

Razvoj i validacija metode za određivanje metadona i metoklopramida u tabletama primjenom ramanove spektroskopije

Pižir, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:999290>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



Ivan Pižir

**Razvoj i validacija metode za određivanje
metadona i metoklopramida u tabletama
primjenom Ramanove spektroskopije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u laboratoriju Odsjeka kemijsko-fizikalnih vještačenja u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ministarstva unutarnjih poslova RH pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan, uz komentorstvo dr. sc. Ivane Bačić.

Zahvaljujem se mentoricama, doc. dr. sc. Jasni Jablan i dr. sc. Ivani Bačić na pruženoj pomoći, ukazanom povjerenju i stečenom znanju tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem se fakultetu što mi je omogućio upoznavanje svih onih fantastičnih ljudi, sada prijatelja, koje su me izgradile kao osobu, a i magistra farmacije!

Zahvaljujem se Ani na pomoći i podršci pri pisanju ovog rada – da nije bilo tebe, još uvijek bih pagirao prvu stranicu.

I naposljetku, iznimno hvala mojoj obitelji na slušanju, podršci i neizmjerne ljubavi!

Lp, vaš dj_pijoo

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Ramanova spektroskopija	1
1.1.1.	Princip Ramanove spektroskopije	1
1.1.2.	Ramanov spektar	3
1.1.3.	Ramanov spektrometar	4
1.1.4.	Primjena Ramanove spektroskopije	5
1.2.	Validacija	6
1.2.1.	Preciznost (engl. Precision)	6
1.2.2.	Specifičnost/selektivnost (engl. Specificity/selectivity).....	7
1.2.3.	Linearnost (engl. Linearity).....	7
1.2.4.	Radno područje (engl. Range).....	7
1.2.5.	Točnost (engl. Accuracy)	7
1.2.6.	Granica dokazivanja (engl. Limit of detection, LOD).....	8
1.2.7.	Granica određivanja (engl. Limit of quantitation, LOQ).....	8
1.2.8.	Izdržljivost/otpornost (engl. Robustness).....	8
1.3.	Djelatne i pomoćne tvari.....	9
1.3.1.	Metadon	9
1.3.2.	Metoklopramid	11
1.3.3.	Laktoza	13
2.	Obrazloženje teme.....	14
3.	Materijali i metode	15
3.1.	Materijali	15
3.1.1.	Radni instrument	15
3.1.2.	Laboratorijski pribor i posuđe	16
3.1.3.	Kemikalije	16
3.2.	Metode.....	17
3.2.1.	Priprema uzorka za analizu.....	17
3.2.2.	Princip metode.....	18
3.2.3.	Statistička obrada rezultata	18
4.	Rezultati i rasprava.....	19
4.1.	Preliminarna ispitivanja	19

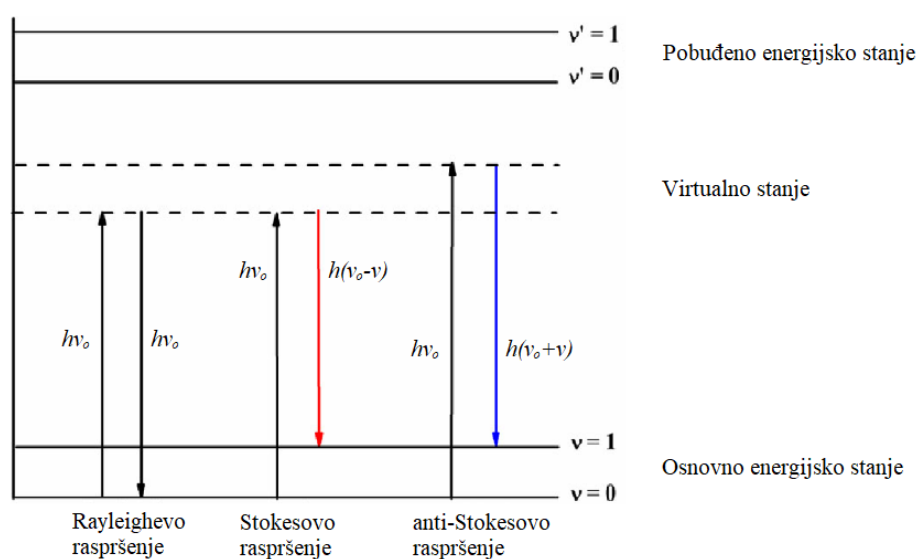
4.2.	Validacija analitičke metode.....	21
4.2.1.	Linearnost	21
4.2.2.	Homogenost.....	24
4.2.3.	Preciznost.....	25
4.2.4.	Točnost	28
4.2.5.	Granica dokazivanja i određivanja	30
4.3.	Primjena metode na realne uzorke	31
5.	Zaključak.....	36
6.	Literatura	37
7.	Sažetak/Summary.....	39
8.	Temeljna dokumentacijska kartica/basic documentation card	

1. Uvod

1.1. Ramanova spektroskopija

1.1.1. Princip Ramanove spektroskopije

Ramanova i infracrvena spektroskopija (IR) su vibracijske spektroskopske tehnike koje su međusobno komplementarne. IR se zasniva na apsorpciji zračenja, dok se Ramanova bazira na fenomenu raspršenja zračenja. Do raspršenja dolazi uslijed sudara ozračenog uzorka i fotona upadnog zračenja. U većini slučajeva prilikom sudara ne dolazi do promjene energije fotona te se takvo raspršenje naziva Rayleighovo ili elastično raspršenje. Kod takvog raspršenja, frekvencija raspršenog fotona jednaka je frekvenciji upadnog zračenja. Tek mali broj fotona izmjenjuje energiju s uzorkom odnosno frekvencija raspršenog fotona bude veća ili manja od upadnog zračenja. Navedeno je primjer neelastičnog ili Ramanovog raspršenja (Šašić i Ozaki, 2008).



Slika 1. Dijagram energijskih prijelaza u Ramanovoj spektroskopiji (preuzeto i prilagođeno prema: Wang i sur., 2018)

Kada se molekula obasja monokromatskim zračenjem dolazi do interakcije upadnih fotona i molekule te posljedično raspršenja svjetlosti. Ukoliko molekula nakon sudara promijeni samo smjer kretanje odnosno ne dolazi do promjene energije, govorimo o već navedenom Rayleigh

raspršenju. Kod Ramanovog raspršenja razlikujemo Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Ako se molekula pobudi iz osnovnog vibracijskog stanja u virtualno stanje, a zatim se spontano vrati u pobuđeno vibracijsko stanje, frekvencija upadnog zračenja (ν_0) je veća od frekvencije raspršenog zračenja ($\nu_0 - \nu$). Takvo raspršenje poznato je kao Stokesovo raspršenje. O anti-Stokesovom raspršenju govorimo ako se molekula pobudi iz pobuđenog vibracijskog stanja u virtualno, a zatim spontano vrati u osnovno vibracijsko stanje. U tom slučaju frekvencija raspršenog zračenja ($\nu_0 + \nu$) je veća od frekvencije upadnog zračenja (ν_0) (Slika 1.) (Wang i sur., 2018).

Anti-Stokesovo raspršenje događa se rijetko s obzirom na to da njegova pojava ovisi o količini molekula u pobuđenom vibracijskom stanju. Vjerojatnije je da će se molekula nalaziti u osnovnom stanju, odnosno češće dolazi do Stokesovog raspršenja. Oba tipa Ramanovog raspršenja su puno slabija te je manja vjerojatnost njihovog događanja u odnosu na Rayleighovo raspršenje (Šašić i Ozaki, 2008).

Polarizabilnost se može shvatiti kao elastičnost elektronskog oblaka tj. koliko lako se može deformirati elektronski oblak. Da bi došlo do Ramanovog raspršenja, molekula mora promijeniti polarizabilnost svog elektronskog oblaka. Štoviše, jača Ramanova raspršenja su povezana s nepolarnim molekulama koje sadrže delokalizirani elektronski oblak ili konjugirani sustav. Većina aktivnih farmaceutskih tvari (API) sadržava navedene domene, dok s druge strane većina pomoćnih tvari su alifatski prsteni/lanci te daju slabiji Ramanov signal (Strachan i sur., 2007).

Fluorescencija je pojava koja se javlja kada energija pobudnog zračenja uzrokuje prijelaz između stvarnih energijskih stanja. Prilikom relaksacije molekule, apsorbirana energija se otpušta u obliku topline, ali i svjetlosti koja u spektru prekriva Ramanovo raspršenje (Li i sur., 2014). Fluorescenciju mogu uzrokovati čak i najmanje količine nečistoće, ali i sam uzorak te time djelomično ili potpuno prekriti Ramanov signal. Fluorofori najčešće emitiraju fluorescenciju pri nižim valnim duljinama (400-550 nm) odnosno u vidljivom području zračenja. Razvoj lasera, koji ekscitiraju pri većim valnim duljinama tj. manje sklonim fluorescenciji, omogućio je daljnji napredak i razvitak Ramanove spektroskopije kakva se danas primjenjuje (Wang i sur., 2018). Laseri bliskog infracrvenog područja (engl. *near-infrared*, *NIR*) ekscitiraju pri većim valnim duljinama odnosno u NIR području. U tom području energija fotona je manja, stoga je manja vjerojatnost prelaska molekule u pobuđeno

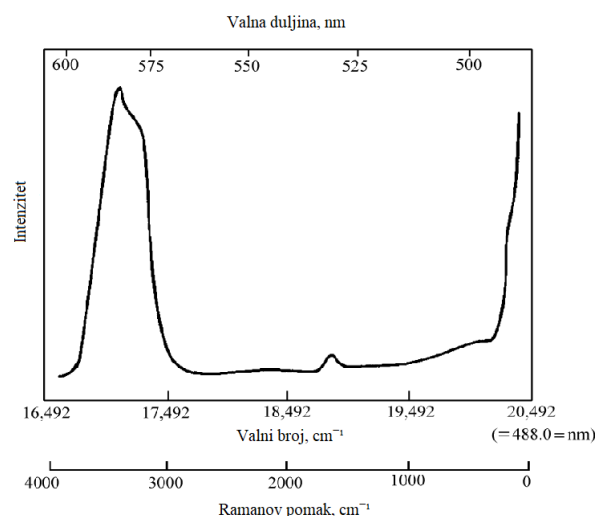
elektronsko stanje i kao takvo emitiranje fluorescencije te dekompozicija uzorka (Li i sur., 2014).

Osim fluorescencije, laseri iz UV-Vis područja mogu uzrokovati otapanje uzorka zbog prevelike količine energije fotona. Spomenuta fluorescencija i raspadanje uzorka su bili glavni razlozi stagnacije razvoja Ramanove spektroskopije. 1980-ih je otkriven *charge-coupled device* (CCD) detektor koji je omogućio primjenu NIR lasera zbog svoje osjetljivosti na već ionako slab Ramanov signal (Strachan i sur., 2007). Nadalje, upravo je optički sustav omogućio Ramanu mjerenje malih čestica u malim koncentracijama nehomogenog uzorka (Fini, 2004). Drugim riječima, većina uzorka se može mjeriti direktno iz svog originalnog pakiranja, bez pripreme uzorka i u jako malim količinama (2-2,5 μg za čvrste i 100-200 μL za tekuće uzorke).

Voda daje jak signal specifično u regiji od 3500 do 3100 cm^{-1} prvenstveno zbog O-H veza, a Ramanov pomak se dešava na puno nižim vrijednostima (Šašić i Ozaki, 2008). Činjenica da voda daje slab Ramanov signal ide u prilog primjeni Ramanove spektroskopije za vodene otopine poput injekcija (Wang i sur., 2018).

1.1.2. Ramanov spektar

Ramanov spektar (Slika 2.) prikazuje ovisnost intenziteta raspršene svjetlosti o valnom broju tj. Ramanovom pomaku gdje je intenzitet raspršenja direktno proporcionalan koncentraciji uzorka. Ramanov pomak je frekvencija vrpce izražena kao pomak od frekvencije zračenja (Gala i Chauhan, 2015).



Slika 2. Ramanov spektar vode (preuzeto i prilagođeno prema: Šašić i Ozaki, 2008)

Na y osi se nalazi intenzitet raspršene svjetlosti, a na x osi Ramanov pomak (cm^{-1}). Ovisno o valnoj duljini primijenjenog lasera, valna duljina i valni broj mogu varirati. Uslijed toga, uveden je Ramanov pomak kao veličina jer x os nije fiksirana što ju čini nepraktičnom za primjenu (Šašić i Ozaki, 2008).

