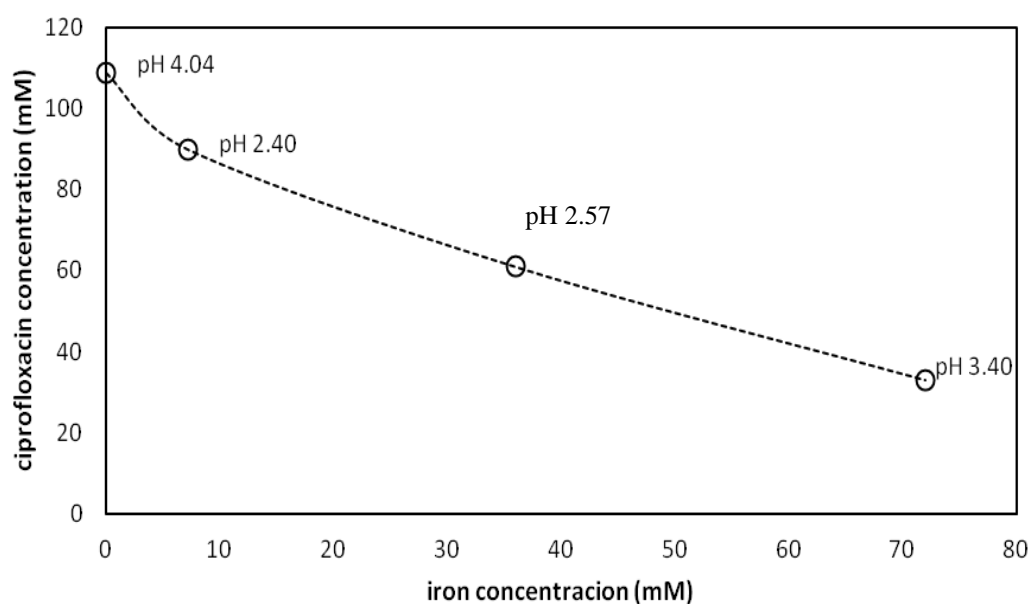
### 6.2.3 Interakcija ciprofloksacina i jona gvožđa

U *in vivo* studijama, interakcija između ciprofloksacina i gvožđa je uočena nakon istovremene primene preparata koji sadrže različite soli gvožđa (sulfat, fumarat, glukonat) (14, 15, 133). U *in vitro* ispitivanjima interakcije ciprofloksacina sa gvožđem često se koriste soli gvožđa(III) koje daju stabilnije komplekse, ali biofarmaceutski značaj tih ispitivanja se dovodi u pitanje jer se gvožđe u preparatima za oralnu primenu, za koje je u *in vivo* studijama uočen uticaj na biološku raspoloživost ciprofloksacina, nalazi u obliku gvožđa(II) i u tom obliku se i apsorbuje iz GIT-a. *In vitro* ispitivanje interakcije ciprofloksacina i jona gvožđa koje je opisano u ovom poglavlju, obuhvata ispitivanje rastvorljivosti, brzine rastvaranja, građenje kompleksa ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu soli gvožđa(II) (gvožđe(II)-sulfata, gvožđe(II)-glukonata i gvožđe(II)-fumarata).

#### 6.2.3.1 Interakcija između ciprofloksacina i gvožđe(II)-sulfata

##### Ispitivanje rastvorljivosti

Ispitivanje rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida je izvršeno u vodi uz dodatak rastućih koncentracija soli gvožđe(II)-sulfata (7.2, 36 i 72 mM soli). Dodatak soli gvožđa u medijum sa ciprofloksacinom dovodi do pojave žute boje koja ostaje prisutna u toku ispitivanja. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida se smanjuje u prisustvu gvožđe(II)-sulfata (Tabela 7). Eksperimentalno određena rastvorljivost ciprofloksacin baze u prisustvu gvožđe(II)-sulfata je 4.7 mg/ml (14.3 mM; pH 4.99). Rezultati ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacin baze u prisustvu gvožđe(II)-sulfata ukazuju na povećanje rastvorljivosti ciprofloksacina u prisustvu soli gvožđa, što je u skladu sa rezultatima koje su objavili Žakelj i sar. (149) i Eboka i sar. (150). Dobijeni rezultati takođe ukazuju da promena u rastvorljivosti nije samo posledica promene pH vrednosti. Na slici 12 dat je grafički prikaz koncentracije ciprofloksacina (sa odgovarajućim pH vrednostima) u medijumu u zavisnosti od količine dodate soli gvožđe(II)-sulfata, heptahidrata.



*Slika 12. Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida rastvorenog u medijumu koji sadrži različite koncentracije gvožđe(II)-sulfata*

*Fig. 12. Concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in media containing different concentrations of ferrous sulfate*

*Tabela 7. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu različitih količina gvožđe(II)-sulfata*

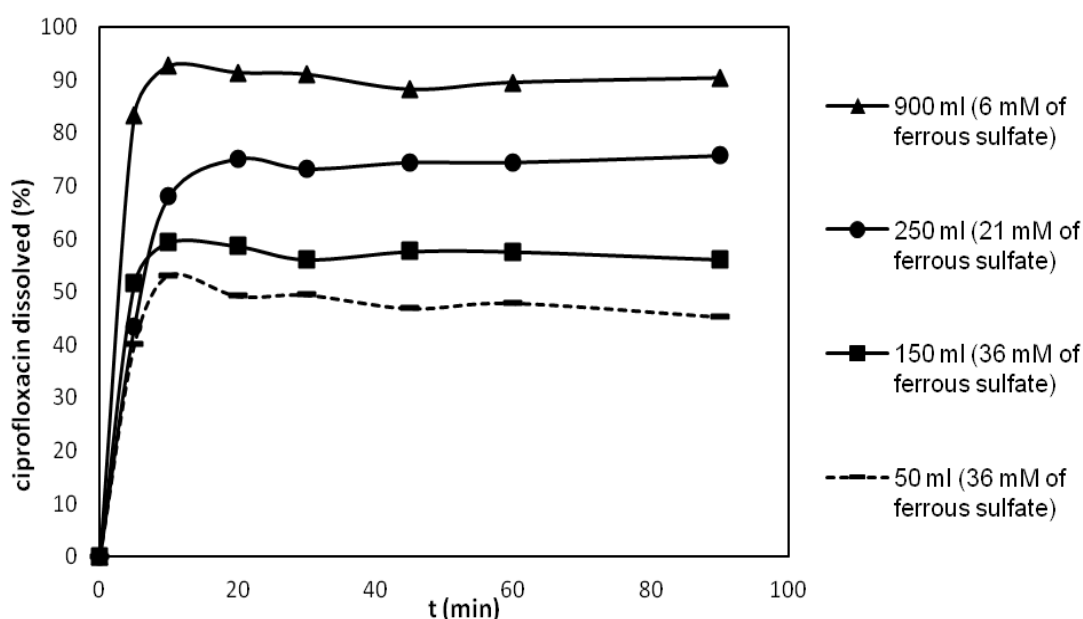
*Table 7. Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water with different amounts of ferrous sulfate added*

Amount of ferrous sulfate added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109	42	4.04
7.2	90	35	2.40
36	61	24	2.57
72	33	12	3.40

### Ispitivanje brzine rastvaranja

Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta je rađeno u vodi kao medijumu u aparaturi sa standardnom lopaticom (900 ml) i u aparaturi sa mini lopaticom i zapreminama medijuma 250, 150 i 50 ml. Uzimajući u obzir činjenicu da je

za interakciju neophodno obezbediti visoke koncentracije i ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata, ispitivanje brzine rastvaranja je rađeno sa tri tablete ciprofloksacin-hidrohlorida i tri doze gvožđe(II)-sulfata (terapijska doza gvožđa je 100 mg) u 900, 250 i 150 ml medijuma. Molarni odnos ciprofloksacin/gvožđe u različitim zapreminama medijuma je uvek bio 1.2, dok su koncentracije ciprofloksacina i gvožđa u 900 ml bile 5 i 6 mM, u 250 ml 18 i 21 mM, u 150 ml 30 i 36 mM. Na slici 13 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata u različitim zapreminama medijuma.

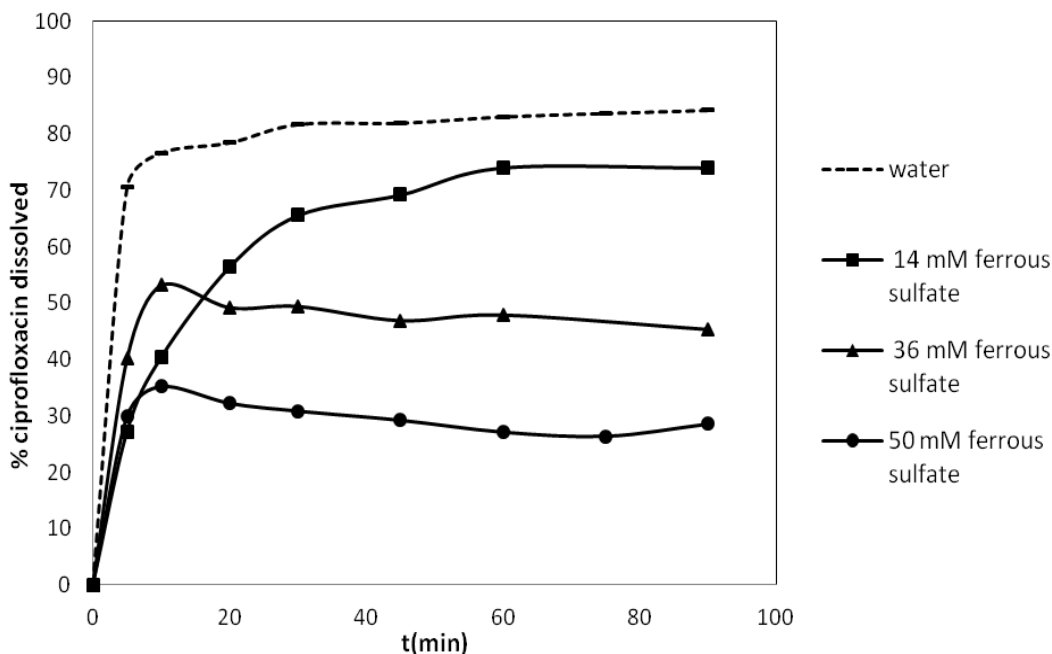


**Slika 13.** Profili brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta u prisustvu 6, 21 i 36 mM (1489 mg u 900, 250 i 150 ml/496 mg u 50 ml) gvožđe(II)-sulfata u različitim zapreminama medijuma

**Fig. 13.** Ciprofloxacin tablet dissolution in different volumes of dissolution media in the presence of 6, 21 and 36 mM (1489 mg in 900, 250 and 150 ml/496 mg in 50 ml) of ferrous sulfate

U standardnoj aparaturi sa lopaticom u 900 ml vode kao medijuma, celokupna količina ciprofloksacin-hidrohlorida se oslobodila u prisustvu soli gvožđa i interakcija nije uočena (slika 13). Sa druge strane, oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu gvožđa u aparaturi sa mini lopaticom je usporeno i nepotpuno, a interakcija se može uočiti u manjim zapreminama medijuma. Ispitivanje brzine rastvaranja je rađeno i u

zapremini medijuma od 50 ml, koristeći jednu tabletu ciprofloksacina i jednu dozu gvožđa (496 mg gvožđe(II)-sulfata, heptahidrata; 100 mg gvožđa). Oslobođanje ciprofloksacina je bilo smanjeno na 43.5 % u zapremini od 50 ml (slika 13). Dobijeni rezultati ukazuju da ispitivanje brzine rastvaranja u malim zapreminama medijuma može biti korisno za simulaciju fizičko-hemijskih interakcija koje se događaju u GIT-u. Ovi rezultati se slažu sa podacima iznetim u studiji Takano i sar. (165) koji naglašavaju značaj korišćenja aparatura sa mini lopaticom u biofarmaceutskoj karakterizaciji preparata. Takođe, ovakvi rezultati su u skladu sa najnovijim podacima koji ukazuju da zahtev za uspostavljanjem *sink* uslova prilikom ispitivanja brzine rastvaranja nije u potpunosti opravdan i ne odslikava *in vivo* situaciju (47). Na slici 14 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tablete od 500 mg u prisustvu različitih količina gvožđe(II)-sulfata u 50 ml vode u aparaturi sa mini lopaticom. Može se uočiti da se koncentracija rastvorenog ciprofloksacina smanjuje sa povećanjem koncentracije gvožđe(II)-sulfata u medijumu.

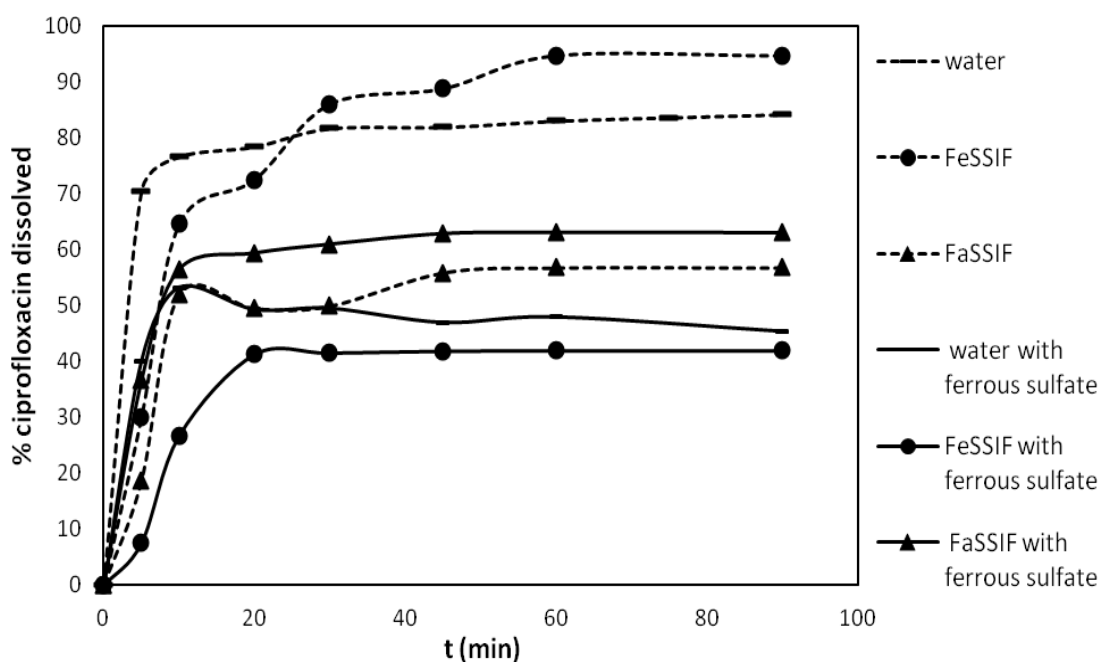


**Slika 14.** Profili brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta bez/u prisustvu 14, 36 and 50 mM gvožđe(II)-sulfata u 50 ml vode

**Fig. 14.** Ciprofloxacin tablet dissolution in 50 ml water as dissolution media without and with addition of 14, 36 and 50 mM of ferrous sulfate

Količina gvožđe(II)-sulfata od 496 mg (100 mg gvožđa) odgovara dozi koja je korišćena u *in vivo* studiji (14) ispitivanja interakcije ciprofloksacina i gvožđa i dozi gvožđe(II)-sulfata koja se nalazi u tabletama za oralnu primenu. Koncentracija gvožđe(II)-sulfata u 50 ml medijuma koji sadrži 100 mg gvožđa iznosi 36 mM. Ova doza gvožđe(II)-sulfata je korišćena i prilikom ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu jona gvožđa u fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju uslove u GIT-u na gladno (FaSSIF) i u stanju sitosti (FeSSIF).

Na slici 15 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu 100 mg (36 mM) gvožđa u obliku gvožđe(II)-sulfata u 50 ml vode i fiziološki zasnovanim medijumima (FaSSIF i FeSSIF).

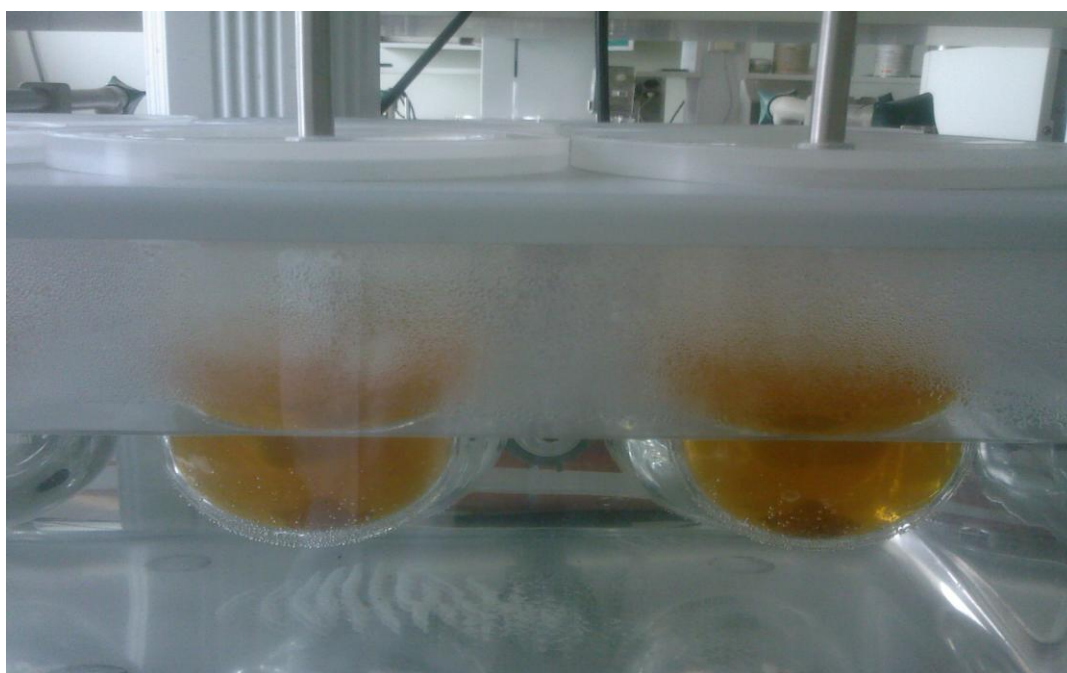


**Slika 15.** Profili brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta sa/bez prisustva gvožđe(II)-sulfata u vodi, FaSSIF i FeSSIF

**Fig. 15.** Ciprofloxacin tablet dissolution in water, FaSSIF and FeSSIF without/with ferrous sulfate added

Nakon 90 minuta, u prisustvu gvožđe(II)-sulfata u vodi je oslobođeno 43.5 % ciprofloksacin-hidrohlorida, 42 % u FeSSIF-u, dok je u FaSSIF-u oslobođeno 63 % (slika 15). Izmerena pH vrednost FaSSIF medijuma na kraju ispitivanja je bila 4.5, dok

je pH vrednost u FeSSIF medijumu ostala nepromenjena (pH 5.0). Uticaj prisustva ciprofloksacina i jona gvožđa u medijumu na pH vrednost FaSSIF-a može se objasniti činjenicom da ovaj medijum poseduje mali puferski kapacitet i da dodatak supstanci koje reaguju kiselo snižava pH vrednost medijuma. Eksperimentalno određena rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u FeSSIF-u je 16.4 mg/ml, a u FaSSIF-u je 4.9 mg/ml. Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu nakon ispitivanja brzine rastvaranja u FaSSIF-u u prisustvu gvožđe(II)-sulfata je bila 6.3 mg/ml, a u FeSSIF-u 4.2 mg/ml. Oslobođanje ciprofloksacin-hidrohlorida bez, kao i u prisustvu gvožđe(II)-sulfata je slično u FaSSIF-u. U FeSSIF-u se može uočiti jasan uticaj gvožđe(II)-sulfata na koncentraciju ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu. Brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu gvožđe(II)-sulfata u FeSSIF-u je u početku sporija u odnosu na vodu, pri čemu se plato dostiže nakon 20 minuta.



*Slika 16. Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu gvožđe(II)-sulfata - izgled uzorka*

*Fig. 16. Ciprofloxacin hydrochloride dissolution in water in the presence of ferrous sulfate – samples appearance*

Na slici 16 prikazan je izgled uzoraka prilikom ispitivanja brzine rastvaranja

ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu gvožđe(II)-sulfata. Pojava žute boje koja ostaje prisutna u toku ispitivanja i precipitata ukazuju na eventualni nastanak nove jonske vrste u interakciji sa gvožđe(II)-sulfatom.

### **Gradenje kompleksa**

Da bi se ispitao uticaj jona gvožđa na rastvorljivost i brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida, interakcija između ciprofloksacin-hidrohlorida i soli gvožđa je praćena u *in vitro* uslovima mešanjem rastvora ispitivanih komponenata u različitim molarnim odnosima. Pripremljen je 0.05 M rastvor ciprofloksacin-hidrohlorida i 0.1 M rastvor gvožđe(II)-sulfata i ta dva rastvora su mešana u odnosima 9:1; 7:3; 1:1; 3:7 i 1:9. U svim uzorcima prilikom mešanja rastvora došlo je do pojave žute boje. U uzorku koji je mešan u odnosu 1:1 i u kome se nalazilo 25 mM ciprofloksacin-hidrohlorida i 50 mM gvožđe(II)-sulfata uočena je precipitacija, a čvrsta faza je izolovana i ispitana analitičkim metodama karakterizacije (XRD, DSC, TGA, FTIR). Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru iznad taloga je bila 2.2 mg/ml (pH 2.8).

Sanchez i sar. (84) su interakciju između ciprofloksacina i gvožđe(II) jona (u obliku soli gvožđe(II)-nitrata) takođe ispitivali u vodenom medijumu i zatim su vršili karakterizaciju dobijenih precipitata. Na osnovu dobijenih rezultata, odbacili su tvrdnju da se između ciprofloksacina i jona gvožđa gradi kompleks. Razlog za dobijanje ovakvih rezultata Sancheza i sar. se može objasniti činjenicom da su autori koristili veoma niske koncentracije i ciprofloksacina i soli gvožđa i da u tako razblaženom rastvoru nije moglo da dođe do interakcije. Ovakva situacija ne odgovara situaciji u *in vivo* uslovima gde su i ciprofloksacin i joni metala prisutni u mnogo većim koncentracijama.

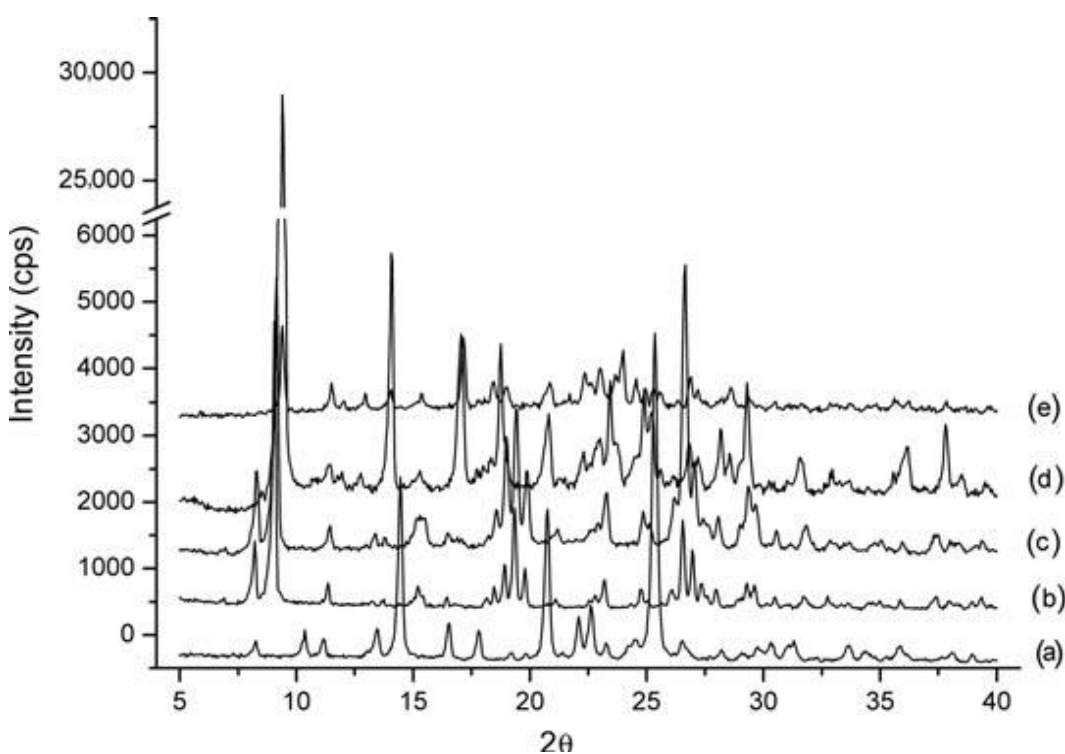
Eksperimentalno određena rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi je oko 20 puta veća od rastvorljivosti proizvoda nastalog u interakciji sa gvožđe(II)-sulfatom, pa se može postaviti pitanje da li u, *in vivo* uslovima, ograničena zapremina tečnosti u intestinumu, na mestu apsorpcije može biti ograničavajući faktor za rastvaranje. Koncentracija ciprofloksacina koja se može očekivati *in vivo* je oko 150 mM, ako se uzme u obzir da je zapremina tečnosti u intestinumu 10-350 ml (166-168). Kada ciprofloksacin dođe u deo intestinuma sa većom pH vrednošću dolazi do njegove precipitacije i ograničena je apsorpcija. Može se pretpostaviti da, prilikom istovremene



primene ciprofloksacina i preparata koji sadrži jon gvožđa, dolazi do građenja slabo rastvorljivog kompleksa koji ograničava proces apsorpcije.

### Karakterizacija čvrste faze

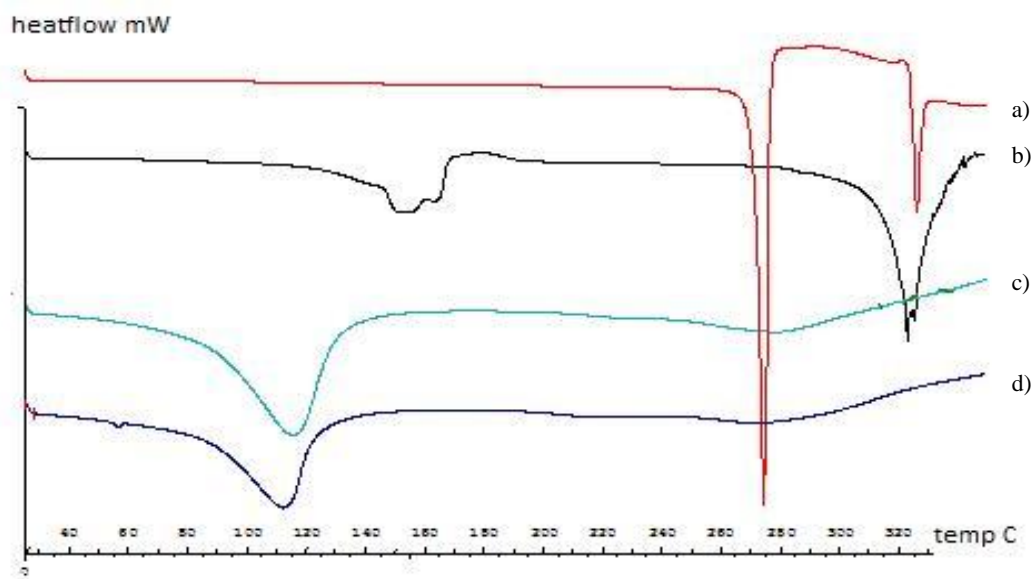
Rezultati karakterizacije čvrste faze prikupljene nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata, kao i čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlordid tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata su prikazani na slikama 17-19.



*Slika 17. XRD spektri: a) ciprofloksacin baza, b) ciprofloksacin-hidrohlordid, c) sprašena ciprofloksacin tableta, d) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata, e) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata*

**Fig. 17.** XRD scans of ciprofloxacin base (a), ciprofloxacin HCl monohydrate (b), powdered ciprofloxacin tablets (c), solid phase from the mixture of ciprofloxacin HCl/ferrous sulfate solution (d), and solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing ferrous sulfate (e)

Rezultati dobijeni metodom difrakcije X-zraka su pokazali da izolovane čvrste faze pokazuju jak pik na  $9.40 \text{ } 2\theta$  i imaju različit difraktogram od ciprofloksacina i ciprofloksacin-hidrohlorida. Ispitivani uzorci su imali kristalnu strukturu, pri čemu je intenzitet pika bio jači u uzorku nastalom mešanjem rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata. Smanjeni intenzitet pika u uzorku dobijenom nakon ispitivanja brzine rastvaranja iz tablete je verovatno uslovljen prisustvom ekscipijenasa (slika 17).



*Slika 18. DSC spektri: a) ciprofloksacin baza, b) ciprofloksacin-hidrohlorid c) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata, d) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata*

*Fig. 18. DSC scans of ciprofloxacin base (a), ciprofloxacin hydrochloride (b), solid phase collected from the mixture of ciprofloxacin hydrochloride/ferrous sulfate solution (c) and solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing ferrous sulfate (d)*

TGA analiza izolovanih čvrstih faza je pokazala gubitak od 19.5 % mase kod čvrste faze nastale mešanjem rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata i gubitak od 16.6 % mase kod čvrste faze nastale nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu gvožđe(II)-sulfata. Gubitak u masi je nastao usled evaporacije adsorbovane i kristalne vode prisutne u analiziranim uzorcima.

Gubitak mase ciprofloksacin-hidrohlorida je bio 6.9 %. Jak endotermni pik u DSC analizi prilikom analize čvrste faze izolovane nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata je uočen na 115°C. Kod čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata jak pik je bio na temperaturi od 110°C i rezultati ukazuju na pojavu termalne dekompozicije. Endotermni pikovi ciprofloksacin-hidrohlorida i ciprofloksacin baze su na 320°C, odnosno 270°C, a na tim temperaturama nema pojave pikova u termogramima čvrstih faza (slika 18).

Literaturni izvori navode da su u kompleksima ciprofloksacina sa jonima metala molekuli vode vezani za metalne jone i da do oslabljanja vode dolazi na temperaturama 150-170°C (80, 92). Prilikom DSC analize kompleksi pokazuju termalnu dekompoziciju koja se odvija u dva koraka, prvo dolazi do dehidracije koja se odvija na nižim temperaturama (do 200°C), a zatim dolazi do pirolitičke dekompozicije anhidrovanog kompleksa do metala ili oksida metala (na temperaturama 200-300°C) (80).

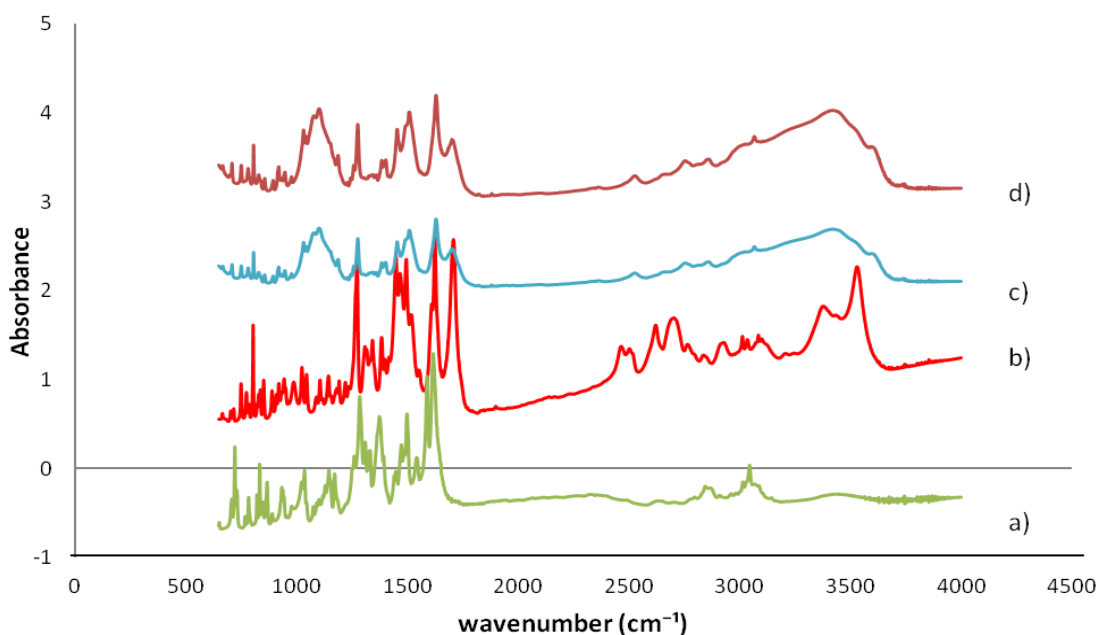
Rezultati dobijeni DSC analizom izolovanih čvrstih faza nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata i nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata takođe pokazuju termalnu dekompoziciju koja se odvija u dva koraka, što ukazuje na to da je u analiziranim čvrstim fazama prisutan kompleks ciprofloksacina i jona gvožđa.

Analizirane čvrste faze izolovane nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata ili nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata imaju skoro identične FTIR spektre (slika 19). Na spektru se mogu uočiti trake koje potiču od OH grupe (na 3416  $\text{cm}^{-1}$ ) i dve trake sa oštrim pikovima na 1701 i 1630  $\text{cm}^{-1}$  koje potiču od karboksilne i ketonske grupe. Takođe, u spektru se može uočiti traka koja potiče od vibracije sulfatne grupe na 1103  $\text{cm}^{-1}$ .

U FTIR spektrima kompleksa ciprofloksacina i jona metala koji su opisani u literaturi, ne mogu se uočiti trake koje potiču od vibracija karboksilne grupe na oko 1700  $\text{cm}^{-1}$ , već se uočavaju dve trake koje karakterišu karboksilnu grupu na 1650-1510  $\text{cm}^{-1}$  i na 1400-1280  $\text{cm}^{-1}$ . Traka koja karakteriše keto grupu iz piperazinskog prstena se nalazi na oko 1600  $\text{cm}^{-1}$  (78, 80-83, 85).

S obzirom da se pik koji karakteriše karboksilnu grupu uočava na FTIR spektru

dobijenom analizom izolovanih čvrstih faza, do kompleksiranja verovatno dolazi preko protonovanog piperazinskog prstena (trake između 2600 i 2400  $\text{cm}^{-1}$ ) što je kontradiktorno tvrdnji nekih autora (82) da u građenju kompleksa učestvuje karboksilna grupa.



**Slika 19.** FTIR spektri: a) ciprofloksacin baza, b) ciprofloksacin-hidrohlorid, c) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin tableta u prisustvu gvožđe(II)-sulfata d) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata

**Fig. 19.** FTIR scans of a) ciprofloxacin base, b) ciprofloxacin hydrochloride, c) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing ferrous sulfate d) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate

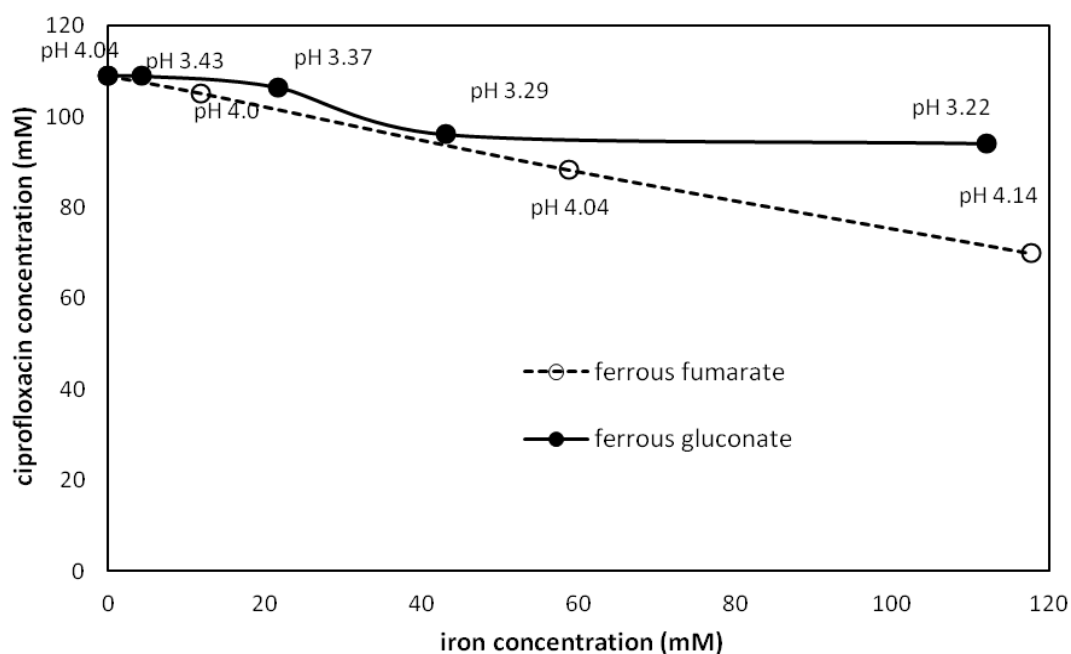
Kvantitativni sastav ispitivanih čvrstih faza izolovanih nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata i nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu gvožđe(II)-sulfata je sličan. Određeni sadržaj ciprofloksacina je oko 60 %, gvožđa oko 5 %, oko 19 % vode, 15 % sulfata i oko 5 % hlorida. Na osnovu ovih rezultata predložena struktura ciprofloksacin-gvožđe kompleksa je  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times (\text{H}_2\text{O})_{12}$ .

### 6.2.3.2 Interakcija između ciprofloksacina i gvožđe(II)-glukonata/gvožđe(II)-fumarata

U terapiji se, pored gvožđe(II)-sulfata, koriste i organske soli glukonat i fumarat. *In vivo* ispitivanja ukazuju da je i u prisustvu ovih soli biološka raspoloživost ciprofloksacina smanjena (15, 133).

#### Ispitivanje rastvorljivosti

Na slici 20 i u tabelama 8 i 9 dati su prikazi rezultata ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu različitih koncentracija gvožđe(II)-glukonata i gvožđe(II)-fumarata. Sva ispitivanja su vršena u vodi kao medijumu. Kao i prilikom ispitivanja interakcije između ciprofloksacina i gvožđe(II)-sulfata, prilikom ispitivanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja u prisustvu gvožđe(II)-glukonata i gvožđe(II)-fumarata došlo je do stvaranja žute boje (glukonat) ili narandžasto-žute boje (fumarat).



*Slika 20. Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida rastvorenog u medijumu koji sadrži različite količine gvožđe(II)-fumarata ili gvožđe(II)-glukonata*

**Fig. 20.** *Concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in media containing different amounts of ferrous fumarate and ferrous gluconate*

**Tabela 8.** Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu različitih količina gvožđe(II)-fumarata

**Table 8.** Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of ferrous fumarate

Amount of ferrous fumarate added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42	4.04
11.8	105.2	40	4.00
58.8	88.3	34	4.04
118	69.9	27	4.14

**Tabela 9.** Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu različitih količina gvožđe(II)-glukonata

**Table 9.** Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of ferrous gluconate

Amount of ferrous gluconate added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42	4.04
4.3	109.0	42	3.43
21.6	106.5	41	3.37
43.1	96.1	37	3.29
112	94.1	36	3.22

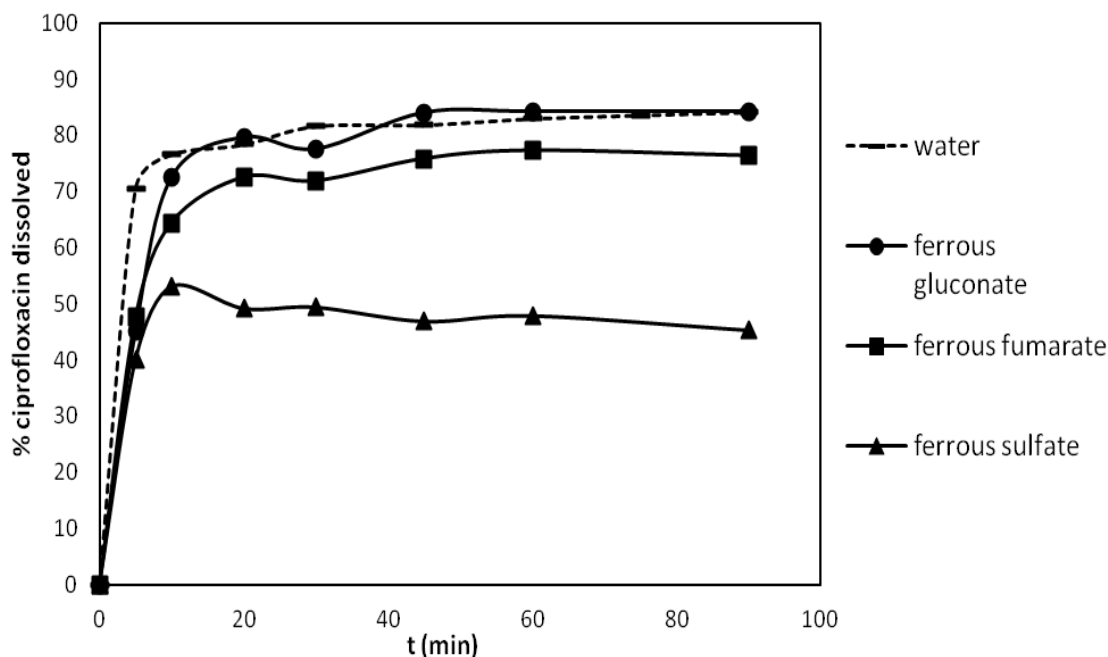
Može se uočiti da se rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida smanjuje sa povećanjem koncentracije gvožđe(II)-fumarata u medijumu, pri čemu nije zabeležena promena u pH vrednosti medijuma. Sa druge strane, u prisustvu gvožđe(II)-glukonata nije značajno smanjena količina rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida.

U slučaju soli glukonata, pokušano je i građenje kompleksa mešanjem rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-glukonata u različitim molarnim odnosima, ali ni u jednom uzorku nije uočena pojava precipitata.

### Ispitivanje brzine rastvaranja

S obzirom da se interakcija između ciprofloksacina i jona gvožđa može uočiti u malim zapreminama medijuma, ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu gvožđe(II)-glukonata ili gvožđe(II)-fumarata su rađena u aparaturi sa

mini lopaticom i 50 ml vode kao medijuma. Korišćeni su isti uslovi i ista količina gvožđa (u obliku soli glukonata/fumarata) kao i prilikom ispitivanja interakcije sa gvožđe(II)-sulfatom. Na slici 21 dat je uporedni prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi uz dodatak 100 mg gvožđa u obliku soli: gvožđe(II)-sulfata (496 mg), gvožđe(II)-fumarata (303 mg) ili gvožđe(II)-glukonata (829 mg).



