

# Razvoj in vitro metode za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljnih formulacija s dodatkom izopropanola i Capryola 90

---

**Novak, Viktor**

**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:163:715437>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Viktor Novak**

**Razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja  
deksametazona iz uljnih formulacija s dodatkom  
izopropanola i Capryola<sup>®</sup>90**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Industrijska farmacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u PLIVA HRVATSKA d.o.o. pod stručnim vodstvom dr.sc. Biserke Cetina-Čižmek i suvoditeljstvom dr.sc. Nikole Marjanovića, PLIVA, Istraživanje i razvoj.

Zahvaljujem mentorici dr.sc. Biserki Cetina-Čižmek na prilici da pod njenim stručnim vodstvom provodim zanimljivo i poučno istraživanje koje mi je omogućilo stjecanje novih znanja i vještina. Moje velike zahvale idu i dr.sc. Nikoli Marjanoviću koji me strpljivo vodio kroz proces istraživanja i pisanja rada. Upućujem zahvale PLIVA HRVATSKA d.o.o. na omogućenim uvjetima rada i materijalima.

Kao i uvijek u svemu, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na nesebičnoj podršci.

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Pripravci produljenog oslobađanja .....	1
1.2. Uljne otopine.....	2
1.3. Biljna ulja.....	5
1.4. Oslobađanje djelatne tvari.....	6
1.5. Ricinusovo ulje .....	10
1.6. Suotapala .....	10
1.7. Capryol®90 .....	12
1.8. Izopropanol.....	12
1.9. Deksametazon .....	13
<b>2. Obrazloženje teme</b> .....	16
<b>3. Materijali i metode</b> .....	17
3.1. Materijali .....	17
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprema formulacija i standarda te receptorskog medija .....	18
3.2.2. Mjerenje oslobađanja deksametazona .....	18
3.2.3. Priprema placeba i mjerenje oslobađanja iz placeba.....	19
3.2.4. Analiza na UPLC-u.....	20
3.2.5. Usporedno praćenje oslobađanja deksametazona na USP II uređaju UPLC-om .....	20
3.2.6. Optimizacija pripreme formulacija kod ponovljenog usporednog mjerenja .....	20
3.2.7. Ispitivanje stabilnosti deksametazona .....	21
<b>4. Rezultati i rasprava</b> .....	22
4.1. Oslobađanje deksametazona iz uljnih formulacija na USP II uređaju spregnutom optičkim probama .....	23
4.2. ApSORPCIJSKI profili placebo formulacija na USP II uređaju spregnutom optičkim probama .....	24
4.3. Oslobađanje deksametazona iz uljnih formulacija na USP II uređaju usporednom detekcijom optičkim probama i UPLC-om.....	26
4.4. Određivanje intenziteta interferencije prilikom očitavanja optičkim probama .....	29
4.5. Provjera stabilnosti deksametazona .....	31
4.6. Ponovljivost rezultata .....	34
<b>5. Zaključci</b> .....	36

<b>6. Literatura</b> .....	37
<b>7. Sažetak/summary</b> .....	43
<b>8. Prilozi</b> .....	45
<i>8.1. Popis slika</i> .....	45

# 1. Uvod

## 1.1. Pripravci produljenog oslobađanja

Terapijsko djelovanje mnogih lijekova može se poboljšati u obliku farmaceutskih pripravaka produljenog oslobađanja lijeka. Stalna koncentracija lijeka u plazmi može se postići brojnim metodama, kao što su opetovana oralna, topička, plućna, parenteralna primjena, isporuka infuzijskim pumpama te dugotrajne injekcije i implantati.

Injekcije i implantati produljenog oslobađanja lijeka nude brojne prednosti (neke od prednosti dijele i s drugim metodama produljenog djelovanja). Ponavljano davanje lijeka bolusom (oralno ili parenteralno) može rezultirati klasičnim „brijeg i dolina“ obrascem farmakokinetičkog profila u kojem maksimalna koncentracija lijeka u plazmi može premašiti toksični prag (što dovodi do neželjenih nuspojava), dok minimalna koncentracija lijeka u plazmi može pasti ispod minimalnog praga potrebnog za učinkovitost. Davanje lijekova produljenog djelovanja može rezultirati u stalnim razinama koncentracije lijeka u krvi koje se održavaju iznad minimalnog praga terapijske učinkovitosti, a istovremeno ispod toksičnog praga, čime se postiže bolja farmakodinamika bez neželjenih nuspojava.

Korištenje dugo djelujućih injekcija i implantata može biti puno prihvatljivije za pacijenta i pružatelja medicinske usluge jer se na taj način smanjuje učestalost primjene lijeka. Smanjena učestalost primjene može rezultirati uštedama za zdravstveni sustav te poboljšati pacijentovo poštivanje terapijskog režima (npr. bolju adherenciju), čime se povećava vjerojatnost željenog terapijskog ishoda. Uz to, adherencija pacijenta prema propisanoj farmakoterapiji može se poboljšati kada su nuspojave lijeka smanjene primjenom dugotrajnih injekcija i implantata (Burgess i Wright, 2012).

Zbog praktičnosti i prihvatljivosti za pacijenta, oralna primjena lijekova je najatraktivniji i preferirani put primjene lijekova. Međutim, neki lijekovi se ne mogu tolerirati oralnim putem zbog kiselog okruženja i raznolikosti proteolitičkih enzima (proteaza) u gastrointestinalnom traktu. Zbog takvih uvjeta dolazi do razgradnje ili metaboliziranja lijeka kao što je to u slučaju proteinskih i peptidnih lijekova, što rezultira niskom bioraspoloživošću (Semalty i sur., 2007).

Štoviše, pacijenti koji ne mogu podnijeti oralni put primjene (npr. bolesnici s dišnim problemima ili poremećajem probavnog sustava) trebaju ne-oralnu (parenteralnu) primjenu za primanje lijekova i prehranu. Parenteralna primjena (npr. intravenska, intramuskularna i potkožna) je također korisna za:

- a) lijekove sa slabom oralnom bioraspoloživošću
- b) liječenje fizičkih ili mentalnih poremećaja kod kojih su otežani drugi načini primjene (oralni ili inhalacijski)
- c) dostavu lijekova na specifična mjesta u organizmu.

Lokalna isporuka može se postići izravnim ubrizgavanjem ili implantacijom u ciljne organe te putem sustava za isporuku koji omogućuju pasivno ili aktivno ciljanje. To omogućava visokim dozama lijekova da dođu do određenih organa ili tkiva (npr. oči, mozak, zglobovi, centralni živčani sustav i srce) poboljšavajući terapijske efekte te izbjegavajući sistemske nuspojave. Uzevši u obzir biokompatibilnost i probleme povezane s višestrukim injekcijama i potencijalnim sistemskim učincima nastalim uslijed visoke vršne koncentracije lijekova, dugotrajne injekcije i implantati su često preferirani (Constantinides i sur., 2008; Medlicott i sur., 2004; Dash i Cudworth, 1998). Nekoliko klasa lijekova podložno je parenteralnoj primjeni, uključujući protuupalne lijekove (fentonil, deksametazon), antipsihotičke lijekove (risperidon), lijekove protiv raka (paklitaksel, citokini), lijekove za liječenje koronarne arterijske bolesti (simvastatin), proteinske i peptidne lijekove, te gensku terapiju. Je li lijek pogodan za dugo djelujuću parenteralnu formulaciju ovisi o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima te farmakokinetičkom i farmakodinamskom profilu (Burgess i Shen, 2012).

## 1.2. Uljne otopine

Formulacija lijekova u obliku lipofilnih otopina ili suspenzija može dovesti do znatnog produljenja djelovanja lijeka nakon parenteralne primjene (Larsen i sur., 2012).

Formulacije temeljene na suspenzijama ljekovite tvari u vodenim ili uljnim nosačima bile su među prvim razvijenim sustavima za injekcije produljenog oslobađanja lijeka. Ovi se sustavi u

velikoj mjeri baziraju na svojstvima topljivosti čestica suspenzije kako bi se upravljalo brzinom otpuštanja lijeka iz depoa. Kada topljivost ljekovite tvari u uljnom nosaču to dopušta, alternativni pristup je formuliranje uljne otopine lijeka. U ovom se slučaju formulator poglavito oslanja na koeficijent razdjeljivanja između ulja i vode te disperziju nosača kako bi upravljao oslobađanjem. Suspenzije i uljne otopine formulacije su općenito pogodne samo za spojeve s niskom topljivošću u vodi. Ako je topljivost lijeka u vodenom mediju previsoka da bi se omogućilo stvaranje formulacije produljenog oslobađanja, topljivost se može smanjiti formiranjem slabo topljivog prolijeka. Jedan od načina je esterifikacija alkanima (npr. za dobivanje enantata, dekanata ili cipionata) koja se često koristi za hormone poput testosterona. Također, mogu se formirati slabo topljivi kompleksi ili soli, kao što su cink-inzulin i kompleksi s karboksimetilcelulozom (Chien, 1981). Formulacije suspenzija i uljnih otopina najčešće se primjenjuju intramuskularno, ali moguća je i subkutana, intraartikularna i intradermalna primjena.

Nedostaci njihove upotrebe su pojava rizika od reakcije preosjetljivosti (Moghimi i sur., 2006), nedostatak fizičke stabilnosti (liposomi) (Sharma i Sharma, 1997) te prilično nepredvidive reakcije razgradnje što dovodi do fluktuacija u cjelokupnom profilu oslobađanja lijeka i problematične proizvodnje (mikrosfere) (Freitas i sur., 2005; Jiang i sur., 2005). Ključne prednosti jednostavnih lipofilnih otopina uključuju jednostavnu proizvodnju (uključujući terminalnu sterilizaciju), povoljnu dugoročnu stabilnost i mogućnost dizajniranja spremnika s prilagođenim karakteristikama isporuke. Stoga, za nove kandidate lijekova koji zahtijevaju primjenu u obliku parenteralnog depoa, razvoj injekcije na bazi lipofilne otopine trebao bi se smatrati realnom opcijom (Larsen i sur., 2012).

Uljne otopine lipofilnih spojeva naširoko se koriste u formulacijama za produljeno oslobađanje. Iako se ovaj farmaceutski pristup primjenjuje već nekoliko desetljeća, objavljeno je relativno malo istraživanja o temeljnim parametrima koji određuju apsorpcijske karakteristike. Lijek otopljen u ulju oslobađa se kao rezultat koncentracijskog gradijenta. Relevantni parametri su:

- a) koncentracija u ulju
- b) debljina difuzijskog sloja kao i koeficijent difuzije u ulju
- c) površina depoa



d) koeficijent razdjeljivanja (P) između ulja i tjelesne tekućine

e) debljina difuzijskog sloja u vodenoj fazi kao i difuzivnost u ovom odjeljku (Kalicharan i sur., 2016).

Konvencionalne injekcije produženog djelovanja sastoje se od lipofilnih lijekova u vodenim otapalima u obliku suspenzija ili otopina u biljnim uljima. Ovakve formulacije obično je potrebno dozirati svakih nekoliko tjedana. U formulacijama suspenzija, korak koji ograničava brzinu apsorpcije lijeka je otapanje čestica lijeka u formulaciji ili u tkivnoj tekućini koja okružuje formulaciju lijeka. Slabo topljive soli u vodi mogu se koristiti za kontrolu brzine otapanja čestica lijeka u cilju produljene apsorpcije, a olanzapin pamoat je primjer soli olanzapina slabo topljive u vodi. Određeni lijekovi za pripravke produženog djelovanja sintetiziraju se esterifikacijom izvornog lijeka i dugolančane masne kiseline. Na temelju izuzetno niske topljivosti u vodi, lijek u obliku estera masne kiseline se otapa polako na mjestu intramuskularne primjene i hidrolizira se u izvorni lijek. Jednom kada se ester hidrolizira intramuskularno, izvorni lijek postaje dostupan u sistemske cirkulaciji. Brzina otpuštanja paliperidon palmitata iz injekcije dugog djelovanja određena je ovim mehanizmom. U mnogim formulacijama, ester masne kiseline lijeka koristi se za pripremu parenteralne otopine na bazi ulja, a brzina oslobađanja lijeka iz otopine kontrolirana je raspodjelom lijeka između nosača ulja i tkivne tekućine te stupnjem biokonverzije lijeka od estera do izvornog lijeka. Međutim, nekoliko drugih čimbenika poput mjesta primjene, volumena ubrizgavanja, stupnja širenja depoa na mjestu primjene te apsorpcije i raspodjele uljne otopine može utjecati na ukupni farmakokinetički profil lijeka ([www.pharmtech.com](http://www.pharmtech.com)).

Injektibilnost injekcija na bazi ulja može se smatrati obrnuto proporcionalnim s viskoznosti ulja (Dexter i Shott, 1979). Postizanje poželjne viskoznosti formulacije može se postići miješanjem različitih ulja. Injektibilnost se narušava velikom viskoznosti otopine. Iako razmjerno niska viskoznost otopine pogoduje injektibilnosti, poboljšana viskoznost može pod određenim uvjetima rezultirati smanjenjem brzine otpuštanja lijeka na mjestu primjene. To se događa ako difuzija lijeka iz uljne faze u uljno-vodeno sučelje, umjesto raspodjele lijeka u vodenu fazu, postane korak koji ograničava brzinu u cjelokupnom procesu otpuštanja lijeka (Sims i Worthington, 1985). Nedostatak veze između viskoznosti nosača i otpuštanja lijekova *in vitro* uočen je i u studiji koja se temelji na čistim biljnim uljima i njihovim smjesama (Fredholt i sur.,

2000). Čini se da viskoznost ulja ne utječe značajno na brzinu apsorpcije lijeka nakon intramuskularne primjene (Hirano i sur., 1982; Hirano i sur., 1981).

Budući da je dielektrična konstanta većine biljnih ulja blizu nule, topljivost polarnih spojeva i iona u takvim otapalima je vrlo niska. Topljivost je povezana s jačinom privlačnih intermolekularnih sila između molekula triglicerida i molekula otopljenog lijeka. Privlačenje između takvih molekula može uključivati van der Waalsove sile (uglavnom međudjelovanja dipola i dipola) i stvaranje vodikove veze s trigliceridnim esterskim skupinama koje djeluju kao akceptori vodika. Topljivost u lijekovima varira s kemijskim sastavom pojedinačnih ulja (Larsen i sur., 2012).

### 1.3. Biljna ulja

Biljna ulja se koriste kao otapala u većini dugo djelujućih parenteralnih lipofilnih otopina. Alternativna otapala su sintetički esteri masnih kiselina poput izopropil miristata i etil oleata. Biljna ulja sadrže razne trigliceride u različitim omjerima gdje ricinusovo ulje posebno odstupa od drugih ulja visokim sadržajem masnih kiselina s hidroksi skupinom (ricinoleinska kiselina). Masnokiselinski sastav biljnih ulja utječe na gustoću i viskoznost otapala. Općenito, biljna ulja pokazuju prihvatljivu kemijsku stabilnost. Međutim, treba naglasiti da trigliceridi koji sadrže nezasićene masne kiseline mogu biti osjetljivi na proces autooksidacije, što je put razgradnje kataliziran toplinom i svjetlošću (Larsen i sur., 2012).