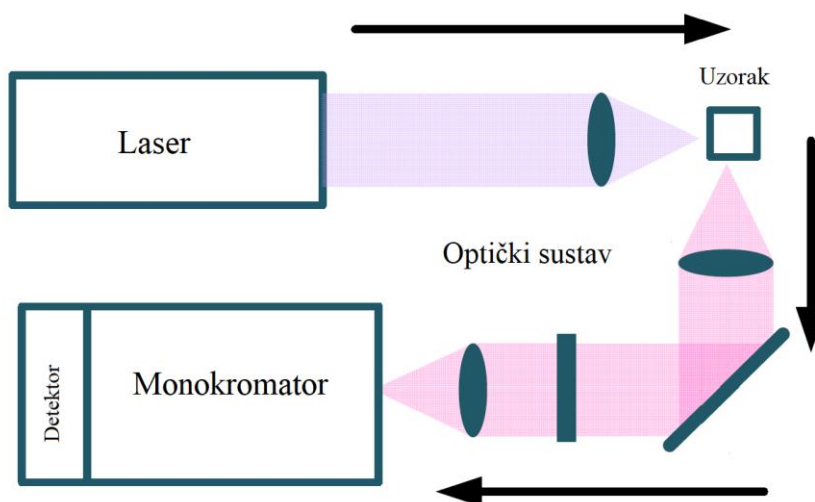
Osnovna formula Ramanove kvantifikacije:

$$L = P_d \beta D K$$

gdje je L intenzitet Ramanovog raspršenja ($\text{foton sr}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{s}^{-1}$), P_d je snaga upadnog lasera ($\text{foton cm}^{-2}\text{s}^{-1}$), β je diferencijalni *cross-section* ciljane molekule ($\text{cm}^2\text{mol}^{-1}\text{sr}^{-1}$), D je broj molekula po cm^3 (opisuje koncentraciju uzorka), a K je geometrijski faktor (Strachan i sur., 2007).

1.1.3. Ramanov spektrometar

Osnovni dijelovi Ramanovog spektrometra su laser, optički sustav, monokromator ili filter i detektor (Slika 3.). Laser predstavlja izvor zračenja, dok optički sustav ima funkciju rasipanja zračenja prema uzorku i detektoru. Monokromator zadržava Rayleighovo elastično zračenje, a detektor ima ulogu hvatanja raspršenog Ramanovog zračenja (Li i sur., 2014).



Slika 3. Shematski prikaz Ramanovog spektrometra (preuzeto i prilagođeno prema: Li i sur., 2014)

1.1.4. Primjena Ramanove spektroskopije

Polimorfizam je česta pojava lijekova i predstavlja veliki problem u farmaceutskoj industriji. Svaki polimorfni oblik ima različite karakteristike kojim manifestira različite učinke na organizam. Upravo radi toga je potrebno identificirati i kvantificirati svaki polimorf u uzorku. No, polimorfi su osjetljivi na fizičke metode pripreme materijala kao što su zagrijavanje, homogeniziranje, itd. Ramanova spektroskopija je tehnika izbora za određivanje polimorfa u uzorku s obzirom na to da ne zahtjeva prethodnu pripremu uzorka za mjerenje (Fini, 2004). Mogućnost mjerenja uzorka direktno u originalnom pakiranju nudi veliku uštedu vremena i novca čime pronalazi svoju primjenu u kontroli kvalitete u proizvodnji i formulaciji lijekova te u razvoju ljekovitih tvari. Jednostavna primjena, minimalna obrada uzorka i velike razlike u spektrima API-ja, ekscipijensa i materijala pakiranja jesu razlozi velike primjene Ramanove spektroskopije u farmaceutskoj industriji (Smith i Dent, 2005).

1.2. Validacija

Validacija analitičkog postupka je prema zahtjevima *Dobre proizvođačke prakse (Good manufacturing praxis, GMP)* i *Dobre laboratorijske prakse (Good laboratory praxis, GLP)* obavezan aspekt svake analitičke metode. Validacijom analitičkog postupka se utvrđuje i evidentira prikladnost određene analitičke metode za točno određenu primjenu. Svaka validirana metoda osigurava dobivanje točnih i valjanih rezultata pri propisanim uvjetima. Stoga, uvođenjem i razvojem nove metode ili pri mijenjanju bilo kojeg uvjeta već validirane metode, potrebno je provesti validaciju. Analitička metoda se razvija i validira sve dok se ne zadovolje svi traženi parametri određeni propisima. Dobiveni rezultati se uspoređuju sa zadanim kriterijima, a zatim donosi odluka o prihvaćanju ili odbijanju analitičkog postupka. Parametri koji se određuju u postupku validacije su preciznost, specifičnost/selektivnost, granica dokazivanja i određivanja, linearnost, radno područje, točnost i izdržljivost. Međutim, ne ispituju se za svaku metodu svi parametri, već ovisno o namjeni analitičke metode i postavljenim kriterijima (Nigović i sur., 2014).

1.2.1 Preciznost (engl. Precision)

Preciznost predstavlja podudaranje između niza ponovljenih mjerenja istog homogenog uzorka i njegovim višestrukim uzorkovanjem pod točno određenim uvjetima. Može se izraziti kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) ili obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost predstavlja podudaranje rezultata pod istim uvjetima (isti analitičar, isti laboratorij, ista oprema) u kratkom vremenskom intervalu. Odstupanje dobivenih rezultata između različitih laboratorija se iskazuje kao obnovljivost, dok srednja preciznost pokazuje variranje rezultata unutar istog laboratorija, ali pod različitim uvjetima – dan, analitičar, instrument. Za prihvatljivu preciznost potrebno je najmanje pet do šest određivanja sa dvije do tri različite koncentracije.

Relativno standardno odstupanje (*relative standard deviation, RSD*) je veličina kojom se najčešće izražava preciznost, a računa se prema formuli:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{\chi}} \times 100$$

gdje je *SD* standardno odstupanje (engl. *standard deviation*), $\bar{\chi}$ srednja vrijednost dobivenih rezultata, a RSD je izražen kao postotak (Nigović i sur., 2014).

1.2.2. Specifičnost/selektivnost (engl. Specificity/selectivity)

Specifičnost analitičke metode je sposobnost da se neupitno može odrediti samo jedan točno određeni analit u uzorku pri točno određenim uvjetima. Sposobnost analitičke metode da odredi više komponenti u uzorku u prisustvu svih ostalih naziva se selektivnost. Češće se upotrebljava selektivnost kao validacijski parametar pošto je specifičnost u praksi rijetka (Nigović i sur., 2014).

1.2.3. Linearnost (engl. Linearity)

Linearnost analitičke metode predstavlja sposobnost metode da unutar zadanog raspona daje rezultate analiziranja koji su izravno proporcionalni koncentraciji tj. količini željenog analita u uzorku (Crowther, 2001).

Linearnost se utvrdi kroz 3 do 6 mjerenja s najmanje 5 različitih koncentracija. Prikazivanjem ovisnosti dobivenog analitičkog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja s jednadžbom pravca iz koje se može iščitati koeficijent korelacije regresijskog pravca ($k > 0,999$). Upravo preko k se izražava linearnost analitičke metode (Nigović i sur., 2014).

1.2.4. Radno područje (engl. Range)

Radno područje analitičke metode je interval između određene donje i gornje koncentracije (uključujući i granične vrijednosti) ispitivanog analita unutar kojeg je zadovoljavajuća i prihvatljiva razina točnosti, preciznosti i linearnosti (Crowther, 2001).

1.2.5. Točnost (engl. Accuracy)

Točnost analitičke metode označava podudaranje stvarnih ili referentnih vrijednosti sa stvarnim rezultatima dobivenih mjerenjem. Potrebno je provesti najmanje 3 mjerenja s najmanje 3 različite koncentracije unutar radnog područja, a ispituje se tek nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti. Točnost odnosno odstupanje od realnih vrijednosti se iskazuje analitičkim prinosom (*recovery*, R):

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \cdot 100$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost svih mjerenja, a \hat{x} stvarna vrijednost analita u uzorku (Nigović i sur., 2014).

1.2.6. Granica dokazivanja (engl. Limit of detection, LOD)

Granica dokazivanja analitičke metode je najmanja koncentracija analita u uzorku koju je moguće dokazati, ali ne nužno i odrediti pri točno određenim uvjetima (Crowther, 2001). Određivanje granice dokazivanja se provodi razrjeđivanjem otopine uzorka, a predstavlja omjer signala i šuma (LOD =3:1 ili 2:1). Drugi način određivanja izvodi se iz standardnog odstupanja signala i kalibracijskog pravca:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a}$$

pri čemu je σ standardno odstupanje rezultata određenog broja mjerenja signala slijepog uzorka ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

1.2.7. Granica određivanja (engl. Limit of quantitation, LOQ)

Granica određivanja analitičke metode predstavlja najmanju koncentraciju analita u uzorku koju je moguće kvantitativno odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri točno određenim uvjetima. Određuje se na iste načine kao i granica dokazivanja, ali uz drugačiji omjer signala i šuma (LOQ=10:1) te formulu:

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a}$$

pri čemu je σ standardno odstupanje rezultata određenog broja mjerenja signala slijepog uzorka ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

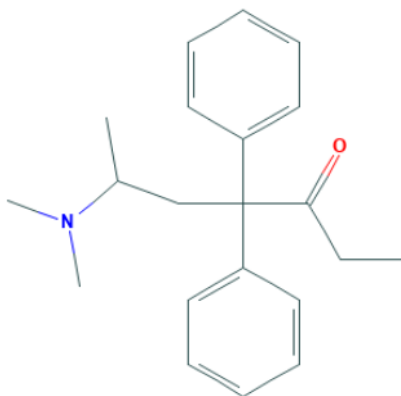
1.2.8. Izdržljivost/otpornost (engl. Robustness)

Izdržljivost analitičke metode predstavlja sposobnost metode da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih varijacija parametara metode. Pri određivanju izdržljivosti, varira samo jedan parametar, dok se ostali ne mijenjaju. Ovisno o analitičkoj metodi, odabere se parametar koji će se mijenjati. Upravo izdržljivost upućuje na pouzdanost metode tijekom njene normalne primjene pri stvarnim i malim promjenama uvjeta (Nigović i sur., 2014).

1.3. Djelatne i pomoćne tvari

1.3.1. Metadon

Metadon je sintetski dugodjelujući opioid. Sadrži jedan kiralni centar, pa razlikujemo 2 enantiomera – R(levo)- i S(dextro)- metadon. Oba karakteriziraju različita farmakodinamička svojstva i djelovanje. R- oblik je enantiomer kojem se pripisuje farmakološko djelovanje koje ostvaruje preko μ -opioidnih receptora (MOR) oponašajući djelovanje endogenih opioida, enkefalina i endorfina (Ahmad i sur., 2018).



Slika 4. Kemijska struktura metadona (preuzeto sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Osim MOR, metadon je slabi antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora i inhibitor adenilciklaze. Kod opioidnih ovisnika kompenzacijski se povećava aktivnost NMDA i adenilciklaze čime se razvija tolerancija na primjenjeni opioid (Chhabra i Bull, 2008).

Zbog navedenih svojstava, metadon je primarno indiciran kao supstitucijska terapija za opioidne ovisnike jer prevenira sindrom ustezanja i reducira toleranciju na opioid. Nadalje, indiciran je za liječenje kronične boli u tumorskih i netumorskih pacijenata kod kojih je potrebna visoka doza opioidnih analgetika ili se visokom dozom opioida nije postiglo zadovoljavajuće analgetsko djelovanje (Chhabra i Bull, 2008).