*Slika 21. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/u prisustvu gvožđe(II) glukonata, gvožđe(II)-fumarata i gvožđe(II)-sulfata u 50 ml medijuma*

*Fig. 21. Ciprofloxacin tablet dissolution without/with ferrous gluconate, ferrous fumarate, ferrous sulfate addition in 50 ml of water as dissolution media*

Na oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta najviše utiče dodatak gvožđe(II)-sulfata. Oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu soli fumarata je smanjeno za 10 %, dok su neznatne razlike u oslobađanju ciprofloksacina uočene kada je u medijumu prisutna so glukonat. Nakon dodavanja gvožđe(II)-fumarata u medijum, ova so gvožđa je ostala suspendovana u vodi, dok se gvožđe(II)-glukonat u potpunosti rastvara po dodavanju u vodu. pH vrednost medijuma sa gvožđe(II)-fumaratom nakon ispitivanja je bila 4.14, dok je pH vrednosti medijuma sa gvožđe(II)-glukonom bila 3.24. Gvožđe(II)-fumarat se slabo rastvara u vodi, pa je to verovatno jedan od razloga

za slabije izraženu interakciju ciprofloksacina sa ovom soli gvožđa. *In vivo* podaci ukazuju da je biološka raspoloživost ciprofloksacina smanjena za 70 % u prisustvu gvožđe(II)-fumarata. Može se pretpostaviti da je oslobađanje jona gvožđa iz soli izraženije u kiseloj sredini želuca i da se interakcija teže uočava *in vitro* usled ograničene rastvorljivosti soli gvožđa u vodi.

U *in vivo* uslovima je zabeleženo smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina za 46 % nakon istovremene primene sa gvožđe(II)-sulfatom i za 67 % nakon istovremene primene ciprofloksacina sa gvožđe(II)-glukonatom. Ipak, u *in vitro* uslovima nisu primećene promene u oslobađanju ciprofloksacina u prisustvu gvožđe(II)-glukonata. Pojava žute boje u medijumu, u ovom slučaju verovatno ne ukazuje na interakciju, već potiče od rastvaranja gvožđe(II)-glukonata. Ciprofloksacin gradi soli sa organskim kiselinama koje imaju veću rastvorljivost od soli ciprofloksacina sa neorganskim kiselinama (169). Uočena pojava bi mogla da se objasni činjenicom, da prisustvo glukonata u medijumu može da pomeri ravnotežu reakcije ka stvaranju rastvorljivih proizvoda, sprečavajući pritom nastanak kompleksa. Nastanak soli ciprofloksacin-glukonata koja ima veću rastvorljivost od ciprofloksacin-hidrohlorida bi mogao biti razlog zašto se interakcija između ciprofloksacina i jona gvožđa ne može uočiti *in vitro*.

#### **6.2.4 Interakcija između ciprofloksacina i jedinjenja aluminijuma**

U *in vivo* studijama, interakcija između ciprofloksacina i jedinjenja aluminijuma uočena je nakon istovremene primene sa aluminijum-hidroksidom, pri čemu je zabeleženo značajno smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina (136). Sa druge strane, rezultati *in vitro* ispitivanja se poprilično razlikuju. Rastvorljivost ciprofloksacina je povećana u prisustvu aluminijum-hlorida, pri čemu dolazi do građenja rastvorljivih kompleksa (98, 153, 154), dok je prilikom ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu aluminijum-hidroksida uočeno usporeno i nepotpuno oslobađanje ciprofloksacina iz tableta (97, 156, 157).

U cilju identifikacije potencijalnog mehanizma interakcije ciprofloksacina i jedinjenja aluminijuma, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje rastvorljivosti, brzine rastvaranja i karakterizacija čvrstih faza prikupljenih u toku *in vitro* ispitivanja u prisustvu jedinjenja aluminijuma.



### Ispitivanje rastvorljivosti

Ispitivanje rastvorljivosti je rađeno u vodi kao medijumu, a korišćena su dva jedinjenja aluminijuma, aluminijum-hlorid, heksahidrat i aluminijum-hidroksid. U tabelama 10 i 11, kao i na slici 22 dat je prikaz rezultata ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu različitih količina aluminijum-hidroksida i aluminijum-hlorida, heksahidrata.

*Tabela 10. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu različitih količina aluminijum-hidroksida*

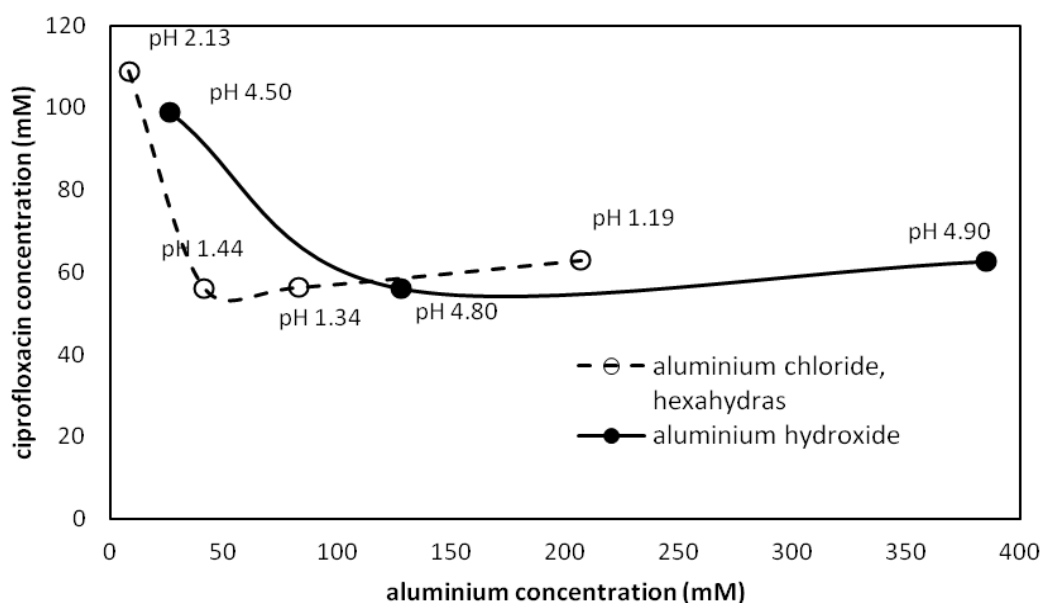
*Table 10. Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of aluminium hydroxide*

Amount of aluminium hydroxide added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42	4.04
26	99.0	38	4.50
128	56.0	22	4.80
385	62.6	24	4.90

*Tabela 11. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu različitih količina aluminijum-hlorida*

*Table 11. Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of aluminium chloride, hexahydrate*

Amount of aluminium chloride, hexahydrate added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42.0	4.04
8.3	108.9	41.9	2.13
41.4	56.2	21.6	1.44
81.8	56.3	21.7	1.34
207	62.9	24.2	1.19



*Slika 22. Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida rastvorenog u medijumu koji sadrži različite količine aluminijum-hlorida, heksahidrata ili aluminijum-hidroksida*

*Fig. 22. Concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in media containing different amounts of aluminium chloride and aluminium hydroxide*

U *in vitro* studijama uglavnom je ispitivana rastvorljivost ciprofloksacin baze u prisustvu aluminijum-hlorida i rezultati tih studija ukazuju na povećanje rastvorljivosti (149, 150, 153). Na osnovu rezultata ispitivanja rastvorljivosti prikazanih na slici 22, može se uočiti da koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida opada nakon dodatka 10 mg/ml (41.5 mM) aluminijum-hlorida i da se koncentracija rastvorenog ciprofloksacina ne menja ni nakon dodatka većih količina soli aluminijuma (82 mM i 207 mM). pH vrednost medijuma opada nakon dodatka aluminijum-hlorida, ali imajući u vidu pH zavisni profil rastvorljivosti ciprofloksacina, ne očekuje se da promena pH vrednosti u uočenom rasponu značajno utiče na rastvorljivost.

Hloridni anjon iz aluminijum-hlorida, može uticati na rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida ako se nalazi u velikoj koncentraciji u rastvoru koji sadrži ciprofloksacin-hidrohlid i aluminijum-hlorid (uticaj zajedničkog jona na rastvorljivost). Kada je u medijumu prisutan aluminijum-hlorid u koncentraciji od 10 mg/ml, koncentracija

hloridnog anjona je 0.1242 mol/l<sup>1</sup> Ukoliko je izračunata rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu te koncentracije hloridnog anjona manja od eksperimentalno određene rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi (109 mM), hloridni jon iz aluminijum-hlorida utiče na rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida. S obzirom da je izračunata vrednost za rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu 124.1 mM hloridnog jona, 97.7 mM, što je manje od eksperimentalno određene rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi, može se pretpostaviti da hloridni jon poreklom iz aluminijum-hlorida dovodi do smanjenja koncentracije ciprofloksacina u medijumu.

Na osnovu rezultata ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida, može se uočiti da se u prisustvu koncentracija aluminijum-hidroksida većih od 100 mM smanjuje koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida. Dodatak aluminijum-hidroksida ne utiče značajno na pH vrednost medijuma, pa se i u ovom slučaju uticaj pH vrednosti može isključiti. S obzirom da je aluminijum-hidroksid teško rastvorljiv u vodi, prisustvo velike količine aluminijum-hidroksida može delovati kao fizička barijera koja sprečava kontakt sa medijumom i rastvaranje ciprofloksacina. Takođe, potencijalan uzrok smanjene koncentracije ciprofloksacin-hidrohlorida bi mogla biti i adsorpcija jona ciprofloksacin-hidrohlorida na čestice aluminijum-hidroksida.

### Ispitivanje brzine rastvaranja

Ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta su rađena u zapremini medijuma od 50 ml u aparaturi sa mini lopaticom, uz dodatak 2 g aluminijum-hlorida, heksahidrata (166 mM jona aluminijuma) ili 1.8 g aluminijum-hidroksida (462 mM jona aluminijuma). Doza od 1.8 g aluminijum-hidroksida odgovara dozi koja je korišćena u *in vivo* studiji Frosta i sar. (131). Ispitivanje brzine rastvaranja

---

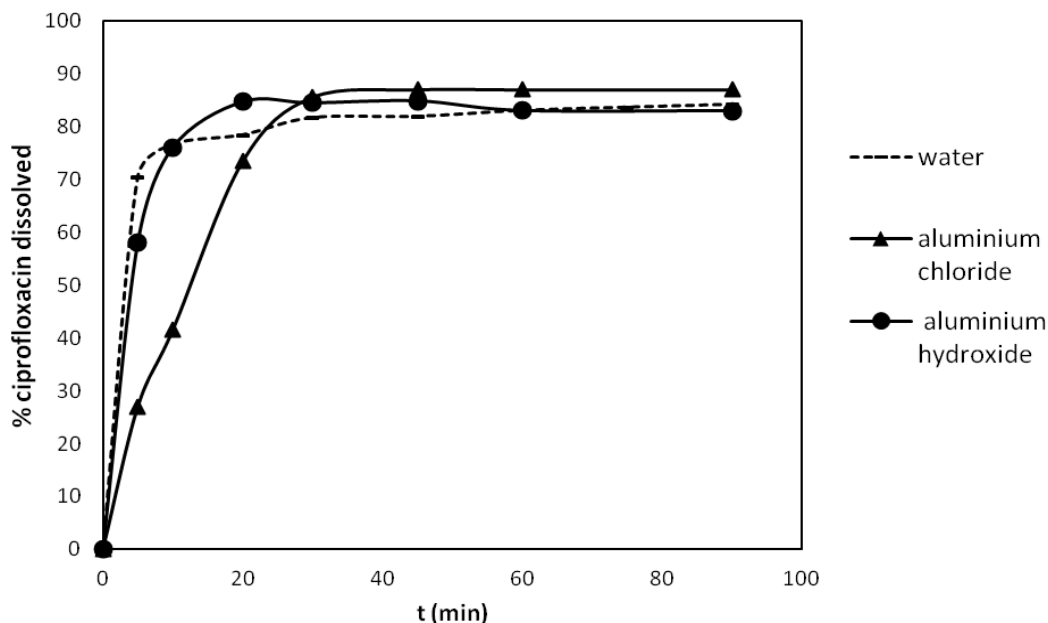
<sup>1</sup> R=0.109 mol/l rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi (*ciprofloxacin solubility in water*)

K (ciproHCl)=  $1.2 \times 10^{-2}$  mol<sup>2</sup>/l<sup>2</sup> proizvod rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida (*ciprofloxacin hydrochloride solubility product*)

$R' = \frac{K}{Cl^-} = 0.097$  mol/l R' < R rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu 124 mM hlorida (*ciprofloxacin hydrochloride solubility in the presence of 124 mM chloride ion*)

ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu aluminijum-hidroksida je rađeno i u fiziološki zasnovanim medijumima.

Na slici 23 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez, kao i nakon dodatka aluminijum-hlorida ili aluminijum-hidroksida u medijum.



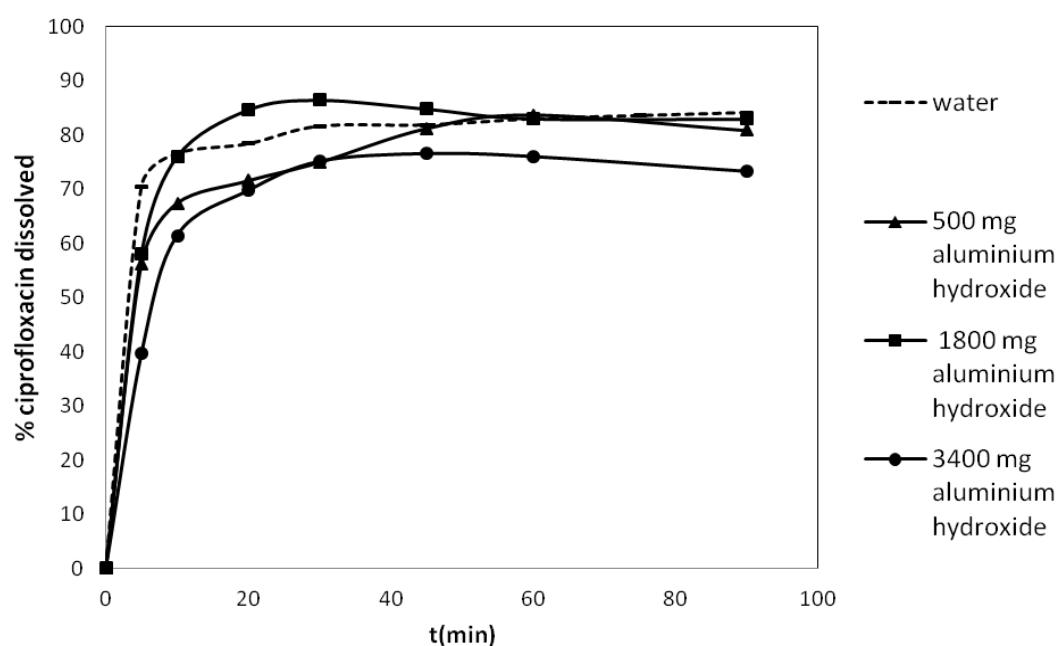
*Slika 23. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta bez/ u prisustvu aluminijum-hlorida, heksahidrata i aluminijum-hidroksida*

*Fig. 23. Ciprofloxacin tablet dissolution without/with addition of aluminium chloride, hexahydras and aluminium hydroxide*

Ciprofloksacin se u prvih 20 minuta sporije oslobađao iz tableta u prisustvu aluminijum-hlorida, ali je nakon 30 minuta oslobođena celokupna količina ciprofloksacina (slika 23). pH vrednost medijuma nakon ispitivanja je bila 1.44. Prisustvo visoke koncentracije hloridnog anjona može uticati na rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida, pa može doći do njegovog taloženja u vodenom medijumu. Iako je koncentracija aluminijum-hlorida u medijumu bila visoka, to je samo u početnoj fazi usporilo oslobađanje ciprofloksacina iz tableta. Mada se u *in vitro* ispitivanjima interakcije ciprofloksacina i jona aluminijuma dosta koristi aluminijum-hlorid, sa biofarmaceutskog aspekta ispitivanje interakcije sa ovom soli aluminijuma nije značajno, jer se aluminijum-hlorid ne koristi u terapiji kao lek ili dijetetski suplement.

Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida bez/uz dodatak aluminijum-hidroksida su skoro identični (slika 23). pH vrednost medijuma na kraju ispitivanja je bila 4.95. Dodata količina aluminijum-hidroksida odgovara količini koja je korišćena u *in vivo* studiji Frosta i sar. (136), ali se u ovom *in vitro* ispitivanju nije mogla uočiti interakcija. S obzirom da je prilikom ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu aluminijum-hidroksida, celokupna količina ciprofloksacina rastvorena u medijumu, moglo bi se pretpostaviti da ciprofloksacin sa jonom aluminijuma gradi rastvorljive komplekse, što bi bilo u skladu sa rezultatima Breda i sar. (98). Čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja, kao i nakon evaporacije profiltriranog medijuma su analizirane i rezultati karakterizacije opisani su u daljem tekstu.

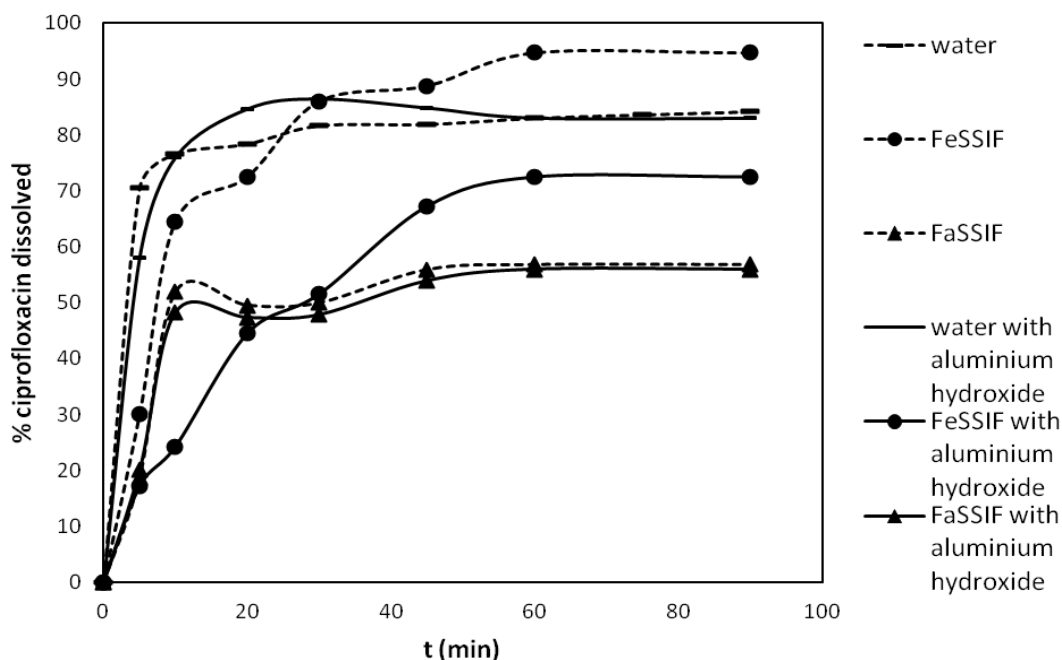
Na slici 24 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu različitih količina aluminijum-hidroksida u 50 ml vode kao medijuma.



**Slika 24.** Profili brzine rastvaranja ciprofloksacina iz tableta bez/u prisustvu 500, 1800 i 3400 mg aluminijum-hidroksida u 50 ml vode

**Fig. 24.** Ciprofloksacin tablet dissolution in 50 ml water as dissolution media without/with 500, 1800, 3400 mg of aluminium hydroxide added

Može se uočiti da dodatak aluminijum-hidroksida u medijum u količini od 500 i 1800 mg nema uticaj na brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida (slika 24). Literaturni izvori navode da je brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida smanjena za oko 20 % u medijumu pH 6 u prisustvu oko 7 g aluminijum-hidroksida (97). S obzirom da je nešto sporije i nepotpuno oslobađanje ciprofloksacina iz tableta uočeno u medijumu koji sadrži 3400 mg aluminijum-hidroksida, može se pretpostaviti da prisustvo nerastvorenog aluminijum-hidroksida u tako velikoj količini u medijumu može da stvori fizičku barijeru koja utiče na brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta. Na slici 25 je dat prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez, kao i u prisustvu 1.8 g aluminijum-hidroksida u vodi, FaSSIF-u ili FeSSIF-u.



*Slika 25. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/ u prisustvu aluminijum-hidroksida u vodi, FaSSIF i FeSSIF-u*

*Fig. 25. Ciprofloxacin tablet dissolution without/with aluminium hydroxide added in water, FaSSIF and FeSSIF*

pH vrednosti medijuma nakon ispitivanja brzine rastvaranja su bile 4.95 (voda), 5.36 (FaSSIF) i 4.95 (FeSSIF). U FaSSIF-u interakcija nije uočena, a profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida bez, kao i u prisustvu aluminijum-hidroksida su

skoro identični (slika 25). Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u FaSSIF-u nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu aluminijum-hidroksida je bila 5.6 mg/ml, što je približno vrednosti za rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u FaSSIF-u (4.9 mg/ml, tabela 6). Dodatak aluminijum-hidroksida u FeSSIF nije uticao na pH medijuma u toku ispitivanja brzine rastvaranja i nakon 90 minuta se oslobodilo 72.5 % ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta (slika 25). Aluminijum-hidroksid takođe ostaje suspendovan u FeSSIF-u, što može ometati oslobađanje ciprofloksacina iz tableta, a imajući u i vidu da je FeSSIF viskozniји od vode, to može uticati na sporiju brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu aluminijum-hidroksida u ovom medijumu.



*Slika 26. Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu aluminijum-hidroksida – izgled uzorka*

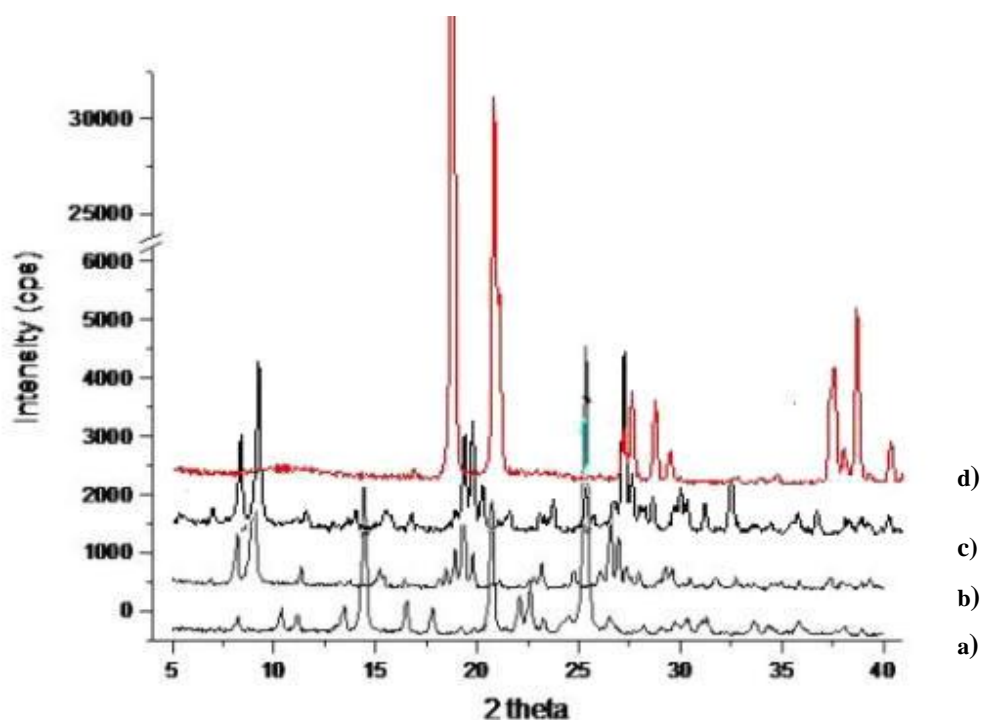
*Fig. 26. Ciprofloxacin hydrochloride dissolution in water with aluminium hydroxide added – samples appearance*

Na slici 26 dat je izgled uzoraka u toku ispitivanja brzine ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu aluminijum-hidroksida u aparaturi sa mini lopaticom. Bela boja medijuma je uslovljena prisustvom velike količine suspendovanog aluminijum-hidroksida.

## Karakterizacija čvrstih faza

Rezultati karakterizacije čvrstih faza su potvrdili prisustvo aluminijum-hidroksida u čvrstoj fazi prikupljenoj iz posude nakon ispitivanja brzine rastvaranja i prisustvo ciprofloksacin-hidrohlorida u čvrstoj fazi prikupljenoj nakon evaporacije profiliranog medijuma.

Na slici 27 dat je prikaz difraktograma, na slici 28 dat je prikaz DSC termograma i na slici 29 FTIR spektar analiziranih čvrstih faza.



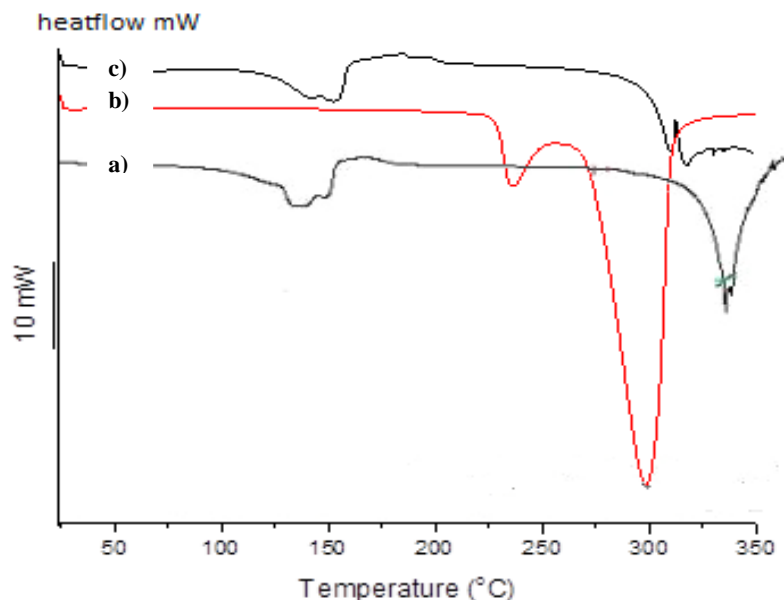
*Slika 27. XRD spektri a) ciprofloksacin b) ciprofloksacin-hidrohlorid c) čvrsta faza prikupljena nakon evaporacije profiliranog medijuma u koji je dodat aluminijum-hidroksid d) nerastvorena čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida*

*Fig. 27. XRD scans of a) ciprofloxacin base b) ciprofloxacin hydrochloride c) solid phase collected after evaporation of dissolution media d) undissolved solid phase collected after ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of aluminium hydroxide*

Čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida pokazuje dva izražena pika na oko 17 i 20  $2\theta$  i XRD spektar (slika 27- spektar d) odgovara spektru aluminijum-hidroksida (170). Takođe,



može se uočiti da je XRD spektar čvrste faze prikupljene nakon evaporacije medijuma (slika 27 spektar c) skoro identičan XRD spektru ciprofloksacin-hidrohlorida (slika 27 spektar b).

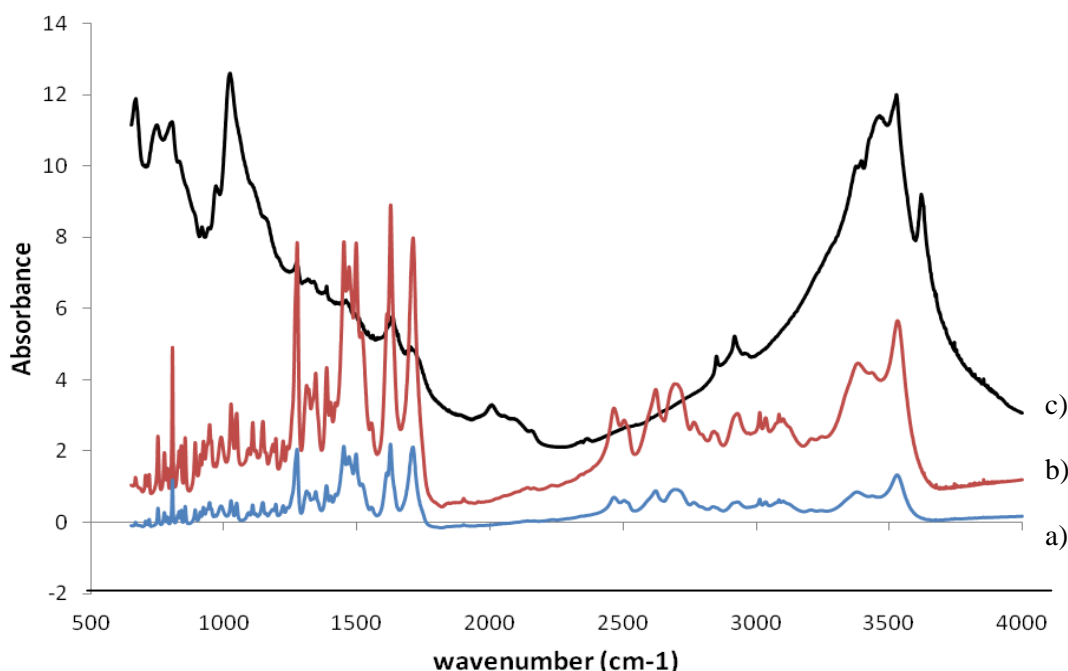


*Slika 28. DSC spektri a) ciprofloksacin-hidrochlorid b) nerastvorena čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida c) čvrsta faza prikupljena nakon evaporacije profiltriranog medijuma u koji je dodan aluminijum-hidroksid*

*Fig. 28. DSC scans of a) ciprofloxacin hydrochloride b) undissolved solid phase collected after ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of aluminium hydroxide c) solid phase collected after evaporation of dissolution media*

DSC analiza čvrstih faza je pokazala da postoje značajne razlike u termogramima ispitivanih uzoraka (slika 28). Nerastvorena čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida pokazuje jak endotermni pik na 300°C i slab pik na 240°C, dok čvrsta faza dobijena evaporacijom profiltriranog medijuma ima sličan termogram kao ciprofloksacin-hidrochlorid. Termogram čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida pokazuje 0.5 % gubitak

vode koji je praćen naglim gubitkom mase na temperaturi preko 220°C. Dobijeni termogram je sličan termogramu aluminijum-hidroksida (170, 171), što potvrđuje odsustvo ciprofloksacin-hidrohlorida u ispitivanoj čvrstoj fazi. TGA analiza čvrste faze prikupljene nakon evaporacije medijuma pokazuje gubitak vlage od 7.5 %. DSC, XRD i FTIR spektri nerastvorene čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja su slični spektru aluminijum-hidroksida opisanom u literaturi (170-173). DSC, XRD i FTIR spektri čvrste faze prikupljene nakon evaporacije profiltriranog medijuma ukazuju da je u medijumu rastvoren dominantno ciprofloksacin-hidrohlord (slika 27-29). Analize čvrstih faza nisu ukazale na to da u interakciji između ciprofloksacina i aluminijum-hidroksida dolazi do stvaranja nove jonske vrste.



*Slika 29. FTIR spektri a) ciprofloksacin-hidrohlord b) čvrsta faza prikupljena nakon evaporacije profiltriranog medijuma u koji je dodat aluminijum-hidroksid c) nerastvorena čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida*

**Fig. 29.** FTIR scans a) ciprofloxacin hydrochloride b) solid phase collected after evaporation of dissolution media c) undissolved solid phase collected after ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of aluminium hydroxide

## 6.2.5 Interakcija između ciprofloksacina i jedinjenja kalcijuma

Interakcija između ciprofloksacina i jedinjenja kalcijuma uočena je *in vivo* nakon istovremene primene ciprofloksacina i kalcijum-karbonata (136, 146). Kao potencijalni mehanizmi interakcije navode se građenje kompleksa, adsorpcija čestica ciprofloksacina na čestice kalcijum-karbonata ili precipitacija ciprofloksacina u intestinumu usled promene pH vrednosti sredine prilikom prelaska iz kisele sredine želuca u neutralnu sredinu intestinuma (61, 136, 156). Kao i u slučaju *in vitro* ispitivanja interakcije ciprofloksacina sa jonima gvožđa i aluminijuma, može se uočiti izvesna kontradiktornost u rezultatima ispitivanja rastvorljivosti (149) i brzine rastvaranja (49, 156, 157) ciprofloksacina u prisustvu jedinjenja kalcijuma. *In vitro* ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu kalcijum-hlorida i kalcijum-karbonata imalo je za cilj identifikaciju potencijalnog mehanizma interakcije koja je uočena *in vivo*.

### Ispitivanje rastvorljivosti

Ispitivanje rastvorljivosti je rađeno u vodi kao medijumu, uz dodatak kalcijum-hlorida, dihidrata ili kalcijum-karbonata. U tabeli 12 i 13 i na slici 30 dat je prikaz rezultata ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu kalcijum-hlorida i kalcijum-karbonata.

**Tabela 12.** Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu različitih količina kalcijum-karbonata

**Table 12.** Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of calcium carbonate

Amount of calcium carbonate added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42.0	4.04
20	11.7	4.5	6.10
100	0.9	0.3	6.70
200	0.3	0.1	6.90

**Tabela 13.** *Rastvorljivost ciprofloksacina u vodi u prisustvu različitih količina kalcijum-hlorida, dihidrata*

**Table 13.** *Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of calcium chloride, dihydrate*

Amount of calcium chloride, dihydrate added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42.0	4.04
13.6	73.0	28.0	3.70
68	40.0	15.0	4.00
136	7.4	2.9	4.10
340	3.6	1.4	4.20

Dodatak kalcijum-karbonata u medijum dovodi do smanjenja koncentracije rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida. Takođe, dodatak kalcijum-karbonata u medijum dovodi do značajne promene pH vrednosti medijuma. Na koncentraciju ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru utiče promena pH vrednosti sredine, a pri pH vrednostima većim od 6 dolazi do taloženja ciprofloksacin baze, tako da se eventualna interakcija sa jonom kalcijuma ne može uočiti.

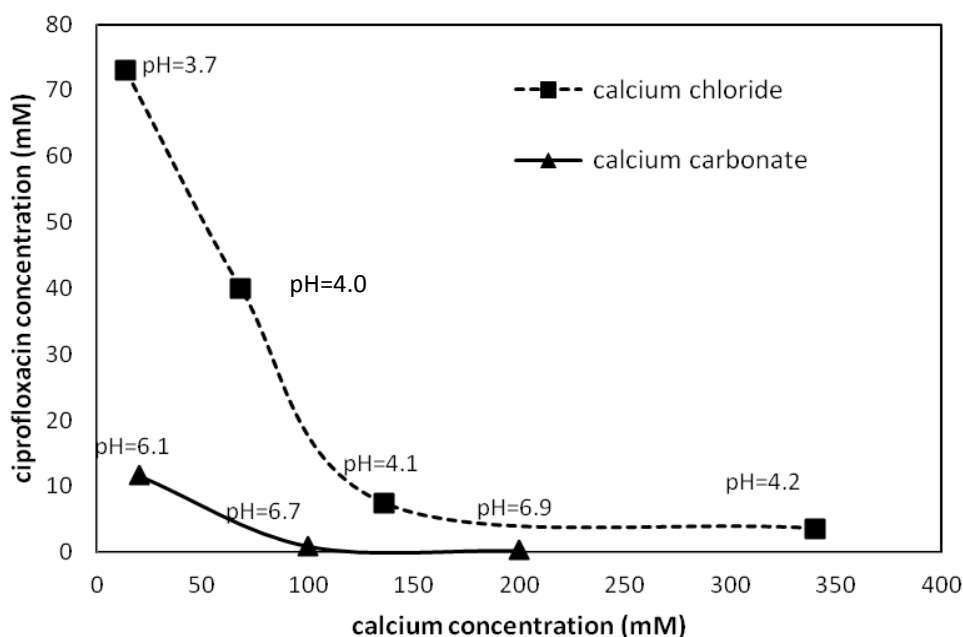
Koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu je smanjena kada je u medijum dodat kalcijum-hlorid. Kada je kalcijum-hlorid prisutan u koncentraciji koja je veća od 20 mg/ml (136 mM), koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi dostiže plato. pH vrednosti medijuma nakon dodatka kalcijum-hlorida su slične pH vrednosti rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida. S obzirom da je u medijumu koji sadrži 136 mM soli kalcijuma prisutna velika koncentracija hloridnog anjona (0.272 mol/l), izračunavanje rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu zajedničkog jona<sup>2</sup> je pokazalo da dodatak 272 mM hloridnog anjona smanjuje koncentraciju rastvorenog

<sup>2</sup> R=0.109 mol/l eksperimentalno određena rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida (*ciprofloxacin hydrochloride solubility*)

K (ciproHCl)=  $1.2 \times 10^{-2} \text{ mol}^2/\text{l}^2$  proizvod rastvorljivosti (*ciprofloxacin hydrochloride solubility product*)

$R' = [\text{Cipro}] = \frac{K}{\text{Cl}^-} = 0.044 \text{ mol/l}$   $R' < R$  rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu 272 mM hlorida (*ciprofloxacin hydrochloride solubility in the presence of 272 mM chloride ion*)

ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu. Izračunata rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu 272 mM hloridnog anjona je 44 mM, što je manje od eksperimentalno određene rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi (109 mM). Na osnovu ovoga može se pretpostaviti da prisustvo zajedničkog jona utiče na smanjenje koncentracije ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru.



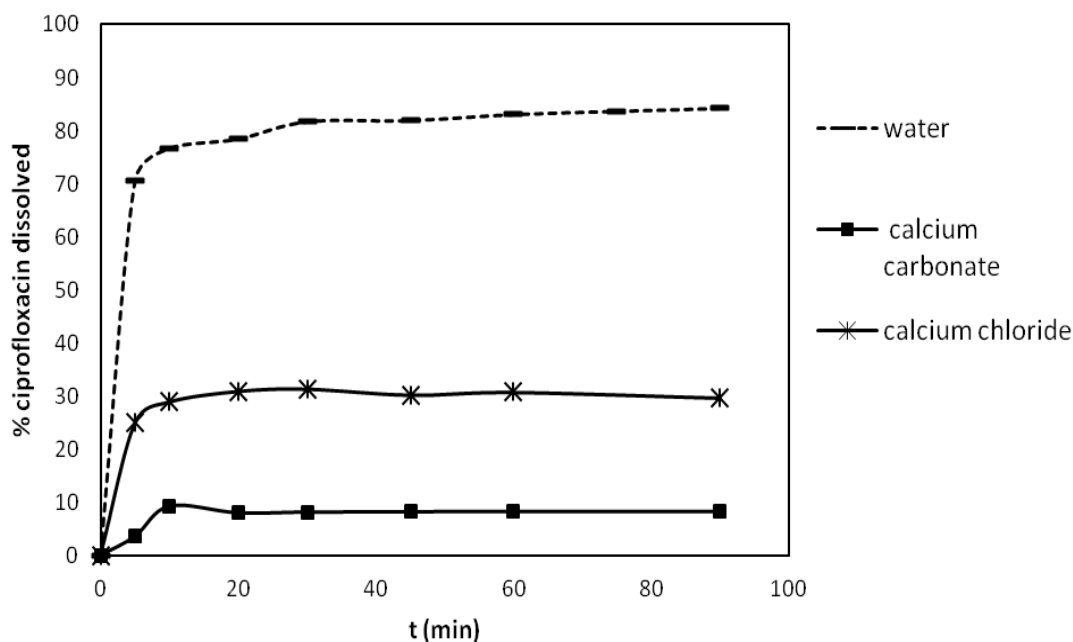
*Slika 30. Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida rastvorenog u medijumu koji sadrži različite količine kalcijum-hlorida, dihidrata i kalcijum-karbonata*

*Fig. 30. Concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in media containing different amounts of calcium chloride, dihydrate and calcium carbonate*

### Ispitivanje brzine rastvaranja

Ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta su sprovedena u aparaturi sa mini lopaticom u prisustvu kalcijum-hlorida, dihidrata ili kalcijum-karbonata u vodi i fiziološki zasnovanim medijumima.

Na slici 31 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida bez, kao i u prisustvu 2 g kalcijum-hlorida, dihidrata (272 mM) i 3.4 g kalcijum-karbonata (680 mM).



*Slika 31. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/ u prisustvu kalcijum-hlorida i kalcijum-karbonata*

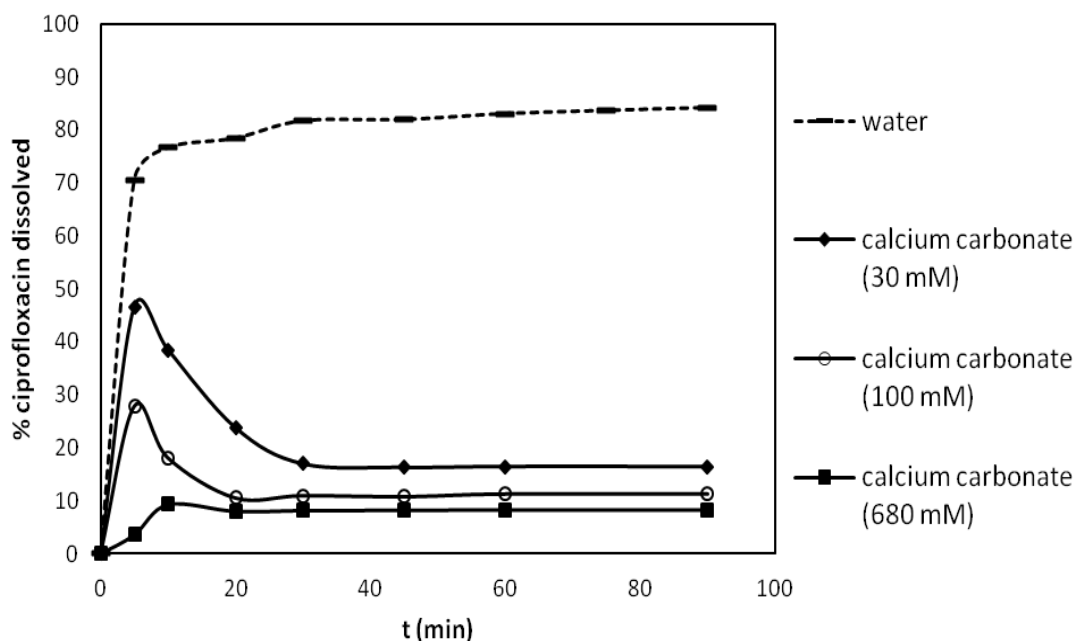
*Fig. 31. Ciprofloxacin tablet dissolution without/with addition of calcium chloride and calcium carbonate*

Prilikom ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu kalcijum-hlorida, oslobodilo se oko 30 % ciprofloksacin-hidrohlorida, a koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu je bila oko 3.5 mg/ml (10 mM). Visoka koncentracija hloridnog anjona koja je bila prisutna u medijumu može dovesti do precipitacije ciprofloksacin-hidrohlorida i uticati na koncentraciju ciprofloksacina u medijumu. pH medijuma nakon ispitivanja je bila 3.8. U prisustvu kalcijum-karbonata oslobodilo se 8.3 % ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta (slika 31). Izmerena pH vrednost na kraju ispitivanja je bila 7.2. Uzimajući u obzir da je rastvorljivost ciprofloksacina na toj pH vrednosti najmanja, može se pretpostaviti da je promena pH vrednosti uticala na oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-karbonata.

