

# Procjena prikladnosti odabranih ciklodekstrina kao solubilizatora u in vitro ispitivanju permeabilnosti flutikazonpropionata

---

Kobaš, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:673303>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Mia Kobaš**

**Procjena prikladnosti odabranih ciklodekstrina  
kao solubilizatora u *in vitro* ispitivanju  
permeabilnosti flutikazonpropionata**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marija Juga, te uz komentoricu dr. sc. Danielu Amidžić Klarić. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4592.

*Zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Mariju Jugu što me svojim izvrsno strukturiranim predavanjima na kolegiju Oblikovanje lijekova zainteresirao za područje rada s ciklodekstrinima. Hvala Vam na pruženoj prilici, prenesenom znanju i stručnom vodstvu.*

*Također, zahvaljujem i komentorici dr. sc. Danieli Amidžić Klarić na pomoći pri razvoju analitičke metode i tumačenju rezultata analize.*

*Veliko hvala i prof. dr. sc. Aniti Hafner na ugodnoj suradnji, korisnim savjetima i prenesenom znanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala asistentici Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. na strpljenju, svim ohrabrenjima te pomoći pri izvođenju praktičnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem i svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na susretljivosti.*

*Neizmjereno hvala mojoj obitelji na konstantnoj podršci, motivaciji i bezrezervnoj ljubavi.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Struktura i derivati ciklodekstrina .....	1
1.2. Fizičko-kemijska svojstva ciklodekstrina .....	2
1.3. Inkluzijski kompleksi lijek/ciklodekstrin .....	4
1.3.1. Mehanizam nastanka kompleksa i solubilizacijskog učinka .....	4
1.3.2. Ispitivanja fazne topljivosti .....	6
1.3.3. Čimbenici koji utječu na stvaranje kompleksa .....	8
1.4. Primjeri solubilizacijskog učinka $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD na lijekove netopljive u vodi .....	10
1.5. Flutikazonpropionat .....	13
1.5.1. Struktura i fizičko-kemijska svojstva lijeka .....	13
1.5.2. Metode analize flutikazonpropionata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ..	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	17
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1. Materijali .....	19
3.2. Metode .....	19
3.2.1. Ispitivanje fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata s $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD .....	19
3.2.2. Ekstrakcija flutikazonpropionata .....	21
3.2.3. Analiza uzoraka HPLC metodom s mobilnom fazom sastavljenom od fosfatnog pufera <i>pH</i> 3,5 i acetonitrila (40:60, V/V) .....	21
3.2.4. Analiza uzoraka HPLC metodom s mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera (50:15:35, V/V/V) .....	22
3.2.5. Validacijski parametri .....	22
3.2.6. Izrada krivulja fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata i ciklodekstrina .....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. Razvoj HPLC metode za analizu flutikazonpropionata u vodenim otopinama $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD .....	25
4.2. Validacija analitičke metode .....	31
4.3. Ispitivanje utjecaja $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD na topljivost flutikazonpropionata .....	33
5. ZAKLJUČCI .....	37
6. LITERATURA .....	38
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	46

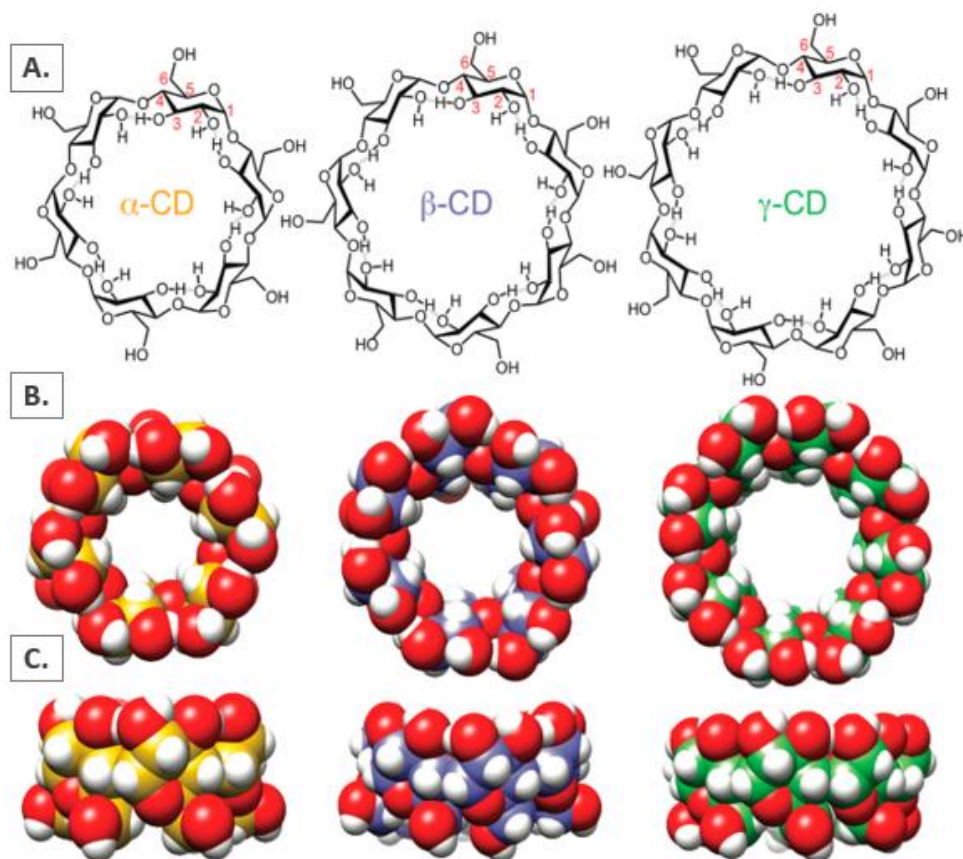
Temeljna dokumentacijska kartica



# 1. UVOD

## 1.1. Struktura i derivati ciklodekstrina

Ciklodekstrini su oligosaharidi građeni od ciklički povezanih glukopiranoznih jedinica. Nastaju razgradnjom škroba, djelovanjem enzima ciklodekstrin-glukoziltransferaze čime se dobiju prirodni, alfa- ( $\alpha$ -CD), beta- ( $\beta$ -CD) i gama-ciklodekstrin ( $\gamma$ -CD) (Jansook i sur., 2018; Sharma i Baldi, 2014). Navedeni ciklodekstrini međusobno se razlikuju prema broju glukopiranoznih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama (Slika 1.).  $\alpha$ -CD sastoji se od šest glukopiranoznih jedinica (Slika 1.A), što je ujedno i najmanji mogući broj glukopiranoznih jedinica u strukturi ciklodekstrina. Ciklodekstrini s manje od šest glukopiranoznih jedinica ne mogu nastati uslijed steričkih smetnji, dok oni s više od osam ne mogu dovoljno učinkovito kompleksirati lijekove zbog prevelikog promjera centralne šupljine i veće strukturne fleksibilnosti (Mura, 2014; Frömring i Szejtli, 1994).



**Slika 1.** Struktura i oblik molekula prirodnih ciklodekstrina prikazanih: **A.** u konformaciji stolca; **B.** kalotnim modelom – pogled od gore; **C.** kalotnim modelom – pogled sa strane.  
(prilagođeno iz Bruns, 2019)

Molekule ciklodekstrina poprimaju oblik krnjeg stošca sa šupljinom u središtu koja je većeg promjera što je veći broj glukopiranoznih jedinica uključen u strukturu (Slika 1.B i 1.C). Ovakva konfiguracija posljedica je toga što glukopiranozne jedinice u molekuli ciklodekstrina zauzimaju konformaciju stolca (Slika 1.A). Budući da je rotacija oko glikozidnih veza onemogućena, primarne i sekundarne hidroksilne skupine smještene su na suprotnim stranama molekule, odnosno na užem te širem dijelu otvora molekule (Crini i sur., 2018; Davis i Brewster, 2004). Tako smještene hidroksilne skupine čine vanjsku površinu molekule izrazito hidrofilnom. Centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina omeđuju atomi ugljika, vodika i kisika podrijetlom iz okosnice glukopiranoznih jedinica te glikozidnih veza zbog čega je unutrašnjost molekule nepolarnog karaktera (Sharma i Baldi, 2014).

Prirodni ciklodekstrini mogu se modificirati uvođenjem supstituenata na hidroksilnim skupinama reakcijom elektrofilne supstitucije. Tako se primjerice hidroksipropilirani (u daljnjem tekstu: HP) derivati dobivaju tretiranjem prirodnih ciklodekstrina propilen-oksidom (Jansook i sur., 2018). Takvim postupcima mijenjaju se topljivost ciklodekstrina i volumen hidrofobne šupljine, čime se značajno može utjecati na njihovu sposobnost kompleksacije (Saokham i sur., 2018; Mura, 2014; Del Valle, 2004). Zbog toga se derivatizacija prirodnih ciklodekstrina najčešće provodi s ciljem prilagođavanja njihovih fizičko-kemijskih svojstava vrsti terapijskog sustava ili radi poboljšanja sposobnosti uklapanja lijeka u centralnu šupljinu stvaranjem dodatnih interakcija između supstituenta i lijeka (Sharma i Baldi, 2014).

## 1.2. Fizičko-kemijska svojstva ciklodekstrina

Ciklodekstrini su izrazito hidrofilne molekule, što je razvidno iz vrijednosti logaritma njihovih koeficijenata razdjeljenja ( $\log P$ ) te loših svojstava topljivosti u nepolarnom otapalu poput metanola (Tablica 1.). Također, vidljivo je da topljivost prirodnih ciklodekstrina u vodi ne raste s porastom broja hidroksilnih skupina, što je suprotno očekivanom. Tako  $\alpha$ -CD, koji u svojoj strukturi ima tri hidroksilne skupine manje, ima gotovo osam puta veću topljivost u vodi u odnosu na  $\beta$ -CD. Naime, struktura ciklodekstrina stabilizirana je stvaranjem vodikovih veza između hidroksilnih skupina C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atoma susjednih glukopiranoznih jedinica. Ova pojava utječe na dimenzije molekule, sposobnost stvaranja vodikovih veza s molekulama otapala te posljedično i na topljivost ciklodekstrina (Crini i sur., 2018; Saokham i sur., 2018). Kod  $\beta$ -CD dolazi do zatvaranja cjelovitog prstena intramolekulskih vodikovih veza, dok u molekuli  $\alpha$ -CD zbog steričkih smetnji nastaje tek pet od šest teoretski mogućih vodikovih veza, što objašnjava

razliku u topljivosti između ova dva tipa ciklodekstrina (Jug i Bećirević-Laćan, 2008; Frömming i Szejtli, 1994).

Uvođenjem supstituenata u molekulu prirodnih ciklodekstrina ometa se stvaranje prethodno opisanih intramolekulskih vodikovih veza (Saokham i sur., 2018) zbog čega, unatoč manjoj vrijednosti  $\log P$ , tako dobiveni derivati pokazuju znatno bolju topljivost u vodi (Tablica 1.). Usto, budući da je postupak supstitucije nasumičan, konačni produkt je amorfna krutina, odnosno smjesa izomera, zbog čega poboljšana svojstva topljivosti prate i krutine inkluzijskih kompleksa derivata ciklodekstrina (Jansook i sur., 2018; Jug i Bećirević-Laćan, 2008; Davis i Brewster, 2004).

**Tablica 1.** Fizičko-kemijska svojstva prirodnih ciklodekstrina te odabranih derivata ciklodekstrina.

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	HP- $\alpha$ -CD	HP- $\beta$ -CD	HP- $\gamma$ -CD	Literatura
Topljivost u vodi pri 25°C (mg/ml)	145	18,5	232	> 600	> 600	> 500	Muankaew i Loftsson, 2017
Topljivost u metanolu pri 25°C (mg/ml)	N	N	> 1	-	3	-	Frömming i Szejtli, 1994
$\log P$	-13	-14	-17	< -10*	-11	-13	Saokham i sur., 2018
$pK_a$	12,3	12,2	12,1	-	-	-	Crini i sur., 2018
Broj molekula vode u centralnoj šupljini	6-8	11-12	13-17	-	-	-	Crini i sur., 2018

N – netopljiv; \* Loftsson i Brewster, 2010

Smatra se da su svojstva hidrofobne šupljine ciklodekstrina slična onima 40%-tne otopine etanola (Jug, 2020; Loftsson i Brewster, 2010; Frömming i Szejtli, 1994). Također, u vodenoj otopini se molekule otapala mogu smjestiti u centralnu šupljinu ciklodekstrina. Budući da se tako smještene molekule vode nalaze u nepolarnoj sredini, ne mogu stvarati vodikove veze, zbog čega imaju visoku entalpiju (Duchêne, 2011).



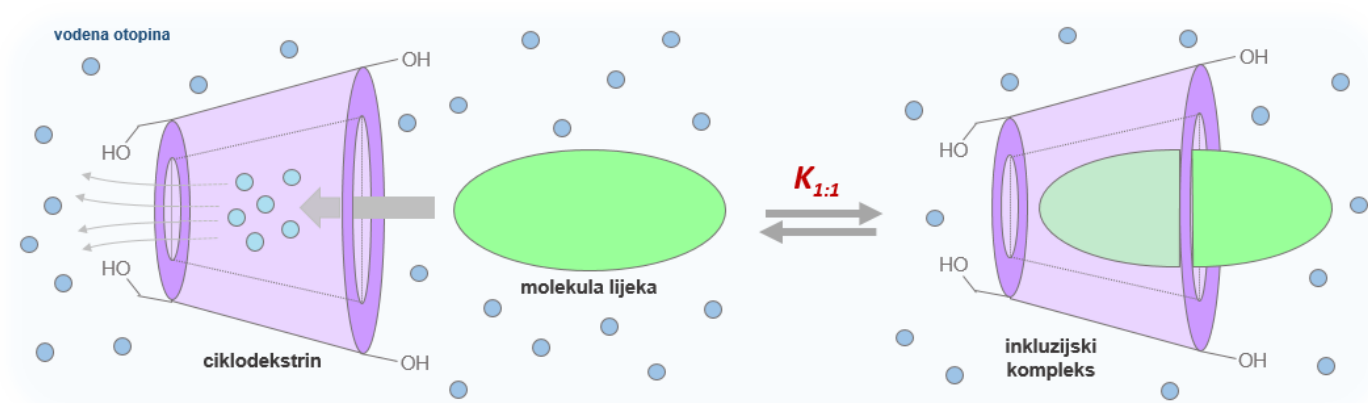
Energija pohranjena u molekulama vode važna je pokretačka sila za stvaranje inkluzijskih kompleksa s raznim supstratima čija je polarnost manja od vode (Loftsson i Brewster, 2017; Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Povećanjem volumena šupljine, više molekula vode može stati u centralnu šupljinu ciklodekstrina (Tablica 1.), no njihova energija sličnija je energiji molekula vode u otopini (Frömming i Szejtli, 1994).

### **1.3. Inkluzijski kompleksi lijek/ciklodekstrin**

#### **1.3.1. Mehanizam nastanka kompleksa i solubilizacijskog učinka**

Zahvaljujući prethodno opisanim strukturnim i fizičko-kemijskim značajkama, ciklodekstrini su pogodno sredstvo za uklapanje lijekova na molekularnoj razini (Davis i Brewster, 2004). Uklapanje lijeka u centralnu šupljinu pojedinog tipa ciklodekstrina ovisi prvenstveno o lipofilnosti i geometriji molekule lijeka, odnosno dijela molekule koji se u nju može smjestiti (Duchêne, 2011; Frömming i Szejtli, 1994). Lipofilni dio molekule smješta se u hidrofobnu centralnu šupljinu, a hidrofilni ostaje s vanjske strane gdje je u kontaktu s otapalom i hidroksilnim skupinama ciklodekstrina.

U tom smislu, stvaranje van der Waalsovih, elektrostatskih i hidrofobnih interakcija te vodikovih veza između supstrata i ciklodekstrina pridonosi nastanku inkluzijskog kompleksa (Jug, 2020; Crini i sur., 2018). Važna pokretačka sila za stvaranje kompleksa je i izdvajanje energijom bogatih molekula vode iz centralne šupljine, odnosno njihova zamjena hidrofobnim dijelom molekule lijeka (Slika 2.). Također, uklapanjem lijeka u šupljinu smanjuje se konformacijsko naprezanje u molekuli ciklodekstrina što je osobito značajno u slučaju  $\alpha$ -CD (Jug i Bećirević-Laćan, 2008; Frömming i Szejtli, 1994). Budući da je prsten u  $\alpha$ CD izrazito napet i iskrivljen u vodenoj otopini, stvaranje inkluzijskog kompleksa rezultira promjenom postojeće konformacije u energetski povoljniju (Frömming i Szejtli, 1994). Nastanak inkluzijskog kompleksa uglavnom je posljedica kombinacije nekoliko od prethodno opisanih mehanizama kojima se smanjuje entalpija, a povećava entropija sustava.