Metadon ima široki raspon bioraspoloživosti koji se kreće od 36% do 100%, a prosjek je između 70% i 80%. Koncentracije u plazmi su mjerljive već nakon 15 minuta, a maksimalni učinak se očekuje nakon 2,5 do 4 sata od primjene. U stresnim situacijama poput tumora i kronične primjene metadona, povećava se količina alfa kiselog proteina na kojeg se primarno veže metadon. Na taj način se smanjuje slobodna frakcija metadona i potrebno je povećano doziranje (Chhabra i Bull, 2008). Metadon je iznimno lipofilna molekula, stoga je distribucija i akumuliranje u adipozna tkiva ekstenzivno pri čemu se on postupno otpušta i ispoljava svoje

djelovanje (Martin, 2011). Metabolizam metadona se prvenstveno odvija hepatskim putem preko CYP enzima uz nastajanje farmakološki neaktivnog metabolita, 2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin (EDDP). Sporedni put metabolizma obuhvaća nastajanje analgetski aktivnih metabolita, metadol i normetadol. Vrijeme polueliminacije iznosi 5 do 130 sati s prosjekom od 22 sata kod kronične primjene. Tome dodatno doprinosi stereoselektivnost metaboliziranja prema S-enantiomeru čime se povećava vrijeme poluživota farmakološki aktivnijeg R-metadona (Ahmad i sur., 2018).

Nadalje, opetovanom primjenom metadona dolazi do autoindukcije CYP enzima zaduženog za metabolizam metadona, a time i potrebe za povećanjem doze (Chhabra i Bull, 2008).

Kako metadon prelazi krvno-moždanu barijeru, postoji opasnost od respiratorne depresije i prolongiranja QT intervala. Dodatno, interindividualne razlike doprinose varijaciji koncentracije metadona, a to su: dob, spol, težina, komorbiditeti tj. primjena drugih lijekova (Ahmad i sur., 2018).

Sve navedeno doprinosi velikoj oscilaciji koncentracije metadona u plazmi i interindividualne razlike svakog pacijenta čineći ga kompleksnim za doziranje i potencijalno opasnom terapijom. Stoga je potrebno pažljivo doziranje i praćenje pacijenta do uspostavljanja optimalne doze održavanja (Chhabra i Bull, 2008).

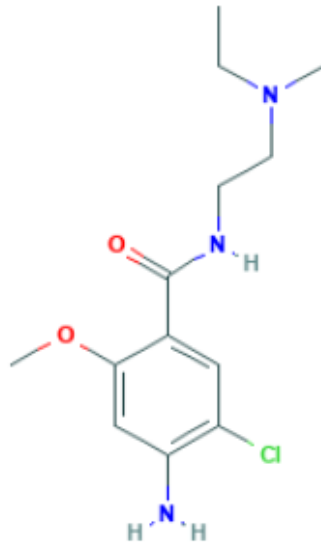
Primijenjen u adekvatnim dozama, doprinosi smanjenju mortaliteta, heroinske ovisnosti, redukciji kriminalne aktivnosti ovisnika, a u konačnici i reduciranju HIV i hepatitis infekcija među ovisnicima (Ferrari i sur., 2004).

Moguća je intramuskularna, rektalna, intravenozna, supkutana, epiduralna i intratekalna primjena metadona. Čimbenici poput puta primjene, učinkovitosti, vremena trajanja učinka te niska cijena, daju prednost primjeni metadona za kontrolu boli i sindrom ustezanja ovisnika (Martin, 2011).

Na našem tržištu postoje 2 oblika metadona - tablete i oralna otopina. Dostupan je samo u receptnom režimu doziranja pod nazivom Heptanon (*Pliva Hrvatska d.o.o.*) - tablete i oralna otopina; Metadon Alkaloid (*Alkaloid d.o.o.*) i Metadon Molteni (*L. Molteni*) u obliku oralne otopine.

1.3.2. Metoklopramid

Metoklopramid je gastroprokinetik i antiemetik koji svoje djelovanje primarno ostvaruje preko blokade dopaminskih D2 receptora, a uz to blokira serotoninske 5-HT3 i aktivira 5-HT4 receptore. Djeluje periferno u gastrointestinalnom zidu i centralno u kemoreceptorskoj trigger zoni medulle oblongate jer zbog svoje lipofilnosti prelazi krvno-moždanu barijeru (Al-Saffar i sur., 2019).



Slika 5. Kemijska struktura metoklopramida (preuzeto sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Osnovni mehanizam perifernog prokinetičkog djelovanja metoklopramida je posredna aktivacija kolinergičkog sustava. Antagoniziranjem dopaminskih D2 receptora se blokira njegovo inhibitorno djelovanje na motoneurone mezenteričkog plexusa što omogućuje ekscitaciju istih te oslobađanje acetilkolina. Aktivacijom 5-HT4 receptora dolazi do otpuštanja serotonina koji stimulira iste motoneurone te na taj način potiče ekscitaciju i dodatno oslobađanje acetilkolina (Scuderi, 2003). Upravo je acetilkolin zadužen za koordinaciju i stimulaciju gastrointestinalnog motiliteta što rezultira gastričnim pražnjenjem. Prednost primjene metoklopramida kao prokinetika pri gastroparezi jeste što se na taj način izbjegava gastrična, bilijarna i pankreatična sekrecija (Al-Saffar i sur., 2019; Scuderi, 2003). Antiemetski učinak se pripisuje centralnom djelovanju metoklopramida gdje djeluje kao blokator dopaminskih D2 i serotoninskih 5-HT3 receptora na centar za povraćanje. Dodatno, na taj način se povećava tonus donjeg ezofagealnog sfinktera čime se sprječava refleks povraćanja i izbacivanje gastričnog sadržaja (Al-Saffar i sur., 2019).

Navedeno je razlog primjene metoklopramida kod odraslih osoba u prevenciji i simptomatskom liječenju mučnine i povraćanja induciranih kemoterapijom, radioterapijom ili akutnom migrenom (Hendren, 2015).

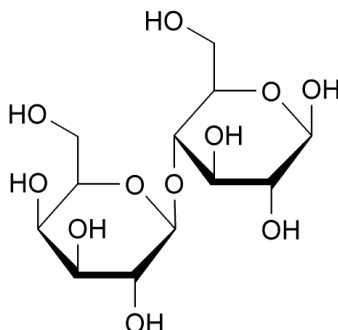
Bioraspoloživost metaklopramida se kreće između 30% i 100%, a najveću koncentraciju doseže unutar jednog sata. Sklon je vezanju na proteine plazme, pretežito na albumin. Metabolizam se u najvećoj mjeri odvija u jetri konjugacijom, a puno manje preko CYP enzima. Međutim, postoji genetska predispozicija za razvijanje ekstrapiramidalnog sindroma (EPS) kod ljudi s CYP2D6 gen polimorfizmom što povlači kontraindikaciju u slučaju Parkinsonove bolesti. U prosjeku se 85% metoklopramida eliminira renalnim putem unutar 72h stoga je potrebna prilagodba doze u ljudi s oslabljenom bubrežnom funkcijom (Hendren, 2015).

Europska medicinska agencija (EMA) preporučuje doziranje metoklopramida u odraslih na 10 mg maksimalno 3 puta dnevno u trajanju liječenja ne duljeg od 5 dana zbog rizika razvoja tardivne diskinezije u slučaju kronične primjene (Al-Saffar i sur., 2019).

Na našem tržištu postoje 2 oblika metoklopramida - tablete i oralna otopina. Dostupan je samo u receptnom režimu doziranja pod nazivom Reglan (*Alkaloid d.o.o.*) - tablete i oralna otopina te Metopran (*Jadran - Galenski Laboratorij d.d.*) tablete.

1.3.3. Laktoza

Laktoza je prirodni disaharid sastavljen od monosaharida D-glukoze i -D-galaktoze međusobno povezanih 1,4- β -glikozidnom vezom (Abu Fara i sur., 2018).



Slika 6. Kemijska struktura β -laktoze anhidrida (preuzeto iz 4. verzije Europske farmakopeje)

Od laktoze u čvrstom stanju, razlikujemo kristaliničnu i amorfnu laktozu. Kristalinična laktoza se češće koristi u farmaceutskoj industriji zbog svojih svojstava. Dobiva se kristalizacijom iz superzasićene otopine laktoze. Ovisno o uvjetima kristalizacije, nastaju 2 najkorištenija oblika laktoze – α -laktoza monohidrat i β -anhidridna laktoza. α -laktoza monohidrat nastaje kad se kristalizacija odvija pri temperaturi ispod 93,5 °C. Sadrži dobra svojstva tečnosti, ali lošije kompresibilnosti zbog čega se nerijetko koristi u postupcima vlažne granulacije. Nadalje, ako se laktoza monohidrat dalje podvrgne sušenju raspršivanjem (*spray drying*), formiraju se amorfni aglomerati s odličnim osobinama tečnosti, miješanja i kompresibilnosti čineći ga idealnim ekscipijensom za direktno komprimiranje.

S druge strane, kao produkt kristalizacije iznad 93,5 °C je β -anhidrid laktoze s lošim svojstvima tečnosti te odlične kompresibilnosti i rekompakcije čime opravdava primjenu u direktnom komprimiranju i suhoj granulaciji. Dodatno, često se koristi u formulacijama osjetljivim na vodu zbog odsutnosti slobodne i vezane vode.

Niska cijena, dostupnost, odličan balans između svojstva tečnosti i kompresibilnosti, niska higroskopsnost, kompatibilnost s mnogo djelatnih tvari te dobra topljivost u vodi čini laktozu jednu od najkorištenijih punila tj. pomoćnih tvari u farmaceutskoj industriji koji se koriste u proizvodnji čvrstih dozirnih oblika – tablete, kapsule, granule, inhalati (Hebbink i Dickhoff, 2019).

2. Obrazloženje teme

Metadon je sintetski opioid koji se danas primarno koristi kao supstitucijska terapija u liječenju opioidne ovisnosti. Primjenom metadona sprječava se ili smanjuje ovisnost o opioidu, a time i poboljšava socijalni život ovisnika te se smanjuje rizik prijenosa HIV-a i hepatitis virusa. Sekundarnu primjenu pronalazi u kontroli kronične boli tumorskih i netumorskih pacijenata, posebno u slučajevima kada se morfinom ne postiže zadovoljavajuća analgezija. Njegovo dugo vrijeme polueliminacije, tj. duljina djelovanja, učinkovitost i niska cijena daju mu prednost u primjeni liječenja boli ili ovisnosti nad drugim opioidima.

No, s obzirom na moguću depresiju ventilacije i prolongiranje QT intervala koji mogu imati fatalni ishod, potreban je dodatan oprez doziranja i primjene metadona (Ahmad i sur., 2018; Martin, 2011).

Metoklopramid je primarno indiciran u odraslih za prevenciju i simptomatsko liječenje mučnine i povraćanja induciranih radioterapijom i kemoterapijom te kao dodatna terapija za liječenje gastropareze i gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB). S obzirom na njegovu djelotvornost, česta je njegova dugotrajna primjena za kronične bolesti poput GERB-a i gastropareze. Iako se smatra sigurnim lijekom, kod dugotrajne primjene (dulje od 12 tjedana) velik je rizik razvoja nuspojava poput tardivne diskinezije, potencijalno ireverzibilnog stanja (Al-Saffar i sur., 2019; Hendren, 2015).

Kromatografske metode su najčešće korištene analitičke metode za kvantitativnu analizu čvrstih djelatnih tvari. Kod ovakvih metoda potrebna je prethodna obrada uzorka, a samo mjerenje dugo traje. Zbog takvih čimbenika koji mogu dovesti do nestabilnosti uzoraka, počela se preispitivati njihova primjena. S obzirom na to da Ramanova spektroskopija ne zahtjeva pripremu uzorka, što je čini ne destruktivnom metodom, a mjerenje traje kraće, daje joj prednost nad drugim kromatografskim metodama (Bell, 2008; Strachan i sur., 2007).

