

Razvoj in vitro metode za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije s dodatkom Capryola R(ovo r je registrirani naziv) 90

Meštrović, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:492667>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



Ivan Meštrović

**Razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja
deksametazona iz uljne formulacije s dodatkom
Capryola® 90**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Industrijska farmacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je u PLIVA HRVATSKA d.o.o. pod stručnim vodstvom dr. sc. Biserke Cetina-Čižmek, znanstvene savjetnice, i suvoditeljstvom Mariete Duvnjak Romić, mag. pharm., PLIVA, Istraživanje i razvoj.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Biserki Cetina-Čižmek na stručnom vodstvu, udijeljenim savjetima i strpljenju. Posebno se zahvaljujem suvoditeljici Marieti Duvnjak Romić, mag. pharm. koja mi je svojim znanjem i nesebičnim savjetovanjem uvelike olakšala izradu ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem PLIVI Istraživanje i razvoj na pruženoj mogućnosti izrade diplomskog rada te svim djelatnicima na odjelu Pretformulacije na nesebičnoj pomoći.

Hvala svim prijateljima, kolegama, a osobito Katarini, s kojima sam proveo nezaboravne studentske dane i koji su uvijek bili uz mene.

Ogromno hvala mami, tati i rodbini na bezgraničnoj podršci i ljubavi, a posebno braći Anti i Anđelku.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Uljne otopine	1
1.1.1. Biljna ulja	4
1.2. Topljivost.....	7
1.3. Particijski koeficijent	9
1.4. Ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz ljekovitog oblika <i>in vitro</i>	10
1.5. Optička vlakna	14
1.6. Deksametazon.....	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali.....	20
3.2. Metode	21
3.2.1. Određivanje sadržaja deksametazona.....	21
3.2.2. Određivanje topljivosti deksametazona u biljnim uljima uz dodatak suotapala	22
3.2.3. Određivanje particijskog koeficijenta deksametazona	22
3.2.4. Razvoj i evaluacija metode za ispitivanje oslobađanja deksametazona.....	23
3.2.5. Analiza podataka	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Topljivost deksametazona	28
4.2. Određivanje particijskog koeficijenta.....	32
4.3. Razvoj i evaluacija metode za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije.....	33
4.3.1. Oslobađanje deksametazona pod utjecajem degaziranja medija.....	34
4.3.2. Utjecaj temperature na brzinu oslobađanja deksametazona.....	38
4.3.3. Utjecaj duljine membrane na brzinu oslobađanja deksametazona.....	41
4.3.4. Utjecaj brzine vrtnje (rpm) na brzinu oslobađanja deksametazona	44
4.3.5. Utjecaj medija na brzinu oslobađanja deksametazona	47
4.3.6. Utjecaj volumena formulacije na brzinu oslobađanja deksametazona.....	49
4.3.7. Utjecaj membrane na brzinu oslobađanja deksametazona	51
4.3.8. Ispitivanje trajanja potpunog oslobađanja deksametazona	52

5. ZAKLJUČCI	54
6. LITERATURA	55
7. SAŽETAK/SUMMARY	59
8. PRILOZI	61
8.1. Popis tablica.....	61
8.2. Popis slika.....	63

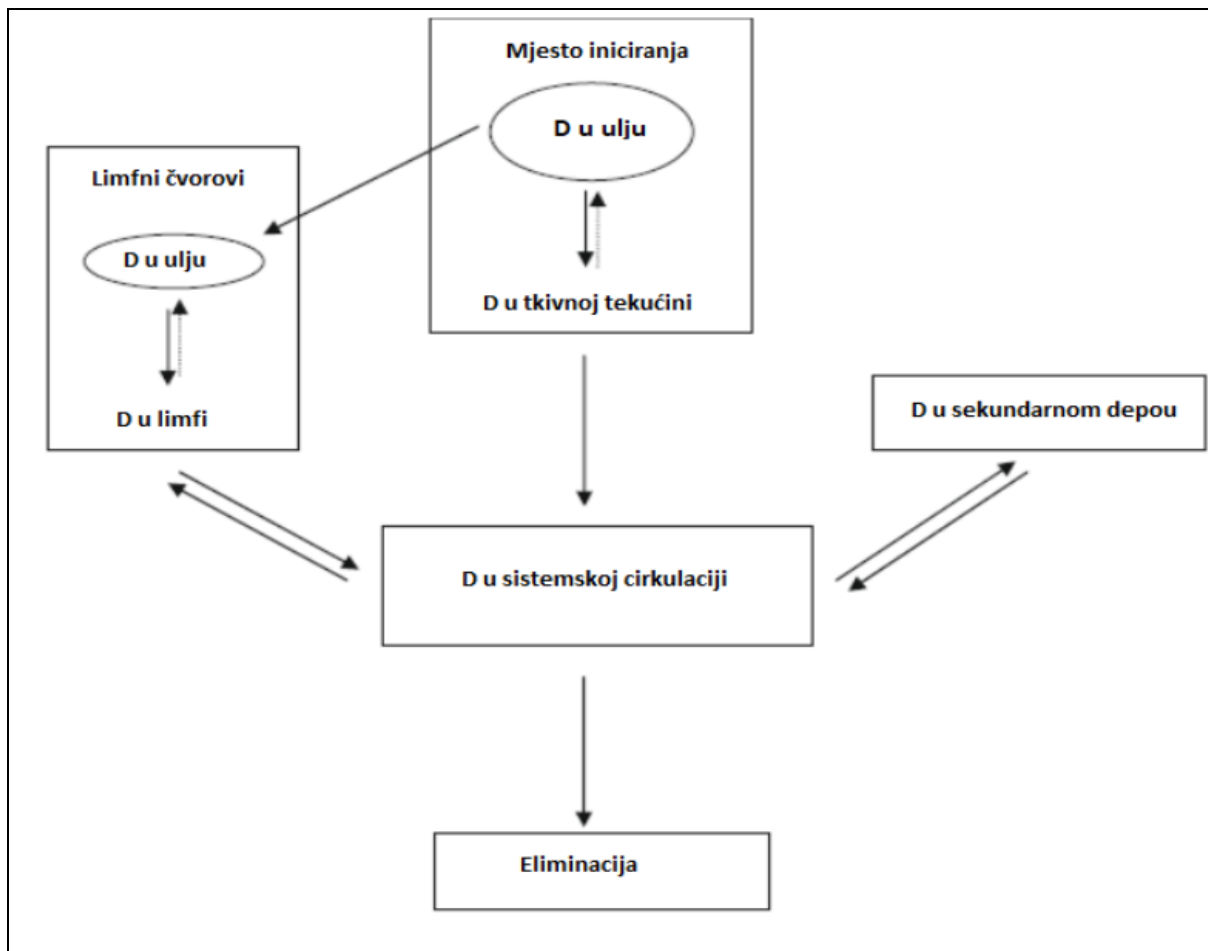
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Uljne otopine

Uljne otopine, kao parenteralni dugodjelujući oblici, sastoje se od lipofilnog lijeka (češće lipofilnijeg prolijeka) otopljenog u biljnom ulju. Ponekad se dodaju i solubilizirajuće tvari poput benzil benzoata ili tokoferoli kao antioksidansi. Ulja, koja se koriste u takvim pripravcima, razlikuju se po dužini lanca masnih kiselina, odnosu zasićenih i nezasićenih masnih kiselina te viskoznosti (Larsen i sur., 2009).

Ljekoviti pripravci u obliku uljnih otopina mogu poprilično produžiti djelovanje nakon parenteralne primjene. Modificiranjem fizikalno-kemijskih parametara lijeka, poput viskoznosti otapala, topljivosti lijeka u uljnom nosaču i razdjeljenja lijeka između uljne i vodene faze, može se produžiti učinak (Slika 1). Djelovanje *in vivo* će ovisiti o injektibilnosti, količini lijeka u pripravku i brzini oslobađanja lijeka iz pripravka (Larsen i sur., 2012).



Slika 1. Prikaz procesa koji utječu na farmakokinetiku ljekovitih tvari nakon injektiranja lipofilne otopine lijeka. D predstavlja lijek ili prolijeak (preuzeto i prilagođeno od Weng Larsen i Larsen, 2009).

Ispravnim odabirom uljnog nosača moguće je manipulirati brzinom oslobađanja djelatne tvari unutar određenih granica. Ovaj pristup je veoma zanimljiv u području dizajniranja parenteralnih oblika produljenog djelovanja, naprimjer lokalnih analgetika. Kombinacija ovog pristupa i stvaranja prolijeaka mogla bi dodatno povećati mogućnost kontrole, i samim time optimiziranja djelovanja parenteralnih dugodjelujućih pripravaka. Ako bi došlo do prebrzog oslobađanja prolijeaka *in vivo*, umjesto dodatnog povećanja lipofilnosti, moguće je usporiti oslobađanje uklapanjem prolijeaka u neko drugo ulje ili uljnu mješavinu (Fredholt i sur., 2000).

Ono što je privlačno kod lijekova s lipofilnim nosačima je njihova jednostavna proizvodnja, uključujući i mogućnost terminalne sterilizacije, kao i dugotrajna stabilnost. Promjenom

koeficijenta distribucije određenim postupcima (stvaranje prolijeka, modifikacija uljnog nosača) moguće je razviti i ljekovite oblike specifičnih načina i duljine oslobađanja (Weng Larsen i Larsen, 2009).

1.1.1. Biljna ulja

Biljna ulja se uglavnom ekstrahiraju iz biljnih sjemenki te su većinom mješavine raznih triglicerida (90% - 95% v/v) (Tablica 1.1) uz male količine slobodnih masnih kiselina i fosfolipida. Također, sadrže i neke prirodne antioksidanse (pigmenti, sterol, vitamin E) koji sprječavaju razgrađivanje. Kemijsku strukturu ulja čini glicerol, na čije su tri krajnje hidroksilne skupine vezane masne kiseline esterskom vezom. Masne kiseline se sastoje od 14 do 22 ugljikova atoma s varirajućim brojem nezasićenih veza što utječe na njihovu viskoznost i gustoću. Viskoznost je manja u uljima s većom količinom nezasićenih masnih kiselina zbog savitljivosti lanca na mjestu dvostruke veze (Mishra, ured., 2016).

Tablica 1.1. Sastav masnih kiselina najupotrebljavanijih biljnih ulja (preuzeto i prilagođeno od Mishra, ured., 2016)

Biljno ulje	ZMK*	MNMK	PNMK		Ricinolna
		Oleinska	Linolna	Linolenska	
Sezamovo	15	38.2	45	0.6	/
Maslinovo	12.6	78.1	7.3	0.6	/
Ricinusovo	2	3	4	/	90
Kukuruzovo	15.8	30.5	52	1	/
Kokosovo	91.6	6.2	1.6	/	/
Palmino	48	40	10	/	/
Maslačkovo	9	20	69	/	/
Sojino	14	23	51	7	/
Kikirikijevo	6	56	41	/	/

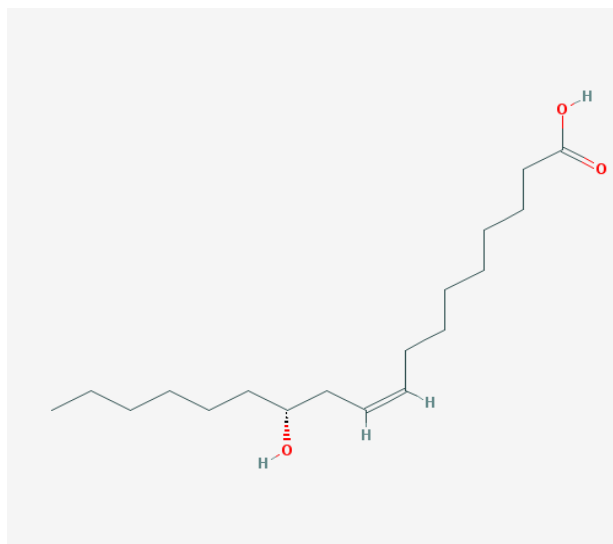
*ZMK-zasićene masne kiseline (kaprilna, kaprinska, miristinska, laurinska, palmitinska, stearinska), MNMK-mononezasićena masna kiselina, PNMK-polinezasićena masna kiselina.

U farmaceutskoj se industriji biljna ulja najčešće koriste za otapanje lijekova slabo topljivih u vodi, čime se ostvaruje produljeno oslobađanje lijeka tijekom dužeg vremena. Nadalje, u totalnoj parenteralnoj prehrani ulja služe kao izvor masti te kao nosači za vitamine topljive u mastima. Dvije stvari, na koje treba obratiti pozornost kod korištenja ulja u parenteralnim pripravcima, su: degradacija ulja uz stvaranje slobodnih masnih kiselina, te prisustvo mineralnih ulja ili parafina koje naše tijelo nije sposobno metabolizirati (Nema i Ludwig, ured., 2010).

Sustavi bazirani na lipidima, gdje spadaju i biljna ulja, omogućuju otapanje slabo topljivih i lipofilnih lijekova te čine širok raspona sustava od kojih su uljne otopine jedna od najjednostavnijih opcija. Drugi sustavi gdje se koriste biljna ulja su: suspenzije, emulzije, samoemulgirajući sustavi, mikroemulzije, implantati i tako dalje (Cafiero, 2017).

Američka farmakopeja izdaje specifikacije za uljna otapala, iznoseći da moraju biti biljnog porijekla kako bi se mogla metabolizirati, moraju biti u tekućem stanju na sobnoj temperaturi te se ne smiju brzo razgrađivati. Određeni su i limiti za sadržaj slobodnih masnih kiselina, jodni broj i saponifikacijski broj. Najčešće korištena ulja su kukuruzovo ulje, ricinusovo ulje, ulje pamuka, kikirikijevo ulje i sezamovo ulje. Pripravci trebaju imati označeno korišteno ulje kako bi korisnici mogli pripaziti na moguće alergijske reakcije na samo ulje (Troy i Beringer, 2006).

Ricinusovo ulje se upotrebljava kao pomoćna tvar, za formiranje emulzija i kao otapalo za nepolarne lijekove. Proizvodi se prešanjem sjemenki ricinusa (*Ricinus communis* L.). Viskozno je i blijedožuto, ne suši se i ne isparava. Zahvaljujući svojim karakteristikama i sadržaju, ima i primjenu u različitim granama industrije (gorivo, sinteza polimera, sapuni, voskovi, lubrikanti, hidraulika, gnojivo, boje). Također, primjenjuje se i u liječenju kao laksativ i purgativ. Sadržava čak 90% ricinolne kiseline (Slika 2) zbog koje ima neke poboljšane značajke nad ostalim uljima poput antioksidativne stabilnosti i sprječavanja stvaranja peroksida (Patel i sur., 2016). Prisutno je u topičkim pripravcima, intramuskularnim injekcijama i čvrstim oralnim oblicima. Njegova visoka viskoznost otežava upotrebu u kozmetici, stoga se etoksilira ili pegilira kako bi se riješio taj problem (Rabasco Alvarez i Gonzalez Rodriguez, 2000).



Slika 2. Struktura ricinolne kiseline (preuzeto s www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

1.2. Topljivost

Otopinom se može nazvati sustav u kojem su molekule tvari koja se otapa otopljene u otapalu. Otopina je zasićena kada je količina otopljene tvari u otapalu maksimalna pri datoj temperaturi i tlaku. Taj maksimum otopljene tvari (lijeka) je veoma bitan jer određuje brzinu otapanja samog lijeka. Veća topljivost obično vodi k bržem otapanju bez uključenosti kemijske reakcije (Florence i Attwood, 2006).

Topljivost je zasigurno jedan od najvažnijih parametara koji pridonosi postizanju željene koncentracije lijeka u sistemskej cirkulaciji za ciljani učinak. Slaba topljivost u vodi jedan je od većih problema pri dizajniranju pravog ljekovitog oblika. Povećanjem topljivosti povećana je količina lijeka u pripravku (doza) pa se može smanjiti veličina ljekovitog oblika. Povećanje topljivosti se obično postiže promjenom fizičkih karakteristika (veličina čestica), kemijskim modifikacijama poput promjene pH ili dodavanjem tvari za povećanje topljivosti - suotapala, surfaktanti (Savjani i sur., 2012).

Korištenjem suotapala može se poboljšati topljivost slabo topljivim lijekovima. No, promjena topljivosti će ovisiti o polarnosti suotapala, dielektričnoj konstanti, površinskoj napetosti, distribucijskom koeficijentu itd. Često se parenteralno korišteni lijekovi primjenjuju u koncentracijama koje nadilaze njihovu topljivost u datom otapalu, zato je potreban oprez pri dodatku suotapala zbog moguće toksičnosti (Gibson, ured., 2004).