**Slika 2.** Shematski prikaz nastanka inkluzijskog kompleksa između molekule lijeka i ciklodekstrina u vodenoj otopini.

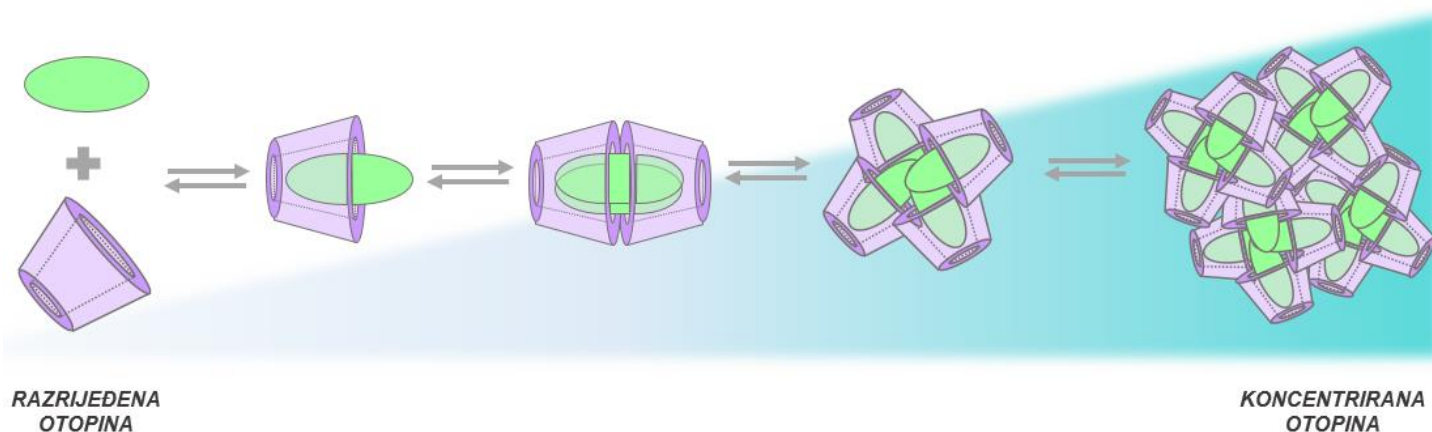
Pri formiranju kompleksa ne stvaraju se kovalentne veze te u otopini postoji dinamička ravnoteža između kompleksiranog i slobodnog oblika lijeka (Jug 2020; Jansook i sur., 2018). Interakcija između molekule lijeka (L) i ciklodekstrina (CD) u većini slučajeva definirana je molarnim odnosom 1:1, stoga se može opisati kemijskom jednačinom (1) i pripadajućom konstantom ravnoteže (2):



$$K_{1:1} = \frac{[L - CD]}{[L] \cdot [CD]} \quad (2)$$

Konstanta ravnoteže navedene reakcije,  $K_{1:1}$  [ $M^{-1}$ ], mjera je afiniteta vezanja molekule lijeka i ciklodekstrina, odnosno stabilnosti tako nastalog kompleksa (L-CD). Veća konstanta ravnoteže prati veću stabilnost kompleksa. Iako najčešće nastaju kompleksi molarnog odnosa 1:1, mogući su i drugi stehiometrijski odnosi koji ovise o strukturnim značajkama ciklodekstrina i samog lijeka (Duchêne, 2011, 2011).

Također, mogući su i drugi mehanizmi solubilizacije lijeka koji dolaze do izražaja pri visokim koncentracijama ciklodekstrina u otopini (Slika 3.). Naime, ciklodekstrini se, jednako kao i kompleksi lijek/ciklodekstrin, mogu udruživati u agregate nanometarskih dimenzija (Jug 2020; Jansook i sur., 2018; Loftsson i sur., 2002). Saokham i sur. (2016) utvrdili su da je kritična koncentracija pri kojoj prirodni ciklodekstrini počinju stvarati agregate u vodenoj otopini 0,69-1,19% ( $m/V$ ), te da ista ovisi o njihovoj intrinzičnoj topljivosti.



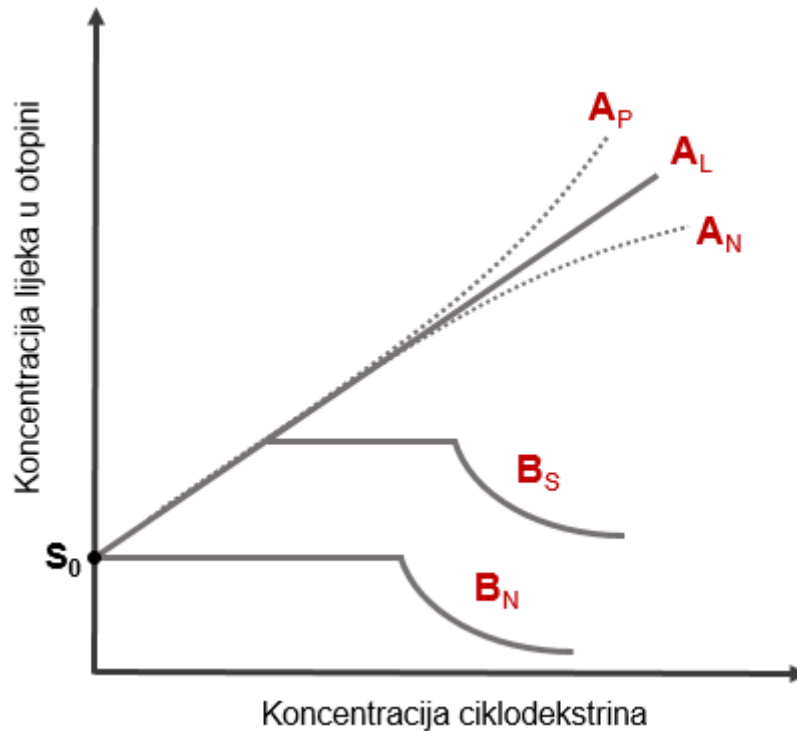
**Slika 3.** Shematski prikaz formiranja oligomera i agregata kompleksa lijek/ciklodekstrin pri različitim koncentracijama ciklodekstrina u vodenoj otopini.

### 1.3.2. Ispitivanja fazne topljivosti

Promjene fizičko-kemijskih svojstava lijeka uslijed formiranja inkluzijskog kompleksa temelj su brojnih metoda za određivanje konstante stabilnosti i stehiometrijskog odnosa kompleksa ciklodekstrina i lijeka. Jedna od njih je i metoda razvijena od strane Higuchija i Connorsa (1965). Metoda se temelji na prikazu najveće moguće koncentracije lijeka koja može biti solubilizirana kao funkciju rastuće koncentracije ciklodekstrina. Budući da se ciklodekstrini često ispituju zbog svog solubilizacijskog učinka na lijekove netopljive u vodi, ova metoda pogodna je za predformulacijska ispitivanja s ciljem utvrđivanja konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa.

Postupak je vrlo jednostavan te uključuje dodatak suviška lijeka u koncentracijski niz otopina ciklodekstrina, nakon čega se prezasićene otopine miješaju do uspostave ravnotežne topljivosti. Potom se uzorak supernatanta analizira na prisutnost lijeka prikladnom analitičkom metodom te koncentracija lijeka grafički prikaže u ovisnosti o koncentraciji ciklodekstrina.

Profil tako dobivene krivulje topljivosti (Slika 4.) govori o učinku ciklodekstrina na topljivost lijeka, kao i o mehanizmu solubilizacijskog učinka (Jansook i sur., 2018; Loftsson i Brewster, 2010).



**Slika 4.** Tipovi izoterma topljivosti kompleksa lijek/ciklodekstrin prema Higuchiju i Connorsu (1965)

Povećanje koncentracije lijeka u otopini porastom koncentracije ciklodekstrina ukazuje na nastanak inkluzijskog kompleksa koji je dobro topljiv u vodi. U tom slučaju izgled izoterme topljivosti bit će sličan A-tipu krivulje (Slika 4.).  $A_L$  tip krivulje upućuje na stvaranje inkluzijskog kompleksa između jedne molekule ciklodekstrina te jedne molekule lijeka, dok  $A_P$  i  $A_N$  tipovi krivulja ukazuju na stehiometrijske odnose višeg reda s obzirom na supstrat ili ciklodekstrin (Jansook i sur., 2018; Landy, 2018). Odstupanje od linearnosti vidljivo u  $A_P$  i  $A_N$  tipovima krivulje može biti i posljedica promjene uvjeta u otopini pri visokim koncentracijama ciklodekstrina, što pak rezultira poboljšanim odnosno oslabljenim solubilizacijskim učinkom (Jacob i Nair, 2018; Jansook i sur., 2018). Ako je topljivost inkluzijskog kompleksa manja od

topljivosti ciklodekstrina, izgled krivulje bit će sličan B<sub>N</sub> tipu, a u slučaju ograničene topljivosti kompleksa, B<sub>S</sub> tipu izoterme (Slika 4.).

Temeljem odsječka na y-osi koji predstavlja intrinzičnu topljivost lijeka ( $S_0$ ), i nagiba pravca linearnog dijela izoterme topljivosti ( $\text{tg}\alpha$ ) mogu se izračunati konstanta stabilnosti inkluzijskog kompleksa ( $K_{1:1}$ ) i učinkovitost kompleksacije (engl. *complexation efficiency*, CE). Formule za izračunavanje spomenutih veličina u slučaju molarnog odnosa lijeka i ciklodekstrina 1:1 su:

$$K_{1:1} = \frac{\text{tg } \alpha}{S_0 \cdot (1 - \text{tg } \alpha)} \quad (3)$$

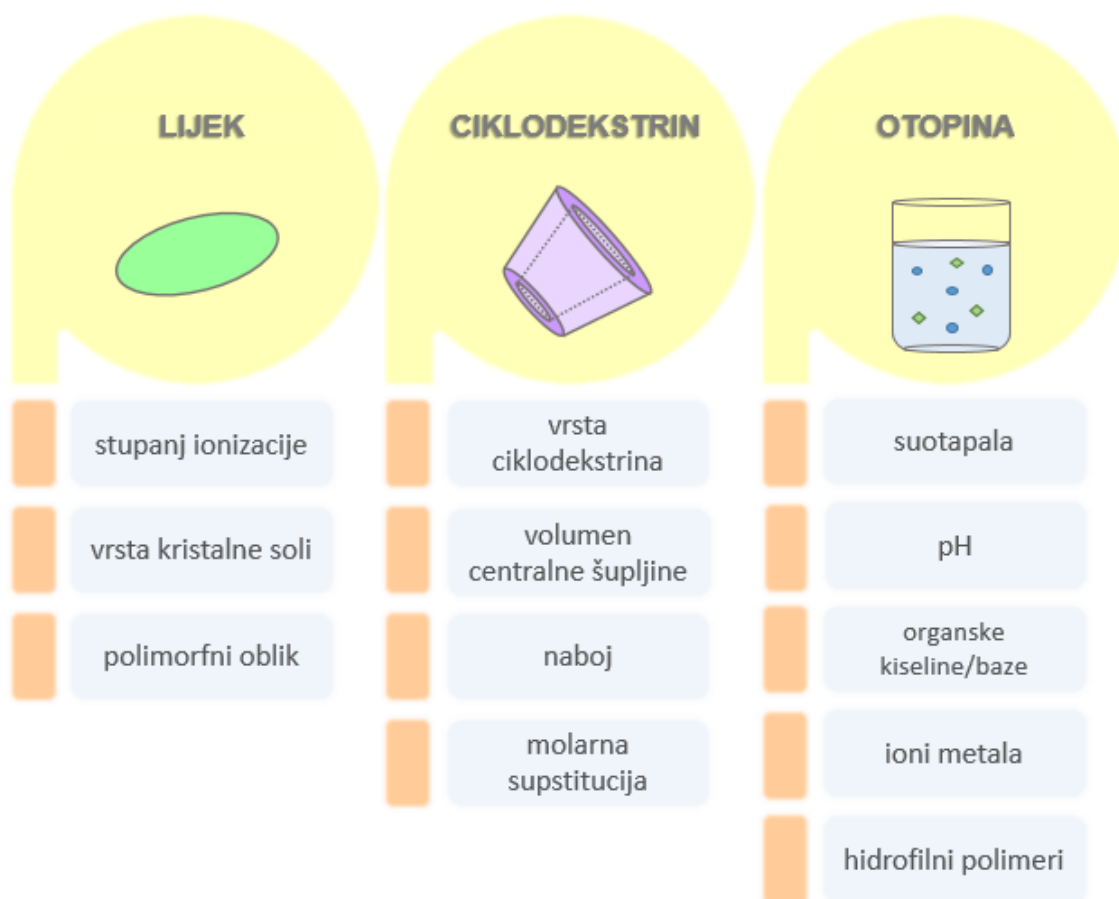
$$CE = \frac{\text{tg } \alpha}{(1 - \text{tg } \alpha)} \quad (4)$$

### 1.3.3. Čimbenici koji utječu na stvaranje kompleksa

Kako bi se osiguralo formiranje inkluzijskog kompleksa, u predformulacijskim ispitivanjima ključno je utvrditi utjecaj svih sastavnica otopine na ravnotežnu reakciju stvaranja i disocijacije inkluzijskog kompleksa, budući da krajnji farmaceutski oblik često sadrži i druge pomoćne tvari u svom sastavu (Jacob i Nair, 2018; Saokham i sur., 2018). Iz formula (3) i (4) vidljivo je da je učinkovitost kompleksacije za molarni odnos lijeka i ciklodekstrina 1:1 jednaka umnošku intrinzične topljivosti lijeka i konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa. Stoga će fizičko-kemijska svojstva lijeka i ciklodekstrina te sastav otopine u kojoj se postupak provodi biti glavni čimbenici koji utječu na prethodno spomenute veličine (Slika 5.). Pri razvoju farmaceutskog oblika isti se razmatraju u svrhu povećanja učinkovitosti postupka (Jacob i Nair, 2018; Jansook i sur., 2018).

Budući da samo otopljene molekule lijeka mogu stupiti u interakciju s centralnom šupljinom ciklodekstrina, povećanjem  $S_0$  lijeka povećava se količina lijeka dostupna za kompleksiranje. Prema tome, učinkovitost postupka kompleksacije bit će veća u vodenoj otopini pH vrijednosti pri kojoj je slaba baza/kiselina u ioniziranom obliku (Jansook i sur., 2018; Loftsson i Brewster, 2012). Amorfna krutina ima veću topljivost i brzinu otapanja, zbog čega će kod nje solubilizacijski učinak ciklodekstrina biti izraženiji u odnosu na kristalnu

krutinu istog lijeka. Također, različite kristalne soli pojedinog lijeka razlikuju se u  $pK_a$  vrijednosti i konstanti topljivosti (Jacob i Nair, 2018; Loftsson i Brewster, 2012). Iz navedenog je razvidno da odabir polimorfnog ili kemijskog oblika lijeka od interesa utječe na uspješnost postupka kompleksacije, osobito u slučaju teško topljivih lijekova (Jansook i sur., 2018; Loftsson i Brewster, 2012).



**Slika 5.** Shematski prikaz čimbenika koji utječu na solubilizacijski učinak ciklodekstrina

Vrsta odabranog ciklodekstrina izravno utječe na  $K_{1:1}$  budući da se ciklodekstrini međusobno razlikuju prema svojim fizičko-kemijskim svojstvima (Tablica 1.). Centralna šupljina ciklodekstrina treba biti dovoljno velika da može uklopiti molekulu lijeka od interesa, ali ne prevelika kako ne bi smanjila hidrofobne interakcije između supstrata i ciklodekstrina te posljedično i solubilizacijski učinak (Duchêne, 2011). Kemijskom modifikacijom, odnosno uvođenjem supstituenata u molekulu ciklodekstrina, mijenjaju se svojstava i volumen njegove

centralne šupljine. Supstituenti mogu povećati stabilnost kompleksa stvaranjem dodatnih interakcija sa supstratom ili pak ometati stvaranje kompleksa (Duchêne, 2011). Primjerice, solubilizacijski učinak derivata ciklodekstrina s ioniziranim supstituentima ovisi o udaljenosti istih od centralne šupljine ciklodekstrina, kao i o naboju molekule supstrata. Količina supstituenata uvedenih u molekulu ciklodekstrina, odnosno molarna supstitucija, također utječe na sposobnost stvaranja kompleksa na način da derivati ciklodekstrina s nižim stupnjem molarne supstitucije imaju bolji solubilizacijski učinak (Jacob i Nair, 2018).

Sastojci otopine u kojoj se provodi postupak mogu djelovati aditivno, sinergistički ili kočiti solubilizacijski učinak ciklodekstrina (Saokham i sur., 2018; Loftsson i Brewster, 2012). Suotapala mogu povećati intrinzičnu topljivost lijeka, ali mogu nepovoljno utjecati na  $K_{1:1}$  uslijed kompeticije između molekula suotapala i lijeka za centralnu šupljinu ciklodekstrina (Loftsson i Brewster, 2012; Duchêne, 2011). Organske kiseline ili baze mogu se udruživati s molekulama lijeka i ciklodekstrina tvoreći ternarne komplekse. Ovim mehanizmom povećava se  $S_0$  i/ili  $K_{1:1}$ . Na sličan način i hidrofilni polimeri mogu stabilizirati komplekse lijek/ciklodekstrin, jednako kao i aggregate istih (Jansook i sur., 2018). Do povećanja solubilizacijskog učinka doći će i ako lijek ima sposobnost stvaranja topljivih kompleksa s ionima metala koji su prisutni u otopini (Loftsson i Brewster, 2012).

Prethodno spomenute čimbenike koji utječu na učinkovitost kompleksacije treba uzeti u obzir i prilikom ispitivanja fazne topljivosti tako da se ispitivanje provodi u mediju koji je najbliži onom očekivane formulacije (Jacob i Nair, 2018; Loftsson i Brewster, 2012). Na taj način dobiva se pouzdani rezultat o potrebnoj količini ciklodekstrina za postizanje željenog solubilizacijskog učinka (Saokham i sur., 2018).

