Razvoj metode za in vitro ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije s dodatkom izopropanola

Kozlina, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:462142

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb







Filip Kozlina

Razvoj metode za *in vitro* ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije s dodatkom izopropanola

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Prije svega zahvaljujem dr. sc. Biserki Cetina-Čižmek na stručnom vodstvu u izradi ovog rada i na pruženoj prilici da kroz ovaj rad steknem veliku količinu novih znanja i iskustava. Veliko hvala Marieti Duvnjak Romić, mag. pharm. na učenju, savjetima i razumijevanju, a posebno i na ugodnoj, motivirajućoj atmosferi tijekom rada. Hvala i Ivanu Meštroviću za kolegijalnost i odlično društvo u laboratoriju. Odjelu Istraživanje i razvoj tvrtke PLIVA HRVATSKA d.o.o., a prije svega djelatnicima odjela za pretformulacije, zahvaljujem na pruženoj prilici i pomoći. Od srca veliko hvala dragoj obitelji i prijateljima, koji su mi bili oslonac i podrška tijekom izrade diplomskog rada, kao i tijekom cijelog studija.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Uljne otopine 2
1.1.1. Farmakokinetika uljnih otopina 2
1.1.2. Uljne otopine u kliničkoj praksi 4
1.1.3. Otapala (nosači) u uljnim otopinama 5
1.1.4. Formuliranje uljnih otopina 6
1.2. Deksametazon 8
1.3. Izopropanol 10
1.4. Ispitivanje oslobađanja djelatne tvari 10
1.4.1. Razvoj metoda za ispitivanje oslobađanja *in vitro* 11
1.4.2. Dijalizacijske vrećice 13
1.5. Spektrofotometrija potpomognuta optičkim vlaknima u ispitivanjima oslobađanja *in vitro* 13
2. OBRAZLOŽENJE TEME 16
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. Materijali 20
3.2. Metode 20
3.2.1. Analiza sadržaja deksametazona tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) 20
3.2.2. Topljivost 21
3.2.3. Raspodjela 22
3.2.4. Analiza oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije 22
3.2.5. Statistička obrada podataka 25
4. REZULTATI I RASPRAVA 27
4.1. Topljivost 28
4.2. Raspodjela 31
4.3. Odabir modelne formulacije 32
4.4. Razvoj metode za ispitivanje oslobađanja *in vitro* 33
4.4.1. Odabir i modifikacija aparature i medija za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju s 20 % (v/v) izopropanola 33
4.4.2. Utjecaj vrste dijalizacijske membrane na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola 36

4.4.3. Utjecaj brzine miješanja medija na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola 40
4.4.4. Utjecaj sastava receptorskog medija na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola 43
4.4.5. Utjecaj temperature na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola 47
4.4.6. Utjecaj volumena formulacije na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola 49
4.5. Evaluacija rezultata 51
4.5.1. Osjetljivost i optimalni uvjeti metode 51
4.5.2. Ponovljivost metode 52
5. ZAKLJUČCI 54
6. LITERATURA 56
7. SAŽETAK/SUMMARY 62
8. PRILOZI 65
8.1. Popis slika 66
8.2. Popis tablica 67
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD . 69

1. UVOD

1.1. Uljne otopine

Otopine su jednostavni tekući tehnološki oblici široko primijenjeni u farmaceutskoj praksi. Dok se neke među njima primjenjuju oralnim putem, većina ih je namijenjena parenteralnoj primjeni. Tehnološki oblici za parenteralnu primjenu sve se intenzivnije istražuju, prvenstveno zbog toga što predstavljaju najefikasniji način primjene bioloških lijekova te omogućuju razvoj pripravaka s produljenim oslobađanjem djelatnih tvari (API, eng. *active pharmaceutical ingredient*). Najveći broj otopina na tržištu su vodene otopine, no nerijetko postoji potreba parenteralno primijeniti djelatne tvari koje su slabo topljive ili nestabilne u vodenim medijima pa je odabir vodene otopine kao formulacije isključen. U tom slučaju mogu se razviti otopine ili suspenzije API-ja u prikladnom lipofilnom mediju. U uljnim otopinama lipofilno otapalo (ulje) može biti jedina pomoćna tvar (nosač), a ako postoji potreba za dodatnim komponentama, odabir se uglavnom svodi na suotapalo te tvari koje održavaju kvalitetu pripravka (konzervanse, antioksidanse i sl.) (Aulton i sur., ured., 2002).

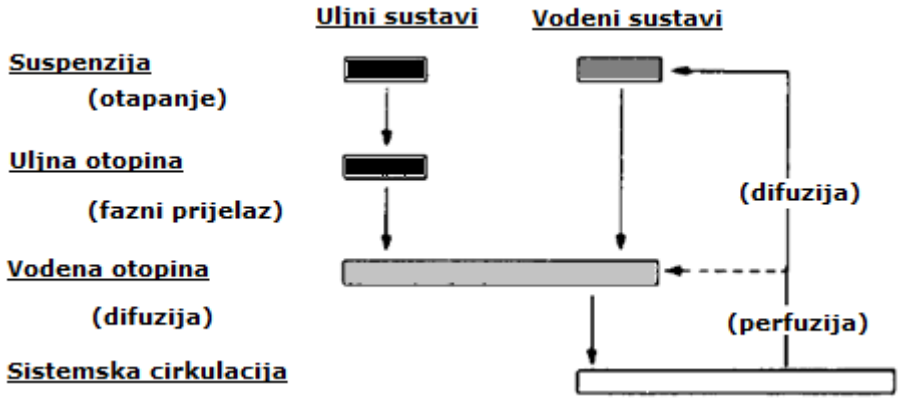
Uljne otopine tehnološki su jedan od najjednostavnijih ljekovitih oblika. Stabilne su, pogodne za terminalnu sterilizaciju, sadrže mali broj pomoćnih tvari i sam proces njihove proizvodnje je jednostavan, zbog čega je i njihova proizvodnja ekonomski prihvatljiva (Larsen i sur., 2009). Njihovi glavni nedostaci tiču se same primjene, koja zahtijeva injekciju relativno velikog volumena pripravka (najčešće 2 do 4 mL), te mogućnost lokalne iritacije i boli nakon primjene, osobito ako se pripravak primijeni prebrzo. Nužnost polaganog injektiranja uvjetuje neugodu pacijentu, pa je osiguravanje produljenog oslobađanja djelatne tvari iz uljnih otopina ključno kako bi se ovim pripravcima osiguralo mjesto na tržištu. Produljeno oslobađanje omogućuje velike vremenske intervale između primjene doza, čak i do samo jedne injekcije svaka dva do tri mjeseca, čime se premošćuju njihovi spomenuti nedostaci (Sartorius i sur., 2010; Jacobeit i sur., 2009).

1.1.1. Farmakokinetika uljnih otopina

Ključna karakteristika uljnih otopina je mogućnost pripreme oblika s produljenim oslobađanjem djelatne tvari (eng. *extended release* ili *prolonged release*). Takvi se oblici često nazivaju dugo-djelujućim injekcijama (LAI, eng. *long-acting injectables*), a u praksi se koriste prije svega u farmakoterapiji shizofrenije te hormonskoj nadomjesnoj terapiji. Put

primjene ovih LAI većinom je intramuskularno (*i.m.*), a mogu se primijeniti i supkutano (*s.c.*) (Owen i Rannard, 2016).

Nakon što se injektiraju u mišić, uljne otopine stvaraju fiksirani depo na mjestu primjene, koji se polako dispergira u manje kapljice ulja (Florence i Attwood, 2006). Potom dolazi do faznog prijelaza djelatne tvari iz uljne u vodenu fazu (tjelesnu tekućinu), što je često ograničavajući korak apsorpcije kod *i.m.* primjene uljnih otopina, nakon čega slijedi difuzija u vodenoj fazi kroz tkivo, te konačno apsorpcija u sistemsku cirkulaciju (ovisno o prokrvljenosti tkiva) (Spanarello i La Ferla, 2014; Zuidema i sur., 1988).



Slika 1. Prikaz procesa koji kontroliraju apsorpciju intramuskularno primijenjenog lijeka (preuzeto i prilagođeno iz Zuidema i sur., 1988)

Djelatne tvari koje se uklapaju u uljne otopine uglavnom su vrlo lipofilne molekule (npr. steroidne strukture, poput fulvestranta (Faslodex®)). U većini slučajeva, potrebno je kemijski dodatno povećati njihovu lipofilnost, što se najčešće ostvaruje sintezom estera kao prolijekova (npr. estradiol-valerat (Delestrogen®) ili haloperidol-dekanoat (Haldol depo®)). Ako je djelatna tvar prolijek, prije ispoljavanja farmakološkog učinka mora se aktivirati, najčešće hidrolizom kataliziranom brojnim esterazama u tkivima i krvi (Spanarello i La Ferla, 2014).

Procesi oslobađanja lijeka iz depoa i hidroliza esterskih prolijekova brži su ako se depo raspršti na manje kapljice ulja s većom dodirnom površinom s vodenom fazom. Stoga efekt produljenog oslobađanja može izostati ako se mjesto primjene masira nakon injekcije lijeka, ili ako se injekcija izvrši u neki od aktivnijih mišića. Tada dolazi do nekontroliranog brzog oslobađanja djelatne tvari te pojave nuspojava ovisnih o dozi, koje su se mogle spriječiti pravilnom primjenom. *Gluteus maximus* (najveći stražnjični mišić) i *vastus lateralis* (bočna glava četveroglavog bedrenog mišića) mišići su kroz koje je protok krvi ustaljen te su stoga i

mišići u koje se u kliničkoj praksi najčešće primjenjuju uljne otopine, a i ostali lijekovi za *i.m.* primjenu (Florence i Attwood, 2006).

Nakon intramuskularne ili supkutane primjene uljnih otopina te oslobađanja djelatne tvari iz depoa, API dolazi izravno u sistemsku cirkulaciju te je izbjegnut metabolizam prvog prolaska kroz jetru, koji drastično utječe na učinak nekih djelatnih tvari, bilo povećavanjem ili smanjivanjem koncentracije same djelatne tvari ili njenih metabolita u sistemskoj cirkulaciji nakon oralne primjene (Preskorn, 2005). Efekt prvog prolaska kroz jetru značajno, primjerice, smanjuje učinak steroidnih hormona, među kojima se neki iz tog razloga i uklapaju u uljne otopine (Katzung i sur., ured., 2012).

1.1.2. Uljne otopine u kliničkoj praksi

Uljne otopine estera testosterona (enantata, propionata i undekanoata) u terapiji simptoma hipogonadizma u muškaraca istražuju se i koriste u terapiji još od 50-ih godina prošlog stoljeća (Nieschlag i Nieschlag, 2014). Međutim, potraga za idealnim lijekom za terapiju te bolesti nastavlja se zbog nedostataka u profilu oslobađanja ljekovite tvari iz mišićnih depoa trenutno dostupnih lijekova. Naime, fluktuacije u postignutim koncentracijama testosterona u krvi su velike, te uzrokuju nepredvidive promjene u raspoloženju i seksualnom ponašanju nekih muškaraca na nadomjesnoj terapiji (Yassin i Haffejee, 2007).

Trenutno se najučinkovitijom opcijom u terapiji hipogonadizma u muškaraca pokazuje otopina testosteron-undekanoata u ricinusovom ulju, kojom se ostvaruju najmanje fluktuacije u koncentracijama testosterona u krvi nakon primjene. Međutim, postoji određena doza zabrinutosti oko primjene ovakvih ljekovitih oblika, jer su u rijetkim slučajevima (u više od 1, a manje od 10 na 1000 pacijenata) zabilježeni simptomi plućne mikroembolije uzrokovane uljem. Rizik od ove ozbiljne nuspojave može se smanjiti polaganim injektiranjem lijeka (Aydogdu i Swerdloff, 2017; www.halmed.hr).