Propilen glikol je jedno od korištenih suotapala. Miješa se s vodom, alkoholom i drugim otapalima. Uz razne industrijske primjene, derivati propilen glikola se koriste i u proizvodnji hrane, farmaceutskoj proizvodnji te u kozmetičkim proizvodima. Esteri propilen glikola i masnih kiselina koriste se, između ostalog, kao biorazgradljivi solubilizatori u otapalima te pojačivači apsorpcije lijekova. Propilen glikol monokaprilat (Capryol® 90) je jedan od derivata propilen glikola korišten u navedenim svrhama (www.chemicalland21.com).

Budući da je dielektrična konstanta većine biljnih ulja blizu nule, topljivost polarnih tvari i iona u takvim otapalima je veoma niska. Topljivost ovisi o jačini privlačnih intermolekulskih

sila između molekula triglicerida i molekule lijeka. Te sile mogu biti van der Waalsove ili vodikove veze u kojima je esterska skupina triglicerida akceptor vodika (Larsen i sur., 2012).

1.3. Particijski koeficijent

Particijski koeficijent P je mjera relativnog afiniteta otopljene tvari prema vodenoj, odnosno nevodenoj fazi. Određuje se kao omjer koncentracije otopljene tvari u nevodenoj fazi i koncentracije u vodenoj fazi. Kada bi pomiješali dvije faze koje se ne miješaju, a pritom jedna faza sadrži otopljenu tvar koja se može otopiti u obje faze, otopljena tvar bi se rasporedila u obje faze. Otopljena tvar postiže kemijsku ravnotežu između obje faze (Florence i Attwood, 2006).

Za produženo oslobađanje iz uljne otopine, poželjno je da djelatna tvar ima viši particijski koeficijent P . Ako particijski koeficijent P nije zadovoljavajući, može se povećati određenim mjerama. Jedna od mogućnosti je povećanje potencijala stvaranja vodikovih veza nevodenog otapala, tako da se doda suotapalo nemješljivo s vodom koje ima grupe koje mogu primiti ili donirati vodik. Time se povećava potencijal nevodenog otapala da veže vodik. Druga mogućnost je prevođenje lijeka u lipofilniji prolijek, što je zapravo i najčešće korišten pristup (Larsen i sur., 2012).

1.4. Ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz ljekovitog oblika *in vitro*

Ispitivanje oslobađanja lijeka *in vitro* uključuje podvrgavanje ljekovitog oblika različitim uvjetima koji uzrokuju oslobađanje lijeka iz pripravka te kvantificiranje količine oslobođenog lijeka pri tim uvjetima. Tijekom razvoja ljekovitog pripravka predstavlja ključni test za uočavanje promjena u formulaciji ljekovitog oblika, za određivanje mehanizma oslobađanja lijeka i oponašanje *in vivo* uvjeta. Također, ima primjenu u kontroli kvalitete gdje utvrđuje sukladnost i kvalitetu proizvedene serije prema unaprijed određenim kriterijima (www.particlesciences.com).

Poznavajući brzinu oslobađanja lijeka, uz informacije o topljivosti, partijskom koeficijentu i pKa lijeka, može se pretpostaviti ponašanje lijeka *in vivo*. No, pretpostavku treba potvrditi upravo *in vitro* testovima te usporedbom s *in vivo* podacima. Zato je njihova uloga prepoznata i potvrđena od strane regulatornih tijela standardizacijom raznih metoda, ovisno o ispitivanom pripravku (Aulton, 2002).

Kao što vrijedi za ostale ljekovite oblike, tako se prikladan *in vitro* test oslobađanja za parenteralne pripravke produljenog oslobađanja treba obaviti u standardiziranim uvjetima koristeći robusne metode. Testovi se mogu uspoređivati samo ako su ispunili navedene uvjete. Razvoj metode oslobađanja za parenteralne oblike kontroliranog oslobađanja koji imaju biorelevantnost, odnosno reflektiraju *in vivo* uvjete što je moguće preciznije, smatra se poželjnim. Nadalje, metoda mora biti diskriminatorna kako bi se razlike u formulaciji ili proizvodnji mogle pouzdano utvrditi. Uz to, dizajn i dimenzije opreme moraju biti uvijek iste, kao i konzistentni hidrodinamički uvjeti. Još jedna okolnost na koju treba paziti su uvjeti osigurane topljivosti, (eng. *sink conditions*) iako ne mora značiti da će takvi uvjeti biti ostvareni na mjestu primjene. Ipak, trebaju biti standard u metodi kako bi proces oslobađanja bio karakteristika dozirnog oblika, a ne ograničene topljivosti djelatne tvari. Prema američkoj farmakopeji, uvjeti osigurane topljivosti se postižu kada je volumen medija barem 3 puta veći od potrebnog volumena koji bi činio zasićenu otopinu s ljekovitom tvari (Seidlitz i Weitschies, 2012).

Pojam korelacija se često upotrebljava u farmaceutskim krugovima kako bi opisala odnos između dvije varijable. Matematički, korelacija predstavlja međuovisnost između kvantitativnih i kvalitativnih podataka, odnosno vezu između mjerenih varijabli. S biofarmaceutskog gledišta, korelacija se može referirati kao veza između prikladnih *in vitro* karakteristika i *in vivo* farmakokinetičkih parametara. Ove definicije su predložene od strane USP i FDA (Emami, 2006).

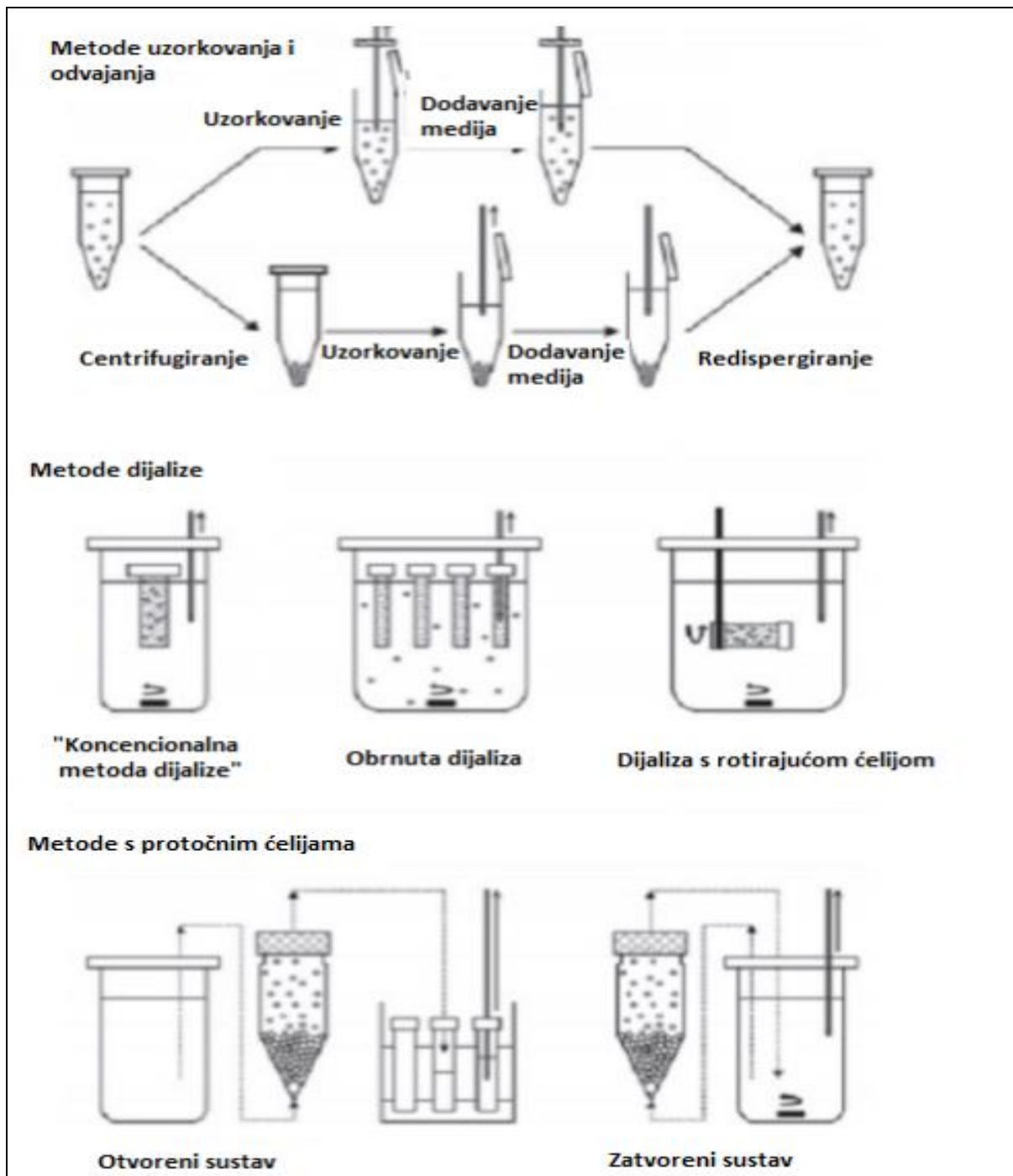
Određivanje profila oslobađanja lijeka (eng. *dissolution* i *drug release tests*) su *in vitro* ispitivanja koja mjere brzinu i opseg otapanja ili oslobađanja ljekovite tvari iz formulacije, obično u vodenom mediju pri određenim uvjetima. Idealno bi bilo da testovi oslobađanja *in vitro* imaju sposobnost predviđanja ponašanja lijeka *in vivo*. Za razvoj same metode potrebno je evaluirati sve kritične parametre poput različite brzine vrtnje, različitog medija (pH, volumen), čak i različite aparature. Sva ta ispitivanja zapravo spadaju u domenu biofarmaceutike kojoj je cilj utvrditi kojom brzinom i u kojoj će količini aktivna tvar doći na mjesto djelovanja (Shargel i sur., 2004).

Za parenteralne proizvode kontroliranog oslobađanja ubrzani *in vitro* testovi često predstavljaju problem zbog dugog trajanja. Proces se može ubrzati promjenom pH, ionske jakosti, dodatkom suotapala ili surfaktanata, povećanjem temperature, itd. Ipak, te promjene mogu negativno utjecati na sam proces oslobađanja (npr. agregacija čestica), zato se preporučuje i paralelno ispitivanje procesa u stvarnom vremenu početne faze oslobađanja (Seidlitz i Weitschies, 2012).

Kako nema definiranih standarda za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari iz parenteralnih oblika, tijekom razvoja treba uzeti u obzir da su takvi pripravci kompleksniji i podložniji varijabilnosti. Stoga se često ne primjenjuju jednako strogi zahtjevi kao za oralne oblike. Također, fiziologija mjesta primjene i farmakokinetika takvih oblika još nisu dovoljno upoznate pa je teško predvidjeti sa sigurnošću samo ponašanje lijeka na mjestu primjene. Isti se *in vitro* uvjeti, stoga, ne mogu primijeniti za lijekove koji se primjenjuju na različitim mjestima i koji imaju drugačije oslobađanje. Potrebno je odrediti specifične *in vitro* uvjete i razviti posebne metode za svaki pripravak (Siewert i sur., 2003).

Najustalnije aparature su one opisane u farmakopejama. Neke aparature, većinom usmjerene na čvrste dozirne oblike, opisane su u američkoj farmakopeji. Također, opisane su i u europskoj farmakopeji, s malim razlikama u specifikaciji opreme, ali nije opisana metoda naizmjeničnog cilindra (USP III). Američka farmakopeja nema preporuke za parenteralne oblike produženog oslobađanja ili za oblike posebnog oslobađanja. Stoga se može koristiti neka druga aparatura ili izmijenjena postojeća, s tim da se mora opravdati svaka promjena. Čak i u slučaju iste djelatne tvari, ako je formulacija značajno različita, isti test oslobađanja ne mora biti prikladan (Gibson, ured., 2004).

Već preko 40 godina postoje metode za određivanje oslobađanja iz čvrstih oralnih oblika, no parenteralni oblici su na tom području još nedefinirani. Zbog posebnih fizikalno-kemijskih značajki i karakteristika oslobađanja, veoma je izazovno razviti standarde na tom polju. Trenutno korištene *in vitro* metode ubrzanog oslobađanja su: metode uzorkovanja i odvajanja metode dijalize i metode s protočnim ćelijama (USP IV) (Slika 3) (Shen i Burgess, 2012).



Slika 3. Osnovne metode oslobađanja za parenteralne oblike produženog djelovanja. Sive točkice predstavljaju ljekovitu tvar, strelice prema gore označavaju uzorkovanje, točkice predstavljaju membranu kod metoda dijalize, isprekidane linije i strelice određuju smjer protoka medija za metode s protočnim ćelijama (preuzeto i prilagođeno od Seidlitz i Weitschies, 2012).

1.5. Optička vlakna

Optička vlakna svojim dizajnom omogućuju vođenje svjetlosti cijelom svojom dužinom principom totalne unutarnje refleksije. Sastoje se od jezgre, kojom putuje svjetlost, omotača, koji ne apsorbira svjetlost te su umotani u plastiku koja ih štiti od vanjskih utjecaja. Ovisno o duljini promjera dijele se na jednomodalna i višemodalna vlakna. S obzirom na mikrometarsku širinu, veliki broj optičkih vlakana u snopu čini optički kabel. Najčešće korišteni materijal je silicijev dioksid uz dodatne tvari za smanjenje raspršivanja svjetla. Za kraća vlakna (nekoliko metara), u kojima raspršenje svjetlosti nije problem, upotrebljava se plastika (Yeh, 1990).

Tehnologija optičkih vlakana se javila devedesetih godina prošlog stoljeća i postaje superiorna nad uobičajenim spektroskopskim metodama, ali još ih nije zamijenila. Eng. *optic fiber* je uređaj za ispitivanje oslobađanja koji je spregnut optičkim vlaknima sa spektrofotometrom za kvantitativnu analizu (Slika 4). Sonde koje se koriste imaju nastavke u raznim veličinama za apsorpciju svjetlosti (1-20 mm), ovisno o opsegu apsorpcije koju očekujemo, te se lako mogu mijenjati i ponovno koristiti. Probe s vlaknima su prenosive i mogu se odnijeti do uzorka, a omogućuju i mjerenje hladnih i vrućih uzoraka (www.agilent.com).

Prednosti:

- a) proces je automatiziran
- b) ponovno uzorkovanje moguće je već nakon 45 sekundi
- c) nije pod utjecajem vanjskog svjetla i zbog male fokusirane zrake nema sprežanja signala
- d) prikladan za ispitivanje materijala osjetljivih na svjetlost
- e) mjerenje malih volumena

Nedostaci:

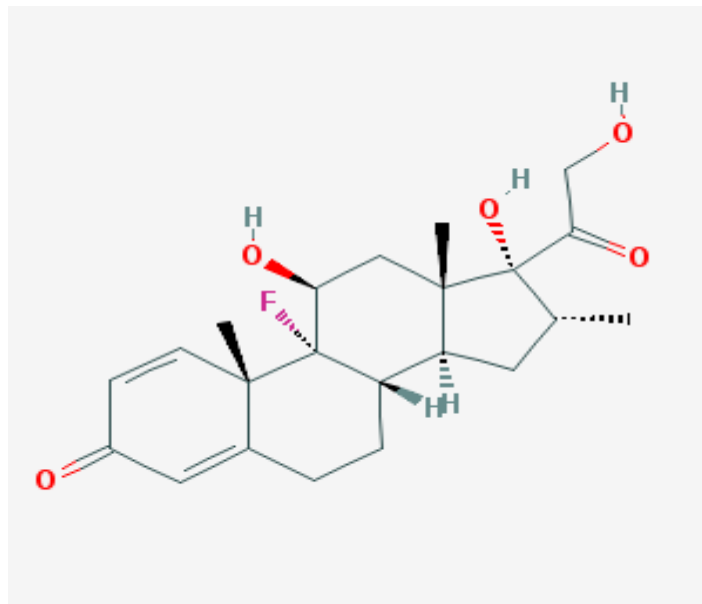
- a) mjehurići zraka ometaju mjerenje
- b) utjecaj hidrodinamike
- c) veličina nastavka



Slika 4. Uređaj za ispitivanje oslobađanja spregnut optičkim vlaknima sa spektrofotometrom (preuzeto s www.labcompare.com)

1.6. Deksametazon

Deksametazon (Slika 5) je sintetski glukokortikoid s blagim mineralokortikoidnim djelovanjem. Također, pokazuje protuupalni i imunosupresivni učinak. Nevezani deksametazon prolazi staničnu membranu i veže se na glukokortikoidne receptore koji se nalaze u citoplazmi u većini tjelesnih stanica. Taj se kompleks u staničnoj jezgri veže na dio DNK koji odgovara na glukokortikoide (GRE - *glucocorticoid response element*), što dovodi do promjene u transkripciji proteina koji sudjeluju u upali i samim time njihovoj sintezi. Protuupalni učinak se očituje u modifikaciji biosinteze medijatora upale poput leukotriena i prostaglandina tako da djeluje na fosfolipazu A₂, inhibitorne proteine i lipokortin. Mineralokortikoidnim učinkom djeluje na metabolizam natrija i kalija kao i na ravnotežu elektrolita i vode (www.drugbank.ca).