#### **1.4. Primjeri solubilizacijskog učinka $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD na lijekove netopljive u vodi**

Zbog svoje specifične strukture, ciklodekstrini imaju sposobnost stvaranja topljivih inkluzijskih kompleksa s lipofilnim molekulama ili dijelovima molekule, što ih čini prikladnim sredstvom za povećanje topljivosti takvih lijekova (Crini i sur., 2018; Sharma i Baldi, 2014; Davis i Brewster, 2004). Usto, mogući su i drugi solubilizacijski mehanizmi poput uklapanja lijeka u micelama slične strukture načinjene od ciklodekstrina ili kompleksa lijek/ciklodekstrin (Jug, 2020; Jansook i sur., 2018; Loftsson i sur., 2002). Također, solubilizacijski učinak može se višestruko povećati dodatkom drugih sastavnica u formulaciju poput hidrofilnih polimera,

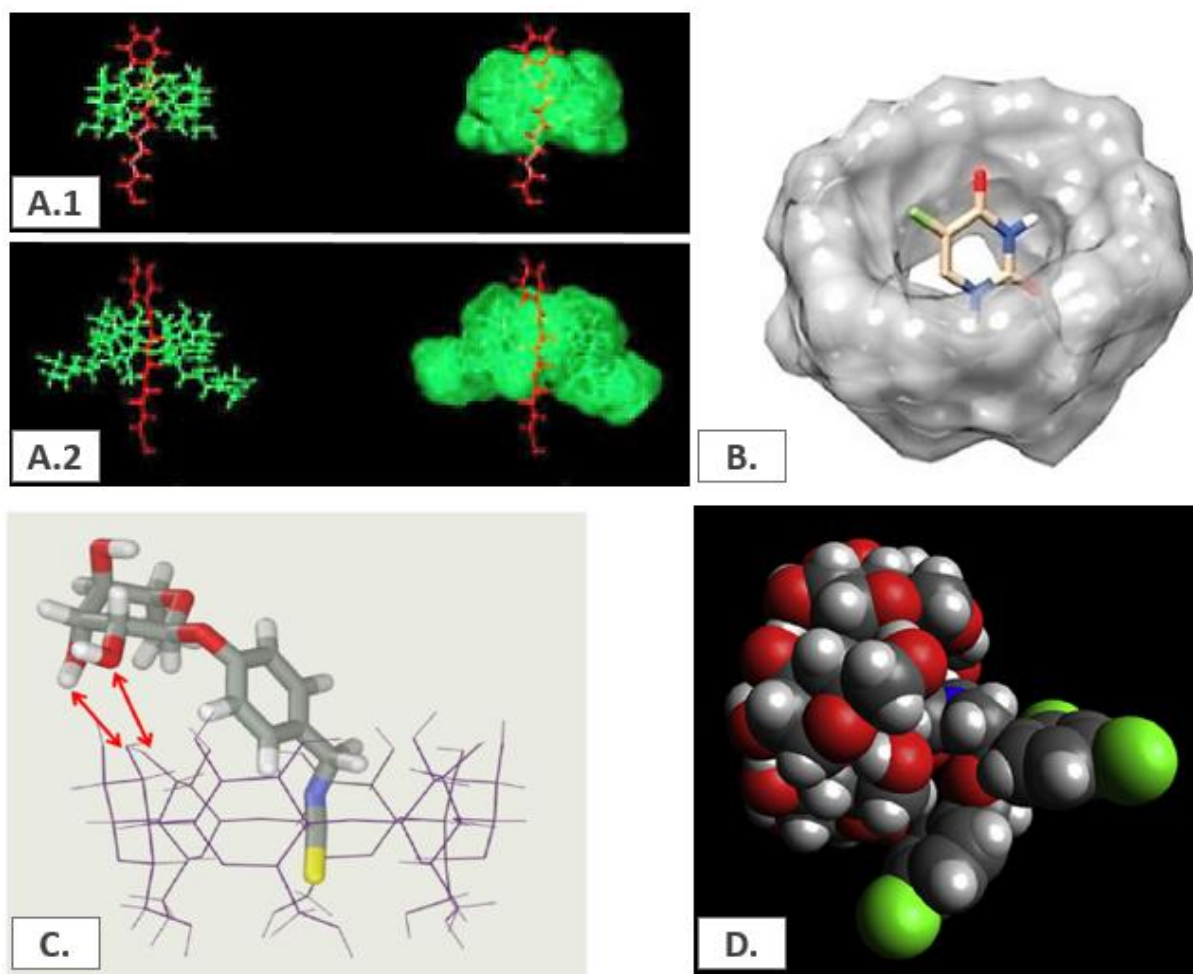
iona metala te organskih baza ili kiselina (Jacob i Nair, 2018; Jansook i sur., 2018; Loftsson i Brewster, 2012). S obzirom na navedene mogućnosti, brojni su primjeri inovativnih rješenja gdje se upotrebom ciklodekstrina premostio problem lijekova čija je primjena bila ograničena lošim fizičko-kemijskim svojstvima istih (Jug, 2020).

Budući da  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD imaju šest glukopiranoznih jedinica u svojoj strukturi, promjer njihove centralne šupljine manji je u odnosu na ostale prirodne ciklodekstrine i pripadajuće derivate (Slika 1.A i 1.B). U vodenoj otopini ciklodekstrina energetski je nepovoljno da centralna šupljina ostane prazna (Frömming i Szejtli, 1994) zbog čega veličina iste ne umanjuje sposobnost stvaranja kompleksa u slučaju  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD. Volumen hidrofobne šupljine ih pak, u geometrijskom smislu, ograničava na stvaranje kompleksa s dijelovima molekula poput alifatskih lanaca (Duchêne, 2011; Cai i sur., 2010; Malaekheh-Nikouei i sur., 2007; Davis i Brewster, 2004) ili manjih prstenastih struktura (Diaz Tome i sur., 2018; Mathiron i sur., 2018; Di Donato i sur., 2016).

Spomenuto ograničenje može predstavljati prednost u slučaju slabo topljivih lijekova velike molekulske mase te razgranate strukture. Tako su primjerice Malaekheh-Nikouei i sur. (2007), uspoređujući učinke  $\alpha$ -CD i  $\beta$ -CD na topljivost ciklosporina A, dokazali da  $\alpha$ -CD ima puno bolji solubilizacijski učinak u odnosu na  $\beta$ -CD. Taj učinak pripisali su boljim interakcijama  $\alpha$ -CD s malim alifatskim skupinama u molekuli ciklosporina A te formiranju kompleksa višeg reda s obzirom na  $\alpha$ -CD (Malaekheh-Nikouei i sur., 2007). Johannsdottir i sur. (2015) riješili su problem loše topljivosti ciklosporina A dodatkom  $\alpha$ -CD u funkciji solubilizatora te uspješno razvili formulaciju prikladnih svojstava za oftalmičku primjenu. HP- $\alpha$ -CD također poboljšava topljivost ciklosporina A u usporedbi s drugim ciklodekstrinima, ali znatno slabije u odnosu na  $\alpha$ -CD (Johannsdottir i sur., 2015; Matilainen i sur., 2006).

U ispitivanju solubilizacijskog učinka ciklodekstrina na teško topljivi citostatik vorinostat,  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD pokazali su bolji učinak u odnosu na  $\gamma$ -CD i HP- $\gamma$ -CD, a lošiji u odnosu na HP- $\beta$ -CD (Cai i sur., 2010). Molekulskim modeliranjem pokazalo se da  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD tvore komplekse s alifatskim lancem u strukturi vorinostata (Slika 6.A.1 i 6.A.2). Temeljem provedenih ispitivanja,  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD su, uz HP- $\beta$ -CD, predloženi kao prikladni solubilizatori u oblicima namijenjenim za parenteralnu primjenu vorinostata (Cai i sur., 2010).





**Slika 6.** Prikaz inkluzijskih kompleksa različitih lijekova s  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD metodom molekuskog modeliranja.

**A.1** kompleks  $\alpha$ -CD i vorinostata i **A.2** kompleks HP- $\alpha$ -CD i vorinostata (preuzeto iz Cai i sur., 2010); **B.** kompleks  $\alpha$ -CD i 5-fluorouracila (preuzeto iz Di Donato i sur., 2016); **C.** kompleks  $\alpha$ -CD i moringina (preuzeto iz Mathiron i sur., 2018); **D.** kompleks  $\alpha$ -CD i ekonazolnitrata (preuzeto iz Diaz Tome i sur., 2018)

$\alpha$ -CD pokazao se ciklodekstrinom izbora za poboljšanje topljivosti još jednog citostatika, 5-fluorouracila (Di Donato i sur., 2016). Karakterizacijom kompleksa utvrđeno je da se pirimidinski prsten u cijelosti uklapa u centralnu šupljinu  $\alpha$ -CD (Slika 6.B). Povećanje topljivosti lijeka, zajedno s povoljnim učinkom ciklodekstrina na permeabilnost lijeka, rezultiralo je do 10 puta jačim citotoksičnim učinkom 5-fluorouracila na A-549 staničnu liniju (Di Donato i sur., 2016).

Topljivost moringina, glikozida izoliranog iz biljke *Moringa oleifera*, povećana je 8 puta u 50 mM vodenoj otopini  $\alpha$ -CD (Mathiron i sur., 2018). Spektrometrijskom analizom kompleksa zaključeno je da se *p*-hidroksibenzil-izotiocijanatna skupina iz moringina smješta u centralnu šupljinu  $\alpha$ -CD, dok ramnoza stvara vodikove veze sa sekundarnim hidroksilnim skupinama  $\alpha$ -CD smještenim s vanjske strane ciklodekstrina (Slika 6.C). Na ovaj način poboljšana je topljivost i stabilnost moringina u vodenoj otopini što je rezultiralo i jačim protuupalnim učinkom.

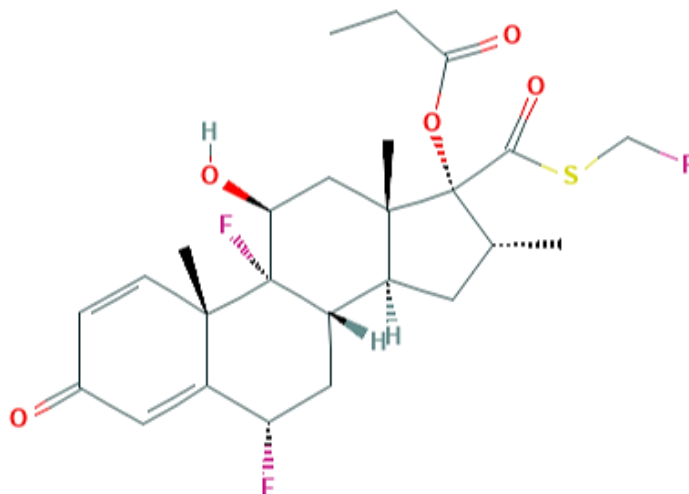
Diaz Tome i sur. (2018) utvrdili su da se terapijski potencijal teško topljivog antifungalnog lijeka ekonazolnitrata može povećati dodatkom  $\alpha$ -CD. Mehanizam solubilizacijskog učinka razjašnjen je nuklearnom magnetskom rezonantnom spektrometrijom (NMR) koja je pokazala da kompleks nastaje uklapanjem imidazolskog prstena u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina (Slika 6.D). Kompleksi  $\alpha$ -CD i ekonazolnitrata potom su uspješno uklopljeni u hidrogelove za oftalmičku primjenu čime je ostvareno kontrolirano oslobađanje lijeka. Druge studije koje su proučavale isti kompleks utvrdile su da se povećanjem topljivosti ekonazolnitrata u vodenoj otopini  $\alpha$ -CD povećava i njegovo antifungalno djelovanje (Jansook i sur., 2020).

## 1.5. Flutikazonpropionat

### 1.5.1. Struktura i fizičko-kemijska svojstva lijeka

Flutikazonpropionat (Slika 7.) sintetski je glukokortikoid druge generacije, molekulske formule  $C_{25}H_{31}F_3O_5S$  ( $M_r=500,6$  g/mol) ([www.pubchem.org](http://www.pubchem.org); Couto i sur., 2014). Agonist je steroidnih receptora te djeluje na upalnu komponentu u patofiziologiji alergijskog i nealergijskog rinitisa te nazalnih polipa (SPC Flixonase, SPC Rinoco), što ga čini neizostavnim lijekom u terapiji navedenih stanja. Zbog iznimno loše topljivosti u vodi, svi registrirani pripravci na našem tržištu dostupni su u obliku praška ili suspenzije (Barišić, 2019). Prema

farmakopejskoj definiciji topljivosti, flutikazonpropionat je gotovo netopljiv u vodi, teško topljiv u etanolu (96%) i metanolu te umjereno topljiv u diklormetanu (Ph.Eur. 8.0; Moffat i sur., ured., 2011). Navedeno je posljedica velike lipofilnosti lijeka ( $\log P = 2,78$ ) ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). Pri fiziološkim uvjetima je u neioniziranom obliku, budući da mu je  $pK_a$  vrijednost 13,56 ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). U izrazito alkalnim vodenim otopinama ( $pH > 12$ ) zabilježeno je nekoliko razgradnih produkata flutikazonpropionata (Tokumura i sur., 2017).



**Slika 7.** *Struktura flutikazonpropionata (preuzeto s [www.pubchem.org](http://www.pubchem.org))*

### 1.5.2. Metode analize flutikazonpropionata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Najveći izazov pri analizi flutikazonpropionata predstavlja njegova loša topljivost u vodenim otopinama te adsorpcija na laboratorijski pribor načinjen od stakla ili polipropilena (Tokumura i sur., 2014a). U literaturi je opisano nekoliko metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) za određivanje flutikazonpropionata (Tablica 2.) koje se s obzirom na vrstu analiziranog uzorka mogu razvrstati na metode analize sadržaja u gotovim farmaceutskim oblicima ili analize u biološkom materijalu. Iz tablice je razvidno da sve metode spadaju u obrnutofazne razdjelne kromatografije sa stacionarnom fazom kemijski modificiranom oktadecilsililnim skupinama. Također, gotovo sve metode, uz iznimku one Maschera i sur. (2008), koriste izokratnu eluciju uz konstantni omjer otapala u mobilnoj fazi. Najveću razliku među metodama predstavlja upravo sastav otapala koja sačinjavaju mobilnu fazu (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Pregled metoda analize flutikazonpropionata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Uzorak	Ekstrakcija	Stacionarna faza	Mobilna faza (V/V)	Brzina protoka (ml/min)	Temperatura kolone (°C)	Volumen injektiranja (µl)	Detekcija	Literatura
<i>Flutikazonpropionat</i>	-	ODS	ACN:APP:MeOH (15:35:50)	1,5	40	20	UV-Vis	<i>Ph. Eur. 8.0; Thakral i sur., 2013; Dai i sur., 2015</i>
	-	ODS	EtOH:H <sub>2</sub> O (50:50)	0,45	<i>nn.</i>	20	MS	<i>Li i sur., 1997</i>
	-	ODS	ACN:H <sub>2</sub> O:PK:NaPP (660:340:1:5)*	1,0	40	50	UV-Vis	<i>Tokumura i sur., 2014a, 2014b, 2015</i>
	-	ODS	ACN:H <sub>2</sub> O (60:40)	1,0	25	10	UV-Vis	<i>Couto i sur., 2014; Drumond i sur., 2014</i>
	+	ODS	ACN:H <sub>2</sub> O (60:40)	1,0	<i>nn.</i>	10	UV-Vis	<i>Dogbe i sur., 2019</i>
<i>Salmeterolksinafoati flutikazonpropionat</i>	-	ODS	MeOH:AcP (75:25)	1,0	40	20	UV-Vis	<i>Murnane i sur., 2006</i>
	-	ODS	MeOH:ACN (20:80)	0,5	<i>nn.</i>	20	UV-Vis	<i>Samir i sur., 2012</i>
<i>Ciklezonid, ciklezonid-M1-metaboliti flutikazonpropionat</i>	+	ODS	<b>gradijentna elucija</b> MF A: HAc:H <sub>2</sub> O:aceton MF B: HAc:ACN:aceton	1,0	50	25	MS/MS (APPI)	<i>Mascher i sur., 2008</i>

\*(V/V/V/m)

ACN – acetonitril; AcP – amonij acetatni puffer (0,6%, *m/V*); APP – amonij dihidrogenfosfatni puffer (1,15 g/l, pH 3,5); APPI – fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photoionization*); EtOH – etanol; HAc – octena kiselina (10 mM); MeOH – metanol; MF – mobilna faza; MS – masena spektrometrija; NaPP – natrijev perklorat monohidrat; *nn.* – podatak nije naveden; ODS – oktadodecilsilil silikagel; PK – perklorna kiselina (60%, *V/V*); UV-Vis – ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija.

Europska Farmakopeja (8.0) u monografiji posvećenoj flutikazonpropionatu unutar poglavlja određivanja sadržaja predlaže metodu koja u mobilnoj fazi sadrži fosfatni pufer ( $pH=3,5$ ) te organska otapala poput acetonitrila i metanola (Tablica 2.). Po uzoru na tu metodu uspješno je provedena analiza određivanja sadržaja lijeka u otopinama koje su sadržavale komplekse flutikazonpropionata i derivate  $\beta$ -CD (Thakral i sur., 2013; Dai i sur., 2015). Za navedenu metodu ustanovljeno je da prisutnost hidroksietil- $\beta$ -, sulfobutileter- $\beta$ -, HP- $\beta$ - te  $\beta$ -ciklodekstrina ne utječe na analizu flutikazonpropionata (Dai i sur., 2015). Tokumura i sur. (2014a) razvili su metodu za analizu vodenih otopina kompleksa flutikazonpropionata i  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD te  $\gamma$ -CD, s perkloratnim puferom u sastavu mobilne faze. Tom metodom postignuta je iznimno visoka osjetljivost, uz granicu određivanja od 10 ng/ml.

Za razliku od prethodno spomenutih metoda, Couto i sur. (2014) razvili su metodu analize flutikazonpropionata u vodenim otopinama  $\gamma$ -CD, bez upotrebe pufera u mobilnoj fazi (Tablica 2.). Granica dokazivanja metode iznosila je 6,7  $\mu$ g/ml, a granica određivanja 20  $\mu$ g/ml, što je znatno niža osjetljivost u odnosu na metodu Tokomure i sur. (2014a). Ipak, metoda se pokazala dovoljno osjetljivom za određivanje sadržaja flutikazonpropionata u biološkim uzorcima, uz prethodnu ekstrakciju smjesom diklormetana i izooktana (Dogbe i sur., 2019).