Početak primjene antipsihotika u obliku LAI 60-ih godina prošlog stoljeća bio je prekretnica u terapiji shizofrenije. Oralna primjena antipsihotika povezana je s rizikom od neadherencije u shizofreničara – ne samo zbog mogućnosti odbijanja uzimanja lijekova, već i zbog mogućnosti nehotičnog propuštanja doza uslijed sekvela bolesti. Injekcijska primjena antipsihotika zahtijeva od pacijenta dolazak zdravstvenom radniku koji će primijeniti lijek, pa se u slučaju nedolaska na zakazani termin injekcije lijeka može direktno pratiti je li pacijent

adherentan i pravovremeno reagirati (Adams i sur., 2001). Stoga je razvoj LAI antipsihotika, uključujući uljne otopine koje se primjenjuju u intervalima od 2 do 4 tjedna, omogućio poboljšanje suradljivosti u nekih pacijenata. Uz to, pomoću tih formulacija u ulozi terapije održavanja, omogućeno je i smanjenje učestalosti relapsa i potrebe za hospitalizacijom, a time i poboljšanje kontrole bolesti i kvalitete njihovih života (Kane i sur., 2013).

Iako su rezultati farmakoepidemioloških studija koje uspoređuju učinkovitost LAI i oralno primijenjenih antipsihotika oprečni te izravno ovise o dizajnu studije, antipsihotici s produljenim oslobađanjem u najmanju ruku omogućavaju psihijatrima odabir terapije koja im pruža sigurnost glede suradljivosti pacijenata (Kirson i sur., 2013).

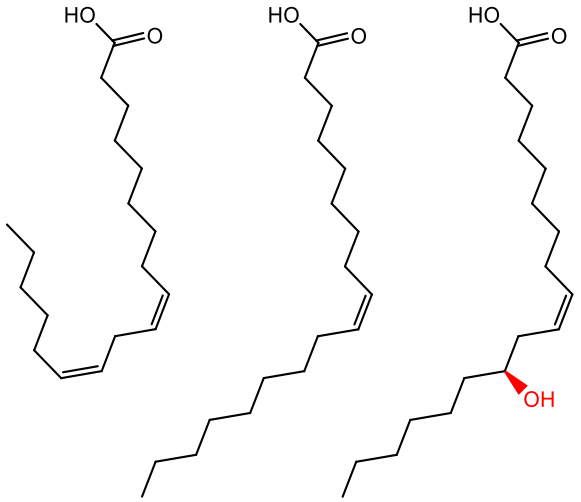
1.1.3. Otapala (nosači) u uljnim otopinama

Izbor nosača, koji ima ulogu otapala u uljnim otopinama, najčešće se svodi na biljna ulja (jedno ili smjesu ulja) te trigliceride srednje duljine lanaca (MCT, eng. *medium chain triglycerides*), poput Miglyola 812®. Dostupni su i sintetski monoesteri masnih kiselina, kao što su izopropil-miristat i etil-oleat, a sve navedene pomoćne tvari mogu se i pomiješati u jednu uljnu fazu (Larsen i sur., 2009).

Prema kemijskom sastavu, biljna ulja su smjese triglicerida masnih kiselina, te se ovisno o udjelu acilnih ostataka različitih masnih kiselina razlikuju njihova fizikalno-kemijska, a time i tehnološka svojstva. Mnoga biljna ulja imaju monografije u farmakopejama (USP 40-NF 35, 2015; Ph. Eur. 4th ed, 2008), a u ljekovitim oblicima najčešće se koriste rafinirana ulja, i to ricinusovo, sezamovo i ulje pamučnih sjemenki. Najveći udio ostataka masnih kiselina u sezamovom ulju i ulju pamučnih sjemenki čini linolna kiselina, dok je nešto manji udio oleinske kiseline. Iste masne kiseline sačinjavaju najveći udio estera i drugih biljnih ulja, poput kukuruzovog, maslinovog, kikirikijevog i sojinog (Wright i Burgess, ured., 2012).

Biljno ulje koje se značajno razlikuje od ostalih je ricinusovo. U sastavu tog ulja najveći je udio estera ricinolne kiseline koja u strukturi sadrži i hidroksilnu skupinu, za razliku od prethodno spomenutih linolne i oleinske, kao i većine drugih prirodno prisutnih masnih kiselina (Slika 2). Ova strukturna značajka omogućuje stvaranje intermolekulskih vodikovih veza međusobno između triglicerida u ricinusovom ulju, kao i vodikovih veza s drugim molekulama koje mogu sudjelovati u vodikovim vezama. Zbog toga se ricinusovo ulje u usporedbi s drugim biljnim uljima ističe kao bitno bolje otapalo, ali je i znatno veće

viskoznosti. Osim u izradi injekcijskih i topikalnih ljekovitih oblika, koristi se i kao sirovina za pripravu površinski aktivnih tvari, a široko se primjenjuje i izvan okvira farmaceutske i kozmetičke tehnologije (Patel i sur., 2016).



I II III

Slika 2. Strukture linolne (I), oleinske (II) i ricinolne kiseline (III)

Ricinusovo ulje postaje užeglo tek pri vrlo visokim temperaturama. Međutim, preporuča ga se čuvati na sobnoj temperaturi i zaštićeno od zraka i svjetlosti, jer je (poput drugih ulja koja sadrže ostatke nezasićenih masnih kiselina) podložno autooksidaciji. Samo po sebi posjeduje jako laksativno djelovanje ako se primijeni oralno u velikim količinama, no u okviru pomoćne tvari u lijekovima koji se primjenjuju parenteralno, farmakološki je neaktivno i smatra se netoksičnim (Rowe i sur., ured., 2006).

1.1.4. Formuliranje uljnih otopina

Kritični parametri formulacija uljnih otopina koji se modificiraju kako bi se postigao ljekoviti oblik optimalnih fizikalno-kemijskih svojstava te djelotvornosti i sigurnosti *in vivo* su:

1. viskoznost uljnog nosača,
2. topljivost djelatne tvari u nosaču,
3. raspodjela djelatne tvari između uljne i vodene faze.

Iako niska viskoznost nosača osigurava bolju injektibilnost (eng. *syringeability*), nerijetko je sama viskoznost nosača odgovorna za usporeno oslobađanje lijeka iz depoa. Ovo je posebno

važno ako je ograničavajući korak oslobađanja difuzija API-ja kroz uljnu fazu do granice ulje-voda, a ne sama raspodjela u vodenu fazu (Wright i Burgess, ured., 2012).

Topljivost djelatne tvari u uljnom nosaču ključan je fizikalno-kemijski parametar koji definira maksimalni udio lijeka u pripravku (eng. *drug load*), tj. maksimalnu koncentraciju uljne otopine koja se formulira. Što je ova koncentracija veća, manji su troškovi proizvodnje lijeka kao i volumen otopine koji se treba primijeniti da bi se postigao željeni farmakološki učinak. Topljivost API-ja može se povećati brojnim tehnološkim procesima (npr. usitnjavanjem čestica, pripremom specifičnih polimorfa i sl.), kemijskim modifikacijama (sintezom soli ili drugih derivata) ili uporabom pomoćnih tvari (suotapala, surfaktanata ili kelatora) (Savjani i sur., 2012).

Raspodjela tvari između dva otapala koja se ne miješaju predstavlja fizikalno-kemijsko svojstvo koje se često istražuje, kako u dizajnu novih lijekova, tako i u predformulacijskim istraživanjima. Za opisivanje raspodjele najčešće se koristi parametar log *P*, definiran kao logaritam omjera koncentracije spoja koji ne disocira u *n*-oktanolu i vodi, a opisuje lipofilnost kemijskih spojeva, te je najčešće korišteni fizikalno-kemijski parametar u predviđanju farmakokinetičkih svojstava novih lijekova tijekom dizajniranja lijekova (Lemke i sur., ured., 2008).

U okviru formuliranja i ispitivanja uljnih otopina, raspodjela djelatne tvari opisuje se prividnim particijskim koeficijentom (P_{app}), koji se računa prema formuli:

$$P_{app} = \frac{c_i - c_v}{c_v} \cdot \frac{V_v}{V_u} \quad (1),$$

u kojoj c_i označava koncentraciju pripremljene uljne otopine za ispitivanje raspodjele, c_v ravnotežnu koncentraciju API-ja u vodenoj fazi (najčešće fosfatni pufer pH 7,4), a V_v i V_u redom volumene vodene i uljne faze na kraju ispitivanja (kad je postignuta dinamička ravnoteža) (Larsen i sur., 2002).

Particijski koeficijent u kontekstu formuliranja uljnih otopina može se, poput topljivosti i viskoznosti, učinkovito modificirati s ciljem povećanja afiniteta djelatne tvari prema uljnoj fazi, kako bi oslobađanje bilo sporije. To se može izvesti sintezom lipofilnijih prolijekova, što je i slučaj kod većine spojeva korištenih u uljnim otopinama koje su trenutno na tržištu. Drugi pristup je primjena suotapala koja sadrže skupine koje mogu djelovati kao donori ili akceptori vodikovih veza (npr. benzil-benzoat, benzilni alkohol, klorbutanol i dr.) i miješaju se s uljima,

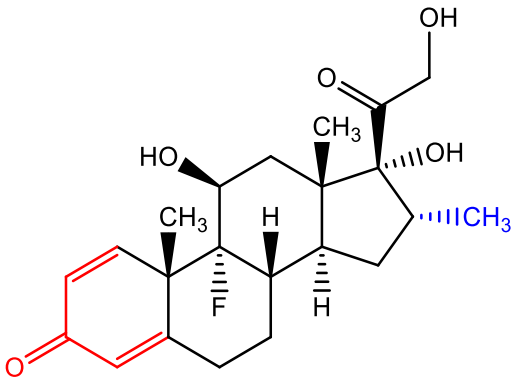
te im time povećavaju kapacitet otapanja lijekova koji i nisu nužno vrlo lipofilni (odnosno nemaju veliki log *P*) (Wright i Burgess, ured., 2012).

Iz navedenog proizlazi da se prikladnim odabirom suotapala i njegove količine u uljnoj otopini može istovremeno utjecati na sva tri kritična parametra formulacije. Uz povećanje topljivosti API-ja u formulaciji, primjenom suotapala istovremeno se smanjuje viskoznost otopine i modificira particijski koeficijent, s ciljem postizanja produljenog oslobađanja i optimizacije fizikalno-kemijskih i tehnoloških svojstava pripravka.

1.2. Deksametazon

Sintetski glukokortikoidi, kojima pripada deksametazon, snažne su protuupalne i imunosupresivne tvari s mnogo odobrenih indikacija. Deksametazon (DEX) je bio prvi u nizu sintetskih glukokortikoida sa supstituentom (metilnom skupinom) u položaju 16α (Slika 3, označeno plavom bojom), koji mu značajno povećava selektivnost u smislu glukokortikoidnih naspram mineralokortikoidnih učinaka. Odlikuje ga visoka potentnost – klinička ispitivanja pokazala su sedmerostruko snažnije antireumatoidno djelovanje deksametazona u usporedbi s hidrokortizonom, a peterostruko jače od prednizona. Stoga se deksametazon može smatrati i svojevrsnim rezervnim glukokortikoidom (Lemke i sur., ured., 2008).