Slika 5. Struktura deksametazona (preuzeto s www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

U Hrvatskoj je trenutno registrirano 17 lijekova koji sadrže deksametazon kao djelatnu tvar. Jedino je Ozurdex® oblik produljenog oslobađanja kao intravitrealni implantat (www.halmed.hr). Može doći i u obliku estera, kako bi se utjecalo na metabolizam, kao acetatni ester, ili u obliku natrijevog fosfata u nekim kapima i injekcijama. Nalazi se u oftalmičkim, parenteralnim i oralnim oblicima te njegova kinetika ovisi o mjestu primjene.

Ono što je slično neovisno o mjestu primjene je vezanje za bjelančevine, osobito na albumin, koje iznosi oko 77%. Lipofilan je i prelazi u međustanični i unutarstanični prostor. Što se tiče metabolizma, nakon razgradnje u stanicama, događa se u jetri, a može i u bubrezima. Poluvrijeme eliminacije može trajati danima (1-3 dana) u slučaju intramuskularne ili intraartikularne primjene, odnosno satima (3-4 sata) u oralnoj primjeni, a izlučuje se uglavnom urinom (Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Deksametazon je lijek koji se koristi u širokoj paleti indikacija i poželjno bi bilo proučiti različite puteve primjene koji bi imali lokalizirani i poboljšani učinak. Oralna primjena kod kroničnih bolesti je učestala i javlja se potreba za parenteralnim pripravcima koji bi pružali produženo i kontrolirano oslobađanje. Time bi se, između ostalog, smanjio interval doziranja, nuspojave i povećala suradljivost pacijenata.

Za parenteralnu primjenu deksametazona s produženim oslobađanjem potrebno je razviti terapijski sustav koji to omogućuje. Jedan od jednostavnijih sustava je razvoj uljne otopine. Uljne otopine produžuju vrijeme distribucije iz ljekovitog oblika u tkivnu tekućinu pa su prikladne za pripravke produženog oslobađanja.

Metode koje se koriste za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari iz ljekovitih oblika produženog djelovanja za parenteralnu primjenu nisu definirane u farmakopejama. Potrebno je kombinirati postojeće definirane metode s nekim novim načinima ispitivanja koji nisu standardizirani.

Cilj rada je razviti i evaluirati metodu za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije uz pomoć uređaja spregnutog optičkim vlaknima. Za razvoj metode potrebno je:

1. Odrediti topljivost deksametazona u ispitivanim uljima sa i bez suotapala
2. Odabrati najpogodnije ulje za formulaciju uz dodatak prigodne količine suotapala
3. Odrediti particijski koeficijent između formulacije i medija
4. Ispitati utjecaj membrana na oslobađanje lijeka
5. Ispitati utjecaj brzine vrtnje, temperature, promjene medija, dužine membrane, volumena formulacije na oslobađanje lijeka
6. Ispitati sličnost profila oslobađanja

Aparatura za oslobađanje je preuzeta iz američke farmakopeje (aparatura II). Pripravljena formulacija ima produženo oslobađanje i uzorkovanje je potrebno vršiti tijekom dužeg

vremena. Kako bi se izbjeglo ručno uzorkovanje, i time mogućnost ljudske pogreške, za ispitivanje oslobađanja odabran je uređaj spregnut optičkim vlaknima (eng. *optic fiber*). Uređaj automatski uzorkuje i računa apsorbanciju u zadanim intervalima što je veoma praktično za izabranu formulaciju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Tijekom razvoja formulacije i metode za ispitivanje oslobađanja korišteni su sljedeći materijali: rafinirano kikirikijevo ulje (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo) rafinirano ulje pamuka (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), rafinirano kukuruzovo ulje (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), rafinirano ricinusovo ulje (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), rafinirano sezamovo ulje (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), Capryol® 90 (Gattefosse, Francuska) i deksametazon (Pfizer, SAD).

Korištena organska otapala za razrjeđivanje uzoraka za HPLC analizu su tetrahidrofuran (Merck, Njemačka) i acetonitril (Merck, Njemačka). Mobilna faza za HPLC analizu je acetonitril (Merck, Njemačka) u određenom omjeru s fosfatnim puferom pH=2,0. Fosfatni pufer je priređen pomoću kalijevog dihidrogenfosfata (Kemika, Hrvatska) i visokopročišćene vode.

Membrane, koje su sadržavale uljnu formulaciju deksametazona tijekom *in vitro* ispitivanja, bile su celuloza ester (CE) od 300 kD (Spectrum labs, SAD) i membrana regenerirane celuloze (RC) od 50 kD (Spectrum labs, SAD).

Receptorski medij za vrijeme ispitivanja oslobađanja bio je fosfatni pufer pH=7,4. Pripremljen je otapanjem natrijevog hidroksida (Kemika, Hrvatska) i kalijevog dihidrogenfosfata (Kemika, Hrvatska) u visokopročišćenoj vodi. Također, korišten je i apsolutni etanol (Kemika, Hrvatska) u kombinaciji s puferom.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje sadržaja deksametazona

Pripremljeni uzorci za ispitivanje topljivosti i particijskog koeficijenta kvantitativno su analizirani pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC) Agilent model 1100/1200 serije s DAD detektorom uz kolonu Kinetex C18, dimenzija 4,7 x 50 mm, veličine čestica 2,6 μm i veličine pora 100 Å, proizvođača Phenomenex®. Kromatogrami su snimani na valnoj duljini od 241 nm gradijentnom eluacijom (Tablica 3.1). Temperatura injektora namještena je na 35 °C, a kolone na 40 °C. Protok mobilne faze je 1,8 mL/min, a volumen injektiranja 10 μL . Analiza svakog uzorka traje 2,2 minute. Organska faza je acetonitril, a vodena pufer pH=2,0.

Tablica 3.1. Sastav mobilne faze tijekom gradijentne eluacije u HPLC metodi za određivanje koncentracije deksametazona pri ispitivanju topljivosti i particijskog koeficijenta

Vrijeme (min)	Udio organske faze u mobilnoj fazi	Udio vodene faze u mobilnoj fazi
0 - 0,9	80	20
0,9 - 1,8	40	60
1,8 - 2,2	80	20

Standard (*stock*) korišten za ispitivanje topljivosti i određivanje particijskog koeficijenta pripremljen je otapanjem 15 mg deksametazona u 25 mL tetrahidrofurana. Iz te otopine su pripremljena dva standarda, jedan za ricinusovo ulje, a drugi za ostala ulja. Prvi je pripremljen razrjeđivanjem 5 mL *stock* otopine u 25 mL acetonitrila dok je drugi pripremljen razrjeđivanjem 1 mL *stock* otopine u 100 mL acetonitrila. Koncentracija prvog standarda je 0,12 mg/mL, a drugog 6 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Određivanje topljivosti deksametazona u biljnim uljima uz dodatak suotapala

Ravnotežna topljivost deksametazona je ispitana u 5 različitih rafiniranih ulja zasebno, (kukuruzovo, kikirikijevo, ricinusovo, pamukovo i sezamovo) potom s dodatkom 10%, odnosno 20% Capryola® 90 (v/v) (propilenglikol monokaprilat) kao suotapala. Svaki uzorak je analiziran u triplikatu s jednakim volumenom ulja, odnosno Capryola® 90. Deksametazon je dodan u većoj količini od očekivane topljivosti i bitno je da ostane u suvišku tijekom cijelog pokusa.

Bočice s uzorcima su postavljene na tresalicu na 100 rpm i 37 °C. Uzorkovanje je obavljeno nakon 2 sata i 24 sata.

Nakon uzorkovanja, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 10000 okretaja kako bi odvojili neotopljeni deksametazon. Zatim su razrijeđeni 8 puta i analizirani uređajem za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti spomenutom metodom gradijentnom eluacijom.

3.2.3. Određivanje particijskog koeficijenta deksametazona

Particijski koeficijent je ispitivan na formulaciji koja sadrži ricinusovo ulje s 20% Capryola® 90 (v/v) (3mL) te 3 mg deksametazona kako bi njegova koncentracija bila 1 mg/mL. U 3 mL formulacije u bočici, dodano je 3 mL pufera pH=7,4 koji predstavlja vodenu fazu. Odnos uljne i vodene faze je 1:1.

Bočice za ispitivanje particijskog koeficijenta su postavljene na tresalicu na 100 rpm i 37 °C. Uzorkovanje je vršeno nakon 2 i 24 sata.

U definiranim intervalima uzorkovano je po 1 mL uljne i vodene faze. Nakon centrifugiranja na 10000 okretaja na 15 minuta, uzorci uljne faze su razrijeđeni 8 puta dok se uzorci vodene faze nisu razrijeđivali. Zatim su analizirani HPLC metodom gradijentnom eluacijom za određivanje sadržaja.

3.2.4. Razvoj i evaluacija metode za ispitivanje oslobađanja deksametazona

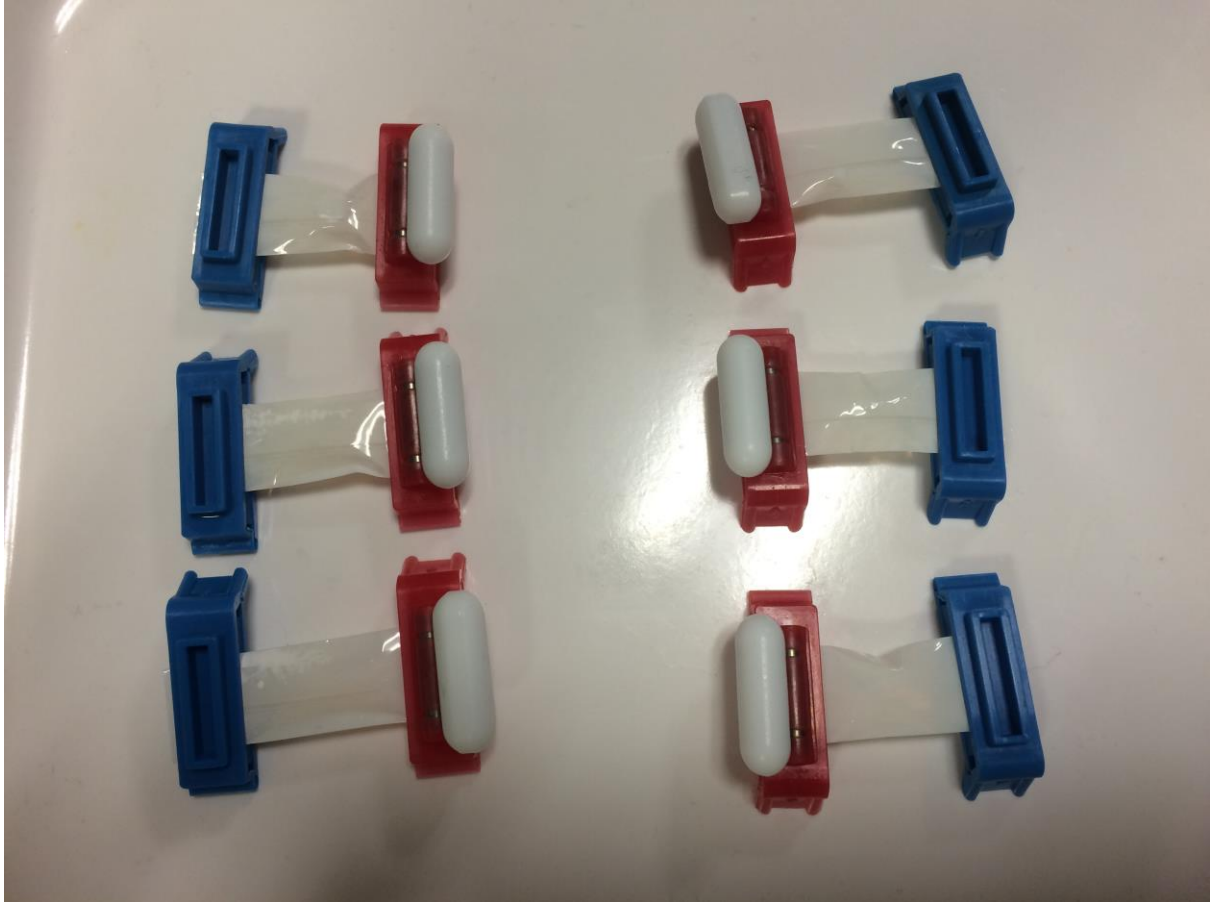
Korišten je uređaj koji se sastoji od aparature za oslobađanje (Agilent, Njemačka) i UV-Vis spektrofotometra (Agilent, Njemačka). Uređajem se upravlja pomoću računalne aplikacije. Aparatura za oslobađanje je USP aparatura II koja se sastoji od posuda s rotirajućim lopaticama. Kraj lopatica su postavljene sonde s nastavkom za automatsko određivanje apsorbancije i termostat. Uređaj automatski sakuplja uzorke i podatke o apsorbanciji pohranjuje u računalo u određenim intervalima. Korišteni nastavci sonde za mjerenje apsorbancije imaju utor od 20 mm kako bi se što preciznije odredila apsorbancija.

Kao receptorski medij korišten je fosfatni pufer pH=7,4 volumena 500 mL. Medij je potrebno degazirati prije upotrebe zbog utjecaja zraka na rezultate testa i polagano uliti u posude. Degaziranje je obavljeno prema uputama u američkoj farmakopeji. Može se koristiti više metoda. Korišten je proces u kojem se prvo zagrije medij na 41 °C uz blago miješanje. Zatim se odmah filtrira pod vakuumom koristeći filter jednak ili manji veličini od 0,45 µm uz pojačano miješanje. Nastavi se miješati još 5 minuta pod vakuumom (USP, 2017).

Nakon postavljenih parametara metode, određuje se bazna linija spektrofotometra mjerenjem apsorbancije receptorskog medija. Zatim se odredi apsorbancija standarda za svaku sondu zasebno. Standard je pripremljen otapanjem 10 mg deksametazona u tetrahidrofuranu u tikvici od 25 mL. 1 mL dobivene otopine razrijedi se sa 100 mL medija i koncentracija standarda iznosi 0,004 mg/mL, što je istovjetno nominalnoj koncentraciji, tj. koncentraciji deksametazona u posudi kad se u potpunosti oslobodi iz ljekovitog oblika.

Kao nosači uzorka korištene su CE i RC membrane. Svaki je uzorak u triplicatu. Prije ispitivanja membrane se trebaju namočiti u mediju barem 30 minuta. Zatim se na jednu stranu membrane prikvači štipaljka s ugrađenim magnetom, dok se na drugu stranu pažljivo unese 1 mL formulacije. Strana, kroz koju je dodana formulacija, također se zatvori štipaljkom (bez magnetom), pazeći da se izbjegnu mjehurići zraka u membrani (Slika 6). Na štipaljke s magnetom stavi se valjkasti magnetski mješač kako bi se dodatno osiguralo potonuće i pravilno kretanje membrane s uzorkom.

Membrane se oprezno spuste na dno posude, jedna po jedna u jednakim intervalima, tako da strana s mješaćem na štipaljci bude na dnu posude. Automatsko uzorkovanje vršeno je nakon 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 300, 360, 720 i 1440 minuta.



Slika 6. CE membrane s formulacijom prije ubacivanja u posude za oslobađanje (autorska fotografija)

3.2.5. Analiza podataka

Dobiveni podaci za ispitivanje topljivosti i particijskog koeficijenta, nakon analiziranja uzoraka HPLC-om, su površine pikova na kromatogramu. Za svaki se uzorak pojedinačno podijeli površina pika s faktorom retencije standarda prema formuli (1) i pomnoži s razrjeđenjem da se dobije koncentracija prije razrjeđenja. Za prikaz rezultata koristi se srednja vrijednost za svaki triplikat izražena u mg/mL.

$$c = \frac{P}{R_f} \quad (1)$$

c = koncentracija otopljenog deksametazona u razrijeđenom uzorku (mg/mL)

P = površina pika deksametazona na kromatogramu

R_f = faktor retencije standarda

Rezultati za topljivost deksametazona u uljima grafički su prikazani kao koncentracija otopljenog deksametazona (mg/mL) nakon 2 sata te nakon 24 sata. Particijski koeficijent je određen omjerom koncentracije otopljenog deksametazona u uljnoj formulaciji i koncentracije otopljenog deksametazona u vodenoj fazi (fosfatni pufer).