Samir i sur. (2012) razvili su HPLC metodu za istovremenu analizu sadržaja flutikazonpropionata i salmeterolaksinafoata u komercijalno dostupnom pripravku Seretide<sup>®</sup> Diskus. Metoda je prikladna za rutinsku analizu velikog broja uzoraka spomenute formulacije budući da, za razliku od metode Murnanea i sur. (2006), ne koristi pufer u mobilnoj fazi (Tablica 2.). Navedeno predstavlja prednost jer se na taj način izbjegava pogreška metode koja može proizaći iz varijabilnosti  $pH$  vrijednosti pufera (Samir i sur., 2012).

Metoda razvijena od strane Maschera i sur. (2008) jedini je literaturni primjer HPLC analize flutikazonpropionata koja koristi gradijentnu eluciju (Tablica 2.). Također, korištena je i iznimno osjetljiva metoda detekcije, spregnuta s dva masena spektrometra gdje su analiti ionizirani metodom fotoionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI). Niža granica određivanja flutikazonpropionata u spomenutoj metodi iznosila je čak 10 pg/ml. Takva osjetljivost bila je potrebna za pouzdane rezultate analize budući da su iznimno niske koncentracije lijeka prisutne u serumu. Navedeno proizlazi iz činjenice da se flutikazonpropionat primjenjuje lokalno, na sluznicu nosa, te ima nizak stupanj sistemske apsorpcije (Daley-Yates i Baker, 2001).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Flutikazonpropionat je izrazito potentan sintetski kortikosteroid indiciran za liječenje ili profilaksu upalnih stanja u nosnoj šupljini poput alergijskog i nealergijskog rinitisa te nazalnih polipa (SPC Flixonase; SPC Rinoco). Pri nazalnoj primjeni, lijek ima izrazito nisku sistemsku bioraspoloživost, što ograničava njegov protuupalni učinak na epitel sluznice nosa i smanjuje učestalost sistemskih nuspojava vezanih uz primjenu kortikosteroida (Daley-Yates i Baker, 2001).

U novije vrijeme ispituje se mogućnost razvoja inovativnih formulacija flutikazonpropionata, kao što su nanosuspenzije (Tao-Tao i sur., 2019) i *in situ* gelirajuće suspenzije (Nižić i sur., 2019). Pri razvoju i karakterizaciji inovativnih farmaceutskih oblika flutikazonpropionata veliki izazov predstavlja njegova slaba topljivost u vodi. Tako je, s ciljem postizanja uvjeta osigurane topljivosti prilikom ispitivanja *in vitro* oslobađanja/otapanja lijeka, u istraživanju Nižić i suradnika u receptorski medij dodan etanol, a u radu Tao-Tao i suradnika, natrijev lauril sulfat. U literaturi su zabilježeni primjeri *in vitro* ispitivanja permeabilnosti flutikazonpropionata na staničnim modelima uz dodatak organskih suotapala (dimetilsulfoksida ili etanola) u puferske sustave u receptorskom i/ili donorskom odjeljku kako bi se povećala topljivost flutikazonpropionata (Kumar i sur., 2020; Haghi i sur., 2013). Unatoč tome što su takvi sustavi dostatni za procjenu permeacije lijeka, organska otapala mogu negativno utjecati na konfluentnost i vijabilnost stanica, te takvi mediji neadekvatno simuliraju *in vivo* uvjete transporta lijeka (Kumar i sur., 2020). Stoga se razvila potreba za istraživanjem biorelevantnih te za stanice netoksičnih metoda ispitivanja permeacije teško topljivih lijekova poput flutikazonpropionata.

Kao jedno od potencijalnih rješenja spomenutog problema nameću se sustavi bazirani na ciklodekstrinima budući da su isti pokazali iznimno dobar učinak na topljivost flutikazonpropionata u istraživanjima koja su se bavila razvojem novih terapijskih sustava tog lijeka (Dai i sur., 2015; Tokumura i sur., 2015; Drumond i sur., 2014; Thakral i sur., 2013). Dodatna prednost ciklodekstrina za ovu namjenu jest da su dobro topljivi u vodi pri koncentracijama dostatnim za povećanje topljivosti flutikazonpropionata (Tokumura i sur., 2015), što je iznimno važno s obzirom na ograničen volumen receptorskog medija pri provođenju *in vitro* ispitivanja na stanicama. Pretpostavka je da bi se dodatkom ciklodekstrina u receptorski medij postigla solubilizacija permeiranog lijeka, što za posljedicu može imati bolju učinkovitost postupka ispitivanja permeacije lijeka *in vitro*. Glavni preduvjet za

uspješnost ovog postupka jest formiranje topljivog inkluzijskog kompleksa uz visoku konstantu stabilnosti istog, budući da će u tom slučaju povećanje topljivosti biti dostatno za uspostavu uvjeta osigurane topljivosti u receptorskom mediju.

Prvi korak ka ispitivanju ove hipoteze predstavlja razvoj pouzdane metode analize sadržaja flutikazonpropionata u uzorcima vodenih otopina ciklodekstrina. HPLC je jedna od najčešće korištenih analitičkih metoda za određivanje sadržaja lijeka (Watson, 2012), te je metoda analize od izbora u brojnim dosadašnjim istraživanjima na temu učinka ciklodekstrina na topljivost flutikazonpropionata (Dai i sur., 2015; Tokumura i sur., 2015; Drumond i sur., 2014; Thakral i sur., 2013). Uz validiranu analitičku metodu nužno je preliminarno ocijeniti i solubilizacijski potencijal ciklodekstrina provođenjem ispitivanja fazne topljivosti, kako bi se utvrdili stehiometrijski odnos supstrata i ciklodekstrina pri formiranju inkluzijskog kompleksa te prisutnost drugih neinkluzijskih mehanizama povećanja topljivosti (Jacob i Nair, 2018; Jansook i sur., 2018).

Cilj ovog diplomskog rada je razviti analitičku metodu za pouzdano određivanje sadržaja flutikazonpropionata u vodenim otopinama  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD te ispitati učinak tih ciklodekstrina na topljivost spomenutog lijeka, temeljem čega će se utvrditi mogućnost njihove primjene u svrhu unaprjeđenja metode *in vitro* ispitivanja permeacije lijeka.

Specifični ciljevi:

- Ispitivanje ovisnosti topljivosti lijeka o količini ciklodekstrina pri definiranim uvjetima metodom prema Higuchiju i Connorsu (1965).
- Razvoj učinkovite, jednostavne i pouzdane HPLC metode za analizu flutikazonpropionata u vodenim otopinama  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD.
- Procjena prikladnosti  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD kao solubilizatora u *in vitro* ispitivanju permeabilnosti flutikazonpropionata na staničnim modelima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

U ispitivanju fazne topljivosti korišteni su  $\alpha$ -ciklodekstrin ( $\alpha$ -CD; Wacker Chemie AG, Njemačka), hidroksipropil- $\alpha$ -ciklodekstrin (HP- $\alpha$ -CD; Sigma-Aldrich, SAD) te flutikazonpropionat (Carbosynth, UK). U izradi Hankove otopine soli (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) korišteni su natrijev klorid, natrijev hidrogenkarbonat, kalijev klorid, D-glukoza monohidrat (dobavljeni od Kemig, Hrvatska), kalcijev klorid dihidrat (Sigma-Aldrich, Njemačka), kalijev dihidrogenfosfat (Gram Mol, Hrvatska) i natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Hrvatska).

U izradi mobilne faze korišteni su amonijev dihidrogenfosfat ( $\geq 99.0\%$ , NORMAPUR<sup>®</sup> BDH Prolabo<sup>®</sup>, VWR International Ltd, UK), otopina fosforne kiseline koncentracije 0,1 M (Lach-Ner, Češka) te acetonitril (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, SAD) i metanol (J.T.Baker<sup>™</sup>, VWR International Ltd, UK) stupnja čistoće za tekućinsku kromatografiju.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Ispitivanje fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata s $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD

Za potrebe pripreve kompleksa najprije je izrađena Hankova otopina soli koja sadrži ione kalcija (HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  pufer) otapanjem odgovarajućih soli u 250 ml pročišćene vode. Sastav HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  pufera prikazan je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Sastavnice HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  pufera prikazane redoslijedom otapanja i njihove molarne koncentracije u puferskoj otopini

Rb.	Sastavnica	$m / \text{mg}$ u 250 ml pufera	$c / \text{mM}$
1	KCl	100	5,4
2	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	150	0,4
3	$\text{NaHCO}_3$	87,5	4,2
4	NaCl	2000	136,9
5	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	15	0,3
6	D-glukoza $\times \text{H}_2\text{O}$	275	5,6
7	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	195	5,3



Ispitivanje fazne topljivosti provedeno je po uzoru na metodu Higuchija i Connorsa (1965), u HBSS-Ca<sup>2+</sup> puferu pH vrijednosti 7,4. Koncentracijski niz otopina  $\alpha$ -CD ( $M_r= 972,84$  g/mol) i HP- $\alpha$ -CD ( $M_r= 1180,00$  g/mol) pripremljen je vaganjem odgovarajuće mase ciklodekstrina u vijale te dodatkom 10 ml pufera (Tablica 4.). Disperzija ciklodekstrina u puferu je po potrebi sonicirana korištenjem ultrazvučne kupelji (Branson Ultrasonics, SAD) kako bi se osiguralo potpuno otapanje ciklodekstrina. Svakoj od tako pripremljenih otopina dodano je 20 mg flutikazonpropionata te su vijale hermetički zatvorene i ostavljene u tresilici (Biosan, Latvija) pri 37° C i 120 rpm, preko noći.

**Tablica 4.** Priprava koncentracijskog niza otopina ciklodekstrina korištenih u svrhu ispitivanja fazne topljivosti.

m ( $\alpha$ -CD) / g	m (HP- $\alpha$ -CD) / g	Koncentracija ciklodekstrina / mM	Koncentracija $\alpha$ -CD / % (m/V)	Koncentracija HP- $\alpha$ -CD / % (m/V)
0,097	0,118	10	1,0	1,2
0,195	0,236	20	1,9	2,4
0,292	0,354	30	2,9	3,5
0,389	0,472	40	3,9	4,7
0,486	0,590	50	4,9	5,9

Idući dan vizualno je provjerena prisutnost neotopljenog lijeka u pripremljenim suspenzijama te je potom iglom i špricom (Becton, Dickinson & Co., SAD) uzorkovano 2 ml bistrog supernatanta. Uzorak je potom profiltriran kroz filter pora 0,22  $\mu$ m (Chromafil® Xtra PES-22/25, MachereyNagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Postupak uzorkovanja ponavljan je kroz 4 naredna dana u vremenskim intervalima od 24 sata.

### **3.2.2. Ekstrakcija flutikazonpropionata**

Uzorci supernatanta suspenzija iz ispitivanja fazne topljivosti obrađeni su korištenjem dvije metode: ekstrakcijom sušenjem te ekstrakcijom otparavanjem organskog otapala pri sniženom tlaku.

Ekstrakcija sušenjem provedena je na način da je 0,5 ml uzorka otpipetirano na porculansku zdjelicu te preneseno u sušionik (Nüve, Turska) termostatiran pri 105° C. Postupak sušenja trajao je dok sva voda nije bila otparena iz uzorka. Ostatak dobiven sušenjem otopljen je u 0,5 ml metanola.

Ekstrakcija otparavanjem organskog otapala provedena je tako da je 1 ml uzorka supernatanta otpipetiran u odmjernu tikvicu od 10,0 ml i razrijeđen metanolom do oznake. Tako pripravljena otopina prenesena je u tikvicu s okruglim dnom od 100 ml te podvrgnuta otparavanju do suha pod sniženim tlakom na uređaju Büchi Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) pri temperaturi od 50°C i tlaku od 150 mbar. Suhi ostatak dobiven otparavanjem otapala otopljen je u 1 ml metanola.

U oba postupka obrade uzorka krajnja otopina profiltrirana je kroz filter pora 0,22 µm (Chromafil® Xtra PES-22/25, MachereyNagel GmbH & Co. KG, Njemačka) nakon čega je provedena analiza sadržaja flutikazonpropionata u filtriranom uzorku HPLC metodom. Analiza je provedena na kromatografskom sustavu Shimadzu (Japan) s obrnuto faznom kolonom Spherisorb ODS2 dimenzija 4,6 mm × 250 mm te veličina čestica 5 µm (Waters Corporation, SAD). Mobilna faza sastojala se od metanola i acetonitrila pomiješanih u omjeru 60:40 (V/V). Temperatura pećnice bila je podešena na 25° C, eluiranje je bilo izokratno uz stalan protok od 1,0 ml/min, a detekcija je provedena pri valnoj duljini od 236 nm. Analiza jednog uzorka opisanom metodom trajala je 7 minuta.

### **3.2.3. Analiza uzoraka HPLC metodom s mobilnom fazom sastavljenom od fosfatnog pufera pH 3,5 i acetonitrila (40:60, V/V)**

Određivanje sadržaja flutikazonpropionata u uzorcima iz ispitivanja fazne topljivosti provedeno je na kromatografskom sustavu i koloni opisanom u 3.2.2. Mobilna faza korištena u kromatografskoj metodi sastojala se od fosfatnog pufera pH 3,5 i acetonitrila pomiješanih u omjeru 40:60 (V/V).

Pufer je pripremljen otapanjem 1,15 g amonijevog dihidrogen fosfata u 1000 ml pročišćene vode. Potom je uz pomoć *pH*-metra (Mettler Toledo, SAD) korištenjem fosforne kiseline (0,1 M) *pH* podešen na 3,5. Tako pripravljen pufer profiltriran je kroz filter od regenerirane celuloze veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (Sartorius GmbH, Njemačka) pri sniženom tlaku na uređaju Büchi Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Pufer je zatim pomiješan u odgovarajućem omjeru s acetonitrilom. Prije upotrebe mobilna faza podvrgnuta je degaziranju u trajanju od 20 minuta na ultrazvučnoj kupelji (Branson Ultrasonics, SAD). Volumen injektiranja iznosio je 20  $\mu\text{l}$ . Temperatura pećnice (CTO-10Avp, Shimadzu, Japan) bila je 45°C te je analiza provedena uz izokratnu eluciju pri stalnom protoku od 1 ml/min. Detekcija flutikazonpropionata provedena je pri valnoj duljini od 236 nm pomoću UV-Vis detektora (SDP-10Avp, Shimadzu, Japan). Analiza jednog uzorka trajala je 13 minuta. U procesu optimiranja metode promijenjen je udio otapala u sastavu mobilne faze na 50:50 (V/V) te je vrijeme analize produljeno na 15 minuta.

#### **3.2.4. Analiza uzoraka HPLC metodom s mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera (50:15:35, V/V/V)**

Analiza je provedena na kromatografskom sustavu Agilent 1200 Series opremljenim detektorom s nizom dioda (engl. *diode-array* detector, Agilent, SAD) uz kolonu Spherisorb ODS2 dimenzija 4,6 mm  $\times$  250 mm te veličine čestica 5  $\mu\text{m}$  (Waters Corporation, SAD). Mobilna faza u optimiranoj kromatografskoj metodi sastojala se od acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera *pH* 3,5 pomiješanih u omjeru 50:15:35 (V/V/V). Pufer je pripremljen metodom opisanom u poglavlju 3.2.3. te potom pomiješan u odgovarajućem volumnom omjeru s acetonitrilom i metanolom. Prije upotrebe mobilna faza podvrgnuta je degaziranju u trajanju od 20 minuta na ultrazvučnoj kupelji. Volumen injektiranja iznosio je 50  $\mu\text{l}$ . Temperatura pećnice bila je 40°C te je analiza provedena uz izokratnu eluciju pri stalnom protoku od 1 ml/min. Analiza jednog uzorka trajala je 6 minuta.

#### **3.2.5. Validacijski parametri**

HPLC uređaj Shimadzu (Japan), na kojem su provedene analize metodama opisanim u poglavljima 3.2.2. i 3.2.3., povezan je s računalom koji sadrži programski paket LC Solution. U tom programu obrađeni su kromatogrami spomenutih metoda. Integriranje površina pikova iz kromatografske metode opisane u odlomku 3.2.4. obavljeno je unutar programskog paketa

Agilent ChemStation, a rezultati su potom obrađeni unutar Microsoft Excel programa. Postupak validacije za metodu 3.2.4. proveden je na temelju smjernica Međunarodnog vijeća za harmonizaciju (engl. *International Council for Harmonization*, ICH) te su određeni linearnost, granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) metode.

Za određivanje linearnosti metode bilo je potrebno pripremiti niz otopina flutikazonpropionata poznate koncentracije. Standardna otopina lijeka koncentracije 1000 µg/ml (osnovna otopina) pripravljena je vaganjem 50 mg flutikazonpropionata u odmjernu tikvicu A klase od 50,0 ml te otapanjem u metanolu. Radne standardne otopine korištene za izradu baždarnog pravca pripravljene su iz navedene osnovne otopine lijeka pipetiranjem odgovarajućih volumena u tikvice klase A od 25,0 ml te nadopunjavanjem metanolom. Koncentracije pripremljenih radnih standardnih otopina i volumeni osnovne otopine potrebne za izradu radnih standardnih otopina prikazani su u Tablici 5. Nakon izrade, otopine su filtrirane kroz filter pora 0,22 µm (Chromafil® Xtra PES-22/25, MachereyNagel GmbH & Co. KG, Njemačka) te je provedeno injektiranje i kromatografska analiza prema uvjetima opisanim u odlomku 3.2.4. Mjerenje za svaku od radnih standardnih otopina provedeno je u triplikatu.