Ovom API-ju pridruženo je oko stotinu različitih indikacija, koje uključuju liječenje autoimunih, reumatskih, alergijskih i očnih bolesti, bolesti endokrinog sustava, probavnih i dišnih organa, bolesti bubrega, hematološke bolesti, a indiciran je i kao adjuvant u terapiji infektivnih bolesti (oralnim putem kod tuberkuloznog meningitisa i trihineloze), te se u obliku kapi i masti za oko koristi vrlo često kod bakterijskih upala oka (www.halmed.hr).



Slika 3. Strukturna formula deksametazona

Deksametazon sadrži kromofor (Slika 3, označeno crvenom bojom) koji se sastoji od dvostruke C=C veze povezane s još jednom dvostrukom C=C vezom preko karbonilnog ugljikovog atoma iz funkcionalne skupine ketona, zbog čega se može identificirati i kvantificirati UV-Vis spektrofotometrijom. Zahvaljujući trima hidroksilnim skupinama, donor je triju vodikovih veza, a uz još dvije karbonilne skupine, akceptor pet vodikovih veza. Zbog tih strukturnih značajki, unatoč vrlo hidrofobnom steroidnom kosturu, deksametazon je tek blago lipofilna molekula (log *P* iznosi 1,68). Deksametazon nema ni jednu funkcionalnu skupinu koja disocira u fiziološki relevantnom pH rasponu – tercijarni alkohol u položaju 17 najkiselija je skupina u strukturi deksametazona, a odgovara mu pK_a vrijednost od 12,42, što znači da se pri fiziološkim vrijednostima pH deksametazon u vodenim otopinama nalazi praktički isključivo u neutralnom obliku (www.chemicalize.com). Sam po sebi, deksametazon je netopljiv u vodi, ali moguće je pripremiti njegov bitno hidrofilniji prolijek – natrijevu sol fosfatnog estera (natrijev deksametazon-fosfat). Nadalje, teško je topljiv u etanolu i umjereno topljiv u diklormetanu (Ph. Eur. 4th ed, 2008).

Kemijska struktura deksametazona i mogućnost priprave njegovih prolijekova dovela je do razvoja različitih farmaceutskih oblika. Na tržištu su dostupne tablete, masti, kapi-suspenzije, otopine za injekciju ili infuziju deksametazona (odnosno njegovih soli i estera), a u novije vrijeme i intravitrealni implantati za terapiju makularnog edema (Osurdex®) (Prata i sur., 2018; www.halmed.hr). Intramuskularna primjena deksametazona također je istražena, te je pokazano da je njegovo oslobađanje iz *i.m.* primijenjenih bezvodnih emulzija u kojima je uljna faza bila ricinusovo ulje u odnosu na U/V emulzije dvostruko dulje (Suitthimeathegorn i sur., 2006).

Intraartikularna primjena deksametazona u obliku soli dobro topljive u vodi (natrijevog deksametazon-fosfata) intenzivno se istražuje te pokazuje potencijalnu novu indikaciju za taj glukokortikoid (Grodzinsky i sur., 2017). Primjena jednokratne injekcije vodene otopine natrijevog deksametazon-fosfata intraartikularno u prevenciji post-traumatskog osteoartritisa istražuje se u kliničkim ispitivanjima (www.clinicaltrials.gov). U ovom kontekstu, osobito zanimljivim se čini potencijal razvoja uljnih otopina deksametazona za intraartikularnu primjenu (Larsen i sur., 2008). Intraartikularna primjena deksametazona kao vrlo potentnog glukokortikoida mogla bi omogućiti snažno protuupalno djelovanje uz sporije, kontrolirano oslobađanje. Kako bi primjena i farmakološki učinak bili lokalizirani na oboljeli zglob, rizik od nuspojava povezanih s dugotrajnom primjenom visokih doza glukokortikoida bio bi smanjen.

1.3. Izopropanol

Propan-2-ol iliti izopropanol (iPrOH) je najjednostavniji sekundarni alkohol, formule $CH_3CH(OH)CH_3$. U biomedicinskim znanostima najvažnija mu je uloga dezinfekcijskog sredstva (npr. rutinski kod dezinfekcije *laminar-flow* uređaja) u obliku 70 %-tne vodene otopine koja ima snažno baktericidno djelovanje. Često se koristi kao otapalo u topikalnim formulacijama, a ne preporuča se njegova oralna primjena (zbog toksičnosti slične etanolu, no izraženije i bez početnih euforičnih učinaka). Parenteralno primijenjen, smatra se sigurnim u malim količinama. Čak 20 mL izopropanola primijenjenog intravenski izazvalo je samo osjećaj vrućine i blago sniženje krvnog tlaka. Međutim, doticaj s očima (kao i s drugim jednostavnim alkoholima) izaziva snažnu iritaciju (Rowe i sur., ured., 2006).

Poput kemijski sličnih alkohola etanola, propilenglikola, glicerola i dr., izopropanol je potencijalno dobro suotapalo za spojeve koji se namjeravaju uklopiti u uljne otopine: s jedne strane jer se odlično miješa s uljima i otapa ih (pritom stvarajući smjesu manje viskoznosti od samih ulja), a s druge strane zato što poput ostalih alkohola može stvarati vodikove veze s djelatnim tvarima koje nisu sasvim hidrofobne, primjerice deksametazonom. Uporaba izopropanola kao suotapala u uljnim otopinama do sada nije istražena.

1.4. Ispitivanje oslobađanja djelatne tvari

Oslobađanje (eng. *liberation, release*) djelatne tvari iz ljekovitog oblika predstavlja preduvjet svim farmakokinetičkim procesima kao i terapijskom učinku primijenjenog lijeka, te je stoga nužno razviti ljekovite oblike iz kojih se djelatna tvar oslobađa u dovoljnoj količini i zadovoljavajućem vremenu, a sve češće i na kontroliran način. Kako bi se ovi parametri mogli mjeriti, ili još bolje – predvidjeti, provode se pokusi *in vitro* ispitivanja oslobađanja djelatne tvari iz ljekovitog oblika (eng. *in vitro release*, IVR), koji pripadaju među najvažnija analitička ispitivanja. IVR ispitivanja provode se često u ranim fazama istraživanja lijekova, a osobito tijekom razvoja formulacije. Ako su robusni, testovi oslobađanja *in vitro* mogu se koristiti i kao metoda kontrole kakvoće lijekova. Najveća korist IVR testova u istraživanju i razvoju lijekova dobiva se ako se ustvrdi da je *in vitro* metoda sposobna predvidjeti oslobađanje lijeka *in vivo*, tj. ako se uspostavi *in vitro – in vivo* korelacija (IVIVC) (Gibson i sur., ured., 2004).

Za ispitivanja oslobađanja *in vitro* postoji nekoliko standardiziranih farmakopejskih metoda s detaljno definiranim karakteristikama aparatura koje će se koristiti u ispitivanju. Najviše tih aparatura opisano je u američkoj farmakopeji: aparatura s košaricama (USP I), lopaticama (USP II), recipročnim cilindrima (USP III, koju ne prihvaćaju Ph. Eur. ni Japanska farmakopeja) te protočnim ćelijama (USP IV). Medij za oslobađanje trebao bi biti biorelevantan, tako da se kod ispitivanja lijekova za oralnu primjenu koriste mediji koji oponašaju pH i kemijski sastav želučanog odnosno crijevnog soka. Sastojci ovih medija također su opisani u farmakopejama (USP 40-NF 35, 2015; Ph. Eur. 4th ed, 2008).

1.4.1. Razvoj metoda za ispitivanje oslobađanja in vitro

Američka, Europska i Japanska farmakopeja definiraju nekoliko metoda ispitivanja oslobađanja djelatne tvari za ljekovite oblike namijenjene oralnoj primjeni i za transdermalne flastere. Za sve ostale tipove parenteralnih ljekovitih oblika zasad u farmakopejama nisu predložene standardizirane metode. Zbog toga je potreba za razvojem novih *in vitro* metoda za ispitivanje oslobađanja iz velikog broja polučvrstih i tekućih ljekovitih oblika i dalje prisutna (Seidlitz i Weitscheis, 2011).

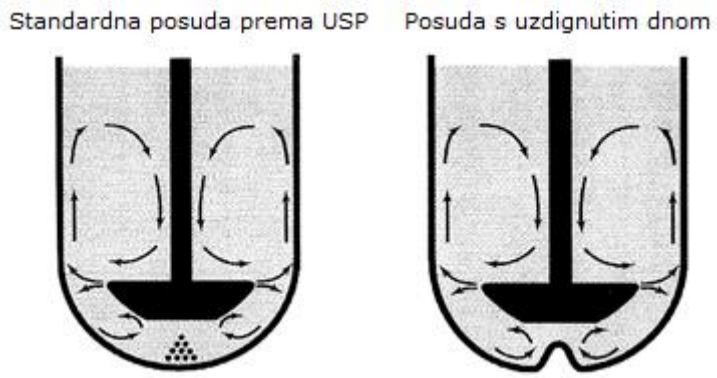
Prilikom razvoja metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz parenteralnih oblika s produljenim oslobađanjem, kritični su faktori:

1. reproducibilnost metode,
2. dobar izbor medija,
3. održavanje uvjeta osigurane topljivosti (eng. *sink conditions*),
4. kontrola hidrodinamike sustava,
5. kvalitetan odabir diskriminirajućih parametara s obzirom na vrstu pripravka (medij, pH, brzina rotacije i sl.) (Shargel i sur., 2004).

Osjetljivost metode koja se razvija jednako je važna kao njena reproducibilnost. Ona podrazumijeva sposobnost metode da detektira razlike u oslobađanju iz različitih uzoraka pri različitim uvjetima, na način na koji bi se oni mogli promijeniti *in vivo* ili tijekom proizvodnog procesa, te tako mijenjati profil oslobađanja lijeka. U razvoju metoda za oslobađanje *in vitro* ispituje se najčešće osjetljivost s obzirom na temperaturu, brzinu miješanja medija, volumen medija ili formulacije, postupak uzorkovanja te sastav medija (Gibson i sur., ured., 2004).

Uvjeti osigurane topljivosti prema USP zadovoljeni su ako je koncentracija API-ja u mediju nakon 100 %-tnog oslobađanja manja ili jednaka od jedne trećine maksimalne otopljene koncentracije u tom mediju (USP 40-NF 35, 2015). Europska farmakopeja za uvjete osigurane topljivosti preporuča da koncentracija nakon potpunog oslobađanja bude i manja: jedna trećina do desetine maksimalne koncentracije API-ja u mediju (Ph. Eur. 4th ed, 2008). Održavanje ovih uvjeta osigurava da nikakve promjene koncentracijskog gradijenta ne utječu na profil oslobađanja API. Uvjeti osigurane topljivosti osiguravaju se prije svega odabirom dovoljno velikog volumena receptorskog medija. Uvjeti osigurane topljivosti predstavljaju poseban problem kod slabo topljivih djelatnih tvari te metoda koje zahtijevaju uzorkovanje receptorskog medija kako bi se iz uzroka odredila količina oslobođenog API, jer se pritom u receptorski medij vraća jednak volumen čistog medija, pri čemu se koncentracijski gradijent može značajno promijeniti (Seidlitz i Weitscheis, 2011; Wright i Burgess, ured., 2012).

Hidrodinamika sustava mora se održavati pod nadzorom tijekom ispitivanja, jer u suprotnom može biti značajan izvor varijabilnosti rezultata. Do toga može doći ako formulacija pluta na površini medija, ako se lijepi za stjenke posude ili druge dijelove aparature i sl. U tom smislu, u razvoju metode potrebno je pažljivo odabrati aparaturu i optimalnu brzinu miješanja medija. Primjerice, prilikom ispitivanja oslobađanja API-ja iz tableta aparaturom s lopaticama, raspadnuti neotopljeni materijal može zaostajati ispod same lopatice te biti u manjoj mjeri izložen miješanju, čime je i oslobađanje usporeno. Kako bi se riješio taj problem, razvijene su posude koje imaju uzdignuto dno ispod lopatice (eng. *peak vessels*, Slika 4).