U idealnom slučaju, ulja koja se koriste u depo formulacijama trebaju biti kemijski stabilna i inertna na reakcije s lijekom, relativno niske viskoznosti, fizički stabilna u širokom rasponu temperature, ne-iritirajuća i bez antigenih svojstava (Brown i sur., 1944). Ulja koja su prihvatljiva za injekcije uključuju maslinovo ulje, kukuruzno ulje, sezamovo ulje, kikirikijevo ulje, bademovo ulje, ulje maka, sojino ulje, ulje sjemenki pamuka i ricinusovo ulje (Murdan i Florence, 2000). Biljna ulja kao prirodni proizvodi sadrže razne trigliceridne komponente, uključujući oleinsku, linolensku, stearinsku, palmitinsku i miristinsku kiselinu (Hirano i sur., 1981). Sezamovo ulje se uglavnom preferira zbog povećane stabilnosti koju daju prirodni antioksidansi, ali je osjetljivo na svjetlost. Izopropil miristat, etil oleat, benzil benzoat,

polioksietilen oleinski trigliceridi (Labrafils), rafinirano biljno ulje (frakcionirano kokosovo ulje, Viscoleo) i PEG su sintetske alternative. Etil oleat se ponekad preferira zbog niže viskoznosti. Ulja se općenito dobro podnose od strane pacijenata, no neki pacijenti ipak mogu imati alergijske reakcije na biljna ulja. Uljne formulacije se obično primjenjuju intramuskularno jer subkutana primjena često može uzrokovati bol i iritaciju na mjestu primjene (Murdan i Florence, 2000).

#### 1.4. Oslobađanje djelatne tvari

Ispitivanje oslobađanja je sredstvo praćenja brzine otpuštanja lijeka iz dozirnog farmaceutskog oblika *in vitro* i široko se koristi u farmaceutskoj industriji tijekom razvoja formulacije, kontrole kvalitete, ispitivanja stabilnosti i predviđanja bioraspoloživosti kako bi se pomoglo u određivanju bioekvivalencije, a parametri oslobađanja lijeka imaju kliničku važnost i s regulatorne strane (Worsfold i sur., 2019).

Svrhovita metoda *in vitro* oslobađanja trebala bi se razviti na temelju razmatranja namjeravane upotrebe parenteralnog proizvoda, mjesta primjene, načela formulacije i prirode ljekovite tvari. Osnovni uvjet za uspješan razvoj *in vitro* metode oslobađanja je da mehanizam za oslobađanje *in vitro* treba odgovarati onome koji je uočen u uvjetima *in vivo*. Stoga se transport oslobođenog lijeka dalje od mjesta primjene, kao i uporaba biorelevantnih medija ili uvjeta, također mogu uzeti u obzir u dizajnu određenog modela oslobađanja (Larsen i sur., 2013).

Razvoj prikladnih *in vitro* modela oslobađanja (za kontrolu kvalitete i razvoj formulacije) predstavlja kritičnu aktivnost koja bi se, po mogućnosti, trebala započeti u ranoj fazi dizajniranja depoa. U idealnom slučaju, rezultat bi trebala biti uspostava *in vitro* - *in vivo* korelacije (IVIVC). Obično, to zahtijeva da otpuštanje lijeka iz depoa bude korak koji ograničava brzinu apsorpcije, a da je mehanizam oslobađanja lijeka isti *in vitro* i *in vivo*. Stoga su takvi odnosi najčešće linearni iako su i nelinearne korelacije također prihvatljive (Uppoor, 2001). Ne postoje odobrene standardne metode za ispitivanje oslobađanja lijekova iz parenteralnih proizvoda s produljenim oslobađanjem, unatoč davno prepoznatoj potrebi za takvim metodama oslobađanja *in vitro* (Burgess i sur., 2004, Burgess i sur., 2002, Lusina Kregar i sur., 2015). U području primjene

formulacija na bazi ulja, primijenjene metodologije oslobađanja mogu se grubo podijeliti u tri kategorije:

- a) modeli s lipofilnom otopinom koja pluta na vrhu medija
- b) tehnike dijalize
- c) metode kontinuiranog protoka (Larsen i Larsen, 2009)

Model rotirajuće dijalize koristi se za proučavanje oslobađanja lijeka iz lipofilnih otopina. Do sada još nisu postignute stroge *in vitro* – *in vivo* korelacije što je najvjerojatnije rezultat toga da trenutni *in vitro* modeli oslobađanja ne mogu oponašati na adekvatan način brzinu, ravnotežu i procese transporta ljekovite tvari kao i ponašanje samog depoa u okolini mjesta primjene (Larsen i sur., 2012).

Iscrpno razumijevanje važnosti takvih procesa koji se odvijaju u neposrednom okruženju mjesta primjene preduvjet je za razvoj diskriminatornih *in vitro* modela oslobađanja. S druge strane, postoje *in vivo* uvjeti koji se ne mogu lako simulirati *in vitro*. Neki od tih događaja, koji utječu na sudbinu lijeka *in vivo*, pridonose varijabilnosti farmakološkog odgovora. To se može dogoditi kada tzv. "drugi odjeljak" (npr. preraspodjela lijeka u masno tkivo) kontrolira širenje lijeka u krv (Wallis i Simkin, 1987). Nepredvidivo širenje na mjestu primjene može dovesti do različitih dodirnih područja između ulja i tkivne tekućine što rezultira varijabilnošću u cjelokupnom procesu oslobađanja (Simkin i sur., 1995; Bauer i sur., 1933). Treći *in vivo* fenomen, koji se ne može simulirati *in vitro*, pojava je tkivnog odgovora na umetanje depoa. Reakcija tkiva (intenzitet i trajanje upalnog odgovora) ovisi o veličini, obliku te fizikalno-kemijskim svojstvima ubrizganog biomaterijala (Simkin i Benedict, 1990). Za dugotrajne depo formulacije, nestajanje ulja koje sadrži lijek s mjesta ubrizgavanja (i potencijalno drugi procesi oslobađanja lijeka) doprinosi ukupnoj brzini otpuštanja lijeka s lokalnog mjesta primjene (Simkin i sur., 1995; Bauer i sur., 1933). Potonje *in vivo* uvjete teško je simulirati primjenom *in vitro* modela oslobađanja lijeka i s obzirom na to uspostavljanje IVIVC-a može postati problematično.

Mnoge uljne otopine uklanjaju se s mjesta primjene polako, otapanjem u tjelesnoj tekućini ili pretvaranjem u topljive oblike, te prolijevanjem i transportom uljnih mikrokapljica s površine depoa. Vizualno promatranje nakon intramuskularne primjene pokazalo je da se uljni depoi ne šire tako brzo kao vodeni sustavi i da poprimaju spljošteni oblik. Ovo je važno jer se očekuje da

će površina depoa biti ključna odrednica brzine oslobađanja. Pokazalo se da apsorpcija lijekova iz uljnih otopina spada u kinetiku prvog reda u slučajevima kada je apsorpcija nosača sporija u odnosu na aktivnu tvar. U ovom slučaju, difuzija aktivne tvari kroz vodenu fazu koja okružuje depo je ograničavajući korak, odnosno konstanta brzine oslobađanja kontrolirana je koeficijentom raspodjele između ulja i vode te volumenom injektirane otopine. Suprotno tome, apsorpcija lijekova iz uljnih suspenzija može slijediti kinetiku nultog reda, jer se topljivost lijeka u nosaču održava na točki zasićene topljivosti dok se čestice suspenzije potpuno ne otope (Hirano i sur., 1981).

U farmaceutskoj industriji, ispitivanje otapanja lijekova rutinski se koristi za dobivanje kritičnih informacija o *in vitro* oslobađanju lijeka u svrhu kontrole kvalitete, tj. za procjenu ujednačenosti serija u proizvodnji čvrstih oralnih oblika kao što su tablete, te tijekom procesa razvoja lijeka, odnosno predviđanja profila oslobađanja lijekova *in vivo*. Postoji nekoliko uređaja za praćenje otapanja. Standardizirani su i specificirani u američkoj farmakopeji (USP) (United States Pharmacopeia, 2008). Među tim se aparatima najčešće i najjeftinije koristi USP 2 aparatura za ispitivanje otapanja (Bai i sur., 2011).

USP aparature 1 i 2 najčešće se koriste, ponajviše zato što su jednostavne, robusne i adekvatno standardizirane, a podržane su i širim iskustvom eksperimentalne uporabe od ostalih vrsta uređaja. Zbog ovih prednosti, one su obično prvi izbor za ispitivanje otapanja čvrstih oblika *in vitro* (pripravci s neposrednim kao i kontroliranim/modificiranim oslobađanjem) (Kramer i sur., 2005).

USP 2 uređaj (Slika 1) razvijen je prije svega za čvrste oralne oblike doziranja, ali se može primijeniti i kod pripravaka s parenteralnom primjenom (USP 33–NF 28, 2010). U slučaju parenteralnih mikročestica, uzorci se raspršuju u velikim količinama medija (500 ml), a miješanje se postiže pomoću motorne lopatice. Uzorci se uklanjaju u određenim vremenskim točkama, odvajaju od mikročestica, a mikročestice se dispergiraju u svježem mediju i prenose natrag u posudu. Zbog široke dostupnosti ovog uređaja, često se koristi kao referentna točka pri razvoju novog testa otapanja ili kada je potrebna odrediti kinetiku oslobađanja nove formulacije za usporedbu sa starijim formulacijama (Bhardwaj i Burgess, 2010). Ovaj uređaj ima određena ograničenja. Kao u USP 1 uređaju, potrebna je velika količina medija, tako da ga je nepraktično koristiti kad su materijali oskudni (obično zbog troškova ili ograničenja pripreme). Nadalje, kao i

u svim metodama uzorkovanja i odvajanja, gubitak uzorka tijekom odvajanja je neizbježan. Konačno, zabilježeni su hidrodinamički problemi gdje se stvara stožac statičke vode ispod lopatice. Ovaj nedostatak može se riješiti upotrebom posebno izrađene „vršne“ posude, gdje se u sredini baze posude nalazi podignuti stožasti oblik (Baxter i sur., 2005).



Slika 1. USP II uređaj s lopaticama ([www.alphachrom.hr](http://www.alphachrom.hr))

Prilikom provođenja ispitivanja otapanja, postoji mnogo čimbenika koji mogu utjecati na točnost rezultata. Oprema za ispitivanje i njeno okruženje, rukovanje uzorkom, formulacije, reakcije in situ, automatizacija i analitičke tehnike mogu biti uzroci pogrešaka i varijabilnosti. Fizičko otapanje oblika za doziranje treba biti neometano u svakom trenutku. Određeni aspekti postupka kalibracije opreme te pažljivo vizualno promatranje testa mogu otkriti ove pogreške. Esencijalni čimbenici testa su točnost rezultata i robusnost metode. Međutim, neobični i neočekivani rezultati se događaju, a analitičar bi trebao biti dobro obučan da istraži sve aspekte testa oslobađanja lijeka, te da za vrijeme ispitivanja promatra uređaj i zapaža promjene na lijeku koje se događaju tijekom provedbe testa (Gray, 2005).

### 1.5. Ricinusovo ulje

Ricinusovo ulje se naširoko koristi u kozmetici, prehrambenim proizvodima i farmaceutskim formulacijama. U farmaceutskim formulacijama ricinusovo ulje najčešće se koristi u kremama za lokalnu upotrebu i mastima u koncentraciji od 5 do 12,5%. Međutim, koristi se i u formulacijama za oralne tablete i kapsule, oftalmičkim emulzijama te kao otapalo u intramuskularnim injekcijama. Obično se smatra relativno netoksičnim i nenadražujućim materijalom kada se koristi kao pomoćno sredstvo (Irwin, 1982). Ricinusovo ulje se terapijski koristi kao laksativ, a oralna primjena velikih količina može uzrokovati mučninu, povraćanje, kolike i jaka pročišćavanja. Iako se široko koristi u lokalnim pripravcima, uključujući oftalmološke pripravke, ricinusovo ulje povezano je s nekim izvješćima o alergijskom kontaktnom dermatitisu, uglavnom u kozmetici za usne (Rowe i sur., 2009).

Jedinstvena struktura ricinusovog ulja nudi zanimljive osobine, što ga čini pogodnim za razne industrijske primjene. Poznato je da ricinusovo ulje sadrži do 90% ricinoleinske, 4% linolne, 3% oleinske, 1% stearinske i manje od 1% linoleinske kiseline. Hidroksilna funkcionalnost ricinoleinske kiseline čini ricinusovo ulje prirodnim poliolum koji pruža oksidativnu stabilnost ulju i relativno dug rok trajanja u odnosu na ostala ulja jer sprječava stvaranje peroksida (Patel i sur., 2016).

U usporedbi s drugim biljnim uljima, ricinusovo ulje pokazuje bolja svojstva otapanja što se može pripisati hidroksi skupinama ricinolne kiseline koje stvaraju vodikove veze s otopljenom tvari (Larsen i sur., 2002).

### 1.6. Suotapala

Neke od mnogih mogućnosti za povećanje topljivosti kod razvoja injektibilnih lijekova uključuju prilagodbu pH, upotrebu suotapala, solubilizaciju lipidima, micelarnu solubilizaciju, kompleksiranje (npr. s ciklodekstrinima), amorfne oblike lijekova, emulgiranje, liposome itd. (Agoram i sur., 2010).

Do sada je pokazano da dodavanje alifatskih alkohola trigliceridima dovodi do povećanja koeficijenata raspodjele između ulja i pufera kod lidokaina (Larsen i sur., 2002). Također, dodavanje alifatskih masnih kiselina koje doniraju vodik poboljšalo je topljivost haloperidola u takvim uljnim mješavinama (Radd i sur., 1985). Druga biokompatibilna suotapala (poput benzil benzoata, benzilnog alkohola i etil laktata) mogu biti od koristi u uljnim smjesama za povećanje udjela lijeka u formulaciji (Riffkin i Huber, 1964).

Suotapala poput etanola, propilen glikola, polietilen glikola i glicerola rutinski se upotrebljavaju za postizanje veće topljivosti kada sama topljivost lijeka u vodi nije dovoljna za postizanje potrebnih koncentracija. U slučaju nekih lijekova, upotreba odgovarajućih otapala može značajno povećati topljivost. Mehanizam koji stoji iza povećane topljivosti često je povezan s izmjenom polarnosti ili dielektrične konstante sustava otapala. Na temelju principa „slično se otapa u sličnom“ manje polarne molekule bolje je otopiti u manje polarnom sustavu otapala. Dodavanje suotapala s manjom dielektričnom konstantom u vodu smanjit će ukupnu dielektričnu konstantu rezultirajućeg sustava otapala i učiniti ga boljim medijem za otapanje manje polarne ili nepolarne molekule (Vemuri, 2010). Iako otapala mogu biti vrlo učinkovita u postizanju bolje topljivosti, treba imati na umu da pomoćne tvari mogu imati toksikološke učinke (npr. hemoliza) i potencijalno lokalno nadraživanje ovisno o primijenjenim koncentracijama. Uz to, vrlo je važno razmotriti potencijal precipitacije lijeka nakon razrjeđivanja (Yalkowsky i sur., 1998). Taj se rizik može procijeniti izračunavanjem stupnja moguće precipitacije i eksperimentalnim simuliranjem razrjeđivanja te testiranjem potencijala precipitacije (Yalkowsky i sur., 1983).