**Tablica 5.** Radne standardne otopine flutikazonpropionata (FP).

<i>Radna standardna otopina</i>	<i>Volumen osnovne otopine FP / ml (c = 1000 µg/ml)</i>	<i>Volumen radne standardne otopine / ml</i>	<i>Koncentracija radne standardne otopine / µg/ml</i>
<i>STD 1</i>	0,025	25	1
<i>STD 2</i>	0,075	25	3
<i>STD 3</i>	0,125	25	5
<i>STD 4</i>	0,250	25	10
<i>STD 5</i>	0,375	25	15
<i>STD 6</i>	0,500	25	20
<i>STD 7</i>	0,750	25	30

Izračun LOD i LOQ vrijednosti proveden je po uzoru na metodu opisanu u Shrivastava i Gupta (2011), prema formulama (5) i (6).

$$LOD = \frac{3,3 \times S_a}{b} \quad (5)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_a}{b} \quad (6)$$

$S_a$  – standardna devijacija regresijskog pravca;  $b$  – nagib linearnog regresijskog pravca

### **3.2.6. Izrada krivulja fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata i ciklodekstrina**

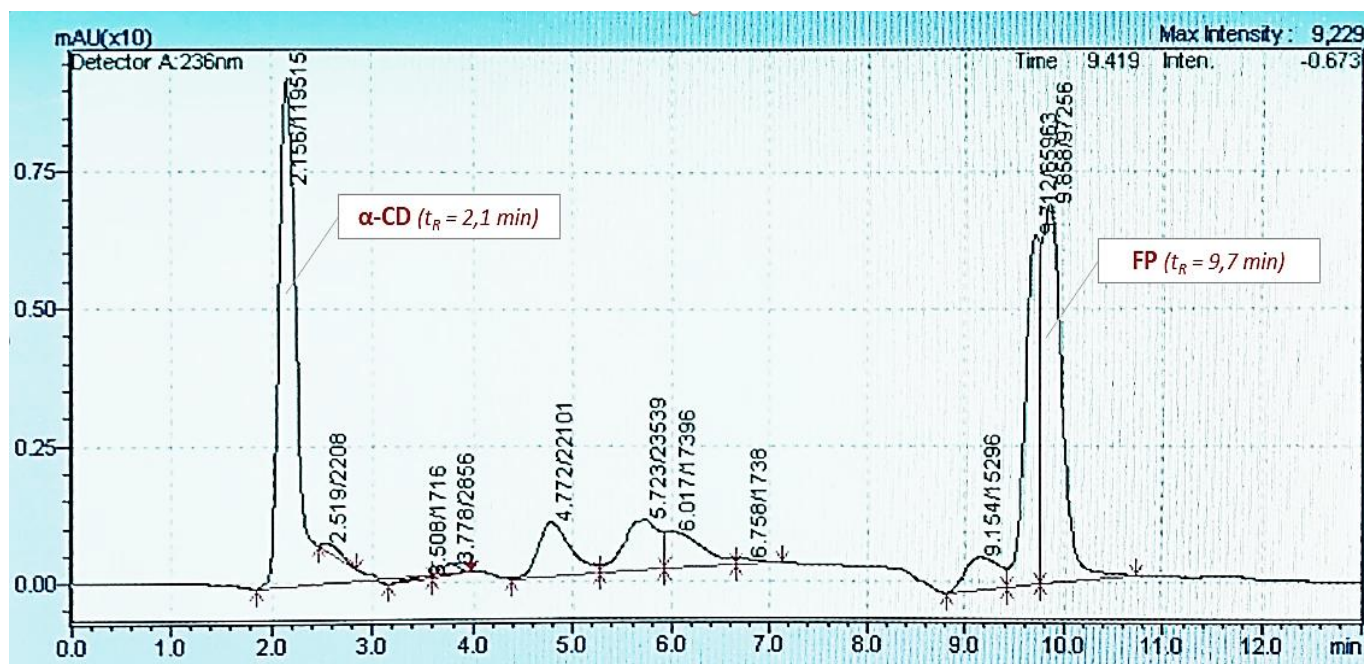
Uzorci koji sadrže rastuće koncentracije  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD i suvišak lijeka analizirani su pomoću optimirane HPLC metode (3.2.4.). Iz koncentracije flutikazonpropionata određene u svakoj od vijala kroz 4 dana provođenja ispitivanja izračunata je prosječna koncentracija lijeka u supernatantu. Prikupljeni rezultati iskorišteni su za izradu krivulja fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata i ispitivanih ciklodekstrina, prema metodi Higuchija i Connorsa (1965). Izoterme topljivosti dobivene su grafičkim prikazom ovisnosti koncentracija flutikazonpropionata u supernatantu o koncentraciji ciklodekstrina. Temeljem izgleda krivulje i količine solubiliziranog flutikazonpropionata pri najvišoj koncentraciji ciklodekstrina (50 mM), procijenjen je učinak ciklodekstrina na topljivost flutikazonpropionata.

Dobiveni rezultati protumačeni su u kontekstu njihove potencijalne primjene u svrhu poboljšanja metode provođenja *in vitro* permeacijskih studija za taj lijek. Podatci o koncentraciji ispitivanih suspenzija flutikazonpropionata i svojstvima te volumenu receptorskog medija koji su bili nužni za postavljanje kriterija ciljne topljivosti u ovom radu preuzeti su iz rada Bobičanec (2020).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Razvoj HPLC metode za analizu flutikazonpropionata u vodenim otopinama $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD

Razvoj analitičke metode započet je opsežnim literaturnim pregledom trenutno dostupnih metoda HPLC analize flutikazonpropionata u vodenim otopinama ciklodekstrina. Utvrđeno je da bi metoda propisana od strane Europske Farmakopeje (8.0) te ona Coutoa i sur. (2014) bile najprikladnije za analizu takvih uzoraka. Drumond i sur. (2014) su uspješno odredili sadržaj flutikazonpropionata u prisutnosti  $\alpha$ -CD korištenjem metode razvijene od strane Coutoa i sur. (2014). Stoga su uvjeti HPLC analize za polazišnu metodu (3.2.3.) objedinili elemente prethodno spomenutih metoda. Analizom uzoraka koji su sadržavali komplekse ciklodekstrina i lijeka dobiveni su kromatogrami (Slika 8.) uz vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) flutikazonpropionata od 9,7 min te ciklodekstrina 2,1 min. Retencijska vremena i identitet pikova potvrđeni su zasebnim analizama lijeka i ciklodekstrina.



**Slika 8.** Kromatogram dobiven HPLC analizom otopine flutikazonpropionata i  $\alpha$ -CD (50 mM) metodom s mobilnom fazom sastavljenom od fosfatnog pufera i acetonitrila (40:60, V/V).

( $\alpha$ -CD – pik  $\alpha$ -ciklodekstrina; FP – pik flutikazonpropionata)

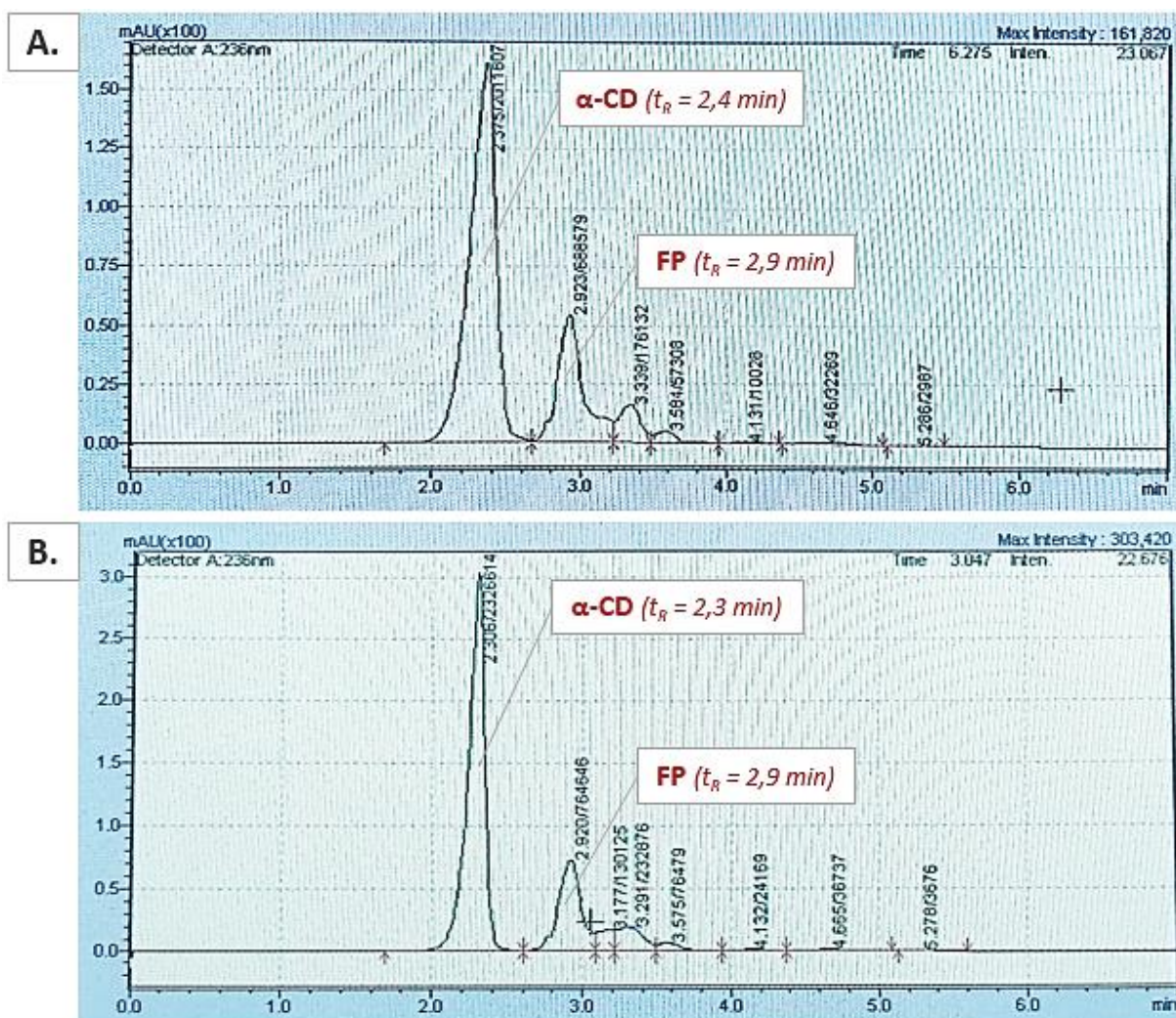
Iz kromatograma (Slika 8.) vidljivo je kako pik flutikazonpropionata nije zadovoljavajućeg oblika (asimetričan i rascjepljen), što onemogućuje pouzdano određivanje sadržaja lijeka. Pikovi ciklodekstrina i lijeka su međusobno izrazito udaljeni što nepotrebno produkuje vrijeme analize i troši veći volumen otapala u mobilnoj fazi. Couto i sur. (2014) koristili su sličnu metodu za analizu kompleksa flutikazonpropionata i  $\gamma$ -CD u prisutnosti polivinilnog alkohola (0,1%, *m/V*). U usporedbi s njihovom metodom, koja je sadržavala pročišćenu vodu i acetonitril u mobilnoj fazi (40:60, *V/V*) te provedena pri temperaturi od 25°C, polazišna metoda iz ovog rada pokazala se 2 puta duljom.

S obzirom na navedene probleme, bilo je potrebno razmotriti druge metode kojima bi se poboljšala učinkovitost analize. Najjednostavnija metoda kojom se u tekućinskoj kromatografiji može utjecati na vrijeme zadržavanja analita jest promjena polarnosti mobilne faze ili njezina *pH*, pod uvjetom da analit ionizira (Watson, 2012). Budući da flutikazonpropionat ne ionizira, promjena *pH* vrijednosti pufera nije bila dobar izbor. Stoga se na parametre analize pokušalo utjecati promjenom sastava organskih otapala mobilne faze. Najprije je povećan udio vodene faze promjenom omjera fosfatnog pufera prema acetonitrilu na 50:50 (*V/V*). Tom promjenom nije postignuto poboljšanje po pitanju glavna dva problema, izgleda pika flutikazonpropionata i duljine trajanja analize. Iz navedenog je zaključeno da bi se smanjenjem polarnosti mobilne faze mogli otkloniti spomenuti problemi.

Smanjenje polarnosti mobilne faze, uz izokratnu eluciju, predstavljalo je problem zbog opasnosti od taloženja ciklodekstrina na koloni prilikom analize (Couto i sur., 2014; McNair i Polite, 2007). U tom smislu, razmotreno je uvođenje postupka obrade uzorka metodom ekstrakcije organskim otapalom. Ekstrakcija tekuće-tekuće odabrana je zbog svoje jednostavnosti, visokog prinosa te niskog utjecaja matrice na uspješnost postupka (Byrro i sur., 2012). Primijenjene su dvije tehnike ekstrakcije flutikazonpropionata te su obje imale jednak krajnji korak, koji je uključivao otapanje suhog ostatka (koji je sadržavao flutikazonpropionat) u organskom otapalu (metanolu). Volumni omjer uzorka uzetog na početku i metanola dodanog za rekonstituciju iznosio je 1:1.

Iz Slike 9. razvidno je kako ciklodekstrini nisu uspješno odijeljeni ovim metodama ekstrakcije budući da obje metode obrade uzorka u svojim kromatogramima sadrže pik ciklodekstrina. Pik flutikazonpropionata (Slika 9.) nije rascijepjen kao u prethodnoj metodi analize (Slika 8.), ali je asimetričan te se rep pika preklapa s nepoznatim onečišćenjem koje izlazi na 3,3 min, što onemogućava pouzdano integriranje. Također, vidljivo je da su pikovi

ciklodekstrina i flutikazonpropionata izrazito blizu jedan drugome (Slika 9.). Iako je razlučivanje između ta dva pika pri koncentraciji ciklodekstrina od 30 mM zadovoljavajuće, pri višim koncentracijama ciklodekstrina postoji mogućnost njihova preklapanja, što se nastoji izbjeći budući da može negativno utjecati na točnost i preciznost određivanja sadržaja lijeka (Watson, 2012).

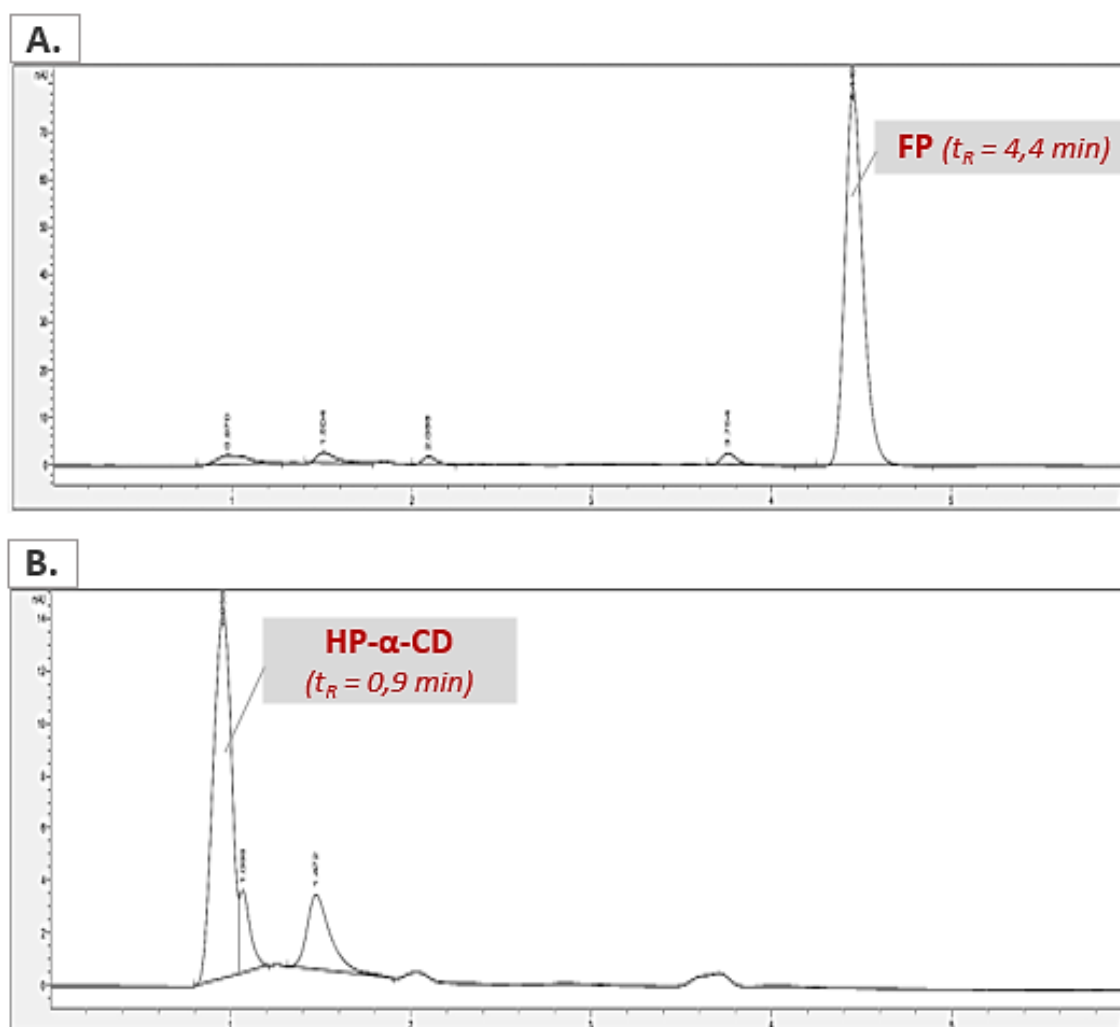


**Slika 9.** Kromatogrami dobiveni HPLC analizom ekstrakata flutikazonpropionata iz vodene otopine koja je sadržavala  $\alpha$ -CD (30 mM) postupcima ekstrakcije: **A.** otparavanjem organskog otapala pod sniženim tlakom i **B.** sušenjem. Analiza je provedena uz mobilnu fazu sastavljenu od acetonitrila i metanola u omjeru 40:60 (V/V).