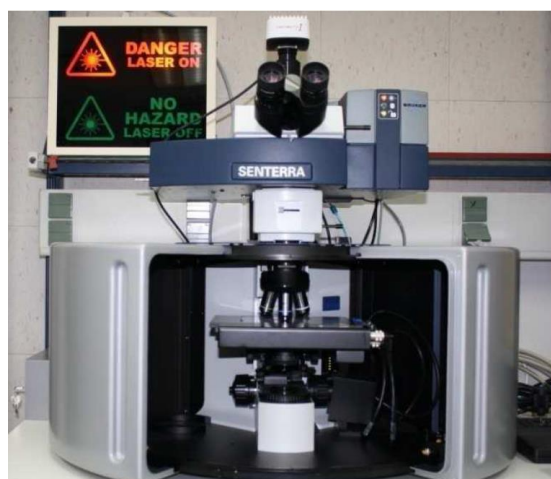
Svrha ovog diplomskog rada je razviti i validirati brzu i jednostavnu metodu za određivanje metadona i metoklopramida u tabletama primjenom disperzivne Ramanove spektroskopije. Prvi je cilj ovoga rada validirati i optimizirati metodu za određivanje metadona i metoklopramida koristeći lasere određenih valnih duljina kao i prethodno odabrano punilo (rezultati prikazani u diplomskom radu Petre Ivanjko) kroz analitičko ispitivanje njene linearnosti, homogenosti, preciznosti, točnosti te granice dokazivanja i granice određivanja. Drugi je cilj ovog rada ispitati primjenu razvijene metode u određivanju sadržaja metadona i metoklopramida u komercijalno dostupnim tabletama.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Radni instrument

Ramanovi spektri snimljeni su pomoću SENTERRA disperzivnog Ramanovog spektrometra tvrtke Bruker (Njemačka) koji je konfiguriran s mikroskopom Olympus s objektivima za povećanje 20, 50 i 100X (Slika 7.). Korištena su dva lasera kao izvori zračenja: Nd:YAG laser valne duljine 532 nm te diodni laser (AlGaAs) valne duljine 785 nm. Za detekciju raspršenog zračenja korišten je CCD uređaj (*charge-coupled device*) hlađen Peltierovim elementom.



Slika 7. SENTERRA disperzivni Ramanov spektrometar tvrtke Bruker u konfiguraciji s mikroskopom Olympus

Za vaganje je korištena Mettler Toledo XA105DU analitička vaga (Slika 8.) maksimalnog kapaciteta od 120g i mogućeg očitovanja do 0,01mg.



Slika 8. Analitička vaga (preuzeto sa www.mt.com)

3.1.2. Laboratorijski pribor i posuđe

- Ručna preša za pripremanje diskova (Specac, UK)
- Metalna pinceta
- Metalna špatula
- Aluminijska folija
- Tarionik i pistila

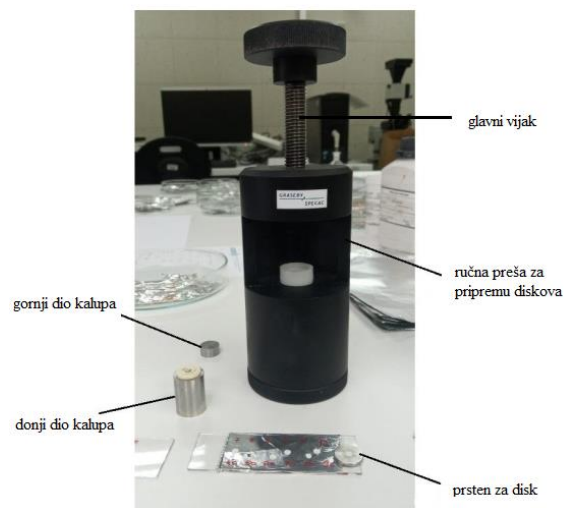
3.1.3. Kemikalije

- Standardna supstanca metadon hidroklorida (Merck, Darmstadt, Njemačka) (u daljnjem tekstu metadon)
- Standardna supstanca metoklopramid hidroklorida (Merck, Darmstadt, Njemačka) (u daljnjem tekstu metoklopramid)
- Laktoza monohidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka) (u daljnjem tekstu laktoza)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzorka za analizu

Točno određena masa standardne supstancije (metadona i metoklopramida) za svaki uzorak se izvaže na analitičkoj vagi na aluminijskoj foliji te kvantitativno prenese u tarionik. Na isti način se odvaže laktoza i prenese u tarionik sa standardom. Smjesa se miješa u tarioniku i usitnjava pistilom sve dok se ne dobije homogena masa. S obzirom na tendenciju mase da se prilijepi po stijenkama, potrebno je metalnom špatulom sastrugati ostatke sa stijenki. Od svake dobivene smjese uzorka, odvaže se količina od 2,00 mg koja ide u daljnju obradu prešanjem. Ručna preša se sastoji od dvodijelnog kalupa, glavnog vijka, prstena za disk te same preše.



Slika 9. Ručna preša za pripremanje diskova

Svaka odvaga se kvantitativno prenese u donji dio kalupa s prstenom za disk. Smjesa se poravna s površinom prstena i na njega se postavi gornji dio kalupa te se sve zajedno prenese u prešu. Rotiranjem glavnog vijka za 3 puna okretaja i ostavljanjem smjese u preši 30 sekundi radi čim bolje kompaktnosti, dobivaju se diskovi promjera 7 milimetara. Njih je potrebno pomoću pincete odvojiti od prstena. U slučaju da se disk zalijepi za gornji dio kalupa, između njega i prstena se stavlja aluminijska folija tokom prešanja radi lakšeg uklanjanja diska. Disk se prenese na mikroskopsko stakalce obloženo s aluminijskom folijom zbog sprečavanja utjecaja podloge na spektre. Kao takvo je spremno za daljnju analizu.



Slika 10. Isprešani diskovi i prsten za diskove

3.2.2. Princip metode

S ciljem smanjenja posljedica eventualne nehomogenosti uzoraka, sva mjerenja provedena su tehnikom kemijskog mapiranja površine uzoraka na 100 položaja s korakom od 100 μm , Time se dobila pravokutna mreža točaka veličine 1x1 mm. Korišteni su laseri valne duljine 532 nm snage 5 mW i 785 nm snage 25 mW. Tijekom snimanja spektara korišten je objektiv s povećanjem 20x (NA 0,4) što je u jednoj točki rezultiralo ozračenom površinom od oko 0,5 μm^2 za laser 532 nm, odnosno 1,1 μm^2 za laser 785 nm. Preostali uvjeti snimanja bili su isti za oba lasera: razlučivanje 9–15 cm^{-1} , spektralno područje 4400-100 cm^{-1} , pukotina 50x1000 μm i rešetka 400a. Krajnji spektar svakog uzorka koji je korišten za interpretaciju rezultata izračunat je kao prosjek svih 100 izvornih spektara dok je spektar svakog pojedinačnog položaja rezultat 5 snimaka uz vrijeme prikupljanja od 1 s. Određivanje prosjeka izvornih Ramanovih spektara kao i određivanje površine odabrane vrpce metadona i metoklopramida provedeno je programskim paketom OPUS 7.0.

3.2.3. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je *Prism GraphPad 9* (Graph pad Software, Inc., San Diego, SAD) i program *Microsoft Excel 2016* paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Svi doneseni zaključci u radu provedeni su uz razinu pouzdanosti od 95 %.

4. Rezultati i rasprava

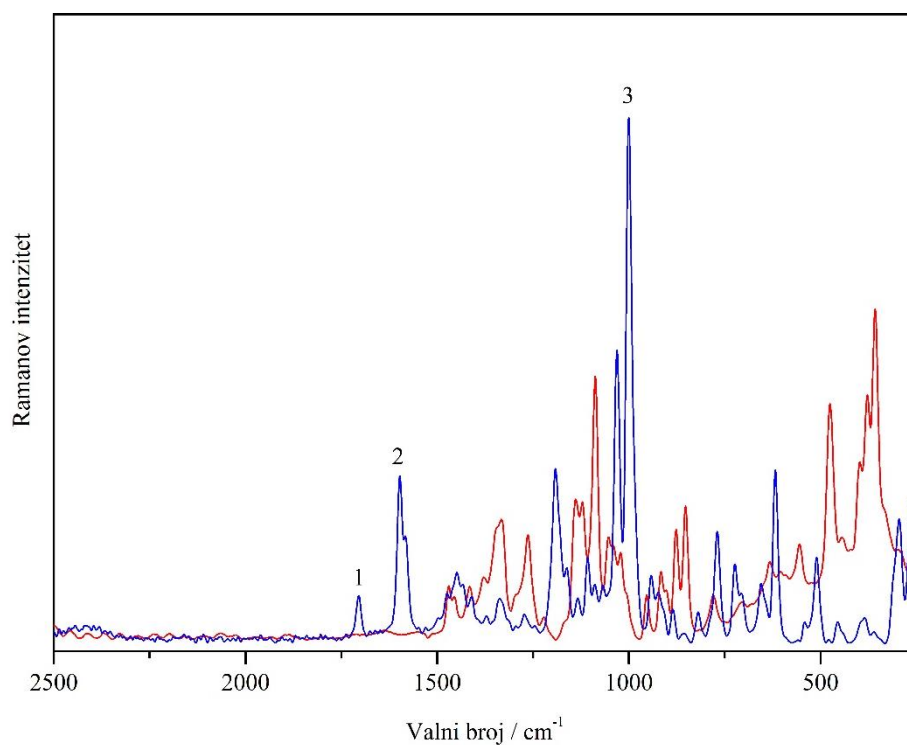
4.1. Preliminarna ispitivanja

Preliminarna ispitivanja uzoraka metadona/metoklopramida i odabranih punila mjerenjem pomoću oba lasera provedena su kako bi se izabralo najbolje punilo i laser za daljnju validaciju metode (Ivanjko, 2020). Punila korištena u preliminarnim ispitivanjima su laktoza, škrob, mikrokristalinična celuloza, dikalcij fosfat dihidrat, magnezijev stearat, talk i aerosil. Odabir najboljeg punila i lasera proveden je analizom dobivenih spektara i uspoređivanjem koeficijenta korelacije baždarnog pravca.

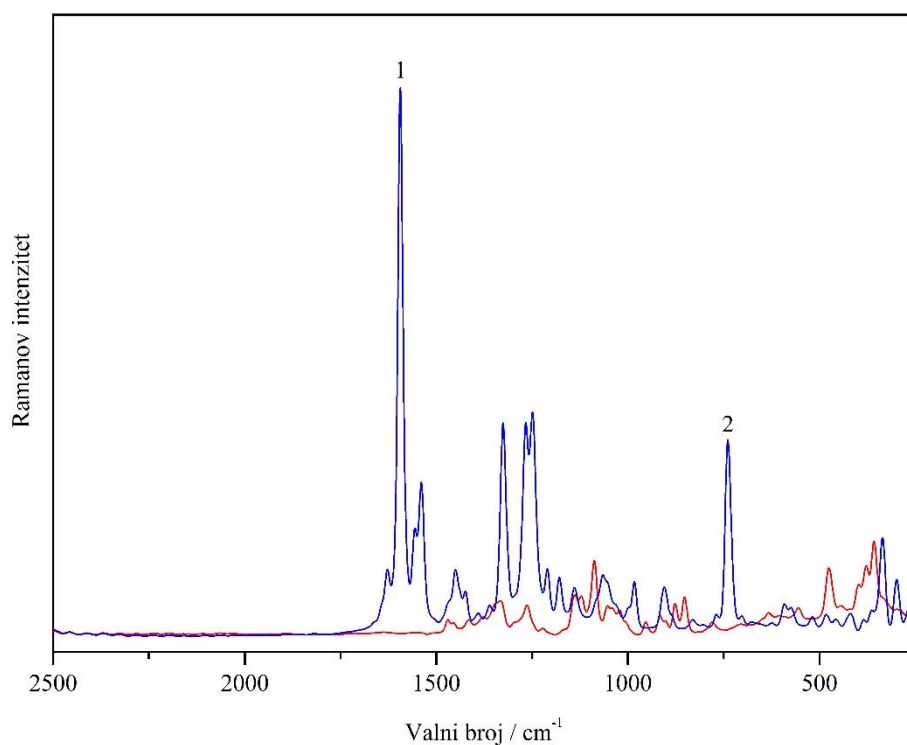
Usporedbom spektara metadona/metoklopramida i laktoze vidljivo je da ne dolazi do preklapanja pikova istih te da je moguće određivanje metadona/metoklopramida u prisutnosti laktoze. Nadalje, koeficijent korelacije baždarnog pravca za uzorak smjese metadona/metoklopramida i laktoze najbolje odgovara zahtjevima ($R^2 \geq 0,99$). Iz tih razloga se za daljnje ispitivanje odabire laktoza kao punilo. Snimanjem pomoću lasera 785 nm ne dolazi do fluorescencije i taj laser se odabire za daljnje provođenje analize.