Slika 4. Uobičajena USP II aparatura i aparatura s posudom s uzdignutim dnom (preuzeto i prilagođeno iz Gibson i sur., ured., 2004)

Ostali problemi hidrodinamike sustava koji se povezuju s USP II aparaturom, a mogli bi biti relevantni u slučaju uljnih otopina, su plutanje i lijepljenje formulacije za stjenke i druge dijelove aparature (Gibson i sur., ured., 2004).

1.4.2. Dijalizacijske vrećice

U dizajnu metoda za *in vitro* ispitivanje oslobađanja iz uljnih otopina od velike koristi mogu biti dijalizacijske vrećice. One su građene od polupropusnih membrana, najčešće su polimera celuloze: regenerirane celuloze (RC), celuloza-estera (CE), celuloza-etera i drugih. Ključno svojstvo po kojem se razlikuju je MWCO (eng. *molecular weight cut off*), što je mjera retencijske sposobnosti membrana za otopljene tvari i predstavlja molekulsku masu tvari za koju je membrana najmanje 90 % nepropusna (www.spectrumlabs.com).

Dijalizacijske vrećice u ispitivanju oslobađanja iz uljnih otopina omogućuju dobru korelaciju *in vitro* prikupljenih rezultata s uvjetima *in vivo*, jer depo uljne otopine nakon injektiranja u mišić ili potkožno tkivo ostaje kompaktan i imobilan te se otopina vrlo sporo raspršuje i difundira kroz tkivo. Uz to, primjenom dijalizacijskih vrećica sprečava se plutanje ulja na površini medija i lijepljenje za stjenke posuda, što predstavlja najčešće poremećaje hidrodinamike tijekom ispitivanja oslobađanja *in vitro*. Mogući problemi povezani s difuzijskim vrećicama, poput retencije sadržaja difuzijske vrećice ili nemogućnosti zadovoljavanja uvjeta osigurane topljivosti unutar same vrećice (prisutni kad je riječ o liposomima ili emulzijama), ne vrijede za uljne otopine kao jednofazne sustave (Wright i Burgess, ured., 2012).

1.5. Spektrofotometrija potpomognuta optičkim vlaknima u ispitivanjima oslobađanja *in vitro*

Kako je u ispitivanjima oslobađanja *in vitro* potrebno često uzorkovati medij i istovremeno u posude za oslobađanje vraćati novi (osobito u slučaju pripravaka s produljenim oslobađanjem), posebno je koristan bio pristup kojim se uzorci mogu konstantno uzorkovati bez da se medij za oslobađanje na bilo koji način mora mijenjati.

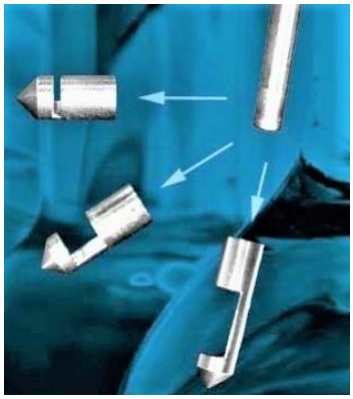
Jedan mogući pristup je korištenje spektrofotometra čije probe su tijekom cijelog ispitivanja uronjene u medij za oslobađanje. Detektor tog tipa instrumenata je proba s lećom i zrcalom na

glavi probe, koja detektira UV i vidljivo zračenje medija u koji je uronjena (Slika 5). Sustavom optičkih vlakana detektirano zračenje se provodi do analizatora povezanog s računalom i prevodi u UV-Vis spektar (www.agilent.com).



Slika 5. Shematski prikaz probe optičkim vlaknima potpomognutog spektrofotometra (preuzeto i prilagođeno s www.agilent.com)

Spektrofotometrija (UV-Vis spektrometrija), kao analitička metoda, bazira se na Beer-Lambertovom zakonu, prema kojemu se s povećanjem optičkog puta linearno povećava i mjerena apsorbancija (Watson, 2012). Stoga su za ove instrumente izrađene probe s različitim duljinama optičkog puta (Slika 6) te je odabirom optičkog puta omogućena optimalna osjetljivost metode za pojedini spoj. Same probe mogu biti građene od nehrđajućeg čelika, kvarca te poliamid-imida (Torlon^{TM}) (www.agilent.com).



Slika 6. Probe od nehrđajućeg čelika s različitim duljinama optičkog puta (2 mm, 10 mm i 20 mm) (preuzeto s www.agilent.com)

S obzirom na to da su ovakve probe izložene atmosferskom svjetlu tijekom pokusa (ako se cijela aparatura ne zaštiti od svjetla), bazna linija spektara dobivenih opisanim instrumentima bitno je većih vrijednosti apsorbancija (oko 8 puta) od klasične spektrofotometrije koja koristi kivete koje se umeću u zatvoreno kućište. Zbog toga je prije mjerenja potrebno kalibrirati svaku probu pojedinačno, što traje svega nekoliko minuta. Unatoč tome, sami utjecaji promjene intenziteta i vrste vanjskog svjetla na rezultate mjerenja dokazano su vrlo mali.

Problem visokih vrijednosti bazne linije nadoknađuje i širok raspon vrijednosti apsorbancija u kojima je metoda linearna, i to do minimalno 2,0 (www.agilent.com).

Za razliku od klasične spektrofotometrije, ovakvi uređaji ne zahtijevaju uporabu kiveta (koje ponekad mogu biti i vrlo skupe), a mjerenja su potpuno automatizirana i mogu se provoditi *in situ*. Ta svojstva optičkim vlaknima potpomognutu spektrofotometriju čine idealnom za relativno dugotrajna ispitivanja oslobađanja djelatnih tvari *in vitro*, kakva se očekuju za uljne otopine, dizajnirane kao depo pripravke, te će uporaba ovakvog instrumenta kao tehnike praćenja oslobađanja *in vitro* biti ispitana u ovom radu.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Uljne otopine su tehnološki jednostavni tekući ljekoviti oblici namijenjeni intramuskularnoj ili supkutanoj primjeni. Omogućuju parenteralnu primjenu djelatnih tvari koje su vrlo slabo topljive u vodi ili nestabilne u vodenim medijima, no pružaju i veliku mogućnost za pripravu ljekovitih oblika s produljenim oslobađanjem djelatne tvari. Kako bi se negativni aspekti njihove primjene (poput boli ili iritacije nakon primjene) mogli premostiti, neophodno je da oslobađanje djelatne tvari iz depoa, koje uljne otopine stvaraju nakon injektiranja, bude dugotrajno, kako bi potreba za injektiranjem bila što rjeđa. Zbog toga je potrebno moći pouzdano mjeriti oslobađanje API-ja iz uljnih otopina, koristeći metodu koja bi u idealnoj situaciji pružala dobru korelaciju s *in vivo* uvjetima, a istovremeno bila jednostavna za izvedbu, po mogućnosti uz korištenje standardiziranih farmakopejskih aparatura.

Trenutno ne postoji ni jedna standardizirana metoda za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari *in vitro* iz parenteralnih pripravaka, zbog čega postoji velika potreba za daljnjim istraživanjem takvih metoda, a osobito za pripravke s produljenim oslobađanjem, poput uljnih otopina.

Cilj ovog rada je razviti i evaluirati analitičku metodu ispitivanja oslobađanja djelatne tvari *in vitro* iz uljnih otopina, koristeći deksametazon kao modelni lijek. Kako bi se to postiglo, potrebno je:

1. ispitati topljivost deksametazona u nekoliko biljnih ulja,
2. ispitati potencijal izopropanola kao suotapala za uljne otopine deksametazona,
3. odabrati modelnu formulaciju na temelju topljivosti deksametazona u biljnim uljima sa ili bez suotapala,
4. izmjeriti prividni particijski koeficijent deksametazona između uljne formulacije i medija za oslobađanje kako bi se procijenio potencijal formulacije za produljeno oslobađanje,
5. ispitati dva tipa dijalizacijskih membrana u razvoju metode,
6. procijeniti osjetljivost metode (njenu sposobnost da detektira promjene u formulaciji uzrokovane promijenjenim uvjetima proizvodnje ili okolnostima nakon primjene *in vivo*), i to s obzirom na temperaturu, brzinu miješanja medija, sastav medija i volumen formulacije,
7. odabrati optimalne uvjete metode za provođenje ispitivanja te dodatno evaluirati ponovljivost metode pri tim uvjetima.

Kao modelni lijek koji će se koristiti u istraživanju odabran je deksametazon. Taj glukokortikoid prikladan je za ovo istraživanje jer je lipofilna molekula koja istovremeno nije

vrlo hidrofobna, pa će biti interesantno ispitati i usporediti njegovu topljivost u uljnim nosačima u odnosu na vodu, kao i raspodjelu između uljne i vodene faze. Nadalje, s obzirom na to da se deksametazon može primjenjivati intraartikularno, teorijski postoji potencijal razvoja uljne otopine deksametazona namijenjene intraartikularnoj primjeni, koja bi se primjenjivala vrlo rijetko i imala lokalno djelovanje, uz sporo oslobađanje kojim bi se minimizirali sistemski učinci i nuspojave glukokortikoida.

Idejna formulacija sadržavat će izopropanol u ulozi suotapala, koji bi, osim povećavanja topljivosti deksametazona u odabranom biljnom ulju, trebao istovremeno smanjiti viskoznost otopine i time povećati njenu injektibilnost, kao i povećati prividni particijski koeficijent deksametazona između uljne faze i fosfatnog pufera pH 7.4 (pH tjelesne tekućine). Razvoj metoda za ispitivanja oslobađanja *in vitro* iz uljnih otopina predmet je mnogih istraživanja. Schultz i sur. predložili su uporabu aparature s rotirajućom dijalizacijskom ćelijom. Ta metoda zahtijevala je ručno uzorkovanje medija u svakoj točki analize i potom određivanje količine oslobođene djelatne tvari pomoću HPLC metode, a primijenjena aparatura nije bila sama po sebi jednostavna ni komercijalno dostupna (Schultz i sur., 1997).

Spektrofotometrija potpomognuta optičkim vlaknima mogla bi omogućiti potpuno automatizirano, *in situ, on-line* mjerenje količine oslobođene djelatne tvari u mnogo kraćim vremenskim intervalima u usporedbi s metodama kod kojih se medij treba uzorkovati uz istovremeno vraćanje jednakog volumena čistog medija u sustav. Osim toga, ovakva metoda osiguravala bi održavanje uvjeta osigurane topljivosti tijekom cijelog postupka, jer se nakon pokretanja pokusa, na medij za oslobađanje i formulaciju ni na koji način ne utječe izvan sustava. Stoga će u ovom radu biti ispitan potencijal primjene spektrofotometrije potpomognute optičkim vlaknima kao tehnike za kvantitativno određivanje oslobađanja *in vitro*.

Pomoću optičkih vlakana, spektrofotometar će u ispitivanjima oslobađanja *in vitro* biti izravno povezan (*on-line*) s USP II aparaturom (aparatura s lopaticom), koja je standardizirana, široko dostupna i jednostavna aparatura, a problematika imobilizacije i mogućeg plutanja ulja pokušat će se riješiti korištenjem dijalizacijskih vrećica. Krajnji cilj rada je razviti jednostavnu, robusnu i diskriminatornu metodu za praćenje *in vitro* oslobađanja djelatne tvari iz uljnog pripravka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za ispitivanje topljivosti deksametazona (Pfizer, SAD), korištena su sljedeća otapala: rafinirano ulje kikirikija (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), rafinirano ulje pamučnih sjemenki (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), rafinirano ulje kukuruza (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo), rafinirano ulje ricinusa (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo) i rafinirano ulje sezama (Croda, Ujedinjeno Kraljevstvo) te izopropanol (Merck, Njemačka).