Tijekom razvoja i evaluacije metode, podaci oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije prikazani su grafički kao postotak oslobođenog deksametazona u ovisnosti o vremenu. Podatke o postotku oslobađanja izračuna uređaj računanjem koncentracije nakon mjerenja apsorpcije u odnosu na apsorpciju otopine standarda.

Za svaki pokus izračuna se srednja vrijednost oslobođenog deksametazona i standardna devijacija za svaki interval.

3.2.5.1. Statistička evaluacija profila oslobađanja

Postoji nekoliko metoda za uspoređivanje profila oslobađanja lijeka. Dije se u 3 kategorije: statističke metode koje mogu biti u jednoj vremenskoj točki ili više, model neovisne metode

koje se dijele na testove omjera i uparene procedure, te model ovisne metode. U procedure uparivanja spada računanje faktora sličnosti f_2 . On je bitan jer je 1995. prihvaćen od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) te Europske agencije za evaluaciju medicinskih proizvoda (EMA) kao kriterij za procjenu sličnosti između dva profila oslobađanja *in vitro* (Costa i Sousa Lobo, 2001).

Za procjenu osjetljivosti metode profili oslobađanja su uspoređeni određivanjem 95%-tnog intervala pouzdanosti faktora sličnosti f_2 prema formuli:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ 100 \cdot \left[1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \right\} \quad (2)$$

R_i i T_i predstavljaju udio oslobođene djelatne tvari u određenom vremenskom intervalu (i) iz referentne odnosno ispitivane formulacije, dok n predstavlja ukupni broj vremenskih intervala iz profila oslobađanja.

Informacije o f_2 nalaze se u trima smjernicama, a FDA smjernice za ispitivanje oslobađanja čvrstih oralnih oblika neposrednog oslobađanja daju najopširniji prikaz koji kaže:

1. potrebne su 3-4 vremenske točke za izračun
2. RSD udjela oslobođene aktivne tvari ne smije biti veći od 20% u ranijim vremenskim točkama (npr. 15 min), a ne veći od 10% za ostale vremenske točke
3. potrebno je koristiti iste uvjete i za referentni i ispitivani oblik
4. potrebno je koristiti rezultate 12 ispitivanja za referentni i ispitivani oblik te samo jedno ispitivanje ako je oslobađanje veće od 85%

No, kada varijabilnost onemogućí ispunjenje navedenih pravila, moguće je koristiti neke druge metode poput Bootstrap metode kojom se izračuna f_2 vrijednost i interval pouzdanosti. Bootstrap metoda simulira distribuciju f_2 vrijednosti kako bi odredila sličnost profila oslobađanja. Da bi se dva profila oslobađanja proglasila sličnima, niža vrijednost intervala pouzdanosti (5%-tni percentil) i f_2 moraju biti jednaki 50 ili veći. Upotreba faktora sličnosti f_2 za uspoređivanje profila oslobađanja je regulirana. Može se koristiti samo kod čvrstih oblika neposrednog i kontroliranog oslobađanja te kombinacija navedenog pri jednakim uvjetima, zatim još kod transdermalnih flastera (Stevens i sur., 2015).

Ovdje korištena Bootstrap metoda za računanje 95%-tnog intervala pouzdanosti faktora sličnosti f_2 zapravo nema regulatornu potvrdu jer se radi o parenteralnj formulaciji, no ipak je iskorištena kako bi se dobio i statistički uvid u osjetljivost metode na ispitivane uvjete.

95%-tni intervali pouzdanosti f_2 izračunati su pomoću besplatnog DDSolver dodatka za Microsoft Excel, razvijenog na China Pharmaceutical University. Program je razvijen kako bi se olakšalo i ubrzalo modeliranje i usporedba podataka oslobađanja (Zhang i sur., 2010). Profili oslobađanja analizirani su opcijom „Bootstrap f_2 method“. Iskorišteni su podaci iz 8 vremenskih točaka svakog profila oslobađanja: 30, 60, 120, 180, 300, 360, 720 i 1440 min, a broj uzoraka za Bootstrap metodu postavljen je na 5000.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Topljivost deksametazona

Ravnotežna topljivost deksametazona je određena u 5 različitih ulja kako bi se odabralo najpogodnije ulje za formulaciju, odnosno ono koje bude najbolje otapalo. Također, ispitana je i topljivost deksametazona u uljima s dodatkom 10 i 20% (v/v) Capryola® 90 kao suotapala.

Deksametazon je dobro topljiv u Capryolu® 90. Moghimipour i sur. su Capryol 90® koristili kao kosurfaktant i izmjerena topljivost deksametazona u Capryolu® 90 iznosi $9,93 \pm 0,27$ mg/mL (Moghimipour i sur., 2013).

Rezultati ispitivanja topljivosti deksametazona prikazani su u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Rezultati ispitivanja topljivosti deksametazona u uljima i s dodatkom Capryola® 90

Topljivost s dodatkom 10% i 20% Capryola® 90		
UZORCI	Koncentracija deksametazona (mg/mL)	
	2h	24h
Kikirikijevo ulje	0.057560387	0
Kikirikijevo ulje s 10% Capryola® 90	0.086666924	0.130965067
Kikirikijevo ulje s 20% Capryola® 90	0.261112047	0.290895264
Pamukovo ulje	0.054472393	0.04805925
Pamukovo ulje s 10% Capryola® 90	0.091208886	0.135563795
Pamukovo ulje s 20% Capryola® 90	0.276114676	0.28734345
Kukuruzovo ulje	0.069581496	0.048864047
Kukuruzovo ulje s 10% Capryola® 90	0.078127766	0.123768549
Kukuruzovo ulje s 20% Capryola® 90	0.257116115	0.26881573
Ricinusovo ulje	1.01330703	0.905145829
Ricinusovo ulje s 10% Capryola® 90	1.117290008	1.18474963
Ricinusovo ulje s 20% Capryola® 90	1.140587144	1.250807623
Sezamovo ulje	0.04453895	0.044640644
Sezamovo ulje s 10% Capryola® 90	0.06899547	0.126856535
Sezamovo ulje s 20% Capryola® 90	0.249867041	0.179363611

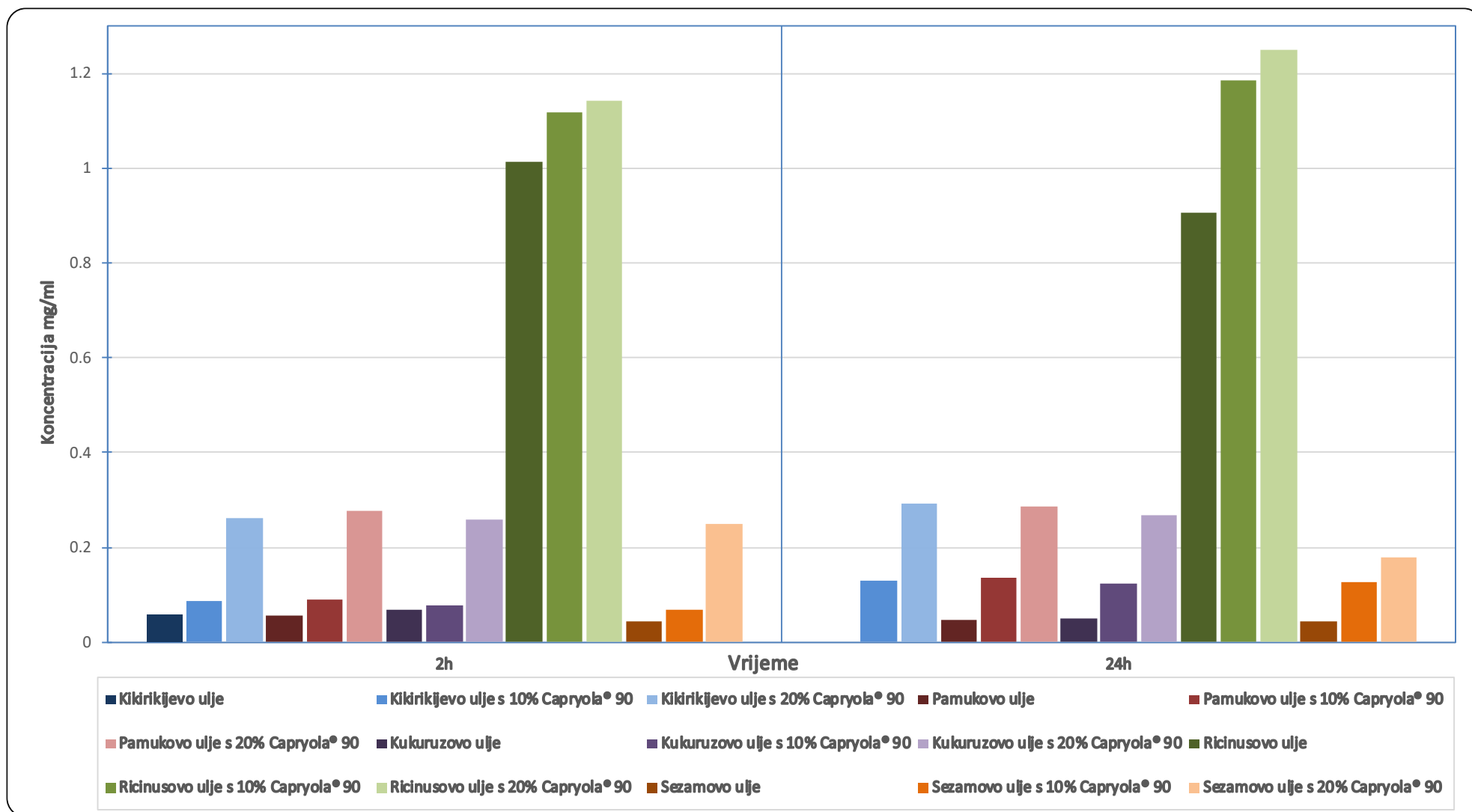
Na slici 7 prikazana je topljivost deksametazona u pojedinim uljima te s dodatkom Capryola® 90. Ulja bez suotapala slabo otapaju deksametazon (osim ricinusovo) i nakon 24 sata nema primjetnog povećanja topljivosti, manje je u odnosu na 2 sata.

Dodatak 10% (v/v) Capryola® 90 poboljšava topljivost u odnosu na sama ulja u oba intervala, a pogotovo nakon 24 sata gdje ne dolazi do pada topljivosti kao kod samih ulja. Uz 20% (v/v) Capryola® 90 veća je topljivost nego s 10% Capryola® (v/v) 90 što je u skladu s očekivanjima, a vidljivo je blago povećanje topljivosti između 2 sata i 24 sata (u sezamovom ulju se smanjilo nakon 24 sata).

Nakon provedenog ispitivanja, ricinusovo ulje se pokazalo kao najbolje otapalo deksametazona. Capryol® 90 još dodatno povećava topljivost što omogućuje veću koncentraciju otopljenog deksametazona u formulaciji. Ostala ulja imaju slične rezultate čemu

je vjerojatni uzrok sličan sastav masnih kiselina (uglavnom oleinska i linolna kiselina). Povećanu topljivost u ricinusovom ulju uzrokuje ricinolna kiselina koje ima oko 90% (Tablica 1.1). Hidroksilna skupina ricinolne kiseline stvara vodikove veze s deksametazonom koji ima 6 akceptorskih skupina za vodikove veze i pojačava učinak otapanja ricinusovog ulja.

Odabrana formulacija s kojom se pristupilo daljnjim pokusima sadrži ricinusovo ulje s 20% (v/v) Capryola® 90 i koncentraciju deksametazona od 1 mg/mL. Izabrana koncentracija je niža od izmjerene (1,25 mg/mL) kako bi bili sigurni da će se sav deksametazon otopiti u formulaciji.



Slika 7. Koncentracija otopljenog deksametazona u uljima te s dodatkom Capryola® 90, nakon 2 sata i 24 sata

4.2. Određivanje particijskog koeficijenta

Nakon ispitivanja topljivosti i odabira formulacije, ispitano je i razdjeljenje deksametazona između formulacije i vodene faze, odnosno particijski koeficijent. Formulacija je namijenjena parenteralnoj primjeni, stoga je od velike važnosti poznavanje particijskog koeficijenta kako bi se pretpostavilo ponašanje na mjestu primjene. Vodena faza simulira uvjete na mjestu primjene i čini je pufer pH=7,4.

U tablici 4.2 su prikazani rezultati određivanja particijskog koeficijenta.

Tablica 4.2. Rezultati određivanja particijskog koeficijenta deksametazona između formulacije i pufera pH=7,4

Faza	Uzorci	Vrijeme	
		2h	24 h
Uljna faza (mg/mL)	Uzorak 1	0.960171452	0.952561605
	Uzorak 2	1.118385529	1.120316513
	Uzorak 3	1.099698391	1.000187475
	Srednja vrijednost	1.059418457	1.024355198
Vodena faza (mg/mL)	Uzorak 1	0.024566512	0.030689931
	Uzorak 2	0.028875719	0.032454644
	Uzorak 3	0.028163839	0.027388955
	Srednja vrijednost	0.027202023	0.030177843
Suma vodene i uljne faze (mg/mL)		1.086620481	1.054533041
Particijski koeficijent	P	38.94631123	33.94394998
	log P	1.59046633	1.530762379

S obzirom da je niska koncentracija deksametazona u vodenoj fazi nakon 24 sata (0,03 mg/mL), u odnosu na uljnu (1,02 mg/mL), može se pretpostaviti dulje zadržavanje u formulaciji prije prelaska u tkivnu tekućinu. Time se postiže usporeno oslobađanje i produljeno djelovanje.

4.3. Razvoj i evaluacija metode za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije

Razvijena uljna formulacija koja je korištena nema definiranu metodu za ispitivanje oslobađanja. Zato se preporučuje korištenje izmijenjenih (prilagođene ispitivanom pripravku) postojećih metoda opisanih u farmakopeji, u ovom slučaju to je aparatura USP II (metoda rotirajućih lopatica) spregnuta sa spektrofotometrom optičkim vlaknima.

Za *in vitro* ispitivanje oslobađanja korištene su dvije vrste membrana kao nosači formulacije, CE i RC. Izmjenjujući eksperimentalne uvjete poput temperature, brzine okretaja lopatica, medija, prati se promjena oslobađanja deksametazona iz formulacije. Farmakopeje zahtijevaju ispunjavanje uvjeta topljivosti (eng. *sink conditions*) koji se postižu tako da medij bude u volumenu barem 3 puta većem od potrebnog za otapanje prisutne količine djelatne tvari (USP, 2017).

Topljivost deksametazona u puferu pH=7,4 iznosi 0,084 mg/mL (Šutić, 2016). Formulacija sadrži 1 mg deksametazona u 1 mL otopine, stoga je za zadovoljenje uvjeta topljivosti potreban volumen medija od 37,5 mL. Uvjeti su zadovoljeni jer je volumen medija 500 mL što je preko 13 puta više od potrebnog volumena medija.

4.3.1. Oslobođanje deksametazona pod utjecajem degaziranja medija

Medij se sastoji od pufera pH=7,4 volumena 500 mL. Nakon odabira eksperimentalnih uvjeta, pokus je pokrenut na 4 sata. Nakon završetka pokusa primijećeno je mnogo mjehurića zraka u posudi te na sondi, što se također dogodilo pri ponovljenom pokusu. Rezultati su prikazani u tablici 4.3 i tablici 4.4.