Za izradu baždarnih pravaca korištene su srednje vrijednosti površina vrpce metadona/metoklopramida koje su zadovoljile dva osnovna uvjeta. Naime, kao dobri kandidati za izradu kalibracijskog modela vrpce analita nisu se smjele preklapati s vrpcoma laktoze, odnosno intenzitet a time i površine odabranih vrpce morale su se povećavati s povećanjem koncentracije analita u pripremljenim modelnim uzorcima. Kako je i vidljivo iz Slika 11. i 12., kod sustava metadon-laktoza prvi uvjet zadovoljavaju tri vrpce, koje su na Slici 11. označene brojevima od 1 do 3, dok su za sustav metoklopramid-laktoza izdvojene dvije vrpce jakih intenziteta i na Slici 12. označene su brojevima 1 i 2 (Farquharson i sur., 2019; Trachta i sur., 2004).

Odabrane vrpce metadona imaju maksimume pri 1705 cm^{-1} (vrpca 1), 1597 cm^{-1} (vrpca 2) te 1000 cm^{-1} (vrpca 3). Treba naglasiti da se vrpca 2 u stvari sastoji od dvije slabo razlučene vrpce s maksimumima pri 1597 cm^{-1} i 1583 cm^{-1} . Promatrane vrpce metoklopramida, koje ne interferiraju s vrpcoma laktoze, imaju maksimume pri 1594 cm^{-1} (vrpca 1) i 739 cm^{-1} (vrpca 2) (Leopold i sur., 2010).



Slika 11. Ramanovi spektri metadona (plavo) i laktoze (crveno) s naznačenim vrpcama metadona čije su površine korištene za kvantitativnu analizu.



Slika 12. Ramanovi spektri metoklopramida (plavo) i laktoze (crveno) s naznačenim vrpcama metoklopramida čije su površine korištene za kvantitativnu analizu.

4.2. Validacija analitičke metode

Metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije: linearnost, homogenost, preciznost (ponovljivost u danu i srednja preciznost), točnost (za metoklopramid) te granica dokazivanja i granica određivanja.

4.2.1. Linearnost

Za ispitivanje linearnosti pripremi se novi set uzoraka, a od ukupne mase izvaže se 2,00 mg za pripremu diskova. Količine metadona/metoklopramida i laktoze u svakom uzorku prikazane su u Tablici 1. odnosno Tablici 2. Linearnost se ispitivala provođenjem 3 mjerenja za 8 različitih omjera metadona i laktoze te 3 mjerenja za 10 različitih omjera metoklopramida i laktoze u uzorku.

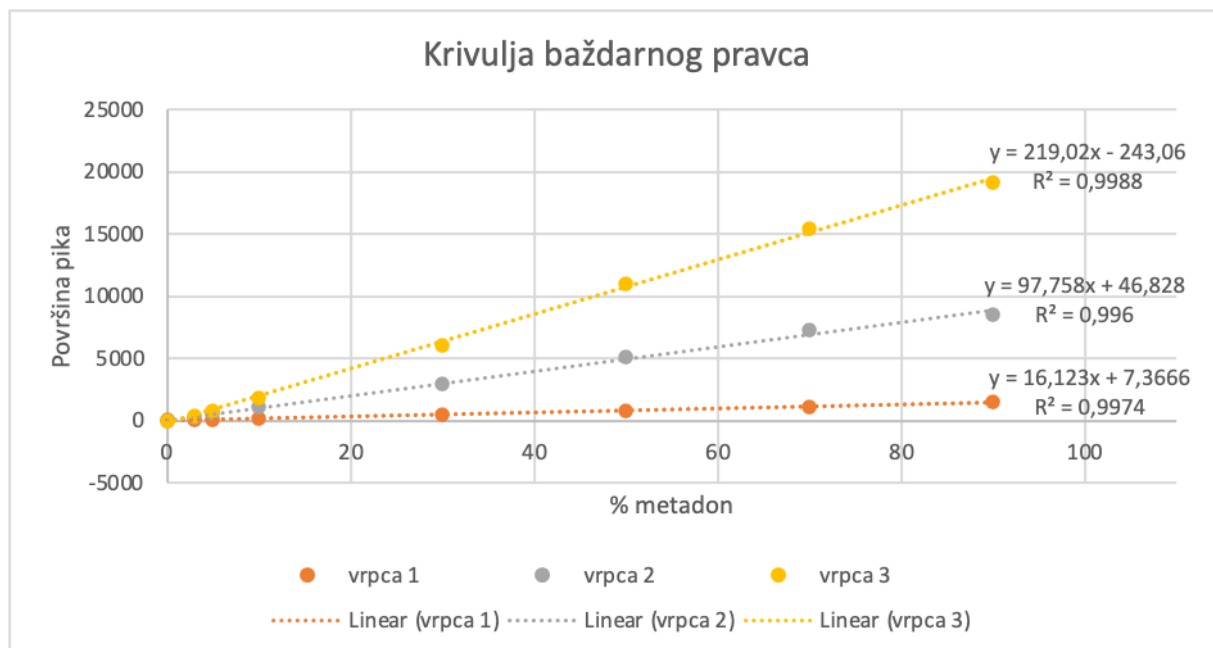
Tablica 1. Masa metadona i laktoze u pojedinom uzorku za ispitivanje linearnosti

uzorak	metadon (masa/mg)	laktoza (masa/mg)	metadon (%)
1	0,00	10,00	0
2	0,30	9,70	3
3	0,50	9,50	5
4	1,00	9,00	10
5	3,00	7,00	30
6	5,00	5,00	50
7	7,00	3,00	70
8	9,00	1,00	90

Tablica 2. Masa metoklopramida i laktoze u pojedinom uzorku za ispitivanje linearnosti

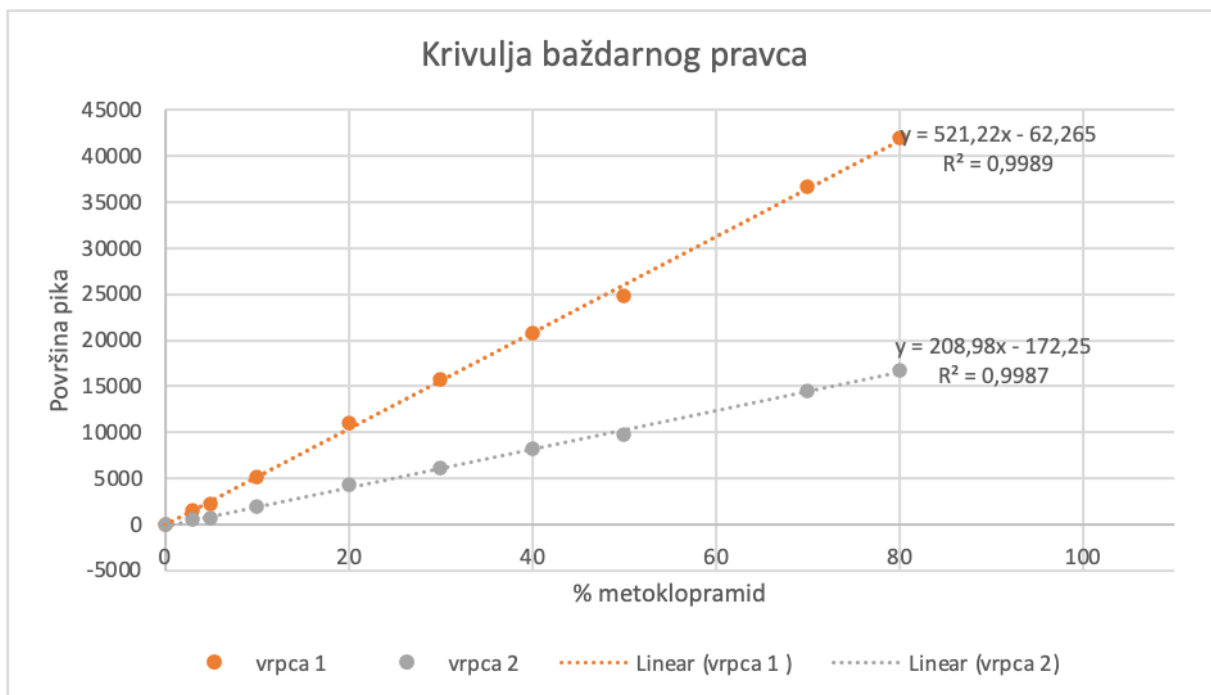
uzorak	Metoklopramid (masa/mg)	laktoza (masa/mg)	metoklopramid (%)
1	0,00	10,00	0
2	0,30	9,70	3
3	0,50	9,50	5
4	1,00	9,00	10
5	2,00	8,00	20
6	3,00	7,00	30
7	4,00	6,00	40
8	5,00	5,00	50
9	7,00	3,00	70
10	8,00	2,00	80

Iz rezultata mjerenja dobije se graf ovisnosti analitičkog signala o postotku djelatne tvari u uzorku, odnosno kalibracijska krivulja. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca. Slika 13. prikazuje graf linearnosti za metadon, dok Slika 14. prikazuje graf linearnosti za metoklopramid.



Slika 13. Graf ovisnosti površine pika metadona o udjelu metadona u uzorku

Koeficijent korelacije regresijskog pravca za vrpcu 1 iznosi 0,9974, za vrpcu 2 0,996, a za vrpcu 3 0,9988. Na temelju dobivenih vrijednosti ($R^2 \geq 0,99$) može se zaključiti da je metoda odgovarajuće linearnosti i pogodna za određivanje metadona u uzorcima.



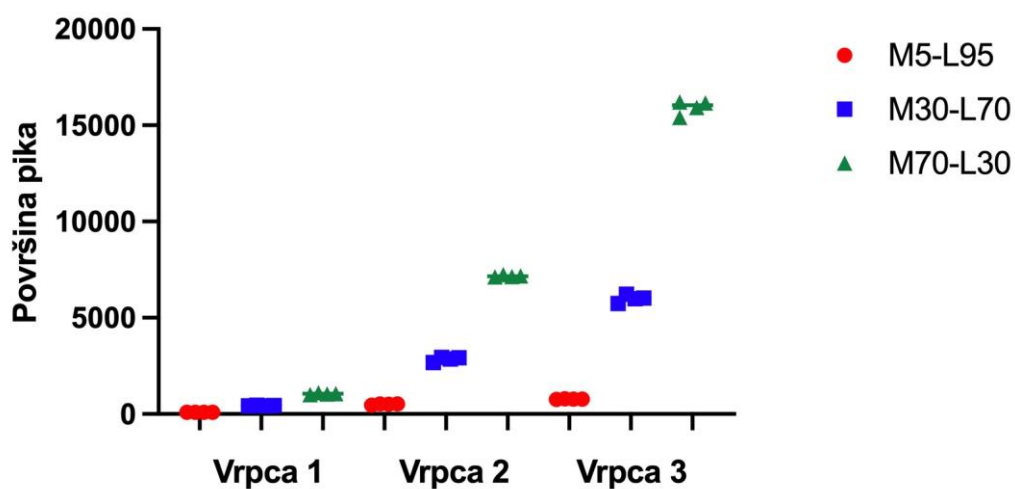
Slika 14. Graf ovisnosti površine pika metoklopramida o udjelu metoklopramida u uzorku

Koeficijent korelacije regresijskog pravca za vrpca 1 iznosi 0,9989, a za vrpca 2 0,9987. Na temelju dobivenih vrijednosti ($R^2 \geq 0,99$) može se zaključiti da je metoda odgovarajuće linearnosti i pogodna za određivanje metoklopramida u uzorcima.

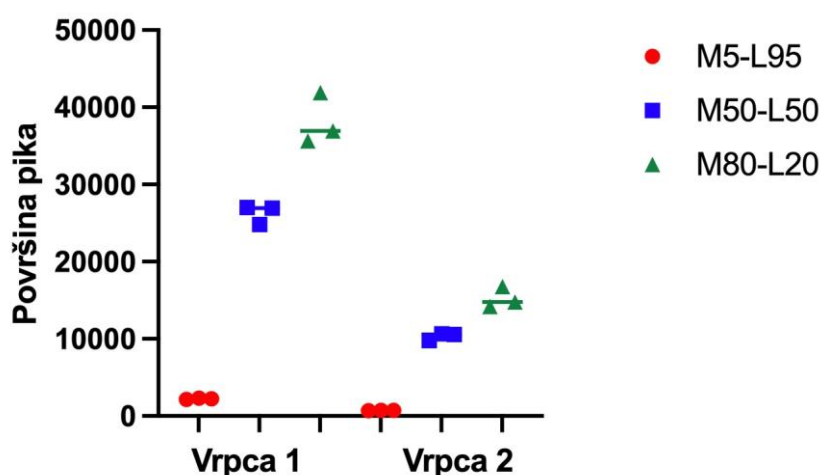
4.2.2. Homogenost

Homogenost uzorka ispituje se određivanjem površine pikova aktivne tvari snimanjem na različitim mjestima na uzorku.