U analizi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) za razrjeđivanje uljnih otopina korišteni su tetrahidrofuran (Merck, Njemačka) i acetonitril (Merck, Njemačka). Kao mobilna faza korišten je acetonitril (organska faza) u odgovarajućem omjeru sa pripremljenim fosfatnim puferom pH 2,0 (vodena faza). Fosfatni pufer pripremljen je iz kalijevog dihidrogenfosfata (Kemika, Hrvatska) i visokopročišćene vode.

Kao receptorski medij korišten je fosfatni pufer pH 7,4 pripravljen pomoću kalijevog dihidrogenfosfata, natrijevog hidroksida (Kemika, Hrvatska) i visokopročišćene vode. U pokusima u kojima je receptorski medij modificiran dodatkom etanola korišten je apsolutni etanol (Kemika, Hrvatska) i dodan u fosfatni pufer u odgovarajućoj količini neposredno prije ispitivanja. Za filtriranje medija korišteni su filtri od regenerirane celuloze, promjera pora 0,2 μm (GE Healthcare, SAD).

Tijekom razvoja metode korištene su dijalizacijske vrećice sastavljene od dva tipa membrana, različitih MWCO vrijednosti:

1. membrane od regenerirane celuloze (RC), MWCO = 50 kDa (SpectrumLab, SAD);
2. membrane od celuloza-estera (CE), MWCO = 300 kDa (SpectrumLab, SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Analiza sadržaja deksametazona tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Tijekom ispitivanja topljivosti i raspodjele, sadržaj deksametazona analiziran je HPLC metodom korištenjem uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC) Agilent Technologies, 1100/1200 series s DAD detektorom uz kolonu Kinetex C18, dimenzija 4,7 × 50 mm, promjera čestica 2,6 μm i veličine pora 100 Å, proizvođača Phenomenex, SAD. Temperatura injektora podešena je na 35 °C, a kolone na 40 °C. Volumen injektiranja iznosio

je 10 μL, a protok mobilne faze 1,8 mL/min. Valna duljina detekcije bila je 241 nm, a vrijeme analize pojedinog uzorka 2,2 min. Korištena je gradijentna eluacija, opisana u Tablici 1:

Tablica 1. Program eluacije u HPLC metodi korištenoj za analizu sadržaja deksametazona tijekom ispitivanja topljivosti i raspodjele

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

Koncentrirane radne otopine (*stock* otopine) pripremljene su otapanjem 15 mg deksametazona u 25 mL tetrahidrofurana. Potom su od *stock* otopine pripravljene dvije nove otopine standarda: prva razrjeđivanjem 5 mL *stock* otopine u 25 mL acetonitrila (koncentracija deksametazona 0,12 mg/ml), a druga razrjeđivanjem 1 mL *stock* otopine u 100 mL deksametazona (do koncentracije deksametazona od 6 μg/mL). Otopina standarda veće koncentracije korištenja je za analizu topljivosti deksametazona u ricinusovom ulju sa ili bez dodatka izopropanola te raspodjele deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju s 20 % (v/v) izopropanola, a otopina manje koncentracije za analizu topljivosti deksametazona u preostala četiri biljna ulja sa ili bez dodatka izopropanola.

3.2.2. Topljivost

Uzorci za ispitivanje ravnotežne topljivosti deksametazona u ulju kikirikija, pamučnih sjemenki, kukuruza, ricinusa i sezama te kombinacijama tih ulja i izopropanola dodanog u volumnom udjelu 10 % i 20 % (v/v) pripremljeni su dodatkom količine deksametazona veće od one koja se može otopiti u 3 mL pripremljenog otapala (prezasićenjem otapala). Prezasićenje pripremljenih uzoraka kontrolirano je tijekom cijelog ispitivanja topljivosti.

Bočice s uzorcima postavljene su na zračnu tresilicu (Jobst d.o.o., Hrvatska) termostatiranu na 37 °C uz brzinu miješanja 100 rpm. Nakon 2 i 24 h, otpipetirano i centrifugirano (15 min, 10 000 rpm) je po 1 mL svakog uzorka. Potom je 200 μL supernatanta pomiješano s 600 μL tetrahidrofurana i 800 μL acetonitrila u vijalima za HPLC te je tako pripremljen analit za HPLC analizu. Sva ispitivanja provedena su u triplikatu.

Koncentracija deksametazona određena je prethodno opisanom HPLC metodom i izračunata kao umnožak razrjeđenja uzorka od 8 puta i kvocijenta površine ispod krivulje i prosječnog faktora odaziva odgovarajućih standardnih otopina.

3.2.3. Raspodjela

Slijedom rezultata ispitivanja topljivosti, pripremljena je otopina deksametazona u odabranom uljnom nosaču koncentracije bliske maksimalnoj (2 mg/mL). 6 mg deksametazona otopljeno je u smjesi 2,4 mL ricinusovog ulja i 0,6 mL izopropanola (uljna faza). Uljnoj fazi potom je dodano 3 mL fosfatnog pufera pH 7,4 (vodena faza) te su promiješani i stavljeni na zračni mješač termostatiran na 37 °C uz brzinu miješanja 100 rpm. Nakon 2 i 24 h, pažljivo je otpipetirano po 1 mL uljne i vodene faze te je svaki uzorak centrifugiran (15 min, 10 000 rpm). Po 200 μL supernatanata pomiješano je s 600 μL tetrahidrofurana i 800 μL acetonitrila u vijalima za HPLC te su uzorci tako pripremljeni za HPLC analizu. Ispitivanja su provedena u triplikatu.

Koncentracija deksametazona određena je prethodno opisanom HPLC metodom i izračunata kao umnožak razrjeđenja uzorka od 8 puta i kvocijenta površine ispod krivulje i prosječnog faktora odaziva standardne otopine veće koncentracije (približne koncentraciji zasićene otopine deksametazona u odabranom uljnom nosaču).

3.2.4. Analiza oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije

Za ispitivanje oslobađanja iz modelne formulacije korištena je aparatura s lopaticom (USP II) model 708-DS Dissolution Apparatus (Agilent Technologies, Njemačka) sa 6 posuda od 1000 mL. Posude su napunjene s 500 mL receptorskog medija pripremljenog degaziranjem, što je volumen receptorskog medija pri kojem su zadovoljeni uvjeti osigurane topljivosti.

Degaziranje receptorskog medija provedeno je prema proceduri preporučenoj u Američkoj farmakopeji (USP 40-NF 35, 2015): receptorski medij je zagrijan uz lagano miješanje do temperature 41 °C i odmah nakon toga filtriran pod vakuumom korištenjem inertnog filtra (RC), poroznosti 0,2 μm (USP zahtjeva poroznost od 0,45 μm ili manju) uz intenzivno miješanje (Slika 7). Miješanje medija tijekom zagrijavanja i filtriranja izvedeno je uz pomoć

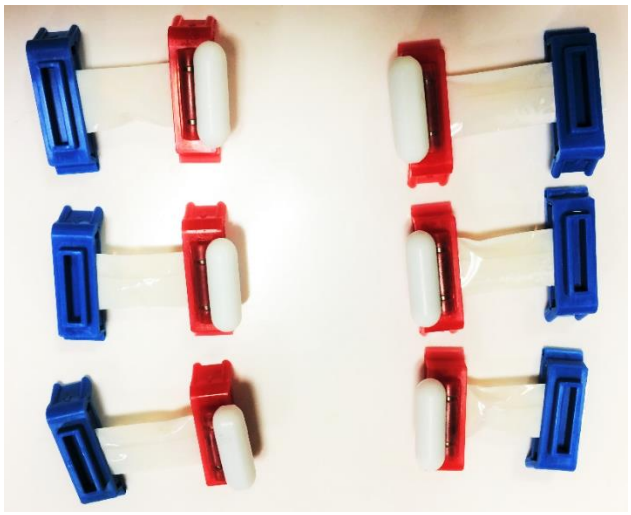
magnetske miješalice. Nakon što je sav medij profiltriran, njegovo miješanje nastavljeno je još desetak minuta.



Slika 7. Degaziranje receptorskog medija (autorska fotografija)

Modelna formulacija (otopina deksametazona u ricinusovom ulju s 20 % (v/v) izopropanola) pripremljena je u koncentraciji 2 mg/mL. Odgovarajući volumen formulacije napunjen je u dijalizacijske vrećice pripravljene zatvaranjem dijalizacijskih membrana plastičnim stezaljkama. Dijalizacijske membrane prethodno su kondicionirane u receptorskom mediju barem 30 minuta.

Kako ovako pripremljene dijalizacijske vrećice ne bi plutale na površini receptorskog medija zbog manje gustoće uljne formulacije, jedna od dviju korištenih stezaljki imala je ugrađeni magnet, te je na nju dodatno pričvršćen još jedan magnet (Slika 8).



Slika 8. Dijalizacijske vrećice (CE) s formulacijom i magnetima (autorska fotografija)

U posude s receptorskim medijem tijekom cijelog ispitivanja uronjene su probe optičkih vlakana spojene *on-line* sa spektrofotometrom Cary 60 (Agilent Technologies, Njemačka) kojime je vršena analiza količine oslobođenog deksametazona (Slika 9, optička vlakna nalaze se u crnim kabelima).



Slika 9. Aparatura za ispitivanje oslobađanja (autorska fotografija)

Kako spektri dobiveni spektrofotometrijom potpomognutom optičkim vlaknima imaju visoke vrijednosti apsorbancije bazne linije, ona se mora odrediti prije svakog ispitivanja, odnosno optička vlakna se moraju kalibrirati. Neposredno prije pokretanja svakog pokusa oslobađanja iz modelne formulacije, snimljeni su spektri samog receptorskog medija te pripremljene standardne otopine, čime su optička vlakna kalibrirana i spremna za rad. Standardna otopina pripremljena je otapanjem 10 mg deksametazona u 25 mL tetrahidrofurana te razrjeđivanjem tako dobivene *stock* otopine receptorskim medijem do volumena od 100 mL. Koncentracija standardne otopine bila je 0,004 mg/mL, jednaka maksimalnoj koncentraciji koja se može očekivati kod 100 %-tnog oslobađanja deksametazona iz 1 mL formulacije u 500 mL medija.

Nakon opisane pripreme aparature, receptorskog medija i uzoraka, dijalizacijske membrane s formulacijom oprezno su ubačene u receptorski medij što dalje od probe optičkih vlakana i temperaturne probe, kako bi se minimizirao rizik njihovog zapinjanja za probe i remećenja hidrodinamike sustava.

U vremenskim točkama od 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 300, 360, 720 i 1440 min, spektrofotometrom je automatski, bez uzrokovanja medija, izmjerena apsorbancija i udio oslobođenog deksametazona iz otopine. Sva mjerenja su izvedena u triplikatu.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Kako bi se analizirala osjetljivost metode, profili oslobađanja uspoređeni su računanjem 95 %-tnog intervala pouzdanosti faktora sličnosti f_2. Taj parametar u usporedbi dva profila oslobađanja već dva desetljeća koriste Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, Food and Drug Administration) i Europska agencija za lijekove (EMA, European Medicines Agency) (Costa i Sousa Lobo, 2001).

Faktor sličnosti f_2 računa se prema formuli:

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

u kojoj R_i i T_i označavaju redom udjele oslobođene djelatne tvari u određenoj vremenskoj točki (i) iz referentne i ispitivane formulacije, a n broj točaka iz profila oslobađanja uzetih u račun.