Na slici 32 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u vodi u prisustvu različitih količina soli kalcijum-karbonata. Oslobađanje ciprofloksacina iz tableta se smanjuje sa povećanjem koncentracije kalcijum-karbonata

u medijumu koja je praćena povećanjem pH vrednosti medijuma. Izmerene pH vrednosti medijuma na kraju ispitivanja su bile 6.25 sa 30 mM kalcijum-karbonata, 7.3 sa 100 mM kalcijum-karbonata i 7.2 sa 680 mM kalcijum-karbonata.

U *in vivo* studiji Frosta i sar. (136) zdravi dobrovoljci su tablete ciprofloksacina primenjivali sa 4 tablete sa po 850 mg kalcijum-karbonata, pri čemu je zabeleženo smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina za oko 40 %. U ovom radu ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata je rađeno u prisustvu iste količine kalcijum-karbonata u medijumu koja je korišćena u *in vivo* studijama, pri čemu se, usled porasta pH vrednosti medijuma, oslobodilo 8.3 % ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta. Prilikom proučavanja literaturnih podataka o građenju kompleksa između ciprofloksacina i jona metala može se uočiti da se građenje kompleksa odvija u odnosu 1:1 ili 1:3, pa su prilikom ispitivanja brzine rastvaranja korišćeni navedeni odnosi ciprofloksacin-hidrohlorida i kalcijum-karbonata (30 mM ciprofloksacina i 30/100 mM jona kalcijuma).



*Slika 32. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/ u prisustvu različitih količina kalcijum-karbonata*

*Fig. 32. Ciprofloxacin tablet dissolution without/with different amounts of calcium carbonate added*

Zanimljivo je da u rezultatima ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-karbonata opisanim u literaturi (156, 157) nije uočen uticaj kalcijum-karbonata na pH vrednost medijuma. Rezultati dobijeni u našim ispitivanjima pokazuju da prisustvo kalcijum-karbonata u medijumu dovodi do povećanja pH sredine, kao i da je ta promena pH vrednosti značajno uticala na rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida. Početno brzo oslobađanje ciprofloksacina je praćeno precipitacijom, a prikupljena čvrsta faza je analizirana pogodnim metodama karakterizacije (DSC, FTIR, TGA, difrakcija X-zraka). Može se uočiti da u toku prvih 30 minuta ispitivanja dolazi do fazne transformacije ciprofloksacina u prisustvu različitih količina kalcijum-karbonata u medijumu. Na slici 33 prikazan je izgled uzoraka u toku ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-karbonata u aparaturi sa mini lopaticom. Može se uočiti da u toku ispitivanja brzine rastvaranja dolazi do pojave precipitacije i nastanka belog, voluminoznog, sirastog taloga.

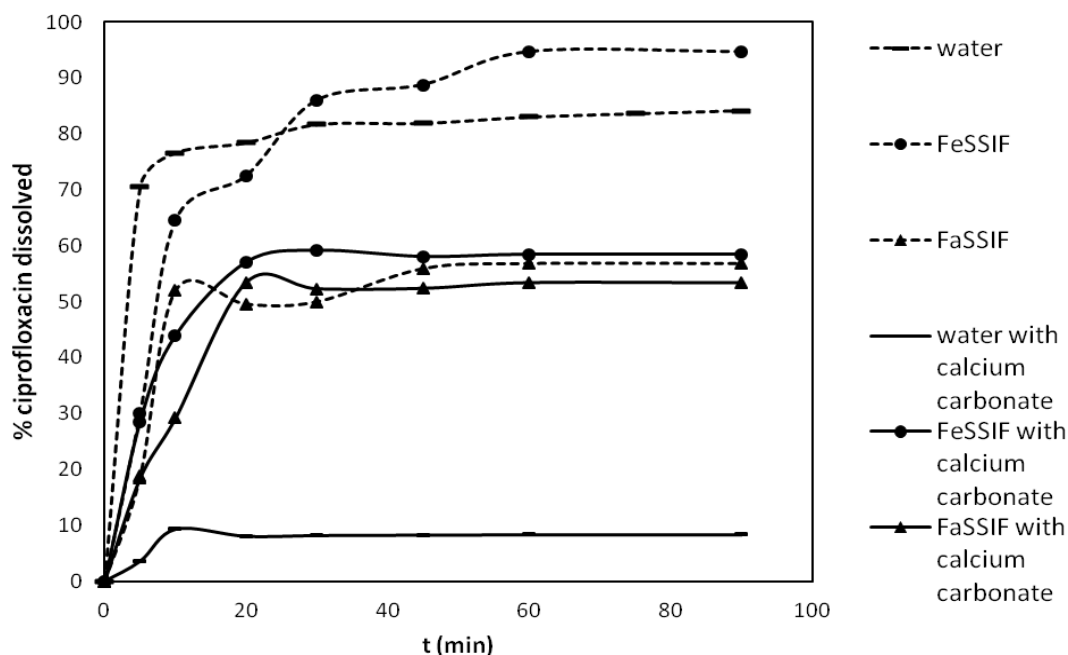


*Slika 33. Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu kalcijum-karbonata – izgled uzoraka*

*Fig. 33. Ciprofloxacin hydrochloride dissolution in water with calcium carbonate added – samples appearance*



Kada se ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu kalcijum-karbonata radi u vodi kao medijumu, dodatak soli menja pH vrednost medijuma i dolazi do taloženja ciprofloksacina. S obzirom da fiziološki zasnovani medijumi imaju veći puferski kapacitet od vode, pokušaj simuliranja interakcije je izvršen i u FaSSIF-u i FeSSIF-u i profili brzine rastvaranja su prikazani na slici 34.



**Slika 34.** Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/ u prisustvu 3400 mg kalcijum-karbonata u vodi, FaSSIF i FeSSIF

**Fig. 34.** Ciprofloxacin tablet dissolution without/with 3400 mg calcium carbonate added in water, FaSSIF and FeSSIF

Dodatak kalcijum-karbonata uticao je na pH vrednost FaSSIF-a koja je nakon ispitivanja bila 7.1, dok je izmerena pH vrednost u FeSSIF-u bila 6.0. U FaSSIF-u, kao i prilikom ispitivanja interakcije sa gvožđe(II)-sulfatom i aluminijum-hidroksidom, oslobađanje ciprofloksacina je bilo ograničeno njegovom rastvorljivošću u medijumu. Sa druge strane, i pored porasta pH vrednosti medijuma, u FeSSIF-u je oslobođeno 58 % ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu kalcijum-karbonata (slika 34). *In vivo* ispitivanja ukazuju da je biološka raspoloživost ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata smanjena za oko 40 %, pa dobijeni rezultati simuliranja interakcije u FeSSIF

medijumu najpribližnije opisuju *in vivo* situaciju (136).

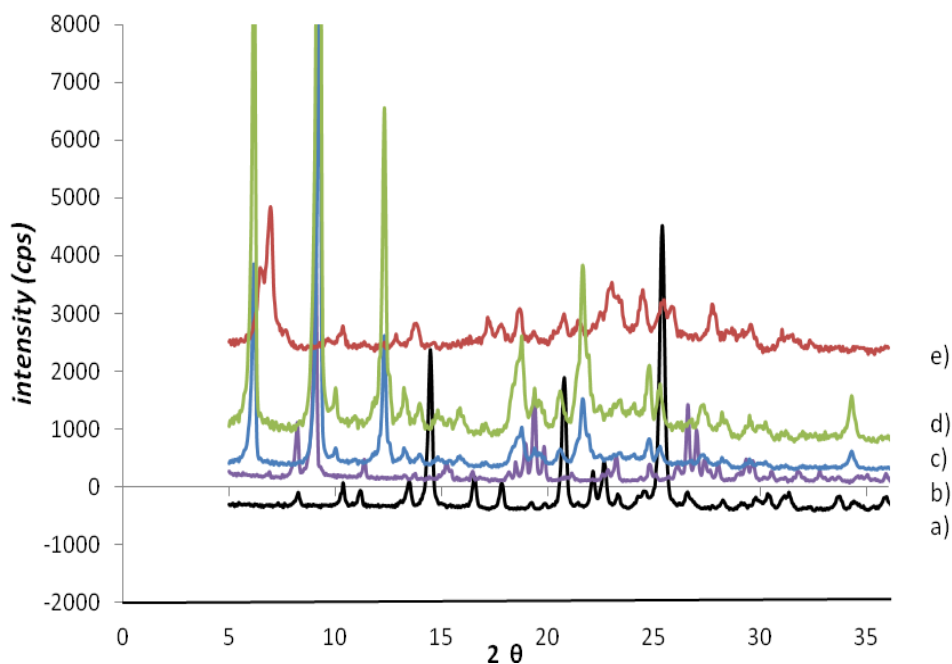
### **Građenje kompleksa**

Pokušaj građenja kompleksa je izvršen mešanjem rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida koncentracije 0.1 M i rastvora kalcijum-hlorida, dihidrata koncentracije 0.3 M u različitim molarnim odnosima. Precipitacija je uočena u uzorku u kome je koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida bila 50 mM, a koncentracija kalcijum-hlorida 150 mM. Prikupljeni precipitat je analiziran metodama karakterizacije (DSC, FTIR, TGA, difrakcija X-zraka). Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu iznad taloga je bila 4.3 mg/ml (pH 3.99).

### **Karakterizacija čvrste faze**

Rezultati karakterizacije čvrstih faza prikupljenih nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu kalcijum-hlorida i kalcijum-karbonata su prikazani na slikama 35-37. Rezultati karakterizacije čvrste faze prikupljene mešanjem rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i kalcijum-hlorida, kao i čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-hlorida su pokazali da prikupljene čvrste faze imaju vrlo slične DSC termograme, XRD difraktograme i FTIR spektre što je prikazano na slikama 35-37.

U difraktogramu čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-hlorida, mogu se uočiti dva pika na oko  $10\ 2\theta$  i  $12.5\ 2\theta$  i generalno difraktogram je vrlo sličan difraktogramu ciprofloksacin-hidrohlorida. U XRD difraktogramu čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-karbonata, mogu se uočiti pikovi na oko  $6, 22, 24\ 2\theta$  i difraktogram je vrlo sličan difraktogramu hidratizane ciprofloksacin baze opisanom u literaturi (174).

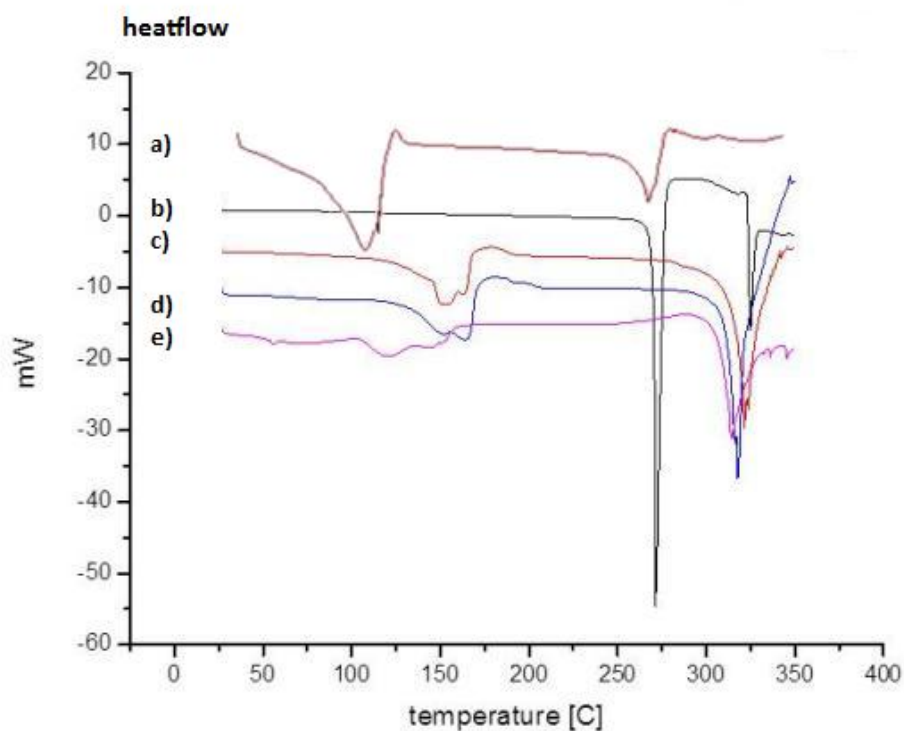


*Slika 35. XRD spektri: a) ciprofloksacin baza, b) ciprofloksacin-hidrohlorid, c) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-hlorida, d) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i kalcijum-hlorida, e) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata*

*Fig. 35. XRD scans of: a) ciprofloxacin base, b) ciprofloxacin hydrochloride, c) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing calcium chloride, d) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and calcium chloride, e) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing calcium carbonate*

Na slici 36 dat je prikaz DSC analize prikupljenih čvrstih faza. Može se uočiti da je DSC termogram čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-hlorida skoro identičan kao termogram ciprofloksacin-hidrohlorida. Endotermni pik ciprofloksacin-hidrohlorida je na 309°C, a na toj temperaturi se pojavljuju pikovi i u termogramu čvrste faze nastale u interakciji sa kalcijum-hloridom. U DSC termogramu čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-karbonata, može se uočiti širok endotermni pik na oko 105°C i endotermni pik na oko

270°C. Endotermni pik na 105°C je praćen gubitkom mase od 14.5 %, što odgovara oslobađanju adsorbovane vode. Do termalne dekompozicije dolazi na temperaturi iznad 270°C, što je praćeno daljim gubitkom mase. Tačka topljenja ciprofloksacin baze se nalazi na 270°C, što ukazuje da je u izolovanoj čvrstoj fazi prisutan ciprofloksacin.

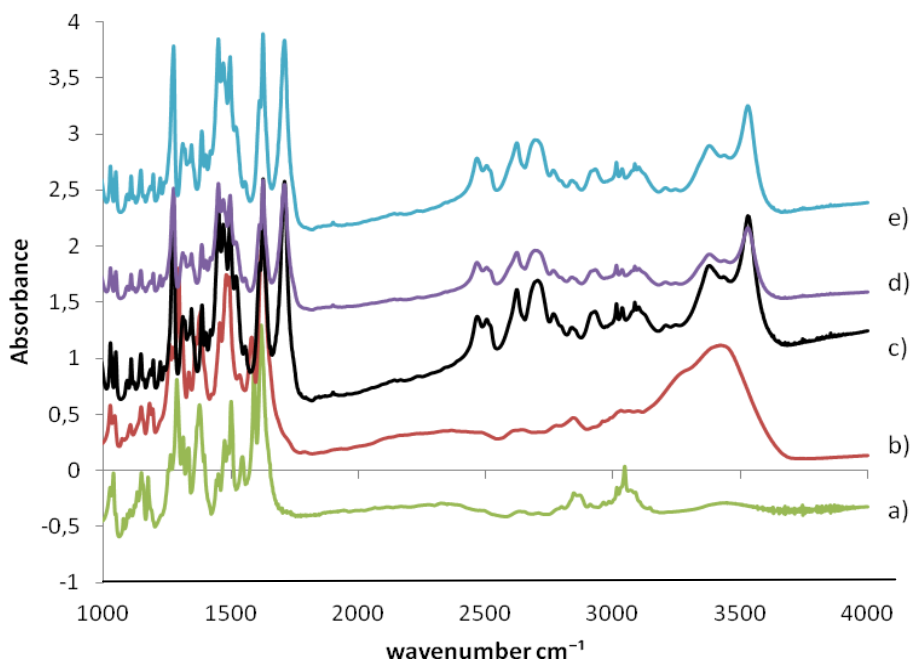


*Slika 36. DSC spektri a) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata, b) ciprofloksacin baza c) ciprofloksacin-hidrohlorid d) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-hlorida, e) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i kalcijum-hlorida*

**Fig. 36.** DSC scans: a) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing calcium carbonate, b) ciprofloxacin base c) ciprofloxacin hydrochloride d) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing calcium chloride, e) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and calcium chloride

FTIR spektar čvrste faze izolovane nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-hlorida je sličan spektru ciprofloksacin-

hidrohlorida. FTIR spektar čvrste faze izolovane nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu kalcijum-karbonata, ima karakteristične vibracije na 1623, 1580 and 1380  $\text{cm}^{-1}$  što odgovara vibracijama keto grupe i karboksilatnog anjona i ovaj spektar je identičan FTIR spektru prikazanom u radu Dorofeev-a koji opisuje hidratisanu formu ciprofloksacin baze (175).



*Slika 37. FTIR spektri: a) ciprofloksacin baza; b) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata, c) ciprofloksacin-hidrohlorid d) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-hlorida, e) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i kalcijum-hlorida*

**Fig. 37.** FTIR scans: a) ciprofloxacin base; b) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing calcium carbonate, c) ciprofloxacin hydrochloride d) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in media containing calcium chloride, e) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and calcium chloride

## 6.2.6 Interakcija između ciprofloksacina i jona cinka

Interakcija između ciprofloksacina i jona cinka je uočena *in vivo* nakon istovremene primene ciprofloksacina i multivitaminskih ili oligomineralnih preparata koji sadrže cink (15, 16). U *in vitro* uslovima opisano je građenje kompleksa između ciprofloksacina i cink-hlorida ili cink-sulfata (95), što je i predloženo kao potencijalni mehanizam interakcije uočene *in vivo*.

U ovom poglavlju opisani su rezultati ispitivanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu cink-hlorida i cink-sulfata, s ciljem da se identifikuju uzroci smanjenja bioraspoloživosti ciprofloksacina u prisustvu jona cinka i potencijalni mehanizam interakcije.

### Ispitivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu cink-hlorida i cink-sulfata, heptahidrata je određena u vodi kao medijumu. U tabelama 14 i 15 i na slici 38 dat je prikaz rezultata ispitivanja rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu različitih količina cink-hlorida i cink-sulfata.

**Tabela 14.** Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu različitih količina cink-hlorida

**Table 14.** Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of zinc chloride

Amount of zinc chloride added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42.0	4.04
14.7	107.8	41.5	4.00
73.5	83.6	32.2	3.50
147	20.6	7.9	3.20
368	6.7	2.6	2.60

**Tabela 15.** *Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu različitih količina cink-sulfata, heptahidrata*

**Table 15.** *Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water containing different amounts of zinc sulfate, heptahydrate*

Amount of zinc sulfate added (mM)	ciprofloxacinHCl solubility		
	mM	mg/ml	pH
0	109.0	42.0	4.04
6.9	104.0	40.0	3.30
34.8	62.3	24.0	3.20
69.7	13.3	5.1	3.20
174	8.6	3.3	3.40

Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru se smanjuje sa povećanjem koncentracije cink-hlorida (slika 38). pH vrednost medijuma takođe blago opada usled prisustva cink-hlorida. Kao i u slučaju aluminijum-hlorida i kalcijum-hlorida, mora se razmotriti i uticaj zajedničkog (hloridnog) jona na rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu cink-hlorida. Značajno smanjenje koncentracije rastvorenog ciprofloksacina je uočeno u uzorku koji je sadržao 368 mM cink-hlorida (736 mM hloridnog anjona). S obzirom da je izračunata vrednost za rastvorljivost<sup>3</sup> ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu 0.736 mol/l hloridnog jona, 16 mM, što je manje od eksperimentalno određene rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi (109 mM), može se pretpostaviti da hloridni jon poreklom iz cink-hlorida prisutan u toj koncentraciji dovodi do smanjenja koncentracije ciprofloksacina u medijumu. Izračunata vrednost za rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu 736 mM hloridnog anjona je znatno viša od eksperimentalno dobijene koncentracije ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu koji sadrži tu koncentraciju hloridnog jona (8.6

<sup>3</sup> R=0.109 mol/l eksperimentalno određena rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida (*ciprofloxacin hydrochloride solubility*)

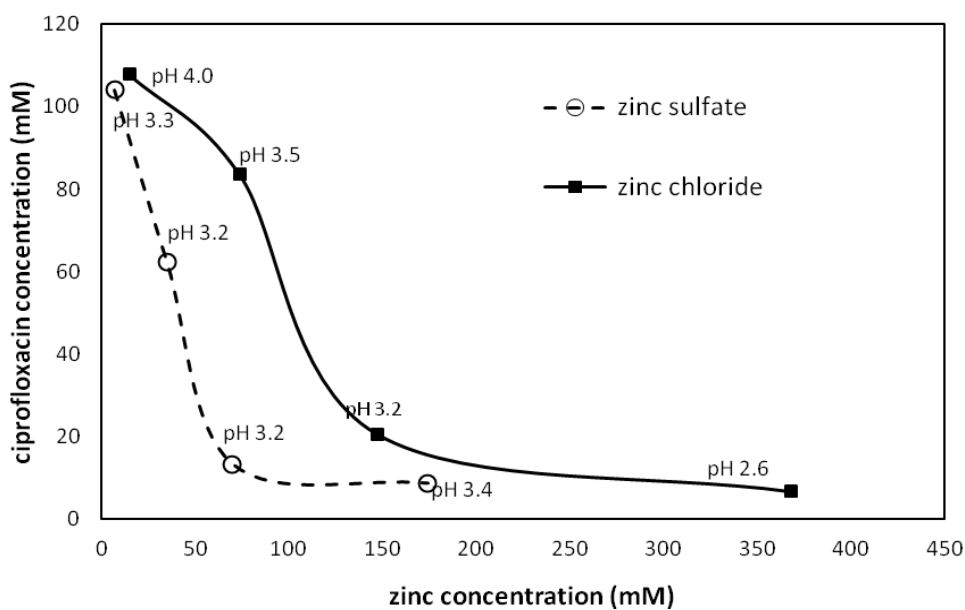
K (ciproHCl)=  $1.2 \times 10^{-2} \text{ mol}^2/\text{l}^2$  proizvod rastvorljivosti (*ciprofloxacin hydrochloride solubility product*)

$$R'=[\text{Cipro}] = \frac{K}{\text{Cl}^-} = 0.016 \text{ mol/l} \quad R' < R \text{ rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu 736 mM}$$

hlorida (*ciprofloxacin hydrochloride solubility in the presence of 736 mM chloride ion*)

mM). Može se pretpostaviti da, pored uticaja zajedničkog jona, na smanjenje koncentracije ciprofloksacina u medijumu mogu uticati i neki drugi faktori (pH vrednost sredine ili građenje kompleksa). Imajući u vidu da je rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u navedenom opsegu pH vrednosti visoka, ne očekuje se da promena pH vrednosti medijuma utiče na rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu cink-hlorida.

Prisustvo cink-sulfata u medijumu dovodi do značajnog smanjenja koncentracije rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida, pri čemu se može uočiti da se ravnotežna rastvorljivost postiže kada je u medijumu prisutno oko 100 mM cink-sulfata (slika 38). pH medijuma blago opada u prisustvu cink-sulfata, pa promena rastvorljivosti ne može biti posledica promene pH vrednosti u uzorcima.



*Slika 38. Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida rastvorenog u medijumu koji sadrži različite koncentracije cink-hlorida i cink-sulfata*

*Fig. 38. Concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in media containing different concentrations of zinc chloride and zinc sulfate*

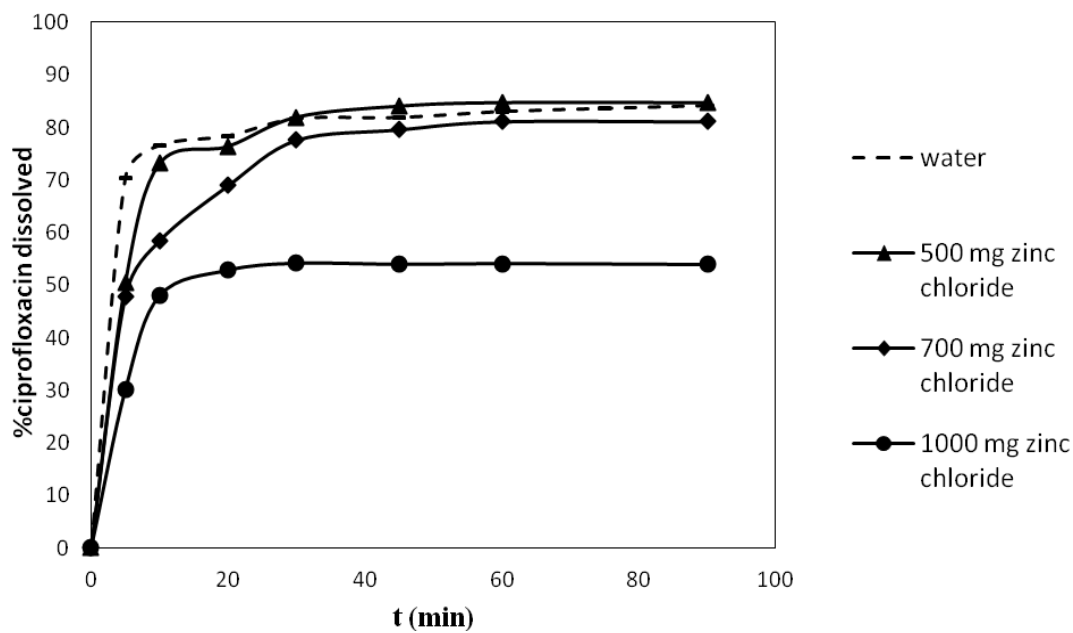


### **Ispitivanje brzine rastvaranja**

Ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta su rađena u aparaturi sa mini lopaticom u vodi i fiziološki zasnovanim medijumima u prisustvu cink-hlorida i cink-sulfata, heptahidrata. Ravnotežna rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu jona cinka je uspostavljena kada je koncentracija cinka u medijumu bila 147 mM, pa je ista koncentracija cinka (u obliku cink-hlorida i cink-sulfata) primenjena prilikom ispitivanja brzine rastvaranja. So cinka je dodavana u medijum (voda ili fiziološki zasnovani medijumi) istovremeno sa tabletom ciprofloksacin-hidrohlorida i to 1000 mg cink-hlorida (147 mM cinka) ili 2110 mg cink-sulfata, heptahidrata (sadrži 147 mM cinka).

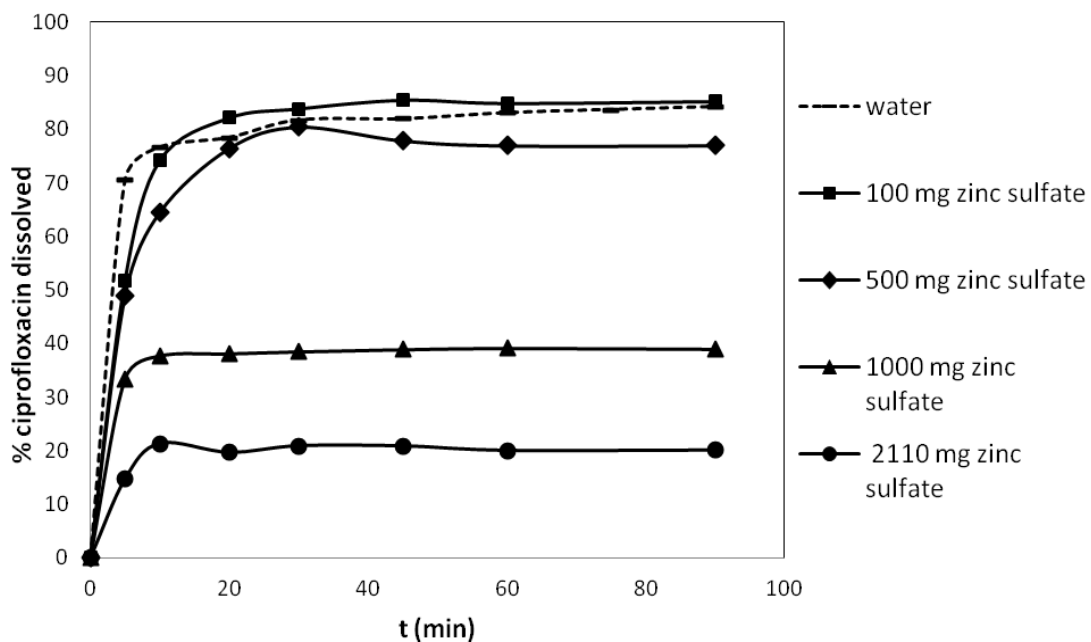
Na slici 39 prikazani su profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu različitih količina cink-hlorida. Sa povećanjem koncentracije cink-hlorida u medijumu, smanjuje se brzina rastvaranja ciprofloksacina. Usporeno i nepotpuno oslobađanje ciprofloksacina iz tableta uočeno je u prisustvu 1000 mg cink-hlorida pri čemu je oslobođeno 54 % supstance. pH vrednosti medijuma nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta su bile 3.40 (500 mg cink-hlorida), 3.24 (700 mg cink-hlorida) i 3.21 (1000 mg cink-hlorida). Imajući u vidu pH zavisni profil rastvorljivosti ciprofloksacina, može se zaključiti da uočeno smanjenje brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu cink-hlorida nije posledica uticaja pH vrednosti medijuma.

Na slici 40 dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu različitih količina cink-sulfata, heptahidrata. Sa povećanjem koncentracije jona cinka u medijumu, brzina rastvaranja ciprofloksacina se smanjuje. pH vrednosti medijuma su bile 3.95 (100 mg cink-sulfata), 3.36 (500 mg cink-sulfata), 3.38 (1000 mg cink-sulfata) i 3.66 (2110 mg cink-sulfata), pri čemu se može uočiti da promena brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida nije posledica uticaja pH vrednosti sredine.



*Slika 39. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/ u prisustvu različitih količina cink-hlorida*

*Fig. 39. Ciprofloxacin tablet dissolution without/with different amounts of zinc chloride added*



*Slika 40. Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/ u prisustvu različitih količina cink-sulfata*

*Fig. 40. Ciprofloxacin tablet dissolution without/with different amounts of zinc sulfate added*

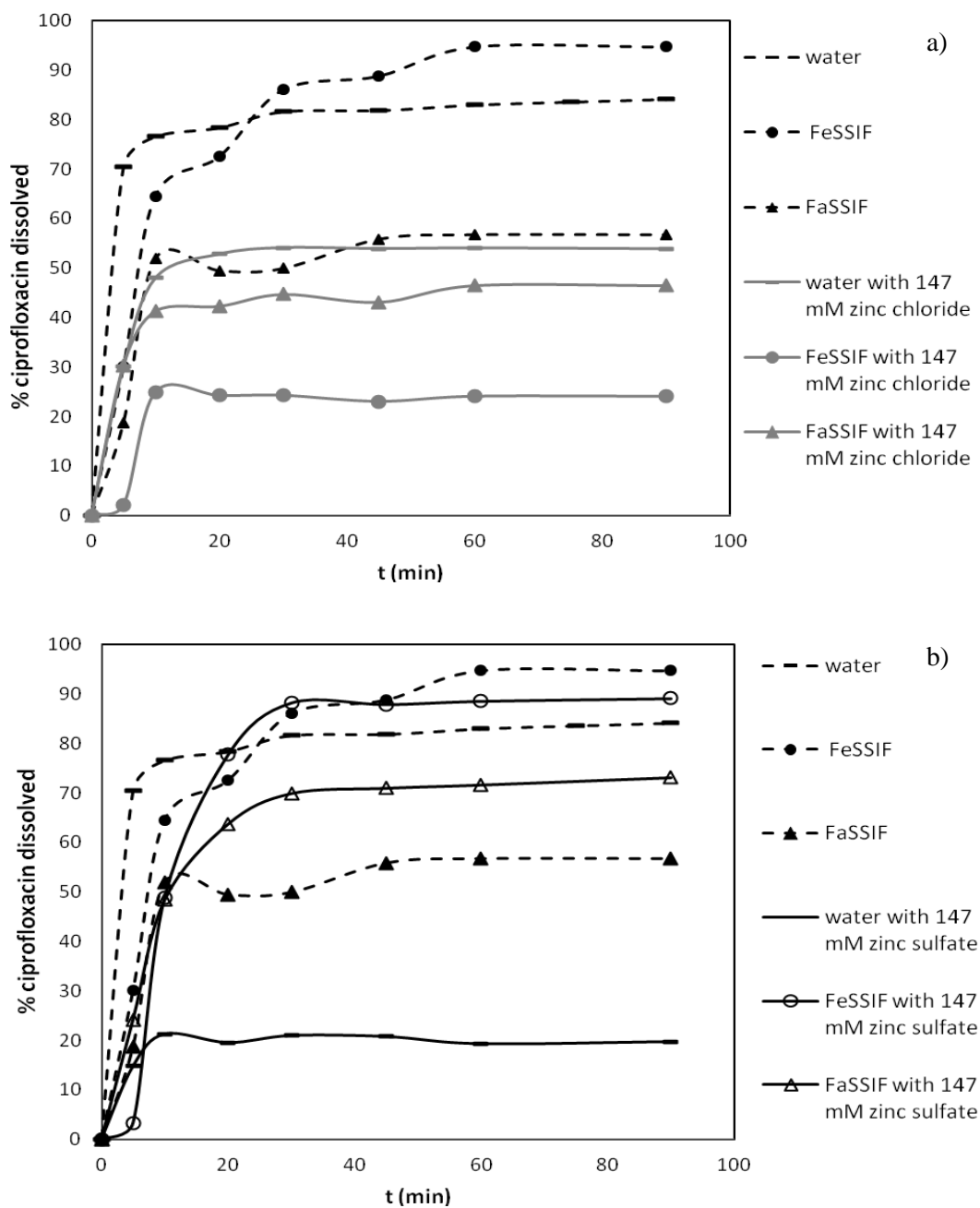
Na slici 41a dat je prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez, kao i u prisustvu cink-hlorida, dok je na slici 41b dat prikaz profila brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez, kao i u prisustvu cink-sulfata u vodi i fiziološki zasnovanim medijumima.

Oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u vodi, u prisustvu cink-hlorida je usporeno i nepotpuno i nakon 90 minuta se oslobodilo 54 % ciprofloksacin-hidrohlorida (pH vrednost medijuma na kraju ispitivanja je bila 3.21; slika 41a), dok se u prisustvu cink-sulfata oslobodilo 20 % ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta (pH vrednost medijuma na kraju ispitivanja je bila 3.66; slika 41b). Nakon ispitivanja, čvrste faze su prikupljene i zatim analizirane primenom odgovarajućih analitičkih metoda (DSC, TGA, FTIR, difrakcija X-zraka).

*U in vivo* ispitivanjima interakcije ciprofloksacin-hidrohlorida sa jonom cinka korišćeni su multivitaminski/oligomineralni preparati koji, pored cinka, sadrže i druge minerale i vitamine (15, 16). U takvim preparatima cink se nalazi u malim količinama i teško je definisati koliki je uticaj samog cinka na bioraspoloživost ciprofloksacina kada je on primenjen u smeši sa drugim metalima. U literaturi se ne mogu pronaći podaci o *in vitro* ispitivanjima rastvorljivosti ili brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu jona cinka, već samo rezultati studija koje su se bavile kompleksiranjem ciprofloksacina i cinka (95). Uzimajući u obzir rezultate ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-hlorida i cink-sulfata, može se uočiti da pH vrednost ne utiče na oslobađanje ciprofloksacina, već da neki drugi faktori, kao što je građenje kompleksa ispoljavaju efekat.

U FaSSIF-u je u prisustvu cink-hlorida oslobođeno 46 % ciprofloksacin-hidrohlorida, a izmerena pH vrednost medijuma nakon ispitivanja je bila 3.34 (slika 41a). Kao što je već napomenuto, oslobađanje ciprofloksacina je ograničeno rastvorljivošću u ovom medijumu, a koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru iznad taloga (4.6 mg/ml) je bila slična eksperimentalno određenoj rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u FaSSIF-u (4.9 mg/ml). Oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida u FeSSIF-u u prisustvu cink-hlorida (slika 41a) je sporije i nakon 90 min oslobođeno je 24.1 % (pH ~ 5). Jedan od mogućih razloga za smanjeno oslobađanje ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta je i prisustvo velike koncentracije hloridnih jona (poreklom iz cink-hlorida i FeSSIF-a) koja može dovesti do taloženja ciprofloksacin-hidrohlorida iz

medijuma i uticati na brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta.



**Slika 41.** Profili brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta bez/ u prisustvu a) cink-hlorida, b) cink-sulfata, heptahidrata u vodi, FaSSIF i FeSSIF

**Fig. 41.** Ciprofloxacin tablet dissolution without/with addition of a) zinc chloride, b) zinc sulfate, heptahydrate in water, FaSSIF, FeSSIF

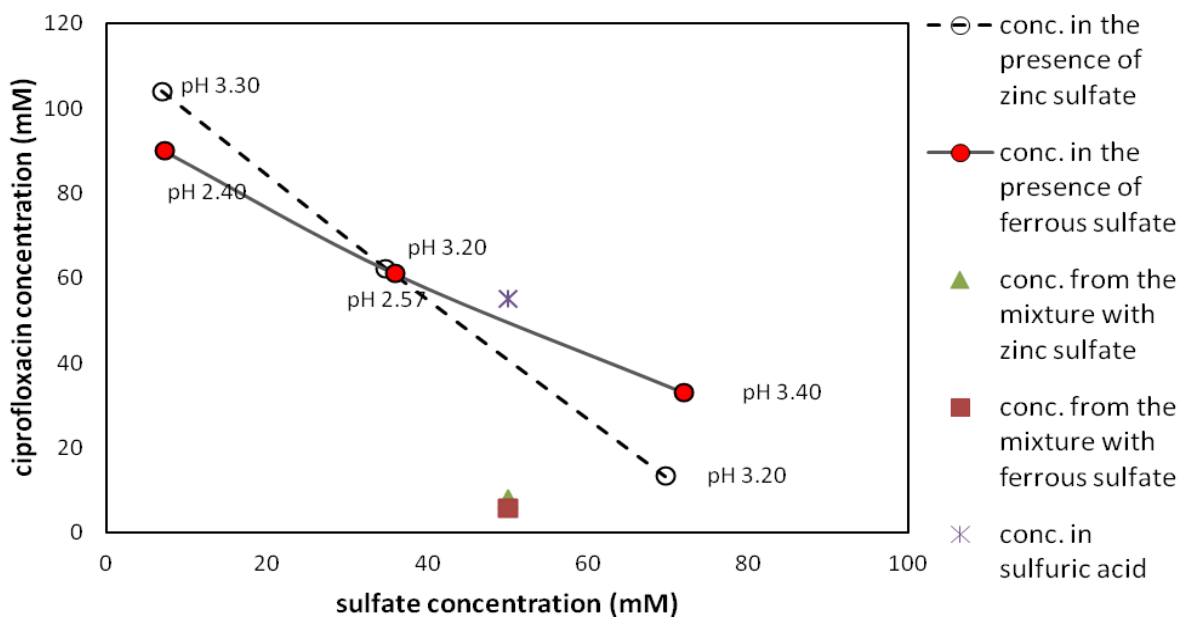
Prilikom ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu 147 mM cink-sulfata u vodi, brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta je bila značajno smanjena (20 %), što može biti uslovljeno građenjem kompleksa između ciprofloksacina i jona cinka. U FaSSIF-u je u prisustvu iste količine cink-sulfata nakon 90 minuta oslobođeno 73 % ciprofloksacin-hidrohlorida (pH vrednost medijuma na kraju ispitivanja je bila 3.19; slika 41b), što može biti uslovljeno sniženjem pH vrednosti (3.19 u odnosu na pH 5.30 kada je u medijumu prisutna samo tableta ciprofloksacin-hidrohlorida). U FeSSIF-u, dodatak cink-sulfata nije imao značajan uticaj na pH vrednost medijuma (pH 4.64), a nakon 90 minuta oslobodila se skoro celokupna količina ciprofloksacin-hidrohlorida (slika 41b). U toku prvih 5 minuta ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u FeSSIF-u u prisustvu cink-sulfata mogla se uočiti precipitacija, koja je praćena naknadnim bistrenjem medijuma u toku ispitivanja. Ako se pretpostavi da u FeSSIF-u dolazi do građenja ciprofloksacin-cink kompleksa, uočeni fenomen u toku ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-sulfata bi se mogao objasniti činjenicom da kompleks poseduje manju stabilnost ili je rastvorljiviji u FeSSIF-u.

### **Građenje kompleksa**

Pokušaj građenja kompleksa je izvršen mešanjem 0.05 M rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i 0.2 M rastvora cink-hlorida u različitim molarnim odnosima. U uzorku koji je sadržavao 25 mM ciprofloksacin-hidrohlorida i 100 mM cink-hlorida uočena je precipitacija i izolovan je beo kristalan talog koji je zatim analiziran. Kada su rastvori ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata pomešani u različitim molarnim odnosima, precipitacija je uočena u uzorku koji je sadržavao 25 mM ciprofloksacin-hidrohlorida i 50 mM cink-sulfata. Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru iznad taloga u prisustvu cink-hlorida je bila 3.8 mg/ml (pH 3.24), dok je u prisustvu cink-sulfata koncentracija bila 3.3 mg/ml (pH 3.4). Nađene koncentracije ciprofloksacin-hidrohlorida su slične, a može se uočiti da je potrebna dva puta veća količina cinka u obliku soli hlorida za postizanje ravnotežne rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida i formiranje precipitata. Cink-hlorid i cink-sulfat su lako rastvorljive soli cinka, pa potencijalan uzrok uočene razlike može biti različit proces njihove hidrolize. Prilikom

hidrolize cink-hlorida, u medijumu su, pored jona cinka i hlorida, prisutni hidratirani kompleksi  $ZnCl_xH_2O_{(4-x)}$  (176), dok cink-sulfat hidrolizom daje metalne komplekse  $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$  i sulfatne anjone (177). Čvrste faze nastale u toku mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata ili cink-hlorida su izolovane i analizirane pogodnim metodama (DSC, TGA; FTIR, difrakcija X-zraka).

Nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata precipitacija je uočena u uzorku koji sadrži 25 mM ciprofloksacin-hidrohlorida i 50 mM cinka-sulfata (slično, kao i u slučaju interakcije sa gvožđem, kada je precipitacija uočena u uzorku koji sadrži 25 mM ciprofloksacin-hidrohlorida i 50 mM gvožđe(II)-sulfata). Na slici 42 dat je grafički prikaz koncentracije ciprofloksacina u medijumu u zavisnosti od koncentracije sulfatnog anjona (poreklom iz cink-sulfata ili gvožđe-sulfata) prisutnog u medijumu sa podacima o koncentraciji rastvorenog ciprofloksacina u medijumu iznad taloga, kao i rastvorljivosti u sumpornoj kiselini.