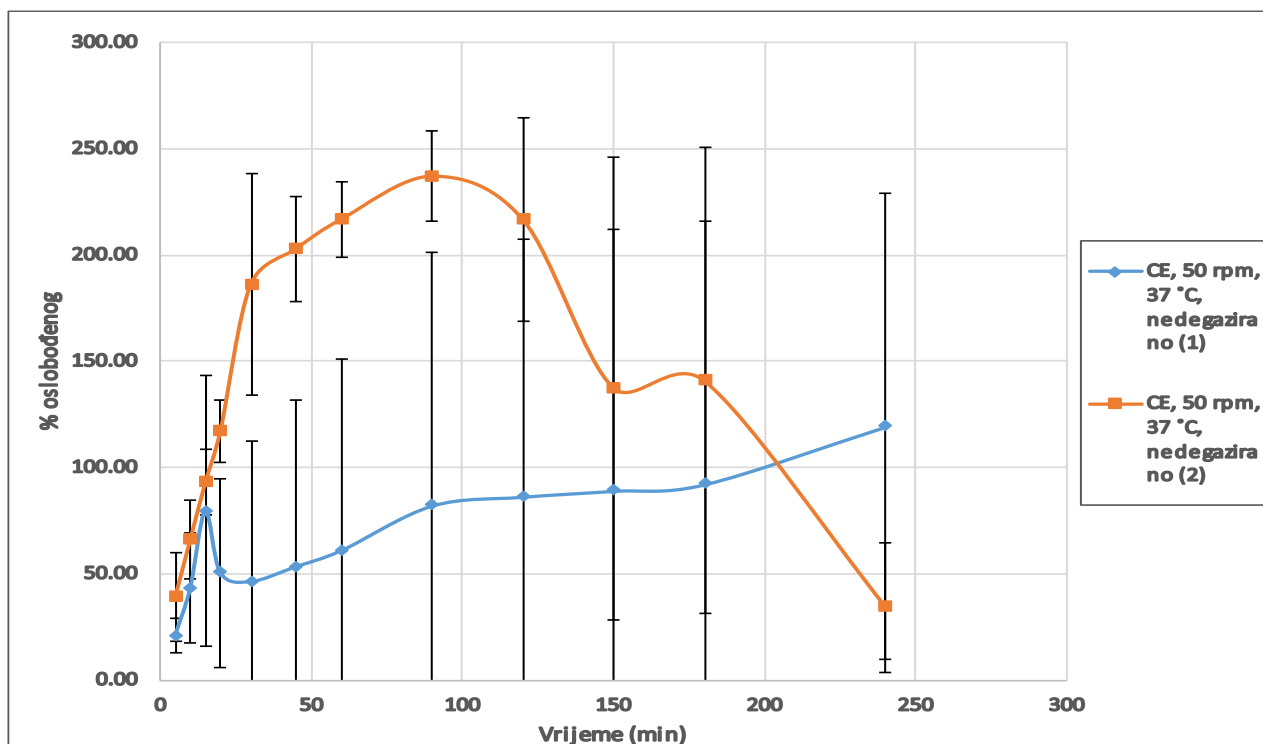
Tablica 4.3. Rezultati oslobođanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran medij, 4 sata (1))

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	11.8	23.4	27	20.73	7.94
10	19.4	39.6	70.6	43.20	25.79
15	26.8	61.2	150.8	79.60	64.01
20	68	83.2	0	50.40	44.30
30	16	122	0.8	46.27	66.03
45	12.2	143.4	4.4	53.33	78.10
60	13.4	164.6	4.8	60.93	89.88
90	16	220.1	9.8	81.97	119.67
120	19.4	226.4	12.6	86.13	121.52
150	20.4	231	15.4	88.93	123.06
180	22.4	235	18.6	92.00	123.86
240	26	239.8	92.2	119.33	109.45

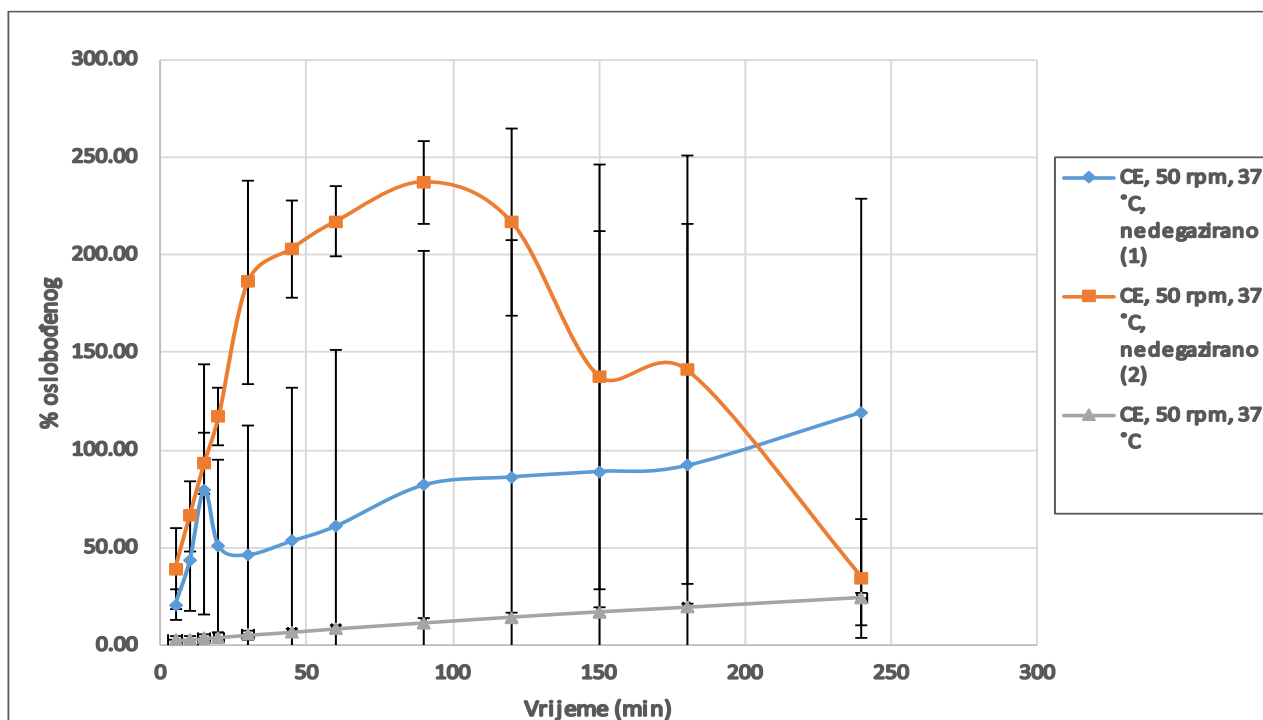
Tablica 4.4. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran medij, 4 sata (2))

<i>t</i> /min	postotak oslobođenog deksametazona				standardna devijacija
	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	
5	61.2	35	20.2	38.80	20.76
10	82.6	69	46.4	66.00	18.29
15	103	100.6	75.2	92.93	15.40
20	118	131.8	102.4	117.40	14.71
30	144	169.8	244.4	186.07	52.14
45	186.8	190.4	231.6	202.93	24.89
60	201.4	212.8	236.4	216.87	17.85
90	215.2	239	257	237.07	20.97
120	220.4	262.4	166.8	216.53	47.92
150	224	15.2	172.8	137.33	108.82
180	226	17	179	140.67	109.65
240	69	19.4	14	34.13	30.32

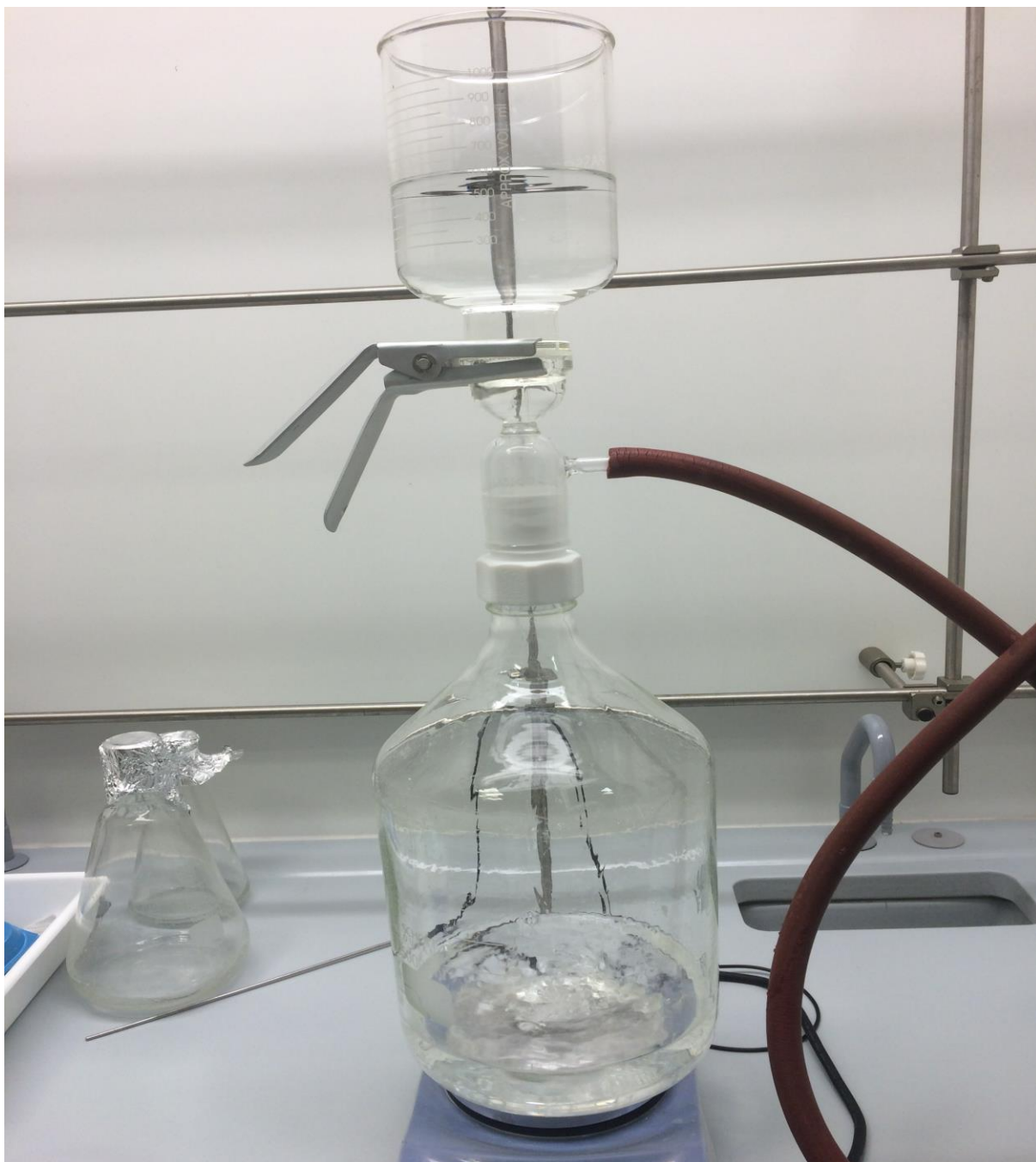
Na slici 8 je grafički prikaz rezultata oslobađanja inicijalnih pokusa. Gledajući prikaz i rezultate vidljiva je velika standardna devijacija te veoma varijabilan proces oslobađanja. S obzirom da je primijećen zrak u posudama, za koji se zna da interferira s mjerenjem apsorbancije, medij je u idućem pokusu degaziran prema uputama farmakopeje. Slika 9 grafički prikazuje utjecaj degaziranja. Grafički prikaz potvrđuje pretpostavku da nedegaziran medij nije prikladan za ovu metodu ispitivanja oslobađanja zbog prisustva zraka. Degaziranje medija je uvedeno kao sastavni dio pripreme medija budućih pokusa (Slika 10).



Slika 8. Oslobođanje deksametazona iz formulacije bez degaziranja medija (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran medij, 4 sata)



Slika 9. Utjecaj degaziranja na oslobođanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran i degaziran medij, 4 sata)



Slika 10. Proces degaziranja pod vakuumom (autorska fotografija)

4.3.2. Utjecaj temperature na brzinu oslobađanja deksametazona

Temperatura medija je postavljena na 37 °C što je jednako tjelesnoj temperaturi. Temperatura treba simulirati uvjete u kojima se formulacija nalazi na mjestu primjene. Osjetljivost metode na promjenu temperature ispitivanjem oslobađanja ispitana je analizom na 25 °C. Tablice 4.5 i 4.6 prikazuju rezultate oslobađanja pri različitim temperaturama.

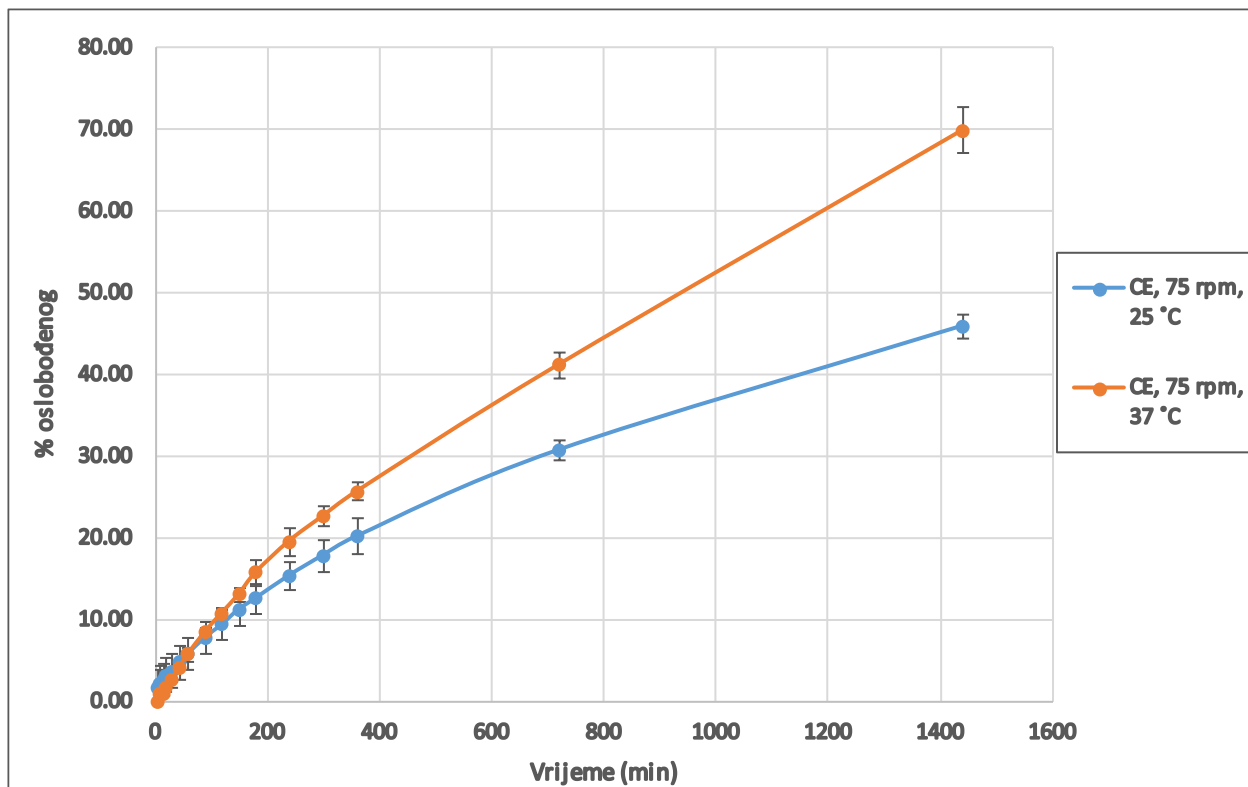
Tablica 4.5. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 25°C, 24 sata)

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0	4.1	1	1.70	2.14
10	0.4	4.7	1.7	2.27	2.21
15	1	4.7	2.2	2.63	1.89
20	1.4	5.5	2.6	3.17	2.11
30	2	6.1	3.1	3.73	2.12
45	3	7	4.2	4.73	2.05
60	4.2	8	5.15	5.78	1.98
90	6	9.9	7.4	7.77	1.98
120	7.8	11.3	9	9.37	1.78
150	9.2	13	11.4	11.20	1.91
180	10.8	14.4	12.5	12.57	1.80
240	13.6	17	15.5	15.37	1.70
300	15.8	19.6	18.1	17.83	1.91
360	17.8	22	20.7	20.17	2.15
720	29.2	31.5	31.5	30.73	1.33
1440	44.4	46.1	47.3	45.93	1.46

Tablica 4.6. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 37°C, 24 sata)

<i>t</i> /min	postotak oslobođenog deksametazona				standardna devijacija
	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	
5	0	0	0	0.00	0.00
10	0.4	1.4	0.8	0.87	0.50
15	1.2	0.8	1	1.00	0.20
20	1.6	1.6	1.6	1.60	0.00
30	2.8	2.4	2.6	2.60	0.20
45	4.6	4	4	4.20	0.35
60	6.8	5.2	5.4	5.80	0.87
90	9	8	8.4	8.47	0.50
120	11.4	10.4	10.6	10.80	0.53
150	14	12.4	12.8	13.07	0.83
180	17.4	14.4	15.4	15.73	1.53
240	21.4	18	19.4	19.60	1.71
300	23.6	21.4	23	22.67	1.14
360	26.6	24.4	26	25.67	1.14
720	42.2	39.4	42	41.20	1.56
1440	73	69.2	67.6	69.93	2.77

Na slici 11 grafički je prikazano oslobađanje pri različitim temperaturama. Pri nižoj se temperaturi očekuje smanjena topljivost deksametazona, posljedično i manje oslobađanje. Smanjenjem temperature smanjuje se kinetička energija čestica što vodi k sporijem oslobađanju. Očekivano, viša temperatura uzrokuje brže oslobađanje što pokazuju i rezultati (69,93% naspram 45,93%). f_2 vrijednost određena Bootstrap metodom, faktor sličnosti, iznosi 50,549, a 5%-tni percentil 47,971. Kako je 5%-tni percentil niži od 50, metoda se može smatrati osjetljivom na temperaturu i profili oslobađanja nisu slični.