FDA propisuje nekoliko zahtjeva koji moraju biti zadovoljeni kako bi f_2 bio dovoljan u procjeni sličnosti dva profila oslobađanja:

1. u računu treba koristiti podatke iz najmanje 3 do 4 vremenske točke,
2. relativna standardna devijacija (RSD) udjela oslobođene djelatne tvari u ranijim vremenskim točkama (npr. do 15 min) ne smije biti veća od 20 %,
3. za ostale vremenske točke, RSD ne smije biti veći od 10%,
4. u računu treba koristiti rezultate 12 ispitivanja za referentnu i ispitivanu formulaciju,
5. smije se koristiti samo jedan rezultat u kojemu je oslobođeno 85 % ili više API iz formulacije.

Za situacije u kojima nabrojeni zahtjevi nisu zadovoljeni, razvijeno je nekoliko osjetljivijih pristupa, od kojih se najčešće koristi tzv. *Bootstrap* metoda, kojom se pomoću računalnih softvera računa f_2 vrijednost te njegov interval pouzdanosti. U tim slučajevima, FDA smatra dva profila oslobađanja sličnima kada su i f_2 i niža vrijednost intervala pouzdanosti f_2 jednaki 50 ili veći (Stevens i sur., 2015).

Međutim, regulatorne agencije su korištenje faktora sličnosti f_2 propisale samo za usporedbe profila oslobađanja iz onih formulacija za koje postoje standardizirane metode ispitivanja oslobađanja *in vitro*: krute oblike namijenjene oralnoj primjeni i transdermalne flastere, i to pri jednakim uvjetima oslobađanja (Stevens i sur., 2015). Stoga se u ovom radu *Bootstrap* metodom izračunati 95 %-tni intervali pouzdanosti faktora sličnosti f_2 ne smatraju regulatorno relevantnima, već su, u nedostatku boljih statističkih metoda za usporedbu profila oslobađanja iz parenteralnih oblika, korišteni kako bi se (osim deliberativno) i statistički procijenila osjetljivost razvijene metode s obzirom na ispitivane uvjete.

95 %-tni intervali pouzdanosti f_2 izračunati su pomoću besplatnog DDSolver dodatka za Microsoft Excel, razvijenog na China Pharmaceutical University (Zhang i sur., 2010). DDSolver se pokazao izuzetno brzim i jednostavnim alatom za usporedbu profila oslobađanja, uz malu vjerojatnost pogrešaka (Zuo i sur., 2014). Profili su analizirani opcijom „Bootstrap f_2 method“ te su odabrani podaci iz po 8 vremenskih točaka iz svakog profila oslobađanja: 30, 60, 120, 180, 300, 360, 720 i 1440 min, a broj uzoraka za *Bootstrap* metodu bio je postavljen na 5000.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Topljivost

Ravnotežna topljivost deksametazona ispitana je u pet biljnih ulja: ulju pamučnih sjemenki, ulju kukuruza, sojinom, ricinusovom i sezamovom ulju. Potom je ispitana i ravnotežna topljivost deksametazona u smjesi biljnih ulja i suotapala izopropanola dodanog u volumnim udjelima (v/v) od 10 % i 20 %.

Rezultati ispitivanja topljivosti sažeti su u Tablici 2 te prikazani na Slici 10. Valja primijetiti kako se topljivost u otapalima nakon 24 sata u odnosu na 2 sata od početka miješanja uzoraka nije povećala. To upućuje na brzo uspostavljanje dinamičke ravnoteže i postizanje zasićenosti otopine te da se maksimalno otapanje deksametazona postiže vrlo brzo nakon miješanja s otapalima.

Sukladno očekivanjima s obzirom na kemijski sastav pojedinih biljnih ulja, topljivost deksametazona u ricinusovom ulju bila je bitno veća nego u ostalim ispitanim biljnim uljima, zahvaljujući velikom udjelu ostataka ricinolne kiseline među trigliceridima u ricinusovom ulju. I deksametazon i ricinolna kiselina sadrže hidroksilne skupine, što ih čini dobrim donorima i akceptorima vodikovih veza, pa se povećana topljivost deksametazona u ricinusovom u odnosu na ostala ulja može objasniti spomenutim vodikovim vezama između deksametazona i triglicerida ricinusovog ulja.

Izopropanol se pokazao kao uspješno suotapalo za deksametazon u biljnim uljima, te je topljivost deksametazona u svim ispitivanim uljima značajno povećana dodatkom iPrOH u volumnom udjelu od 10 %, a još i više kad je dodan u volumnom udjelu 20 %.

Temeljem izvedenih pokusa, zaključeno je da je najveća topljivost deksametazona u smjesi ricinusovog ulja i 20 % (v/v) ricinusovog ulja, te da iznosi 2,25 mg/ml.

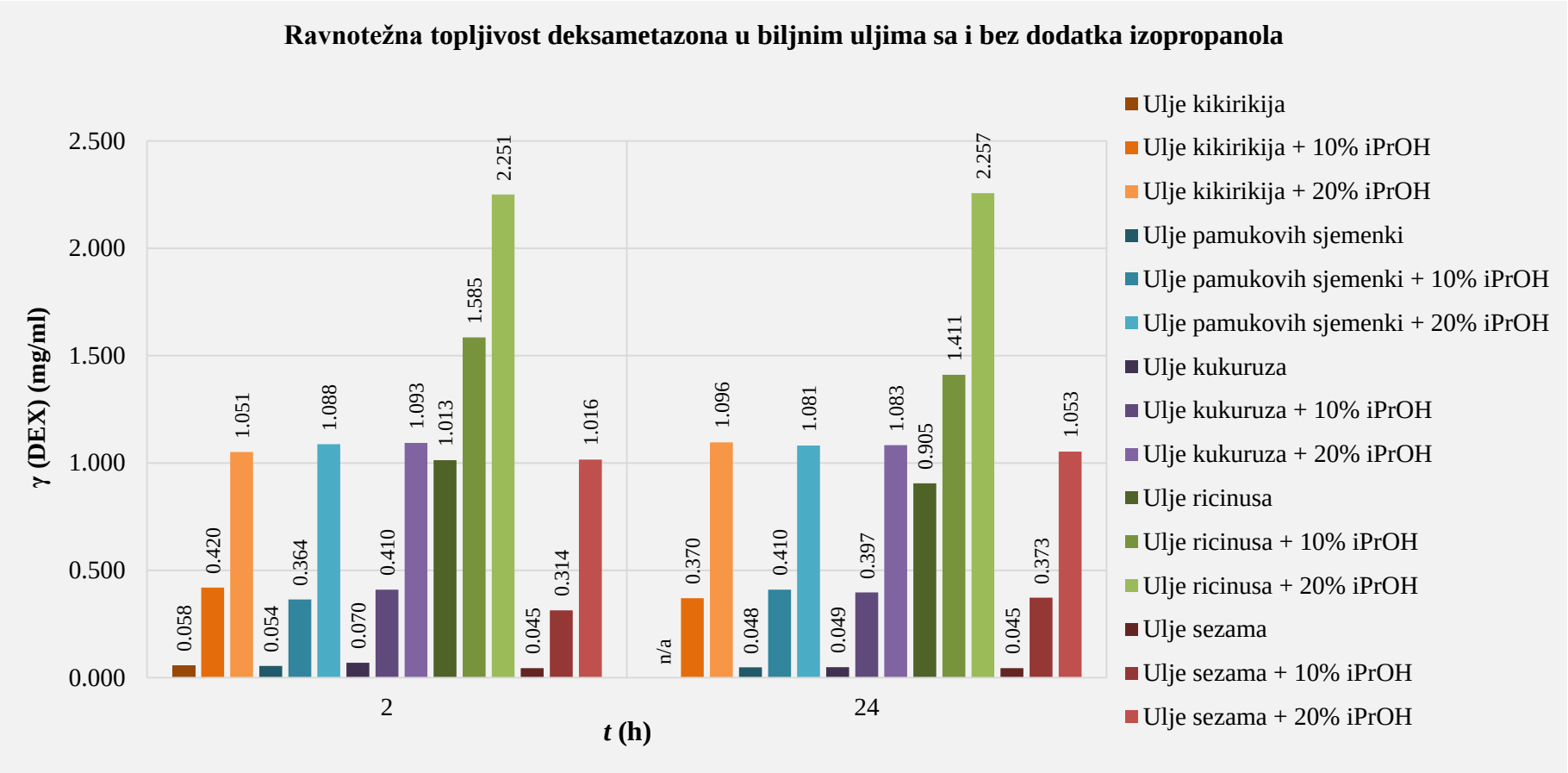
Tablica 2. Rezultati ispitivanja topljivosti deksametazona u biljnim uljima sa i bez dodatka izopropanola

	***γ* (DEX) (mg/mL) ***							
	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost
otapalo **	***t* = 2 h**				***t* = 24 h**			
A	0,072	0,048	0,052	**0,058**	n/a***	n/a	n/a	**n/a**
A + 10 % iPrOH	0,364	0,440	0,456	**0,420**	0,382	0,367	0,361	**0,370**
A + 20 % iPrOH	1,111	1,077	0,968	**1,051**	1,199	1,117	0,972	**1,096**
B	0,055	0,055	0,053	**0,054**	0,049	0,048	0,047	**0,048**
B + 10 % iPrOH	0,453	0,432	0,209	**0,364**	0,417	0,387	0,426	**0,410**
B + 20 % iPrOH	1,193	1,049	1,022	**1,088**	1,102	1,089	1,052	**1,081**
C	0,069	0,069	0,070	**0,070**	0,048	0,049	0,049	**0,049**
C + 10 % iPrOH	0,436	0,406	0,389	**0,410**	0,429	0,387	0,376	**0,397**
C + 20 % iPrOH	1,197	1,099	0,987	**1,093**	1,179	1,099	0,970	**1,083**
D	1,161	1,002	0,876	**1,013**	0,948	0,977	0,790	**0,905**
D + 10 % iPrOH	1,686	1,760	1,309	**1,585**	1,502	1,357	1,373	**1,411**
D + 20 % iPrOH	2,174	2,334	2,250	**2,251**	2,182	2,326	2,262	**2,257**
E	0,035	0,047	0,051	**0,045**	0,044	0,045	0,045	**0,045**
E + 10 % iPrOH	0,333	0,315	0,292	**0,314**	0,362	0,359	0,398	**0,373**
E + 20 % iPrOH	1,171	1,030	0,848	**1,016**	1,167	1,100	0,891	**1,053**

* Izmjerena masena koncentracija deksametazona.

** A = ulje kikirikija, B = ulje pamukovih sjemenki, C = ulje kukuruza, D = ulje ricinusa, E = ulje sezama, 10 % iPrOH i 20% iPrOH = volumni udjeli izopropanola u formulaciji.

*** n/a = nije izmjereno.



Slika 10. Grafički prikaz rezultata ispitivanja topljivosti deksametazona u biljnim uljima bez i sa dodatkom izopropanola u volumnim udjelima 10 % i 20 %.

4.2. Raspodjela

Kako je raspodjela djelatne tvari između uljne i vodene faze često korak koji ograničava brzinu oslobađanja API-ja iz uljnih otopina, nužno je izmjeriti prividni particijski koeficijent (P_{app}) za odabranu modelnu formulaciju.