Upotreba suotapala, kao što je ranije navedeno, ima mogućnost izmjene dielektrične konstante otapala tako što utječe na energiju potrebnu za prevladavanje vodikovih veza u vodenom mediju te na smanjenje količine energije potrebne za stvaranje šupljine za smještaj otopljene tvari (Rubino, 2007).

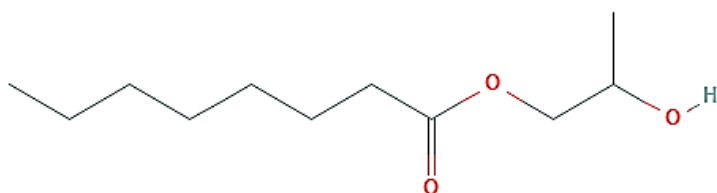
Vodikova veza je posebna vrsta privlačne interakcije koja postoji između elektronegativnog atoma i atoma vodika koji je kovalentno povezan na drugi elektronegativni atom. Obično je elektronegativni atom kisik, dušik ili fluor, koji ima djelomično negativan naboj i akceptor je vodikove veze. Tada vodik ima djelomično pozitivan naboj i donator je vodikove veze. Tipična vodikova veza jača je od van der Waalsovih sila, ali slabija od kovalentnih ili ionskih veza i može se pojaviti intermolekularno ili intramolekularno. Kada je vodikova veza između otopljene



tvari i otapala moguća, topljivost je veća nego što se očekuje za spojeve slične polarnosti koji ne mogu tvoriti vodikove veze (Ching-Chiang i sur., 2010).

### 1.7. Capryol<sup>®</sup>90

Capryol<sup>®</sup>90 (propilen glikol monokaprilat) (Slika 2) je neionski surfaktant netopljiv u vodi koji se koristi kao kosurfaktant u oralnim lipidnim formulacijama SEDDS i SMEDDS ([www.cphi-online.com](http://www.cphi-online.com)) te kao ekscipijens u tabletama Mavyret i kapsulama Dutrys. SEDDS i SMEDDS su samoemulgirajući sustavi za isporuku lijekova sastavljeni od izotropne smjese ulja, surfaktanata, otapala, suotapala i kosurfaktanata. Mogu se koristiti za poboljšanje oralne apsorpcije izrazito lipofilnih lijekova. Trenutno na tržištu nema mnogo lijekova u tim oblicima, ali se intenzivno provode istraživanja u kojima se Capryol<sup>®</sup>90 koristi kao kosurfaktant.

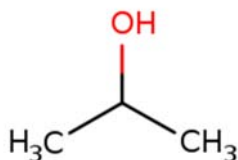


Slika 2. Struktura Capryola<sup>®</sup>90 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

### 1.8. Izopropanol

Izopropilni alkohol (propan-2-ol) (Slika 3) je bistra, bezbojna, pokretna, zapaljiva i hlapljiva tekućina karakterističnog mirisa nalik na mješavinu etanola i acetona. Koristi se u kozmetici i farmaceutskim formulacijama, ponajprije kao otapalo u topikalnim formulacijama. Izopropanol se koristi i kao otapalo za oblaganje tableta filmom i za njihovu granulaciju nakon čega se izopropanol uklanja isparavanjem. Izopropanol ima antimikrobna svojstva i koristi se kao topički dezinficijens u 70% vodenoj otopini. U terapijske svrhe se istražuje njegovo djelovanje kod

liječenja postoperativne mučnine i povraćanja. Zbog svoje toksičnosti se ne preporučuje za oralnu upotrebu (Rowe i sur., 2009).



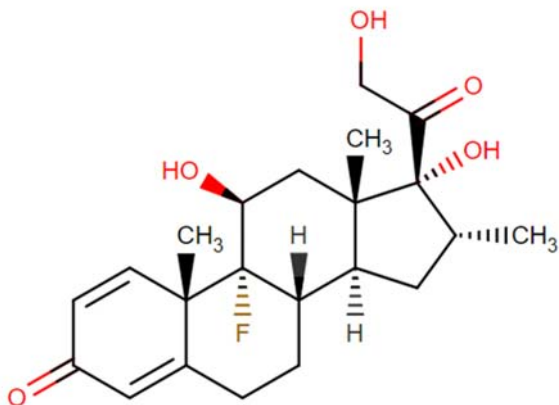
Slika 3. Struktura izopropanola (<https://chem.nlm.nih.gov>)

### 1.9. Deksametazon

Deksametazon (Slika 4), sintetički adrenokortikalni steroid, bijeli je do gotovo bijeli kristalni prah bez mirisa. Stabilan je na zraku i netopljiv u vodi.

Glukokortikoidi, prirodni i sintetski, adrenokortikalni su steroidi koji se lako apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta. Glukokortikoidi uzrokuju raznolike metaboličke učinke. Pored toga, modificiraju imunološku reakciju tijela na različite podražaje. Glukokortikoidi koji se javljaju u prirodi (hidrokortizon i kortizon), a koji imaju i svojstva zadržavanja natrija, koriste se kao nadomjesna terapija u stanjima nedostatka adrenokortikala. Njihovi sintetički analozi, uključujući deksametazon, primarno se koriste zbog njihovog protuupalnog djelovanja kod poremećaja mnogih organskih sustava. Deksametazon pokazuje najveće protuupalno djelovanje među sintetičkim adrenokortikalnim steroidima (Hochhaus i sur., 2001).

Deksametazon se najčešće koristi kao terapija za alergije, kožne bolesti, poremećaje endokrinog sustava (npr. primarna i sekundarna bubrežna insuficijencija), hematološke poremećaje, autoimune bolesti, bolesti gastrointestinalnog trakta itd.



Slika 4. Struktura deksametazona (<https://www.drugbank.ca>)

Kratkoročni učinci kortikosteroida su smanjena vazodilatacija i propusnost kapilara, kao i smanjena migracija leukocita na mjesta upale. Kortikosteroidi koji se vežu na glukokortikoidne receptore posredno utječu na promjene u ekspresiji gena koje dovode do višestrukih uzastopnih učinaka tijekom nekoliko sati do nekoliko dana. Glukokortikoidi inhibiraju apoptozu neutrofila i demarginalizaciju, inhibiraju fosfolipazu A2 (PLA2), što dovodi do smanjenja produkcije derivata arahidonske kiseline, inhibiraju NF-Kappa B i ostale upalne transkripcijske faktore te promiču ekspresiju protuupalnih gena poput gena za interleukin 10. Niže doze kortikosteroida pružaju protuupalni učinak, dok su veće doze imunosupresivne. Visoke doze glukokortikoida kroz duže vrijeme vežu se za mineralokortikoidne receptore, podižući razinu natrija i smanjujući razinu kalija.

Glukokortikoidi su kroz brojne putove sposobni suzbiti upalni proces. Oni komuniciraju sa specifičnim proteinima unutarstaničnih receptora u ciljanim tkivima kako bi promijenili ekspresiju gena koji odgovaraju na kortikosteroide. Glukokortikoidni receptori u staničnoj citoplazmi vežu se sa steroidnim ligandima kako bi formirali komplekse hormonskih receptora koji se na kraju translociraju u staničnu jezgru. Tamo se ovi kompleksi vežu za određene DNK sekvence i mijenjaju njihovu ekspresiju. Kompleksi mogu inducirati transkripciju mRNA što dovodi do sinteze novih proteina. Takvi proteini uključuju lipokortin, protein za koji se zna da inhibira enzim PLA2a i time blokira sintezu prostaglandina, leukotriena i faktora aktivacije trombocita (PAF). Glukokortikoidi također inhibiraju proizvodnju drugih medijatora, uključujući

metabolite arahidonske kiseline poput ciklooksigenaze (COX), citokina, interleukina, adhezijskih molekula i enzima poput kolagenaze.

Kortikosteroidi difundiraju kroz stanične membrane i vežu se na specifične citoplazmatske receptore. Ti kompleksi tada ulaze u staničnu jezgru, vežu se za DNK (kromatin) i potiču transkripciju mRNA i sintezu različitih inhibicijskih enzima odgovornih za protuupalno djelovanje topičkih kortikosteroida. Takvi protuupalni učinci uključuju inhibiciju ranih procesa kao što su edemi, taloženje fibrina, kapilarna dilatacija, kretanje fagocita i fagocitne aktivnosti. Kasniji procesi, kao što su nastajanje kapilara, taloženje kolagena i stvaranje keloida, također su inhibirani kortikosteroidima. Sveukupna djelovanja aktualnih kortikosteroida su katabolična (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 2. Obrazloženje teme

Cilj razvoja ove metode bio je ispitati kako se odabrana ljekovita tvar oslobađa iz ljekovitog oblika produljenog oslobađanja u *in vitro* uvjetima. Ljekoviti oblici produljenog oslobađanja pokazuju mnoge prednosti u odnosu na klasične pripravke koje uključuju manje nuspojave i manji interval doziranja, a time i veću adherenciju pacijenata u propisanoj terapiji.

Prethodni radovi pokazali su da deksametazon u obliku uljne otopine s dodatkom suotapala ima moguću korisnu primjenu zbog svojstva produljenog oslobađanja. Kao otapalo je korišteno ricinusovo ulje jer je u njemu deksametazon pokazao najbolju topljivost. Izopropanol i Capryol<sup>®</sup>90 kao suotapala omogućuju povećanu topljivost deksametazona u ulju, a osim toga smanjuju viskoznost otopine što dovodi do povećanja injektibilnosti.

Cilj ovog rada je optimizirati metodu oslobađanja deksametazona iz uljnih otopina na USP II uređaju spregnutom optičkim probama te ispitati potencijalne interferencije. U sklopu tog ispitivanja potrebno je:

1. usporedno pratiti oslobađanje deksametazona iz formulacija s izopropanolom i Capryolom<sup>®</sup>90 na USP II uređaju spregnutom optičkim probama
2. pratiti oslobađanje iz placeba, tj. formulacija bez deksametazona kako bi se ispitale potencijalne interferencije
3. usporediti profile oslobađanja deksametazona iz formulacija na USP II uređaju određene detekcijom optičkim probama i UPLC-om

USP II uređaj spregnut optičkim probama omogućuje automatizirano praćenje koncentracije oslobođene tvari u mediju. Mjerenjem apsorbancije otopine izračunava se koncentracija u proteklom vremenu. Međutim, to mjerenje može biti nespecifično jer na promjenu apsorbancije otopine osim oslobođenog deksametazona mogu utjecati i tvari poput nečistoća ili ostalih sastavnica formulacije koje se u tom procesu mogu osloboditi. Da bi se provjerile potencijalne interferencije, oslobađanje deksametazona je dodatno usporedno praćeno UPLC-om. UPLC je tehnika tekućinske kromatografije u kojoj se ispitivana tvar razdvaja između mobilne i stacionarne faze pod visokim tlakom. Odlikuje ju visoka sposobnost razlučivanja, osjetljivost, selektivnost i brzina analize.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Materijali

Za pripremu formulacije upotrebljavani su deksametazon (Pfizer, SAD), rafinirano ricinusovo ulje (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), izopropanol (Merck, Njemačka) i Capryol<sup>®</sup>90 (Gattefosse, Francuska).

Medij u kojem se mjerilo oslobađanje je bio fosfatni pufer pH=7,4. Priređen je otapanjem natrijevog hidroksida (Kemika, Hrvatska) i kalijevog dihidrogenfosfata (Kemika, Hrvatska) u visokopročišćenoj vodi, uz podešavanje pH fosfatnom kiselinom (Kemika, Hrvatska).

Dijalizacijska membrana preko koje je ispitivano oslobađanje iz formulacija izrađena je od celuloznog estera s porama veličine 300 kD, oznake CE 300 kD (Spectrum labs, SAD). Membrana je cilindričnog oblika.

Mobilna faza za UPLC pripremljena je iz acetonitrila (Merck, Njemačka) i acetatnog pufera pH=4,5 koji je pripremljen otapanjem natrijevog acetata trihidrata (Kemika, Hrvatska) u redestiliranoj vodi i potom profiltriran preko Whatman membrane s veličinama pora 0,2 µm.

Kao otapalo za izradu standarda za UPLC korišten je metanol pomiješan s vodom u omjeru 60/40.

Tijekom pokusa usporednog praćenja oslobađanja deksametazona na USP II uređaju i na UPLC-u korištene su plastične šprice s produženim nastavcima za uzorkovanje te viali i pipeta za pripremu uzoraka.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema formulacija i standarda te receptorskog medija

Pripremljene su dvije formulacije deksametazona. Prva formulacija koncentracije 2 mg/mL pripremljena je otapanjem 10 mg deksametazona u 4 mL ricinusovog ulja i 1 mL izopropanola dok je druga formulacija koncentracije 1 mg/mL pripremljena otapanjem 5 mg deksametazona u 4 mL ricinusovog ulja i 1 mL Capryola<sup>®</sup>90. Formulacije su miješane u čaši pomoću magneta i prebačene su u odmjerne tikvice od 5 mL.

Standardi za kalibriranje spektrofotometra pripremljeni su na sljedeći način. Stock otopina pripremi se otapanjem 10 mg deksametazona u 25 ml tetrahidrofurana. Standard 1 pripremi se otapanjem 1 ml stock otopine u 100 ml fosfatnog pufera, a standard 2 otapanjem 1 ml stock otopine u 200 ml fosfatnog pufera. Standard 1 služi za kalibraciju optičkih probi koje prate oslobađanje deksametazona iz formulacije s izopropanolom, a standard 2 služi za kalibraciju optičkih proba koje prate oslobađanje deksametazona iz formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90.

Fosfatni pufer pH=7,4 u volumenu od 500 mL korišten je kao receptorski medij tijekom pokusa oslobađanja iz formulacija. Kako bi se uklonili nepoželjni učinci otopljenog zraka, medij je prethodno degaziran. Degaziranje je provedeno zagrijavanjem fosfatnog pufera na 50°C te filtriranjem preko membrane veličine pora 0,2 µm. Za vrijeme zagrijavanja i filtriranja pufer je miješan pomoću magneta na magnetskoj miješalici.

### 3.2.2. Mjerenje oslobađanja deksametazona

Oslobađanje deksametazona mjeri se pomoću USP II uređaja spregnutog optičkim probama (Agilent, Njemačka). Uređaj funkcionira na način da se u posude s rotirajućim lopaticama, a koje su napunjene fosfatnim puferom, doda ispitivana formulacija u svom nosaču (dijalizacijskoj membrani). Rotirajuće lopatice miješaju otopinu i potiču oslobađanje formulacije iz nosača dok sonde s optičkim probama mjere apsorbanciju otopine pri 241 nm, optimalnoj valnoj duljini za detekciju deksametazona. Iz izmjerene apsorbancije određuje se koncentracija otopine usporedbom s prethodno pripremljenim standardima deksametazona poznate koncentracije te se izračunava količina oslobođenog deksametazona iz formulacije u svakoj od vremenskih točaka.