Slika 11. Utjecaj temperature na oslobađanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 37°C i 25°C, 24 sata)

4.3.3. Utjecaj duljine membrane na brzinu oslobađanja deksametazona

CE membrane su dosad korištene u istoj duljini za svaki pokus kako bi se izbjegao mogući utjecaj na oslobađanje. Uobičajena duljina membrane je namještena tako da 1 mL formulacije stane u membranu između štipaljki bez uklapanja mjehurića zraka. Ispitan je mogući utjecaj duljine membrane na oslobađanje produljivanjem membrane. Rezultati koji prikazuju oslobađanje ovisno o duljini membrane prikazani su u tablici 4.7 i tablici 4.8.

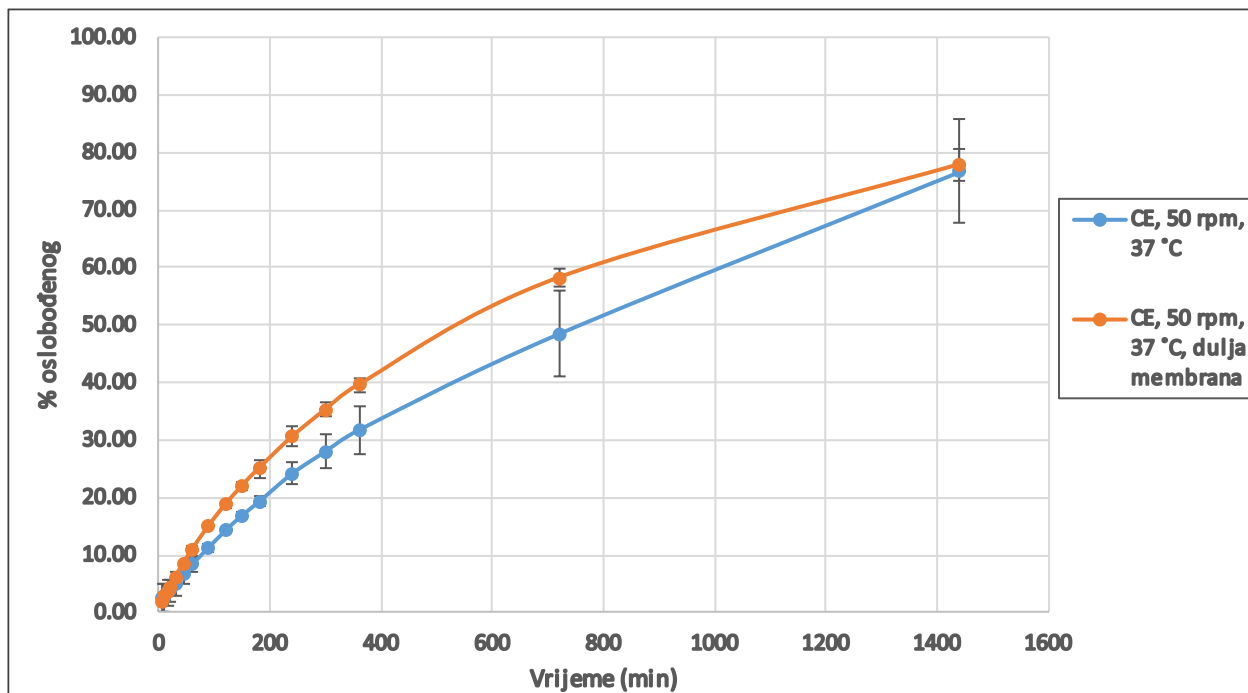
Tablica 4.7. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata, dulja membrana)

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0	2.4	3.6	2.00	1.83
10	1.2	3.2	4.4	2.93	1.62
15	1.8	3.8	5.2	3.60	1.71
20	2.4	4.6	5.8	4.27	1.72
30	4.2	6.6	7.6	6.13	1.75
45	6.4	9.2	10.2	8.60	1.97
60	8.8	11.4	12.4	10.87	1.86
90	13	15.6	16.6	15.07	1.86
120	16.6	19.2	20.4	18.73	1.94
150	19.6	22.4	24	22.00	2.23
180	22.8	25.6	26.6	25.00	1.97
240	28.4	30.8	32.4	30.53	2.01
300	33	35.6	37.2	35.27	2.12
360	37.2	39.8	41.8	39.60	2.31
720	55.4	58	61.2	58.20	2.91
1440	74.4	78.8	80.4	77.87	3.11

Tablica 4.8. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata, uobičajena duljina membrane)

<i>t</i> /min	postotak oslobođenog deksametazona				standardna devijacija
	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	
5	0	3	4.8	2.60	2.42
10	0	2.8	5	2.60	2.51
15	1.2	3.6	5.6	3.47	2.20
20	2	4	5.8	3.93	1.90
30	3	5.2	7.2	5.13	2.10
45	5	6.8	8	6.60	1.51
60	7	8.4	9.6	8.33	1.30
90	10.6	11.4	12	11.33	0.70
120	14	14.2	14.6	14.27	0.31
150	17.4	16.6	16.8	16.93	0.42
180	20.2	19	18.6	19.27	0.83
240	26.4	23.4	22.8	24.20	1.93
300	31.6	26.8	25.8	28.07	3.10
360	36.4	30.4	28.6	31.80	4.08
720	56.8	46.2	42.6	48.53	7.38
1440	83.4	80.4	66.4	76.73	9.07

Na slici 12 nalazi se grafički prikaz oslobađanja pri različitoj duljini membrane. Dulja membrana ima veću kontaktnu površinu s medijem što bi trebalo pogodovati i većem oslobađanju. Iako dulja membrana ima veće oslobađanje tijekom cijelog trajanja pokusa, na kraju je konačni postotak veoma sličan. To pokazuje i vrijednost f_2 izračunat Bootstrap metodom, koji iznosi 61,568, te 5%-tni percentil koji je veći od 50 (52,748), što govori da su profili oslobađanja slični. Može se zaključiti da duljina membrane nema značajni utjecaj na oslobađanje deksametazona, suprotno očekivanjima. Vjerojatni uzrok je viskoznost ricinusovog ulja koje zauzima jednaki volumen membrane bez obzira na duljinu membrane.



Slika 12. Utjecaj duljine membrane na oslobađanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata, različita duljina membrane)

4.3.4. Utjecaj brzine vrtnje (rpm) na brzinu oslobađanja deksametazona

Američka farmakopeja preporučuje brzinu vrtnje lopatica od 50 i 75 rpm za oblike neposrednog oslobađanja na aparaturi II. Za oblike produljenog oslobađanja može se koristiti i brzina od 100 rpm, uz opravdanje. Promjena brzine vrtnje je opravdana za postizanje IVIVC ili ako je metoda diskriminativnija bez negativnog utjecaja na varijabilnost same metode (USP, 2017).

Ispitano je oslobađanje deksametazona promjenom brzine vrtnje. Korištene brzine vrtnje su 50 i 75 rpm. Rezultati oslobađanja su prikazani u tablicama 4.9 i 4.10.

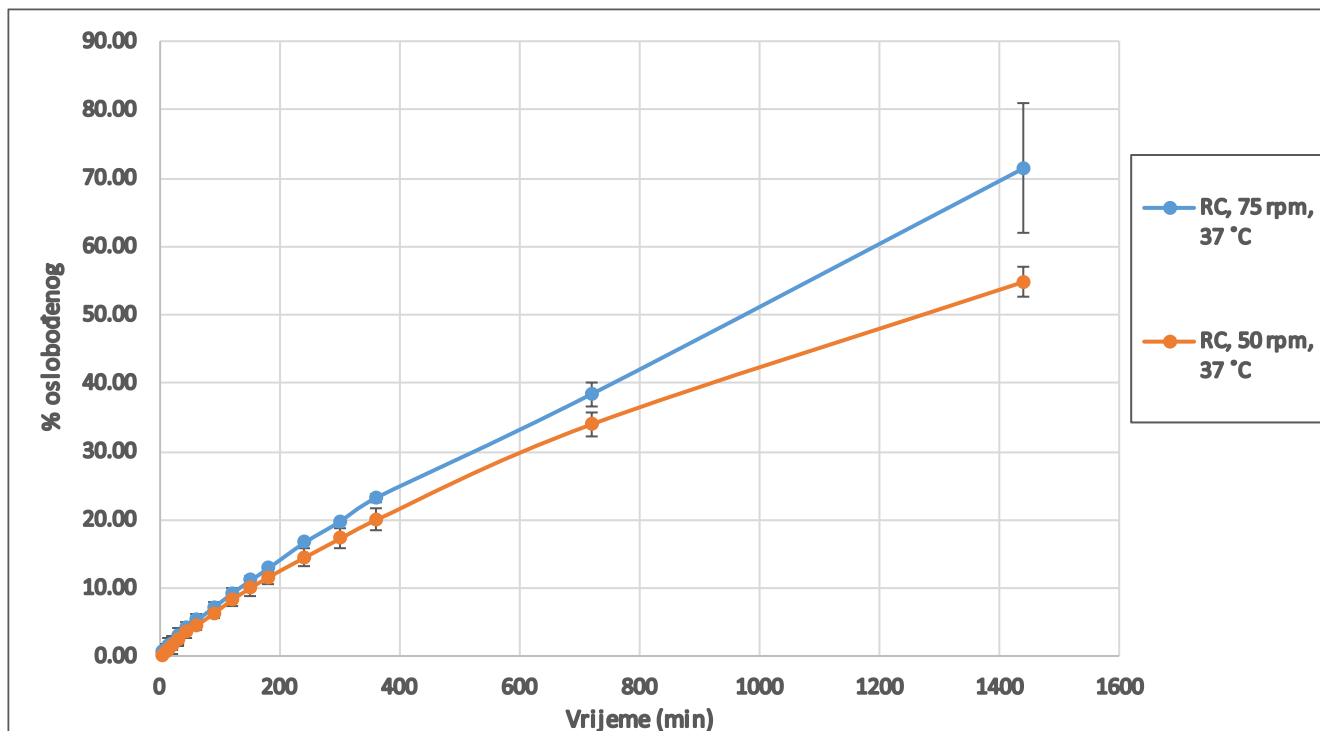
Tablica 4.9. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata)

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0	0	0	0.00	0.00
10	0.2	1	0.4	0.53	0.42
15	0.4	1.8	1	1.07	0.70
20	0.8	2	1.6	1.47	0.61
30	1.8	2.8	2.8	2.47	0.58
45	3	4.2	3.2	3.47	0.64
60	4.2	5.2	4.2	4.53	0.58
90	5.8	7.2	6	6.33	0.76
120	7.8	9.4	7.8	8.33	0.92
150	9.4	11.2	9.4	10.00	1.04
180	11.2	12.6	11	11.60	0.87
240	14	16	13.4	14.47	1.36
300	16.8	19	16	17.27	1.55
360	19.6	21.8	18.6	20.00	1.64
720	33.4	36	32.6	34.00	1.78
1440	55.6	56.4	52.4	54.80	2.12

Tablica 4.10. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, 24 sata)

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0	0.2	1.4	0.53	0.76
10	0.2	1.2	1.8	1.07	0.81
15	0.6	1.6	2.6	1.60	1.00
20	0.4	1.8	3	1.73	1.30
30	1.6	2.8	4.2	2.87	1.30
45	3.2	4.4	4.8	4.13	0.83
60	4.2	5.4	6	5.20	0.92
90	6.2	7.4	8	7.20	0.92
120	8.2	9.6	9.8	9.20	0.87
150	10.4	11.2	11.6	11.07	0.61
180	12.4	13.2	13	12.87	0.42
240	16.4	16.8	16.6	16.60	0.20
300	20	19.6	19.6	19.73	0.23
360	23.8	23	22.8	23.20	0.53
720	40.2	38.2	36.8	38.40	1.71
1440	80	73	61.2	71.40	9.50

Na slici 13 nalazi se grafički prikaz oslobađanja pri različitim brzinama vrtnje. Očekuje se brže oslobađanje pri većoj brzini vrtnje. Veća brzina uzrokuje brže gibanje čestica i češće doticanje medija i formulacije. Rezultati odgovaraju očekivanjima, pri bržoj vrtnji deksametazon se brže oslobađa (71,40% prema 54,80%). Iako je vidljiva razlika u oslobađanju, prema f_2 vrijednosti određenoj Bootstrap metodom (59,874) i 5%-tnom percentilu koji je malo veći od 50 (52,429), zaključuje se da su profili oslobađanja pri datim brzinama vrtnje slični. Stoga se metoda ne može smatrati osjetljivom na promjenu brzine vrtnje. Niža varijabilnost u zadnjem intervalu kod 50 rpm ukazuje da je za duže pokuse prikladnija niža brzina vrtnje.



Slika 13. Utjecaj brzine vrtnje na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC membrana, 50 i 75 rpm, 37 °C, 24 sata)

4.3.5. Utjecaj medija na brzinu oslobađanja deksametazona

Medij je također jedan od parametara čija promjena može rezultirati promjenom oslobađanja. Promjena medija se može odnositi na promjenu volumena ili na dodatak drugih tvari. U ovom slučaju dodano je 10% etanola (v/v) kao molekule koja poboljšava topljivost samog medija.

Rezultati oslobađanja dodatkom etanola prikazani su u tablici 4.11.

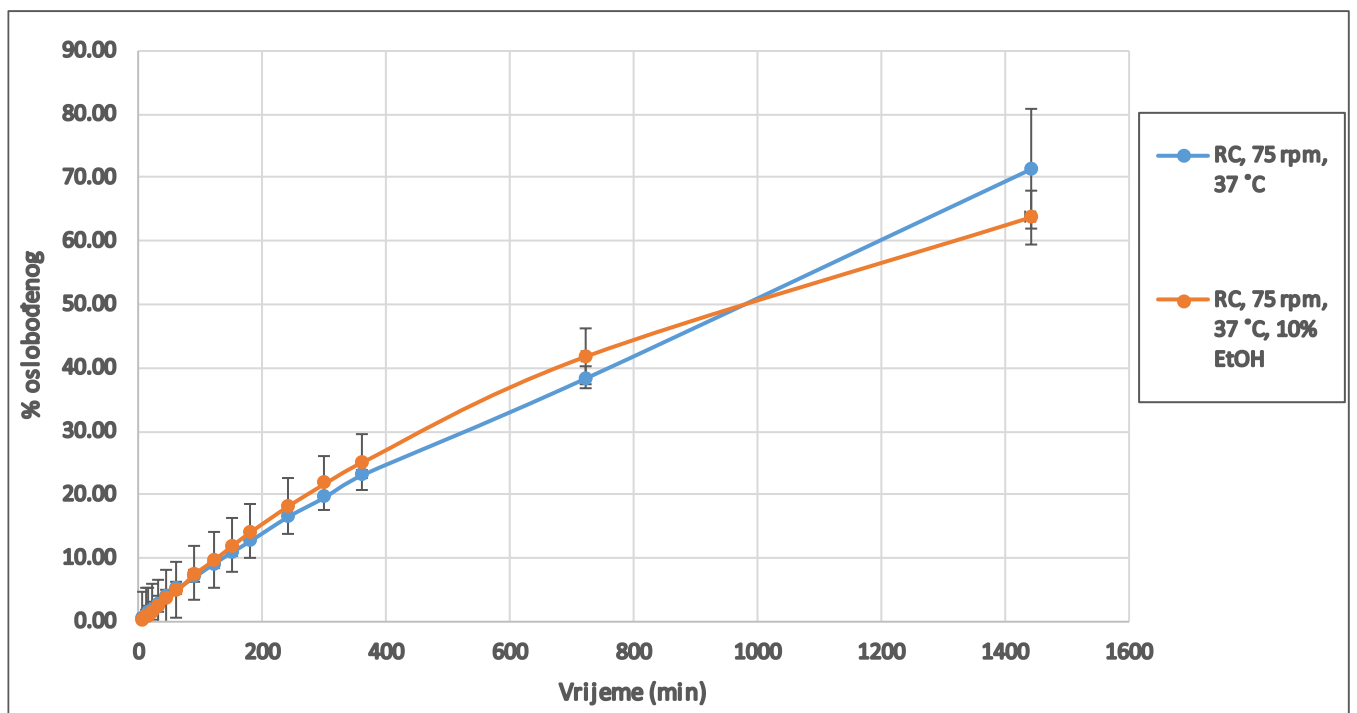
Tablica 4.11. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, 10 % etanola, 24 sata)

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0	0	0.8	0.27	0.46
10	0.8	0.8	1.2	0.93	0.23
15	0.6	1	1.4	1.00	0.40
20	1.2	1.6	2.2	1.67	0.50
30	1.6	2.6	2.8	2.33	0.64
45	3	4	4	3.67	0.58
60	4	5.6	5.2	4.93	0.83
90	6.4	8.4	8.2	7.67	1.10
120	8.2	10.8	10.4	9.80	1.40
150	10.2	13.4	12.6	12.07	1.67
180	12	16	14.8	14.27	2.05
240	15.6	20.4	18.8	18.27	2.44
300	18.8	24.2	22.6	21.87	2.77
360	21.6	28	26	25.20	3.27
720	36	46	43.4	41.80	5.19
1440	55.2	70.8	65.2	63.73	7.90

Slika 14 grafički prikazuje oslobađanje promjenom medija. Oslobađanje uz etanol je blago brže od uobičajenog medija većinu vremena, no na kraju je uz etanol oslobođeno manje deksametazona. Etanol bi trebao poboljšati oslobađanje jer deksametazon ima veću topljivost u puferu s dodatkom etanola, no rezultati to nisu potvrdili (Šutić, 2016). Moguće je da ulazi u

formulaciju kroz membranu pa potiče otapanje deksametazona u formulaciji te ne dolazi do bržeg oslobađanja.

f_2 vrijednost određena Bootstrap metodom iznosi 73,774 dok 5%-tni percentil iznosi 60,976. 5%-tni percentil je veći od 50 i zaključuje se da su profili oslobađanja, uz etanol i bez njega, slični. Metoda nije osjetljiva na promjenu medija dodatkom etanola zbog već prisutne osigurane topljivosti, stoga etanol nema bitan utjecaj na oslobađanje.