( $\alpha$ -CD – pik  $\alpha$ -ciklodekstrina; FP – pik flutikazonpropionata)



Primjenom metode ekstrakcije i analize s organskim otapalima u sastavu mobilne faze skraćeno je trajanje analize te je riješen problem rascijepljenosti pika flutikazonpropionata. Iz navedenog je zaključeno kako bi dodatak metanola u mobilnu fazu metode korištene u 3.2.3. mogao polučiti bolji rezultat, stoga je udio acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera (pH=3,5) u mobilnoj fazi promijenjen na 50:15:35 (V/V/V). Omjeri otapala u mobilnoj fazi slični ovim opisani su u HPLC metodi predloženoj od strane Europske Farmakopeje (8.0), uz razliku u većem udjelu metanola prema acetonitrilu (Tablica 2.).



**Slika 10.** Kromatogram dobiven HPLC analizom uzorka **A.** flutikazonpropionata (5 µg/ml) te **B.** HP-α-CD (10 mM) metodom s mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera (50:15:35, V/V/V).

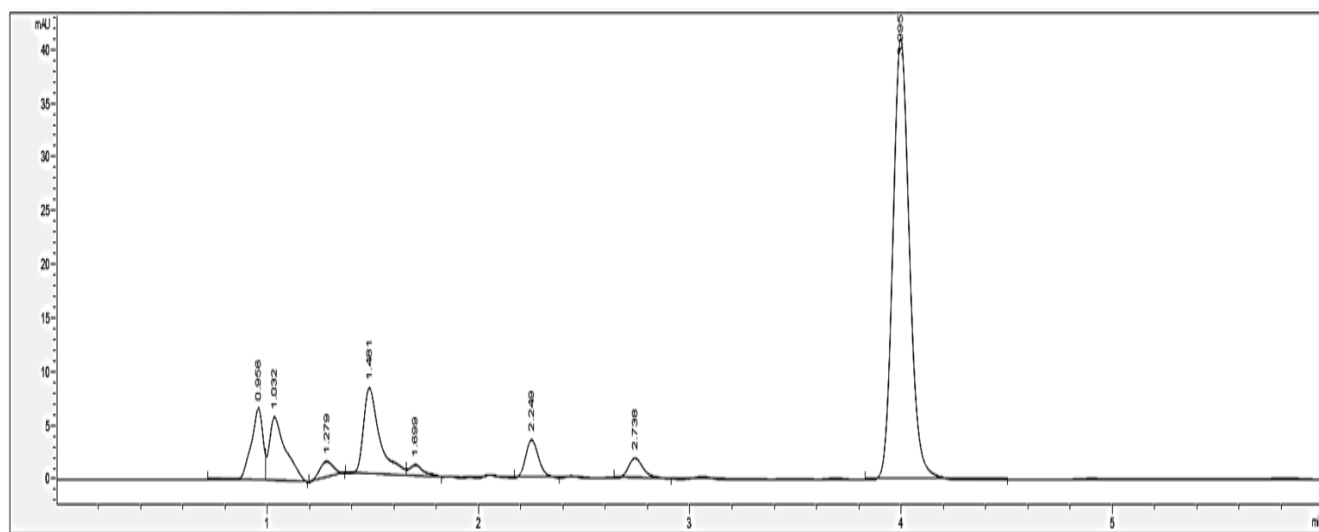
(HP-α-CD – pik hidroksipropil-α-ciklodekstrina; FP – pik flutikazonpropionata)

Kako bi se potvrdili zaključci izneseni iz prethodne dvije metode, najprije su pri uvjetima optimirane metode analizirani zasebni uzorci čistog lijeka te ciklodekstrina (Slika 10.). Temeljem vremena zadržavanja ciklodekstrina (0,9 min) i flutikazonpropionata (4,4 min), zaključeno je da bi metoda mogla biti prikladna za analizu uzoraka koji sadrže obje sastavnice.

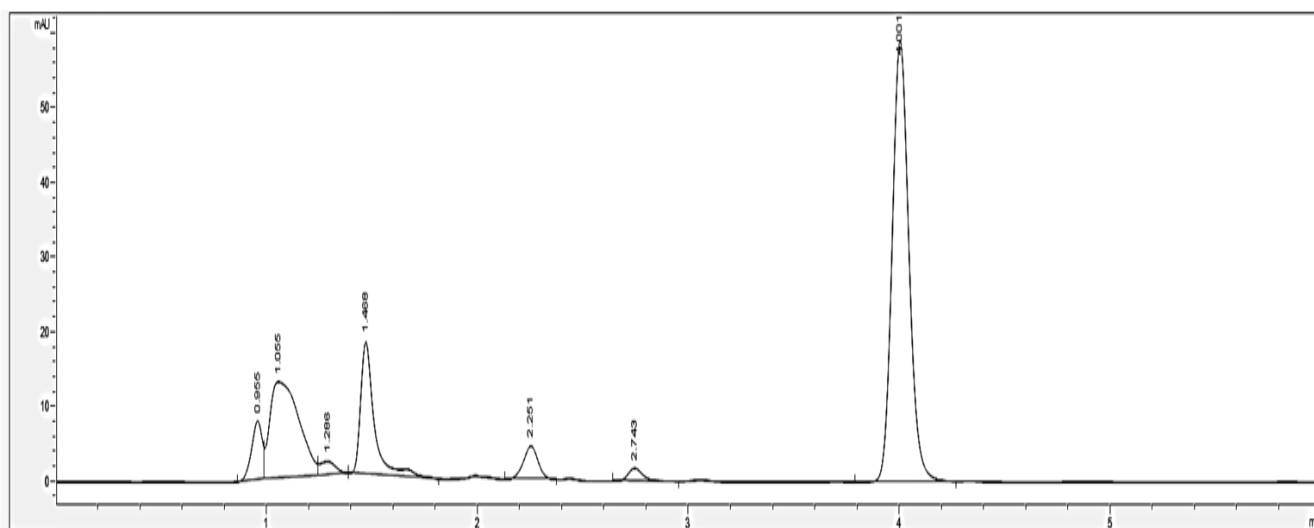
Analizom uzoraka koji sadrže komplekse lijeka i ciklodekstrina (Slike 11. i 12.) zamijećen je pomak u vremenu zadržavanja flutikazonpropionata prema nižim vrijednostima (4,0 min) u usporedbi s vremenom zadržavanja pri analizi čistog lijeka (Slika 10.). U literaturi je opisano da prisutnost ciklodekstrina u mobilnoj fazi rezultira smanjenjem retencijskog vremena analita. Učinak je proporcionalan koncentraciji ciklodekstrina u mobilnoj fazi. Primjerice, kod određivanja sadržaja atenolola korištenjem smjese 50mM otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}$  vrijednosti 6.8 i metanola (92:8, V/V) kao mobilne faze i YMC ODS-AQ C18 kolone, retencijsko vrijeme lijeka se s 23 minute smanjilo na 9 minuta u prisutnosti 10 mM  $\beta\text{CD}$  (Buha i sur., 2012). U takvom je sustavu ravnoteža nastajanja inkluzijskog kompleksa pomaknuta u desno te je inkluzijski kompleks analita dominantno prisutan u mobilnoj fazi. S obzirom da je inkluzijski kompleks značajno hidrofilniji u odnosu na slobodan lijek, slabije se veže za lipofilnu stacionarnu fazu kolone te se posljedično brže eluira (Yang i sur., 2012). No, u ovom ispitivanju su ciklodekstrini bili prisutni samo u uzorku. Njegovim iniciranjem u HPLC sustav dolazi do značajnog razrjeđenja uzorka, što pridonosi disocijaciji kompleksa, koja je dodatno potencirana prisutnošću metanola, za kojeg je poznato da kompetira s molekulama lijeka za interakciju s ciklodekstrinom (Mohseni i Hurtubise, 1990). Zbog svega navedenog, u ovom slučaju su u mobilnoj fazi istovremeno prisutni slobodni lijek i slobodni ciklodekstrini. Kao što je ranije navedeno,  $\alpha\text{-CD}$  i njegovi derivati pokazuju značajan afinitet prema interakciji s linearnim molekulama. Temeljem toga se može pretpostaviti stvaranje inkluzijskih kompleksa ispitivanih ciklodekstrina i C18 lanaca stacionarne faze, čime se smanjuje njena lipofilnost. Uslijed toga je smanjeno vezanje lipofilnog lijeka na stacionarnu fazu te njegovo posljedično brže ispiranje s kolone.

Uz optimiranu metodu, vrijeme zadržavanja flutikazonpropionata (Slike 11. i 12.) je gotovo 2,5 puta kraće u odnosu na polazišnu metodu koja je u sastavu mobilne faze imala samo pufer i acetonitril (Slika 8.). Navedeno je posljedica smanjene interakcije flutikazonpropionata sa stacionarnom fazom uslijed smanjenja polarnosti mobilne faze, što uzrokuje brže eluiranje nepolarnih molekula (Watson, 2012). Obratni učinak na vrijeme zadržavanja lijeka, uslijed

povećanja polarnosti mobilne faze, zamjetan je usporedbom kromatograma optimirane metode (Slike 11. i 12.) s onima dobivenim analizom ekstrakata flutikazonpropionata (Slika 9.).



**Slika 11.** Kromatogram dobiven HPLC analizom otopine flutikazonpropionata i  $\alpha$ -CD (50 mM) metodom s mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera (50:15:35, V/V/V).



**Slika 12.** Kromatogram dobiven HPLC analizom otopine flutikazonpropionata i HP- $\alpha$ -CD (50 mM) metodom s mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera (50:15:35, V/V/V).

Provedene analize upućuju na to da je razvijena učinkovita HPLC metoda za kvalitativno određivanje flutikazonpropionata u prisutnosti  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD. Idući korak predstavlja određivanje validacijskih parametara metode, kako bi se mogao utvrditi njezin potencijal za pouzdanu kvantitativnu analizu lijeka u uzorcima ispitivanja fazne topljivosti.

## 4.2. Validacija analitičke metode

Određivanje validacijskih parametara metode razvijene u ovom radu usklađeno je s ICH smjernicama. U postupku validacije, ispitane su sljedeće značajke metode: linearnost, granica dokazivanja te granica određivanja.

Linearnost analitičke metode definira se kao sposobnost metode da, unutar određenog intervala, daje rezultat koji je direktno proporcionalan koncentraciji analita u uzorku ([www.ich.org](http://www.ich.org)). Grafičkim prikazom ovisnosti izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita u uzorku dobiva se kalibracijska krivulja, definirana pripadajućom jednadžbom pravca oblika  $y=ax + b$  (Shrivastava i Gupta, 2011; Nigović i sur., 2014). Za pouzdano određivanje linearnosti metode potrebno je provesti analizu na barem 5 različitih koncentracija analita unutar radnog područja metode ([www.ich.org](http://www.ich.org)). U ovom radu linearnost je ispitana koristeći 7 radnih standardnih otopina flutikazonpropionata, unutar raspona koncentracija od 1 do 30  $\mu\text{g/ml}$ . Budući da je u drugim radovima (Tokumura i sur., 2014a) naglašen problem adsorpcije flutikazonpropionata na laboratorijski pribor, analizirane otopine sadržavale su isključivo metanol u funkciji otapala, čime se spriječila adsorpcija lijeka te osigurala pouzdanost dobivenih rezultata. U Tablici 6. prikazana je srednja vrijednost površine pika za svaku od analiziranih otopina, zajedno s pripadajućom standardnom (SD) i relativnom standardnom devijacijom (RSD). Jednadžba linearnog regresijskog pravca glasila je  $y=114x-28,51$ , a vrijednost koeficijenta korelacije iznosila je 0,9998, temeljem čega se s pouzdanošću može potvrditi linearnost metode.

**Tablica 6.** Validacijski parametri razvijene metode.

<b>LINEARNOST</b>				
<i>Radna standardna otopina</i>	<i>Koncentracija standarda / <math>\mu\text{g/ml}</math></i>	<i>Srednja vrijednost površine pika (n=3)</i>	<i>SD (n=3)</i>	<i>RSD / % (n=3)</i>
<b>STD 1</b>	1	77,03	0,15	0,20
<b>STD 2</b>	3	296,07	0,25	0,09
<b>STD 3</b>	5	554,10	1,99	0,36
<b>STD 4</b>	10	1114,63	0,35	0,03
<b>STD 5</b>	15	1726,23	0,32	0,02
<b>STD 6</b>	20	2218,10	2,10	0,09
<b>STD 7</b>	30	3390,23	4,54	0,13
<i>Jednadžba pravca:</i>			$y = 114x - 28,51$	
<i>Koeficijent korelacije (r):</i>			0,9998	
<b>LOD</b>			<b>LOQ</b>	
0,24 $\mu\text{g/ml}$			0,74 $\mu\text{g/ml}$	

Granicu dokazivanja analitičke metode predstavlja najniža koncentracija analita koja može biti dokazana, ali ne nužno i određena, pri propisanim uvjetima analize. Za razliku od toga, granica određivanja je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može odrediti uz prihvatljiv stupanj preciznosti i točnosti (Watson, 2012; Nigović i sur., 2014). Utvrđivanje ovih parametara važno je za metode određivanja sadržaja u kojima je analit prisutan u iznimno niskim koncentracijama u uzorku ([www.ich.org](http://www.ich.org)). Postoji nekoliko različitih načina određivanja granice dokazivanja i određivanja (Shrivastava i Gupta, 2011). U ovom radu određene su preko standardne devijacije i nagiba linearnog regresijskog pravca, korištenjem formula (5) i (6), te su njihove vrijednosti prikazane u Tablici 6. S obzirom na izmjerene koncentracije flutikazonpropionata u vodenim otopinama  $\alpha$ -CD prijavljene u drugim radovima (Tokumura i sur., 2015; Drumond i sur., 2014), ustanovljeno je da su LOD i LOQ vrijednosti metode razvijene u ovom radu dostatne za pouzdanu kvantitativnu analizu takvih uzoraka.

### 4.3. Ispitivanje utjecaja $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD na topljivost flutikazonpropionata

Cilj ispitivanja fazne topljivosti bio je utvrditi učinak  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD na topljivost flutikazonpropionata u HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  puferu kako bi se ocijenila mogućnost njihove primjene u svrhu unaprjeđenja metode *in vitro* ispitivanja permeacije na staničnim modelima. *In vitro* ispitivanje provodi se pri fiziološkom  $\text{pH}$  i temperaturi od  $37^\circ\text{C}$  uz definirane volumene donorskog i receptorskog medija, stoga je solubilizacijski učinak ciklodekstrina promatran u kontekstu uvjeta te aparature korištene u radu Bobičanec (2020).

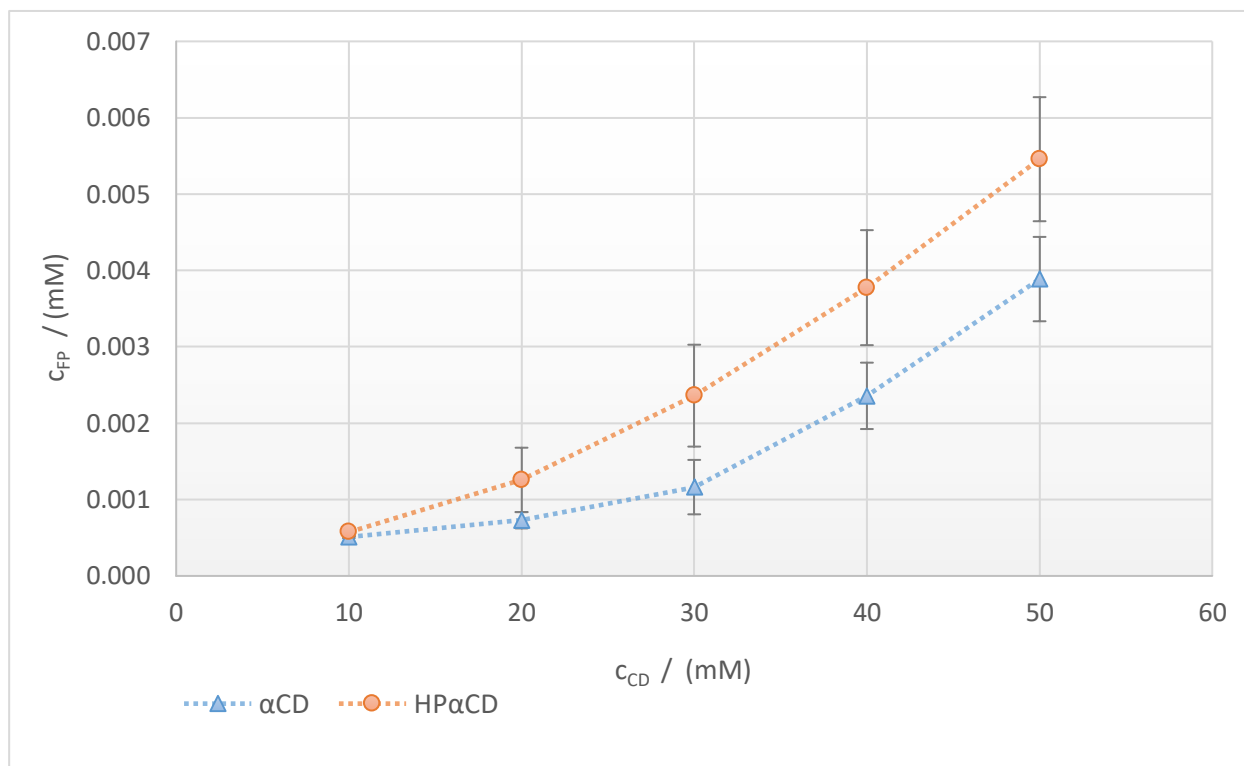
Pregledom literature utvrđeno je nekoliko primjera uspješne pripreve kompleksa između  $\alpha$ -CD i flutikazonpropionata (Tokumura i sur., 2015; Drumond i sur., 2014), što znači da postoji kompatibilnost u geometrijskom smislu između molekule lijeka i tog ciklodekstrina. Flutikazonpropionat ne ionizira pri fiziološkom  $\text{pH}$ . Navedeno potvrđuje i rad Tokumure i sur. (2014a) koji su zaključili da  $\text{pH}$  vrijednost otopine ( $< 8$ ) pri  $37^\circ\text{C}$  ne mijenja intrinzičnu topljivost lijeka od  $0,1 \mu\text{g/ml}$ . Također, do sada nisu zabilježeni primjeri tvorbe vodotopljivih kompleksa s ionima metala za taj lijek, što znači da ioni  $\text{Ca}^{2+}$  podrijetlom iz pufera (Tablica 3.) ne utječu na intrinzičnu topljivost lijeka.