Homogenost uzorka smjese metadona/metoklopramida i laktoze ispitana je snimanjem površine uzorka na 3 različita mjesta. Za određivanje homogenosti korišteni su uzorci koji su već pripremljeni za određivanje linearnosti (uzorci s 5, 30 i 70% metadona; uzorci s 5, 50 i 80% metoklopramida). Slika 15. i 16. prikazuju rezultate dobivene mjerenjem površine pika djelatne tvari na 3 različita položaja na uzorku.



Slika 15. Prikaz površine pika metadona u 3 različite točke uzorka



Slika 16. Prikaz površine pika metoklopramida u 3 različite točke uzorka

Rezultati dobiveni za određivanje homogenosti uzorka su zadovoljavajući i nema većih odstupanja čak niti kod manjih koncentracija što ukazuje na homogenu raspodjelu djelatnih tvari u pripremljenim uzorcima.

Nešto veće odstupanje dobiveno je kod uzoraka s 50% i 80% za vrpce 1 te 80% za vrpce 2 metoklopramida što može biti posljedica pogreške analitičara prilikom pripreme uzorka.

4.2.3. Preciznost

Preciznost se ispitala provođenjem 3 mjerenja za 3 različita omjera metadona/metoklopramida i laktoze te 2 mjerenja za 2 različita omjera u slučaju intermedijarne preciznosti. Izražava se vrijednostima kao što su SD i RSD. U Tablici 3. prikazane su vrijednosti za ponovljivost uzorka metadona kvantificiranog prema vrpce 1, 2 i 3.

Tablica 3. Ponovljivost u danu - metadon

	Vrpca 1			Vrpca 2			Vrpca 3		
Metadon (%)	5	30	70	5	30	70	5	30	70
1. mjerenje	98,203	460,713	998,624	427,978	2936,970	7083,622	664,017	6227,373	15022,161
2. mjerenje	109,311	410,551	1044,451	442,599	2891,170	7274,913	669,619	6228,890	15058,049
3. mjerenje	97,246	423,450	1010,050	465,019	2957,986	6777,903	664,228	6177,955	15036,579
Srednja vrijednost	101,587	431,571	1017,708	445,199	2928,709	7045,479	665,955	6211,406	15038,930
SD	6,707	26,048	23,854	18,657	34,166	250,691	3,175	28,979	18,059
RSD	6,602	6,036	2,344	4,191	1,167	3,558	0,477	0,467	0,120

Dobivene vrijednosti RSD kod vrpce 1 su u rasponu od 2,344 do 6,6, za vrpce 2 od 1,16 do 4,2, a za vrpce 3 od 0,12 do 0,48 (Tablica 3.). Kvantifikacija pomoću vrpce 3 pokazuje najbolju ponovljivost. Iako se vrijednosti RSD razlikuju ovisno o odabranoj vrpce za kvantifikaciju, može se zaključiti da je metoda zadovoljavajuće preciznosti neovisno o korištenoj vrpce za kvantifikaciju.

Tablica 4. Ponovljivost u danu – metoklopramid

	Vrpca 1			Vrpca 2		
Metoklopramid (%)	5	50	80	5	50	80
1. mjerenje	2204,981	27620,361	41876,015	687,122	10965,000	16704,617
2. mjerenje	2188,864	27802,684	42400,795	679,709	11030,320	16924,379
3. mjerenje	2214,572	27684,251	42700,366	684,024	10998,149	17054,138
Srednja vrijednost	2202,806	27702,432	42325,725	683,618	10997,823	16894,378
SD	12,991	92,511	417,271	3,723	32,661	176,681
RSD	0,590	0,334	0,986	0,545	0,297	1,046

U slučaju metoklopramida RSD je bio u rasponu od 0,334 do 0,986 za vrpce 1 odnosno od 0,297 do 1,046 za vrpce 2. (Tablica 4.). Kao i kod uzorka metadona, vrijednosti RSD su pokazale zadovoljavajuću ponovljivost kod obje primijenjene vrpce.

Tablica 5. Ponovljivost iz dana u dan – metadon

	Vrpca 1			Vrpca 2			Vrpca 3		
Metadon (%)	5	30	70	5	30	70	5	30	70
1. dan	71,981	444,771	911,837	363,101	3215,876	5953,788	516,099	6568,055	13631,938
2. dan	70,396	456,829	857,752	346,822	3157,897	5679,145	525,273	6347,350	12369,538
3. dan	94,333	411,019	734,086	308,990	3021,683	5671,789	443,803	6137,776	12467,154
Srednja vrijednost	78,903	437,540	834,558	339,638	3131,819	5768,241	495,058	6351,060	12822,877
SD	13,386	23,746	91,117	27,762	99,688	160,731	44,625	215,163	702,366
RSD	16,965	5,427	10,918	8,174	3,183	2,786	9,014	3,388	5,477

Prema dobivenim RSD vrijednostima opaženo je najveće odstupanje za srednju preciznost kod uzoraka s udjelom metadona od 5 i 70% kvantificiranih pomoću vrpce 1 (Tablica 5.). Odstupanje može biti posljedica pogreške analitičara tijekom pripreme uzorka zbog čega dolazi do nehomogene raspodjele djelatne tvari u uzorku. Iz dobivenih vrijednosti RSD za srednju preciznost metadona može se zaključiti da je metoda zadovoljavajuće preciznosti te se može koristiti za određivanje metadona u uzorcima.

Tablica 4. Ponovljivost iz dana u dan - metoklopramid

Metoklopramid (%)	Vrpca 1			Vrpca 2		
	5	50	80	5	50	80
1. dan	1971,457	24752,298	36876,690	578,981	9671,938	14453,563
2. dan	1885,383	23149,117	34731,005	643,437	8926,630	13477,401
3. dan	2075,537	24664,312	37591,157	654,863	9614,491	14716,002
Srednja vrijednost	1977,459	24188,576	36399,617	625,760	9404,353	14215,655
SD	95,219	901,272	1488,562	40,913	414,716	652,674
RSD	4,815	3,726	4,089	6,538	4,410	4,591

Iz dobivenih vrijednosti RSD za srednju preciznost metoklopramida može se zaključiti da je metoda precizna te se može koristiti za određivanje metoklopramida u uzorcima (Tablica 6.).

Tablica 5. Intermedijarna preciznost – metadon, analitičar 1

Metadon (%)	Analitičar 1					
	Vrpca 1		Vrpca 2		Vrpca 3	
	7	35	7	35	7	35
1. mjerenje	114,047	479,820	657,561	2990,638	964,081	6220,035
2. mjerenje	114,817	424,374	592,431	2682,034	894,587	5659,032
Srednja vrijednost	114,432	452,097	624,996	2836,336	929,334	5939,534
SD	0,544	39,206	46,054	218,216	49,140	396,689
RSD	0,476	8,672	7,369	7,694	5,288	6,679

Tablica 6. Intermedijarna preciznost - metadon, analitičar 2

Metadon (%)	Analitičar 2					
	Vrpca 1		Vrpca 2		Vrpca 3	
	7	35	7	35	7	35
1. mjerenje	104,011	488,880	432,871	3349,084	729,152	6872,748
2. mjerenje	118,273	463,159	531,195	2976,875	925,214	6180,111
Srednja vrijednost	111,142	476,020	482,033	3162,980	827,183	6526,430
SD	10,085	18,187	69,526	263,192	138,637	489,768
RSD	9,074	3,821	14,423	8,321	16,760	7,504

Dobivene vrijednosti RSD su pokazale nešto slabiju intermedijarnu preciznost kod uzoraka s udjelom metadona od 7% s korištenim vrpca 2 i 3 za kvantifikaciju kod analitičara 2 (Tablica 7. i 8.). Odstupanje je vjerojatno posljedica pogreške analitičara tijekom pripreme uzorka zbog čega dolazi do nehomogene raspodjele djelatne tvari u uzorku.

Tablica 7. Intermedijarna preciznost - metoklopramid

	Analitičar 1				Analitičar 2			
	Vrpca 1		Vrpca 2		Vrpca 1		Vrpca 2	
Metoklopramid (%)	7	35	7	35	7	35	7	35
1. mjerenje	3234,55	16188,38	1119,66	6312,49	3678,20	14550,40	1269,38	5815,55
2. mjerenje	3779,29	15789,44	1248,98	6235,67	3316,83	16683,81	1135,51	6540,84
Srednja vrijednost	3506,92	15988,91	1184,32	6274,08	3497,51	15617,11	1202,45	6178,20
SD	385,19	282,10	91,44	54,32	255,52	1508,55	94,67	512,86
RSD	10,98	1,76	7,72	0,87	7,31	9,66	7,87	8,30

Kod uzoraka metoklopramida nešto veća vrijednost RSD dobivena je kod uzorka s udjelom metoklopramida od 7% za vrpcu 1 kod analitičara 1 što se kao i kod metadona može objasniti pogreškom analitičara tijekom pripreme uzorka. Sve ostale dobivene vrijednosti RSD za intermedijarnu preciznost metoklopramida pokazale zadovoljavajuću preciznost te se razvijena metoda može koristiti za određivanje metoklopramida u uzorcima (Tablica 9.).

4.2.4. Točnost

Točnost analitičke metode određuje se uspoređivanjem stvarnih rezultata dobivenih mjerenjem sa stvarnim ili referentnim vrijednostima. Točnost se u ovom radu odredila pomoću metode standardnog dodatka. Metoda standardnog dodatka se koristi za određivanje točnosti kada referentni materijal nije dostupan. Originalnoj tableti Metoprana dodana je točno poznata količina standardne supstancije metoklopramida. Ispitivanje je provedeno pomoću 3 različite količine standarda koje su dodane originalnoj Metoprana. Točnost odnosno odstupanje od realnih vrijednosti se iskazuje analitičkim prinosom (*recovery, R*):

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \cdot 100$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost svih mjerenja, a \hat{x} stvarna vrijednost analita u uzorku.

Analitički prinos pri kvantifikaciji pomoću vrpce 1 bio je u rasponu od 87,091 do 94,204 dok za vrpce 2 u rasponu od 96,453 do 101,56 (Tablica 10.). Niži analitički prinos je uočeno kod uzoraka koji su se kvantificirali s vrpcom 1 u odnosu na uzorke kvantificirane vrpcom 2 što može biti posljedica pripreme uzorka, pa posljedično dovodi do nehomogene raspodjele djelatne tvari u samom uzorku. Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti da je analitička metoda točna i da se može primijeniti za određivanje količine aktivne tvari u ljekovitom pripravku.