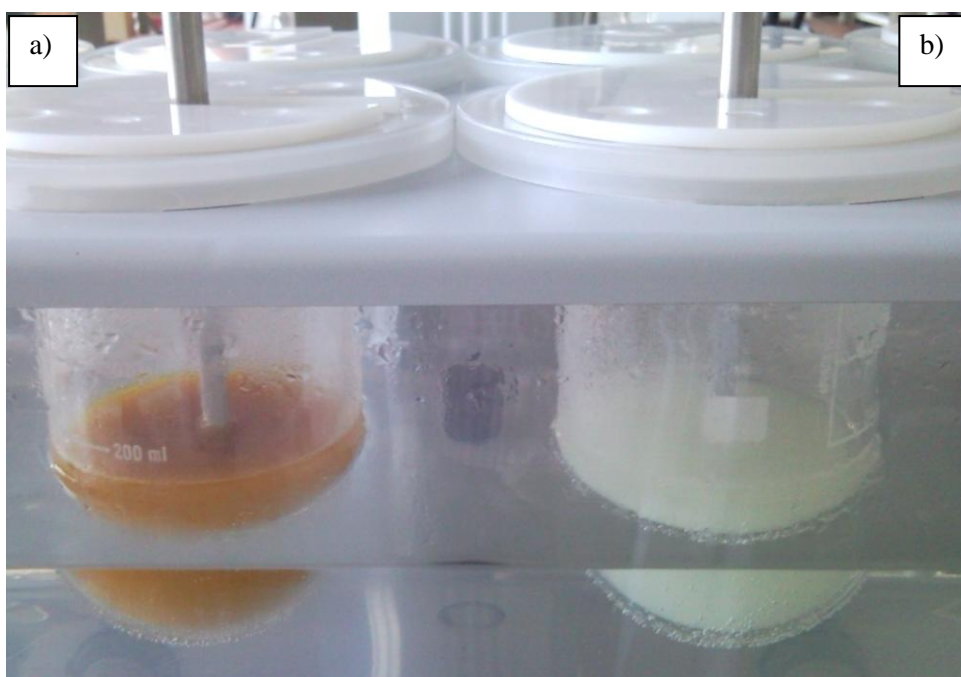


*Slika 42. Rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u zavisnosti od koncentracije sulfatnog anjona (poreklom iz gvožđe(II)-sulfata i cink-sulfata)*

*Fig. 42. Concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in media containing different sulfate concentrations (iron and zinc salts)*

Može se uočiti da je koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu cink-sulfata ili gvožđe(II)-sulfata oko 7 puta manja od rastvorljivosti u sumpornoj kiselini. Ciprofloksacin-hidrohlorid gradi sa gvožđe(II)-sulfatom slabo rastvorljiv kompleks (opisano u poglavlju 6.2.3). S obzirom da je slično ponašanje uočeno i u prisustvu jona cinka, može se pretpostaviti da ciprofloksacin-hidrohlorid pod istim uslovima gradi kompleks i sa jonom cinka.

Na slici 43 dat je izgled uzoraka u toku ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu gvožđe(II)-sulfata i cink-sulfata.



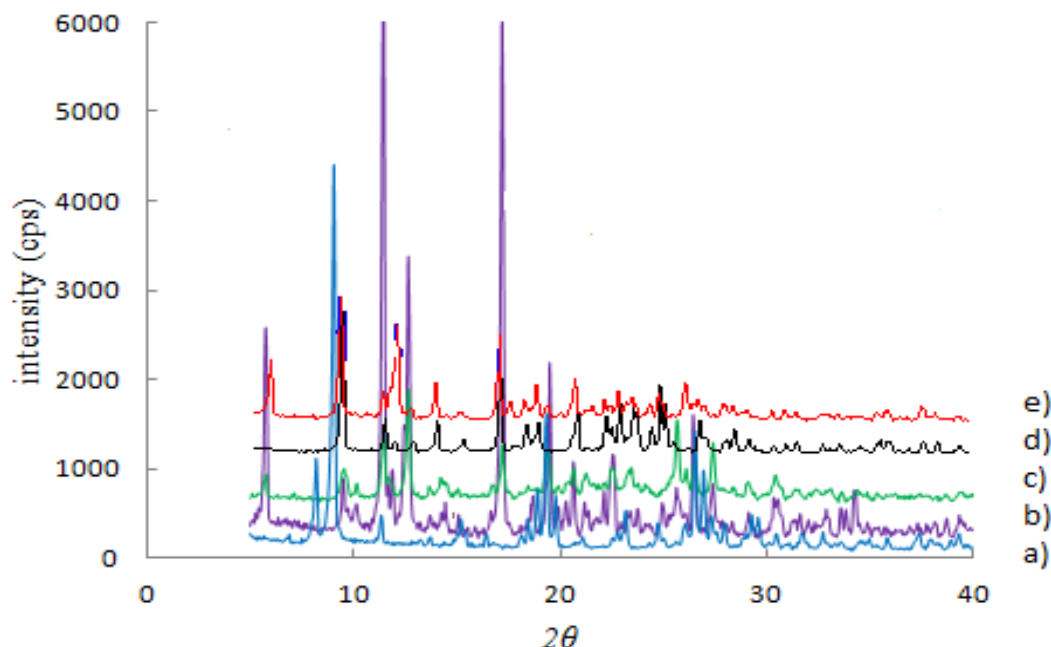
*Slika 43. Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi u prisustvu a) gvožđe(II)-sulfata ili b) cink-sulfata – izgled uzoraka*

*Fig. 43. Ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in water in the presence of a) ferrous sulfate or b) zinc sulfate added – samples appearance*

### **Karakterizacija čvrstih faza**

Rezultati karakterizacije čvrstih faza prikupljenih nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-hlorida i cink-sulfata su prikazani na slikama 44-46. Rezultati karakterizacije čvrstih faza prikupljenih nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida sa rastvorom cink-hlorida ili cink-sulfata su

pokazali da čvrste faze poseduju skoro identične karakteristike kao čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-hlorida ili cink-sulfata (slika 44-46).



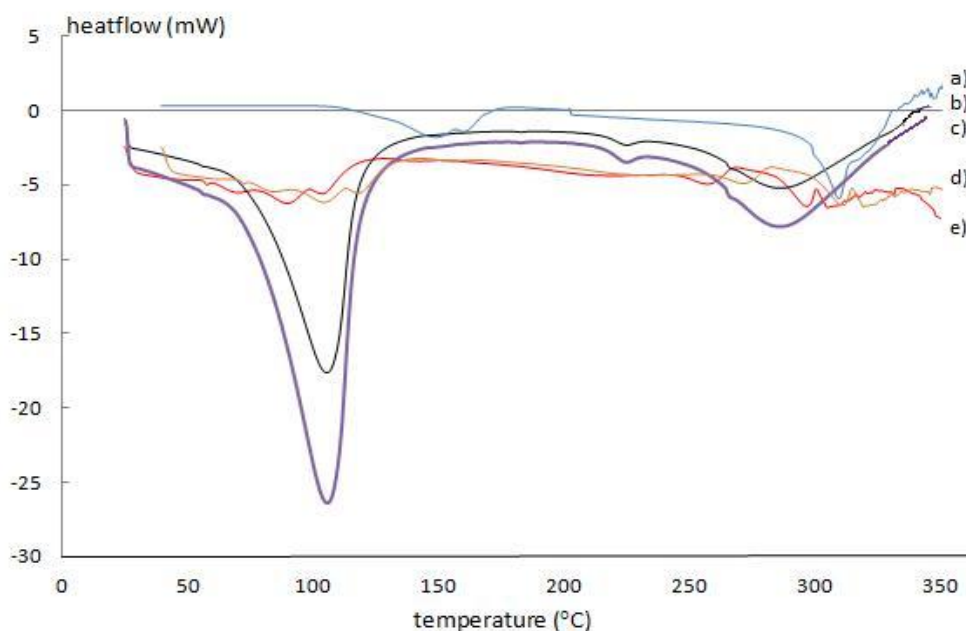
**Slika 44.** XRD spektri: a) ciprofloksacin-hidrohlolid; b) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-hlorida c) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu cink-hlorida, d) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu cink-sulfata, e) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata

**Fig. 44.** XRD scans of a) ciprofloxacin hydrochloride; b) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and zinc chloride, c) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution study in media containing zinc chloride, d) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution study in media containing zinc sulfate, e) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and zinc sulfate

U XRD difraktogramu čvrste faze izolovane nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-hlorida mogu se uočiti pikovi na oko 11.35, 12.60 i 17.15  $2\theta$  i difraktogram se razlikuje od difraktograma ciprofloksacin-hidrohlorida. U XRD difraktogramu čvrste faze izolovane nakon ispitivanja brzine



rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-sulfata uočavaju se pikovi na oko 9 i 17 2 $\theta$ , pri čemu se može uočiti da se i ovaj difraktogram razlikuje od difraktograma ciprofloksacin-hidrohlorida.



**Slika 45.** DSC spektri: a) ciprofloksacin-hidrohlorid b) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu cink-sulfata, c) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata, d) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata, e) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu cink-hlorida

**Fig. 45.** DSC scans of a) ciprofloxacin hydrochloride b) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution study in media containing zinc sulfate, c) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and zinc sulfate, d) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and zinc chloride, e) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution study in media containing zinc chloride

Termogravimetrijska analiza je ukazala na gubitak mase od 4.5 % u čvrstoj fazi prikupljenoj nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-hlorida. Ovaj gubitak mase odgovara gubitku dva molekula vode, što je u skladu sa rezultatima Zupančiča i sar. (95). U termogramima čvrstih faza može se uočiti slab endotermni pik na oko 90°C koji ukazuje na dehidraciju. Jak pik na oko 290°C

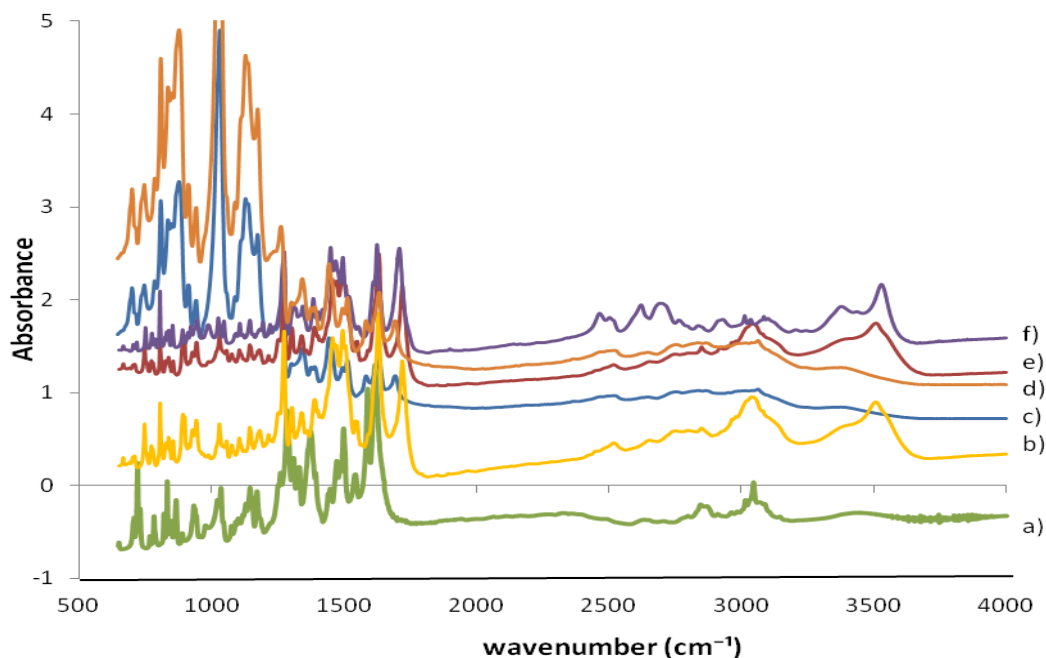
kome prethode dva slaba pika na 185°C i 246°C, praćeni daljim gubitkom mase ukazuju na pojavu termalne dekompozicije. Prema Zupanćiću i sar. (95), krajnji proizvod termalne razgradnje je cink-oksidi. Ako imamo u vidu da su endotermni pikovi ciprofloksacin-hidrohlorida i ciprofloksacin baze na 309°C, odnosno 270°C, može se uočiti da na tim temperaturama nema pojave pikova u termogramima čvrstih faza (slika 45). Termogravimetrijska analiza čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-sulfata je pokazala gubitak mase od 18.8 %, što ukazuje na dehidraciju i gubitak adsorbovane ili vezane vode. U termogramu se može uočiti jak endotermni pik na oko 100°C koji ukazuje na dehidraciju. Slab pik na oko 270°C praćen daljim gubitkom mase ukazuje na pojavu termalne dekompozicije. Takođe, kao i u čvrstoj fazi nastaloj i interakciji sa cink-hloridom, u termogramu čvrste faze nastale u interakciji sa cink-sulfatom nisu uočeni pikovi karakteristični za ciprofloksacin bazu i ciprofloksacin-hidrochlorid (slika 45).

U FTIR spektru čvrste faze izolovane nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-hlorida (slika 46) se mogu uočiti široke trake koje potiču od OH grupe (između 3450 i 3500  $\text{cm}^{-1}$ ) i dve trake sa oštrim pikovima na 1718 i 1629  $\text{cm}^{-1}$  koje potiču od karboksilne i ketonske grupe. Trake koje karakterišu karboksilnu i piridinsku keto grupu su malo pomerene ka višim talasnim dužinama, u odnosu na trake karboksilne i keto grupe kod ciprofloksacin-hidrohlorida (1709 i 1624  $\text{cm}^{-1}$ ).

U FTIR spektru čvrste faze izolovane nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta u prisustvu cink-sulfata (slika 46) se mogu uočiti dve trake sa oštrim pikovima na oko 1722 i 1629  $\text{cm}^{-1}$  koje potiču od vibracija karboksilne i ketonske grupe. Pik koji potiče od vibracije keto grupe je slab, što može ukazati da je došlo do deprotonizacije COOH grupe. Karakterističan je i širok i oštar pik koji potiče od vibracija sulfatne grupe i nalazi se na 1030  $\text{cm}^{-1}$ . Spektar se razlikuje od spektra ciprofloksacin-hidrohlorida, što može ukazati na nastanak nove jonske vrste.

U studiji Zupanćića i sar. (95) kompleks između ciprofloksacina i cinka je nastao mešanjem rastvora ciprofloksacina i cink-hlorida u odnosu 2:1 u vodenom medijumu i izolovani kompleks je opisan hemijskom formulom  $(\text{cfH}_2)_2(\text{ZnCl}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}$ . Na osnovu rezultata difrakcije X-zraka, termogravimetrijskih i spektrofotometrijskih metoda, može se pretpostaviti da je u interakciji između ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-hlorida

došlo do građenja slabo rastvorljivog kompleksa koji je istog sastava kao kompleks koji su izolovali Zupančič i sar. (95).



*Slika 46. FTIR spektri: a) ciprofloksacin baza; b) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-hlorida, c) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu cink-sulfata, d) čvrsta faza prikupljena nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata, e) čvrsta faza prikupljena nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu cink-hlorida, f) ciprofloksacin-hidrohlord*

*Fig. 46. FTIR scans of a) ciprofloxacin base; b) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and zinc chloride, c) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution study in media containing zinc sulfate, d) solid phase collected from mixture containing ciprofloxacin hydrochloride and zinc sulfate, e) solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution study in media containing zinc chloride, f) ciprofloxacin hydrochloride*

Zupančič i sar. (95) su izolovali dva kompleksa ciprofloksacina i cink-sulfata,  $(\text{cfH}_2)_2(\text{ZnCl}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}$  i  $(\text{Zn}(\text{cf})_2) \times 3\text{H}_2\text{O}$ . Prema njihovim rezultatima, vibracija koja potiče od keto grupe karboksilne kiseline se ne može uočiti na spektru u regionu 1800-

1500  $\text{cm}^{-1}$ . U čvrstoj fazi prikupljenoj nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu cink-sulfata, pik koji potiče od vibracija karboksilne grupe postoji, ali je slabog intenziteta (slika 46). Određivanje sastava čvrste faze je ukazalo na prisustvo 58 % ciprofloksacina, 4 % cinka, 11.7 % sulfata i 4.5 % hlorida, dok je TGA analiza ukazala na gubitak mase koji odgovara gubitku 12 molekula vode. Rezultati ispitivanja interakcije ciprofloksacina i gvožđe(II)-sulfata su pokazali da, između ciprofloksacina i jona gvožđa, dolazi do građenja slabo rastvorljivog kompleksa čija je hemijska struktura  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ . Imajući u vidu rezultate ispitivanja interakcije ciprofloksacina i jona cinka, potencijalni mehanizam interakcije je i u ovom slučaju, građenje slabo rastvorljivog kompleksa. Detaljna analiza XRD difraktograma i FTIR spektara izolovanih čvrstih faza nakon interakcije ciprofloksacina sa gvožđe(II)-sulfatom i cink-sulfatom, ukazuje na to da su strukture kompleksa sa gvožđem i sa cinkom istog tipa i da kompleks sa cinkom ima istu hemijsku strukturu kao kompleks sa gvožđem, pa se može predložiti sledeća hemijska stuktura kompleksa sa cinkom  $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ . Turel (80) je objavio da cink može da gradi sa norfloksacinom kompleks istog tipa kao norfloksacin sa bakrom, tako da građenje ovakvih kompleksa jona metala sa fluorinolonima nije neuobičajeno.

## 6.2 *In vitro* study

Formation of nonabsorbable complexes has been postulated as the potential mechanism of ciprofloxacin-metallic cations interaction observed *in vivo* (13-17), although it is suggested that changes in solubility may also play a role (14). Published data related to ciprofloxacin complexation and solubility in the presence of metallic compounds are somewhat contradictory. Although ciprofloxacin tablet dissolution has been shown to be retarded, some solubility studies reported an increased solubility or no effect in the presence of divalent or trivalent cations (49, 51, 84, 97, 98, 149, 156). Numerous ciprofloxacin-metallic cations complexes have been isolated but the biopharmaceutical relevance of these studies is questionable as the complexes described were isolated, mainly, from non-aqueous media.

Ciprofloxacin solubility can be affected by changes in media pH, complexation and common ion effect. Ciprofloxacin hydrochloride solubility and tablet dissolution in the reactive media containing different amounts of metallic compound added, as well as characterisation of the solid phases generated from the interaction media, may help in identification of critical factors and mechanism that impair ciprofloxacin absorption *in vivo*.

### 6.2.1 Ciprofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride solubility study

Solubility studies of ciprofloxacin base and ciprofloxacin hydrochloride were performed in water, 0.1 M HCl, 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and physiologically based media (FaSSIF and FeSSIF). In Fig. 9, experimentally determined ciprofloxacin base and ciprofloxacin hydrochloride solubility in various media were plotted against the theoretical ciprofloxacin pH-solubility profile. Ciprofloxacin hydrochloride solubility in water, phosphate buffer pH 6.8, FaSSIF and FeSSIF was determined to be 42 mg/ml (109 mM; final pH 4.0), 0.117 (0.3 mM, final pH 6.8), 4.9 mg/ml (13 mM; final pH 5.2) and 16.4 mg/ml (final pH 4.7), respectively. Solubility of ciprofloxacin base in water, FaSSIF and FeSSIF was determined to be 0.099 mg/ml (0.3 mM; final pH 7.0), 0.34 mg/ml (1 mM; final pH 6.5) and 3.3 mg/ml (9.97 mM; final pH 5.0), respectively. Solubility of ciprofloxacin base in water and ciprofloxacin hydrochloride in pH 6.8 are similar, so having in mind pH dependent drug solubility, it is likely that ciprofloxacin precipitate at pH 6.8. Ciprofloxacin hydrochloride solubility in 0.1 M HCl was determined to be 12.68 mg/ml (33 mM). Presence of common chloride anion in media may suppress ciprofloxacin dissociation which resulted in significant decrease in solubility in 0.1 M HCl compared to solubility obtained in aqueous medium. Ciprofloxacin hydrochloride solubility in 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was determined to be 21.2 mg/ml (55 mM), indicating possible formation of ciprofloxacin sulfate salt which is less soluble than hydrochloride salt.

Ciprofloxacin hydrochloride solubility in FaSSIF and FeSSIF was notably lower than that observed in water, while experimentally obtained solubility of ciprofloxacin base was

approximately three times higher in physiologically based media compared to its theoretical solubility at relevant pHs. Although ciprofloxacin solubility is to a great extent influenced by pH, the observed effect of physiologically based media could not be solely attributed to the differences in media pH values, and other factors, such as different buffer capacities and amount of surface active substances present, may also contribute. In addition, presence of common chloride anion in FaSSIF and FeSSIF media may suppress ciprofloxacin dissociation which resulted in decrease in solubility in FaSSIF and FeSSIF compared to solubility obtained in aqueous medium. Taking into account ciprofloxacin pKa values (i.e. 6.16 and 8.62) and the two protonation steps, it is expected that at the FaSSIF media pH value (i.e. 6.5), drug is mainly present as zwitterion, while in FeSSIF (pH 5.0) positively charged form predominates. Ottaviani et al (164) emphasized that solubility of investigated compounds is higher in FaSSIF than in relevant phosphate buffer and that positively charged components were better solubilized due to favorable electrostatic interactions. When compared to the data set reported by Ottaviani et al (164), the ratio of experimentally obtained values in the current study and theoretical ciprofloxacin solubility at relevant pH was relatively high (i.e. 13 vs 0.3 mM). Such findings also indicate that solubility is not limited by intermolecular interactions, but mainly by compound lipophilicity.

### **6.2.2 Ciprofloxacin tablet dissolution**

Dissolution profiles of ciprofloxacin hydrochloride tablets in the standard paddle apparatus with 900 ml of media and mini paddle apparatus with 250, 150 or 50 ml media are presented in Fig. 10.

Ciprofloxacin dissolution profiles obtained in different apparatuses and volume of media are comparable which may indicate that hydrodynamic changes or changes in media volume have no influence on ciprofloxacin dissolution from tablets (Fig. 10). The results obtained indicate that small volume dissolution experiments may be useful for performing biorelevant dissolution tests. Such results are in accordance with findings reported by Takano et al. (165) emphasizing the importance of mini scale dissolution studies in biopharmaceutical drug characterisation. The results of ciprofloxacin tablet dissolution in mini paddle apparatus with 50 ml of various media (water, 0.1 M HCl, pH 4.5, USP phosphate buffer pH 6.8, FaSSIF and FeSSIF) are shown in Fig. 11. In the majority of cases studied, relatively fast initial dissolution can be observed followed by the “plateau” phase after 10 minutes of investigation. However, the amount of ciprofloxacin dissolved in the “plateau” phase differed markedly depending on the dissolution media used. Ciprofloxacin dissolution in water, 0.1 M HCl and acetate buffer pH 4.5 was rapid and complete, while dissolution in pH 6.8 was reduced indicating that the effect observed could be attributed to media pH value (solubility limited dissolution).

Total percent ciprofloxacin dissolved in FaSSIF and FeSSIF were 57 (final pH 5.3) and 94.7 % (final pH 5.05). Final ciprofloxacin concentration in the FaSSIF was 5.7 mg/ml and that was

close to the experimentally determined ciprofloxacin hydrochloride solubility in FaSSIF. Although, ciprofloxacin dissolution in FaSSIF and phosphate buffer pH 6.8 media are solubility limited, ciprofloxacin dissolution in FaSSIF was slightly enhanced due to presence of lecithin and tauroholic salt.

### **6.2.3 *In vitro* study of ciprofloxacin iron interaction**

The retardation of ciprofloxacin absorption when co-administered with iron salts (sulfate, fumarate, gluconate) is well documented (14-16, 133). Some authors use iron(III) salts in *in vitro* investigation of ciprofloxacin-iron interaction, but biopharmaceutical relevance of such studies is questionable because preparations used *in vivo* contain only iron(II) salts. In this chapter, ciprofloxacin-iron interaction is investigated *in vitro* by performing solubility and dissolution studies in the reactive media containing ferrous sulfate, ferrous fumarate or ferrous gluconate.

#### **6.2.3.1 *In vitro* study of ciprofloxacin-ferrous sulfate interaction**

##### **Solubility study**

Solubility studies in water and reactive media containing 7.2, 36 and 72 mM ferrous sulfate were performed using ciprofloxacin hydrochloride salt and/or ciprofloxacin base. Drug solubility was notably reduced in the presence of ferrous sulfate (Table 7). The more than threefold decrease of ciprofloxacin hydrochloride concentration in solution was observed in media containing 72 mM ferrous sulfate. Ciprofloxacin base solubility in water was found to increase in media containing ferrous sulfate, consistent with the findings of Žakelj et al. (149) and Eboka et al (150). The concentration of ciprofloxacin in solution (with final pH values) determined in the reactive media containing different amounts of ferrous sulfate is presented in Fig. 12. The results obtained indicate that decreased ciprofloxacin concentration in reactive media is not just a pH related effect.

##### **Dissolution study**

Ciprofloxacin tablet dissolution profiles obtained in different volumes of media with/without ferrous sulfate added are presented in Fig. 13. Taking into account that the results obtained from solubility studies in reactive media containing different amounts of ferrous sulfate indicate that ciprofloxacin-iron interaction occurs at relatively high drug concentrations, three ciprofloxacin tablets and an equivalent of three doses of iron were added to each of the dissolution media volumes investigated. The relevant ciprofloxacin/iron molar ratio was 1.2 with the actual concentrations of ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate being 5 and 6 mM, 18 and 21 mM and 30 and 36 mM in dissolution media volume of 900 ml, 250 ml and 150 ml, respectively.

While drug interaction was not evident from the standard, high volume, dissolution vessel, in the

mini scale apparatus, with the media volume of 150 ml, decreased ciprofloxacin dissolution was observed. Dissolution study was also conducted with single tablet in 50 ml media. The extent of ciprofloxacin dissolution was reduced to 43.5 %, which was close to the data obtained with three doses added to 150 ml media. The results obtained indicate that small volume dissolution experiments may be useful for performing biorelevant dissolution tests predictive of certain physicochemically based drug interactions occurring in the gastrointestinal lumen. Such results are in accordance with findings reported by Takano et al. (165). Also, these results are consistent with findings suggesting that *sink* conditions are not always requested to reflect the *in vivo* situation (47). Ciprofloxacin tablet dissolution profiles in 50 ml water as dissolution media with different amounts of ferrous sulfate added are presented in Fig. 14. Increased amounts of ferrous sulfate in the dissolution medium resulted in markedly reduced ciprofloxacin tablet dissolution.

Ciprofloxacin dissolution in water and physiologically based media (FaSSIF, FeSSIF) in the presence of ferrous sulfate is shown in Fig. 15. Ferrous sulfate was added to each vessel concomitantly with ciprofloxacin tablet in dose corresponding to that used in the *in vivo* study. Total percent ciprofloxacin dissolved was 63 % (final pH 4.5) in FaSSIF media containing ferrous sulfate and it was slightly higher compared to FaSSIF without ferrous sulfate addition. Final ciprofloxacin concentration in FaSSIF dissolution media was 6.3 mg/ml and was slightly higher than the experimentally determined ciprofloxacin hydrochloride solubility in FaSSIF (i.e 4.9 mg/ml). Initial drug dissolution (first 15 minutes) observed upon addition of ferrous sulfate in both water and FaSSIF were superimposable, while total amount of ciprofloxacin dissolved in FaSSIF was somewhat higher than that observed in water. Total percent ciprofloxacin dissolved was 42 % (pH 5.0) in FeSSIF media containing iron compound.

### **Complex formation**

When solutions of 0.05 M ciprofloxacin hydrochloride and 0.1 M ferrous sulfate were mixed in different volumetric ratios, immediate coloration was observed followed by some precipitation, with the most abundant precipitation in the mixture containing 25 mM ciprofloxacin hydrochloride and 50 mM ferrous sulfate. Ciprofloxacin concentration in the solution above the precipitate was found to be 2.2 mg/ml (pH 2.8).

Sanchez et al. (84) investigated the interaction of ciprofloxacin with ferrous nitrate and found that the crystals formed in ciprofloxacin solutions contained the anion forming the metal salt, but no metallic cations. However, they used relatively low ciprofloxacin and iron concentrations and it may be presumed that in the presence of low concentrations of interaction compounds complex formation was not possible. In the present study, depending of the actual ratio of the interacting components, ciprofloxacin solubility in the presence of ferrous sulfate was decreased indicating that interaction occurred. This, as well as the yellow coloration observed in the reactive media containing ferrous ion, indicated formation of a new ionic species.



Solubility of this new species was almost 20-fold lower than that of ciprofloxacin hydrochloride. Incomplete ciprofloxacin absorption in the presence of iron, in spite of the relatively low dose/solubility ratio of ciprofloxacin–iron complex, could implicate a limited fluid volume available at the site of absorption, limiting its dissolution. Relevant drug concentrations that could be expected *in vivo*, taking into account the intestinal fluid volume range of 10–350 ml (166-168) could be as high as 150 mM. Transport to intestinal regions with increased pH values would cause ciprofloxacin to precipitate, thus limiting its absorption to a relatively short segment of the intestine. It can be postulated that, following concomitant drug administration, excess iron is present in the gastrointestinal lumen, causing less soluble complex formation and thus limiting ciprofloxacin absorption and its bioavailability.

### **Solid state characterisation**

The solid phases generated from the interaction mixture of ciprofloxacin hydrochloride solution and ferrous sulfate solution as well as that collected from the dissolution study in the reactive media containing ferrous sulfate were examined by powder XRD, DSC, TGA, and FTIR and results are presented in Fig. 17-19.

X-ray diffraction scan of the solid phase collected from the mixture of ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate solutions showed a very prominent peak at 9.40  $2\theta$  and the diffractogram was different than those of ciprofloxacin base and the hydrochloride salt (Fig. 17). The sample obtained from the ciprofloxacin tablet dissolution study was crystalline, although the peak intensities did not exceed 1500 cps, in contrast to the precipitate obtained from ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate solutions interaction (Fig. 17). The decrease in peak intensities may be due to a reduction in the crystalline fraction of the precipitate caused by the presence of tablet excipients. The solid phase collected from mixture of ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate solution exhibited a 19.5 % mass loss (by TGA) in the temperature range corresponding to a broad endothermic peak seen by DSC with a peak at approximately 115°C (Fig. 18). This was followed by a broad and weak endotherm peaking at approximately 227°C associated with a mass loss by TGA, indicating thermal decomposition. In contrast, thermogravimetry of ciprofloxacin hydrochloride showed approximately 6.9 % mass loss corresponding to crystalline and adsorbed water removal. A melting endotherm for ciprofloxacin hydrochloride was seen in DSC at approximately 309°C, whereas that of base appeared at approximately 270°C (Fig. 18). No thermal events of ciprofloxacin salt or base were observed in the thermogram of the precipitate. Thermal analysis of the solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of ferrous sulfate showed a major endothermic event peaking at approximately 110°C preceded by a minor endotherm with an onset at approximately 54°C (Fig. 18). These two processes were accompanied by a mass loss of approximately 16.6 % and attributed to adsorbed/crystalline water evaporation. Another, broad but weak, endotherm appeared at approximately 214°C (peak temperature) and it was associated with a further continuous mass loss, indicating thermal decomposition. The FTIR

spectrum of the solid phase collected from ciprofloxacin tablet/dissolution in the reactive media containing ferrous sulfate was nearly identical to the solid phase collected from the mixture of ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate solution and was characterized by a broad and irregular in shape peak with a maximum at  $3416\text{ cm}^{-1}$ , most likely of OH stretch vibrations of water molecules. Two peaks at  $1701$  and  $1630\text{ cm}^{-1}$  ascribed to the carboxylic and ketone groups, respectively, were observed. FTIR of ciprofloxacin hydrochloride show two peaks at  $1709$  and  $1624\text{ cm}^{-1}$ , respectively (Fig. 19). It was observed earlier that fluoroquinolones are able to coordinate to metals, for example, copper ions through the carbonyl group attached to the ring and oxygen of the ionized carboxylic group (82). This type of direct coordination is, however, not supported by the FTIR analysis and the carboxylic peak is still visible. Therefore, it is likely that ciprofloxacin binds to the ferrous ion as cation formed by protonation of the piperazine ring and forms an outer-sphere complex. Another interesting and characteristic band is a broad and strong peak at  $1103\text{ cm}^{-1}$  assigned as the  $\text{SO}_4^{2-}$  vibrations (Fig. 19).

Quantitative analysis of the solid phases collected from the ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate solution mixture and after dissolution show ciprofloxacin content of ~ 60 %, 5 % iron, and approximately 19 % water. The relevant amount of the sulfate was 15 % and that of chloride ion was 5 %. On the basis of the results of quantitative analysis presented above, the probable chemical structure of the ciprofloxacin–iron complex obtained in this study is  $\text{Fe}(\text{SO}_4^{2-})_2(\text{Cl}^-)_2(\text{cf})_2 \times (\text{H}_2\text{O})_n$ , where n is up to 12 molecules of water.

#### **6.2.3.2 *In vitro* study of ciprofloxacin ferrous gluconate/ferrous fumarate interaction**

Literature *in vivo* data reported reduced ciprofloxacin bioavailability in the presence of ferrous gluconate and ferrous fumarate (15, 133).

#### **Solubility study**

Concentrations of ciprofloxacin dissolved in media containing increasing amounts of ferrous fumarate or ferrous gluconate are shown in Table 8 and 9, respectively and in Fig. 20. In all the interaction studies, instantaneous formation of yellow or orange-brown color upon contact of ciprofloxacin and ferrous salts occurred. Ciprofloxacin solubility was not affected in the presence of ferrous gluconate, nevertheless of the yellow coloration observed. However, in the case of ciprofloxacin-ferrous fumarate interaction certain decrease in the amount of drug dissolved was observed in media containing 118 mM of ferrous fumarate (concentration of ciprofloxacin hydrochloride found was ~70 mM).

#### **Dissolution study**

Having in mind that ciprofloxacin-iron interaction occurs at relatively high drug concentrations in small volume of media, dissolution studies of ciprofloxacin tablets with ferrous gluconate/ferrous

fumarate addition were performed in mini paddle apparatus using 50 ml of water as medium. Ciprofloxacin dissolution profiles in the presence of 100 mg of iron as ferrous sulfate (496 mg), ferrous gluconate (829 mg) and ferrous fumarate (303 mg) are shown in Fig. 21.

Ciprofloxacin dissolution profile in media containing ferrous gluconate was almost superimposable with that observed in water (final pH 4.24). Cumulative amount of drug dissolved was reduced by 10 % (final pH 4.14) in the presence of ferrous fumarate. When ferrous fumarate was added to the dissolution media, it remained suspended. On the contrary, freely soluble ferrous gluconate added to the dissolution media dissolved rapidly. It should be noted that slightly soluble ferrous fumarate tended to cone at the bottom of the vessel thus preventing contact of ciprofloxacin tablet with the dissolution medium and that could be partially responsible for the overall reduction of ciprofloxacin dissolution observed. *In vivo* data reported 70 % reduced ciprofloxacin bioavailability in the presence of ferrous fumarate. *In vitro* ciprofloxacin-ferrous fumarate interaction was not observed and one of the reasons can be also limited solubility of fumarate salt in water.

Ciprofloxacin bioavailability was reduced by 46 % and 67 % in the presence of ferrous sulfate and ferrous gluconate, respectively (15). *In vitro* interaction between ciprofloxacin and ferrous sulfate resulted in low soluble complex formation, while ciprofloxacin interaction with ferrous gluconate was not observed. Ciprofloxacin salts formed with organic acids are more soluble than ciprofloxacin salts with inorganic acids (169). According to the results obtained it is possible that the gluconate excess can “solubilise” the system shifting the balance towards more soluble species forming a soluble salt that prevents complex formation.

#### **6.2.4 *In vitro* study of ciprofloxacin aluminium interaction**

Literature *in vivo* data report on the reduced ciprofloxacin bioavailability when co-administered with aluminium hydroxide containing preparations (136). Results obtained from *in vitro* studies showed increased ciprofloxacin solubility in the presence of aluminium-chloride resulting in soluble complex formation (98, 153, 154), while ciprofloxacin dissolution was retarded in the presence of aluminium hydroxide (97, 156, 157).

In this chapter, ciprofloxacin-aluminium interaction was investigated *in vitro* by performing relevant solubility and dissolution studies. Undissolved solid phase collected after ciprofloxacin tablet dissolution in media containing aluminium hydroxide, as well as solid phase collected after evaporation from the filtered dissolution media were characterized by XRD, DSC, TGA and FTIR in order to identify the nature of ciprofloxacin-aluminium interaction observed *in vivo*.

##### **Solubility study**

Concentrations of ciprofloxacin dissolved in the reactive media containing aluminium chloride, hexahydrate or aluminium hydroxide are presented in Fig. 22, Tables 10 and 11. Literature data indicate that solubility of ciprofloxacin base is increased in the presence of aluminium chloride

(149, 150, 153). Our results show that solubility of ciprofloxacin hydrochloride is decreased in the reactive media containing 41.5 mM (10 mg/ml) of aluminium chloride (Fig. 22). Addition of aluminium chloride lead to a decrease in media pH, ranging from 1.19 to 1.44, but the observed change in media pH is not responsible for reduced ciprofloxacin solubility (having in mind its pH dependent solubility profile). When ciprofloxacin hydrochloride solution is mixed with aluminium chloride, addition of chloride ion in concentration of 124 mM may decrease the solubility of ciprofloxacin hydrochloride, as the reaction will shift toward the left (toward the reactants). Shifting the equilibrium toward the reactants causes ciprofloxacin hydrochloride to precipitate. Calculation is given in footnote (page 87). Ciprofloxacin hydrochloride solubility product is  $1.2 \times 10^{-2} \text{ mol}^2/\text{l}^2$ . In calculations like this, it can be assumed that the concentration of the common chloride ion is entirely due to aluminium chloride. Calculated ciprofloxacin hydrochloride solubility in the presence of 124 mM of chloride ion is 97.7 mM which was lower than experimentally obtained ciprofloxacin solubility in water (i.e 109 mM). It can be suggested that presence of chloride ion in concentration higher than 124 mM may affect ciprofloxacin solubility.

The amount of ciprofloxacin hydrochloride in solution was reduced in the reactive media containing aluminium hydroxide. However, media pH values observed in the case of aluminium hydroxide (ranging from 4.5 to 4.9) and the data in Fig. 22 indicate that the effect observed is not just a pH related effect.

Aluminium hydroxide remains undissolved in media and may act as a physical barrier preventing ciprofloxacin dissolution. Furthermore, aluminium hydroxide adsorption properties may also contribute.

### **Dissolution study**

Ciprofloxacin dissolution profiles in water and reactive media containing 2 g of aluminium chloride, hexahydrate (166 mM of aluminium) and 1.8 g of aluminium hydroxide (462 mM of aluminium) are shown in Fig. 23.

Ciprofloxacin dissolution in media containing aluminium chloride was somewhat slower when compared to water, although more than 85 % drug was dissolved in 30 minutes (final media pH 1.44). Ciprofloxacin hydrochloride solubility can be affected by common ion effect, so that might be a reason for slower ciprofloxacin dissolution observed in the presence of aluminium chloride in the first 20 minutes. *In vitro* ciprofloxacin interaction with aluminium chloride resulting in soluble complex formation is described in the literature (98, 149, 153) but the biopharmaceutical relevance of these studies is questionable because aluminium chloride is not used as a dietary supplement or antacid.

Ciprofloxacin dissolution profile in media containing 1.8 g aluminium hydroxide was almost superimposable with that observed in water. The amount of aluminium hydroxide added was equal to dose of aluminium hydroxide used *in vivo* (136), but in the present *in vitro* study, interaction was not observed. It might be hypothesized that, consistent to the results of Breda et

al (98), ciprofloxacin hydrochloride forms highly soluble/low permeable complex with aluminium. Ciprofloxacin tablet dissolution profiles in water containing different amounts of aluminium hydroxide are presented in Fig. 24. Ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of aluminium hydroxide was, generally, not affected, irrespective of the amount of the hydroxide added (i.e. 500-3400 mg). Literature data (97) reported 20 % reduced ciprofloxacin dissolution in media pH 6 containing 7 g of aluminium hydroxide. Aluminium hydroxide did not dissolve in water and the excess solid phase preventing tablet dissolution might be responsible for somewhat slower and incomplete ciprofloxacin dissolution observed at the highest dose of hydroxide added (pH value 4.9). In this case, concentration of ciprofloxacin dissolved was approx. 7.5 mg/ml (while its solubility determined in media containing the same amount of aluminium hydroxide was approx. 24 mg/ml) indicating that other factors/mechanisms may also be involved. Ciprofloxacin dissolution profiles in water and physiologically based media without/with 1.8 g of aluminium hydroxide added are presented in Fig. 25.

Total percent ciprofloxacin dissolved and media pH values were 85 (pH 4.95), 72.5 (pH 4.95), 56 (pH 5.36) in water, FeSSIF and FaSSIF containing aluminium hydroxide, respectively. Final ciprofloxacin concentration in FaSSIF was 5.3 mg/ml and it was close to the experimentally determined ciprofloxacin hydrochloride solubility in FaSSIF (i.e 4.9 mg/ml). Drug dissolution in the FeSSIF in the presence of aluminium hydroxide was somewhat slower compared to water, probably because of higher viscosity of FeSSIF. On the contrary, drug dissolution in the FaSSIF containing aluminium hydroxide was almost superimposable to that in pure media.

### **Solid state characterisation**

Results of solid state characterisation of the solid phase collected from the dissolution vessel after performing ciprofloxacin tablet dissolution in water and solid phase collected after evaporation of dissolution media in the presence of aluminium hydroxide are presented in Fig. 27-29.

The XRD scans presented in Fig. 27 indicate that in the solid phase collected from dissolution vessel, only excess aluminium hydroxide was found and XRD scan was similar to the scan of aluminium hydroxide reported in the literature (170). The XRD pattern of the sample collected after evaporation of dissolution media was similar to diffractogram of ciprofloxacin hydrochloride.

The solid phase collected from the dissolution vessel of ciprofloxacin hydrochloride tablet in reactive media containing aluminium hydroxide had two distinct endothermic events with onsets at 240°C and 300°C (Fig. 28). TGA revealed a weight loss of 0.5 % up to 100°C and then a rapid mass loss was observed starting at ~ 220°C and that was consistent with DSC and TGA scans of aluminium hydroxide found in the literature (170, 171). The DSC thermogram of the solid phase recovered after evaporation of dissolution media showed a broad endotherm at 153°C followed by another endotherm with an onset at 305°C and was similar to DSC scan of ciprofloxacin hydrochloride. TGA revealed a weight loss of 7.5 % up to 170°C indicating a

hydrated nature of this solid.

FTIR studies (Fig. 29) led to the conclusion that solid phase collected after evaporation of media was ciprofloxacin hydrochloride monohydrate as its spectrum fully overlapped with the spectrum of ciprofloxacin hydrochloride. The FTIR scan of solid phase collected from dissolution vessel was identified as aluminium hydroxide (170-173). The results obtained indicate that interaction study with aluminium hydroxide did not result in new species formation.

Ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in water in reactive media containing aluminium hydroxide in the mini paddle apparatus is shown in Fig. 27.