Koncentracijski raspon ciklodekstrina korišten u ispitivanju (Tablica 4.), određen je na osnovu podataka o citotoksičnosti ispitivanih ciklodekstrina na Calu-3 staničnoj liniji. HP- $\alpha$ -CD se pokazao sigurnim u koncentracijama 2-50 mM, dok je  $\alpha$ -CD tek pri koncentraciji od 50 mM pokazao znakove toksičnosti (Matilainen i sur., 2008).

Ispitivanja fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata i  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD provedena su po uzoru na metodu Higuchija i Connorsa (1965). Metoda se zasniva na praćenju promjene koncentracije teško topljivog lijeka u supernatantu suspenzija koje sadrže lijek i rastuću koncentraciju solubilizatora, ciklodekstrina. Izoterme topljivosti kompleksa ispitivanih u ovom radu prikazani su na Slici 13.

Iz dobivenih rezultata razvidno je kako koncentracija lijeka u otopini raste s porastom koncentracije ciklodekstrina, što znači da su oba ciklodekstrina povećala topljivost flutikazonpropionata. Krivulje topljivosti za oba ciklodekstrina odstupaju od linearnog trenda te se karakterizacijom izoterme prema Higuchiju i Connorsu (1965) svrstavaju u  $A_P$ - tip izoterme (Slika 4.). Također, vidljivo je da HP- $\alpha$ -CD ima bolji solubilizacijski učinak u odnosu

na  $\alpha$ -CD. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji ciklodekstrina, HP- $\alpha$ -CD povećao je topljivost lijeka za 27,3 puta u odnosu na njegovu intrinzičnu topljivost.



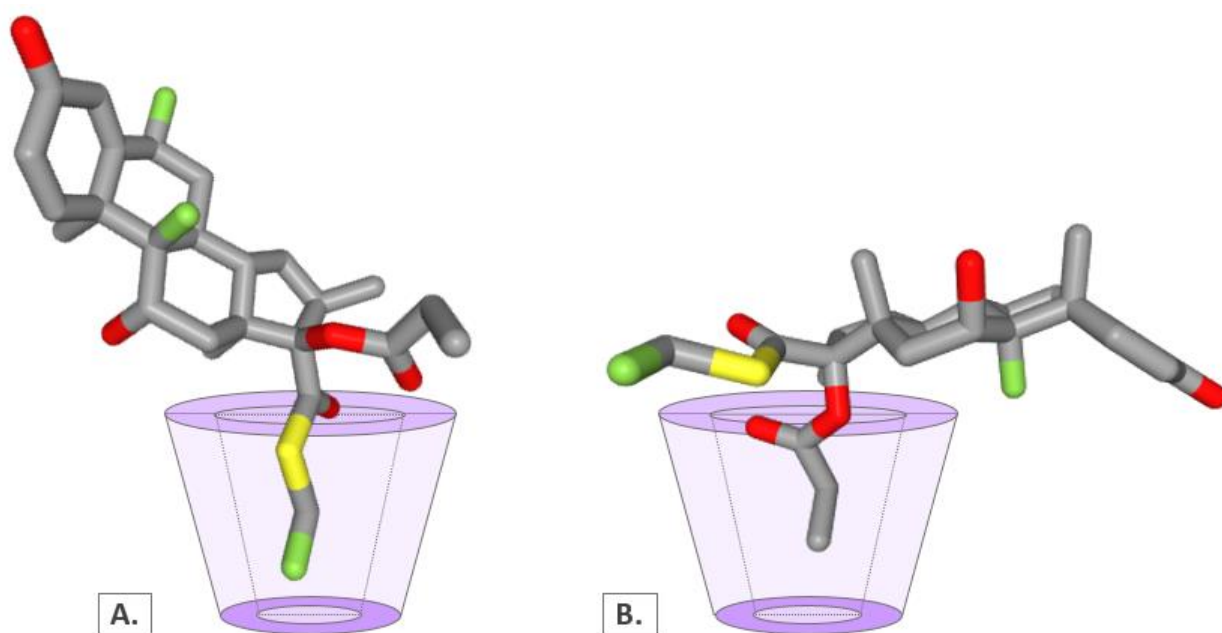
**Slika 13.** Izoterme topljivosti kompleksa flutikazonpropionata s  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD u vodenoj otopini HBSS- $Ca^{2+}$  pufera (pH=7,4) pri temperaturi od 37°C. Prikazane su srednje vrijednosti koncentracija flutikazonpropionata u pojedinoj vijali, izmjerene tijekom višednevnog provođenja ispitivanja, zajedno s pripadajućom standardnom devijacijom (n=2).

Solubilizacijski učinak  $\alpha$ -CD pri koncentraciji od 50 mM bio je nešto niži, uz izmjerenu količinu lijeka od 0,0038 mM, što predstavlja povećanje topljivosti od 19,5 puta naspram intrinzične topljivosti lijeka. Dobiveni rezultat u skladu je s onim zabilježenim od strane Tokumure i sur. (2015), koji su pri koncentraciji  $\alpha$ -CD od 50 mM izmjerili 0,0057 mM flutikazonpropionata u supernatantu. Usto, u njihovom radu je također dobivena izoterma topljivosti kompleksa  $\alpha$ -CD i flutikazonpropionata A<sub>p</sub>- tipa.

Krivulje topljivosti  $A_p$  tipa, dobivene ispitivanjima fazne topljivosti u ovom radu (Slika 13.), mogu upućivati na to da je reakcija formiranja kompleksa prvog reda s obzirom na supstrat, te višeg reda s obzirom na ciklodekstrin (Jansook i sur., 2018). Također, pozitivno odstupanje od linearnosti može biti posljedica i formiranja agregata kompleksa i/ili ciklodekstrina koji imaju sposobnost dodatnog uklapanja molekula lijeka neinkluzijskim mehanizmima (Loftsson i sur., 2002). S obzirom na volumen centralne šupljine  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD te strukturu flutikazonpropionata, formiranje kompleksa višeg reda je malo vjerojatno. Stoga je, solubilizacijski učinak  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD najvjerojatnije posljedica uklapanja lijeka u agregate kompleksa lijek/ciklodekstrin i/ili samih ciklodekstrina. Navedeno podupire i činjenica da je kritična koncentracija pri kojoj se u vodenoj otopini  $\alpha$ -CD počinju formirati agregati  $1,19 \pm 0,17\%$  ( $m/V$ ) (Saokham i sur., 2016), što je prema Tablici 4. slučaj za gotovo sve otopine  $\alpha$ -CD korištene u ovom radu.

Uvid u mehanizam nastanka inkluzijskog kompleksa daju primjeri pozitivnog solubilizacijskog učinka  $\alpha$ -CD na drugim lijekovima steroidne strukture srodne onoj flutikazonpropionata. Tako je povećanje topljivosti beklometazondipropionata, koji se od flutikazonpropionata neznatno razlikuje, objašnjeno uklapanjem propionatnih skupina u centralnu šupljinu  $\alpha$ -CD (Malaekheh-Nikoulei i sur., 2012). Usto, aromatski prsten A u steroidnoj strukturi flutikazonpropionata ne može stati u centralnu šupljinu  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD, stoga bi nastanak inkluzijskog kompleksa bio moguć jedino uklapanjem fluorometil-tioesterske i/ili propionatne skupine. Pretpostavljeni model inkluzijskog kompleksa između  $\alpha$ -CD i HP- $\alpha$ -CD te flutikazonpropionata prikazan je na Slici 14., te bi za potvrdu navedenog trebalo provesti dodatna spektroskopska ispitivanja s ciljem njegove strukturne karakterizacije.





**Slika 14.** Teorijski model inkluzijskog kompleksa flutikazonpropionata s  $\alpha$ -CD ili HP- $\alpha$ -CD uklapanjem **A.** fluorometil-tioesterske skupine i/ili **B.** propionatne skupine lijeka u hidrofobnu centralnu šupljinu ciklodekstrina.

(3D struktura flutikazonpropionata preuzeta s [www.pubchem.org](http://www.pubchem.org))

Svrha provedenih ispitivanja bila je utvrditi može li se topljivost lijeka dovoljno povećati za stvaranje uvjeta osigurane topljivosti u receptorskom mediju ograničena volumena. To bi značilo da, za slučaj potpune permeacije lijeka, ciklodekstrin mora moći osigurati topljivost lijeka od 311,3  $\mu\text{g/ml}$ . Topljivost lijeka pri najvećoj mogućoj koncentraciji  $\alpha$ -CD koja je još uvijek sigurna za primjenu na Calu-3 stanicama (40 mM) iznosila je  $1,18 \pm 0,22 \mu\text{g/ml}$ , a za HP- $\alpha$ -CD (50 mM)  $2,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ . Iz navedenog se može zaključiti kako odgovarajuća topljivost lijeka za ispitanu namjenu nije postignuta. Daljnja istraživanja trebala bi biti usmjerena ka proučavanju interakcija drugih derivata ciklodekstrina i flutikazonpropionata koji bi mogli imati bolji solubilizacijski učinak.

## 5. ZAKLJUČCI

- U ovom radu uspješno je razvijena HPLC metoda za kvantitativnu analizu sadržaja flutikazonpropionata u prisutnosti  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD.
- Metoda s mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila, metanola te fosfatnog pufera ( $pH=3,5$ ) u omjeru 50:15:35 (V/V/V) omogućila je brzu analizu uzoraka (6 minuta) uz adekvatan izgled pika flutikazonpropionata, iz kojeg se pouzdano može odrediti koncentracija lijeka.
- Linearnost razvijene metode dokazana je u području koncentracija lijeka od 1 do 30  $\mu\text{g/ml}$  uz jednadžbu pravca  $y=114x-28,51$  te koeficijent korelacije 0,9998. LOD metode iznosio je 0,24  $\mu\text{g/ml}$ , a LOQ 0,74  $\mu\text{g/ml}$ .
- Primjenom  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD, uspješno je povećana topljivost flutikazonpropionata za 19,5, odnosno 27,3 puta u odnosu na intrinzičnu topljivost lijeka.
- Ispitivanjem fazne topljivosti flutikazonpropionata u vodenim otopinama  $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD pri definiranim uvjetima  $pH=7,4$  i temperature  $37^{\circ}\text{C}$ , dobivene su izoterme topljivosti  $A_P$ - tipa za obje vrste ispitivanih ciklodekstrina.
- Temeljem izgleda krivulje topljivosti te podataka o strukturnim značajkama korištenih ciklodekstrina i lijeka, zaključeno je da su osim inkluzijskih, prisutni i neinkluzijski mehanizmi solubilizacije lijeka uslijed njegova uklapanja u micelle nastale agregacijom kompleksa i/ili samih ciklodekstrina.
- $\alpha$ -CD te HP- $\alpha$ -CD nisu povećali topljivost flutikazonpropionata u dovoljnoj mjeri za primjenu u svrhu unaprjeđenja metode *in vitro* ispitivanja permeacije lijeka.

## 6. LITERATURA

- Barišić A. Primjenjivost pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera s flutikazonpropionatom za nazalnu primjenu. Diplomski rad, 2019.
- Bobičanec S. Biofarmaceutska karakterizacija in situ gelirajućeg sustava s flutikazonpropionatom na Calu-3 epitelnom staničnom modelu. Diplomski rad, 2020.
- Borchard G, Cassara ML, Roemele PEH, Florea BI, Junginger HE. Transport and Local Metabolism of Budesonide and Fluticasone Propionate in a Human Bronchial Epithelial Cell Line (Calu-3). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 91, 1561–1567.
- Bruns CJ. Exploring and Exploiting the Symmetry-Breaking Effect of Cyclodextrins in Mechanomolecules. *Symmetry*, 11(10), 1249, 2019.
- Buha SM, Baxi GA, Shrivastav PS. Liquid Chromatography Study on Atenolol- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex. *ISRN Analytical Chemistry*, 2012, 1-8.
- Byrro RMD, César IC, Cardoso FFSS, Mundim IM, Teixeira LS, Bonfim RR, Gomes SA, Pianetti GA. A rapid and sensitive HPLC–APCI-MS/MS method determination of fluticasone in human plasma: Application for a bioequivalency study in nasal spray formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 61, 38–43.
- Cai YY, Yap CW, Wang Z, Ho PC, Chan SY, Ng KY, Ge ZG, Lin HS. Solubilization of vorinostat by cyclodextrins. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2010, 35(5), 521–526.
- Couto ARS, Cardoso DE, Cabral-Marques HM. Validation of an HPLC Analytical Method for the Quantitative/Qualitative Determination of Fluticasone Propionate in Inhalation Particles on Several Matrices. *Scientia Pharmaceutica*, 2014, 82(4), 787–797.

- Crini G, Fourmentin S, Fenyvesi É, Torri G, Fourmentin, Morin-Crini N. Fundamentals and Applications of Cyclodextrins. U: Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis. Fourmentin S, Crini G, urednici, *Springer Nature*, Cham, 2018, str. 1-57.
- Dai J, Liang X, Su W. Improvement on solubility of fluticasone propionate with cyclodextrins by mechanochemical activation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 25(2), 799-806.
- Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3(12), 1023–1035.
- Daley-Yates PT, Baker RC. Systemic bioavailability of fluticasone propionate administered as nasal drops and aqueous nasal spray formulations. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 51, 103–105.
- Di Donato C, Lavorgna M, Fattorusso R, Isernia C, Isidori M, Malgieri G, Piscitelli G, Russo C, Russo L, Iacovino R. Alpha- and Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes with 5-Fluorouracil: Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation. *Molecules*, 2016, 21(12), 1644.
- Díaz-Tomé V, Luaces-Rodríguez A, Silva-Rodríguez J, Blanco-Dorado S, García-Quintanilla L, Llovo-Taboada J, Blanco-Mendez J, García-Otero X, Varela-Fernandez R, Herranz M, Gil-Martínez M, Lamas MJ, Gonzalez-Barcia M, Otero-Espinar FJ, Fernandez-Ferreiro A. Ophthalmic Econazole Hydrogels for the Treatment of Fungal Keratitis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 107(5), 1342–1351.
- Dogbe MG, Mafilaza AY, Eleutério CV, Cabral-Marques H, Simões S, Gaspar MM. Pharmaceutical Benefits of Fluticasone Propionate Association to Delivery Systems: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*, 2019, 11(10), 521.

- Drumond N, Couto AS, Ana Costa A, Cabral-Marques H. Study of aerodynamic and release properties of inhaled particles containing cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2014, 80(1-2), 25–30.
- Duchêne D. Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes. U: Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine - Current and Future Industrial Applications. Bilensoy E, urednik, *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken NJ, 2011, str. 3-18.
- European Medicines Agency (EMA). Fluticasone propionate, 01/2012:1750. U: European Pharmacopoeia (8.0), Council of Europe, Strasbourg, 2013, str. 2276-2278.
- Fluticasone propionate, <https://www.drugbank.ca> - pristupljeno 20.8.2020.
- Fluticasone Propionate, [www.pubchem.org](http://www.pubchem.org) - pristupljeno 17.8.2020.
- Frömring KH, Szejtli J. Chapter 1: Cyclodextrins. U: Cyclodextrins in pharmacy, *Springer Science*, Dordrecht, 1994.
- Haghi M, Traini D, Postma DS, Bebawy M, young PM. Fluticasone uptake across Calu-3 cells is mediated by salmeterol when deposited as a combination powder inhaler. *Respirology*, 2013, 18, 1197–1201.
- Higuchi T, Connors KA. Phase Solubility Techniques. *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation*, 1965, 4, 117-212.
- Jacob S, Nair AB. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. *Drug Development Research*, 2018, 79(5), 201–217.
- Jansook P, Prajapati M, Pruksakorn P, Loftsson T. Antifungal Activity of Econazole Nitrate/Cyclodextrin Complex: Effect of pH and Formation of Complex Aggregates. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 574, 118896.
- Jansook P, Ogawa, N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 535(1-2), 272–284.