Tablica 8. Točnost (analitički prinos %) metoklopramida u uzorku Metoprana

				Vrpca 1		Vrpca 2	
Metopran 10mg	Masa tablete (mg)	Metoklopramid (mg)	Metoklopramid (%)	Izmjerena masa	Recovery (%)	Izmjerena masa	Recovery (%)
+ 5mg	127,2	15	11,8	13,425	89,499	15,229	101,530
+ 10mg	132,2	20	15,1	17,418	87,091	19,291	96,453
+ 15mg	137,2	25	18,2	23,551	94,204	25,390	101,560

4.2.5. Granica dokazivanja i određivanja

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) se određuju prema formulama:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a}$$

pri čemu je σ standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca. Dobivene su sljedeće vrijednosti:

Tablica 9. LOD i LOQ za metadon

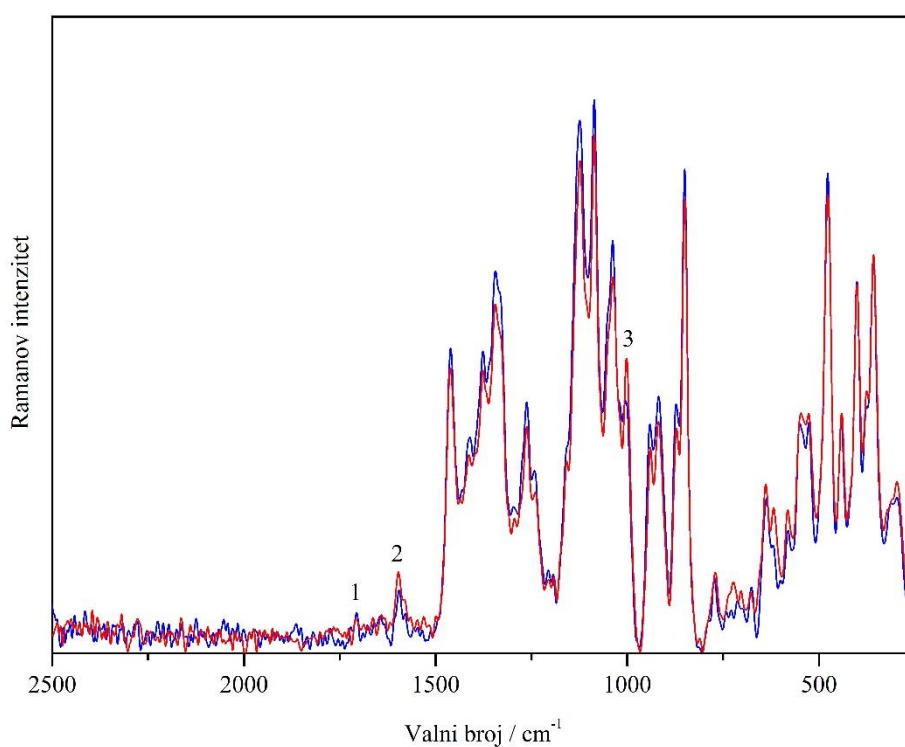
Metadon	Vrpca 1	Vrpca 2	Vrpca 3
standardno odstupanje (σ)	30,679	228,855	282,302
nagib pravca (a)	16,123	97,758	219,02
LOD (%)	6,279	7,725	4,253
LOQ (%)	19,028	23,410	12,889

Tablica 10. LOD i LOQ za metoklopramid

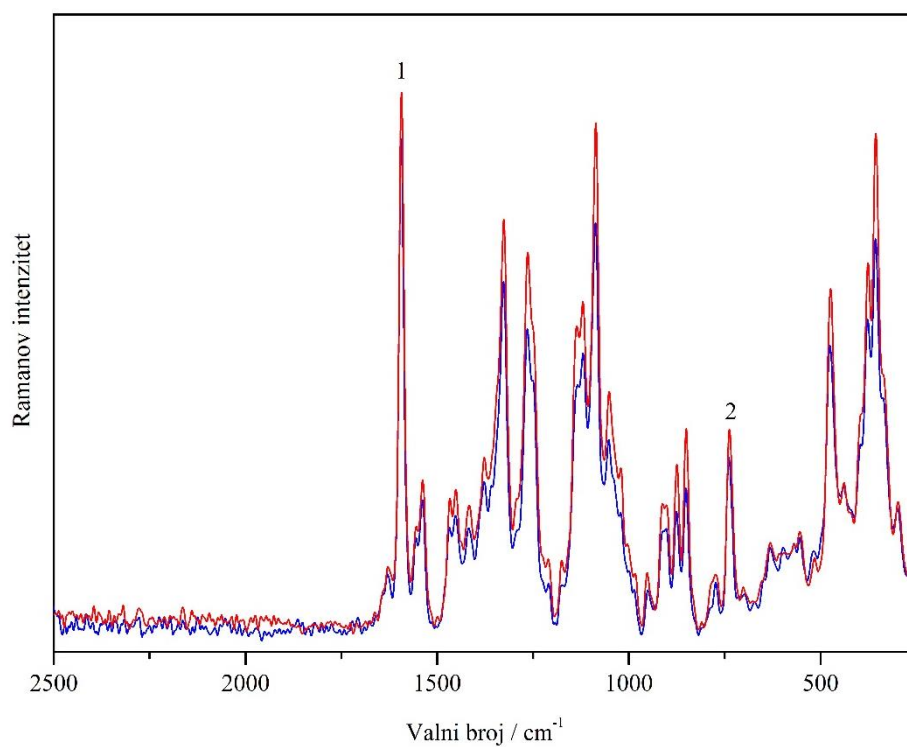
Metoklopramid	Vrpca 1	Vrpca 2
standardno odstupanje (σ)	1004,183	413,988
nagib pravca (a)	521,22	208,98
LOD (%)	6,595	6,658
LOQ (%)	19,984	20,177

4.3. Primjena metode na realne uzorke

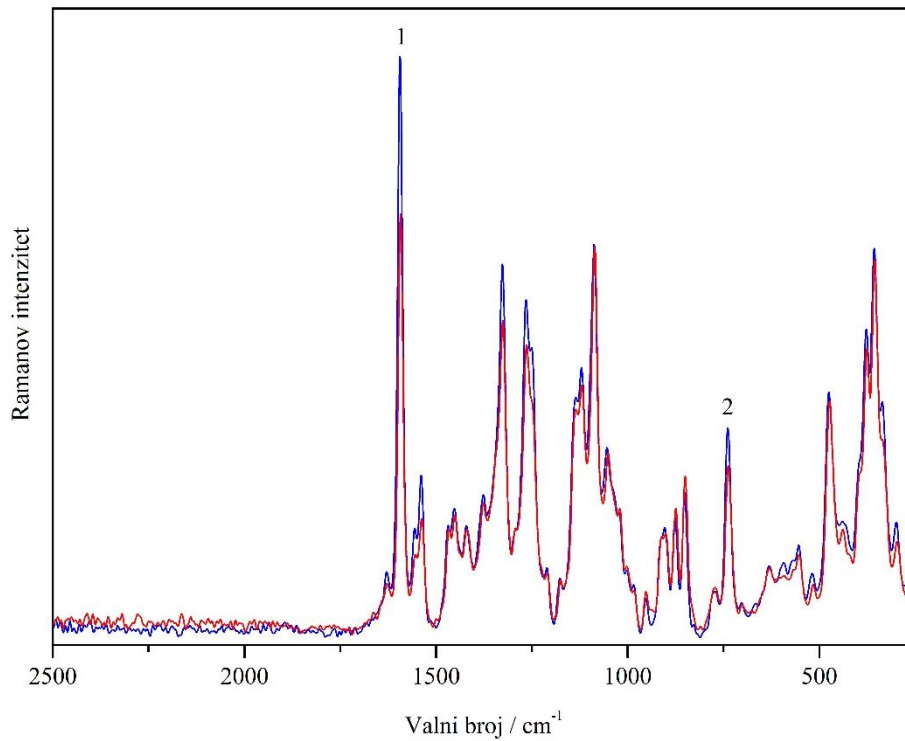
Razvijenom metodom određen je sadržaj metadona/metoklopramida u realnim uzorcima. Analiziran je jedan uzorak metadona (Heptanon) i dva uzorka metoklopramida (Reglan i Metopran). Svi uzorci su bili u obliku tableta. Snimljeni su prvo Raman spektri cijele tablete, a zatim su se tablete usitnile u tarioniku pomoću pistila te je snimljen Raman spektar usitnjene tablete (Slika 17., 18. i 19.).



Slika 177. Ramanovi spektri originalne (plavo) i homogenizirane (crveno) tablete Heptanona s naznačenim vrpčama metadona čije su površine korištene za kvantitativnu analizu.



Slika 1818. Ramanovi spektri originalne (plavo) i homogenizirane (crveno) tablete Reglana s naznačenim vrpčama metoklopramida čije su površine korištene za kvantitativnu analizu.



Slika 19. Ramanovi spektri originalne (plavo) i homogenizirane (crveno) tablete Metoprana s naznačenim vrpčama metoklopramida čije su površine korištene za kvantitativnu analizu.

Dobiveni rezultati analize su prikazani u Tablicama 13. i 14. s preračunatim vrijednostima površine pikova u postotak udjela:

Tablica 11. Rezultati teorijskih i izmjerenih udjela metadona u cijelim i usitnjenim tabletama

	Masa tablete (mg)	Teorijski % metadona	Izmjereni % metadona		
			Vrpca 1	Vrpca 2	Vrpca 3
Heptanon 5 mg	150,45	3,3	3,1*	2,5*	2,8*
			3,4**	2,1**	3,9**

* cijela tableta

** usitnjena tableta

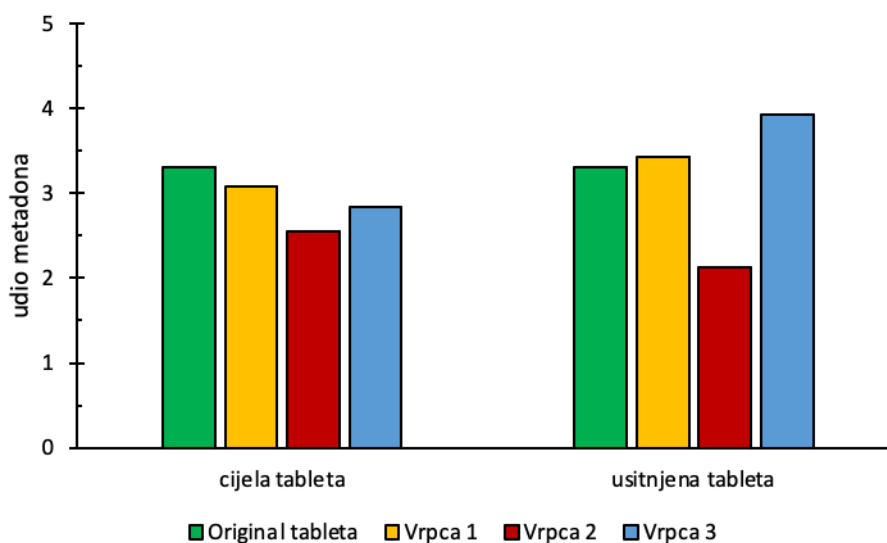
Tablica 12. Rezultati teorijskih i izmjerenih udjela metoklopramida u cijelim i usitnjenim tabletama

	Masa tablete (mg)	Teorijski % metoklopramida	Izmjereni % metoklopramida	
			Vrpca 1	Vrpca 2
Reglan 10 mg	127,9	7,8	6,9*	5,4*
			7,2**	6,7**
Metopran 10 mg	122,2	8,2	10,5*	9,3*
			8,0**	7,8**

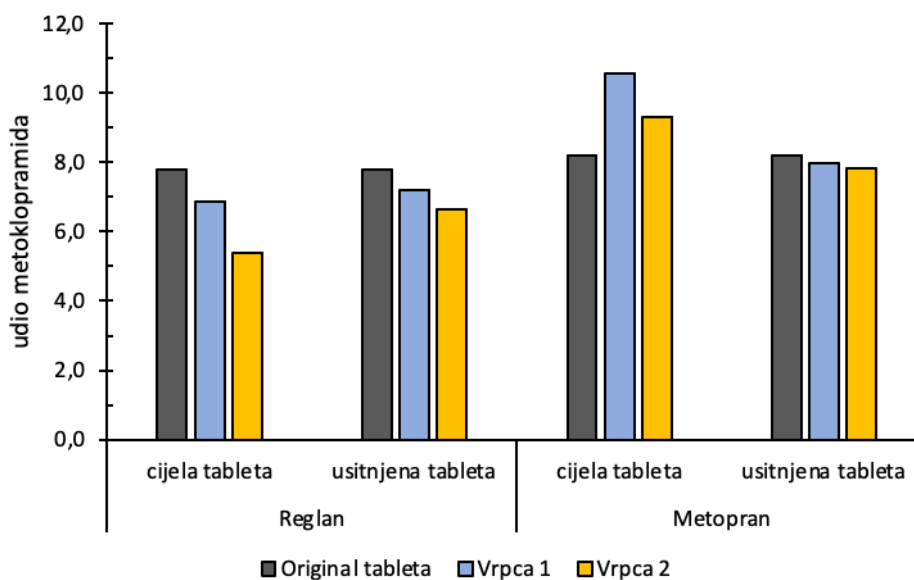
* cijela tableta

** usitnjena tableta

Usporedba rezultata sadržaja metadona/metoklopramida dobivenih razvijenom metodom s deklariranim vrijednostima prikazana je na Slikama 20. i 21.