### **6.2.5 *In vitro* study of ciprofloxacin calcium interaction**

Reduced ciprofloxacin bioavailability when co-administered with calcium carbonate containing preparations was documented in *in vivo* studies (136, 146). Formation of nonabsorbable complexes, adsorption and change of conditions in the gastro-intestinal tract (pH, ion strength, individual ion concentrations, protein binding, motility) that lead to ciprofloxacin precipitation were postulated as the potential interaction mechanisms (61, 136, 156). *In vitro* data related to ciprofloxacin solubility (149) and dissolution studies (49, 156, 157) in the presence of calcium compounds are somewhat contradictory. Ciprofloxacin tablet dissolution has been shown to be retarded in the presence of calcium carbonate (156, 157), while some solubility studies indicate increased ciprofloxacin solubility in the presence of calcium chloride (149). In the present study, ciprofloxacin calcium interaction was investigated *in vitro* by performing solubility and dissolution studies in the reactive media containing calcium chloride and calcium carbonate.

#### **Solubility study**

Concentrations of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in the reactive media containing calcium chloride and calcium carbonate are presented in Table 12 and 13, respectively, and in Fig. 30. Although pH values of equilibrated samples in media containing chloride salt were similar to that observed in water, ciprofloxacin hydrochloride solubility in media containing 68 and 136 mM of calcium chloride was reduced to 40 and 7.4 mM, respectively. Ciprofloxacin hydrochloride solubility can be affected by common ion effect. Calculated ciprofloxacin solubility in the presence of 272 mM of chloride (footnote, page 104) was found to be 44 mM indicating that presence of high concentration of chloride in media may decrease ciprofloxacin solubility. Experimentally obtained ciprofloxacin hydrochloride solubility in reactive media containing 272 mM of chloride was somewhat lower than calculated value (i.e 8 vs 44 mM). Addition of carbonate salt increased pH value above 6 of the investigated samples and that might be potential reason for reduced ciprofloxacin solubility in the presence of calcium carbonate. Ciprofloxacin solubility is limited at pH values higher than 6 resulting in ciprofloxacin base precipitation.

### Dissolution study

Ciprofloxacin dissolution profiles in water without/with 2 g (272 mM) calcium chloride and 3.4 g (680 mM) calcium carbonate added are shown in Fig. 31. Freely soluble calcium chloride added to the dissolution media dissolved rapidly, but calcium carbonate remained undissolved. Ciprofloxacin dissolution in media containing calcium chloride was reduced to 30 % (final pH 3.8) probably because ciprofloxacin solubility was affected by the presence of high concentration of chloride ion. Cumulative amount of drug dissolved was reduced to 8.3 % in the presence of calcium carbonate. Addition of carbonate salt increased media pH to 7.2, so ciprofloxacin dissolution was affected by the limited solubility at that pH value.

Ciprofloxacin dissolution profiles in reactive media containing different amounts of calcium carbonate are presented in Fig. 32. Upon addition of poorly soluble calcium carbonate, initially fast drug dissolution was followed by a notable reduction in the percent of drug dissolved, reaching a maximum of ~ 20%. Ciprofloxacin dissolution profiles in the presence of different amounts of calcium carbonate exhibited obvious phase transformation during the first 30 minutes of investigation. In this case, media pH value increased, resulting in pH 7.3 and pH 7.2 in media containing 500 and 3400 mg calcium carbonate, respectively. In order to identify potential phase changes resulting from the interaction, characterisation of the solid phases collected from the dissolution vessel following ciprofloxacin tablet dissolution in water in the presence of calcium carbonate was performed.

In the study of Frost et al (136) ciprofloxacin tablet was administered with four 850-mg calcium carbonate tablets. The relative bioavailability of ciprofloxacin when given with calcium carbonate was approximately 60 % of the control value. Dissolution study in water was performed using the amount of calcium carbonate (3400 mg) reflecting dose administered in the clinical study of Frost et al. (136). Ciprofloxacin dissolution in reactive media containing 3400 mg calcium carbonate was reduced to 8.3 %. Ciprofloxacin-calcium complex formation *in vitro* occurs in ciprofloxacin:calcium 1:1 and 1:3 molar ratio, so that molar ratio was used in dissolution studies (30 mM of ciprofloxacin: 30/100 mM calcium).

Arayne et al. (156) investigated ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of calcium carbonate. However, they did not consider the effect of increased media pH. Our results show that addition of calcium carbonate has significant effect on media pH.

Ciprofloxacin dissolution profiles in water and physiologically based media are presented in Fig. 34. Total percent ciprofloxacin dissolved in FaSSIF in the presence of 3400 mg calcium carbonate was 53 (pH 7.1). Similarly to aluminium and iron compounds, drug dissolution in FaSSIF was reduced irrespective of the presence and type of metal compound added to the dissolution media. Final ciprofloxacin concentration in the dissolution media was 5.3 mg/ml and was close to the experimentally determined ciprofloxacin hydrochloride solubility in FaSSIF (i.e 4.9 mg/ml). Total percent ciprofloxacin dissolved in FeSSIF in the presence of calcium carbonate was 58 % (final media pH 6.0). Drug dissolution profiles observed upon addition of calcium carbonate in both FaSSIF and FeSSIF were similar, leading to approximately 50 % of

ciprofloxacin dissolved. Ciprofloxacin dissolution reduction observed in FeSSIF in the presence of calcium carbonate was similar to reduction in ciprofloxacin bioavailability reported *in vivo* (136), indicating that FeSSIF offers certain advantages over the FaSSIF and water and, due to its higher buffer capacity and solubilisation potential.

### **Complex formation**

When solutions of 0.1 M ciprofloxacin hydrochloride and 0.3 M calcium chloride were mixed in different volumetric ratios, precipitation was observed in the mixture containing 50 mM ciprofloxacin hydrochloride and 150 mM calcium chloride. Ciprofloxacin concentration in the solution above the precipitate was found to be 4.3 mg/ml (pH 3.99) and solid phase collected was analysed for its solid state properties.

### **Solid state characterisation**

Results of solid state characterisation of the solid phases collected from the dissolution vessels after performing ciprofloxacin tablet dissolution in water in the presence of calcium compounds are presented in Fig. 35-37.

DSC, XRD and FTIR scans of solid phase collected from interaction mixtures containing ciprofloxacin hydrochloride and calcium chloride and solid phase collected from dissolution vessel in media containing calcium chloride were almost identical (Fig. 35-37).

In the XRD diffractogram of the solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of calcium carbonate (Fig. 35) three peaks were observed at 6, 22, 24  $2\theta$  and diffractogram was consistent with that of ciprofloxacin 1:3.7 (3:11) hydrate isolated by Mafra et al. (174). In the XRD diffractogram of the solid phase collected from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the presence of calcium chloride peaks were observed at 10 and 12.5  $2\theta$  which was similar to XRD scan of ciprofloxacin hydrochloride (Fig. 35).

DSC scans of the investigated solid phases are shown in Fig. 36. DSC and FTIR scans of the solid phase collected from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the presence of calcium chloride was almost superimposable with DSC and FTIR scans of ciprofloxacin hydrochloride (Fig. 36 and 37) indicating the presence of ciprofloxacin hydrochloride only. Thermal analysis of the solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of calcium carbonate (Fig. 36) showed a major endothermic event at approximately 270°C preceded by a broad endotherm at approximately 105°C. The endotherm at 100°C was accompanied by a mass loss of approximately 14.5 % and attributed to adsorbed/crystalline water evaporation. Extensive thermal decomposition of the sample was observed at temperatures above the melting point accompanied by a large mass loss recorded by TGA. Thermal events of ciprofloxacin base were observed in the thermogram of the collected solid phase (the melting endotherm for ciprofloxacin base was at approximately 270°C) indicating the presence of base in the sample).

Solid phase recovered from reactive media containing calcium carbonate was identified as



hydrated ciprofloxacin base (Fig. 37), which explains slow and incomplete drug dissolution. FTIR spectra of the solid phase obtained from ciprofloxacin dissolution in the presence of calcium carbonate contained characteristic bands at 1623, 1580 and 1380  $\text{cm}^{-1}$  assigned to the ketone C=O stretch, antisymmetric and symmetric vibrations of the carboxylate anion, respectively and was practically identical to the spectra of hydrated ciprofloxacin base reported by Dorofeev (175).

### **6.2.6 *In vitro* study of ciprofloxacin zinc interaction**

Pharmacokinetic studies have shown reduced ciprofloxacin bioavailability after simultaneous administration with zinc containing multivitamin and oligomineral preparations (15, 16). Ciprofloxacin-zinc complexes have been isolated and described in the literature (95) and complex formation is postulated as the interaction mechanism *in vivo*.

In this chapter ciprofloxacin-zinc interaction was investigated *in vitro* by performing solubility and dissolution studies in reactive media containing zinc chloride or zinc sulfate in order to identify mechanisms for reduced ciprofloxacin bioavailability in the presence of zinc compounds.

#### **Solubility study**

Concentrations of ciprofloxacin dissolved in the reactive media containing different amounts of zinc chloride and zinc sulfate are presented in Fig. 38 and Table 14 and 15.

Ciprofloxacin hydrochloride solubility decreased 10-fold in the presence of zinc chloride. The effect observed cannot be attributed to the pH dependent ciprofloxacin solubility (where ciprofloxacin solubility is high at pH values below 5 and above 10, and low near the isoelectric point), which is close to neutral. Ciprofloxacin hydrochloride solubility can be affected by common ion effect. Calculated ciprofloxacin solubility in the presence of 294 mM of chloride was found to be 40 mM indicating that presence of high concentration of chloride in media may decrease ciprofloxacin solubility. Experimentally determined ciprofloxacin solubility in media containing 294 mM of chloride was two-fold lower compared to calculated value (i.e 20 mM vs 40 mM) indicating that formation of new ionic species may also contribute to the effect observed. The amount of ciprofloxacin hydrochloride in solution was reduced in the reactive media containing zinc sulfate. Media pH values observed in the case zinc sulfate interaction ranged from 2.62 to 4.00 and data presented in Fig. 38 indicate that the effect observed is not just a pH related effect.

#### **Dissolution study**

Zinc chloride up to 1000 mg and zinc sulfate up to 2110 mg containing equivalent of 147 mM of zinc were used for dissolution studies. Ciprofloxacin dissolution profiles in water in the presence of different amounts of zinc chloride are presented in Fig. 39. Addition of 500 and 700 mg zinc

chloride (i.e 74 mM and 103 mM, respectively) slightly decreased ciprofloxacin dissolution, but the total amount dissolved was not affected. In the presence of 1000 mg zinc chloride (ciprofloxacin to zinc molar ratio ~ 1:5), ciprofloxacin tablet dissolution was markedly reduced, with total of 54 % dose dissolved. Final media pH values were 4.04, 3.40, 3.24 and 3.21 in water and media containing 500, 700 and 1000 mg zinc chloride, respectively.

Ciprofloxacin dissolution profiles in water in the presence of different amounts of zinc sulfate are presented in Fig. 40. Increased amounts of soluble zinc sulfate in the dissolution medium resulted in markedly reduced ciprofloxacin tablet dissolution, with 20 % ciprofloxacin dissolved at the highest dose of the investigated metallic compound. Final media pH values were 4.04, 3.95, 3.36 and 3.38 and 3.66 in water and media containing 100, 500, 1000 and 2110 mg of zinc sulfate, respectively.

Ciprofloxacin dissolution profiles in water and physiologically based media without/with zinc chloride or zinc sulfate addition are shown in Fig. 41. Ciprofloxacin dissolution in the presence of zinc chloride and zinc sulfate was reduced to 54 % (final pH 3.21) and 20 % (final pH 3.66), respectively.

Literature *in vivo* data reported reduced ciprofloxacin bioavailability when co-administered with multivitamin/oligomineral preparations (15, 16). Preparations used in *in vivo* studies contained zinc in the mixture of vitamins, minerals and other metallic compounds (15, 16), so it was hard to define the effect of zinc on ciprofloxacin bioavailability. Results from *in vitro* studies related to ciprofloxacin solubility and dissolution in the presence of zinc compound cannot be found in the literature. *In vitro* formation of ciprofloxacin-zinc complexes was reported by Zupančič et al. (95). Total percent ciprofloxacin dissolved and pH media values were 46 % (pH 3.34) and 73 % (pH 3.19) in FaSSIF in the presence of zinc chloride and zinc sulfate, respectively. Final ciprofloxacin concentration in the dissolution media was 4.6 and 7.3 mg/ml in the presence of zinc chloride and zinc sulfate, respectively, and was close to the experimentally determined ciprofloxacin hydrochloride solubility in FaSSIF (i.e 4.9 mg/ml).

Media pH value decreased slightly upon addition of zinc compound into FeSSIF. While drug dissolution in FeSSIF in the presence of zinc sulfate was almost superimposable to that in water, ciprofloxacin dissolution observed in the presence of zinc chloride was reduced to 24.1 %. One of the reasons for reduced ciprofloxacin dissolution in FeSSIF in the presence of zinc chloride can be the common ion effect. Dissolution profiles obtained in water and physiologically based media in the presence of zinc sulfate differed substantially. Only 20 % drug (equivalent to 2 mg/ml) was dissolved in water in the presence of zinc sulfate irrespective of the relatively low pH value which would be favorable for ciprofloxacin hydrochloride dissolution. The amount of ciprofloxacin hydrochloride in FaSSIF was slightly higher in the presence of zinc sulfate, which may be attributed to the somewhat lower pH value obtained (3.7 vs 5.3). Superimposable dissolution profiles were observed in FeSSIF with and without zinc sulfate addition. Visual inspection of drug dissolution in FeSSIF in the presence of zinc sulfate revealed that, interactive media initially become turbid, but clarifies later thus indicating that, potentially, formed

ciprofloxacin zinc complex is relatively unstable or soluble in FeSSIF.

### **Complex formation**

When solutions of ciprofloxacin hydrochloride and zinc chloride or zinc sulfate were mixed in different volumetric ratios, immediate and the most abundant precipitation was observed in the mixture containing 25 mM ciprofloxacin hydrochloride and 100 mM zinc chloride (1:4 molar ratio) and 25 mM ciprofloxacin hydrochloride and 50 mM zinc sulfate. Ciprofloxacin concentration in the solution above the precipitate was found to be 3.8 mg/ml (~ 9.9 mM; pH 3.24) and 3.3 mg/ml (~6.9 mM; pH 3.4) in the presence of zinc chloride and zinc sulfate, respectively. Ciprofloxacin concentrations found in the solution above the precipitate in the mixtures containing zinc chloride or zinc sulfate, heptahydrate were similar. The results obtained show that 100 mM of zinc in the form of zinc chloride and 50 mM of zinc in the form of zinc sulfate are needed to obtain same ciprofloxacin concentration in the solution. Zinc chloride and zinc sulfate represent soluble zinc salts. It is possible that one of the reasons for different influence of zinc salts on ciprofloxacin solubility is their different hydrolysis in water. In the case of zinc chloride it can be found that zinc chloride solutions contain solvated  $Zn^{2+}$  ions and  $Cl^-$  ions and  $ZnCl_xH_2O_{(4-x)}$  species (176). On the other hand, aqueous solution of zinc sulfate consist of the metal aquo complex  $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$  and  $SO_4^{2-}$  (177).

Solid phases precipitated from the mixture of ciprofloxacin hydrochloride and zinc chloride or zinc sulfate were collected and investigated for its solid state properties.

When solutions of 0.05 M ciprofloxacin hydrochloride and 0.1 M ferrous sulfate were mixed in different volumetric ratios, the most abundant precipitation was found in the mixture containing 25 mM ciprofloxacin hydrochloride and 50 mM ferrous sulfate. It was found that precipitate was formed in the mixture containing the same ratio of ciprofloxacin hydrochloride: metallic-sulfate (zinc sulfate or ferrous sulfate). In addition, ciprofloxacin concentration in the solution above the precipitate in the mixture with ferrous sulfate was lower (2.2 mg/ml, pH 2.8). Results representing concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in media containing different sulfate concentrations (iron and zinc salt) are shown in Fig. 42. It can be seen that ciprofloxacin solubility in the reactive media containing either zinc sulfate or ferrous sulfate is 7-fold lower than ciprofloxacin solubility in sulfuric acid. Ciprofloxacin hydrochloride interaction with ferrous sulfate resulted in the formation of poorly soluble complex (chapter 6.2.3). The results of solubility and ciprofloxacin tablet dissolution studies in the reactive media containing zinc sulfate indicate formation of ciprofloxacin-zinc complex, as well.

### **Solid state characterisation**

Results of solid state characterisation of the solid phases collected from the dissolution vessels after performing ciprofloxacin tablet dissolution in water in the presence of zinc chloride and zinc sulfate are presented in Fig. 44-46.

Solid phases collected from interaction mixtures containing ciprofloxacin hydrochloride and zinc

salts and solid phases collected from dissolution vessel in media containing zinc salts have very similar DSC, XRD and FTIR scans, although the peak intensities of solid phases collected from dissolution study were somewhat lower (Fig. 44-46). It may be postulated that the observed decrease in peak intensities may be due to a reduction in the crystalline fraction of the precipitate caused by the presence of tablet excipients.

In contrast to the ciprofloxacin hydrochloride and ciprofloxacin base diffractograms, prominent peaks at 11.35, 12.60 and 17.15  $2\theta$  can be observed in the diffractogram of the solid phase collected from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the presence of zinc chloride. The XRD diffractogram of the solid phase obtained from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the presence of zinc sulfate show peaks at  $\sim 9$  and  $17$   $2\theta$  degrees and the diffractogram was different than that of ciprofloxacin hydrochloride (Fig. 44).

DSC scans of the investigated solid phases are presented in Fig. 45. Thermogravimetry (TGA) of the solid phase collected from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the reactive media containing zinc chloride showed 4.5 % mass loss up to  $120^{\circ}\text{C}$ , respectively. The values obtained are in good agreement with the value for the loss of two water molecules per molecule reported by Zupančič et al. (95). A broad endotherm was detected up to  $\sim 120^{\circ}\text{C}$ , consistent with the mass loss by TGA and thus associated with the removal of water molecules. The solid phase collected from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the reactive medium containing zinc chloride show endothermic peak at  $\sim 290^{\circ}\text{C}$  and two minor endotherms with onsets at  $185^{\circ}\text{C}$  and  $246^{\circ}\text{C}$ , perhaps due to excipients present in the tablet. That was concomitant with substantial mass loss by TGA, most likely from thermal decomposition.

Thermogravimetry of the solid phase collected from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the presence of zinc sulfate showed 18.8 % mass loss. Broad and strong endotherm peak appeared at approximately  $110^{\circ}\text{C}$ , perhaps of the residual water, followed by another endothermic, but a minor peak at  $\sim 225^{\circ}\text{C}$ . The third endothermic event was apparent with an onset at  $\sim 270^{\circ}\text{C}$  (Fig. 45).

FTIR scans of the investigated solid phases are presented in Fig. 46. The characteristic bands for the C=O vibration of the carboxylic and ketone groups in ciprofloxacin hydrochloride hydrate were present at  $1709\text{ cm}^{-1}$  and  $1624\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 46). In the FTIR scans of the solid phase collected from ciprofloxacin hydrochloride tablet dissolution in the presence of zinc chloride two peaks at  $1718$  and  $1629\text{ cm}^{-1}$ , ascribed to the carboxylic and ketone C=O groups vibrations, respectively, were observed and bands were slightly shifted in comparison to ciprofloxacin hydrochloride (Fig. 46). The same shifts were observed in the FTIR spectra of the ciprofloxacin-zinc complex obtained by Zupančič et al (95).

FTIR spectrum of the solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of zinc sulfate showed absorption bands for the  $\nu(\text{C}=\text{O})$  vibration of the carboxylic and ketone (C=O) groups at  $1722$  and  $1629\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 46). Absorption band for C=O vibration of the carboxylic group was very weak probably indicating that the  $-\text{COOH}$  group has been deprotonated. Also characteristic band was a broad and strong peak at  $1030\text{ cm}^{-1}$  assigned as

the  $\text{SO}_4^{2-}$  vibrations. FTIR scans of the solid phases collected from ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of zinc sulfate and in the presence of zinc chloride were generally different from scan of ciprofloxacin hydrochloride suggesting that the sample are ciprofloxacin-zinc complexes.

Zupančič et al. (95) obtained the  $(\text{cfH}_2)_2(\text{ZnCl}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}$  ciprofloxacin/zinc complex by dissolving zinc chloride in ciprofloxacin solution prepared in 0.1 M HCl, where the drug:zinc molar ratio was 1:1, as well as from a saturated aqueous solution of ciprofloxacin hydrochloride at pH=6 to which zinc sulfate (in a molar ratio of drug:zinc of 2:1) was added. According to the results obtained in the present study, the solid phase collected from ciprofloxacin tablet dissolution in the reactive media containing zinc chloride is ciprofloxacin-zinc complex of the similar composition to that synthesized by Zupančič et al. (95).

Zupančič et al. (95) isolated also ciprofloxacin-zinc complex with the following structure:  $(\text{Zn}(\text{cf})_2) \times 3\text{H}_2\text{O}$ . FTIR scan of the collected solid phase from ciprofloxacin tablet dissolution in the presence of zinc sulfate exhibited an absorption band at approximately  $3500 \text{ cm}^{-1}$ , most likely of OH stretch vibrations of water molecules. The characteristic band for the  $(-\text{C}=\text{O})$  vibration of the carboxylic and ketone groups in ciprofloxacin hydrochloride hydrate were at  $1709 \text{ cm}^{-1}$  and  $1624 \text{ cm}^{-1}$ . Absorption bands for the  $(-\text{C}=\text{O})$  vibration of the carboxylic and ketone groups were observed at  $1722$  and  $1629 \text{ cm}^{-1}$  and bands were slightly shifted in comparison to ciprofloxacin hydrochloride. Absorption band for  $\text{C}=\text{O}$  vibration of the carboxylic group was very weak, probably indicating that the  $-\text{COOH}$  group has been deprotonated. The zinc content of the sample, as measured by the ICP-MS assay, was 4.0 %. The results of the zinc assay together with the infrared analysis suggested that ciprofloxacin-zinc complex has been generated from drug interaction. Our results show that ciprofloxacin hydrochloride interaction with ferrous sulfate resulted in the formation of a low solubility complex with the probable chemical structure of  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ , where n is up to 12 molecules of water. A close examination revealed that their structures are likely to be isotypic, implying that the two complexes should have very similar chemical form. Indeed, based on the chloride and sulfate content analysis (4.5 and 11.7 %, respectively), the possible stoichiometry of the zinc complex may be postulated as  $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ , where n is up to 12 molecules of water. Turel et al. (80) found that the zinc complex with norfloxacin ( $\text{nfH}$ ),  $(\text{nfH}_3)(\text{nfH}_2)[\text{ZnCl}_4]\text{Cl} \times \text{H}_2\text{O}$ , was isotypic to the copper/norfloxacin complex, thus the occurrence of isotypism for fluoroquinolone-metal complexes is not unexpected.

The zinc-ciprofloxacin adduct isolated and presented in this work is new and its structure has been unpublished to date and is also different to a zinc-ciprofloxacin complex with a structure of  $(\text{cfH}_2)_2(\text{ZnCl}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}$  isolated by Zupančič et al. (95).

### 6.3 *In silico* ispitivanja

Primena matematičkog modelovanja i simulacije zauzima sve važnije mesto u razvoju lekovitih preparata i proceni njihovog kvaliteta (68-70, 178-181). Razvijaju se različiti programski paketi koji pružaju mogućnost predviđanja frakcije apsorbovanog leka, kao i kinetiku procesa apsorpcije. *In vitro* ispitivanja uticaja istovremeno primenjenih lekova/hrane predstavljaju način da se utvrdi mogućnost ispoljavanja lek/lek i lek/hrana interakcija. Sve veće interesovanje postoji i za *in silico* programe koji simuliraju proces apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta, i smatra se da oni predstavljaju korisno sredstvo za *in silico* predviđanje potencijalnih lek-lek/lek-hrana interakcija. Međutim, još uvek nema dovoljno publikovanih rezultata vezanih za njihovu primenu s ciljem predviđanja lek/lek i lek/hrana interakcija. Do sada publikovani radovi su se bavili ispitivanjem lek-lek interakcija koje se dešavaju na nivou metabolizma (71-73), dok još uvek nema dovoljno podataka vezanih za simulaciju fizičko-hemijskih interakcija koje se dešavaju na nivou apsorpcije. U okviru ovog poglavlja biće opisana *in silico* simulacija fizičko-hemijske interakcije ciprofloksacina i jona metala, a generisani modeli će se koristiti u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcija ciprofloksacina sa jonima metala.

#### 6.3.1 Gastrointestinalna simulacija apsorpcije ciprofloksacina

Simulacija apsorpcije ciprofloksacina iz GIT-a ostvarena je u modulu pojedinačne simulacije (*Single Simulation Modul*) u programu GastroPlus<sup>tm</sup>. Profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi je simuliran na osnovu fizičko-hemijskih i farmaceutsko tehnoloških parametara, koji su prikazani u tabeli 16 i na osnovu odgovarajućih fizioloških parametara, u uslovima gladovanja, koji su prikazani u tabeli 17. U cilju poređenja *in vivo* i *in silico* simuliranog profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi, kao ulazni parametar korišćeni su srednji profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi iz studija Kara i sar. (15), Frost u sar. (136) i Polk i sar. (16).

**Tabela 16.** Prikaz ulaznih parametara korišćenih u GastroPlus<sup>™</sup> programu

**Table 16.** Summary of ciprofloxacin input parameters for GastroPlus<sup>™</sup> simulation

Parameters	Value
molecular weight	385.8 g/mol
logP	1.32 <sup>a</sup>
pKa <sub>1</sub>	8.62 <sup>b</sup>
pKa <sub>2</sub>	6.16 <sup>b</sup>
dose	500 mg
solubility at pH 4.04	42 mg/ml <sup>c</sup>
diffusion coefficient	0.75x10 <sup>5</sup> cm <sup>2</sup> /s <sup>d</sup>
drug particle density	1.2 g/ml <sup>e</sup>
P <sub>eff</sub> (human jejunal permeability)	1.57x10 <sup>-4</sup> cm/s <sup>f</sup>
body weight	70 kg
blood/plasma conc. ratio	1 <sup>e</sup>
unbound percent in plasma	70 % <sup>g</sup>
clearance CL	26 - 37 l/h <sup>h</sup>
volume of distribution Vc	0.56 l/kg <sup>i</sup>
peripheral volume V <sub>2</sub>	1.347 l/kg <sup>j</sup>
elimination half-life T 1/2 (h)	4.08 <sup>i</sup>
distribution rate constants	
k <sub>12</sub>	2.3753 1/h <sup>i</sup>
k <sub>21</sub>	0.98752 1/h <sup>i</sup>

<sup>a</sup>from ref [108]; <sup>b</sup>from ref [100]; <sup>c</sup>experimental value; <sup>d</sup>GastroPlus estimated value based on molecular weight <sup>e</sup>GastroPlus default values; <sup>f</sup>calculated from equation ( $Fa=(1-e^{-1.47Pe_{eff}})*100$ ); <sup>g</sup>from ref [124]; <sup>h</sup>GastroPlus optimized; <sup>i</sup>Calculated by Kinetica program from ref [161]; <sup>j</sup>GastroPlus calculated (built-in calculation from PK parameters)

**Tabela 17.** Fiziološki parametri korišćeni u simulacijama

**Table 17.** Physiological parameters used for simulation

Compartment	ASF	pH	transit time (h)
Stomach	0	1.3	0.25
Duodenum	2.781	4.04	0.26
Jejunum 1	2.744	6.2	0.93
Jejunum 2	2.727	6.4	0.74
Ileum 1	0.5	6.6	0.58
Ileum 2	0	6.9	0.42
Ileum 3	0	7.4	0.29
Caecum	0	6.4	4.19
Asc Colon	0	6.8	12.57

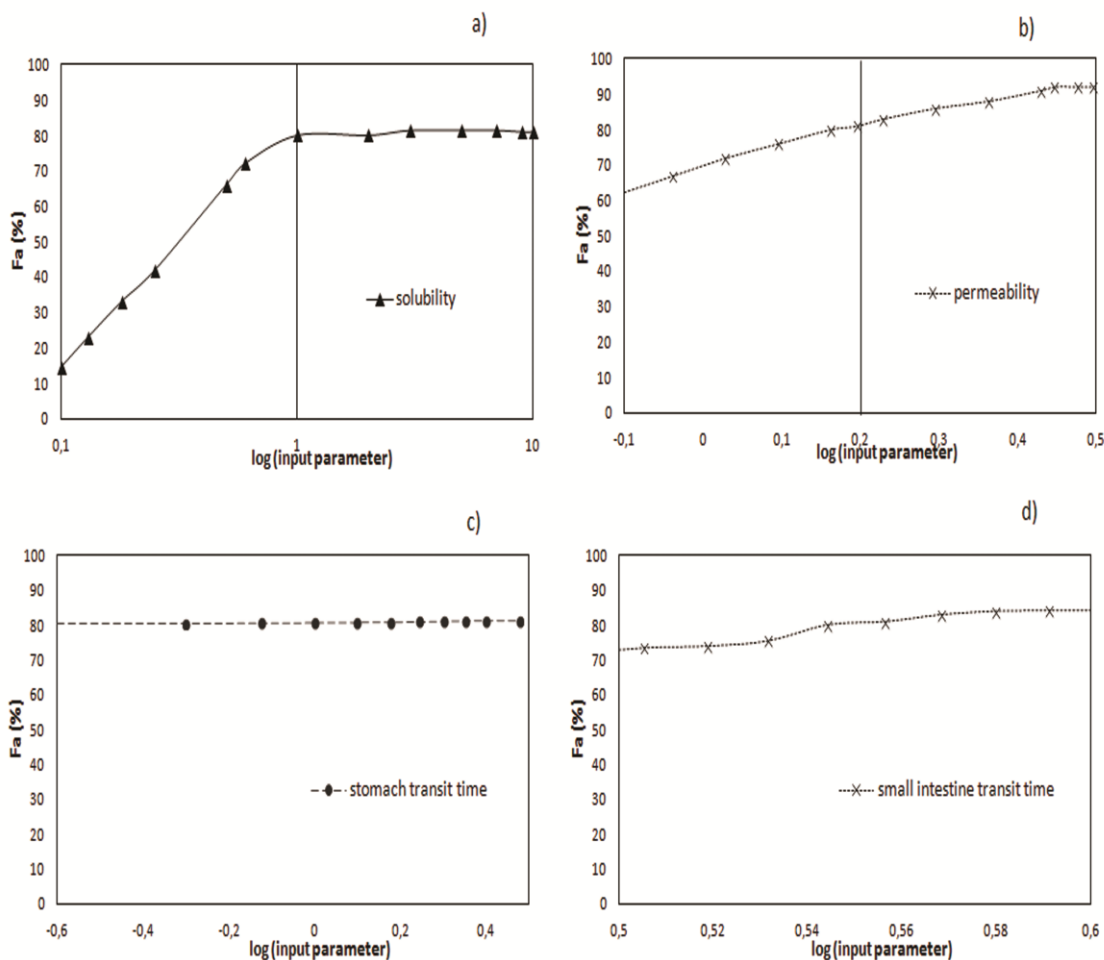
Simulacije su sprovedene uzimajući u obzir pH-zavisani profil rastvorljivosti ciprofloksacina. Da bi se procenila mogućnost primene *in silico* modela u predviđanju brzine i stepena apsorpcije ciprofloksacina, generisan je model koji simulira profile koncentracije ciprofloksacina u plazmi koji odgovaraju *in vivo* profilima (15, 16, 136). Ulazni parametar za klirens je bilo potrebno optimizovati u skladu sa *in vivo* uočenim profilom, pa je vrednost tog parametra bila 26 l/h za simulaciju profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi iz studije Kara i sar. (15), 35 l/h za simulaciju profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi iz studije Frost i sar. (136) i 37 l/h za simulaciju profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi iz studije Polk i sar. (16).

Prilikom simuliranja profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi, da bi se dobio profil koji se podudara sa profilima koncentracije leka iz *in vivo* studija, vrednosti ASF su optimizovane. U *in vivo* uslovima ciprofloksacin se apsorbuje u gornjim delovima intestinuma, pa su ASF segmenata koji predstavljaju distalne delove intestinuma označeni nulom. U skladu sa eksperimentalnim podacima za pH vrednost zasićenog rastvora ciprofloksacina, promenjena je i pH vrednost u duodenumu sa 6.0 na 4.04. Nakon prelaska rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida iz želuca u tanko crevo i apsorpcije vode, u duodenumu je prisutna velika koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida. Tečnost u intestinumu ima relativno malu zapreminu i mali puferski kapacitet pa, usled toga, u duodenumu dolazi do promene pH vrednosti (166-168, 182). Analiza osetljivosti parametara (*Parameter Sensitivity Analysis - PSA*) je primenjena da bi se ispitalo uticaj ulaznih parametara (rastvorljivost, permeabilnost, vreme prolaska kroz želudac i vreme prolaska kroz tanko crevo) na apsorpciju ciprofloksacina. Rastvorljivost je varirana u opsegu 0.1-100 mg/ml. Permeabilnost je varirana u opsegu 0.79 do  $3.14 \times 10^{-4}$  cm/s, koji obuhvata 0.5-2 puta veću vrednost od vrednosti ulaznog parametra (prema GastroPlus<sup>tm</sup> osnovnim vrednostima). Vreme prolaska kroz želudac je relativno varijabilno pa je varirano u opsegu 0.25 - 3 h, dok je vreme prolaska kroz tanko crevo uglavnom konstantno i traje između 3 i 4 h (163). Rezultati koji pokazuju zavisnost stepena apsorpcije ciprofloksacina od ispitivanih parametara su prikazani na slici 47.

Rezultati PSA analize ukazuju da promena vremena prolaska kroz želudac u opsegu 0.25 do 3 h, nema uticaja na procenat apsorbovanog leka. Takođe, procenat apsorbovanog ciprofloksacin-hidrohlorida se ne menja značajno u ispitivanom vremenu



prolaska kroz tanko crevo. Na osnovu rezultata PSA analize može se uočiti da su rastvorljivost i permeabilnost leka kritični faktori koji utiču na brzinu i obim apsorpcije ciprofloksacina. U opsegu rastvorljivosti 0.1–100 mg/ml, PSA rezultati ukazuju da bi se pri vrednosti za rastvorljivost 42 mg/ml apsorbovalo 80 % ciprofloksacin-hidrohlorida, što je u skladu sa literaturnim *in vivo* podacima o bioraspoloživosti ciprofloksacina (117-122). U ispitivanom opsegu vrednosti parametra za permeabilnost prilikom PSA analize ( $0.79\text{-}3.14 \times 10^{-4}$  cm/s), stepen apsorpcije ciprofloksacina se povećava i kada je ulazni parametar  $1.57 \times 10^{-4}$  cm/s apsorpcija leka je skoro kompletna (Fa je 80 %).

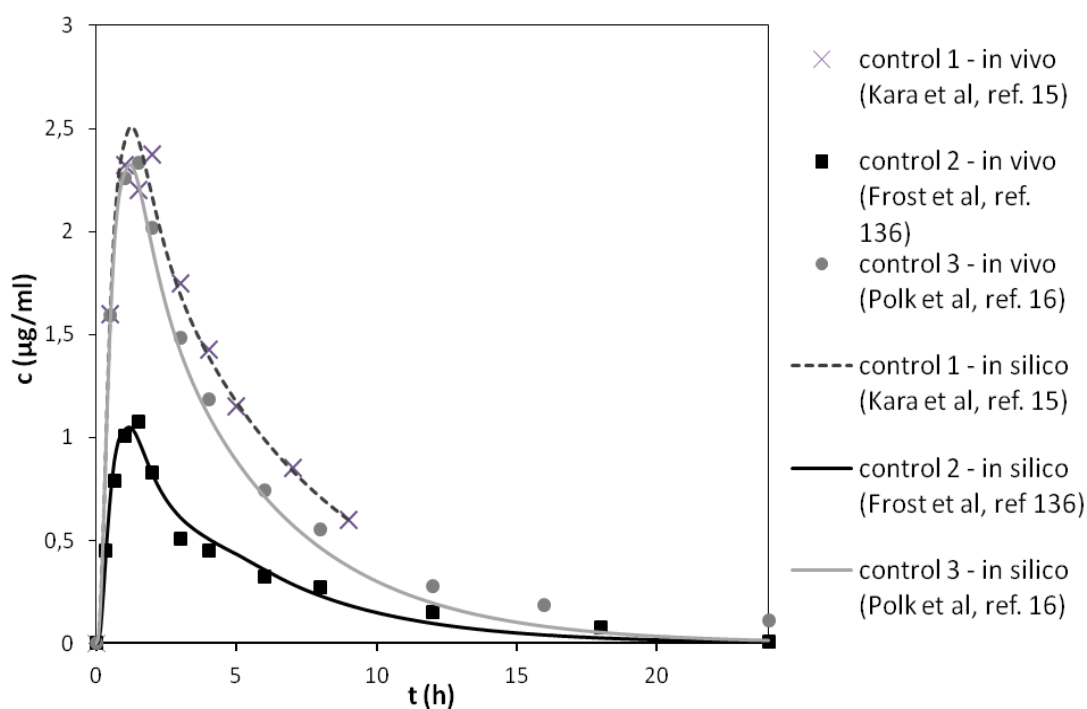


**Slika 47.** Analiza osetljivosti parametara (PSA). Zavisnost stepena apsorpcije ciprofloksacina od različitih ulaznih parametara a) rastvorljivost, b) permeabilnost c) vreme prolaska kroz želudac d) vreme prolaska kroz tanko crevo

**Fig. 47.** Parameter Sensitivity Analysis (PSA). The dependence of fraction ciprofloxacin absorbed on different input parameters: a) solubility, b) permeability, c) stomach transit time and d) small intestine transit time

Na slici 48 dat je prikaz simuliranih zajedno sa *in vivo* uočenim profilima koncentracije ciprofloksacina u plazmi. Dobro slaganje *in silico* simuliranog i *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi za kontrolne profile (*control 1-3*) je postignuto za rastvorljivost kao ulazni parametar 42 mg/ml, što odgovara eksperimentalno određenoj rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi.

Tačnost predviđanja je procenjena na osnovu uporedne analize stvarnih i predviđenih vrednosti parametara, izračunavanjem procenta greške predviđanja (% PE) (tabela 18) kao i na osnovu statističkih parametara (koeficijent korelacije  $r^2$ , suma kvadrata greške SSE, koren iz srednje vrednosti kvadrata greške RMSE, srednja vrednost apsolutne greške MAE) koji su prikazani u tabeli 19.



**Slika 48.** *In silico* simulirani i *in vivo* profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacina (15,16, 136)

**Fig. 48.** *In silico* simulated and *in vivo* observed ciprofloxacin plasma profiles following oral administration of ciprofloxacin tablet (ref 15, 16, 136)

**Tabela 18.** Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara kao i odgovarajućih greški predviđanja (% PE)

**Table 18.** *In silico* predicted and *in vivo* observed pharmacokinetic parameters with calculated values for percent prediction error (% PE)

<i>In vivo</i> study	$C_{max}$ (µg/ml)			AUC <sub>0-t</sub> (µgh/h)			Ref
	observed	predicted	% PE	observed	predicted	%PE	
<b>Control 1</b>	2.35	2.51	5.57	12.04	11.92	1.05	15
<b>Control 2</b>	1.95	2.15	10.20	10.92	11.55	5.70	136
<b>Control 3</b>	2.33	2.44	4.70	13.67	13.35	2.30	16

**Tabela 19.** Prikaz statističkih parametara ( $r^2$ -koeficijent korelacije, SSE-suma kvadrata greške, RMSE- koren iz srednje vrednosti kvadrata greške, MAE- srednja vrednost apsolutne greške)

**Table 19.** Statistical parameters ( $r^2$  - regression coefficient, SSE - sum of square error, RMSE - root mean square error, MAE - mean absolute error)

	$r^2$	SSE	RMSE	MAE	Ref.
<b>Control 1</b>	0.97	0.10	0.10	0.08	15
<b>Control 2</b>	0.93	0.50	0.20	0.10	136
<b>Control 3</b>	0.99	0.07	0.07	0.07	16

S obzirom da su izračunate vrednosti za greške predviđanja za  $C_{max}$  i AUC<sub>0-t</sub> manje od 10 %, predviđanje se može smatrati uspešnim. Visoka vrednost za koeficijent korelacije i niska vrednost za koeficijent greške ukazuju na to da se simulirani i *in vivo* profili koncentracije leka u plazmi dobro slažu.

### 6.3.2 Simulacija interakcije ciprofloksacina i jona gvožđa

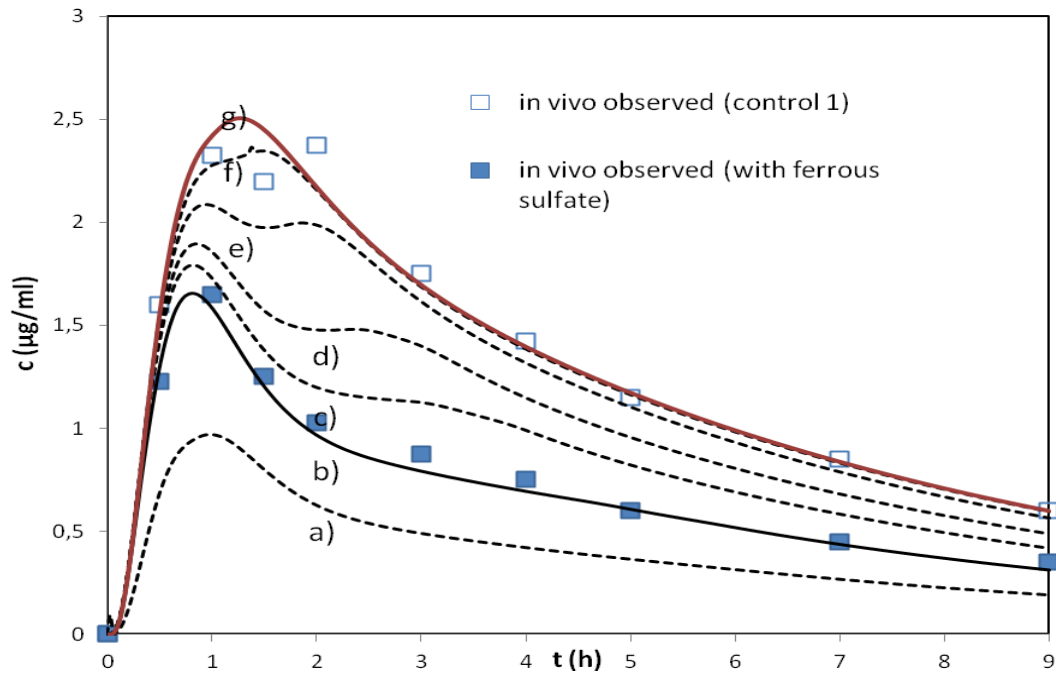
Za optimizaciju modela gastrointestinalne simulacije interakcije ciprofloksacina i jona gvožđa primenjeni su profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon istovremene primene sa preparatom gvožđe(II)-sulfata i gvožđe(II)-glukonata (15).