Slika 14. Utjecaj promjene medija na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, medij s i bez 10 % etanola, 24 sata)

4.3.6. Utjecaj volumena formulacije na brzinu oslobađanja deksametazona

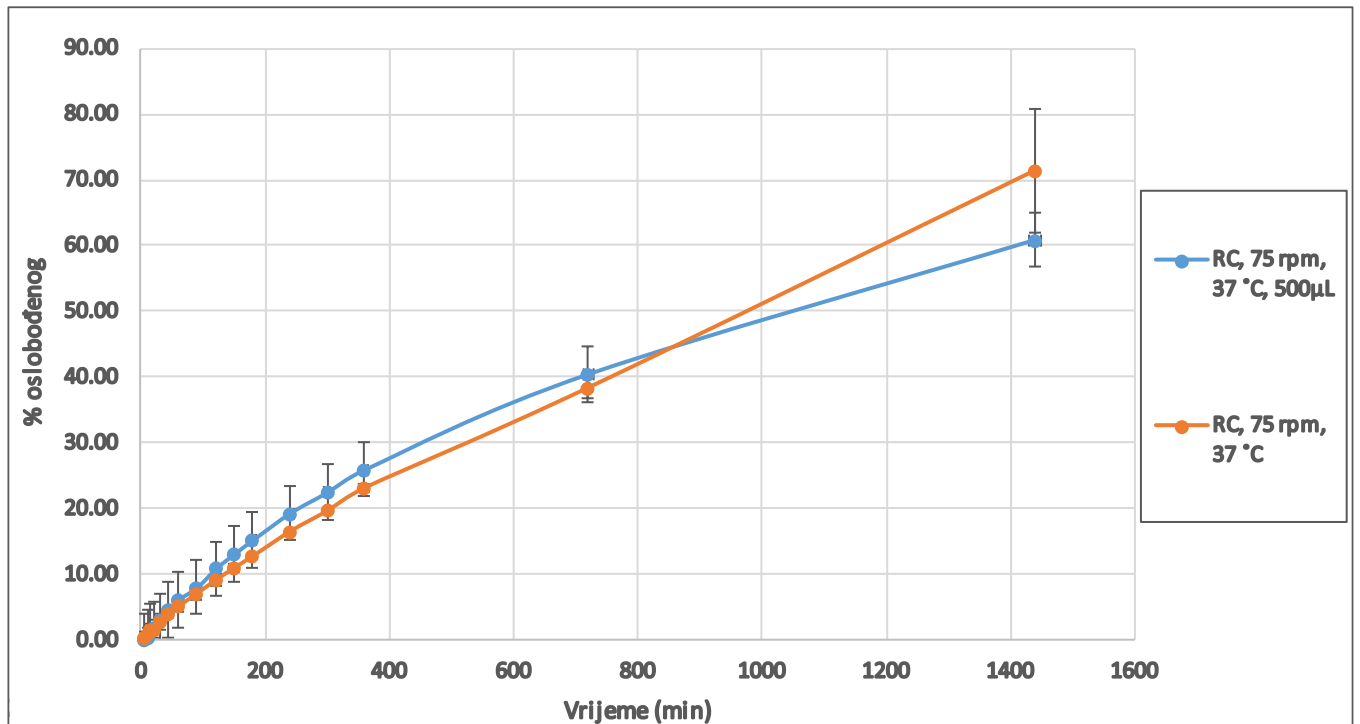
Korišteni volumen formulacije iznosi 1 mL. Ispitan je utjecaj smanjenja volumena na 0,5 mL na oslobađanje deksametazona iz formulacije. Manji volumen sadrži jednaku koncentraciju deksametazona, a duplo manju masu. Tablica 4.12 prikazuje rezultate oslobađanja iz formulacije promjenom volumena formulacije.

Tablica 4.12. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, volumen formulacije 0,5 mL, 24 sata)

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0	0	0	0.00	0.00
10	0.8	0.7	0	0.50	0.44
15	1.3	2.2	0.7	1.40	0.75
20	2.2	1.8	1.6	1.87	0.31
30	3.2	4.3	1.6	3.03	1.36
45	5	6.1	3	4.70	1.57
60	6.4	8.2	4	6.20	2.11
90	8.3	9.3	6.7	8.10	1.31
120	10.5	13.9	8.4	10.93	2.78
150	12.5	16.8	10.2	13.17	3.35
180	14.5	19.3	12.1	15.30	3.67
240	17.5	24.6	16	19.37	4.59
300	20.6	28.1	18.9	22.53	4.90
360	23.7	31.9	22.3	25.97	5.19
720	37.4	48.7	35.3	40.47	7.21
1440	57.1	72.5	53	60.87	10.28

Na slici 15 je grafički prikaz oslobađanja promjenom volumena formulacije. Oslobađanje iz formulacije s manjim volumenom bi trebalo biti niže zbog manje količine deksametazona u formulaciji. Formulacija manjeg volumena otpušta manje deksametazona potvrdivši pretpostavku, no profili oslobađanja su i dalje slični gledajući vrijednosti f_2 i 5%-tnog

percentila (68,272 odnosno 56,097) određenih Bootstrap metodom. Iz sličnosti profila može se zaključiti da metoda nije osjetljiva na promjenu volumena formulacije. Manji volumen nije primjenjiv za ispitivanje oslobađanja jer produžuje vrijeme trajanja oslobađanja.

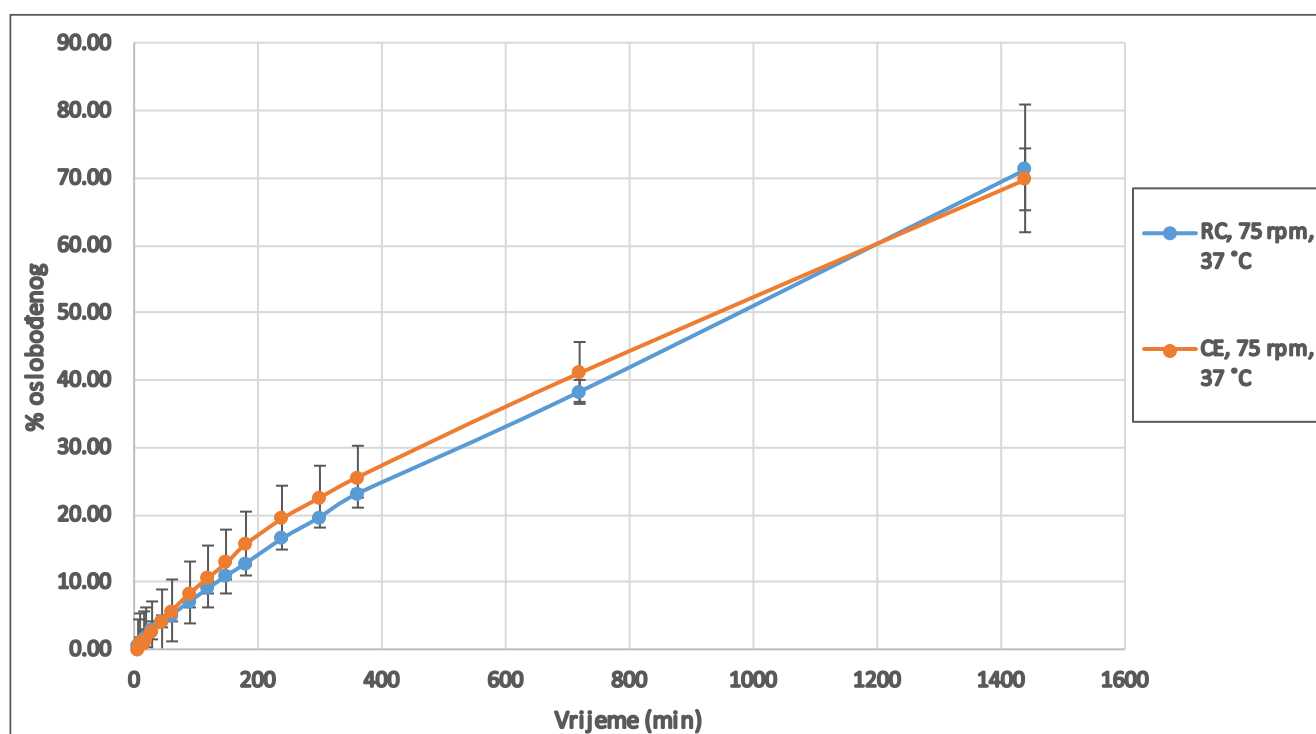


Slika 15. Utjecaj volumena formulacije na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, volumen formulacije 1 mL i 0,5 mL, 24 sata)

4.3.7. Utjecaj membrane na brzinu oslobađanja deksametazona

Dvije vrste membrane su korištene kao nosači formulacije, membrana regenerirane celuloze i celuloza estera. Različite su mase molekula koje propuštaju (300 kD su CE, a 50 kD RC) pa se ispitala mogućnost različite brzine oslobađanja. Rezultati su prikazani u prethodnim tablicama 4.6 i 4.10.

Na slici 16 prikazan je graf oslobađanja deksametazona iz obje membrane pri jednakim uvjetima. Profili oslobađanja su veoma slični kao što je vidljivo i grafički, a to potvrđuje i f_2 vrijednost koja iznosi 81,518, te 5%-tni percentil veći od 50 (69,536), određeni Bootstrap metodom. Odabir membrane nema značajan utjecaj na oslobađanje deksametazona.



Slika 16. Utjecaj membrane na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC i CE membrana, 75 rpm, 37 °C, 24 sata)

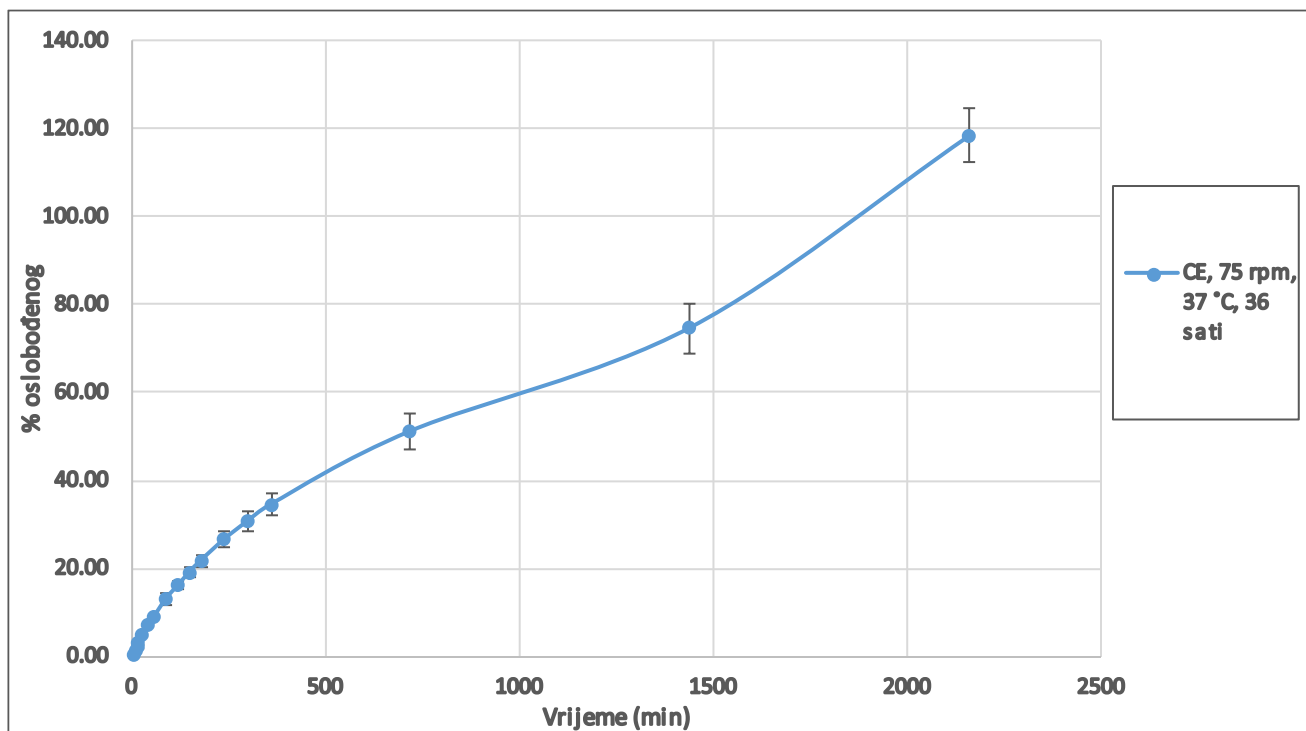
4.3.8. Ispitivanje trajanja potpunog oslobađanja deksametazona

Pokusi su izvođeni u trajanju od 24 sata. U tom periodu nije došlo do potpunog oslobađanja deksametazona iz formulacije. Produženjem trajanja pokusa ispitano je potrebno vrijeme za potpuno oslobađanje deksametazona iz formulacije. Rezultati su prikazani u tablici 4.13.

Tablica 4.13. Rezultati potpunog oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, 36 sati)

	postotak oslobođenog deksametazona				
<i>t</i> /min	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0	1	0	0.33	0.58
10	1	1.8	1	1.27	0.46
15	1.6	2.4	2	2.00	0.40
20	2.8	3.4	2.6	2.93	0.42
30	4.8	4.6	4.6	4.67	0.12
45	7	6.8	6.8	6.87	0.12
60	9.2	8.8	9.2	9.07	0.23
90	14.4	12	12.8	13.07	1.22
120	16.4	15	16.6	16.00	0.87
150	19.6	17.8	19.8	19.07	1.10
180	22.4	20.2	22.6	21.73	1.33
240	27.2	24.6	27.8	26.53	1.70
300	31.6	28.2	32.2	30.67	2.16
360	35.4	31.6	36.4	34.47	2.53
720	52.8	46.4	54.2	51.13	4.16
1440	77	68.2	78.8	74.67	5.67
2160	124.8	112.6	117.8	118.4	6.12

Na slici 17 je grafički prikaz pokusa u trajanju od 36 sati. Vidljivo je da je za potpuno oslobađanje potrebno oko 1800 minuta, iako isparavanje medija zbog duljeg trajanja pokusa utječe na rezultate. Kako je za potpuno oslobađanje potrebno nešto više od jednog dana (30 sati), formulacija pokazuje produljeno oslobađanje.



Slika 17. Potpuno oslobađanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 37 °C, 36 sati)

5. ZAKLJUČCI

- Među ispitivanim uljima ricinusovo ulje s dodatkom 20% (v/v) Capryola® 90 otapa najveću količinu deksametazona zahvaljujući sastavu masnih kiselina koje sadrži, pretežno ricinolnoj.
- Particijski koeficijent između formulacije i medija pogoduje produljenom oslobađanju deksametazona iz formulacije.
- Pripravljena formulacija pokazuje produljeno djelovanje i može se iskoristiti kao parenteralni pripravak produljenog djelovanja.
- Razvijena je nova metoda za *in vitro* ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije koristeći aparaturu USP II spregnutu optičkim vlaknima, koja se pokazala osjetljivom na promjenu temperature, dok nije osjetljiva na promjenu brzine vrtnje, membrane, medija, volumena formulacije te duljine membrane.