Rezultati ispitivanja raspodjele deksametazona između smjese ricinusovog ulja i izopropanola u volumnom udjelu 20 % te fosfatnog pufera pH 7,4 prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Omjeri koncentracija deksametazona u uljnoj i vodenoj fazi izmjereni nakon 2 h i 24 h miješanja otopine deksametazona u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanolu s fosfatnim puferom pH 7,4

	$\frac{\gamma_U\,(DEX)}{\gamma_V\,(DEX)}$ *					
***t* (h)**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	**srednja vrijednost**	standardna devijacija	**RSD (%)**
2	19,149	23,314	20,940	**21,134**	2,089	**9,885**
24	10,821	10,561	10,754	**10,712**	0,135	**1,263**

*Omjer masenih koncentracija (mg/mL) deksametazona u uljnoj i vodenoj fazi.

Među rezultatima prikazanima u Tablici 3 zanimljivo je primijetiti kako je varijabilnost rezultata među uzorcima u triplikatu nakon 2 h relativno velika, a nakon 24 h vrlo mala. Ta činjenica upućuje na to da se nakon 2 h još nije postigla dinamička ravnoteža raspodjele deksametazona između uljne i vodene faze, a nakon 24 h jest. Zbog toga su za izračun prividnog particijskog koeficijenta korišteni omjeri koncentracija deksametazona u uljnoj i vodenoj fazi nakon 24 h.

Zahvaljujući dobroj topljivosti izopropanola u vodi, tijekom ispitivanja je zbog otapanja izopropanola u vodi uočeno povećanje volumena vodene u odnosu na uljnu fazu, te omjer volumena uljne i vodene faze na kraju ispitivanja, za razliku od početka, nije iznosio 1:1. Zbog toga se prividni koeficijent raspodjele ne može računati kao omjer ravnotežnih koncentracija deksametazona u uljnoj i vodenoj fazi, već se treba korigirati s obzirom na njihove volumene.

Formula (1) uzima u obzir i korekciju P_{app} s obzirom na volumene uljne i vodene faze, te je stoga korištena u računanju P_{app}. Volumeni vodene i uljne faze nisu se mogli precizno odrediti

na kraju ispitivanja zbog nemogućnosti savršenog odjeljivanja vodene faze od uljne bez miješanja, pa su procijenjeni korištenjem graduirane pipete. Za sve uzroke u triplikatu, volumen vodene faze nakon 24 h miješanja bio je 2,5 mL, a uljne 1,5 mL.

Koristeći navedene eksperimentalno dobivene podatke, izračunata je vrijednost prividnog particijskog koeficijenta (P_{app}) deksametazona od 17,85 (log P_{app} = 1,25). Za modelnu uljnu formulaciju, zahvaljujući određenoj vrijednosti prividnog particijskog koeficijenta, može se očekivati produljeno oslobađanje API-ja kontrolirano raspodjelom deksametazona iz uljne u vodenu fazu.

Ovaj rezultat usporediv je s vrijednostima P_{app} dostupnima u znanstvenoj literaturi i za druge API-je u uljnim otopinama s produljenim oslobađanjem, no te vrijednosti mogu doseći i nekoliko stotina. Relativno nizak P_{app} razuman je rezultat kad je riječ o deksametazonu, koji nije vrlo lipofilna molekula i sadrži tri polarne hidroksilne i dvije karbonilne skupine. Za usporedbu, testosteron, još jedna steroidna molekula, pokazuje P_{app} vrijednost od 199 za raspodjelu između otopine u frakcioniranom ulju kokosa i fosfatnog pufera pH 7,4. Testosteron u strukturi sadrži samo jednu hidroksilnu i jednu karbonilnu skupinu, zbog čega ima bitno manji potencijal stvaranja vodikovih veza od deksametazona, a time i manju topljivost u vodi i relativno manju tendenciju raspodijeli u vodenu fazu (Larsen, 2002).

4.3. Odabir modelne formulacije

Temeljem ispitivanja topljivosti i raspodjele deksametazona, kao modelna formulacija odabrana je otopina deksametazona u ricinusovom ulju s 20 % (v/v) izopropanola u ulozi suotapala.

Topljivost deksametazona u tom sustavu iznosi 2,25 mg/mL te je najveća među određenima i najbliža koncentracijama vodenih otopina soli deksametazona (natrijevog deksametazon-fosfata) koje su dostupne na tržištu (www.halmed.hr). Zahvaljujući vrijednosti prividnog particijskog koeficijenta od 17,85, očekuje se da će deksametazon doista imati produljeno oslobađanje iz ove formulacije.

Nadalje, ogranoleptički je uočeno da je otopina deksametazona u ricinusovom ulju s izopropanolom kao suotapalom u volumnom udjelu 20 % značajno manje viskoznosti od otopine deksametazona u čistom ricinusovom ulju ili s dvostruko manjim udjelom

izopropanola i usporediva s viskoznostima ostalih ispitanih biljnih ulja. Zbog toga odabrana formulacija među svim ispitanim otopinama ima najbolji odnos topljivosti, particijskog koeficijenta API-ja i viskoznosti (injektibilnosti).

4.4. Razvoj metode za ispitivanje oslobađanja *in vitro*

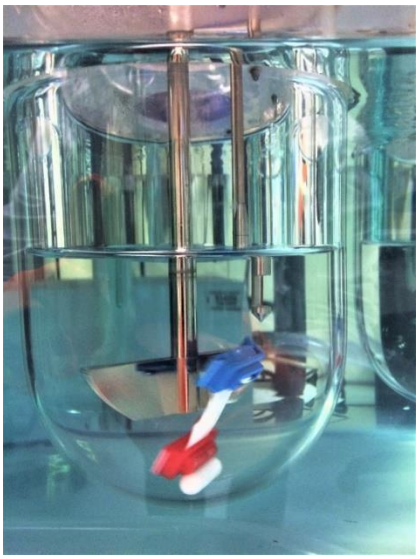
4.4.1. Odabir i modifikacija aparature i medija za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju s 20 % (v/v) izopropanola

Kao aparatura za oslobađanje odabrana je standardizirana i komercijalno široko dostupna aparatura s lopaticama (USP II) te modificirana kako bi bila prikladna za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz uljnih otopina.

Fosfatni pufer pH vrijednosti 7,4 odabran je kao medij za oslobađanje. Taj se medij rutinski koristi u ispitivanju oslobađanja *in vitro* zbog pH koji odgovara fiziološkim vrijednostima. Kako topljivost deksametazona u fosfatnom puferu pH 7,4 iznosi 0,084 mg/mL (Šutić, 2016), korišten je volumen medija od 500 mL. Taj volumen medija zadovoljava uvjete osigurane topljivosti za formulaciju koncentracije 2 mg/mL tijekom eksperimenata (minimalni volumen medija da se to zadovolji trebao bi biti 71,4 mL). Navedena koncentracija deksametazona u formulaciji odabrana je temeljem izmjerene topljivosti deksametazona u formulaciji od 2,25 mg/mL.

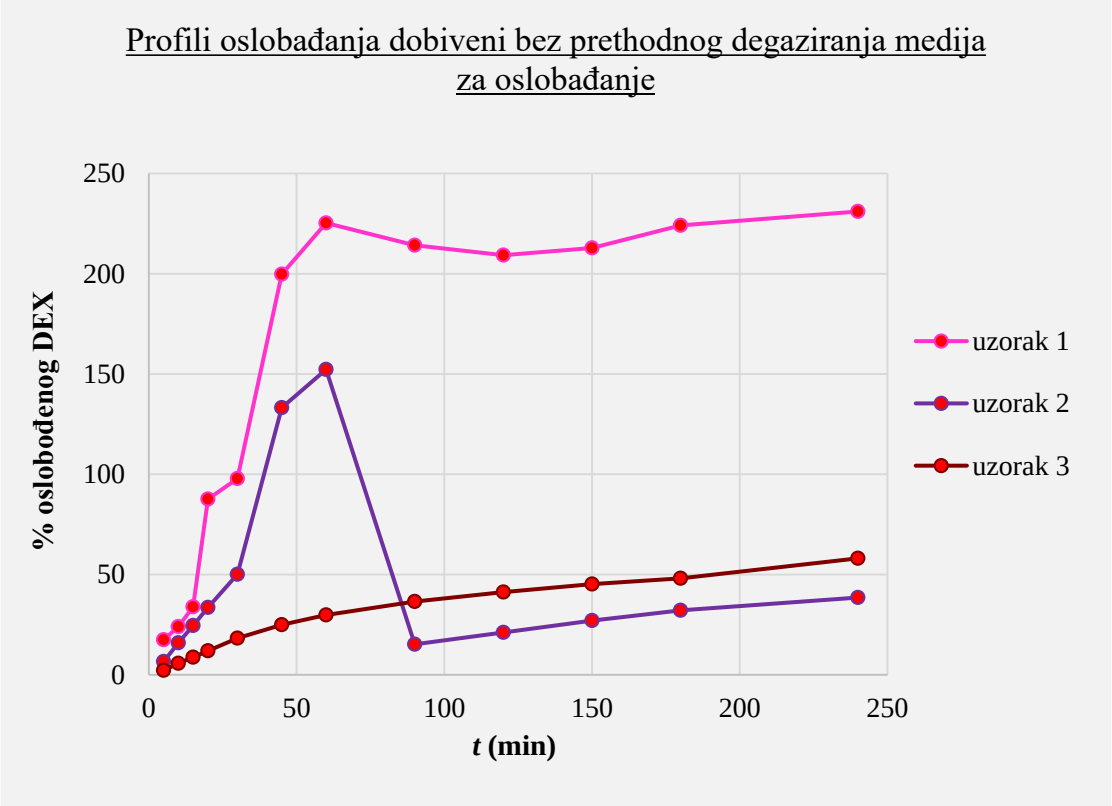
Kako bi se u metodi što bolje oponašali *in vivo* uvjeti relevantni za primjenu uljnih otopina, formulacije su aplicirane u dijalizacijske vrećice od polupropusnih membrana celuloza-estera (CE) i regenerirane celuloze (RC). Formulacija u dijalizacijskim vrećicama oponaša depo uljne otopine koji nastane nakon injektiranja zahvaljujući viskoznosti otopine, te dugo vremena ostaje kompaktan i sporo se raspršuje.

Samo provođenje pokusa s dijalizacijskim membranama ne rješava u potpunosti problem kontroliranja hidrodinamike sustava, jer uljna formulacija, zbog gustoće manje od vodenog medija, pluta na vodi. Zbog toga su membrane zatvorene jednom stezaljkom u koju je ugrađen magnet, te je na nju dodatno pričvršćen još jedan magnet (Slika 11). Time je spriječeno plutanje vrećica na površini medija, a istovremeno i njihovo prianjanje za stjenke posude, jer uz ovakvu aparaturu vrećice tijekom cijelog ispitivanja jednolično rotiraju oko osi lopatice.