## Simulacija interakcije ciprofloksacina sa gvožđe(II)-sulfatom

Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u vodi je smanjena u prisustvu gvožđe(II)-sulfata. U gastrointestinalnoj simulaciji interakcije ciprofloksacina i jona gvožđa je ispitivan uticaj promene vrednosti za rastvorljivost na biološku raspoloživost ciprofloksacina. U toku simulacije interakcije ciprofloksacina sa gvožđe(II)-sulfatom rastvorljivost je varirana u opsegu od 1 do 42 mg/ml (1, 3, 5, 10, 20, 30 i 42 mg/ml). Posmatrano je koja vrednost za rastvorljivost daje najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u prisustvu gvožđe(II)-sulfata. Na slici 49 dat je prikaz simuliranih profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi sa različitim vrednostima za rastvorljivost kao ulazni parametar. Najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi u prisustvu gvožđe(II)-sulfata dobijeno je kada je rastvorljivost bila 3 mg/ml (slika 49 - profil b). Ova vrednost je približna eksperimentalno određenoj koncentraciji ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru iznad taloga nastalog nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata (2.2 mg/ml). Takođe, *in silico* optimizovana vrednost je slična koncentraciji ciprofloksacin-hidrohlorida nađenoj u 50 ml medijuma koji sadrži gvožđe(II)-sulfat (4.3 mg/ml), što ukazuje na značaj korišćenja malih zapremina medijuma u razvoju biorelevantnog testa za *in vitro* ispitivanje interakcije ciprofloksacina i gvožđe(II)-sulfata.

U tabeli 20 dat je prikaz predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajuće vrednosti greške predviđanja za simulirani profil dobijen na osnovu rastvorljivosti 3 mg/ml kao ulazni parametar.

Vrednosti odgovarajućih statističkih parametara koji karakterišu postavljeni model bile su  $r^2 = 0.982$ ;  $SSE = 0.03$ ;  $RMSE = 0.05$ ;  $MAE = 0.05$  za koeficijent korelacije, sumu kvadrata greške, koren iz srednje vrednosti kvadrata greške i srednju vrednost apsolutne greške. Visoka vrednost za koeficijent korelacije i niska vrednost za koeficijent greške ukazuju na to da se simulirani i *in vivo* dobijeni profil dobro slažu. S obzirom da su izračunate vrednosti greške predviđanja za  $C_{max}$  i  $AUC_{0-t}$  manje od 10 %, predviđanje se može smatrati uspešnim.



**Slika 49.** Simulirani (linije) i in vivo (kvadrat) uočeni profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi u zavisnosti od primenjene vrednosti za rastvorljivost kao ulazni parametar (a) 1 mg/ml, b) 3 mg/ml, c) 5 mg/ml, d) 10 mg/ml, e) 20 mg/ml, f) 30 mg/ml g) 42 mg/ml

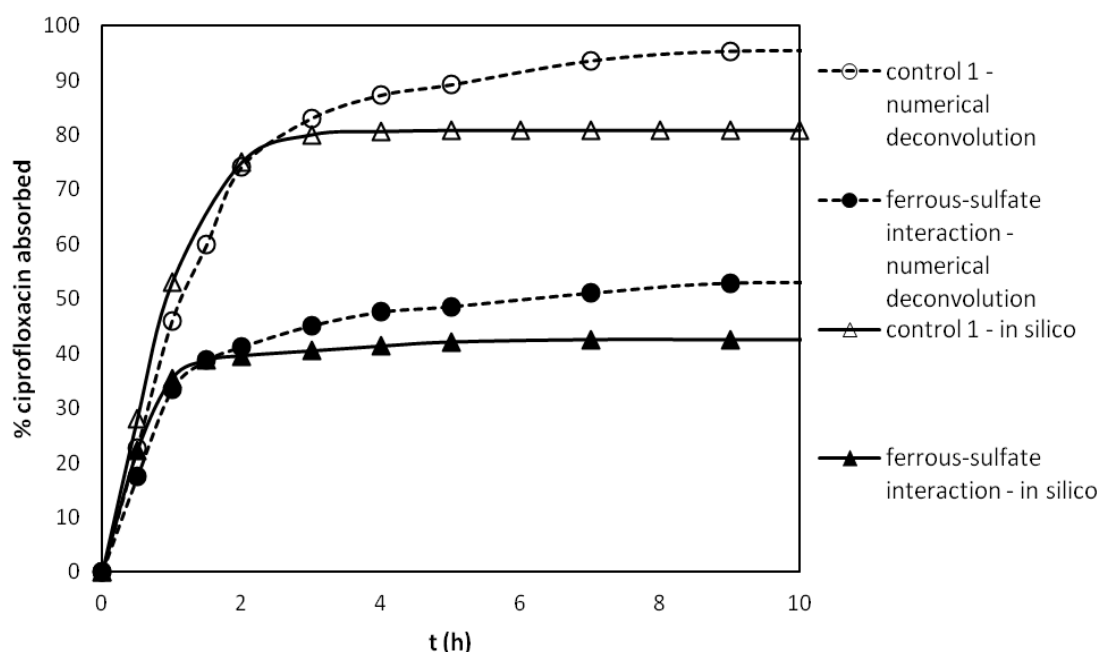
**Fig. 49.** In silico simulated (lines) and in vivo observed (square) ciprofloxacin plasma profiles based on various solubility input value (a) 1 mg/ml, b) 3 mg/ml, c) 5 mg/ml, d) 10 mg/ml, e) 20 mg/ml, f) 30 mg/ml, g) 42 mg/ml

**Tabela 20.** Vrednosti in vivo uočenih i in silico predviđenih farmakokinetičkih parametara kao i odgovarajućih greški predviđanja (% PE)

**Table 20.** In silico predicted and in vivo observed pharmacokinetic parameters with calculated values for percent prediction error (% PE)

	$C_{max}$ (µg/ml)			$AUC_{0-t}$ (µg/h)			Ref
	observed	predicted	% PE	observed	predicted	%PE	
<b>Ciprofloxacin-ferrous sulfate interaction</b>	1.650	1.654	0.24	6.60	6.30	4.47	15

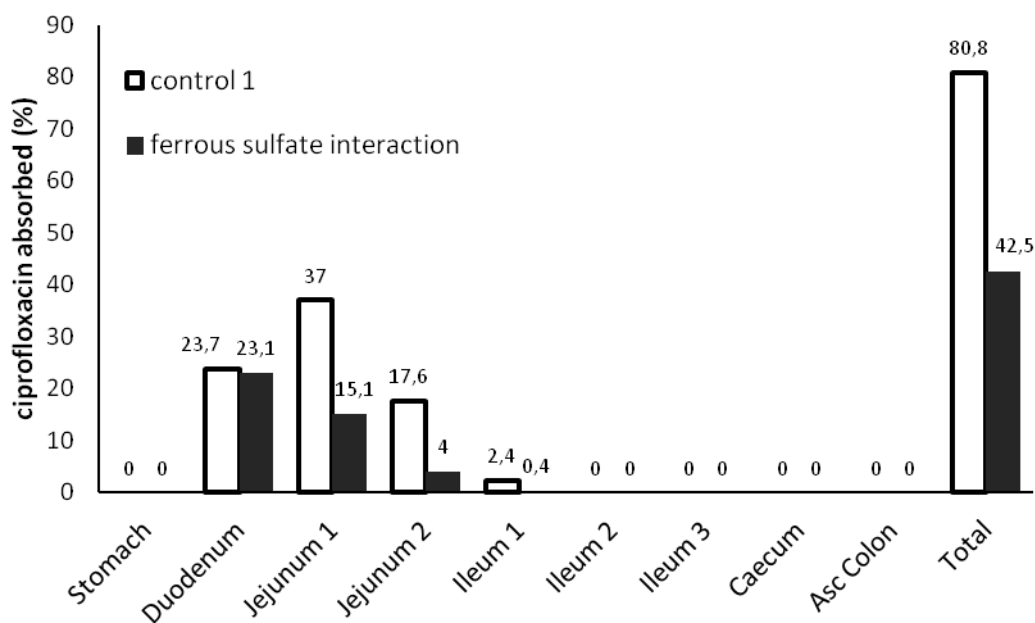
U simulacijama su dobijeni i podaci o kinetici apsorpcije ciprofloksacina bez, kao i u prisustvu jona gvožđa, kao i podaci o regionalnoj apsorpciji. Profili apsorpcije ciprofloksacina bez/u prisustvu gvožđe(II)-sulfata dobijeni prilikom *in silico* simulacije su upoređivani sa rezultatima dobijenim numeričkom dekonvolucijom (slika 50). Može se uočiti da je u oba slučaja apsorpcija ciprofloksacina brza i da se dešava u toku prvih 2 h nakon primene.



*Slika 50. Profili apsorpcije ciprofloksacina dobijeni metodom numeričke dekonvolucije i in silico simulacije koristeći in vivo podatke Kara i sar. (15)*

*Fig. 50. Ciprofloxacin absorption profiles calculated by numerical deconvolution and estimated by gastrointestinal simulation from the in vivo data set reported by Kara et al (15).*

Na slici 51 dat je prikaz regionalne apsorpcije ciprofloksacina u različitim delovima GIT-a bez i nakon primene sa gvožđe(II)-sulfatom. Može se videti da se apsorpcija dominantno odvija u duodenumu i jejunumu što je i u skladu sa literaturnim podacima (123). Takođe, može se uočiti da je potencijalno mesto interakcije jejunum 1 i jejunum 2 gde je i smanjena apsorpcija ciprofloksacina nakon istovremene primene sa tabletom gvožđe(II)-sulfata.



*Slika 51. Regionalna apsorpcija ciprofloksacina bez/uz primenu preparata sa gvožđe(II)-sulfatom*

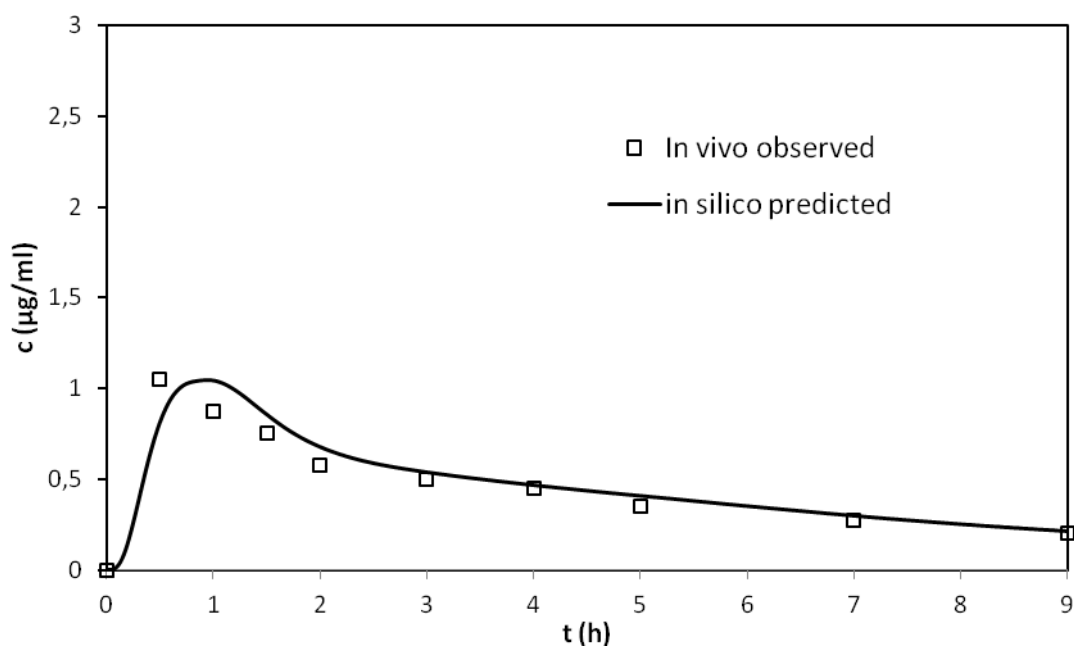
*Fig. 51. Regional absorption of ciprofloxacin with/without ferrous sulfate co-administration*

### **Simulacija interakcije ciprofloksacina sa gvožđe(II)-glukonatom**

Na slici 52 dat je prikaz simuliranog i *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon istovremene primene sa gvožđe(II)-glukonatom.

Promena rastvorljivosti ciprofloksacina najviše utiče na smanjenje biorasploživosti ciprofloksacina u prisustvu gvožđe(II)-glukonata. *In silico* optimizovana vrednost za parametar za rastvorljivost pri kojoj se simulirani i *in vivo* profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi u prisustvu gvožđe(II)-glukonata najbolje slažu je 0.9 mg/ml (slika 52).

Vrednosti statističkih parametara su  $r^2 = 0.86$ ;  $SSE = 0.09$ ;  $RMSE = 0.01$  i  $MAE = 0.07$ . Može se uočiti da je izračunata vrednost za koeficijent korelacije visoka, a da je vrednost za koeficijent greške niska, što ukazuje na to da se simulirani i *in vivo* dobijeni profil dobro slažu. Izračunate vrednosti greške predviđanja za  $C_{max}$  i  $AUC_{0-t}$  su prikazane u tabeli 21, a s obzirom da su manje od 10 %, predviđanje se može smatrati uspešnim.



**Slika 52.** Simulirani i in vivo profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacina sa tabletom gvožđe(II)-glukonata

**Fig. 52.** Simulated and in vivo observed mean ciprofloxacin plasma Cp-time profiles following oral administration of ciprofloxacin tablet with ferrous gluconate tablet

**Tabela 21.** Vrednosti in vivo uočenih i in silico predviđenih vrednosti farmakokinetičkih parametara kao i odgovarajućih greški predviđanja (% PE)

**Table 21.** In silico predicted and in vivo observed pharmacokinetic parameters with calculated values for percent prediction error (% PE)

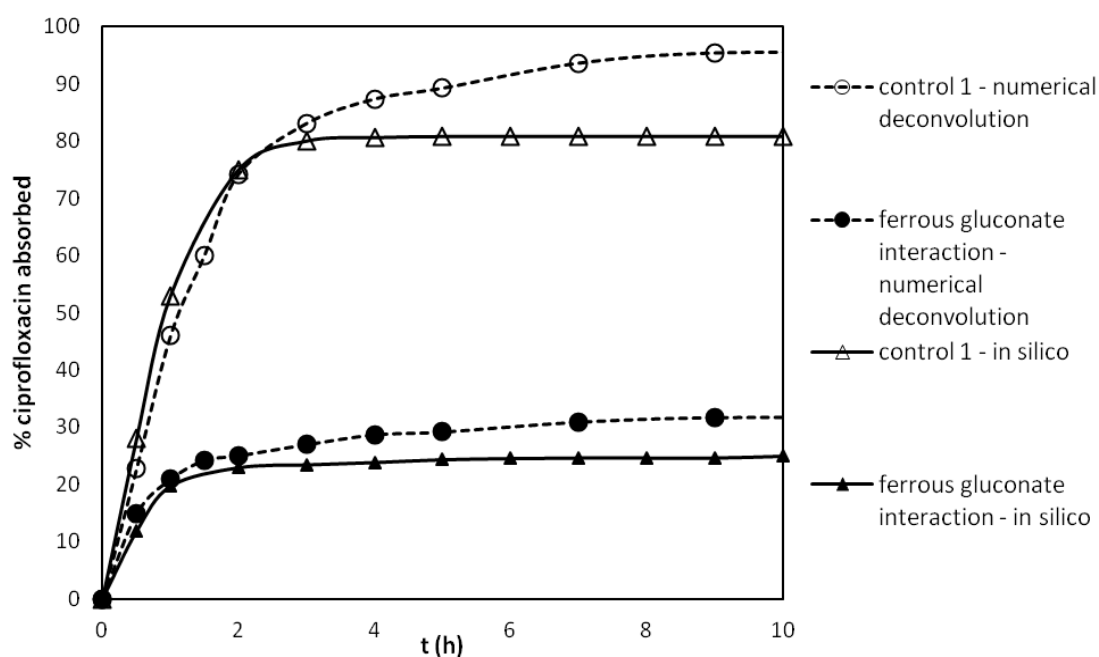
	$C_{max}$ (µg/ml)			$AUC_{0-t}$ (µgh/h)			Ref
	observed	predicted	% PE	observed	predicted	%PE	
<b>Ciprofloxacin-ferrous gluconate interaction</b>	1.05	1.05	0	4.19	4.25	1.43	15

Poređenjem eksperimentalno dobijenih i *in silico* optimizovanih rezultata za rastvorljivost uočava se izvesna kontradiktornost. Naime, u *in vitro* uslovima dobijena je veća vrednost za rastvorljivost ciprofloksacina u prisustvu gvožđe(II)-glukonata u odnosu na *in silico* optimizovanu vrednost, a takođe, interakcija nije uočena prilikom ispitivanja brzine rastvaranja. U *in vivo* studiji su korišćene tablete sa trenutnim



oslobađanjem gvožđe(II)-sulfata i gvožđe(II)-glukonata koje su sadržavale oko 60 mg gvožđa. Kara i sar. (15) su pretpostavili da je brzina rastvaranja gvožđe(II)-glukonata *in vivo* veća od brzine rastvaranja gvožđe(II)-sulfata i da je zato efekat interakcije izraženiji. Kao što je već pomenuto u poglavlju 6.2, u *in vitro* uslovima nije uočena interakcija između ciprofloksacina i gvožđe(II)-glukonata, verovatno usled toga što glukonatni anjon prisutan u medijumu može da pomeri ravnotežu reakcije između ciprofloksacina i gvožđe(II)-glukonata ka stvaranju rastvorljivih proizvoda, sprečavajući pritom nastanak kompleksa.

Tokom simulacija dobijeni su i podaci o kinetici apsorpcije ciprofloksacina bez/u prisustvu gvožđe(II)-glukonata kao i podaci o regionalnoj apsorpciji. Profili apsorpcije ciprofloksacina bez/u prisustvu gvožđe(II)-glukonata dobijeni tokom *in silico* simulacije su upoređivani sa rezultatima dobijenim numeričkom dekonvolucijom (slika 53). Može se uočiti da je u oba slučaja apsorpcija ciprofloksacina brza i da se dešava u toku prvih 2 h nakon primene.

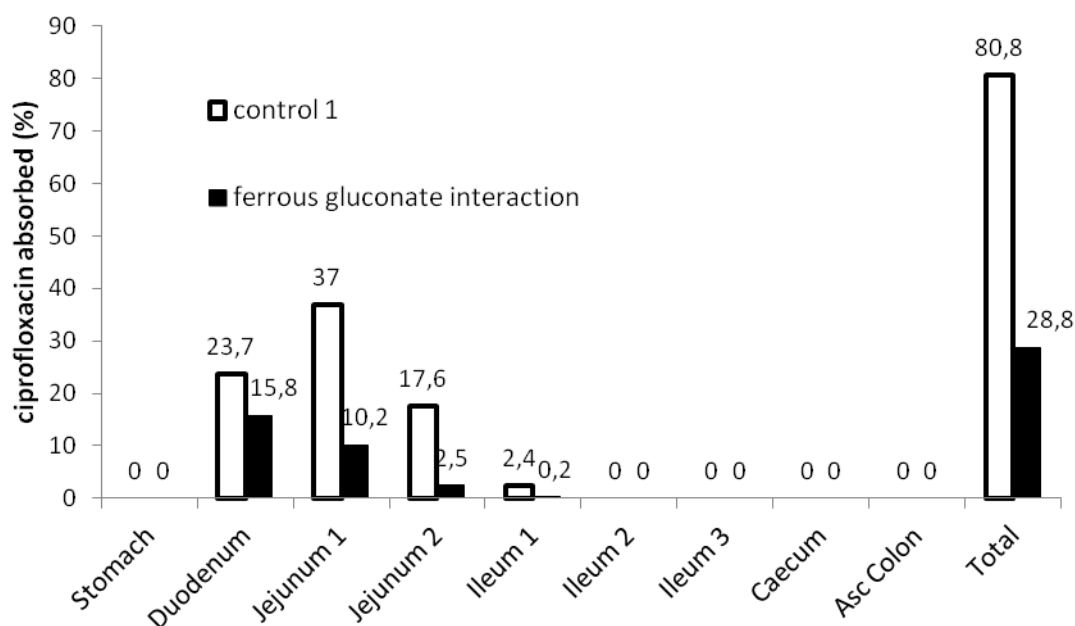


**Slika 53.** Profili apsorpcije ciprofloksacina dobijeni metodom numeričke dekonvolucije i *in silico* simulirani koristeći *in vivo* podatke Kara i sar. (15)

**Fig. 53.** Ciprofloxacin absorption profiles calculated by numerical deconvolution and estimated by gastrointestinal simulation from the *in vivo* data set reported by Kara et al (15).

Na slici 54 dat je prikaz regionalne apsorpcije ciprofloksacina u različitim delovima

GIT-a bez i nakon primene sa preparatom gvožđe(II)-glukonata. Može se videti da se apsorpcija dominantno odvija u duodenumu i jejunumu što je u skladu sa literaturnim podacima (123). Takođe, kao i kod interakcije sa gvožđe(II)-sulfatom potencijalno mesto interakcije je jejunum 1 i jejunum 2.



*Slika 54. Regionalna apsorpcija ciprofloksacina bez/uz primenu preparata sa gvožđe(II)-glukonatom*

*Fig. 54. Regional absorption of ciprofloxacin with/without ferrous gluconate co-administration*

### 6.3.3 Simulacija interakcije ciprofloksacina sa aluminijum-hidroksidom

Za optimizaciju modela gastrointestinalne simulacije interakcije ciprofloksacina i aluminijum-hidroksida primenjen je profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon istovremene primene sa preparatom aluminijum-hidroksida (136).

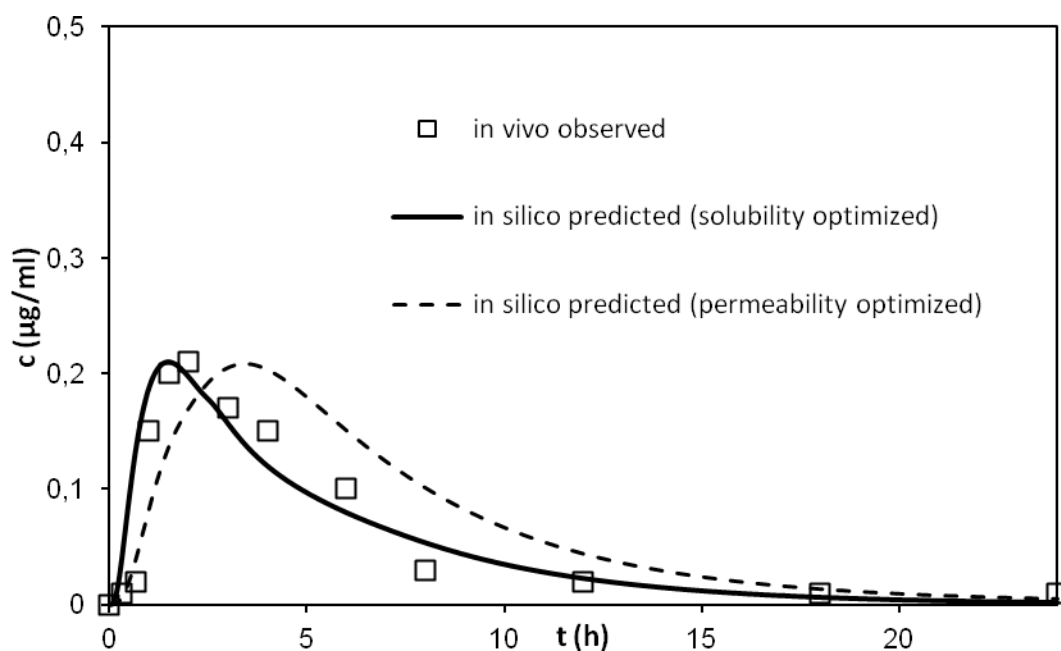
*In vitro* ispitivanje rastvorljivosti ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu aluminijum-hidroksida je pokazalo da je koncentracija rastvorenog ciprofloksacina smanjena kada je količina aluminijum-hidroksida veća od 10 mg/ml. Sa druge strane, nije uočena značajna razlika u brzini rastvaranja ciprofloksacina iz tableta u vodi bez/u prisustvu aluminijum-hidroksida. U studiji Žakelja i sar. (61) je uočeno da kompleks

ciprofloksacin-aluminijum ne permeira membranu intestinuma.

PSA analiza je identifikovala rastvorljivost i permeabilnost kao kritične parametre koji utiču na stepen apsorpcije ciprofloksacina, pa su prilikom *in silico* ispitivanja interakcije ciprofloksacina i jona aluminijuma razmatrana dva slučaja:

Slučaj 1: U ovom slučaju, ulazni parametar za permeabilnost nije variran ( $P_{\text{eff}} = 1.57 \times 10^{-4}$  cm/s), dok je vrednost za rastvorljivost kao ulazni parametar optimizovana. Utvrđeno je da je najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi, u prisustvu aluminijum-hidroksida, kada je optimizovana vrednost za rastvorljivost 0.07 mg/ml. Simulirani i *in vivo* profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacina sa tabletom aluminijum-hidroksida su prikazani na slici 55. Vrednosti odgovarajućih statističkih parametara bile su  $r^2 = 0.8$ ; SSE = 0.02; RMSE = 0.04 i MAE = 0.03. U tabeli 22 dat je prikaz predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajuće vrednosti greške predviđanja za simulirani profil. S obzirom da su vrednosti greške predviđanja za  $C_{\text{max}}$  i AUC manje od 10 %, predviđanje se može smatrati uspešnim.

Slučaj 2: U ovom slučaju, rastvorljivost kao ulazni parametar nije varirana (korišćena je eksperimentalno određena vrednost za rastvorljivost u vodi 42 mg/ml), dok je permeabilnost kao ulazni parametar optimizovana. Najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila je bilo za vrednost ulaznog parametra  $0.1 \times 10^{-4}$  cm/s, što je oko 15 puta manje u odnosu na početni/kontrolni profil ( $P_{\text{eff}} = 1.57 \times 10^{-4}$  cm/s). Simulirani i *in vivo* profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacina sa tabletom aluminijum-hidroksida su prikazani na slici 55. Vrednosti odgovarajućih statističkih parametara bile su  $r^2 = 0.74$ ; SSE = 0.02; RMSE = 0.04 i MAE = 0.04, dok su vrednosti greške predviđanja za  $C_{\text{max}}$  i  $AUC_{0-t}$  prikazane u tabeli 22.



*Slika 55. Simulirani i in vivo profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacina sa tabletom aluminijum-hidroksida (136)*

*Fig. 55. Simulated and in vivo observed mean ciprofloxacin plasma Cp-time profiles following oral administration of ciprofloxacin tablet with aluminium hydroxide tablet (136)*

*Tabela 22. Vrednosti in vivo uočenih i in silico predviđenih vrednosti farmakokinetičkih parametara kao i odgovarajućih greški predviđanja (% PE)*

*Table 22. In silico predicted and in vivo observed pharmacokinetic parameters with calculated values for percent prediction error (% PE)*

Ciprofloxacin- aluminium hydroxide interaction	$C_{max}$ (µg/ml)			$AUC_{0-t}$ (µgh/h)			Ref
	observed	predicted	% PE	observed	predicted	%PE	
optimized solubility	0.21	0.21	0	1.20	1.17	2.50	136
optimized permeability	0.21	0.21	0	1.20	1.63	35.80	136

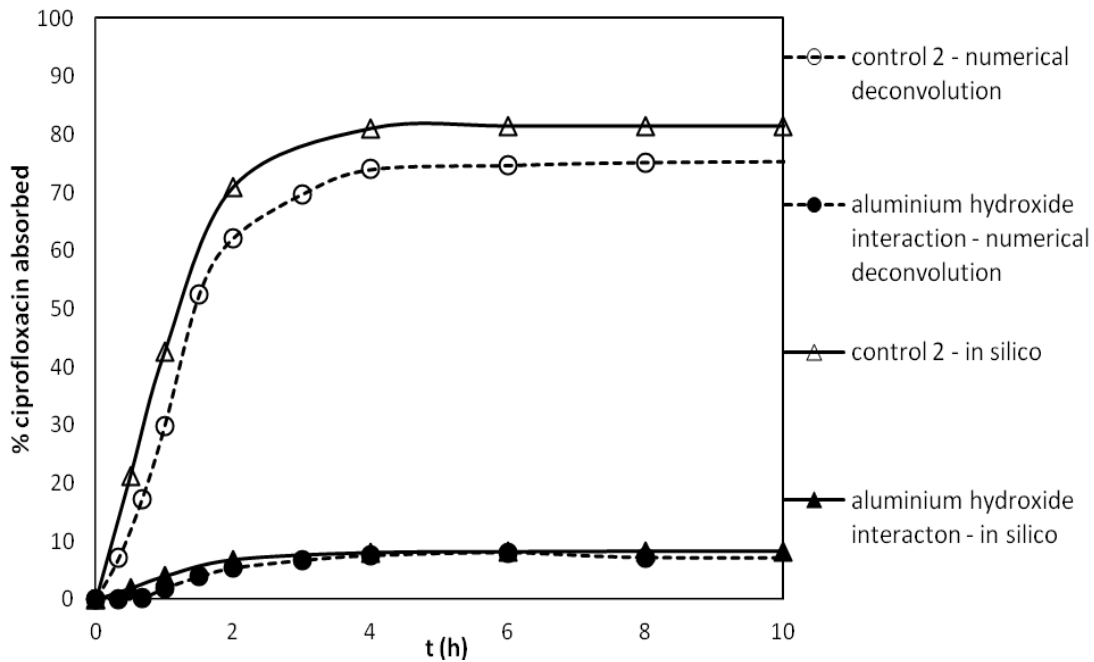
Na osnovu izračunatih vrednosti za procenat greške predviđanja i za vrednosti koeficijenta korelacije, može se uočiti da je bolje slaganje *in vivo* i *in silico* profila

koncentracije ciprofloksacina u plazmi postignuto optimizovanjem vrednosti za rastvorljivost. Literaturni izvori navode da ciprofloksacin gradi bolje rastvorljive komplekse ciprofloksacina sa aluminijumom (98, 153, 154) u odnosu na rastvorljivost ciprofloksacina u opsegu pH 1–8 i da kompleksi ne permeiraju membranu GIT-a (61). *In vitro* određena rastvorljivost ciprofloksacina u prisustvu aluminijum-hidroksida je oko 24 mg/ml, što je oko 300 puta više od *in silico* optimizovane vrednosti (tabela 11). Prilikom ispitivanja brzine rastvaranja, koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u 50 ml medijuma koji sadrži aluminijum-hidroksid je bila oko 7.5 mg/ml, što je, takođe, znatno više od *in silico* optimizovane vrednosti.

Nakon primene velikih doza aluminijum-hidroksida *in vivo*, može doći do stvaranja fizičke barijere koja sprečava oslobađanje i rastvaranje ciprofloksacina u gastrointestinalnom lumenu i dovodi do smanjenja biorasploživosti. Takođe, neki autori navode da adsorpcija ciprofloksacin-hidrohlorida na čestice aluminijum-hidroksida može uticati na biorasploživost ciprofloksacina (156). Uticaji ovih faktora (adsorpcija ili stvaranje mehaničke barijere) se, međutim, ne mogu identifikovati primenom gastrointestinalne simulacije, pa je prilikom ispitivanja potencijalnog mehanizma interakcije lekova neophodno uzeti u obzir i rezultate dobijene u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima. Ispitivanje brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u malim zapreminama medijuma u prisustvu velikih količina aluminijum-hidroksida može biti korisno u otkrivanju ovih faktora koji mogu uticati na brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta.

Tokom simulacija dobijeni su i podaci o kinetici apsorpcije i regionalnoj apsorpciji ciprofloksacina bez/u prisustvu aluminijum-hidroksida. Na slici 56 dat je uporedni prikaz profila apsorpcije ciprofloksacina dobijenih numeričkom dekonvolucijom i *in silico* simuliranih profila bez i nakon primene 3 tablete sa po 600 mg aluminijum-hidroksida.

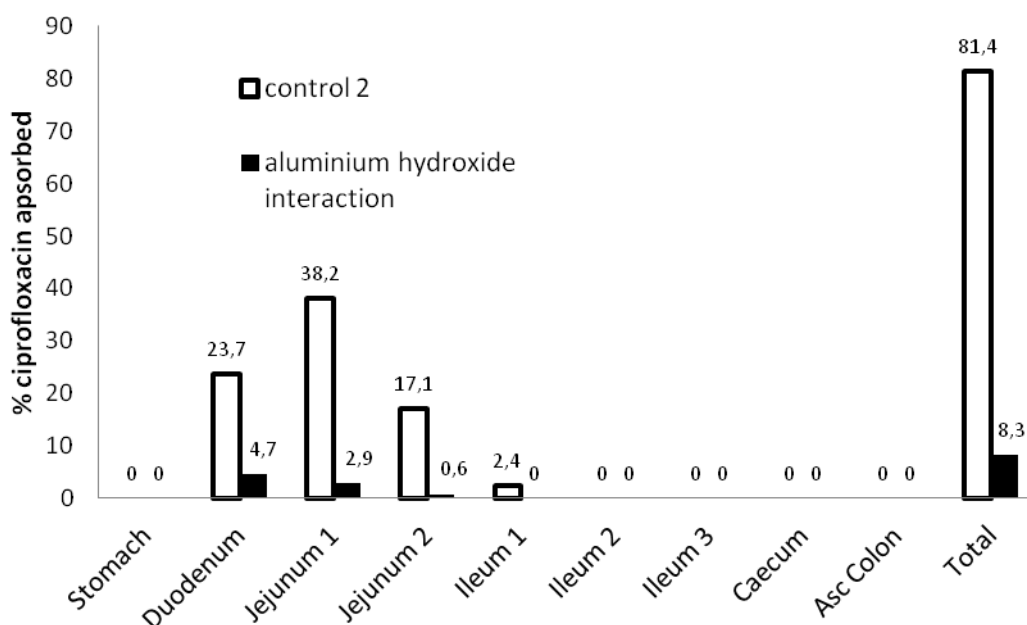
Može se uočiti da se proces apsorpcije odvija brzo. Iako profil apsorpcije ciprofloksacina (*control 2*) dobijen numeričkom dekonvolucijom pokazuje nešto nižu vrednost u odnosu na *in silico* simulirani profil apsorpcije, profili apsorpcije ciprofloksacina u prisustvu aluminijum-hidroksida dobijeni numeričkom dekonvolucijom i *in silico* simulirani su gotovo identični.



**Slika 56.** Profili apsorpcije ciprofloksacina dobijeni metodom numeričke dekonvolucije i gastrointestinalne simulacije koristeći *in vivo* podatke Frosta i sar. (136)

**Fig. 56.** Ciprofloxacin absorption profiles calculated by numerical deconvolution and estimated by gastrointestinal simulation from the *in vivo* data set reported by Frost et al (136)

Na osnovu rezultata *in silico* simulacija interakcije između ciprofloksacina i aluminijum-hidroksida sa optimizovanom vrednosti za rastvorljivost kao ulazni parametar, mogu se dobiti podaci o regionalnoj apsorpciji ciprofloksacina nakon primene sa aluminijum-hidroksidom. Na slici 57 se može videti da se apsorpcija dominantno odvija u duodenumu i jejunumu što je u skladu sa literaturnim podacima (123), a potencijalno mesto interakcije je proksimalni deo intestinuma (duodenum, jejunum 1 i jejunum 2).



*Slika 57. Regionalna apsorpcija ciprofloksacina bez/uz primenu preparata sa aluminijum-hidroksidom*

*Fig. 57. Regional absorption of ciprofloxacin with/without aluminium hydroxide co-administration*

### 6.3.4 Simulacija interakcije ciprofloksacina sa kalcijum-karbonatom

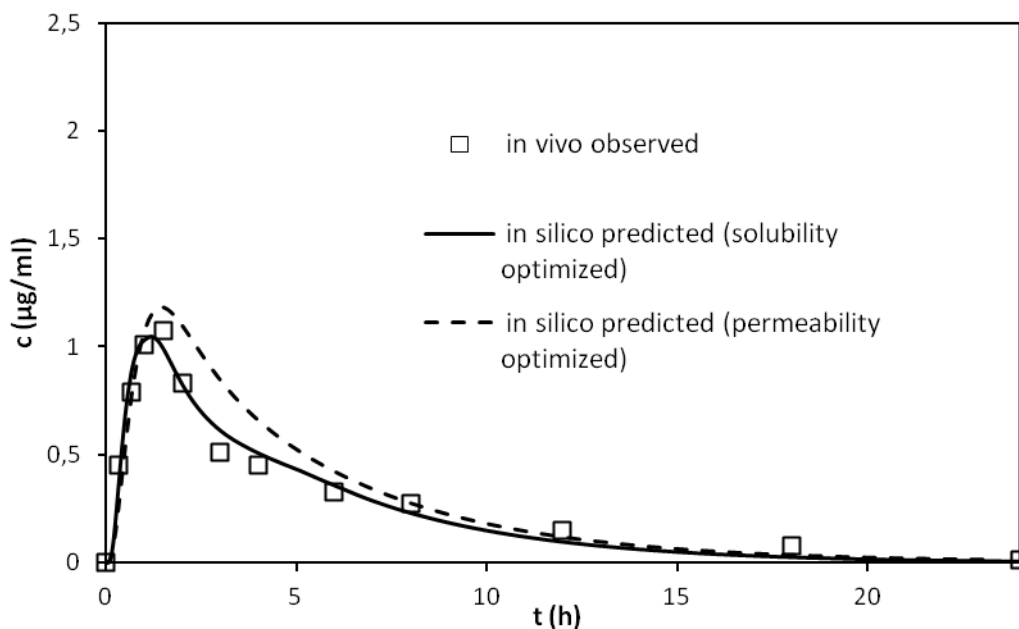
Za optimizaciju modela gastrointestinalne simulacije interakcije ciprofloksacina i kalcijum-karbonata primenjen je profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon istovremene primene sa preparatom kalcijum-karbonata (136).

Uzimajući u obzir rezultate PSA analize i potencijalni uticaj rastvorljivosti i permeabilnosti na stepen apsorpcije ciprofloksacina, prilikom *in silico* ispitivanja interakcije ciprofloksacina i kalcijum-karbonata razmatrana su dva slučaja:

*Slučaj 1:* U ovom slučaju, ulazni parametar za permeabilnost nije variran ( $P_{\text{eff}} = 1.57 \times 10^{-4}$  cm/s), dok je vrednost za rastvorljivost kao ulazni parametar optimizovana. Najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi u prisustvu kalcijum-karbonata je dobijeno kada je optimizovana vrednost za rastvorljivost kao ulazni parametar bila 1 mg/ml. Simulirani i *in vivo* profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacin-

hidrohlorida sa tabletom kalcijum-karbonata su prikazani na slici 58. Vrednosti odgovarajućih statističkih parametara bile su  $r^2 = 0.97$ ;  $SSE = 0.05$ ;  $RMSE = 0.06$  i  $MAE = 0.05$ . Visoka vrednost za koeficijent korelacije i niska vrednost za koeficijent greške ukazuju na to da se simulirani i *in vivo* dobijeni profil dobro slažu. U tabeli 23 dat je prikaz predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajuće vrednosti greške predviđanja za simulirani profil. S obzirom da su greške predviđanja za  $C_{max}$  i  $AUC_{0-t}$  manje od 10 %, predviđanje se može smatrati uspešnim.

Slučaj 2: U ovom slučaju, rastvorljivost kao ulazni parametar nije varirana (korišćena je eksperimentalno određena vrednost za rastvorljivost u vodi 42 mg/ml), dok je permeabilnost kao ulazni parametar optimizovana. Najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila je dobijeno kada je optimizovana vrednost za permeabilnost kao ulazni parametar  $0.8 \times 10^{-4}$  cm/s. Simulirani i *in vivo* profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacin-hidrohlorida sa tabletom kalcijum-karbonata su prikazani na slici 58. Vrednosti statističkih parametara su  $r^2 = 0.86$ ;  $SSE = 0.02$ ;  $RMSE = 0.03$  i  $MAE = 0.04$ , dok su vrednosti greške predviđanja za  $C_{max}$  i  $AUC_{0-t}$  prikazane u tabeli 23.



**Slika 58.** Simulirani i *in vivo* uočeni profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacina sa tabletom kalcijum-karbonata (136)

**Fig. 58.** Simulated and *in vivo* observed mean ciprofloxacin plasma  $C_p$ -time profiles following oral administration of ciprofloxacin tablet with calcium carbonate tablet (136)



**Tabela 23.** Vrednosti *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara kao i odgovarajućih greški predviđanja (% PE)

**Table 23.** *In silico* predicted and *in vivo* observed pharmacokinetic parameters with calculated values for percent prediction error (% PE)

Ciprofloxacin-calcium carbonate interaction	$C_{max}$ (µg/ml)			AUC <sub>0-t</sub> (µgh/h)			Ref
	observed	predicted	% PE	observed	predicted	%PE	
optimized solubility	1.08	1.05	2.80	5.88	5.31	9.70	136
optimized permeability	1.08	1.18	9.30	5.88	6.50	10.54	136

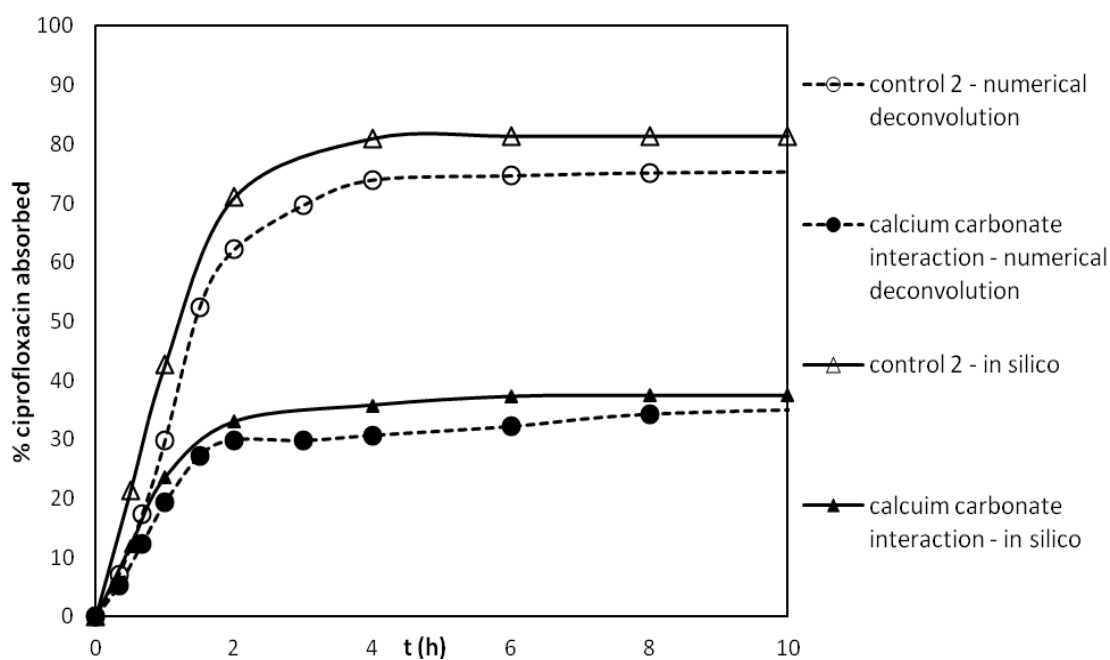
Na osnovu vrednosti farmakokinetičkih parametara i greški predviđanja prikazanih u tabeli 23, može se uočiti da na apsorpciju ciprofloksacina više utiče promena rastvorljivosti nego promena permabilnosti.