Slika 20. Grafički prikaz udjela metadona u cijeloj i usitnjenj tableti Heptanona



Slika 21. Grafički prikaz udjela metoklopramida u cijeloj i usitnjenj tableti Reglana i Metoprana

Dobiveni rezultati upućuju na variranje rezultata ovisno o korištenoj vrpca za kvantifikaciju kao i o samom analiziranom uzorku (cijela ili usitnjena tableta). Svi rezultati ukazuju na točnije i preciznije vrijednosti kod usitnjenih tableta što se može objasniti postignutom boljom homogenom raspodjelom djelatne tvari u uzorku. Rezultati su pokazali statističko značajno odstupanje kod određivanja metadona u cijeloj kao i u usitnjenj tableti u slučaju kad se koristila vrpca 2 za kvantifikaciju. Primjenom vrpce 1 i 3 za kvantifikaciju nije dobiveno statistički značajno odstupanje i u slučaju analize cijele tablete kao i usitnjene tablete. Kod određivanja sadržaja metoklopramida primjenom vrpce 2 samo kod jednog realnog uzorka, i to pri mjerenju cijele tablete, rezultati su pokazali statističko značajno odstupanje. Sva ostala mjerenja nisu značajno odstupala od deklariranih vrijednosti. U daljnjim istraživanjima će se primijeniti veći broj uzoraka kao i kemometrijski pristup analizi podataka radi bolje kvantifikacije djelatnih tvari u uzorcima.

5. Zaključak

U ovom radu, Ramanova spektroskopija je predložena kao metoda za kvantitativnu analizu aktivnih farmaceutski tvari, metadona i metoklopramida. U radu su naglašene prednosti Ramanove spektroskopije u odnosu na kromatografske metode, prvenstveno kratko vrijeme analize kao i moguća analiza bez prethodne obrade uzorka (moguće analiziranje cijele tablete). Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti da je Ramanova spektroskopija brza i jednostavna spektroskopska metoda te da je prikladna za kvantitativno određivanje djelatnih tvari u gotovom ljekovitom pripravku.

6. Literatura

1. Abu Fara D, Rashid I, Alkhamis K, Al-Omari M, Chowdhry BZ, Badwan A. Modification of α -lactose monohydrate as a direct compression excipient using roller compaction. *Drug Dev Ind Pharm* 2018, 44, 2038-2047.
2. Ahmad T, Valentović MA, Rankin GO. Effects of cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms on methadone metabolism and pharmacodynamics. *Biochem Pharmacol* 2018, 153, 196-204.
3. Al-Saffar A, Lennernäs H, Hellström PM. Gastroparesis, metoclopramide, and tardive dyskinesia: Risk revisited. *Neurogastroenterol Motil* 2019, 31, 13617.
4. Bell SEJ. Quantitative Analysis of Solid Dosage Formulations by Raman Spectroscopy. U: *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*. Šašić S, urednik, New Jersey, Wiley and Sons, 2008, str. 29-36.
5. Chhabra S, Bull J. Methadone. *Am J Hosp Palliat Care* 2008, 25, 146-150.
6. Crowther JB. Validation of pharmaceutical test methods. U: *Handbook of modern pharmaceutical analysis*. Ahuja S, Scypinski S, urednici, San Diego, Academic press 2001, str. 415-428.
7. Farquharson S, Brouillette C, Smith W, Shende C. A Surface-Enhanced Raman Spectral Library of Important Drugs Associated With Point-of-Care and Field Applications. *Front Chem* 2019, 7.
8. Ferrari A, Coccia CP, Bertolini A, Sternieri E. Methadone - metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res* 2004, 50, 551-559.
9. Fini G. Applications of Raman spectroscopy to pharmacy. *J Raman Spectrosc* 2004, 35, 335-337.
10. Gala U, Chauhan H. Principles and applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov* 2015, 10, 187-206.
11. Hebbink GA, Dickhoff BHJ. Application of lactose in the pharmaceutical industry. U: *Lactose*. Paques M, Lindner C, urednici, San Diego, Academic Press 2019, str. 175-229.
12. Hendren G, Aponte-Feliciano A, Kovač A. Safety and efficacy of commonly used antiemetics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015, 11, 1753-1767.
13. Ivanjko P. Razvoj i validacija metode za određivanje paracetamola u tabletama primjenom Ramanove spektroskopije. Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2020.

14. Leopold N, Cîntă-Pînzaru S, Szábó L, Ileşan D, Chiş V, Cozara O, Kiefer W. Raman and SERS study of metoclopramide at different pH values. *J Raman Spectrosc* 2010, 41, 248–255.
15. Li Z, Deen MJ, Kumar S, Selvaganapathy PR. Raman Spectroscopy for In-Line Water Quality Monitoring - Instrumentation and Potential. *Sensors* 2014, 14, 17275-17303.
16. Martin CM. Methadone: Marvelous, Malevolent, or Merely Misunderstood? *Consult Pharm* 2011, 26, 32-40.
17. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – Praktikum: Validacija analitičkog postupka. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, 135-137.
18. Scuderi PE. Pharmacology of antiemetics. *Int Anesthesiol Clin* 2003, 41, 41-66.
19. Smith E, Dent G. Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach. Chichester, Wiley and Sons, 2005, str. 160-166.
20. Strachan CJ, Rades T, Gordon KC, Rantanen J. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids. *J Pharm Pharmacol* 2007, 59, 179-192.
21. Šašić S, Ozaki Y. Introduction to Raman spectroscopy. U: Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy. Šašić S, urednik, New Jersey, Wiley and Sons 2008, str. 1-10.
22. Trachta G, Schwarze B, Sägmüller B, Brehm G, Schneider S. Combination of high-performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine. *J Mol Struct* 2004, 693, 175–185.
23. Wang WT, Zhang H, Yuan Y, Guo Y, He SX. Research Progress of Raman Spectroscopy in Drug Analysis. *AAPS PharmSciTech* 2018, 19, 2921-2928.

7. Sažetak/Summary

Metadon je sintetski opioid koji se danas primarno koristi kao supstitucijska terapija u liječenju opioidne ovisnosti te se sve više istražuje, ali i koristi u liječenju kronične boli.

Metoklopramid je primarno indiciran u odraslih za prevenciju i simptomatsko liječenje mučnine i povraćanja induciranih radioterapijom i kemoterapijom. Problem je što metoklopramid čini gotovo polovinu potrošnje lijekova za funkcionalne GIT poremećaje, a indiciran je samo kao dodatna terapija.

Svrha ovog diplomskog rada bila je razviti i validirati brzu i jednostavnu metodu za određivanje metadona i metoklopramida u tabletama primjenom disperzivne Ramanove spektroskopije, a zatim ispitati razvijenu metodu u određivanju udjela metadona i metoklopramida u komercijalno dostupnim tabletama.

Preliminarnim ispitivanjima odabran je laser 785 nm i laktoza kao najbolje punilo. Kod validacije analitičke metode ispitivani su parametri: linearnost, homogenost, preciznost (ponovljivost i srednja preciznost), točnost te granica određivanja i dokazivanja. Rezultati provedenih validacijskih mjerenja za sve parametre većinom su se nalazili unutar postavljenih granica, a svako odstupanje se može objasniti pogreškom analitičara prilikom pripreme uzorka. Primjenom validirane metode na realne uzorke, dobivene su vrijednosti udjela metadona i metoklopramida u uzorcima tableta te su uspoređene s deklariranim vrijednostima. U daljnjim istraživanjima primjenjivati će se kemometrijski pristup analizi podataka zbog bolje kvantifikacije djelatnih tvari u uzorcima.

Methadone is a synthetic opioid used primarily as replacement therapy in the treatment of opioid dependence and is increasingly being researched, but it is also used in the treatment of chronic pain.

Metoclopramide is primarily indicated in adults for the prevention and symptomatic treatment of nausea and vomiting induced by radiation and chemotherapy. Problematically, metoclopramide accounts for almost half of drug use in functional GIT disorders, although it is only indicated as adjunctive therapy.

The aim of this work was to develop and validate a fast and simple method for the determination of methadone and metoclopramide in tablets using dispersive Raman spectroscopy, and then to investigate the developed method in the determination of the proportion of methadone and metoclopramide in tablets.

In preliminary experiments, a 785 nm laser and lactose were selected as the best filler. In the validation of the analytical method, the following parameters were examined: linearity, homogeneity, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy and limits of detection and quantification. The results of the validation measurements performed for all parameters, are mostly within the specified limits, with deviations due to errors made by analyst during sample preparation. Using a validated method on real samples, the values of the content of methadone and metoclopramide in tablet samples were determined and compared with the declared content. In further studies, a chemometric approach to data analysis will be applied to achieve better quantification of the active ingredients in the samples.

8. Temeljna dokumentacijska kartica/basic documentation card

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ I VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE METADONA I METOKLOPRAMIDA U TABLETAMA PRIMJENOM RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE

Ivan Pižir

SAŽETAK

Metadon je sintetski opioid koji se danas primarno koristi kao supstitucijska terapija u liječenju opioidne ovisnosti te se sve više istražuje, ali i koristi u liječenju kronične boli. Metoklopramid je primarno indiciran u odraslih za prevenciju i simptomatsko liječenje mučnine i povraćanja induciranih radioterapijom i kemoterapijom. Problem je što metoklopramid čini gotovo polovinu potrošnje lijekova za funkcionalne GIT poremećaje, a indiciran je samo kao dodatna terapija. Svrha ovog diplomskog rada bila je razviti i validirati brzu i jednostavnu metodu za određivanje metadona i metoklopramida u tabletama primjenom disperzivne Ramanove spektroskopije, a zatim ispitati razvijenu metodu u određivanju udjela metadona i metoklopramida u komercijalno dostupnim tabletama. Preliminarnim ispitivanjima odabran je laser 785 nm i laktoza kao najbolje punilo. Kod validacije analitičke metode ispitivani su parametri: linearnost, homogenost, preciznost (ponovljivost i srednja preciznost), točnost te granica određivanja i dokazivanja. Rezultati provedenih validacijskih mjerenja za sve parametre većinom su se nalazili unutar postavljenih granica, a svako odstupanje se može objasniti pogreškom analitičara prilikom pripreme uzorka. Primjenom validirane metode na realne uzorke, dobivene su vrijednosti metadona i metoklopramida u uzorcima tableta te su uspoređene s deklariranim. U daljnjim istraživanjima primjenjivati će se kemometrijski pristup analizi podataka zbog bolje kvantifikacije djelatnih tvari u uzorcima.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 21 grafičkih prikaza, 14 tablica i 23 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ramanova spektroskopija, metadon, metoklopramid, validacija analitičke metode

Mentor: **Doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr. sc. Ivana Bačić, dipl. ing.**, *glavni vještak za požare i eksplozije, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić"*

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivana Bačić, dipl. ing., *glavni vještak za požare i eksplozije, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić"*

Prof. dr. sc. Mario Jug, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytical chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINING OF METHADONE AND METOCLOPRAMIDE IN TABLETS USING RAMAN SPECTROSCOPY

Ivan Pižir

SUMMARY

Methadone is a synthetic opioid used primarily as replacement therapy in the treatment of opioid dependence and is increasingly being researched, but it is also used in the treatment of chronic pain. Metoclopramide is primarily indicated in adults for the prevention and symptomatic treatment of nausea and vomiting induced by radiation and chemotherapy. Problematically, metoclopramide accounts for almost half of drug use in functional GIT disorders, although it is only indicated as adjunctive therapy. The aim of this work was to develop and validate a fast and simple method for the determination of methadone and metoclopramide in tablets using dispersive Raman spectroscopy, and then to investigate the developed method in the determination of the proportion of methadone and metoclopramide in tablets. In preliminary experiments, a 785 nm laser and lactose were selected as the best filler. In the validation of the analytical method, the following parameters were examined: linearity, homogeneity, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy and limits of detection and quantification. The results of the validation measurements performed for all parameters, are mostly within the specified limits, with deviations due to errors made by analyst during sample preparation. Using a validated method on real samples, the values of the content of methadone and metoclopramide in tablet samples were determined and compared with the declared content. In further studies, a chemometric approach to data analysis will be applied to achieve better quantification of the active ingredients in the samples.

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

Thesis includes: 40 pages, 21 figures, 14 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Raman spectroscopy, methadone, metoclopramide, validation

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Ivana Bačić, Ph.D.**, *Chief Expert for Fire and Explosions, Forensic Science Centre „Ivan Vučetić“*

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Bačić, Ph.D., *Chief Expert for Fire and Explosions, Forensic Science Centre „Ivan Vučetić“*

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

The thesis was accepted: April 2021.