U svaku od 6 posuda s rotirajućim lopaticama ulije se po 0,5 L fosfatnog pufera. Ulijevanje mora biti oprezno kako bi se izbjegle prevelike turbulencije tekućine što bi dovelo do stvaranja mjehurića i otapanja zraka koji može interferirati s mjerenjem. Zatim se mjeri apsorbancija fosfatnog pufera i određuje bazna linija spektrofotometra. Dodatno je potrebno kalibrirati svaku optičku probu mjerenjem apsorbancije pripremljenih otopina deksametazona poznatih koncentracija (standarda). U malu čašu se doda otopina odgovarajućeg standarda i u nju uroni proba. Proba se prije i poslije standardizacije mora isprati vodom i obrisati, a tijekom ispiranja nužan je oprez kako voda za ispiranje ne bi dospjela u posude s medijem. Postupak se ponovi za svaku od posuda, odnosno optičkih proba.

Pripremi se 6 dijalizacijskih membrana odgovarajuće duljine koje su prethodno bile ekvilibrirane najmanje 30 minuta u fosfatnom puferu. Membrane se na jednom kraju zatvore kopčama s magnetom, u njih se pipetom doda po 1 mL formulacije (svaka formulacija u tri membrane) te se s druge strane zatvore kopčom bez magneta. Zatim se na kopče s magnetom stave magneti koji će svojom težinom osiguravati da membrane ne isplutaju na površinu tijekom analize. Tako pripremljene membrane se pažljivo ubace u posude s medijem na način da ih lopatice uređaja mogu pravilno zahvatiti i da tijekom vrtnje ne udaraju o termometar i optičku probu. S parafilmom se zatvore otvori na poklopcima posuda da se spriječi isparavanje medija.

Pokus oslobađanja deksametazona na USP II uređaju provodi se kroz tri dana, pri temperaturi od 37°C, uz brzinu okretanja lopatica od 75 rpm (od eng. rounds per minute). Uređaj je namješten da mjeri apsorbanciju otopina u vremenima 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 720, 1440, 2160, 2880, 3600 i 4320 minuta. S obzirom da je svaka formulacija usporedno analizirana u po tri posude, konačni rezultat je njihov prosjek.

### 3.2.3. Priprema placebo i mjerenje oslobađanja iz placebo

Placebo formulacije su pripremljene miješanjem 16 mL ricinusovog ulja i 4 mL suotapala izopropanola, odnosno Capryola®90. Apsorpcijski profili placebo kroz vrijeme praćeni su na isti način kao što se pratilo i oslobađanje deksametazona iz pripremljenih formulacija.



#### 3.2.4. Analiza na UPLC-u

Standardi za UPLC priređeni su iz stock otopine koja je napravljena otapanjem 20 mg deksametazona u 200 mL metanola pomiješanog s vodom u omjeru 60/40. Deksametazon se prvo doda u 2/3 potrebnog volumena metanola te se stavi na otapanje u ultrazvučnoj kupelji 15 minuta, a onda se doda ostatak metanola pomiješanog s vodom. Napravljene su dvije stock otopine i iz svake po jedan standard tako da se 2 mL stock otopine pomiješa s fosfatnim puferom do konačnog volumena od 50 mL. Koncentracija tako pripremljenih standarda je 4 µg/mL. Prvi standard korišten je za određivanje koncentracije oslobađenog deksametazona, a drugi standard je korišten za provjeravanje linearnosti UPLC metode.

Parametri UPLC metode bili su sljedeći: pH=4.5, sastav mobilne faze je acetonitril (ACN) i voda u omjeru 70/30, protok 0,4 mL/min, temperatura kolone 50°C, detekcija pri 241 nm, volumen injektiranja uzorka 10 µl. U analizi je korištena kolona Acquity BEH UPLC Shield RP18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm.

#### 3.2.5. Usporedno praćenje oslobađanja deksametazona na USP II uređaju UPLC-om

Odmah nakon što bi USP II uređaj spregnut optičkim probama u određenoj vremenskoj točki očitao apsorbancije, iz posuda s medijem je pomoću šprica s produžecima uzorkovano po 1 mL medija i prebačeno u označene vialne. Volumen izvađenog uzorka je nadoknađen zagrijanim medijem pomoću pipete. Svakoj posudi je bila pridružena posebna šprica s oznakom kako ne bi došlo do zabune.

#### 3.2.6. Optimizacija pripreme formulacija kod ponovljenog usporednog mjerenja

Za razliku od prethodnih priprema, vaganjem su određene odgovarajuće količine ricinusovog ulja i suotapala za pripremu otopina te pomiješane. Potom je izvagan deksametazon u posudici za vaganje i nakon prebacivanja u smjesu otapala izvagana je i prazna posudica. Iz razlike težine posudice s deksametazonom i prazne posudice izračunata je količina deksametazona dodanog u smjesu. Time je otklonjen problem zaostajanja deksametazona na posudici. Tako pripremljena uljna otopina je zatim dobro promiješana na magnetskoj miješalici. Odgovarajući volumen

formulacije dodan je u dijalizacijsku membranu špricom. Izvagana je šprica prije i nakon dodavanja formulacije te je na taj način određena točna količina dodane otopine, odnosno samog deksametazona. Uljne otopine su viskozne i određeni dio se lijepi za stijenke nastavka pipete pa je ovako taj problem otklonjen.

Na kraju analize izmjereni su volumeni medija u posudama USP II uređaja kako bi se mogao izračunati gubitak medija nastao isparavanjem.

### 3.2.7. Ispitivanje stabilnosti deksametazona

Otopina deksametazona poznate koncentracije (4 µg/mL) koja je korištena kao standard za kalibraciju USP II uređaja postavljena je na ispitivanje stabilnosti pri 37 °C. Stabilnost je praćena kroz 72 sata, vrijeme ekvivalentno vremenu trajanja analize na USP II uređaju. U različitim vremenskim točkama određena je koncentracija deksametazona u otopini pomoću UPLC-a i uspoređena s otopinom na početku ispitivanja kako bi se odredila stabilnost pri navedenim uvjetima nakon određenog vremena.

## 4. Rezultati i rasprava

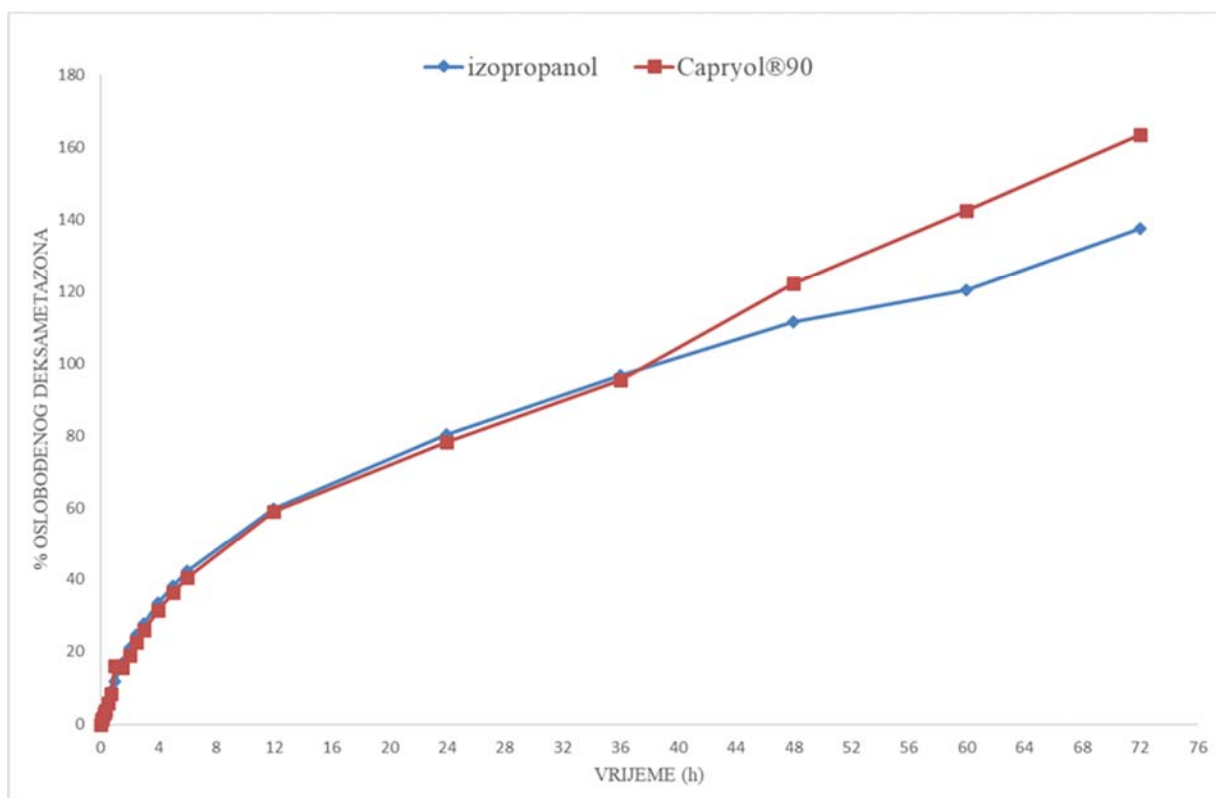
Metoda ispitivana u ovom radu bila je već razvijena u prethodnim radovima na način da su određeni optimalni uvjeti oslobađanja deksametazona iz uljnih formulacija. Bili su ispitani sljedeći parametri:

- vrsta biljnih ulja za otapanje deksametazona
- vrste dijalizacijskih membrana
- duljina membrane
- sastav receptorskog medija
- utjecaj degaziranja medija na oslobađanje deksametazona
- brzina miješanja receptorskog medija
- temperatura
- volumen formulacije
- različita suotapala, izopropanol i Capryol<sup>®</sup>90

Međutim, uočena je potreba za dodatnim provjeravanjem razvijene metode u duljem vremenu trajanja ispitivanja. U prethodnim radovima ispitivano je oslobađanje deksametazona do maksimalno 50 sati kod formulacije s izopropanolom i do maksimalno 40 sati kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90. Pregledom tih rezultata uočena je povećana apsorbancija u kasnijim vremenskim točkama koja ukazuje na preveliko oslobađanje deksametazona koje bi moglo biti posljedica interferencija u očitavanju. Iz tog razloga provedeno je nekoliko pokusa u kojima je uspoređeno oslobađanje deksametazona iz formulacija s izopropanolom i Capryolom<sup>®</sup>90 u vremenskom periodu od 72 sata. Usporedno, ispitan je i apsorpcijski profil placeba pri istim uvjetima kako bi se odredila razina interferencija pri očitavanju optičkim probama.

#### 4.1. Oslobađanje deksametazona iz uljnih formulacija na USP II uređaju spregnutom optičkim probama

U prvom pokusu ispitivano je oslobađanje deksametazona iz uljnih formulacija na USP II uređaju spregnutom optičkim probama (Slika 5).



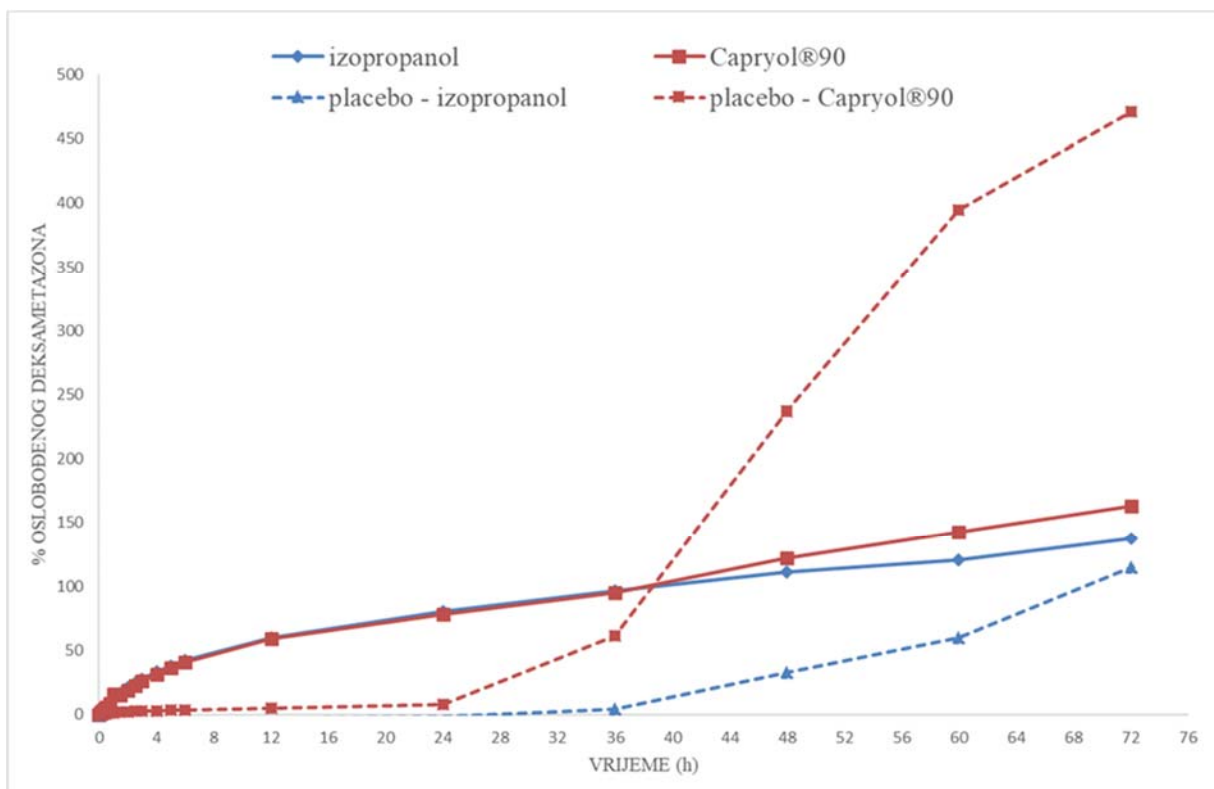
Slika 5. Oslobađanje deksametazona iz uljnih formulacija s izopropanolom i Capryolom®90 na USP II uređaju spregnutom optičkim probama.

Profil oslobađanja deksametazona iz obje formulacije vrlo je sličan do 36 sati, a na sljedećem očitavanju kod 48 sati vidi se veće oslobađanje iz formulacije s Capryolom®90. Nadalje, kod obje formulacije uočava se oslobađanje deksametazona znatno veće od 100% što nije u skladu s očekivanim rezultatima koji su predviđali približavanje krivulje granici od 100% oslobodjenog deksametazona i stvaranje platoa krivulje. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako pri postavljenim uvjetima analize dolazi do određenih interferencija u očitavanju koje uzrokuju

previsok signal apsorbancije. Moguće je da do interferencija dolazi zbog apsorbancije određenih sastojaka formulacije pri valnoj duljini na kojoj se detektira deksametazon. Zbog toga je potrebno provjeriti apsorpcijski profil samog placeba pri istim uvjetima analize i u istim vremenskim točkama.

#### 4.2. Apсорpcijski profili placebo formulacija na USP II uređaju spregnutom optičkim probama

Placebo formulacija sadrži ricinusovo ulje i suotapalo, ali ne i deksametazon. Time se uklanja utjecaj deksametazona na apsorbanciju i omogućava promatranje apsorpcijskog profila ostalih sastavnica formulacije. U idealnom slučaju sastojci iz formulacije ne bi trebali značajno utjecati na očitavanje apsorbancije deksametazona, pogotovo s obzirom na valnu duljinu pri kojoj se očitava njegov maksimum.