Prema Žakelj i sar. (61), prisustvo jona kalcijuma ne utiče značajno na permeabilnost ciprofloksacina, što je i u skladu sa *in silico* dobijenim rezultatima. *In silico* optimizovana vrednost za rastvorljivost kao ulazni parametar je 1 mg/ml. Prilikom *in vitro* ispitivanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata utvrđeno je da dodatak kalcijum-karbonata u medijum menja pH vrednost sredine i da to utiče na rastvorljivost i oslobađanje ciprofloksacina iz tableta (tabela 13). Takođe, karakterizacija čvrste faze prikupljene nakon ispitivanja brzine rastvaranja je ukazala da prilikom interakcije između ciprofloksacin-hidrohlorida i kalcijum-karbonata dolazi do taloženja hidratizane forme ciprofloksacin baze.

Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu nakon ispitivanja brzine rastvaranja u prisustvu kalcijum-karbonata je bila smanjena za više od 70 % (slika 32). Koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida u 50 ml medijuma nakon ispitivanja brzine rastvaranja u prisustvu kalcijum-karbonata je bila 0.83 mg/ml, što je slično *in silico* optimizovanoj vrednosti za rastvorljivost (1 mg/ml). Eksperimentalno određena rastvorljivost ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu kalcijum-karbonata (0.12 mg/ml) je nešto niža od *in silico* optimizovane vrednosti i slična je rastvorljivosti ciprofloksacin baze u vodi. Koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida nađena u 50 ml medijuma nakon ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-

hidrohlorida u prisustvu kalcijum-karbonata daje podatke koji su najpribližniji *in silico* optimizovanoj vrednosti za rastvorljivost, što ukazuje na značaj korišćenja malih zapremina medijuma u razvoju biorelevantnog testa za *in vitro* ispitivanje interakcije ciprofloksacina i kalcijum-karbonata.

Na slikama 59 i 60 dati su prikazi profila apsorpcije dobijenih *in silico* simulacijom i numeričkom dekonvolucijom, kao i podaci o regionalnoj apsorpciji ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata. Može se uočiti da su profili apsorpcije ciprofloksacina u prisustvu kalcijuma dobijeni numeričkom dekonvolucijom i *in silico* simulirani gotovo identični u toku prvih 2 h nakon primene. Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju da je apsorpcija ciprofloksacina u prisustvu kalcijum-karbonata smanjena verovatno usled ograničene rastvorljivosti ciprofloksacina na pH vrednostima iznad 6.

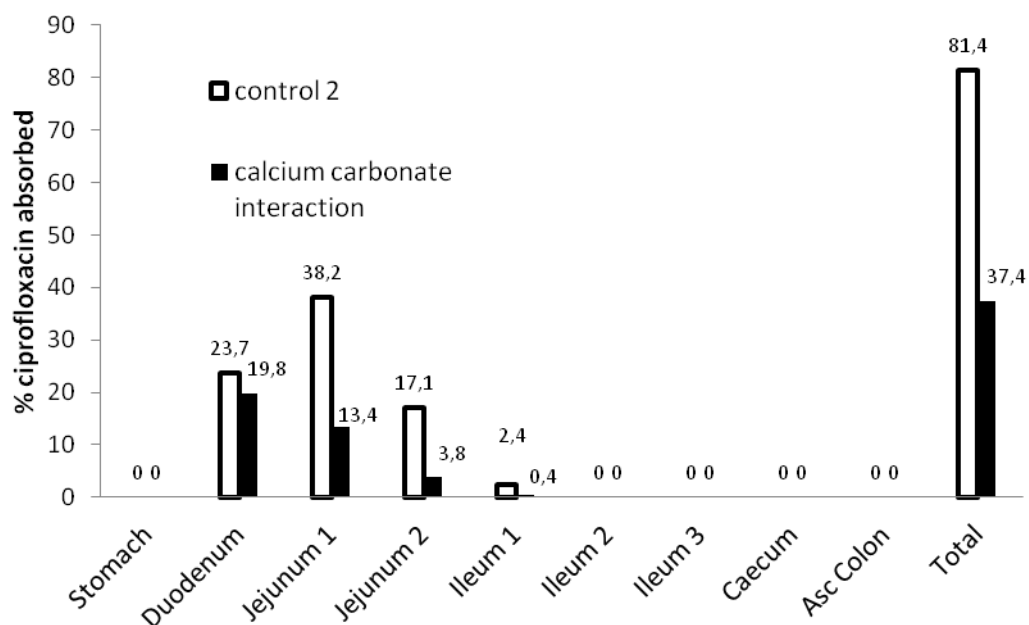


**Slika 59.** Profili apsorpcije ciprofloksacina dobijeni metodom numeričke dekonvolucije i gastrointestinalne simulacije koristeći *in vivo* podatke Frosta i sar. (136)

**Fig. 59.** Ciprofloxacin absorption profiles calculated by numerical deconvolution and estimated by gastrointestinal simulation from the *in vivo* data set reported by Frost et al (136).

Na osnovu slike 60, može se videti da se apsorpcija ciprofloksacina kada se on primeni sa preparatom koji sadrži kalcijum-karbonat dominantno odvija u duodenumu i

jejunumu. Apsorpcija ciprofloksacina je najviše smanjena u jejunumu 1 i jejunumu 2, pa se pretpostavlja da je taj deo tankog creva potencijalno mesto interakcije ciprofloksacina i jona kalcijuma.



*Slika 60. Regionalna apsorpcija ciprofloksacina bez/uz primenu preparata sa kalcijum-karbonatom*

*Fig. 60. Regional absorption of ciprofloxacin with/without calcium carbonate co-administration*

### 6.3.5 Simulacija interakcije ciprofloksacina i jona cinka

Za optimizaciju modela gastrointestinalne simulacije interakcije ciprofloksacina i jona cinka primenjen je profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon istovremene primene sa multivitaminskim preparatom koji sadrži cink (16).

Uzimajući u obzir rezultate PSA analize i potencijalni uticaj rastvorljivosti i permeabilnosti na stepen apsorpcije ciprofloksacina, prilikom *in silico* ispitivanja interakcije ciprofloksacina i preparata koji sadrži cink razmatrana su dva slučaja:

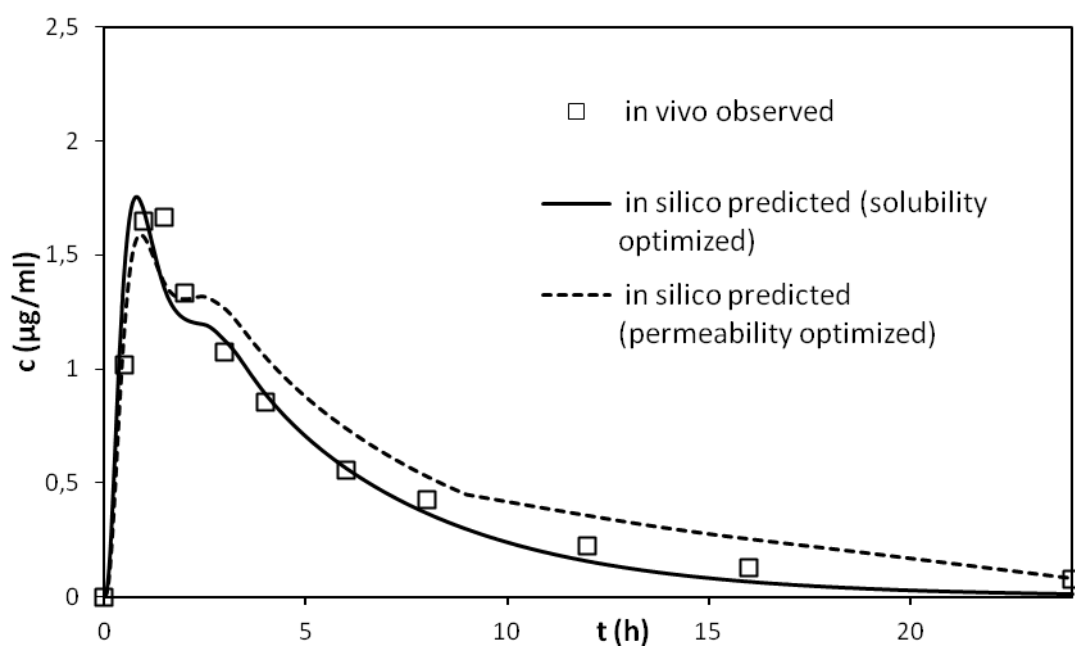
Slučaj 1: U ovom slučaju, ulazni parametar za permeabilnost nije variran ( $P_{\text{eff}} = 1.57 \times 10^{-4}$  cm/s), dok je vrednost za rastvorljivost kao ulazni parametar optimizovana.

Najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi u prisustvu multivitamina sa cinkom je dobijeno, kada je optimizovana vrednost za rastvorljivost kao ulazni parametar bila 29 mg/ml. Simulirani profil i *in vivo* profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacin-hidrohlorida sa multivitaminskim preparatom koji sadrži cink su prikazani na slici 61. Vrednosti odgovarajućih statističkih parametara bile su  $r^2 = 0.93$ ;  $SSE = 0.3$ ;  $RMSE = 0.2$  i  $MAE = 0.1$ . U tabeli 24 dat je prikaz predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara i odgovarajuće vrednosti greške predviđanja za simulirani profil. S obzirom da su vrednosti greške predviđanja za  $C_{max}$  i AUC manje od 10 %, predviđanje se može smatrati uspešnim.

Slučaj 2: U ovom slučaju, rastvorljivost kao ulazni parametar nije varirana (korišćena je eksperimentalno određena vrednost za rastvorljivost u vodi 42 mg/ml), dok je permeabilnost kao ulazni parametar optimizovana. Najbolje slaganje simuliranog i *in vivo* profila je dobijeno kada je optimizovana vrednost za permeabilnost kao ulazni parametar  $1.2 \times 10^{-4}$  cm/s. Vrednosti odgovarajućih statističkih parametara bile su  $r^2 = 0.84$ ;  $SSE = 0.4$ ;  $RMSE = 0.2$  i  $MAE = 0.2$ , dok su vrednosti greške predviđanja za  $C_{max}$  i  $AUC_{0-t}$  prikazane u tabeli 24. Odgovarajući simulirani profil i *in vivo* profil koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete ciprofloksacin-hidrohlorida sa multivitaminskim preparatom koji sadrži cink su prikazani na slici 61.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 24, može se uočiti da na apsorpciju ciprofloksacina više utiče promena rastvorljivosti nego promena permeabilnosti.

Na slici 61 mogu se uočiti dva pika u simuliranim profilima koncentracije ciprofloksacina u plazmi, što može biti posledica različitog stepena apsorpcije duž GIT-a. Prisustvo dva pika u simuliranim profilima apsorpcije ciprofloksacina nakon primene sa multivitaminskim preparatom cinka može da ukaže na postojanje dva regiona za apsorpciju u GIT-u koja su razdvojena regionom u kome je apsorpcija ciprofloksacina smanjena usled interakcije sa cinkom.



**Slika 61.** Simulirani i in vivo uočeni profili koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon primene tablete sa 500 mg ciprofloksacina sa preparatom cinka

**Fig. 61.** Simulated and in vivo observed mean ciprofloxacin plasma Cp-time profiles following oral administration of ciprofloxacin 500 mg tablet with zinc containing preparation

**Tabela 24.** Vrednosti in vivo uočenih i in silico predviđenih farmakokinetičkih parametara kao i odgovarajućih greški predviđanja (% PE)

**Table 24.** In silico predicted and in vivo observed pharmacokinetic parameters with calculated values for percent prediction error (% PE)

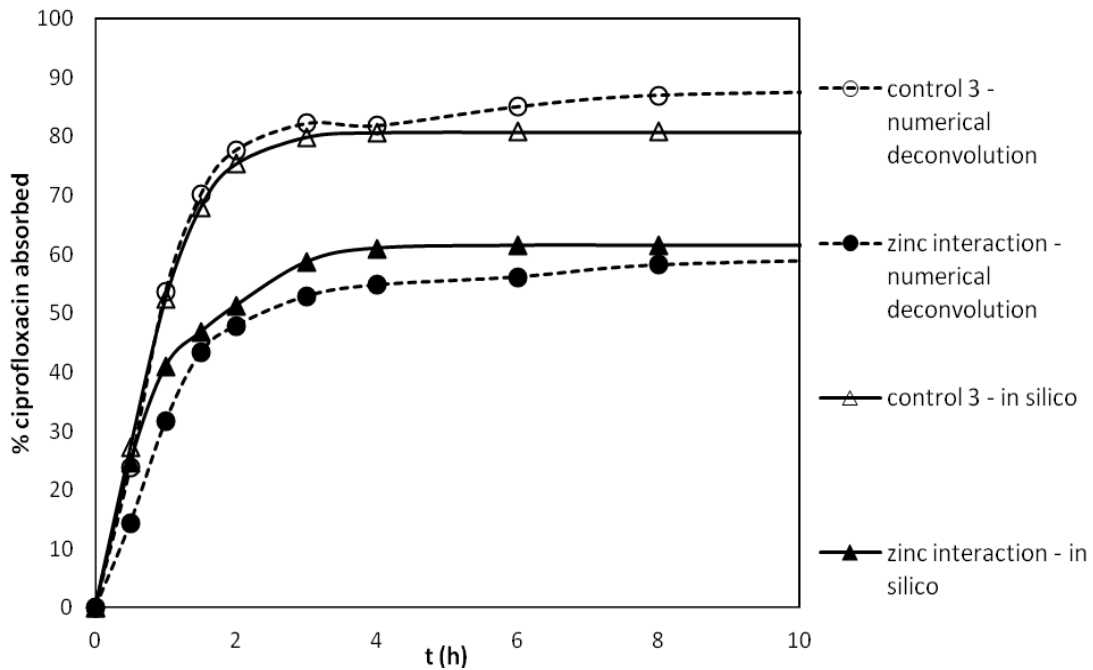
Ciprofloxacin-zinc interaction	C <sub>max</sub> (µg/ml)			AUC <sub>0-t</sub> (µgh/h)			Ref
	observed	predicted	% PE	observed	predicted	%PE	
optimized solubility	1.67	1.76	2.80	10.20	9.72	4.70	16
optimized permeability	1.67	1.59	4.80	10.20	11.53	13.04	16

In vitro dobijeni rezultati ispitivanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida u prisustvu soli cinka (cink-hlorida i cink-sulfata) su pokazali da su u

prisustvu soli cinka smanjene rastvorljivost i brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta (slika 38-40). Koncentracija ciprofloksacin-hidrohlorida u rastvoru iznad taloga nakon mešanja rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata je bila 3.3 mg/ml, što je značajno niže od *in silico* optimizovane vrednosti za rastvorljivost. To se može objasniti činjenicom da je simulirani profil upoređivan sa *in vivo* profilom koncentracije ciprofloksacina u plazmi nakon istovremene primene ciprofloksacina sa multivitaminskim preparatom koji sadrži oko 23 mg cinka, dok je u *in vitro* ispitivanjima korišćena veća količina cinka. Karakterizacija čvrstih faza dobijenih mešanjem rastvora ciprofloksacin-hidrohlorida i soli cinka (cink-hlorid ili cink-sulfat) u različitim molarnim odnosima je ukazala na *in vitro* građenje slabo rastvorljivog ciprofloksacin-cink kompleksa. Uzimajući u obzir rezultate *in vivo* studija, *in vitro* i *in silico* rezultate simulacije interakcije ciprofloksacina sa jonom cinka, građenje slabo rastvorljivog kompleksa bi mogao da predstavlja potencijalan mehanizam interakcije između ciprofloksacina i jona cinka.

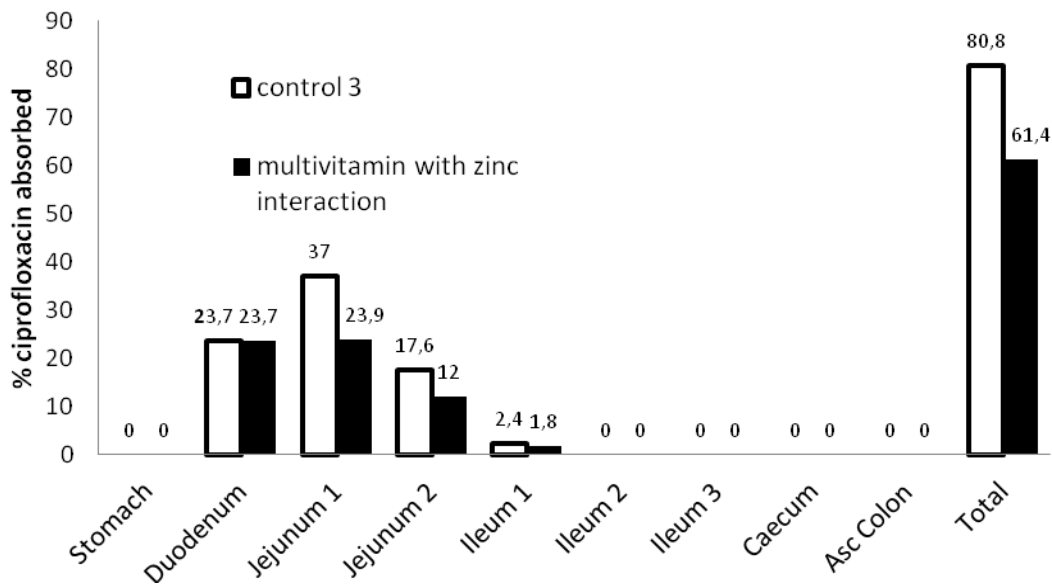
Na slikama 62 i 63 dati su prikazi profila apsorpcije dobijenih *in silico* simulacijom i numeričkom dekonvolucijom, kao i podaci o regionalnoj apsorpciji ciprofloksacina u prisustvu jona cinka. Može se uočiti da se profil apsorpcije ciprofloksacina (*control 3*) dobijen numeričkom dekonvolucijom slaže sa *in silico* simuliranim profilom. Takođe, profil apsorpcije ciprofloksacina u prisustvu preparata koji sadrži cink dobijen numeričkom dekonvolucijom se dobro slaže sa *in silico* simuliranim profilom apsorpcije ciprofloksacina. Apsorpcija ciprofloksacina bez, kao i nakon primene sa preparatom koji sadrži cink je brza i odvija se u prvih 2 h.

Na osnovu slike 63 vidi se da se ciprofloksacin u najvećem procentu apsorbuje u proksimalnim delovima intestinuma, dok su potencijalna mesta interakcije jejunum 1 i jejunum 2.



*Slika 62. Profili apsorpcije ciprofloksacina dobijeni metodom numeričke dekonvolucije i gastrointestinalne simulacije koristeći in vivo podatke Polka i sar. (16)*

*Fig. 62. Ciprofloxacin absorption profiles calculated by numerical deconvolution and estimated by gastrointestinal simulation from the in vivo data set reported by Polk et al (16)*



*Slika 63. Regionalna apsorpcija ciprofloksacina bez/uz primenu preparata sa cinkom*

*Fig. 63. Regional absorption of ciprofloxacin with/without zinc co-administration*

### 6.3 *In silico* simulation of ciprofloxacin metallic ions interaction

Gastrointestinal mechanistic simulations have become an important *in silico* tool to predict the *in vivo* drug behavior during drug development and quality approval (68-70, 178-181). Advanced mechanistic, physiologically-based simulation programs are able to simulate gastrointestinal absorption, the fraction of drug absorbed, pharmacokinetics, and optionally, pharmacodynamic effects. *In vitro* study has become a critical first step in the assessment of drug interactions. Besides the *in vitro* experiments, *in silico* modeling and simulation may also assist in the prediction of drug interactions and nowadays there is an increased interest for *in silico* investigation of drug–drug and food–drug interactions (68, 70, 73). However, there are only few published papers related to *in silico* simulation of drug-drug and drug-food interaction (70-73). The majority of the published data are related to *in silico* simulation of metabolic drug-drug interactions that involve cytochrome enzymes (71-73). Taking into account generally limited/incomplete gastrointestinal absorption of the investigated metallic compounds and that they are not metabolized in the body, the assumption of physicochemical nature of the interaction observed was made. In our study gastrointestinal mechanistic simulations were employed in investigation of physicochemical drug-drug interactions which impair absorption process. Ciprofloxacin-specific absorption models were developed and employed in order to simulate interactions between ciprofloxacin and a range of metallic ions (aluminium, calcium and zinc) and elucidate potential interaction mechanism/s.

#### 6.3.1 *In silico* simulation of ciprofloxacin absorption

*In silico* absorption simulation was performed using the commercially available software GastroPlus™ version 6.0.1004 (Simulations Plus Inc., USA) based on the Advanced Compartmental Absorption and Transit (ACAT) model. Gastrointestinal simulation for ciprofloxacin tablets, based on the input physicochemical and pharmacokinetic data presented in Table 16, and physiological data presented in Table 17, was performed by using the GastroPlus Single Simulation. Human Physiology Fasted mode was used for simulation. The simulated plasma concentration-time profile was compared with the mean plasma profile observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets containing 500 mg (15, 16) or 750 mg (136) of ciprofloxacin. In order to obtain the best fit with the *in vivo* data reported by Kara et al. (15), Frost et al. (136) and Polk et al. (16), it was necessary to optimize clearance as the input parameter (clearance was optimized to 26, 35 and 37 l/h, respectively). Default Absorption Scale Factor (ASF) values were modified to reflect the *in vivo* data indicating rapid drug absorption in the proximal segments of the gastrointestinal tract and narrow absorption window in the upper small intestine. Consequently, they were scaled to zero below the 'jejunum 2' compartment. The pH value in 'duodenum' compartment was adjusted to 4.04 in accordance with the ciprofloxacin hydrochloride experimental data (pH value of saturated ciprofloxacin hydrochloride solution). The proposed adjustment was justified based on relatively high



ciprofloxacin concentration following gastric emptying of a dissolved drug, relatively low fluid volume available (166-168) and low buffer capacity (182) in the proximal part of intestine.

Parameter Sensitivity Analysis (PSA) was used to assess the importance of selected input parameters (solubility, permeability, stomach residence time and small intestine transit time) in predicting the fraction of drug absorbed. During PSA, only one parameter is varied at a time while all other parameters are held at their baseline values. Solubility was varied in the range 0.1 - 100 mg/ml, while effective drug permeability was varied in the range from 0.79 to  $3.14 \times 10^{-4}$  cm/s, covering one half to 2-fold input value (i.e according to the default GastroPlus™ settings). Stomach and small intestine transit times were evaluated separately in order to assess the effects of residence time in stomach and small intestine on the percent of drug absorbed. As residence time in the stomach is known to be highly variable it was varied in the range 0.25-3 h, while the transit time in small intestine has been reported to be relatively constant and physiologically relevant range of 3 to 4 hours was employed (163).

The results obtained from PSA analysis are shown in Fig. 47. The outputs indicated that, within the range of values tested, the percent of ciprofloxacin absorbed was sensitive to solubility and permeability, while it was less sensitive to variation in stomach residence time and small intestine transit time. The results obtained show that the percent of ciprofloxacin absorbed is not sensitive to change in stomach residence time in the range of 0.25-3 h. However, the percent of ciprofloxacin absorbed increased slightly with the increase in small intestine transit time. Based on the PSA performed for ciprofloxacin solubility in the range from 0.1 to 100 mg/ml, almost complete absorption ( $F_a = 80\%$ ) was achieved with solubility value 42 mg/ml, reflecting ciprofloxacin hydrochloride aqueous solubility. Based on the PSA performed for ciprofloxacin permeability in the range from 0.79 to  $3.14 \times 10^{-4}$  cm/s, it was demonstrated that almost complete absorption is expected if effective permeability is equal to or higher than  $1.57 \times 10^{-4}$  cm/s, indicating that ciprofloxacin absorption is not permeability limited, but could be compromised if less permeable interaction adduct is formed.

The simulated ciprofloxacin plasma profiles are presented in Fig. 48, together with the mean plasma profiles observed *in vivo* after administration of tablets containing 500 mg (15, 16) or 750 mg (136) of ciprofloxacin hydrochloride. The good fit of the actual data observed *in vivo* ("control" study 1-3) was obtained with the input solubility of 42 mg/ml, corresponding to the experimentally obtained aqueous solubility of ciprofloxacin hydrochloride. The predictability of the generated absorption model was measured by the percent prediction error (PE %) between the simulated and *in vivo* observed data. The predicted pharmacokinetic parameters and those observed *in vivo* are presented in Table 18. The percent prediction errors obtained were less than 10 % for both  $C_{max}$  and  $AUC_{0-t}$ , indicating good predictability. Statistical parameters ( $r^2$  - regression coefficient, SSE - sum of square error, RMSE - root mean square error, MAE - mean absolute error) are presented in Table 19. Regression coefficients for *in silico* predicted "control" profiles were 0.97, 0.99 and 0.93, indicating that *in silico* simulated profiles matched well the *in vivo* data reported by Kara et al (15), Polk et al (16) and Frost et al (136),

respectively.

### 6.3.1 *In silico* simulation of ciprofloxacin iron interaction

In order to investigate the influence of iron compounds on ciprofloxacin bioavailability, the simulated Cp-time data were compared with the mean plasma profiles observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets with ferrous sulfate or ferrous gluconate containing tablets (15).

#### *In silico* simulation of ciprofloxacin ferrous sulfate interaction

The results obtained *in vitro* and literature *in vivo* data were combined in the GastroPlus<sup>™</sup> simulation in order to investigate the impact of solubility change on ciprofloxacin bioavailability following oral administration with/without ferrous sulfate. PSA analysis identified solubility as critical parameter affecting the rate and extent of ciprofloxacin absorption. Ciprofloxacin hydrochloride solubility was varied within the range starting at 1 mg/ml up to the highest experimentally observed value 42 mg/ml obtained in water (actual inputs being 1, 3, 5, 10, 20, 30, and 42 mg/ml). The simulated ciprofloxacin plasma profiles are presented in Fig. 49, together with the mean plasma profiles for ciprofloxacin administration with and without ferrous sulfate reported by Kara et al. (15). The good match of the actual *in vivo* data observed when ciprofloxacin tablets were given without ferrous sulfate (i.e. control 1 study) was obtained with the input solubility of 42 mg/ml, referring to the experimentally obtained aqueous solubility of ciprofloxacin hydrochloride. The relevant % PE values were 5.57 for  $C_{max}$  and 1.05 for AUC (Table 20). Reduced ciprofloxacin absorption observed in the presence of ferrous sulfate was best described when ciprofloxacin solubility was reduced to approximately 3 mg/ml (% PE 0.23 for  $C_{max}$  and 4.57 for AUC in Table 20). This finding corresponds well with ciprofloxacin concentration found in the interaction study between ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate solutions (i.e 2.2 mg/ml). In addition, *in silico* simulated ciprofloxacin solubility was similar to ciprofloxacin concentration found after dissolution in the 50 ml reactive media containing ferrous sulfate (i.e 4.3 mg/ml). PSA identified solubility as the critical parameter affecting drug absorption and use of *in vitro* obtained solubility value in conjunction with the *in vivo* reported data was useful in simulation of *in vivo* observed ciprofloxacin-iron interaction. Similarity between *in silico* optimized ciprofloxacin solubility which demonstrates possible ciprofloxacin solubility *in vivo* in the presence of ferrous sulfate and ciprofloxacin concentration found after dissolution emphasize the potential of using small volume dissolution test in *in vitro* investigation of ciprofloxacin-ferrous sulfate interaction. Statistical parameters for regression coefficient, sum of square error, root mean square error and mean absolute error are  $r^2 = 0.98$ ; SSE = 0.03; RMSE = 0.05; MAE = 0.05, respectively. High value of regression coefficient and low value of mean absolute error indicate that simulated and *in vivo* profile matched well.

The gastrointestinal absorption models developed were used to estimate the relevant drug absorption kinetics and regional absorption. Ciprofloxacin absorption profiles without and with co-administered ferrous sulfate generated by GastroPlus™ were plotted together with the results obtained by numerical deconvolution (Fig. 50). The *in vivo* input profiles obtained suggest that after oral administration, either with or without iron, ciprofloxacin absorption kinetics exhibit initial rapid absorption in the first 2 h after administration. The amounts of drug absorbed from different regions of the gastrointestinal tract with/without ferrous sulfate co-administration are given in Fig. 51. The regional absorption profiles indicate predominant ciprofloxacin absorption in the proximal part of the gastrointestinal tract and are consistent with data reported from the *in vivo* remote control capsule study (123). The simulations suggest that drug absorption when co-administered with iron was not impaired in “duodenum,” whereas it was substantially reduced in “jejunum 1 and 2.”

### ***In silico* simulation of ciprofloxacin ferrous gluconate interaction**

The simulated ciprofloxacin plasma profile in the presence of ferrous gluconate is presented in Fig. 52, together with the mean plasma profile reported by Kara et al. (15).

The simulated absorption profile matched well the *in vivo* observed data according to calculated values of regression coefficient (0.86) and mean absolute error (0.07). It was found that reduced ciprofloxacin absorption observed in the presence of ferrous gluconate resulted from decreased ciprofloxacin solubility and was best described when ciprofloxacin solubility was optimized to 0.9 mg/ml (Fig. 52). The relevant % PE values were 0 for  $C_{max}$  and 1.43 for AUC (Table 21).

Ciprofloxacin bioavailability was reduced by 67 % when co-administered with ferrous gluconate (15). Kara et al (15) suggested that ferrous gluconate tablets have higher dissolution rate compared to ferrous sulfate tablets and that this contributed to the reduction in ciprofloxacin bioavailability *in vivo*. Ciprofloxacin dissolution profile in media containing ferrous gluconate was almost superimposable with that observed in water (Fig. 21). Concentration of ciprofloxacin dissolved in 50 ml reactive media was found to be 8.4 mg/ml, which was significantly higher than *in silico* optimized. Ciprofloxacin solubility in media containing ferrous gluconate was found to be 36 mg/ml (i.e 94 mM) which was higher than *in silico* optimized, as well. In this case, *in silico* obtained results did not match with *in vitro* obtained results. Ciprofloxacin-ferrous gluconate interaction was not observed *in vitro*. Ciprofloxacin salts formed with organic acids are, generally more soluble than ciprofloxacin salts with inorganic acids (169) and it may be postulated that formation of soluble ciprofloxacin salt in the presence of gluconate anion prevents ciprofloxacin-ferrous gluconate interaction *in vitro*. Currently, it is not possible to include all these phenomena in the *in silico* simulation, which emphasize the need for complementary *in vitro* studies in order to assess the mechanisms involved.

The gastrointestinal absorption models developed were used to estimate the relevant drug

absorption kinetics and regional absorption. Ciprofloxacin absorption profiles without and with co-administered ferrous gluconate generated by GastroPlus™ were plotted together with the results obtained by numerical deconvolution (Fig. 53). It can be seen that after oral administration, either with or without iron, ciprofloxacin exhibits initial rapid absorption in the first 2 h after administration.

The amounts of drug absorbed from different regions of the gastrointestinal tract with/without ferrous gluconate co-administration are given in Fig. 54. The regional absorption profiles indicate predominant ciprofloxacin absorption in the duodenum and jejunum and are consistent with data reported from the *in vivo* remote control capsule study (123). According to the results obtained, jejunum 1 and 2 can be suggested as the potential site of interaction.

### 6.3.3 *In silico* simulation of ciprofloxacin aluminium interaction

In order to investigate the influence of aluminium hydroxide on ciprofloxacin bioavailability, the simulated  $C_p$ -time data were compared with the mean plasma profile observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets with aluminium hydroxide (136). According to the results obtained, the amount of ciprofloxacin dissolved was decreased in the reactive media containing 10 mg/ml of aluminium hydroxide. On the other hand, ciprofloxacin tablet dissolution profile in the reactive media containing aluminium hydroxide was almost superimposable with that observed in water. Žakelj et al. (61) reported that ciprofloxacin-aluminium complexes do not permeate through the intestinal absorption barrier. Taking into account the potential influence of (a) solubility and (b) permeability as identified above in the PSA analysis, two cases were considered for ciprofloxacin/aluminium interaction:

Case 1. In this case,  $P_{eff}$  value remained unchanged ( $P_{eff} = 1.57 \times 10^{-4}$  cm/s), while solubility input value was optimized. It was found that reduced ciprofloxacin absorption observed in the presence of aluminium hydroxide was best described when ciprofloxacin solubility was reduced to 0.07 mg/ml ( $r^2 = 0.8$ ; SSE = 0.02; RMSE = 0.04 and MAE = 0.03).

Case 2. In the second case, permeability input values have been optimized, while the solubility remained unchanged (i.e. experimentally obtained ciprofloxacin aqueous solubility 42 mg/ml). The results obtained show that reduced ciprofloxacin absorption observed in the presence of aluminium hydroxide was best described when permeability was optimized to  $0.1 \times 10^{-4}$  cm/s which was more than 15-fold lower than input in control profile ( $r^2 = 0.74$ ; SSE = 0.02; RMSE = 0.04 and MAE = 0.04).

Relevant *in silico* simulated and *in vivo* observed  $C_p$ -t profiles are presented in Fig. 55.

The predicted pharmacokinetic parameters values ( $C_{max}$  and AUC) are given in Table 22, together with the data observed in the *in vivo* studies. According to the percent prediction error values presented in Table 22, it would be expected that ciprofloxacin absorption in the presence of aluminium hydroxide is more affected by solubility than by permeability variation.

Literature data indicate formation of more soluble ciprofloxacin complexes with aluminium (98,

153, 154) compared to ciprofloxacin in the pH range 1-8. It was reported, based on *in vitro* permeability studies, that ciprofloxacin-aluminum complex does not permeate intestinal mucosal membrane (61). The amount of ciprofloxacin dissolved in the reactive media containing aluminium hydroxide was found to be 24 mg/ml, which was 300-fold higher than *in silico* optimized. Concentration of ciprofloxacin dissolved in 50 ml reactive media containing aluminium hydroxide was approx. 7.5 mg/ml. In this case, ciprofloxacin-aluminium interaction was not observed *in vitro*. Administration of high doses of aluminium hydroxide may act as a physical barrier preventing ciprofloxacin dissolution in the gastrointestinal lumen, which might be the reason for reduced ciprofloxacin bioavailability *in vivo*. Also, some authors suggest that adsorption of fluoroquinolones on the aluminum hydroxide particles could significantly decrease the amount of drug available for absorption (156). Currently, it is not possible to include all these phenomena in the *in silico* simulation, which emphasize the need for complementary *in vitro* and *in vivo* studies in order to assess the mechanisms involved. It was estimated that small volume dissolution studies in the presence of high amounts of aluminium hydroxide can be useful in identification of additional factors (i.e. adsorption or physical barrier that prevents drug dissolution) that can affect ciprofloxacin tablet dissolution.

The gastrointestinal absorption models developed were used to estimate the relevant drug absorption kinetics and regional absorption. Ciprofloxacin absorption profiles without and with co-administered aluminium hydroxide generated by GastroPlus<sup>tm</sup> were plotted together with the results obtained by numerical deconvolution (Fig. 56). Ciprofloxacin absorption kinetics after oral administration without aluminium compound co-administered exhibit initial rapid absorption whereas deconvoluted profile is slightly lower than *in silico* simulated. Deconvoluted and *in silico* simulated ciprofloxacin absorption profiles with aluminium hydroxide co-administered were almost superimposable.

The amounts of drug absorbed from different regions of the gastrointestinal tract with/without aluminium hydroxide coadministration are given in Fig. 57. Regional absorption profiles indicate predominant ciprofloxacin absorption in the duodenum and jejunum which probably represent the potential site of interaction *in vivo*.

#### **6.3.4 *In silico* simulation of ciprofloxacin calcium carbonate interaction**

In order to investigate the influence of calcium carbonate on ciprofloxacin bioavailability, the simulated Cp-time data were compared with the mean plasma profile observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets with calcium carbonate (136). Taking into account the potential influence of (a) solubility and (b) permeability as identified above in the PSA analysis, two cases were considered:

Case 1. In this case,  $P_{\text{eff}}$  value remained unchanged ( $P_{\text{eff}} = 1.57 \times 10^{-4}$  cm/s), while solubility input value was optimized. It was found that reduced ciprofloxacin absorption was best described when ciprofloxacin solubility was optimized to 1 mg/ml. Calculated values for

statistical parameters were  $r^2 = 0.97$ ; SSE = 0.05; RMSE = 0.06 and MAE = 0.05.

Case 2. In the second case, permeability input values have been optimized, while the solubility remained unchanged (i.e. experimentally obtained ciprofloxacin aqueous solubility 42 mg/ml). The results obtained show that reduced ciprofloxacin absorption observed in the presence of calcium carbonate was best described when permeability was optimized to  $0.8 \times 10^{-4}$  cm/s. Calculated values for statistical parameters were  $r^2 = 0.86$ ; SSE = 0.02; RMSE = 0.03 and MAE = 0.04.

Relevant *in silico* simulated and *in vivo* observed  $C_p$ -t profiles are presented in Fig. 58.

The predicted pharmacokinetic parameters values ( $C_{max}$  and AUC) are given in Table 23, together with the data observed in the *in vivo* studies. According to the percent prediction error values presented in Table 23, it would be expected that ciprofloxacin absorption in the presence of calcium carbonate is more affected by solubility than by permeability variation.

Žakelj et al. (61) reported that ciprofloxacin permeability was not significantly influenced by the presence of  $Ca^{2+}$ . According to their results and the results obtained from *in silico* simulations, reduced ciprofloxacin bioavailability, which occurs when it is taken concomitantly with preparations containing calcium, is not necessarily a consequence of diminished intestinal drug permeability. *In silico* optimized ciprofloxacin solubility in the presence of calcium carbonate was found to be 1 mg/ml. As stated earlier, addition of calcium carbonate elevates pH value of media and affects ciprofloxacin solubility resulting in appearance of notable precipitation. The results of solid state characterisation show that ciprofloxacin hydrochloride-calcium carbonate interaction product is hydrated ciprofloxacin base.

Cumulative amount of drug dissolved *in vitro* in the presence of calcium carbonate was reduced by more than 70 % (Fig. 32). *In silico* optimized ciprofloxacin solubility (1 mg/ml) was similar to ciprofloxacin concentration found after dissolution in 50 ml of the reactive media containing calcium carbonate (i.e. 0.83 mg/ml). Experimentally obtained solubility in media containing calcium carbonate was found to be 0.12 mg/ml, which was similar to solubility of ciprofloxacin base and lower than *in silico* optimized value. In this case, similarity between *in silico* optimized solubility value and ciprofloxacin concentration found in 50 ml of media containing calcium carbonate was evident, emphasizing the potential of using small volume dissolution test in *in vitro* investigation of ciprofloxacin hydrochloride-calcium carbonate interaction.

Ciprofloxacin absorption profiles without and with co-administered calcium carbonate generated by GastroPlus<sup>tm</sup> were plotted together with the results obtained by numerical deconvolution (Fig. 59). Deconvoluted and *in silico* simulated ciprofloxacin absorption profiles with calcium carbonate co-administered were almost superimposable in the first 2 h after administration. The simulation results show incomplete drug absorption in the presence of calcium carbonate, indicating that absorption is likely to be solubility-limited at pH values above 6.

The amounts of drug absorbed from different regions of the gastrointestinal tract with/without calcium carbonate co-administration are given in Fig. 60. Regional absorption profiles indicate predominant ciprofloxacin absorption in the duodenum and jejunum which could represent the

potential site of interaction *in vivo*.

### 6.3.5 *In silico* simulation of ciprofloxacin zinc interaction

In order to investigate the influence of zinc compound on ciprofloxacin bioavailability, the simulated  $C_p$ -time data were compared with the mean plasma profiles observed *in vivo* after administration of ciprofloxacin tablets with multivitamins containing zinc (16). Taking into account the potential influence of (a) solubility and (b) permeability as identified above in the PSA analysis, two cases were considered:

Case 1. In this case,  $P_{eff}$  value remained unchanged ( $P_{eff} = 1.57 \times 10^{-4}$  cm/s), while solubility input value was optimized. It was found that reduced ciprofloxacin absorption was best described when ciprofloxacin solubility was optimized to 29 mg/ml. Calculated values for statistical parameters were  $r^2 = 0.93$ ; SSE = 0.3; RMSE = 0.2 and MAE = 0.1.

Case 2. In the second case, permeability input values have been optimized, while the solubility remained unchanged (i.e. experimentally obtained ciprofloxacin aqueous solubility 42 mg/ml). The results obtained show that reduced ciprofloxacin absorption observed in the presence of multivitamins containing zinc was best described when permeability was optimized to  $1.2 \times 10^{-4}$  cm/s. Calculated values for statistical parameters were  $r^2 = 0.84$ ; SSE = 0.4; RMSE = 0.2 and MAE = 0.2.

Relevant *in silico* simulated and *in vivo* observed  $C_p$ -t profiles are presented in Fig. 61.

The predicted pharmacokinetic parameters values ( $C_{max}$  and AUC) are given in Table 24, together with the data observed in the *in vivo* studies. According to the results obtained, solubility was identified as the critical parameter affecting the rate and extent of ciprofloxacin absorption. The double peaks in the simulated  $C_p$ -t profiles (Fig. 61) could be result of differential rates of absorption along the gastrointestinal tract. Such behavior of ciprofloxacin when co-administered with zinc compound may indicate that there are two distinct absorption sites in GIT, separated by a region of poor absorption that was caused by ciprofloxacin precipitation due to interaction with zinc. The results obtained related to ciprofloxacin solubility and dissolution in reactive media containing zinc salts, show reduced solubility and slow and incomplete dissolution (Fig. 38-40). Concentration of ciprofloxacin dissolved in the reactive media containing zinc sulfate after mixing ciprofloxacin hydrochloride and zinc sulfate solutions was found to be 3.3 mg/ml, which was significantly lower than *in silico* predicted. The reason for that might be that *in vivo* administered amount of zinc (23 mg) was almost 3-fold lower than the amount of zinc used in *in vitro* study. The results of solid state characterisation indicate formation of low soluble ciprofloxacin-zinc complex. *In silico* simulation of ciprofloxacin-zinc interaction identified decreased solubility as the critical factor affecting the rate and extent of drug absorption, which is consistent with *in vitro* obtained data suggesting formation of low soluble ciprofloxacin-zinc complexes. The gastrointestinal absorption models developed were

used to estimate the relevant drug absorption kinetics and regional absorption. Ciprofloxacin absorption profiles without and with co-administered zinc compound simulated by GastroPlus™ were plotted together with the results obtained by numerical deconvolution (Fig. 62). The *in vivo* input profiles obtained suggest that after oral administration, without zinc, ciprofloxacin absorption kinetics exhibit initial rapid absorption. Deconvoluted and *in silico* simulated ciprofloxacin absorption profiles without/with zinc containing preparation matched well. The amounts of drug absorbed from different regions of the gastrointestinal tract with/without zinc compound co-administration are given in Fig. 63. Similarly to other metallic compounds, regional absorption profiles indicate predominant ciprofloxacin absorption in the duodenum and jejunum and that also represents the potential site of interaction *in vivo* consistent with appearance of double peaks in GastroPlus generated absorption profiles.