6. LITERATURA

Agilent online UV dissolution systems, 2014., <https://www.agilent.com>, pristupljeno 17.1.2018.

Aulton ME, urednik. *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2002, str. 82.

Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 13(2), 123-33.

Dexamethasone, <https://www.drugbank.ca>, pristupljeno 3.2.2018.

Drug release testing, <http://www.particlesciences.com>, pristupljeno 17.1.2018.

Emami J. *In vitro - in vivo* correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharm Sci*, 2006, 9(2), 169-89.

Fiber-optic UV dissolution system from Agilent technologies, <https://www.labcompare.com>, pristupljeno 5.2.2018.

Florence AT, Attwood D. *Physicochemical principles of pharmacy*. London, Pharmaceutical Press, 2006, str. 140. i 164.

Fredholt K, Larsen DH, Larsen C. Modification of *in vitro* drug release rate from oily parenteral depots using a formulation approach. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(3), 231–7.

Gibson M, urednik. *Pharmaceutical preformulation and formulation*, Boca Raton, CRC, 2004, str. 198. i 246.

Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Registrirani lijekovi koji sadrže deksametazon, 2018. Dostupno na: <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 11.3.2018.

Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Sažetak opisa svojstava lijeka: Dexamethason Krka 4 mg/ml otopina za injekciju ili infuziju, 2013., Dostupno na: http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-13-02-254_.pdf, pristupljeno 17.12.2017.

Larsen C, Weng Larsen S, Jensen H, Yaghmur A, Østergaard J. Role of *in vitro* release models in formulation development and quality control of parenteral depots. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2009, 6:12, 1283-1295.

Mishra M, urednik. Handbook of encapsulation and controlled release. Boca Raton, CRC Press, 2016, str. 1383-1384.

Moghimipour E, Salimi A, Karami M, Isazadeh S. Preparation and Characterization of Dexamethasone Microemulsion Based on Pseudoternary Phase Diagram. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 2013, 8(3), 105-112.

Nema S, Ludwig JD, urednici. Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications: Regulation, validation and the future. London, Informa Healthcare, 2010, str. 111.

Patel VR, Dumancas GG, Kasi Viswanath LC, Maples R, Subong BJJ. Castor Oil: Properties, Uses, and Optimization of Processing Parameters in Commercial Production. *Lipid insights*, 2016, 9, 1-12.

Propylene glycol monocaprylate, <http://chemicalland21.com>, pristupljeno 5.2.2018.

Rabasco Alvarez AM, González Rodríguez ML. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites*, 2000, 51 (1-2), 74-96.

Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 2012, 195727.

Seidlitz A, Weitschies W. *In-vitro* dissolution methods for controlled release parenterals and their applicability to drug-eluting stent testing. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 64, 969–985.

Shargel L, Wu-Pong S, Yu A. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. New York, McGraw Hill, 2004, str. 504 i 512.

Shen J, Burgess DJ. Accelerated *in vitro* release testing methods for extended release parenteral dosage forms. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2012, 64(7), 986-996.

Siewert M, Dressman J, Brown CK, Vinod PS, Aiache JM, Aoyagi N, Bashaw D, Brown W, Burgess D, Crison J, DeLuca P, Djerki R, Dressman J, Foster T, Gjellan K, Gray V, Hussain A, Ingallinera T, Klancke J, Kraemer J, Kristensen H, Kumi K, Leuner C, Limberg J, Loos P, Margulis L, Marroum P, Moeller H, Mueller B, Mueller-Zsigmondy M, Okafo N, Ouderkirk L, Parsi S, Qureshi S, Robinson J, Uppoor R, Williams R. FIP/AAPS guidelines to dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech*, 2003, 4(1), 43-52.

Stevens RE, Gray V, Dorantes A, Gold L, Pham L. Scientific and Regulatory Standards for Assessing Product Performance Using the Similarity Factor, *f*₂. *AAPS Journal*, 2015, 17(2), 301-306.

Struktura deksametazona, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 2.2.2018.

Struktura ricinolne kiseline, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 2.2.2018.

Šutić A. Razvoj *in vitro* metode za ispitivanje brzine oslobađanja deksametazona iz topikalne nanosuspenzije, diplomski rad, 2016.

Troy DB, Beringer P, urednici. Remington: The science and practice of pharmacy. Maryland, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, str. 803.

U.S. Pharmacopoeia-National Formulary [USP 40 NF 35]. Rockville, 2017, United States Pharmacopoeial Convention, [711] Dissolution.

U.S. Pharmacopoeia-National Formulary [USP 40 NF 35]. Rockville, 2017, United States Pharmacopoeial Convention, [1092] The dissolution procedure: Development and validation.

Webster GK, Jackson D, Bell R, urednici. Poorly soluble drugs: Dissolution and drug release. U: Dissolution of lipid-based drug formulations. Cafiero SM, urednik, Pan Stanford Publishing, Singapore, 2017.

Weng Larsen S, Larsen C. Critical Factors Influencing the *In Vivo* Performance of Long-Acting Lipophilic Solutions- Impact on *In Vitro* Release Method Design. *AAPS J*, 2009, 11(4), 762-70.

Wright JC, Burgess DJ, urednici. Long acting injections and implants. U: Oily (lipophilic) solutions and suspensions. Weng Larsen S, Thing MA, Larsen C, urednici, Springer, New York, 2012.

Yeh C. Handbook of fiber optics. U: The optical fibers. San Diego, Academic Press, 1990, str. 13-36.

Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, Xie S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS Journal*, 2010, 12(3), 263-271.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Deksametazon je često korišten lijek u kroničnoj terapiji velikog broja indikacija. Nalazi se u oralnim, oftalmičkim i parenteralnim pripravcima, no u posljednje se vrijeme puno radi na istraživanju parenteralnih formulacija koje bi imale produženo djelovanje. Takvo djelovanje bi osiguralo manje nuspojave, bolju suradljivost pacijenata i rjeđe doziranje.

Uljne otopine, koje se sastoje od lijeka otopljenog u biljnom ulju s prigodnim dodacima poput suotapala, mogu poslužiti kao sustavi koji bi omogućili produženo djelovanje lijeka. U ovom radu je ispitano nekoliko najkorištenijih ulja s dodatkom suotapala Capryola® 90 kako bi se odabralo najpogodnije ulje kao otapalo. Formulacija s ricinusovim uljem i 20% (v/v) Capryola® 90 odabrana je za razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja.

Trenutno nema definirane metode za ispitivanje oslobađanja parenteralnih pripravaka produženog oslobađanja, stoga je za ispitivanje oslobađanja odabran uređaj eng. *optic fiber*. Sastoji se od jedinice za oslobađanje, koju čini aparatura USP II, spregnute optičkim vlaknima za automatsko određivanje apsorbancije.

Cilj rada je razviti i evaluirati *in vitro* metodu za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz izabrane formulacije. Kao nosači formulacije korištene su membrane celuloza estera i regenerirane celuloze. Formulacija usporeno oslobađa deksametazon i moguće ju je upotrijebiti kao parenteralni pripravak produženog djelovanja. Ispitivanjem utjecaja eksperimentalnih uvjeta na brzinu oslobađanja deksametazona utvrđeno je da razvijena metoda pokazuje osjetljivost na promjenu temperature, dok su profili oslobađanja slični (utvrđeno računanjem f_2 Bootstrap metodom) promjenom ostalih uvjeta.

Dexamethasone is frequently used drug in chronic therapy in large amount of indications. It can be found in oral, ophthalmic and parenteral products, but, lately, there has been an increasing focus on researching the parenteral formulations with prolonged release. Achieving prolonged release would reduce side effects, improve patient adherence and accomplish less frequent drug use.

Lipophilic solutions, that consist of drug dissolved in vegetable oil with apposite additives such as cosolvents, can be used as systems that would enable prolonged drug release. In this study several most used vegetable oils were studied with addition of cosolvent Capryol® 90 in order to pick the most appropriate vegetable oil as solvent. The formulation that consists of ricinus oil and 20% (v/v) of Capryol® 90 was chosen for *in vitro* drug release testing.

Currently, there are no specified methods for drug release tests for prolonged release parenterals, therefore optic fiber device was chosen for drug release testing. It consists of drug release unit which is USP II apparatus coupled with optic fibers for automatic absorbency determination.

The aim of this study is to develop and evaluate *in vitro* method for drug release testing of dexamethasone from chosen formulation. Cellulose ester and regenerated cellulose membranes were used as formulation carriers. Dexamethasone is slowly released and formulation can be used as prolonged release parenteral formulation. By studying the effect of experimental conditions on drug release rate of dexamethasone it is concluded that the developed method is sensitive to temperature changes, while changing other conditions showed that dissolution profiles were similar (concluded by determination of f_2 with Bootstrap method).

8. PRILOZI

8.1. Popis tablica

Tablica 1.1. Sastav masnih kiselina najupotrebljavanijih biljnih ulja (preuzeto i prilagođeno od Mishra, ured., 2016)	4
Tablica 3.1. Sastav mobilne faze tijekom gradijentne elucije u HPLC metodi za određivanje koncentracije deksametazona pri ispitivanju topljivosti i particijskog koeficijenta	21
Tablica 4.1. Rezultati ispitivanja topljivosti deksametazona u uljima i s dodatkom Capryola® 90.....	29
Tablica 4.2. Rezultati određivanja particijskog koeficijenta deksametazona između formulacije i pufera pH=7,4.....	32
Tablica 4.3. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran medij, 4 sata (1))	34
Tablica 4.4. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran medij, 4 sata (2))	35
Tablica 4.5. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 25°C, 24 sata)	38
Tablica 4.6. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 37°C, 24 sata)	39
Tablica 4.7. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata, dulja membrana)	41
Tablica 4.8. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata, uobičajena duljina membrane)	42
Tablica 4.9. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata)	44

Tablica 4.10. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, 24 sata)	45
Tablica 4.11. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, 10 % etanola, 24 sata)	47
Tablica 4.12. Rezultati oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, volumen formulacije 0,5 mL, 24 sata)	49
Tablica 4.13. Rezultati potpunog oslobađanja deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, 36 sati).....	52

8.2. Popis slika

Slika 1. Prikaz procesa koji utječu na farmakokinetiku lijekovitih tvari nakon injektiranja lipofilne otopine lijeka. D predstavlja lijek ili prolijek (preuzeto i prilagođeno od Weng Larsen i Larsen, 2009).....	2
Slika 2. Struktura ricinolne kiseline (preuzeto s www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).....	6
Slika 3. Osnovne metode oslobađanja za parenteralne oblike produženog djelovanja. Sive točkice predstavljaju lijekovitu tvar, strelice prema gore označavaju uzorkovanje, točkice predstavljaju membranu kod metoda dijalize, isprekidane linije i strelice određuju smjer protoka medija za metode s protočnim ćelijama (preuzeto i prilagođeno od Seidlitz i Weitschies, 2012).....	13
Slika 4. Uređaj za ispitivanje oslobađanja spregnut optičkim vlaknima sa spektrofotometrom (preuzeto s www.labcompare.com).....	15
Slika 5. Struktura deksametazona (preuzeto s www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).....	16
Slika 6. CE membrane s formulacijom prije ubacivanja u posude za oslobađanje (autorska fotografija).....	24
Slika 7. Koncentracija otopljenog deksametazona u uljima te s dodatkom Capryola® 90, nakon 2 sata i 24 sata.....	31
Slika 8. Oslobađanje deksametazona iz formulacije bez degaziranja medija (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran medij, 4 sata)	36
Slika 9. Utjecaj degaziranja na oslobađanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, nedegaziran medij, 4 sata)	36
Slika 10. Proces degaziranja pod vakuumom (autorska fotografija)	37
Slika 11. Utjecaj temperature na oslobađanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 37°C i 25°C, 24 sata).....	40
Slika 12. Utjecaj duljine membrane na oslobađanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 50 rpm, 37 °C, 24 sata, različita duljina membrane)	43
Slika 13. Utjecaj brzine vrtnje na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC membrana, 50 i 75 rpm, 37 °C, 24 sata).....	46

Slika 14. Utjecaj promjene medija na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, medij s i bez 10 % etanola, 24 sata).....	48
Slika 15. Utjecaj volumena formulacije na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC membrana, 75 rpm, 37 °C, volumen formulacije 1 mL i 0,5 mL, 24 sata)	50
Slika 16. Utjecaj membrane na oslobađanje deksametazona iz formulacije (RC i CE membrana, 75 rpm, 37 °C, 24 sata).....	51
Slika 17. Potpuno oslobađanje deksametazona iz formulacije (CE membrana, 75 rpm, 37 °C, 36 sati).....	53

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Samostalni kolegij (Industrijska farmacija)
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije s dodatkom Capryola® 90

Ivan Meštrović

SAŽETAK

Deksametazon je često korišten lijek u kroničnoj terapiji velikog broja indikacija. Nalazi se u oralnim, oftalmičkim i parenteralnim pripravcima, no u posljednje se vrijeme puno radi na istraživanju parenteralnih formulacija koje bi imale produženo djelovanje. Takvo djelovanje bi osiguralo manje nuspojave, bolju suradljivost pacijenata i rjeđe doziranje.

Uljne otopine, koje se sastoje od lijeka otopljenog u biljnom ulju s prirodnim dodacima poput suotapala, mogu poslužiti kao sustavi koji bi omogućili produženo djelovanje lijeka. U ovom radu je ispitano nekoliko najkorištenijih ulja s dodatkom suotapala Capryola® 90 kako bi se odabralo najpogodnije ulje kao otapalo. Formulacija s ricinusovim uljem i 20% (v/v) Capryola® 90 odabrana je za razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja.

Trenutno nema definirane metode za ispitivanje oslobađanja parenteralnih pripravaka produženog oslobađanja, stoga je za ispitivanje oslobađanja odabran uređaj eng. *optic fiber*. Sastoji se od jedinice za oslobađanje, koju čini aparatura USP II, spregnute optičkim vlaknima za automatsko određivanje apsorpcije.

Cilj rada je razviti i evaluirati *in vitro* metodu za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz izabrane formulacije. Kao nosači formulacije korištene su membrane celuloza estera i regenerirane celuloze. Formulacija usporeno oslobađa deksametazon i moguće ju je upotrijebiti kao parenteralni pripravak produženog djelovanja. Ispitivanjem utjecaja eksperimentalnih uvjeta na brzinu oslobađanja deksametazona utvrđeno je da razvijena metoda pokazuje osjetljivost na promjenu temperature, dok su profili oslobađanja slični (utvrđeno računanjem f_2 Bootstrap metodom) promjenom ostalih uvjeta.

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

Rad sadrži: 64 stranice, 17 grafičkih prikaza, 15 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Deksametazon, uljna otopina, topljivost, particijski koeficijent, ricinusovo ulje, ispitivanje *in vitro* oslobađanja, *optic fiber*

Mentor: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj

Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Biljana Nigović, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Independent course (Industrial pharmacy)
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Development of method for *in vitro* release testing of dexamethasone from oil formulation with addition of Capryol® 90

Ivan Meštrović

SUMMARY

Dexamethasone is frequently used drug in chronic therapy in large amount of indications. It can be found in oral, ophthalmic and parenteral products, but, lately, there has been an increasing focus on researching the parenteral formulations with prolonged release. Achieving prolonged release would reduce side effects, improve patient adherence and accomplish less frequent drug use.

Lipophilic solutions, that consist of drug dissolved in vegetable oil with apposite additives such as cosolvents, can be used as systems that would enable prolonged drug release. In this study several most used vegetable oils were studied with addition of cosolvent Capryol® 90 in order to pick the most appropriate vegetable oil as solvent. The formulation that consists of ricinus oil and 20% (v/v) of Capryol® 90 was chosen for *in vitro* drug release testing.

Currently, there are no specified methods for drug release tests for prolonged release parenterals, therefore optic fiber device was chosen for drug release testing. It consists of drug release unit which is USP II apparatus coupled with optic fibers for automatic absorbency determination.

The aim of this study is to develop and evaluate *in vitro* method for drug release testing of dexamethasone from chosen formulation. Cellulose ester and regenerated cellulose membranes were used as formulation carriers. Dexamethasone is slowly released and formulation can be used as prolonged release parenteral formulation. By studying the effect of experimental conditions on drug release rate of dexamethasone it is concluded that the developed method is sensitive to temperature changes, while changing other conditions showed that dissolution profiles were similar (concluded by determination of f_2 with Bootstrap method).

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

Thesis includes: 64 pages, 17 figures, 15 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Dexamethasone, oil solution, solubility, partition coefficient, ricinus oil, *in vitro* release testing, optic fiber

Mentor: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.** Senior Research Scientist, PLIVA Research and development

Reviewers: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.** Senior Research Scientist, PLIVA Research and development

Jelena Filipović-Grčić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2018.