Slika 6. Usporedba apсорpcijskih profila placebo formulacija s profilima oslobađanja deksametazona iz uljnih formulacija.

Na slici 6 vidljivo je kako se kod placebo formulacije s izopropanolom povećana apsorbancija (prikazana kao ekvivalent % oslobođenog deksametazona) javlja nakon 36 sati, a kod placebo formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90 već nakon 24 sata. Povećana apsorbancija od početka je nešto izraženija kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90, a na kraju mjerenja dostiže vrijednost koja je nekoliko puta veća od placebo formulacije s izopropanolom i od formulacija s deksametazonom. Konkretno, razlika u apsorbanciji između placeba i formulacije s deksametazonom iznosi 308% za Capryol<sup>®</sup>90 te 23% za izopropanol u vremenskoj točki od 72 sata. Dobiveni rezultati su potvrdili kako određeni sastojci iz placeba uzrokuju interferenciju u očitavanju apsorbancije deksametazona i prividno povećavaju postotak oslobođenog deksametazona u pokusima s uljnim formulacijama. Apsorpcijski profili placeba također postupno rastu kroz vrijeme pa je to najvjerojatnije posljedica difuzije pojedinih sastojaka iz formulacije koji značajno apsorbiraju pri odabranoj valnoj duljini. S obzirom na dobivene profile moguće je da Capryol<sup>®</sup>90 dodatno pospješuje difuziju tih sastojaka kroz dijalizacijsku membranu dok je utjecaj izopropanola manje izražen.

Interferencija pri očitavanju apsorbancije optičkim probama najčešći je problem kod takve vrste analiza. Neki od razloga interferencije su pojava mjehurića zraka koji ometaju očitavanje apsorbancije, vibracijske smetnje koje mogu doći od rada opreme i vanjskih izvora (Gray, 2005) ili interferencije do kojih dolazi zbog utjecaja sastavnica formulacije (Liu i sur, 2008; Lu i sur, 2003).

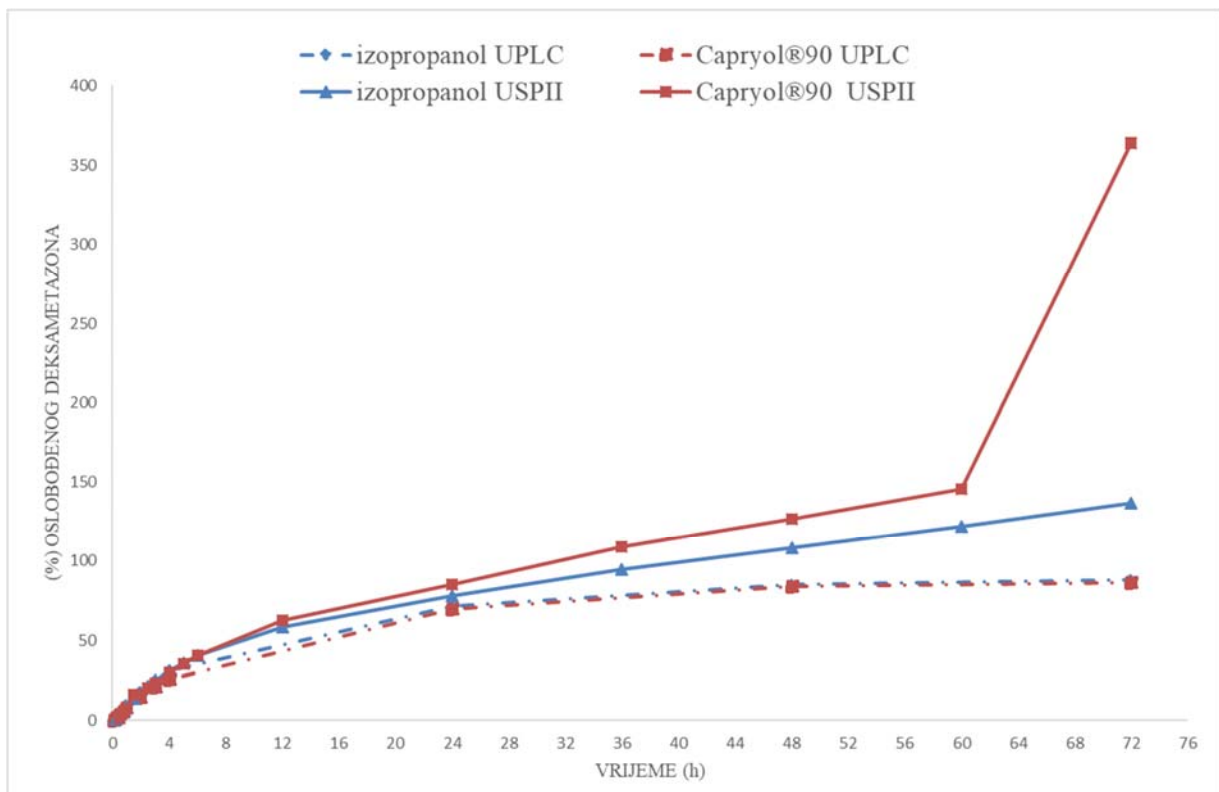
Budući da se apsorbancija aktivne supstancije očitava direktno u otopini u kojoj se provodi analiza, te nema odvajanja oslobođene aktivne supstancije od ostalih sastojaka koji pri istoj valnoj duljini mogu apsorbirati, što na kraju rezultira prividnim povećanjem postotka oslobođenog deksametazona. Kako bi se eliminirale interferencije potrebno je odvojiti oslobođeni deksametazon iz otopine od ostalih sastojaka formulacije. U tu svrhu se može koristiti analiza tekućinskom kromatografijom, HPLC ili UPLC. U sljedećem pokusu dodatno je uvedena UPLC analiza uzoraka iz receptorskog medija u koji se oslobađa deksametazon pomoću koje se može direktno pratiti koncentracija oslobođenog deksametazona.

Također, u literaturi se navodi mogućnost korištenja matematičkih filtara koji uklanjaju doprinos komponenti koje ne čine aktivnu farmaceutsku tvar (API). Ti filtri obično imaju jedan od moguća dva oblika. Prvi je korekcija bazne linije kod kojeg se doprinos drugih komponenti

apsorbanciji izmjerenoj na analitičkoj valnoj duljini modelira mjerenjem njihovog doprinosa na valnoj duljini gdje API ne pokazuje apsorbanciju. Druga kategorija algoritama za korekciju temelji se na derivacijskoj spektroskopiji. Osnovna ideja je da se nagib apsorpcijskog pika API razlikuje od nagiba interferencije te se ta razlika može iskoristiti za razlikovanje doprinosa apsorbanciji API-ja od doprinosa drugih komponenti (Nir i Lu, 2018).

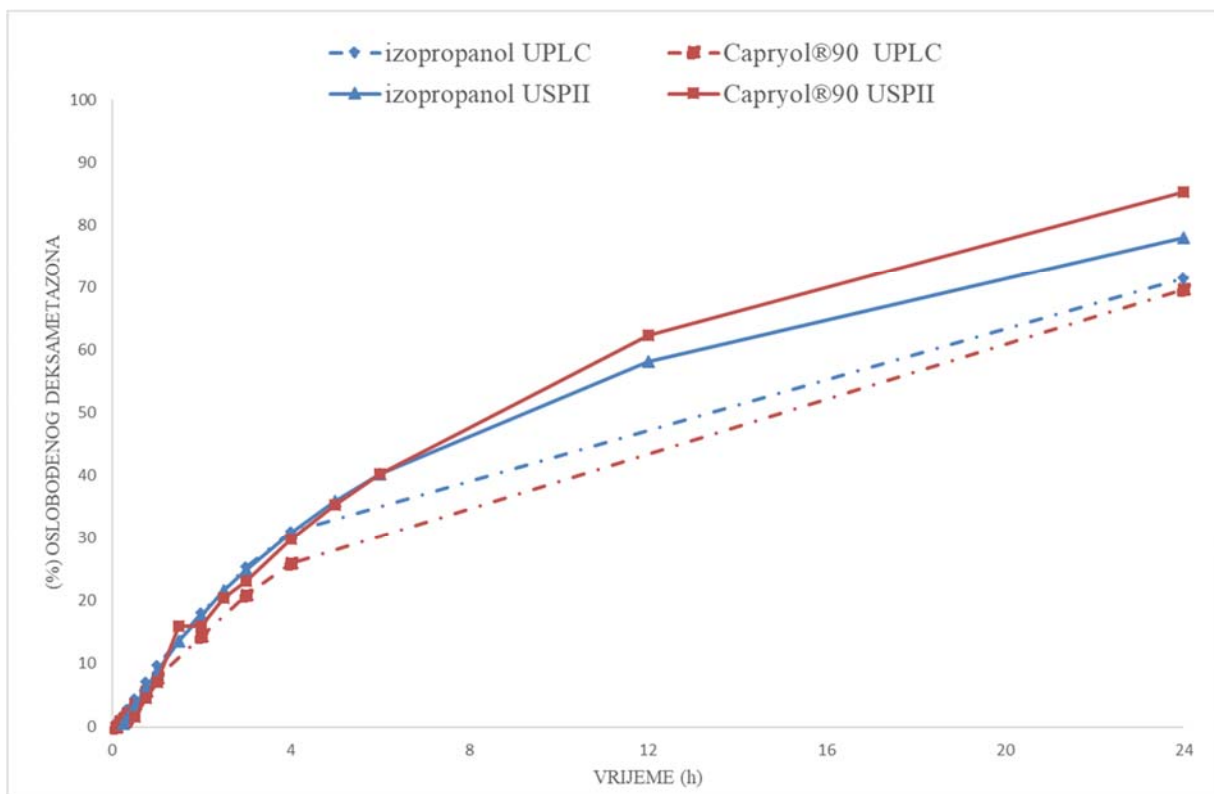
#### 4.3. Oslobađanje deksametazona iz uljnih formulacija na USP II uređaju usporednom detekcijom optičkim probama i UPLC-om

U ponovljenom pokusu na USP II uređaju usporedno je količina oslobođenog deksametazona praćena detekcijom optičkim probama te razdvajanjem na UPLC-u. Uvedena je i optimizacija pripreme formulacija s ciljem uklanjanja potencijalnih pogrešaka u pripremi uzoraka i postavljanja pokusa, a time i mogućih nepravilnosti u mjerenju.



Slika 7. Usporedba oslobađanja deksametazona iz formulacija na USP II uređaju određena detekcijom optičkim probama i UPLC-om.

Slika 7 prikazuje usporedbu profila oslobađanja deksametazona iz obje uljne formulacije, određene detekcijom optičkim probama i UPLC-om. Profil oslobađanja određen optičkim probama značajno je viši od profila određenog UPLC-om za obje formulacije, pogotovo u kasnijim vremenskim točkama. Pri tome profil oslobađanja iz formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90 značajnije odstupa od profila određenog UPLC-om nego što je to slučaj kod formulacije s izopropanolom. Posebno se ističe ogroman porast kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90 na zadnjoj vremenskoj točki, 72 sata, što bi moglo ukazivati na pojačano oslobađanje pomoćnih sastojaka iz formulacije koji uzrokuju interferenciju u očitavanju apsorbancije. Kod formulacije s izopropanolom takav nagli porast se ne događa.



Slika 8. Usporedba oslobađanja deksametazona iz formulacija na USP II uređaju određena detekcijom optičkim probama i UPLC-om, do vremenske točke od 24h.

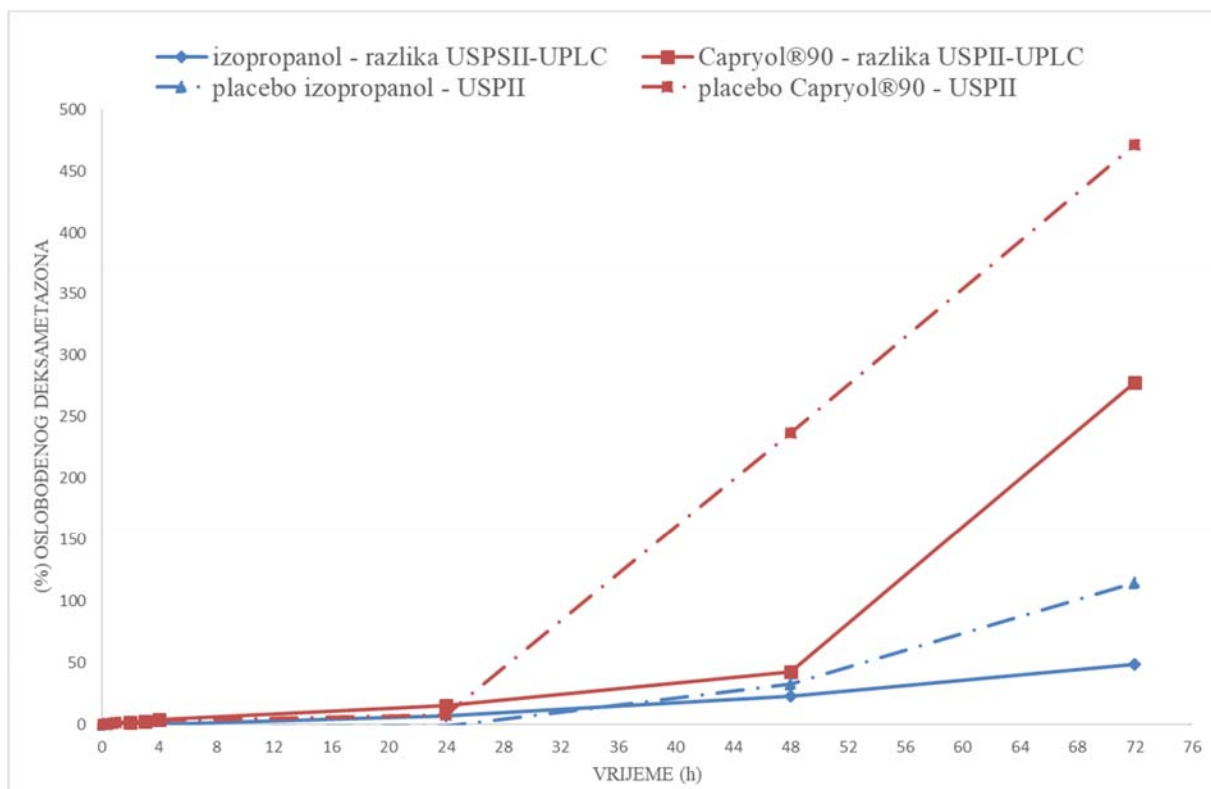


Kako bi se bolje usporedili profili oslobađanja lijeka, na slici 8 prikazani su rezultati u kraćem vremenskom periodu, do 24 sata od početka pokusa. U ranijim vremenskim točkama, do 4. sata, poklapanje profila dobivenih UPLC-om i optičkim probama je sasvim dobro. U vremenskom periodu između 4. i 24. sata dolazi do nešto većeg razilaženja među profilima dobivenima detekcijom optičkim probama i UPLC-om. Budući da je očitavanje optičkim probama automatsko, a uzorkovanje za UPLC se radi ručno, nisu uzimani uzorci za analizu UPLC-om u tom vremenskom periodu. Iz tog razloga niti sve vremenske točke se ne poklapaju te nije moguće usporediti profile u svim točkama. Slaganje profila je relativno dobro čak i u vremenskoj točki od 24 sata kada dolazi do blagog porasta profila dobivenih detekcijom optičkim probama. To je nešto više izraženo kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90, kod koje je u navedenoj vremenskoj točki profil viši za 16%, dok je kod formulacije s izopropanolom profil viši za 7%. Profili s razlikom do 10% se u skladu s računanjem f2 faktora sličnosti mogu smatrati sličnima s obzirom na grešku metode. Nakon 24. sata dolazi do većeg razilaženja među profilima, odnosno značajnijeg porasta u profilima određenima detekcijom optičkim probama, što je izraženije kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90. U skladu s time, moglo bi se zaključiti kako u tom kasnijem periodu i interferencije u očitavanju apsorbancije kod obje formulacije postaju sve veće. Takvi rezultati su u skladu s apsorpcijskim profilima placebo formulacija (Slika 6) gdje je primijećeno kako upravo od 36. sata dolazi do značajnog povećanja apsorbancije kod placebo formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90 te i izopropanolom od 48. sata.