- Jansook P, Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins as solubilizers: Formation of complex aggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 99(2), 719–729.
- Jóhannsdóttir S, Jansook P, Stefánsson E, Loftsson T. Development of a cyclodextrin-based aqueous cyclosporin A eye drop formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 493(1-2), 86–95.
- Jug M. Cyclodextrin-based drug delivery systems. U: *Nanomaterials for Clinical Applications*, Elsevier, Amsterdam, 2020, str. 29-69.
- Jug M, Bećirević-Laćan M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals. *Med Sci*, 2008, 499, 9-26.
- Kumar V, Bariwal J, Narang AS, Tso J, Cheong J, Mahato RI. Functional similarity of modified cascade impactor to deposit drug particles on cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 583, 119404.
- Landy D. Measuring Binding Constants of Cyclodextrin Inclusion Compounds. U: *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*. Fourmentin S, Crini G, urednici, Springer Nature, Cham, 2018, str. 223-255.
- Li YNB, Tattam BN a, Brown KF, Seale JP. A sensitive method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 16(3), 447–452.
- Loftsson T, Magnúsdóttir A, Masson M, Sigurjonsdóttir JF. Self-Association and Cyclodextrin Solubilization of Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 91(11), 2307–2316.
- Loftsson T, Brewster M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010, 62(11), 1607–1621.

- Loftsson T, Brewster, ME. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101(9), 3019–3032.
- Malaekheh-Nikouei B, Nassirli H, Davies N. Enhancement of cyclosporine aqueous solubility using  $\alpha$ - and hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin mixtures. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2007, 59(3-4), 245–250.
- Malaekheh-Nikouei B, Tabassi SAS, Gerayeli G, Mehran Arab Salmani MA, Gholamzadeh A. The effect of cyclodextrin mixtures on aqueous solubility of beclomethasone dipropionate. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2011, 72(3-4), 383–387.
- Mascher H, Zech K, Mascher D. Sensitive simultaneous determination of ciclesonide, ciclesonide-M1-metabolite and fluticasone propionate in human serum by HPLC–MS/MS with APPI. *Journal of Chromatography B*, 2008, 869(1-2), 84–92.
- Mathiron D, Iori R, Pilard S, Rajan TS, Landy D, Mazzon E, Rollin P, Djedaini-Pilard F. A Combined Approach of NMR and Mass Spectrometry Techniques Applied to the  $\alpha$ -Cyclodextrin/Moringin Complex for a Novel Bioactive Formulation. *Molecules*, 2018, 23(7), 1714.
- Matilainen L, Jarvinen K, Toropainen T, Nasi E, Auriola S, Järvinen T, Jarho P. In vitro evaluation of the effect of cyclodextrin complexation on pulmonary deposition of a peptide, cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 318(1-2), 41–48.
- Matilainen L, Toropainen T, Vihola H, Hirvonen J, Järvinen T, Jarho P, Järvinen K. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *Journal of Controlled Release*, 2008, 126(1), 10–16.

- McNair H, Polite LN. Troubleshooting in High Performance Liquid Chromatography. U: HPLC method development for pharmaceuticals. Ahuja S, Rasmussen H, urednici, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2007, 459-477.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. *Pharmaceutical Press*, London, 2011, str. 1057-1058.
- Mohseni RM, Hurtubise RJ. Retention Characteristics of Several Compound Classes in Reversed-phase Liquid Chromatography with  $\beta$ -cyclodextrin as a Mobile Phase Modifier. *Journal of Chromatography*, 1990, 499, 395-410.
- Muankaew C, Loftsson T. Cyclodextrin-Based Formulations: A Non-Invasive Platform for Targeted Drug Delivery. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2017, 122(1), 46–55.
- Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 101, 238–250.
- Murnane D, Martin G, Marriott C. Validation of a reverse-phase high performance liquid chromatographic method for concurrent assay of a weak base (salmeterol xinafoate) and a pharmacologically active steroid (fluticasone propionate). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 40(5), 1149–1154.
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Validacija analitičkog postupka. U: *Analitika lijekova – Praktikum*, 2014, 135-139.
- Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršond V, Safundžić Kučuk M, Pepić I, Hafner A. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 563, 445-456.
- Samir A, Hesham Salem, Abdelkawy M. Simultaneous Determination of Salmeterol Xinafoate and Fluticasone Propionate in Bulk Powder and Seritide Diskus using High



- Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Method. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 2012, 3(8).
- Saokham P, Couto AS, Ryzhakov A, Loftsson T. The self-assemble of natural cyclodextrins in aqueous solutions: Application of miniature permeation studies for critical aggregation concentration (cac) determinations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 505, 187-193.
- Saokham P, Muankaew C, Jansook P, Loftsson T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules*, 2018, 23(5), 1161.
- Sharma N, Baldi A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Delivery*, 2014, 23(3), 729–747.
- Shrivastava A, Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2011, 2(1), 21.
- Tao-Tao F, Zhao-Qing C, Yun Z, Wei-Ya C, Chun-Yu L, Ying Z, Fei-Fei Y, Yong-Hong L. Fluticasone propionate nanosuspensions for sustained nebulization delivery: An in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 572, 118839.
- Thakral NK, Ray AR, Jacobsen J, Bar-Shalom D, Eriksson AH, Majmudar DK. Colon targeting of fluticasone propionate inclusion complex: a novel approach in inflammatory bowel disease. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2012, 75(1-2), 175–184.
- Tokumura T, Miyazaki E, Isaka H, Kaneko N, Kanou M. Solubility of fluticasone propionate in aqueous solutions measured by a method avoiding its adsorption to experimental tools. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS)*. 2014a, 4(4), 19-24.

- Tokumura T, Kanou M, Miyazaki E, Kaneko N, Isaka H. Degradation rate of fluticasone propionate in an alkaline solution of 0.1N NaOH : methanol = 1 : 1. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS)*. 2014b, 4(5), 1-3.
- Tokumura T, Isaka H, Kanou M, Miyazaki E, Kaneko N, Kurita T. An inclusion complex of fluticasone propionate with  $\gamma$ -cyclodextrin in aqueous solution and in a solid state. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2015, 26, 24–27.
- Tokumura T, Yoshida N, Mori-Yasumoto K, Shiota O, Kurita T. Degradation rates and products of fluticasone propionate in alkaline solutions. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 7(5), 297–302.
- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005, [www.ich.org](http://www.ich.org) – pristupljeno 3.9.2020.
- Valle ED. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 2004, 39(9), 1033–1046.
- Yang H, Parniak MA, Hillier SL, Rohan LC. A thermodynamic study of the cyclodextrin-UC781 inclusion complex using a HPLC method. *Journal of Inclusion Phenomena*, 2012, 72, 459-465.
- Watson D. Control of the quality of analytical methods. U: *Pharmaceutical Analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, 3rd edition. Watson D, Elsevier, London, 2012, str. 1-25.
- Watson D. High-performance liquid chromatography. U: *Pharmaceutical Analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, 3rd edition. Watson D, Elsevier, London, 2012, str. 301-357.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Loša topljivost flutikazonpropionata u vodi predstavlja veliki izazov u razvoju i karakterizaciji novih formulacija lijeka. U *in vitro* ispitivanjima oslobađanja i permeabilnosti nužno je uspostaviti uvjete osigurane topljivosti. U odnosu na organska suotapala i površinski aktivne tvari, ciklodekstrini pružaju prednost izrazite biokompatibilnosti sa staničnim modelima, što ih čini prikladnim solubilizatorima za tu namjenu.

Cilj ovog rada bio je razviti metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za pouzdano određivanje sadržaja flutikazonpropionata u vodenim otopinama  $\alpha$ - te hidrokispropil- $\alpha$ -ciklodekstrina, te potom ispitati učinak ciklodekstrina na povećanje topljivosti lijeka pri uvjetima definiranim potrebama provođenja ispitivanja permeabilnosti na Calu-3 stanicama.

U ovom diplomskom radu uspješno je razvijena metoda obrnutofazne razdjelne kromatografije za kvantitativnu analizu flutikazonpropionata. Analiza je provedena uz izokratnu eluciju pri stalnom omjeru acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera pH 3,5 u mobilnoj fazi (50:15:35, V/V/V). Volumen injektiranja bio je 50  $\mu$ l, temperatura kolone 40°C, a brzina protoka mobilne faze iznosila je 1 ml/min. Pri navedenim uvjetima, područje linearnosti metode potvrđeno je za koncentracijski raspon lijeka od 1  $\mu$ g/ml do 30  $\mu$ g/ml (koeficijent korelacije 0,9998). Granice dokazivanja i određivanja metode iznosile su 0,24  $\mu$ g/ml te 0,74  $\mu$ g/ml. Uz ovu metodu uspješno su analizirani uzorci ispitivanja fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata s  $\alpha$ - te hidrokispropil- $\alpha$ -ciklodekstrinom provedenih pri 37°C u Hankovoj otopini soli koja sadrži ione kalcija (pH 7,4). Primjenom  $\alpha$ - te hidrokispropil- $\alpha$ -ciklodekstrina pri koncentracijama od 50 mM, povećana je topljivost flutikazonpropionata za 19,5, odnosno 27,3 puta u odnosu na intrinzičnu topljivost lijeka. Uzevši u obzir strukturne značajke ciklodekstrina i lijeka te profil izotermi topljivosti, zaključeno je da je povećanje topljivosti flutikazonpropionata posljedica uklapanja lijeka u agregate kompleksa lijek/ciklodekstrin i/ili samih ciklodekstrina neinkluzijskim mehanizmima.

Temeljem dobivenih rezultata, procijenjeno je kako solubilizacijski učinak  $\alpha$ - te hidrokispropil- $\alpha$ -ciklodekstrina nije dostatan za primjenu u *in vitro* ispitivanju permeabilnosti flutikazonpropionata na staničnim modelima. Rezultati ovog rada mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja s drugim vrstama ciklodekstrina koji bi mogli imati bolji solubilizacijski učinak na flutikazonpropionat.

Low aqueous solubility of fluticasone propionate poses a great challenge in new formulation development and characterization. When conducting *in vitro* dissolution and permeation studies it is important to ensure that sink conditions are met. Compared to organic cosolvents and surfactants, cyclodextrins offer the advantage of distinct biocompatibility with cell lines, what makes them a suitable choice for solubilization purposes.

The aim of this study was to develop a reliable high performance liquid chromatography method for quantification of fluticasone propionate in aqueous solutions containing  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin, as well as to investigate the solubilization potential of these cyclodextrins at conditions defined by requirements of permeability tests on Calu-3 cell lines.

In this diploma thesis, a reverse-phase chromatographic method for quantitative analysis of fluticasone propionate was successfully developed. The analysis was carried out with isocratic flow, at constant acetonitrile, methanol and phosphate buffer pH 3.5 ratio within the mobile phase (50:15:35, V/V/V). The injection volume was 50  $\mu$ l, column temperature 40°C and flow rate 1 ml/min. At these conditions, the linearity range was confirmed within drug concentration range of 1  $\mu$ g/ml to 30  $\mu$ g/ml (correlation coefficient 0.9998). The limit of detection and quantification were found to be 0.24  $\mu$ g/ml and 0.74  $\mu$ g/ml, respectively. Using this method, samples obtained in phase solubility studies of fluticasone propionate with  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin carried out at 37°C in Hank's balanced salt solution containing calcium ions (pH 7.4), were successfully analysed. Using  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin at 50 mM concentration, the intrinsic solubility of fluticasone propionate was increased by 19.5 and 27.3 times, respectively. Considering the structural characteristics of cyclodextrins and the drug, as well as the obtained phase solubility diagram profiles, it was concluded that the enhancement in fluticasone propionate's solubility was the product of its entrapment inside cyclodextrin and/or drug/cyclodextrin complex aggregates, through non-inclusion mechanisms.

The results obtained showed that the solubilization effect of  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin was not sufficient enough to be applied for *in vitro* permeation studies of fluticasone propionate using cell models. The results of this study could serve as a basis for further research of other cyclodextrins with better solubilization effect on fluticasone propionate.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Procjena prikladnosti odabranih ciklodekstrina kao solubilizatora u *in vitro* ispitivanju permeabilnosti flutikazonpropionata

Mia Kobaš

### SAŽETAK

Loša topljivost flutikazonpropionata u vodi predstavlja veliki izazov u razvoju i karakterizaciji novih formulacija lijeka. U *in vitro* ispitivanjima oslobađanja i permeabilnosti nužno je uspostaviti uvjete osigurane topljivosti. U odnosu na organska suotapala i površinski aktivne tvari, ciklodekstrini pružaju prednost izrazite biokompatibilnosti sa staničnim modelima, što ih čini prikladnim solubilizatorima za tu namjenu.

Cilj ovog rada bio je razviti metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za pouzdano određivanje sadržaja flutikazonpropionata u vodenim otopinama  $\alpha$ - i hidroksipropil- $\alpha$ -ciklodekstrina, te potom ispitati učinak ciklodekstrina na povećanje topljivosti lijeka pri uvjetima definiranim potrebama provođenja ispitivanja permeabilnosti na Calu-3 stanicama.

U ovom diplomskom radu uspješno je razvijena metoda obrnutofazne razdjelne kromatografije za kvantitativnu analizu flutikazonpropionata. Analiza je provedena uz izokratnu eluciju pri stalnom omjeru acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera pH 3,5 u mobilnoj fazi (50:15:35, V/V/V). Volumen injektiranja bio je 50  $\mu$ l, temperatura kolone 40°C, a brzina protoka mobilne faze iznosila je 1 ml/min. Pri navedenim uvjetima, područje linearnosti metode potvrđeno je za koncentracijski raspon lijeka od 1  $\mu$ g/ml do 30  $\mu$ g/ml (koeficijent korelacije 0,9998). Granice dokazivanja i određivanja metode iznosile su 0,24  $\mu$ g/ml te 0,74  $\mu$ g/ml. Uz ovu metodu uspješno su analizirani uzorci ispitivanja fazne topljivosti kompleksa flutikazonpropionata s  $\alpha$ - te hidroksipropil- $\alpha$ -ciklodekstrinom provedenih pri 37°C u Hankovoj otopini soli koja sadrži ione kalcija (pH 7,4). Primjenom  $\alpha$ - te hidroksipropil- $\alpha$ -ciklodekstrina pri koncentracijama od 50 mM, povećana je topljivost flutikazonpropionata za 19,5, odnosno 27,3 puta u odnosu na intrinzičnu topljivost lijeka. Uzevši u obzir strukturne značajke ciklodekstrina i lijeka te profil izoterme topljivosti, zaključeno je da je povećanje topljivosti flutikazonpropionata posljedica uklapanja lijeka u agregate kompleksa lijek/ciklodekstrin i/ili samih ciklodekstrina neinkluzijskim mehanizmima.

Temeljem dobivenih rezultata, procijenjeno je kako solubilizacijski učinak  $\alpha$ - te hidroksipropil- $\alpha$ -ciklodekstrina nije dostatan za primjenu u *in vitro* ispitivanju permeabilnosti flutikazonpropionata na staničnim modelima. Rezultati ovog rada mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja s drugim vrstama ciklodekstrina koji bi mogli imati bolji solubilizacijski učinak na flutikazonpropionat.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 47 stranica, 14 grafičkih prikaza, 6 tablica i 66 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: flutikazonpropionat; topljivost;  $\alpha$ -ciklodekstrin; hidroksipropil- $\alpha$ -ciklodekstrin; HPLC analiza

Mentor: **Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Jasna Jablan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of pharmaceutical technology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Suitability assessment of selected cyclodextrins as solubilizers in fluticasone propionate *in vitro* permeation studies

Mia Kobaš

#### SUMMARY

Low aqueous solubility of fluticasone propionate poses a great challenge in new formulation development and characterization. When conducting *in vitro* dissolution and permeation studies it is important to ensure that sink conditions are met. Compared to organic cosolvents and surfactants, cyclodextrins offer the advantage of distinct biocompatibility with cell lines, what makes them a suitable choice for solubilization purposes.

The aim of this study was to develop a reliable high performance liquid chromatography method for quantification of fluticasone propionate in aqueous solutions containing  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin, as well as to investigate the solubilization potential of these cyclodextrins at conditions defined by requirements of permeability tests on Calu-3 cell lines.

In this diploma thesis, a reverse-phase chromatographic method for quantitative analysis of fluticasone propionate was successfully developed. The analysis was carried out with isocratic flow, at constant acetonitrile, methanol and phosphate buffer pH 3.5 ratio within the mobile phase (50:15:35, V/V/V). The injection volume was 50  $\mu$ l, column temperature 40°C and flow rate 1 ml/min. At these conditions, the linearity range was confirmed within drug concentration range of 1  $\mu$ g/ml to 30  $\mu$ g/ml (correlation coefficient 0.9998). The limit of detection and quantification were found to be 0.24  $\mu$ g/ml and 0.74  $\mu$ g/ml, respectively. Using this method, samples obtained in phase solubility studies of fluticasone propionate with  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin carried out at 37°C in Hank's balanced salt solution containing calcium ions (pH 7.4), were successfully analysed. Using  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin at 50 mM concentration, the intrinsic solubility of fluticasone propionate was increased by 19.5 and 27.3 times, respectively. Considering the structural characteristics of cyclodextrins and the drug, as well as the obtained phase solubility diagram profiles, it was concluded that the enhancement in fluticasone propionate's solubility was the product of its entrapment inside cyclodextrin and/or drug/cyclodextrin complex aggregates, through non-inclusion mechanisms.

The results obtained showed that the solubilization effect of  $\alpha$ - and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin was not sufficient enough to be applied for *in vitro* permeation studies of fluticasone propionate using cell models. The results of this study could serve as a basis for further research of other cyclodextrins with better solubilization effect on fluticasone propionate.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 47 pages, 14 figures, 6 tables and 66 references. Original is in Croatian language.

Keywords: fluticasone propionate; solubility;  $\alpha$ -cyclodextrin; hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin; HPLC analysis

Mentor: **Mario Jug, Ph.D., Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario Jug, Ph.D., Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Hafner, Ph.D., Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D., Assistant Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.