## 7. ZAKLJUČCI

1. Detaljnom analizom rezultata *in vivo* studija bioraspoloživosti ciprofloksacina nakon oralne primene uočava se relativno visok stepen varijabilnosti, kako u pogledu vrednosti bioraspoloživosti ciprofloksacina bez, tako i nakon istovremene primene sa lekovima, dijetetskim suplementima ili hranom koji sadrže jedinjenja metala. Generalno, bioraspoloživost ciprofloksacina je smanjena u prisustvu jedinjenja metala (gvožđe, kalcijum, aluminijum, cink), a uticaj različitih jona metala na bioraspoloživost ciprofloksacina varira u zavisnosti od vrste i primenjene doze preparata koji sadrži jedinjenje metala.
2. Iako je u literaturi predložen isti mehanizam (građenje kompleksa) odgovoran za *in vivo* uočene interakcije ciprofloksacina i jona metala, na osnovu rezultata ispitivanja rastvorljivosti, brzine rastvaranja i karakterizacije čvrstih faza može se zaključiti da su mehanizmi interakcije različiti u zavisnosti od vrste jedinjenja metala koji stupa u interakciju sa ciprofloksacinom. Koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu je bila smanjena u prisustvu ispitivanih jedinjenja metala. Interakcija ciprofloksacin-hidrohlorida sa jedinjenjima metala se može uočiti samo sa rastvorljivim solima metala koje se koriste kao lekovi ili dijetetski suplementi, pri čemu dolazi do građenja slabo rastvorljivih kompleksa.
3. Rastvorljivost i brzina rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida su značajno smanjene u prisustvu gvožđe(II)-sulfata, cink-hlorida i cink-sulfata. Prisustvo gvožđe(II)-fumarata ili gvožđe(II)-glukonata u medijumu nema značajan uticaj na rastvorljivost i na brzinu rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida iz tableta. U toku *in vitro* ispitivanja, izolovane su nove jonske vrste nastale kao proizvod interakcije ciprofloksacin-hidrohlorida sa gvožđe(II)-sulfatom, cink-sulfatom ili cink-hloridom. Izolovani slabo rastvorljivi kompleksi ciprofloksacin-hidrohlorida i gvožđe(II)-sulfata, ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-sulfata, kao i ciprofloksacin-hidrohlorida i cink-hlorida imaju sledeće hemijske strukture:  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$  i  $(\text{cfH}_2)_2(\text{ZnCl}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}$ .
4. U interakciji ciprofloksacina sa jonima kalcijuma i aluminijuma ne dolazi do građenja kompleksa. Iako je u literaturi opisano građenje bolje rastvorljivih kompleksa između ciprofloksacina i jedinjenja aluminijuma, u *in vitro* uslovima nije

uočena interakcija između ciprofloksacin-hidrohlorida i aluminijum-hidroksida. Koncentracija rastvorenog ciprofloksacin-hidrohlorida u medijumu koji sadrži veliku količinu aluminijum-hidroksida, je smanjena, što je verovatno uslovljeno formiranjem fizičke barijere koja potiče od suspendovanog aluminijum-hidroksida. Rezultati *in vitro* ispitivanja interakcije između ciprofloksacin-hidrohlorida i kalcijum-karbonata, su pokazali da prilikom interakcije, dolazi do izdvajanja hidratizane forme ciprofloksacin baze koja se taloži na pH vrednostima iznad 6, što dovodi do smanjenja rastvorljivosti i brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida.

5. Za interakciju ciprofloksacina i jona metala neophodno je obezbediti visoke koncentracije reaktanata u medijumu, a u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcije veliki značaj ima korišćenje aparatura sa mini lopaticom, uz korišćenje malih zapremina medijuma. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja ciprofloksacin-hidrohlorida sa jedinjenjima koja sadrže jone metala u fiziološki zasnovanim medijumima, nisu ukazali na prednosti korišćenja ovih medijuma umesto vodenog medijuma.
6. Generisani *in silico* model gastrointestinalne simulacije se može uspešno koristiti u simulaciji profila koncentracije ciprofloksacina u plazmi bez, kao i nakon primene ciprofloksacina sa jonima metala. PSA analiza je identifikovala rastvorljivost i permeabilnost kao kritične parametare koji određuju obim i brzinu apsorpcije. Imajući u vidu rezultate gastrointestinalne simulacije interakcije ciprofloksacina i jona metala, može se zaključiti da promena rastvorljivosti u najvećem stepenu utiče na obim i brzinu apsorpcije ciprofloksacina sa jonima metala. Utvrđeno je da se *in silico* optimizovane vrednosti za rastvorljivost kao ulazni parametar prilikom simulacija interakcije ciprofloksacina sa jedinjenjima metala mogu podudarati sa eksperimentalno dobijenim vrednostima za koncentraciju ciprofloksacina-hidrohlorida u medijumu koji sadrži jedinjenje metala. U skladu s tim, u biofarmaceutskoj karakterizaciji interakcija lekova potrebno je uzeti u obzir rezultate *in vitro* i *in silico* ispitivanja i kombinovati ih radi utvrđivanja uticaja promene rastvorljivosti na bioraspoloživost ciprofloksacina u prisustvu jedinjenja metala.
7. Na osnovu podataka o regionalnoj apsorpciji ciprofloksacina bez/ nakon primene sa preparatima koji sadrže jon metala, može se zaključiti da se ciprofloksacin dominantno apsorbuje u gornjim delovima GIT-a, a da je potencijalno mesto

interakcije sa jonima metala duodenum i jejunum 1. Na osnovu ovih rezultata, može se usvojiti preporuka da se preparati koji sadrže jone metala ne primenjuju u isto vreme sa preparatima ciprofloksacina, već sa vremenskim razmakom od 2 h kako bi se izbegao nastanak interakcija.

8. Sveobuhvatna analiza *in vivo* rezultata, uz primenu odgovarajućih *in vitro* i *in silico* metoda je neophodna za biofarmaceutsku karakterizaciju interakcija lekova i može se primeniti za ispitivanje interakcija fluorohinolona sa jonima metala koje dovode do promene u bioraspoloživosti fluorohinolonskih lekova.

## 8. Conclusions

1. Detailed survey of *in vivo* literature data gave an overview of ciprofloxacin bioavailability without and when co-administered with metallic ions containing preparations. Relatively high variability in ciprofloxacin bioavailability is evident, both in the pharmacokinetic studies following oral administration of ciprofloxacin hydrochloride tablets alone, as well as in the interaction studies in which various drug products or dietary supplements containing different metallic compounds were co-administered. Ciprofloxacin bioavailability in the presence of different metallic compounds was reduced to a variable extent depending mainly on the type of metallic compound/preparation administered, its dose and dosage regimen.
2. The results of ciprofloxacin *in vitro* solubility, dissolution studies and solid state characterisation in the presence of metallic compounds showed marked differences depending on the type and amount of metallic compound added. The amount of ciprofloxacin hydrochloride in solution was reduced in all the reactive media containing the investigated metallic compounds when compared to the amount of ciprofloxacin hydrochloride dissolved in water. According to the results obtained it can be concluded that complexation is not the common interaction mechanism involved. It was observed that soluble metal compound salts form poorly soluble complexes with ciprofloxacin.
3. Ciprofloxacin hydrochloride solubility and dissolution from tablets were clearly reduced in media containing ferrous sulfate, zinc chloride or zinc sulfate. Ciprofloxacin solubility and tablet dissolution were not significantly reduced in the presence of ferrous gluconate and ferrous fumarate. New solid phases were isolated from the interaction mixtures containing ciprofloxacin hydrochloride and ferrous sulfate, zinc sulfate or zinc chloride. They were identified as low solubility complexes with the chemical structure  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2(\text{Cl})_2(\text{cf})_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$  and  $(\text{cfH}_2)_2(\text{ZnCl}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}$ , respectively.
4. Interaction studies with aluminium hydroxide and calcium carbonate did not result in complex formation. Although it was reported that ciprofloxacin aluminium complexes are more soluble than ciprofloxacin in the present study, ciprofloxacin-aluminium complexes were not isolated. The results obtained show that concentration of ciprofloxacin hydrochloride dissolved was reduced in the reactive media containing large amount of aluminium hydroxide that, mainly, act as the physical barrier preventing ciprofloxacin dissolution. Interaction with calcium carbonate resulted in precipitation of ciprofloxacin (base) hydrate. Calcium carbonate addition had the most pronounced effect on ciprofloxacin hydrochloride solubility and tablet dissolution, associated with the substantial increase in media pH (pH above 6).
5. Interaction occurs in mixtures containing relatively high drug concentrations. Results obtained emphasise the importance of using mini scale apparatus and small volume media in biopharmaceutical characterisation of physico-chemical interactions between

ciprofloxacin and metallic ions containing preparations. The results obtained in physiologically based dissolution media were inconclusive and didn't provide any advantage over the simple media, such as water.

6. The data obtained indicate the potential of 'gastrointestinal simulation technology' to be used for prediction of ciprofloxacin metallic ions interaction. It was possible to use common model for simulation of ciprofloxacin absorption without/with metallic compounds co-administration. Parameter Sensitivity Analysis identified solubility and permeability as the critical factors affecting the rate and extent of ciprofloxacin absorption. It was found that ciprofloxacin absorption is more sensitive to variation of solubility than variation of permeability. Similarity between *in silico* optimized solubility value and ciprofloxacin concentration found after dissolution in the presence metallic compounds indicate that it is important to combine the results obtained *in silico* with *in vitro* experimental data in order to investigate the impact of solubility change on ciprofloxacin bioavailability following oral administration with/without metallic cations.
7. The regional absorption profiles indicate predominant ciprofloxacin absorption in the proximal part of the gastrointestinal tract and that drug absorption when coadministered with metallic compounds was impaired in duodenum and jejunum 1 indicating that ciprofloxacin-metallic cations interaction may be avoided by administering metallic ions containing products 2 h after/before the ciprofloxacin dose, when majority of drug has been absorbed.
8. Comprehensive analysis of *in vivo*, *in vitro* and *in silico* data is necessary for biopharmaceutical characterisation of drug drug interaction and the approach presented could be applied to other fluorquinolone-metallic ion interactions resulting in the altered bioavailability

## 8. LITERATURA

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology, 5th ed. Philadelphia USA: Elsevier Science, 2003: 718-22.
2. Griffin JP, D'Arcy PF. A manual of adverse drug interactions. Elsevier Science, 1997: 9-36.
3. Baxter K. Stockley's Drug Interactions, 9th ed. Pharmaceutical Press, 2010: 1-11.
4. Kedderis GL. Pharmacokinetics of drug interactions. In: Advances in Pharmacology, vol 43: Drug-Drug interactions: Scientific and regulatory perspectives. Academic Press, 1997: 189-203.
5. Florence AT, Attwood D. Physicochemical drug interactions and incompatibilities. In: Physicochemical principles of pharmacy, 4th ed. London UK: Pharmaceutical Press, 2006: 393-430.
6. Prescott LF. Pharmacokinetic drug interaction. The Lancet 1969; 294: 1239-1243.
7. Griffin JP. Drug interactions occurring during absorption from the gastrointestinal tract. Pharmac Ther 1981; 15: 79-88.
8. Kažić T. Gotovi lekovi: Priručnik za farmakoterapiju. 12th ed. Integra, 2009: 35-38.
9. McElnay JC, D'Arcy PF. Sites and mechanisms of drug interactions I. *In vitro*, intestinal and metabolic interactions. Int J Pharm 1980; 5: 167-185.
10. Fleisher D, Li C, Zhou Y, Pao LH, Karim A. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. Clin Pharmacokinet 1999; 36: 233-254.
11. Klink PR, Colaizzi JL. Effect of trichloroacetate anion on partition behavior of tetracyclines. J Pharm Sci 1973; 62: 97-100.
12. Ambre JJ, Fischer LJ. Effect of coadministration of aluminium and magnesium hydroxides on absorption of anticoagulants in man. Clin Pharmacol Ther 1973; 14: 231-237.
13. Hoffken G, Borner K, Glatzel PD, Koeppe P, Lode H. Reduced enteral absorption of ciprofloxacin in the presence of antacids. Eur J Clin Microbiol 1985; 4: 345.

14. Lehto P, Kivisto TK, Neuvonen JP. The effect of ferrous sulphate on the absorption of norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin. *Brit J Clin Pharmacol* 1994; 37: 82-85.
15. Kara M, Hasinoff BB, McKay WD, Campbell RCN. Clinical and chemical interactions between iron preparations and ciprofloxacin. *Brit J Clin Pharmacol* 1991; 31: 257-61.
16. Polk RE, Healy DP, Sahai J, Drwal L, Racht E. Effect of ferrous sulfate and multivitamins with zinc on absorption of ciprofloxacin in normal volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1841-1844.
17. Nix DE, Watson WA, Lener ME, Krol G, Goldstein H, Lettieri J, Schentag JJ. Effects of aluminum and magnesium antacids and ranitidine on the absorption of ciprofloxacin. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 700-705.
18. MacAdam A. The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption. *Adv Drug Del Rev* 1993; 11: 201-220.
19. EMA/CPMP. Note for guidance on the investigation of drug interactions (Doc. Ref.: CPMP/EWP/560/95) 1997.
20. EMA/CPMP. Guideline on the Investigation of Drug Interactions (CPMP/EWP/560/95/Rev. 1Corr.\*) 2012.
21. FDA/CDER. Guidances for Industry: Drug Interaction Studies —study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. Rockville, 2012.
22. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413-420.
23. Lobenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 3-12.
24. Yu LX, Lipka E, Crison JR, Amidon GL. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; 19: 359-376.

25. FDA/CDER. Guidances for Industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate - release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Rockville, 2000.
26. EMA/CPMP. Guideline on the investigation of bioequivalence (Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev.1/ Corr\*\*) 2010.
27. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998; 15: 11-22.
28. Kortejarvi H, Urtti A, Yliperttula M. Pharmacokinetic simulation of biowaiver criteria: the effects of gastric emptying, dissolution, absorption and elimination rates. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30: 155-166.
29. FDA/CDER. Guidances for Industry: Food-effect bioavailability and fed bioequivalence studies. Rockville, 2002.
30. Souliman S, Blanquet S, Beyssac E, Cardot JM. A level A *in vitro/in vivo* correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form. *Eur J Pharm Sci* 2006; 27: 72-79.
31. Sugano K, Okazaki A, Sugimoto S, Tavornvipas S, Omura A, Mano T. Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22: 225-254.
32. The United States Pharmacopeia, The National Formulary (USP 31/NF 25), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD; 2008.
33. Florence AT, Attwood D. The solubility of drugs. In: *Physicochemical principles of pharmacy*, 4th ed. London UK: Pharmaceutical Press, 2006: 138-176.
34. Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas MJK. *Vogel's Quantitative Chemical Analysis*, 6th ed. New York: Prentice Hall, 2000.
35. Myrdal PB, Yalkowsky SH. Solubilization of Drugs in Aqueous Media. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*, 3rd ed. New York USA: Informa Healthcare, 2007: 3311-3333.
36. Harwood WS, Herring FG, Madura JD, Petrucci RH. *General chemistry principles and modern applications*, 9th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2007: 670.



37. Gray V, Kelly G, Xia M, Butler C, Thomas S, Mayock S. The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. *Pharm Res* 2009; 26: 1289-1302.
38. European Pharmacopoeia 7.0, Seventh Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2011.
39. Galia E, Nicolaidis E, Horter D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. *Pharm Res* 1998; 15: 698-705.
40. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 2008; 25: 1663-1676.
41. Vertzoni M, Fotaki N, Kostewicz E, Stippler E, Leuner C, Nicolaidis E, Reppas C. Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: physiological issues and practical aspects. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 453-462.
42. Kostewicz ES, Brauns U, Becker R, Dressman JB. Forecasting the oral absorption behavior of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media. *Pharm Res* 2002; 19: 345-349.
43. Jantratid E, De Maio V, Ronda E, Mattavelli V, Vertzoni M, Dressman JB. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of *in vivo* performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *Eur J Pharm Sci* 2007; 37: 434-441.
44. Shono Y, Jantratid E, Janssen N, Kesisoglou F, Mao Y, Vertzoni M, Reppas C, Dressman JB. Prediction of food effects on the absorption of celecoxib based on biorelevant dissolution testing coupled with physiologically based pharmacokinetic modeling. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 73, 107-114.
45. Grbić S, Parojčić J, Đurić Z, Ibrić S, Jovanović M. An investigation into the potential use of sucrose-ester as a surfactant in dissolution testing of poorly soluble drug. 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva/Switzerland, March 2006

46. Parojčić J, Grbić S, Knežević M, Krsmanović S, Ibrić S, Đurić Z. Uticaj hrane na resorpciju lekova: osnovna razmatranja i mogućnost *in vitro* simulacije. *Arh farm* 2007; 57: 149-163
47. Mudie DM, Amidon GL, Amidon GE. Physiological parameters for oral delivery and *in vitro* testing. *Mol Pharm* 2010; 7: 1388-1405.
48. Moltke L, Greenblatt DJ, Schmider J, Wright CE, Harmatz JS, Shader RI. *In vitro* approaches to predicting drug interactions *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 113-122.
49. Papai K, Budai M, Ludanyi K, Antal I, Klebovich I. *In vitro* food–drug interaction study: Which milk component has a decreasing effect on the bioavailability of ciprofloxacin? *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52: 37-42.
50. Parojčić J, Corrigan OI. Rationale for ibuprofen co-administration with antacids: Potential interaction mechanisms affecting drug absorption. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 640-647.
51. Parojčić J, Stojković A, Tajber L, Grbić S, Paluch K, Đurić Z, Corrigan OI. Biopharmaceutical characterization of ciprofloxacin HCl–ferrous sulfate interaction. *J Pharm Sci* 2011; 100: 5174-5184.
52. Parojčić J. *In vitro – in vivo* korelacija: osnovna razmatranja i značaj. 1<sup>st</sup> ed. Beograd: Zadužbina Andrejević, 2005.
53. Arayne MS, Sultana N, Ghazali FA. Effect of antacids on the dissolution behavior of tetracycline and oxytetracycline. *J Pharm Univ Kar* 1983; 1: 139-146.
54. Abrahamsson B, Albery T, Eriksson A, Gustaffson I, Sjoberg M. Food effects on tablet disintegration. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22: 165-172.
55. Jungiger HE, Verhoeven J, Peschier LJC. A new *in vitro* model to detect interactions between controlled release dosage forms and food. *Acta Pharm Technol* 1990; 36: 155-160.
56. Nicolaidis E, Galia E, Efthymiopoulos C, Dressman J, Reppas C. Forecasting the *in vivo* performance of four low solubility drugs from their *in vitro* dissolution data. *Pharm Res* 1999; 16: 1876-1882.
57. Navia M, Chaturvedi R. Design principles for orally bioavailable drugs. *Drug Discov Today* 1996; 1: 179-189.

58. Lennernas H, Ahrensted O, Hallgren R, Knuston L, Ryde M, Paalzow LK. Regional jejunal perfusion, a new *in vivo* approach to study oral drug absorption in man. *Pharm Res* 1992; 9: 1243-1251.
59. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 23: 3-25.
60. Kmetec V, Kozjek F, Veber M. Chromatographic and permeation analysis of ciprofloxacin metal complexes. *Int J Pharm* 1999; 176: 225-230.
61. Žakelj S, Berginc K, Uršič D, Veber M, Kristl A. Metal cation-fluoroquinolone complexes do not permeate through the intestinal absorption barrier. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 655-659.
62. Parojčić J. Biofarmaceutska karakterizacija hidrofилnih matriks tableta sa usporenim oslobađanjem paracetamola. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, 2004.
63. Kovačević I. Primena *in silico* apsorpcionih modela u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, 2010.
64. Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 50: 41-67.
65. GastroPlus<sup>tm</sup> user manual, Version 6.1, 2009.
66. Kovacevic I, Parojčić J, Tubic-Grozdanis M, Langguth P. Justification of biowaiver for carbamazepine, a low soluble high permeable compound, in solid dosage forms based on IVIVC and gastrointestinal simulation. *Mol Pharm* 2009; 6: 40-47.
67. Tubic-Grozdanis M, Bolger MB, Langguth P. Application of gastrointestinal simulation for extensions for biowaivers of highly permeable compounds. *AAPS J* 2008; 10: 213-226.
68. Kuentz M, Nick S, Parrott N, Rothlisberger D. A strategy for preclinical formulation development using GastroPlus as pharmacokinetic simulation tool and a statistical screening design applied to a dog study. *Eur J Pharm Sci* 2006; 27: 91-99.

69. Okumu A, Dimaso M, Lobenberg R. Dynamic dissolution testing to establish *in vitro/in vivo* correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm Res* 2008; 25: 2778-2785.
70. Parrott N, Lukacova V, Fraczekiewicz G, Bolger MB. Predicting pharmacokinetics of drugs using physiologically based modeling--application to food effects. *AAPS J* 2009; 11: 45-53.
71. Rostami-Hodjegan A, Tucker G. 'In silico' simulations to assess the 'in vivo' consequences of 'in vitro' metabolic drug-drug interactions. *Drug Discov Today* 2004; 1: 441-448.
72. Zhang L, Zhang YD, Zhao P, Huang S. Predicting drug-drug interactions: an FDA perspective. *AAPS J* 2009; 11: 300-306.
73. Dickins M, Waterbeemd H. Simulation models for drug disposition and drug interactions. *DDT: BIOSILICO* 2004; 2: 38-45.
74. Lave T, Parrott N, Grimm HP, Fleury A, Reddy M. Challenges and opportunities with modelling and simulation in drug discovery and drug development. *Xenobiotica* 2007; 37: 1295-1310.
75. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 34th ed. London, UK: Royal Pharmaceutical Society, 2004.
76. Summary of Product Characteristics (SPC), Ciprocinal, 500 mg, film coated tablets, Zdravlje-Actavis. ([www.actavis.rs/NR/CIPROCINALtablete.pdf](http://www.actavis.rs/NR/CIPROCINALtablete.pdf) - access date May 2009)
77. Summary of Product Characteristics, CIPRO®, 500 mg film coated tablets, Bayer Health Care. ([www.cipro.com](http://www.cipro.com) - access date May 2009)
78. Turel I, Bukovec P, Quirids M. Crystal structure of ciprofloxacin hexahydrate and its characterization. *Int. J. Pharm* 1997; 152: 59-65.
79. Liu Y, Wang J, Yin Q. The crystal habit of ciprofloxacin hydrochloride monohydrate crystal. *J Cryst Growth* 2005; 276: 237-242.
80. Turel I. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coord Chem Rev* 2002; 232: 22-47.
81. Turel I, Leban I, Bukovec N. Synthesis, characterization and crystal structure of copper(II) complex with quinolone family member (Ciprofloxacin): bis(1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-piperazin-1ylquinoline-3-

- carboxylate) copper(II) chloride hexahydrate. *J Inorg Biochem* 1994; 56: 273-282.
82. Turel I, Leban I, Bukovec N. Crystal structure and characterization of the bismuth(III) compound with quinolone family member - (ciprofloxacin). *Antibacterial Study. J Inorg Biochem* 1997; 66: 241-245.
83. Turel I, Bukovec N. Complex formation between some metals and quinolone family member (ciprofloxacin). *Polyhedron* 1996; 15: 269-275.
84. Sanchez BM, Cabarga MM, Navarro AS, Hurlle AD. A physico-chemical study of the interaction of ciprofloxacin and ofloxacin with polyvalent cations. *Int J Pharm* 1994; 106: 229-235.
85. Serafin A, Stanczak A. The complexes of metal ions with fluoroquinolones. *Russ J Coord Chem* 2009; 35: 81-95.
86. Drakopoulos AI, Ioannou PC. Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution. *Anal Chim Acta* 1997; 354: 197-204.
87. Psomas G. Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: Synthesis, characterization and DNA-binding properties. *J Inorg Bio* 2008; 102: 1798-1811.
88. Upadhyay SK, Kumar P, Arora V. Complexes of quinolone drugs norfloxacin and ciprofloxacin with alkaline earth metal perchlorates. *J Struct Chem* 2006; 47: 1078-1083.
89. Pansuriya PB, Dhandhukia P, Thakkar V, Patel MN. Synthesis, spectroscopic and biological aspects of iron(II) complexes. *J Enzym Inhib Med Ch* 2007; 22: 477-487.
90. Đurđević P, Jelikić Stankov M, Odović J. Study of solution equilibria between iron(III) ion and ciprofloxacin in pure nitrate ionic medium and micellar medium. *Polyhedron* 2000; 19: 1085-1096.
91. Đurđević P, Joksović Lj, Jelić R, Đurđević A, Jelikić Stankov M. Solution equilibria between aluminum(III) ion and some fluoroquinolone family members. Spectroscopic and potentiometric study. *Chem Pharm Bull* 2007; 55: 1689-1699.

92. Anacona JR, Toledo C. Synthesis and antibacterial activity of metal complexes of ciprofloxacin. *Transit Metal Chem* 2001; 26: 228-231.
93. Al-Mustafa J, Tashtoush B. Iron(II) and iron(III) perchlorate complexes of ciprofloxacin and norfloxacin. *J Coord Chem* 2003; 56: 113-124.
94. Urbaniak B, Kokot ZJ. Analysis of the factors that significantly influence the stability fluoroquinolone-metal complexes. *Anal Chim Acta* 2009; 647: 54-59.
95. Zupančič M, Turel I, Bukovec P, White AJP, Williams DJ. Synthesis and characterization of two novel zinc(II) complexes with ciprofloxacin. Crystal Structure of  $[C_{17}H_{19}N_3O_3F]_2 \cdot [ZnCl_4] \cdot 2H_2O$ . *CCACAA* 2001; 74: 61-74.
96. Patel MN, Chhasatia MR, Dosi PA, Bariya HS, Thakkar VR. Synthesis, characterization and biological studies of some homodinuclear complexes of zinc with second-generation quinolone drug and neutral bidentate ligands. *Polyhedron* 2010; 29: 1918–1924.
97. Rodríguez Cruz S, Gonzalez Alonso I, Sanchez-Navarro A, Sayalero Marinero L. *In vitro* study of the interaction between quinolones and polyvalent cations. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 1999; 73: 237–245.
98. Breda SA, Jimenez-Kairuz AF, Manzo RH, Olivera ME. Solubility behavior and Biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *Int J Pharm* 2009; 371: 106-113.
99. Kozjek F, Palka E, Krizman I, Vodopivec P. Pharmacokinetics of ciprofloxacin metal complexes. *Acta Pharm* 1996; 46: 109-114.
100. pION INC. 2003. Molecule of the month-ciprofloxacin HCl. <http://www.pion-inc.com/molecules/ciprofloxacin2.pdf>
101. Babic S, Horvat AJM, Pavlović DM, Macan MK. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trend Anal Chem* 2007; 26: 1043-1061.
102. Escribano E, Calpena AC, Garrigues TM, Freixas J, Domenech J, Moreno J. Structure-absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1996-2000.
103. Li X, Zhi F, Hub Y. Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin. *Int. J. Pharm* 2007; 328: 177-182.

104. Melo MJP, Varanda FR, Dohrn R, Marrucho IM. Solubility of ciprofloxacin and moxifloxacin in different solvents: the effect of the HCl group. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 2005.
105. Zhang CL, Wang Y. Aqueous solubilities for ofloxacin, norfloxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, and pipemidic acid from (293.15 to 323.15 K). J Chem Eng Data 2008; 53: 1295-1297.
106. Yu X, Zipp G, Davison GR. The effect of temperature and pH on the solubility of quinolone compounds: estimation of heat of fusion. Pharm Res 1994; 11: 522-527.
107. Montero MT, Freixas J, Hermindez-Borrell J. Expression of the partition coefficients of a homologous series of 6-fluoroquinolones. Int. J. Pharm 1997; 147: 161-170.
108. Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernas H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. Mol Pharm 2004; 1: 85-96.
109. Volpe DA. Permeability classification of representative fluoroquinolones by a cell culture method. AAPS PharmSci 2004; 6(artical 13): 1-6.
110. Žakelj S, Šturm K, Kristl A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine *in vitro*. Int J Pharm 2006; 313: 175-180.
111. Rodriguez-Ibanez M, Sanchez-Castano G, Montalar-Montero M, Garrigues TM, Bermejo M, Merino V. Mathematical modelling of *in situ* and *in vitro* efflux of ciprofloxacin and grepafloxacin. Int J Pharm 2006; 307: 33-41.
112. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, Gonzalez I, Fernandez C, Sanchez G, Garrigues TM, Merino V. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. Eur J Pharm Sci 2004; 21: 429-441.
113. Cavet ME, West M, Simmons NL. Fluoroquinolone (ciprofloxacin) secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Brit J Pharmacol 1997; 121: 1567-1578.

114. Rodriguez-Ibanez M, Nalda-Molina R, Montalar-Montero M, Bermejo MV, Merino V, Garrigues TM. Transintestinal secretion of ciprofloxacin, grepafloxacin and sparfloxacin *in vitro* and *in situ* inhibition studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55: 241-246.
115. Olivera ME, Manzo RH, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ciprofloxacin hydrochloride. *J Pharm Sci* 2011; 100: 22–33.
116. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 265–278.
117. Hoffken G, Lode H, Prinzing C, Borner K, Koeppe P. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and parenteral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 375–379.
118. Bergan T, Thorsteinsson SB, Kolstad IM, Johnsen S. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after intravenous and increasing oral doses. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5: 187–192.
119. Borner K, Hoffken G, Lode H, Koeppe P, Prinzing C, Glatzel P, Wiley R, Olschewski P, Sievers B, Reinitz D. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5: 179–186.
120. Drusano GL, Standiford HC, Plaisance K, Forrest A, Leslie J, Caldwell J. Absolute oral bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 444–446.
121. Plaisance KI, Drusano GL, Forrest A, Bustamante CI, Standiford HC. Effect of dose size on bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 956–958.
122. Lettieri JT, Rogge MC, Kaiser L, Echols RM, Heller AH. Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 993–996.



123. Harder S, Fuhr U, Beermann D, Staib AH. Ciprofloxacin absorption in different regions of the human gastrointestinal tract. Investigations with hf-capsule. *Brit J Clin Pharmacol* 1990; 30: 35–39.
124. Bergan T. Extravascular penetration of ciprooxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 103-104.
125. Shah A, Lettieri J, Blum R, Millikin S, Sica D, Heller AH. Pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin in normal and renally impaired subjects. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 103-116.
126. Garrelts JC, Jost G, Kowalsky SF, Krol GJ, Lettieri JT. Ciprofloxacin pharmacokinetics in burn patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1153-1156.
127. Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1073-1081.
128. Forrest A, Ballow CH, Nix DE, Birmingham MC, Schentag JJ. Development of a population pharmacokinetic model and optimal sampling strategies for intravenous ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1065-1072.
129. Shah A, Liu M, Vaughan D, Heller AH. Oral bioequivalence of three ciprofloxacin formulations following single-dose administration: 500 mg tablet compared with 500 mg/10 ml or 500 mg/5 ml suspension and the effect of food on the absorption of ciprofloxacin oral suspension. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 49-54.
130. Ledergerber B, Bettex JD, Joos B, Flepp M, Luthy R. Effect of standard breakfast on drug absorption and multiple-dose pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 350-352.
131. Neuhofel AL, Wilton JH, Victory JM, Hejmanowsk LG, Amsden GW. Lack of bioequivalence of ciprofloxacin when administered with calcium-fortified orange juice: a new twist on an old interaction. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 461-466.

132. Nix DE, Watson WA, Handy L, Frost RW, Rescott DL, Goldstein HR. The effect of sucralfate pretreatment on the pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Pharmacotherapy* 1989; 9: 377-380.
133. Brouwers JR, Van der Kam HJ, Sijtsma J, Proost JH. Decreased ciprofloxacin absorption with concomitant administration of ferrous fumarate. *Pharm Weekbl Sci* 1990; 12: 182-183.
134. Wong PY, Zhu M, Li RC. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between intravenous ciprofloxacin and oral ferrous sulphate. *J. Chemother* 2000; 12: 286-293.
135. Motoya T, Miyashita M, Kawachi A, Yamada K. Effects of ascorbic acid on interactions between ciprofloxacin and ferrous sulphate, sodium ferrous citrate or ferric pyrophosphate, in mice. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 397-401.
136. Frost RW, Lettieri JT, Noe A, Shamblen EC, Lasseter K. Effect of aluminium hydroxide and calcium carbonate antacids on ciprofloxacin bioavailability. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 830-832.
137. Lomaestro BM, Bailie GR. Effect of staggered dose of calcium on the bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1004-1007.
138. Furet YX, Deshusses J, Pechere JC. Transport of pefloxacin across the bacterial cytoplasmic membrane in quinolone-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2506-2511.
139. Fleming LW, Moreland TA; Stewart WK, Scott AC. Ciprofloxacin and antacids (letter). *Lancet* 1986; 2: 294.
140. Akinleye MO, Coker AB, Chukwuani MC, Adeoye AW. Effect of five Alive fruit juice on the dissolution and absorption profiles of ciprofloxacin. *Nig Ot J Hosp Med* 2007; 17: 53-57.
141. Pazzucconi E, Barbi S, Baldassarre D, Colombo N, Dorigotti F, Sirtori CR. Iron-ovotransferrin preparation does not interfere with ciprofloxacin absorption. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 59: 418-422.
142. Mees EJD, Basci A. Citric acid in calcium effervescent tablets may favour aluminium intoxication. *Nephron* 1991; 59: 322.

143. Domingo JL, Gomez M, Llobet JM, Richart C. Effect of ascorbic acid on gastrointestinal aluminium absorption. *Lancet* 1992; 338: 1467.
144. Lode H. Drug interactions with quinolones. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 5132-5136.
145. Garrelts JC, Godley PJ, Peterie JD, Gerlach EH, Yakshe CC. Sucralfate significantly reduces ciprofloxacin concentrations in serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 931-933.
146. Sahai J, Healy DP, Stotka J, Polk RE. The influence of chronic administration of calcium carbonate on the bioavailability of oral ciprofloxacin. *Brit J Clin Pharmacol* 1993; 35: 302-304.
147. Frost RW, Carlson JD, Dietz AJ, Heyd A; Lettieri JT. Ciprofloxacin pharmacokinetics after a standard or high-fat/high calcium breakfast. *J Clin Pharmacol* 1989; 29: 953-955.
148. Neuvonen PJ, Kivisto KT, Lehto P. Interference of dairy products with the absorption of ciprofloxacin. *Clin Pharmac Ther* 1991; 50: 498-502.
149. Žakelj S, Berginc K, Uršič D, Kristl A. Influence of metal cations on the solubility of fluoroquinolones. *Pharmazie* 2007; 62: 318–320.
150. Eboka CJ, Okeri HA. Aqueous solubility of ciprofloxacin in the presence of metal cations *Trop J Pharm Res* 2005; 4: 349-354.
151. Ross DL, Riley CM. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. III. Complexation of lomefloxacin with various metal ions and the effect of metal ion complexation on aqueous solubility. *Int J Pharm* 1992; 87: 203–213.
152. Lee DS, Han HJ, Kim K, Park WB. Dissociation and complexation of fluoroquinolone analogues. *J Pharm Biomed Anal* 1994; 12: 157-164.
153. Allemandi DA, Alovero F, Manzo RH. Formulation of neutral solution of ciprofloxacin upon complexation with aluminium. *Farmaco* 1999; 54: 758-760.
154. Alovero FL, Olivera ME, Manzo RH. In vitro pharmacodynamic properties of a fluoroquinolone pharmaceutical derivate: hydrochloride of ciprofloxacin-aluminium complex. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 446-451.

155. Manzo RH, Mazzieri MR, Olivera ME. Argentinean Patent Application 338200/96, 1996.
156. Arayne MS, Sultana N, Hussain F. Interactions between ciprofloxacin and antacids-dissolution and adsorption studies. *Drug Metabol Drug Interact* 2005; 21: 117–129.
157. Sultana N, Arayne MS, Hussain F. *In vitro* monitoring of ciprofloxacin antacids interaction by UV and HPLC. *Pak J Pharm Sci* 2005; 18: 23-31.
158. Tanaka M, Kurata T, Fujisawa C, Ohshima Y, Aoki H, Okazaki O, Hakusui H. Mechanistic study of inhibition of levofloxacin absorption by aluminum hydroxide, *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2173–2178.
159. Patel M, Chhasatia M, Parmar P. Antibacterial and DNA interaction studies of zinc(II) complexes with quinolone family member, ciprofloxacin. *Eur J Med Chem* 210; 45: 439–446.
160. Sanchez Navarro A, Martinez Cabarga M, Hurle AD. Comparative study of the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  on absorption parameters of ciprofloxacin and ofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 119-125.
161. Ljungberg B, Nilsson-Ehle I. Pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin at three different doses. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 715-720.
162. FDA/CDER. Guidance for Industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of *in vitro/in vivo* correlations. 1997.
163. Wilson CG. Gastrointestinal transit and drug absorption. In Dressman JB, Lennernas H, editors. *Oral drug absorption. Prediction and Assessment, USA*: Marcel Dekker; 2000. p: 1-11.
164. Ottaviani G, Gosling JD, Patissier C, Rodde S, Zhou L, Faller B. What is modulating solubility in simulated intestinal fluids? *Eur J Pharm Sci* 2010; 41: 452-457.
165. Takano R, Takata N, Saito R, Furumoto K, Higo S, Hayashi Y, Machida M, Aso Y, Yamashita S. Quantitative analysis of the effect of supersaturation on *in vivo* drug absorption. *Mol Pharm* 2010; 7: 1431–1440.
166. Schiller C, Frohlich CP, Giessmann T, Siegmund W, Monnikes H, Hosten N, Weitschies W. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms

- as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 971–979.
167. Marciani L, Cox EF, Hoad CL, Pritchard S, Totman JJ, Foley S, Mistry A, Evans S, Gowland PA, Spiller RC. Postprandial changes in small bowel water content in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2010; 138: 469–490.
168. Sutton CS. Role of physiological intestinal water in oral absorption. *AAPS J* 2009; 11: 277–285.
169. Paluch KJ, Corrigan OI, Healy AM, Tajber L. Preparation and characterization of novel solid state forms of ciprofloxacin with dicarboxylic acids. Proceeding from 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2012.
170. Kathyayini H, Willems I, Fonseca A, Nagy JB, Nagaraju N. Catalytic materials based on aluminium hydroxide, for the large scale production of bundles of multi-walled (MWNT) carbon nanotubes. *Catal Commun* 2006; 7: 140–147.
171. Riad M. Influence of magnesium and chromium oxides on the physicochemical properties of  $\gamma$ -alumina. *Appl Catal A-Gen.* 2007; 327: 13–21.
172. Strekopytov S, Exley C. Thermal analyses of aluminium hydroxide and hydroxyaluminosilicates. *Polyhedron* 2006; 25: 1707-1713.
173. Qing Su S, Yang J, Ma HW, Jiang F, Liu YQ, Li G. Preparation of ultrafine aluminum hydroxide from coal fly ash by alkali dissolution process. *Integr Ferroelectr* 2011; 128: 155-162.
174. Mafra L, Santos SM, Siegel R, Alves I, Almeida Paz FA, Dudenko D, Spiess HW. Packing interactions in hydrated and anhydrous forms of the antibiotic ciprofloxacin: a solid-state NMR, X-ray diffraction, and computer simulation study. *J Am Chem Soc* 2012; 134: 71–74.
175. Dorofeev VL. The betaine like structure and infrared spectra of drugs of the fluoroquinolone group. *Pharm Chem. J* 2004; 38: 698-702.
176. Irish DE, McCarroll B, Young TF. Raman study of zinc chloride solutions. *J Chem Phys* 1963; 39: 3436–3444.

177. Ogden MI, Beer PD eds. Water and O-Donor Ligands. In: Encyclopedia of Inorganic Chemistry, 1st ed, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
178. Lukacova V, Woltosz WS, Bolger MB. Prediction of modified release pharmacokinetics and pharmacodynamics from *in vitro*, immediate release, and intravenous data. AAPS J 2009; 11: 323–334.
179. Zhang X, Lionberger RA, Davit BM, Yu LX. Utility of physiologically based absorption modeling in implementing quality by design in drug development. AAPS J 2011; 13: 59-71.
180. Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, Cabalu T, Hochman J. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. AAPS J 2013; 15: 629-645.
181. Jiang W, Kim S, Zhang X, Lionberger RA, Davit BM, Conner DP, Yu LX. The role of predictive biopharmaceutical modeling and simulation in drug development and regulatory evaluation. Int J Pharm 2011; 418: 151-160.
182. Perez de la Cruz Moreno M, Oth M, Deferme S, Lammert F, Tack J, Dressman J, Augustijns P. Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. J Pharm Pharmacol 2006; 58: 1079-1089.

## BIOGRAFIJA

Aleksandra Stojković je rođena u Beogradu 26.01.1984. godine, gde je završila osnovnu školu, a zatim i VIII Beogradsku gimnaziju. Nakon završetka osnovne i srednje škole proglašena je za đaka generacije, a dobitnik je i Vukove diplome. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 2003/04. godine, a diplomirala je u septembru 2008. godine sa prosečnom ocenom 9.77 i ocenom 10 iz diplomskog ispita. U toku studiranja bila je stipendista grada Beograda. Doktorske akademske studije iz Farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu je upisala školske 2008/09. godine. Ispite predviđene planom i programom doktorskih studija je položila sa prosečnom ocenom 9.92. Obavezan farmaceutski pripravnički staž obavila je u apoteci "Zdravlje", nakon čega je 26.01.2010. položila stručni ispit. U toku školske 2008/09. bila je zaposlena kao stručni saradnik u organizovanju i izvođenju praktične nastave na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju. Od februara 2010. godine do septembra 2011. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i prosvetu. Od septembra 2011. do avgusta 2013. godine je bila zaposlena kao istraživač-saradnik u Biomedicinskom centru Instituta "Torlak". Saradnik je na projektu TR34007 čiji je nosilac Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu. Dobitnik je godišnje nagrade Farmaceutskog fakulteta za naučnoistraživački rad za 2010. godinu koja se dodeljuje studentima-doktorantima.

Aleksandra Stojković je autor/koautor četiri rada objavljena u međunarodnim časopisima iz oblasti farmaceutske tehnologije i tri rada iz oblasti neuroimunologije, jednog rada objavljenog u časopisu nacionalnog značaja i četrnaest saopštenja prezentovanih na međunarodnim i domaćim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Стојковић

број индекса 17/08

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биофармацеутска карактеризација интеракције ципрофлоксацина и јона метала

---

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 15.11.2013.

Стојковић Александра



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Стојковић

Број индекса 17/08

Студијски програм докторске академске студије из фармацеутске технологије

Наслов рада Биофармацеутска карактеризација интеракције  
ципрофлорксацина и јона метала

Ментор Проф. др Јелена Паројчић

Потписани/а Александра Стојковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 15.11.2013.

Стојковић Александар

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Биофармацеутска карактеризација интеракције ципрофлоксацина и јона метала

---

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 15. 11. 2013.

Својубош Александро

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.