Generalni zaključak usporedbe profila oslobađanja deksametazona dobivenih detekcijom optičkim probama i UPLC analizom je kako se oni dobro poklapaju zaključno s vremenskom točkom od 24 sata. S obzirom na to, metoda praćenja oslobađanja deksametazona iz uljnih formulacija na USP II uređaju spregnutom optičkim probama, opisana u ovom radu, dovoljno je točna i pouzdana do tog vremena. Nakon toga dolazi do izraženijeg utjecaja interferencija pri očitavanju apsorbancije. Budući da se unutar 24 sata oslobodi već oko 80% deksametazona iz obje formulacije, može se zaključiti kako je metoda ipak dovoljno dobra za početni probir formulacija vezano na usporedbu brzine oslobađanja između različitih uljnih formulacija deksametazona.

#### 4.4. Određivanje intenziteta interferencije prilikom očitavanja optičkim probama

Rezultati dobiveni UPLC analizom potvrdili su postojanje interferencija prilikom očitavanja optičkim probama, a što se već prethodno moglo zaključiti na temelju pokusa s placebo formulacijama. Kako bi se odredio intenzitet interferencije, od apsorpcijskih profila uljnih formulacija deksametazona određenih detekcijom optičkim probama oduzeti su profili oslobađanja određeni UPLC-om za odgovarajuće formulacije. Rezultirajući profili daju iznos interferencije u očitavanju apsorpcije optičkim probama za svaku vremensku točku i za svaku formulaciju zasebno. Tako dobiveni profili su uspoređeni s apsorpcijskim profilima placebo formulacija (Slika 9).



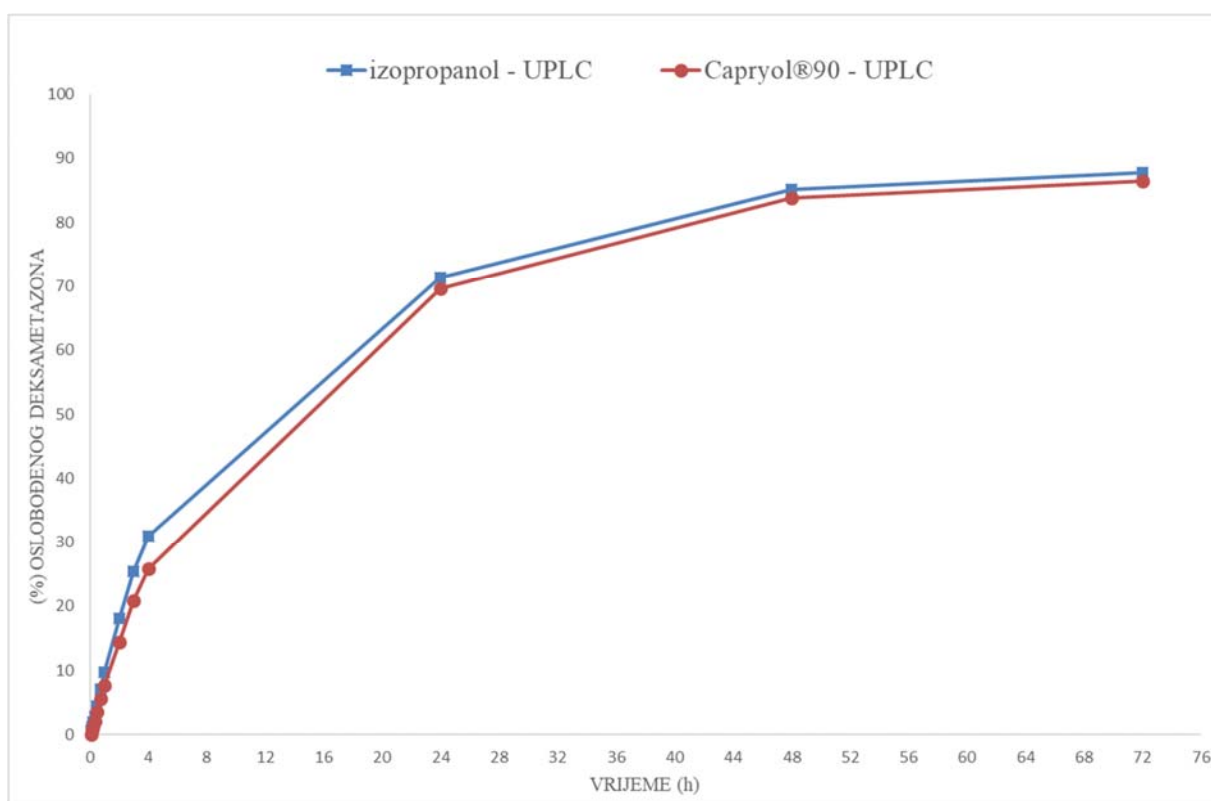
Slika 9. Usporedba apsorpcijskih profila placebo formulacija s razlikom profila oslobađanja formulacija deksametazona određenih optičkim probama i UPLC-om.

Apsorpcijski profili placebo formulacija dobro se poklapaju s dobivenim krivuljama interferencije u početnom dijelu i to za formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90 do 24. sata, a za formulacije s izopropanolom do 48. sata. Nakon toga dolazi do značajnijeg porasta profila kod obje placebo formulacije. Na temelju toga moglo bi se zaključiti kako kinetika oslobađanja pomoćnih sastojaka iz placebo formulacija koji uzrokuju interferenciju nije jednaka kinetici oslobađanja istih iz formulacija s deksametazonom. Vjerojatno oslobađanje, odnosno difuzija deksametazona u receptorski medij kroz dijalizacijsku membranu usporava difuziju pomoćnih sastojaka iz formulacije pa je i interferencija pri očitavanju apsorbancije manje izražena.

Interferencija je najvjerojatnije uzrokovana difuzijom uljnih komponenti iz formulacija u receptorski medij. Ricinusovo ulje se sastoji od više različitih masnih kiselina koje nakon difuzije kroz dijalizacijsku membranu mogu utjecati na povećanje apsorbancije i na taj način prividno povećati postotak oslobođenog deksametazona. Analize oslobađanja s otopinama placeba na USP II uređaju s optičkim probama pokazale su kako nakon određenog vremena dolazi do povećanja apsorbancije u odnosu na baznu liniju. Iz toga se može zaključiti kako u otopinama placeba postoje sastojci koji asporbiraju pri istoj valnoj duljini kao i deksametazon, a koji tek u kasnijim vremenskim točkama počnu difundirati kroz dijalizacijsku membranu. U slučaju analize UPLC-om, te komponente se kromatografski odvoje od deksametazona i interferencija se eliminira. Zanimljivo je kako je interferencija puno izraženija kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90. Kontrolnim mjerenjem apsorbancije otopina Capryola<sup>®</sup>90 i izopropanola u puferu pH 7.4 pri valnoj duljini od 241 nm korištenoj za detekciju deksametazona, u pokusu je pokazano da oni ne pridonose značajno ukupnoj apsorbanciji u usporedbi s deksametazonom. Iz tog razloga je zaključeno da interferencije do kojih dolazi kod detekcije optičkim probama nisu posljedica oslobađanja Capryola<sup>®</sup>90 odnosno izopropanola u receptorski medij. Vjerojatno se kod jače interferencije s Capryolom<sup>®</sup>90 radi o njegovoj interakciji s pomoćnim sastojcima u formulaciji koji onda uzrokuju interferencije, odnosno njegovom utjecaju na pojačanu difuziju tih sastojaka u receptorski medij, u usporedbi s izopropanolom.

#### 4.5. Provjera stabilnosti deksametazona

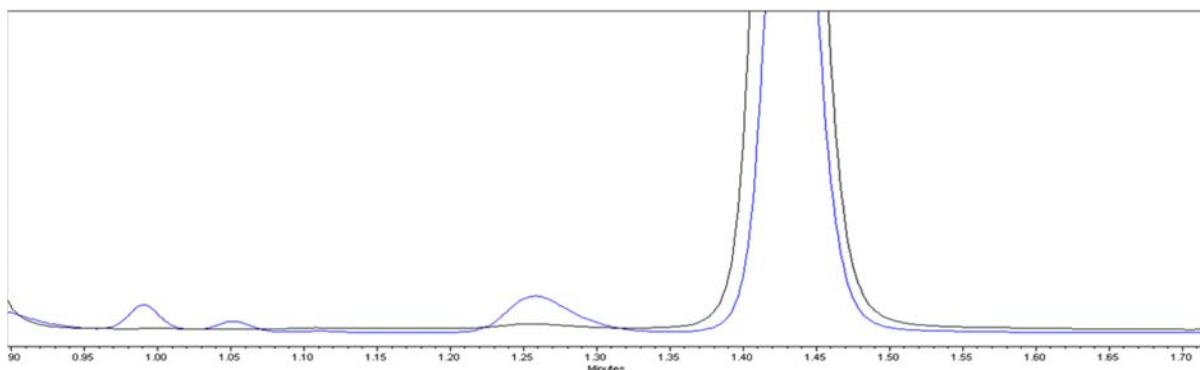
Profili oslobađanja određeni UPLC-om su međusobno vrlo slični za obje formulacije i u skladu s očekivanjima postižu plato u kasnijim vremenskim točkama te ne prelaze 100%. Međutim, detaljnijim uvidom u profile oslobađanja (Slika 10) može se primijetiti kako obje krivulje dostižu plato na oko 90% iako bi bilo za očekivati da dolazi do potpunog oslobađanja deksametazona s platom krivulje na oko 100%. S obzirom na to, dolazi do gubitka od oko 10% koji je potrebno razjasniti.



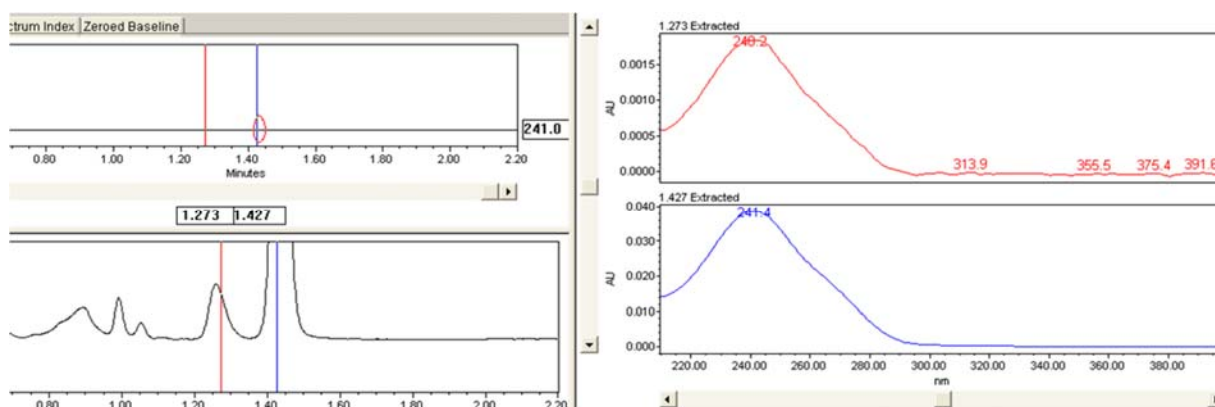
Slika 10. Oslobađanje deksametazona iz formulacija na USP II uređaju određeno UPLC-om.

Prilikom UPLC analize uzoraka iz pokusa na USP II uređaju primijećena je uz veliki signal deksametazona i pojava dodatnog signala na kromatogramu koji površinom odgovara oko 6.5 % oslobođenog deksametazona u vremenskoj točki od 72 sata (Slika 11).

Slika 12 prikazuje spektre tih dvaju signala te se može vidjeti kako su njihovi spektri vrlo slični. Iz toga se može zaključiti kako bi manji signal mogao biti rezultat degradacije ili modifikacije deksametazona do koje dolazi zbog njegove nestabilnosti u uvjetima provođenja pokusa.



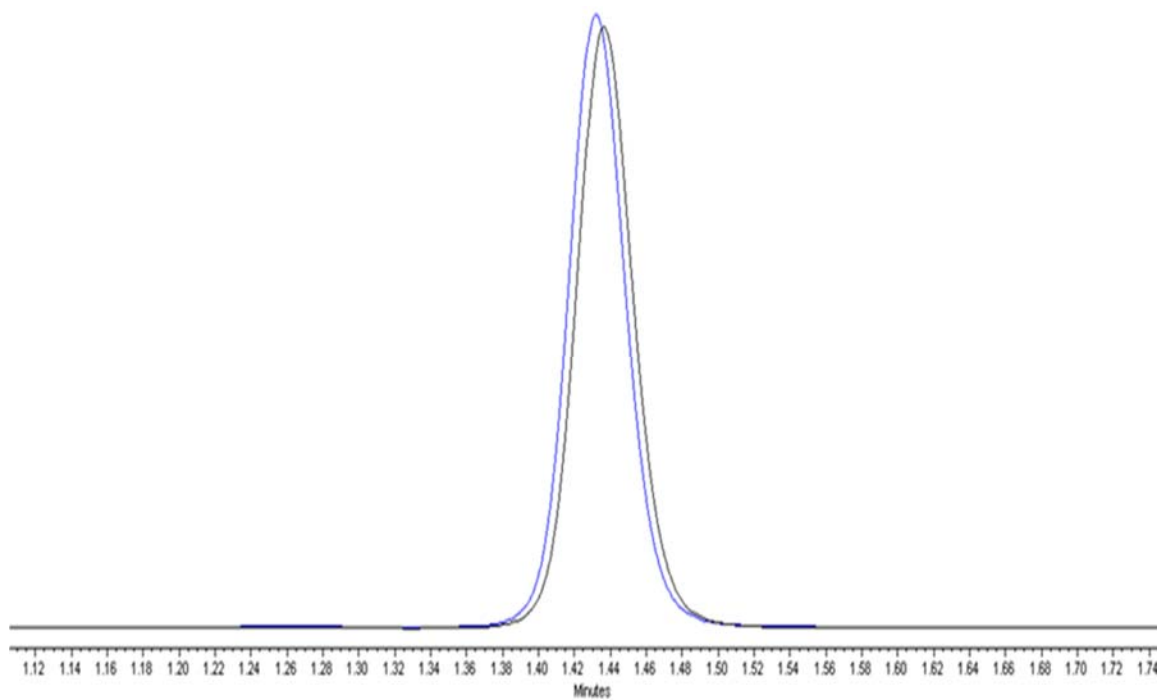
Slika 11. UPLC kromatogram uzorka nakon 72 sata analize uljne formulacije deksametazona na USP II uređaju.



Slika 12. Usporedba UV spektara signala s UPLC kromatograma.

Zbog toga je provedeno ispitivanje stabilnosti otopine deksametazona poznate koncentracije u receptorskom mediju. Usporedbom površina signala na UPLC kromatogramu početne otopine i otopine nakon 72 sata inkubacije dobiven je omjer od 98,6% te nije bilo pojave dodatnog signala (Slika 13). To znači da je deksametazon stabilan u receptorskom mediju tijekom trajanja pokusa na USP II uređaju. Bez obzira na dobiveni rezultat, moguće je da tijekom pokusa dolazi do

interakcije deksametazona s pojedinim sastojcima iz formulacije te se analizom na UPLC-u takvi derivati odvajaju na kromatogramu kao posebni signali što rezultira manjim konačnim postotkom oslobođenog deksametazona. Za potvrdu takve pretpostavke trebalo bi provesti dodatnu studiju i opsežnije analize takvih uzoraka.



Slika 13. UPLC kromatogram nakon 72 sata ispitivanja stabilnosti deksametazona pri 37°C u fosfatnom puferu pH=7,4.

Postoje i dodatni potencijalni razlozi smanjenog postotka oslobođenog deksametazona tijekom pokusa na USP II uređaju.

U idealnom slučaju, dijalizacijske membrane ne bi trebale vezati deksametazon. Međutim, postoji mogućnost nespecifičnog vezanja određenih molekula na pojedine vrste dijalizacijskih membrana. Obično se ne radi o velikim gubicima, ali u nekim slučajevima mogu iznositi čak i do 10%, što bi odgovaralo gubitku primijećenom nakon UPLC analize. U jednom istraživanju provedeno je ispitivanje vezanja deksametazona na membrane od celuloznog estera u mediju od McIlvaine pufera s dodatkom etanola te s dodatkom tiloksapola. Pokazalo se da je analitički

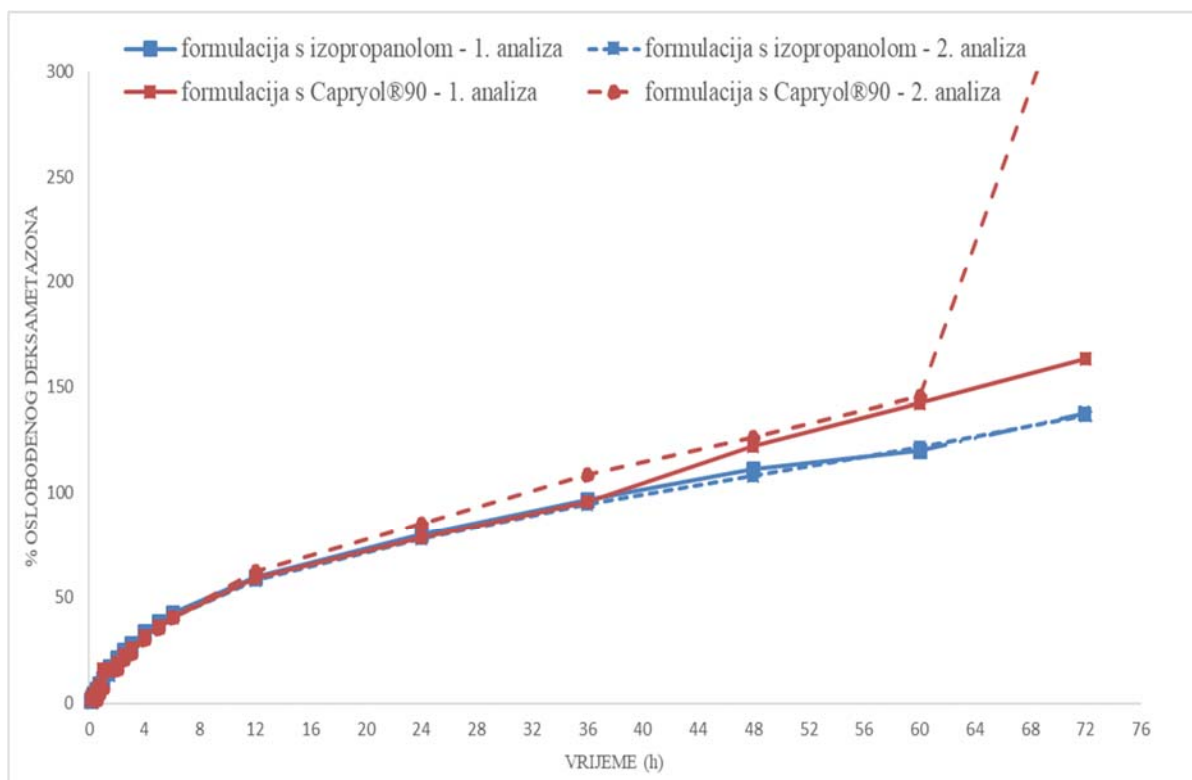
prinos u prvom slučaju bio 98,6%, dok je u drugom slučaju bio 98,2% što znači da vezanje deksametazona na membranu u tim uvjetima nije bilo značajno (Šutić i sur., 2019).

Kako bi se provjerila kompatibilnost deksametazona s membranama korištenima u ovom radu bilo bi potrebno inkubirati otopinu deksametazona koncentracije korištene u pokusu kroz vrijeme trajanja pokusa i usporediti koncentraciju nakon tog vremena s početnom koncentracijom.

U ovom radu nisu provedena dodatna ispitivanja s ciljem otkrivanja razloga smanjene količine oslobođenog deksametazona s obzirom na dobivene rezultate UPLC analize pa bi takvi pokusi mogli biti predmet nekog dodatnog istraživanja.

#### 4.6. Ponovljivost rezultata

Kako bi se provjerila ponovljivost rezultata dobivenih detekcijom optičkim probama tijekom pokusa na USP II uređaju, uspoređeni su rezultati dva odvojena pokusa (Slika 14).



Slika 14. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz dviju formulacija u dva pokusa.

Profili oslobađanja deksametazona iz formulacije s izopropanolom gotovo su identični u oba pokusa, dok su profili oslobađanja deksametazona iz formulacije s Capryol<sup>®</sup>90 vrlo slični do vremenske točke od 60 sati, nakon čega se u točki od 72 sata javlja puno veće oslobađanje u drugom pokusu. S obzirom na tako veliki skok u apsorbanciji vjerojatno je u tom pokusu došlo do značajno povećanog oslobađanja sastojaka iz formulacije koji uzrokuju interferenciju pri očitavanju apsorbancije. Usporedba dva odvojena pokusa pokazuje dobru ponovljivost metode što je važno za evaluaciju rezultata ukoliko se testira više različitih formulacija u nekoliko uzastopnih pokusa. To može biti od posebne važnosti za ranu fazu razvoja formulacija u farmaceutskoj industriji, u smislu probira između većeg broja različitih formulacija, a s obzirom na vrijeme potrebno za potpuno oslobađanje djelatne tvari, odnosno duljinu djelovanja koje se želi postići.



## 5. Zaključci

- Obje uljne formulacije deksametazona pokazuju povećano oslobađanje uz očitavanje apsorbancije optičkim probama tijekom 72 sata pokusa. Pokus s placebo pokazao je pojavu značajnih interferencija u očitavanju apsorbancije optičkim probama nakon 24 sata kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90 te 36 sati kod formulacije s izopropanolom.
- Usporednom analizom uzoraka na UPLC-u potvrđena je interferencija u očitavanju apsorbancije optičkim probama, najvjerojatnije zbog otpuštanja pomoćnih sastojaka iz formulacije.
- Kinetika otpuštanja pomoćnih sastojaka iz placeba i formulacija s deksametazonom nije ista, te je zapaženo otpuštanje iz placeba nešto brže.
- Postoje naznake nepotpunog oslobađanja deksametazona iz uljnih formulacija u ovim uvjetima, a koje mogu biti posljedica njegove nestabilnosti, te nespecifičnog vezanja na dijalizacijsku membranu.
- Određivanje oslobađanja deksametazona iz uljnih formulacija pomoću UV optičkih proba usporedivo je s UPLC analizom do vremenske točke od 24 sata.
- Metoda direktnog određivanja oslobađanja deksametazona pomoću UV optičkih probi pouzdana je za analizu u trajanju do 24 sata, do tog vremena se oslobodi oko 80 % deksametazona, te se ova metoda može koristiti kao brza pretražna metoda za odabir formulacija u ranoj fazi razvoja.

## 6. Literatura

Agoram B, Sagawa K, Shanker RM, Singh SK. Biopharmaceutics of NCEs and NBEs. U: Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications: Formulation and packaging. Nema S, Ludwig JD, urednici, London, Informa Healthcare, 2010, str. 37.

Bai G, Wang Y, Armenante P. Velocity profiles and shear strain rate variability in the USP Dissolution Testing Apparatus 2 at different impeller agitation speeds. *Int J Pharm*, 2011, 403, 1–14.

Bauer W, Short CL, Bennett GA. The manner of removal of proteins from normal joints. *J Exp Med*, 1933, 57, 419–433.

Baxter JL, Kukura J, Muzzio FJ. Shear-induced variability in the United States pharmacopeia apparatus 2: modifications to the existing system. *AAPS J*, 2005, 7(4), E857–E864.

Bhardwaj U, Burgess DJ. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *Int J Pharm*, 2010, 388(1–2), 287–294.

Brown WE, Wilder VM, Schwartz P. A study of oils used for intramuscular injections. *J Lab Clin Med*, 1944, 29, 259.

Burgess DJ, Crommelin DJ, Hussain AS, Chen ML. Assuring quality and performance of sustained and controlled released parenterals. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 21, 679–690.

Burgess DJ, Hussain AS, Ingallinera TS, Chen ML. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: workshop report. *AAPS PharmSci*, 2002, 4:E7.

Burgess DJ, Shen J. Drugs for Long Acting Injections and Implants. U: Long Acting Injections and Implants. Burgess DJ, Wright JC, urednici, New York, Springer, 2012, str.74.

Burgess DJ, Wright JC. An Introduction to Long Acting Injections and Implants. U: Long Acting Injections and Implants. Burgess DJ, Wright JC, urednici, New York, Springer, 2012, str. 1-2.

Chien YW. Long-acting parenteral drug formulations. *J Parenter Sci Technol*, 1981, 35, 106-139.

- Ching-Chiang S, Xiao L, Hageman M. Drug solubility and solubilization. U: Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications: Formulation and packaging. Nema S, Ludwig JD, urednici, London, Informa Healthcare, 2010, str. 139.
- Constantinides PP, Chaubal MV, Shorr R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60, 757–767.
- Dash AK, Cudworth GC. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1998, 40, 1–12.
- Dexter MB, Shott MJ. The evaluation of the force to expel oily injection vehicles from syringes. *J Pharm Pharmacol*, 1979, 31, 497–500.
- 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, 231–237.
- Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release*, 2005, 102, 313–332.
- Gray V. Compendial Testing Equipment: Calibration, Qualification, and Sources of Error. U: Pharmaceutical Dissolution Testing. Dressman J, Kramer J, urednici, Boca Raton, Taylor & Francis Group, 2005, str. 58-60.
- Gray V. Pharmaceutical Analysis: Dissolution Testing. U: Encyclopedia of Analytical Science. Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miro M, urednici, Amsterdam, Elsevier, 2019, str. 182-187.
- Hirano K, Ichihashi T, Yamada H. Studies on the absorption of practically water-insoluble drugs following injection V: subcutaneous absorption in rats from solutions in water immiscible oils. *J Pharm Sci*, 1982, 71, 495–500.
- Hirano K, Ichihashi T, Yamada H. Studies on the absorption of practically water-insoluble drugs following injection. I. Intramuscular absorption from water-immiscible oil solutions in rats. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29, 519–531.
- Hochhaus G, Barth J, Al-Fayoumi S, Suarez S, Derendorf H, Hochhaus R, Möllmann H. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dexamethasone Sodium-m-Sulfobenzoate (DS)

after Intravenous and Intramuscular Administration: A Comparison with Dexamethasone Phosphate (DP). *J Clinical Pharmacology*, 2001, 41, 425-434.

Injekcija lijekova produženog djelovanja, 2010, <http://www.pharmtech.com/sustained-release-injectable-drug-delivery?id=&sk=&date=&pageID=2>, pristupljeno 18.5.2020.

Irwin R. NTP technical report on the toxicity studies of castor oil (CAS no 8001-79-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (dosed feed studies). *Toxic Rep Ser*, 1982, 12, 1–B5.

Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 391–410.

Kalicharan RW, Schot P, Vromans H. Fundamental understanding of drug absorption from a parenteral oil depot. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 83, 19-27.

Kramer J, Grady LT, Gajendran J. Historical Development of Dissolution Testing. U: Pharmaceutical Dissolution Testing. Dressman J, Kramer J, urednici, Boca Raton, Taylor & Francis Group, 2005, str. 15.

Larsen DB, Parshad H, Fredholt K, Larsen C. Characteristics of drug substances in oily solutions. Drug release rate, partitioning and solubility. *Int J Pharm*, 2002, 232, 107–117.

Larsen SW, Larsen C, Thing MA. Oily (Lipophilic) Solutions and Suspensions. U: Long Acting Injections and Implants. Burgess DJ, Wright JC, urednici, New York, Springer, 2012, str. 113.-127.

Larsen SW, Larsen C. Critical factors influencing the in vivo performance of long acting lipophilic solutions – impact on in vitro release method design. *AAPS J*, 2009, 2, 762–770.

Liu L, Fitzgerald G, Embry M, Cantu R, Pack B. Technical evaluation of a fiber-optic probe dissolution system. *Dissolution Technol*, 2008, 15 (1), 10–20.

Lu X, Lozano R, Shah P. In-situ dissolution testing using different UV fiber optic probes and instruments. *Dissolution Technol*, 2003, 10 (4), 6-15.

Lusina Kregar M, Durrigl M, Rožman A, Jelčić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development and validation of an in vitro release method for topical particulate delivery systems. *Int J Pharm*, 2015, 485, 202–214.

Medlicott NJ, Waldron NA, Foster TP. Sustained release veterinary parenteral products. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56, 1345–1365

Mehanizam djelovanja deksametazona, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 21.5.2020.

Moghim SM, Hamad I, Bungler R, Andresen TL, Jorgensen K, Hunter AC, Baranji L, Rosivall L, Szebeni J. Activation of the human complement system by cholesterol-rich and pegylated liposomes – modulation of cholesterol-rich liposome-mediated complement activation by elevated serum LDL and HDL levels. *J Liposome Res*, 2006, 16, 167–174.

Murdan S, Florence AT. Non-aqueous solutions and suspensions as sustained-release injectable formulations. U: Sustained-Release Injectable Products. Senior J, urednik. Boca Raton, Informa HealthCare, 2000, str. 71–108.

Nir I, Lu X. In Situ UV Fiber Optics for Dissolution Testing – What, Why, and Where We Are After 30 Years. *Dissolution Technol*, 2018, 25 (3), 70-77.

Opis Capryola®90, <https://www.cphi-online.com/capryolm-90-prod486138.html>, pristupljeno 20.5.2020.

Patel V, Dumancas G, Viswanath L, Maples R, Subong B. Castor Oil: Properties, Uses, and Optimization of Processing Parameters in Commercial Production. *Lipid Insights*, 2016, 9, 1–12.

Prikaz USP II uređaja, <https://www.alphachrom.hr>, pristupljeno 27.5.2020.

Radd BL, Newman AC, Fegely BJ, Chrzanowski FA, Lichten JL, Walkling WD. Development of haloperidol in oil injection formulations. *J Parenter Sci Technol*, 1985, 39, 48–51.

Riffkin C, Huber RKCH. Castor oil as a vehicle for parenteral administration of steroid hormones. *J Pharm Sci*, 1964, 53, 891–895.

Rowe RC, Sheskey PJ, Sian CO. Handbook of Pharmaceutical excipients. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 126-127.

- Rowe RC, Sheskey PJ, Sian CO. Handbook of Pharmaceutical excipients. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 346.
- Rubino JT. Cosolvents and Cosolvency. U: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Swarbrick J, urednik. New York, Informa Healthcare USA, Inc., 2007, str. 806-819.
- Semalty A, Semalty M, Singh R, Saraf S, Saraf S. Properties and formulation of oral drug delivery systems of protein and peptides. *Ind J Pharm Sci*, 2007, 69, 741–747.
- Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm*, 1997, 154, 123–140.
- Simkin PA, Bassett JE, Koh EM. Synovial perfusion in the human knee: a methodologic analysis. *Semin Arthritis Rheum*, 1995, 25, 56–66.
- Simkin PA, Benedict RS. Iodide and albumin kinetics in normal canine wrists and knees. *Arthritis Rheum*, 1990, 33, 73–79.
- Sims EE, Worthington HEC. Formulation studies on certain oily injection products. *Int J Pharm*, 1985, 24, 287–296.
- Struktura Capryola 90, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 18.7.2020.
- Struktura deksametazona, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01234>, pristupljeno 25.5.2020.
- Struktura izopropanola, <https://chem.nlm.nih.gov>, pristupljeno 18.7.2020.
- Šutić A, Romić MD, Miočić S, Cetina-Čižmek B. Development of Analytical Method for In Vitro Release Testing of Dexamethasone Nanosuspensions. *Dissolution Technol*, 2019, 26 (2), 40-46.
- The United States Pharmacopoeia. <711> Dissolution. U: The United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 33–NF 28), 2010, Rockville, MD.
- Uppoor VR. Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations. *J Control Release*, 2001, 72, 127–132.

Vemuri MN. Preformulation. U: Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications: Formulation and packaging. Nema S, Ludwig JD, urednici, London, Informa Healthcare, 2010, str. 60.

Wallis WJ, Simkin PA, Nelp WB. Protein traffic in human synovial effusions. *Arthritis Rheum*, 1987, 30, 57–63.

Weng Larsen S, Østergaard J, Yaghmur A, Jensen H, Larsen C. Use of in vitro release models in the design of sustained and localized drug delivery systems for subcutaneous and intra-articular administration. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2013, 23 (4), 315-324.

Yalkowsky SH, Kryzyaniak JF and Ward GH. Formulation related problems associated with intravenous drug delivery. *J Pharm Sci*, 1998, 87 (7), 787–796.

Yalkowsky SH, Valvani SC and Johnson BW. In vitro method for detecting precipitation of parenteral formulations after injection. *J Pharm Sci*, 1983, 72 (9), 1014–1017.

## 7. Sažetak/summary

Terapijsko djelovanje mnogih lijekova može se poboljšati formuliranjem u obliku pripravaka produljenog oslobađanja. Produljeno djelovanje lijeka ima poseban značaj kod tretmana kroničnih bolesti jer se na taj način smanjuje učestalost primjene lijeka što je prihvatljivije i za pacijenta i za zdravstveni sustav.

Deksametazon je glukokortikoid koji se koristi za liječenje niza kroničnih oboljenja. Prethodni radovi pokazali su da deksametazon u obliku uljne otopine s dodatkom suotapala ima moguću korisnu primjenu zbog svojstva produljenog oslobađanja. U tim radovima ispitivani su mnogi parametri oslobađanja, ali je uočena potreba za dodatnim provjeravanjem metode u duljem vremenu trajanja ispitivanja zbog moguće pojave interferencija. Cilj ovog rada bio je optimizirati metodu oslobađanja deksametazona iz uljnih otopina na USP II uređaju spregnutom optičkim probama te ispitati potencijalne interferencije.

Kao otapalo je korišteno ricinusovo ulje jer je u njemu deksametazon pokazao najbolju topljivost u odnosu na ostala ispitana ulja. Izopropanol i Capryol<sup>®</sup>90 kao suotapala omogućuju povećanu topljivost deksametazona u ulju, a osim toga smanjuju viskoznost otopine što dovodi do povećanja injektibilnosti. Ispitivanje je provedeno pomoću USP II uređaja spregnutog optičkim probama koje su preko apsorpcije u receptorskom mediju pratile koncentraciju oslobođenog deksametazona iz formulacija. Određen je i apsorpcijski profil placebo formulacija, a u drugom dijelu rada uvedeno je i kontrolno određivanje količine oslobođenog deksametazona UPLC-om kako bi se mogle preciznije odrediti interferencije prilikom očitavanja optičkim probama.

Rezultati istraživanja pokazuju kako zaista dolazi do pojave interferencije, odnosno do prevelikog očitavanja količine oslobođenog deksametazona kod formulacije s izopropanolom nakon 36. sata i kod formulacije s Capryolom<sup>®</sup>90 nakon 24. sata od početka provođenja pokusa. Interferencija nastaje najvjerojatnije zbog otpuštanja pomoćnih sastojaka iz formulacija koja apsorbiraju na istoj valnoj dužini. Iz toga se zaključuje kako je metoda direktnog određivanja oslobađanja deksametazona pomoću optičkih proba pouzdana za analizu do 24 sata. Nadalje, budući da se nakon 24 sata oslobodi već oko 80% deksametazona iz obje formulacije, može se zaključiti kako je metoda ipak dovoljno dobra za usporedbu brzine oslobađanja između različitih uljnih formulacija deksametazona i njihov početni probir.



The therapeutic effect of many drugs can be improved in the form of prolonged release preparations. Prolonged action of the drug is of particular importance in the treatment of chronic diseases because it reduces the frequency of drug use which is more acceptable for both the patient and the healthcare system.

Dexamethasone is a glucocorticoid used to treat a number of chronic diseases. Previous works have shown that dexamethasone in the form of an oil solution with the addition of a cosolvent has a possible useful application due to its prolonged release properties. In these works, many release parameters were examined, but there was still a need for additional verification of the method over a longer duration of the test due to the possible occurrence of interferences. Therefore, the aim of this work was to optimize the method for dexamethasone release from oil solutions on a USP II device coupled with optic fiber spectrophotometer and to examine potential interferences.

Castor oil was used as a solvent due to highest dexamethasone solubility compared to other tested oils. Isopropanol and Capryol<sup>®</sup>90 as cosolvents increase solubility of dexamethasone in oil, and in addition reduce the viscosity of the solution leading to increased injectability. The assay was performed on a USP II apparatus coupled with optical fibers that monitored the concentration of dexamethasone released from the formulations via absorption in receptor medium. The absorption profile of placebo formulations was determined and in the second part of the assay additional measurement of released dexamethasone by UPLC was introduced so that interferences during optical probes detection could be determined more precisely.

The results of the study confirmed the existence of interference by optical probes detection, meaning that there is an excessive detection of released dexamethasone in the formulation with isopropanol after 36 hours and with Capryol<sup>®</sup>90 after 24 hours duration of the experiment. Interference occurs most likely due to the release of excipients from the formulations which have absorption at same wavelength. Therefore, the method for direct determination of dexamethasone release by optical fibers is reliable for analysis up to 24 hours. Furthermore, since about 80% of dexamethasone is released from both formulations after 24 hours, the method is still good enough to compare the release rate between different dexamethasone oil formulations as well as for their initial screening.

## 8. Prilozi

### 8.1. Popis slika

Slika 1. USP II uređaj ( <a href="http://www.alphachrom.hr">www.alphachrom.hr</a> ).....	9
Slika 2. Struktura Capryola <sup>®</sup> 90 ( <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov</a> ) .....	12
Slika 3. Struktura izopropanola ( <a href="https://chem.nlm.nih.gov">https://chem.nlm.nih.gov</a> ).....	13
Slika 4. Struktura deksametazona ( <a href="https://www.drugbank.ca">https://www.drugbank.ca</a> ).....	14
Slika 5. Oslobađanje deksametazona iz uljnih formulacija s izopropanolom i Capryolom <sup>®</sup> 90 na USP II uređaju spregnutom optičkim probama. ....	23
Slika 6. Usporedba apsorpcijskih profila placebo formulacija s profilima oslobađanja deksametazona iz uljnih formulacija. ....	24
Slika 7. Usporedba oslobađanja deksametazona iz formulacija na USP II uređaju određena detekcijom optičkim probama i UPLC-om.....	26
Slika 8. Usporedba oslobađanja deksametazona iz formulacija na USP II uređaju određena detekcijom optičkim probama i UPLC-om, do vremenske točke od 24h.....	27
Slika 9. Usporedba apsorpcijskih profila placebo formulacija s razlikom profila oslobađanja formulacija deksametazona određivanih optičkim probama i UPLC-om.....	29
Slika 10. Oslobađanje deksametazona iz formulacija na USP II uređaju određeno UPLC-om. ...	31
Slika 11. UPLC kromatogram uzorka nakon 72 sata analize uljne formulacije deksametazona na USP II uređaju.....	32
Slika 12. Usporedba UV spektara signala s UPLC kromatograma. ....	32
Slika 13. UPLC kromatogram nakon 72 sata ispitivanja stabilnosti deksametazona pri 37°C u fosfatnom puferu pH=7,4.....	33
Slika 14. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz dva pokusa.....	35

## 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 ULJNIH FORMULACIJA S DODATKOM IZOPROPANOLA I CAPRYOLA®90

Viktor Novak

#### SAŽETAK

Terapijsko djelovanje mnogih lijekova može se poboljšati formuliranjem u obliku pripravaka produljenog oslobađanja. Produljeno djelovanje lijeka ima poseban značaj kod tretmana kroničnih bolesti jer se na taj način smanjuje učestalost primjene lijeka što je prihvatljivije i za pacijenta i za zdravstveni sustav. Deksametazon je glukokortikoid koji se koristi za liječenje niza kroničnih oboljenja. Prethodni radovi pokazali su da deksametazon u obliku uljne otopine s dodatkom suotapala ima moguću korisnu primjenu zbog svojstva produljenog oslobađanja. U tim radovima ispitivani su mnogi parametri oslobađanja, ali je uočena potreba za dodatnim provjeravanjem metode u duljem vremenu trajanja ispitivanja zbog moguće pojave interferencija. Cilj ovog rada bio je optimizirati metodu oslobađanja deksametazona iz uljnih otopina na USP II uređaju spregnutom optičkim probama te ispitati potencijalne interferencije. Kao otapalo je korišteno ricinusovo ulje jer je u njemu deksametazon pokazao najbolju topljivost u odnosu na ostala ispitana ulja. Izopropanol i Capryol®90 kao suotapala omogućuju povećanu topljivost deksametazona u ulju, a osim toga smanjuju viskoznost otopine što dovodi do povećanja injektibilnosti. Ispitivanje je provedeno pomoću USP II uređaja spregnutog optičkim probama koje su preko apsorbancije u receptorskom mediju pratile koncentraciju oslobođenog deksametazona iz formulacija. Određen je i apsorpcijski profil placebo formulacija, a u drugom dijelu rada uvedeno je i kontrolno određivanje količine oslobođenog deksametazona UPLC-om kako bi se mogle preciznije odrediti interferencije prilikom očitavanja optičkim probama. Rezultati istraživanja pokazuju kako zaista dolazi do pojave interferencije, odnosno do prevelikog očitavanja količine oslobođenog deksametazona kod formulacije s izopropanolom nakon 36. sata i kod formulacije s Capryolom®90 nakon 24. sata od početka provođenja pokusa. Interferencija nastaje najvjerojatnije zbog otpuštanja pomoćnih sastojaka iz formulacija. Iz toga se zaključuje kako je metoda direktnog određivanja oslobađanja deksametazona pomoću optičkih proba pouzdana za analizu do 24 sata. Nadalje, budući da se nakon 24 sata oslobodi već oko 80% deksametazona iz obje formulacije, može se zaključiti kako je metoda ipak dovoljno dobra za usporedbu brzine oslobađanja između različitih uljnih formulacija deksametazona i njihov početni probir.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 14 grafičkih prikaza i 62 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: deksametazon, ricinusovo ulje, izopropanol, Capryol®90, uljna otopina, USP II, ispitivanje oslobađanja, spektrofotometrija, optička proba

Mentor: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, naslovni izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, naslovni izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Anita Hafner**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 2021.

## 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 *IN VITRO* METHOD FOR DEXAMETHASONE RELEASE TESTING FROM AN OILY SOLUTION WITH ADDITION OF ISOPROPANOL AND CAPRYOL®90

Viktor Novak

#### SUMMARY

The therapeutic effect of many drugs can be improved in the form of prolonged release preparations. Prolonged action of the drug is of particular importance in the treatment of chronic diseases because it reduces the frequency of drug use which is more acceptable for both the patient and the healthcare system. Dexamethasone is a glucocorticoid used to treat a number of chronic diseases. Previous works have shown that dexamethasone in the form of an oil solution with the addition of a cosolvent has a possible useful application due to its prolonged release properties. In these works, many release parameters were examined, but there was still a need for additional verification of the method over a longer duration of the test due to the possible occurrence of interferences. Therefore, the aim of this work was to optimize the method for dexamethasone release from oil solutions on a USP II device coupled with optic fiber spectrophotometer and to examine potential interferences. Castor oil was used as a solvent due to highest dexamethasone solubility compared to other tested oils. Isopropanol and Capryol®90 as cosolvents increase solubility of dexamethasone in oil, and in addition reduce the viscosity of the solution leading to increased injectability. The assay was performed on a USP II device coupled with optical fibers that monitored the concentration of dexamethasone released from the formulations via absorption in receptor medium. The absorption profile of placebo formulations was determined and in the second part of the assay additional measurement of released dexamethasone by UPLC was introduced so that interferences during optical probes detection could be determined more precisely. The results of the study confirmed the existence of interference by optical probes detection, meaning that there is an excessive detection of released dexamethasone in the formulation with isopropanol after 36 hours and with Capryol®90 after 24 hours duration of the experiment. Interference occurs most likely due to the release of excipients from the formulations. Therefore, method of direct determination of dexamethasone release by optical fibers is reliable for analysis up to 24 hours. Furthermore, since about 80% of dexamethasone is released from both formulations after 24 hours, the method is still good enough to compare the release rate between different dexamethasone oil formulations as well as for their initial screening.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Thesis includes: 47 pages, 14 figures and 62 references. Original is in Croatian language.

Keywords: dexamethasone, castor oil, isopropanol, Capryol®90, oily solution, USP II, dissolution testing, spectrophotometry, optic fiber

Mentor: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Hafner, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jelena Filipović-Grčić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 2021.