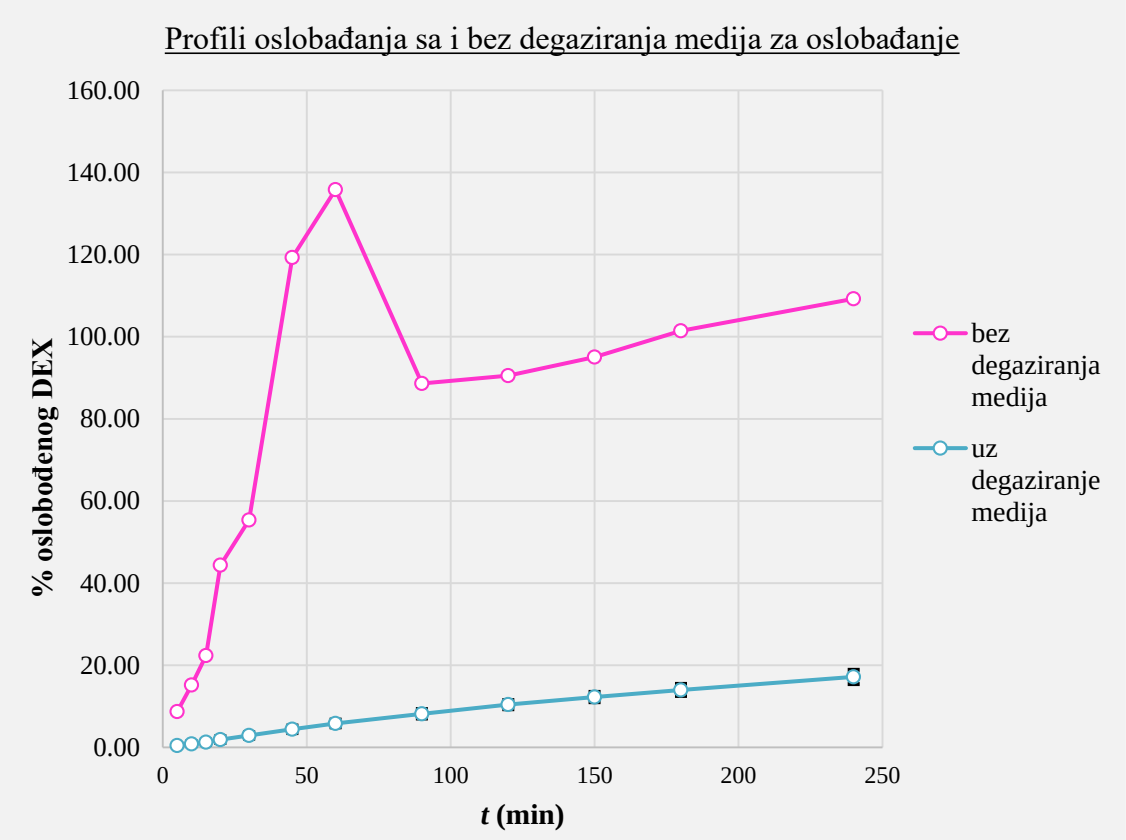
Slika 11. Dijalizacijska vrećica s magnetom i proba spektrofotometra s optičkim vlaknima u upotrebi (autorska fotografija)

Inicijalni pokusi u razvoju metode bili su neuspješni i rezultirali su nerealnim profilima oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije (Slika 12).



Slika 12. Profili oslobađanja deksametazona bez prethodnog degaziranja medija za oslobađanje. Uvjeti ispitivanja: CE membrane, 37 °C, 50 rpm, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4.

Tijekom ponovljenog pokusa, primijećeno je da se u probi nakupljaju mjehurići zraka, zbog čega se mjere pogrešne, ponekad i abnormalne apsorbancije. Zbog toga je medij za oslobađanje pripremljen uz prethodno degaziranje prema proceduri preporučenoj u Američkoj farmakopeji (USP 40-NF 35, 2015). Degaziranjem je navedeni problem potpuno riješen, te su na Slici 13 prikazani profili oslobađanja dobiveni sa i bez pripreme medija za oslobađanje degaziranjem.



Slika 13. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije sa i bez prethodnog degaziranja medija za oslobađanje. Uvjeti ispitivanja: CE membrane, 37 °C, 50 rpm, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4. Za profil dobiven bez degaziranja medija na grafu nisu naznačene standardne devijacije udjela oslobođenog deksametazona (u rasponu od 7,82 do 109,2).

4.4.2. Utjecaj vrste dijalizacijske membrane na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola

Temeljem razlike u veličini pora korištenih dijalizacijskih membrana, može se očekivati različit profil oslobađanja deksametazona iz dijalizacijskih vrećica građenih od različitih vrsta membrana. Kako CE membrane imaju veće pore od RC membrana, zbog veće izravne dodirne površine uljnog i vodenog medija, kao i manje vjerojatnosti nastanka fizičkih zapreka u porama dijalizacijske membrane, koje bi mogle spriječiti slobodnu difuziju deksametazona niz koncentracijski gradijent, predviđa se brže oslobađanje deksametazona iz CE dijalizacijskih vrećica u odnosu na RC. Međutim, eksperimentalno dobiveni profili oslobađanja korištenjem CE i RC membrana, uz identične ostale uvjete ispitivanja, slični su (Tablice 4 i 5 te Slika 14).

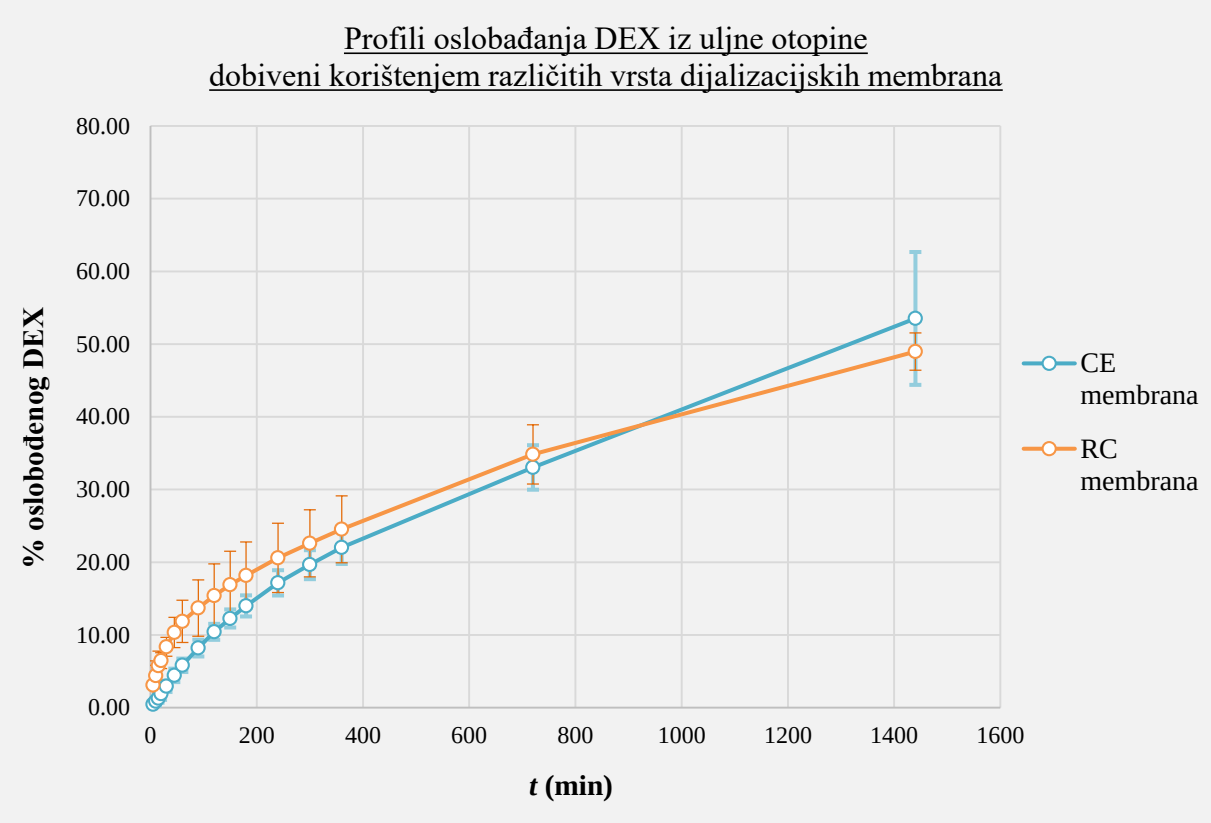
Tablica 4. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 37 °C i 50 rpm

	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0,40	0,00	1,00	**0,47**	0,50
10	0,80	0,30	1,50	**0,87**	0,60
15	1,10	0,80	2,00	**1,30**	0,62
20	1,70	1,20	2,80	**1,90**	0,82
30	2,70	2,30	3,80	**2,93**	0,78
45	3,90	3,90	5,50	**4,43**	0,92
60	5,20	5,40	6,90	**5,83**	0,93
90	7,30	7,80	9,50	**8,20**	1,15
120	9,40	10,30	11,60	**10,43**	1,11
150	11,00	12,30	13,50	**12,27**	1,25
180	12,50	14,10	15,40	**14,00**	1,45
240	15,20	17,80	18,50	**17,17**	1,74
300	17,40	20,50	21,10	**19,67**	1,99
360	19,40	23,30	23,40	**22,03**	2,28
720	29,50	35,00	34,60	**33,03**	3,07
1440	47,39	64,04	49,16	**53,53**	9,14

Tablica 5. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 50 rpm

	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	5,00	4,30	0,00	**3,10**	2,71
10	6,20	4,80	2,20	**4,40**	2,03
15	7,90	5,50	3,90	**5,77**	2,01
20	7,70	6,10	5,60	**6,47**	1,10
30	9,60	7,00	8,50	**8,37**	1,31
45	11,00	8,00	12,00	**10,33**	2,08
60	11,80	9,00	14,80	**11,87**	2,90
90	12,60	10,50	18,00	**13,70**	3,87
120	14,00	11,90	20,30	**15,40**	4,37
150	15,30	13,30	22,10	**16,90**	4,61
180	16,50	14,60	23,40	**18,17**	4,63
240	18,80	17,00	26,00	**20,60**	4,76
300	21,00	19,00	27,80	**22,60**	4,61
360	23,00	20,90	29,70	**24,53**	4,60
720	33,50	31,60	39,40	**34,83**	4,07
1440	47,64	47,37	51,94	**48,98**	2,56

Usporedbom profila oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije pri 37 °C uz brzinu miješanja medija 50 rpm koristeći *Bootstrap* metodu računanja faktora sličnosti f_2, izračunat je f_2 vrijednosti 67,839, a 5 %-tni percentil (manja vrijednost 95 %-tnog intervala f_2 pouzdanosti) iznosi 57,603. Kako su oba navedena parametra veći od 50, dobiveni profili oslobađanja korištenjem CE i RC membrana mogu se smatrati sličnima. Ova činjenica upućuje na to da difuzija deksametazona kroz same pore dijalizacijskih vrećica nije korak koji ograničava brzinu oslobađanja deksametazona iz formulacija.



Slika 14. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o tipu korištene dijalizacijske membrane. Ostali uvjeti ispitivanja: 50 rpm, 37 °C, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4.

U prvim satima ispitivanja, deksametazon se oslobađa brže nego u kasnijim vremenskim točkama, a nakon otprilike 5 sati oslobađanja, dolazi do uravnoteženja sustava i ovisnost oslobođenog udjela deksametazona o vremenu postaje gotovo linearna. Ove dvije faze u profilu oslobađanja deksametazona iz formulacije posljedica su fizikalno-kemijskih svojstava suotapala izopropanola, koji je dobro topljiv u uljnoj formulaciji, a još bolje u receptorskom (vodenom) mediju. Zbog toga se i izopropanol oslobađa iz formulacije u receptorski medij, a njegov profil oslobađanja zasigurno je različit u odnosu na profil oslobađanja deksametazona zbog velikih razlika u njihovim strukturama i fizikalno-kemijskim svojstvima.

Kako je topljivost izopropanola u vodenom mediju znatno veća od topljivosti deksametazona, može se pretpostaviti da je oslobađanje izopropanola u početnim trenutcima brže u odnosu na deksametazon te da se sav ili većina izopropanola oslobodi iz formulacije u prvim satima ispitivanja. Nadalje, kako su profili oslobađanja izopropanola i deksametazona različiti, može se zaključiti i da se particijski koeficijent deksametazona između uljne i vodene faze s vremenom mijenja.

Kad se brzina oslobađanja izopropanola ustali ili se gotovo sav izopropanol oslobodi iz formulacije, topljivost i particijski koeficijent deksametazona u uljnoj i vodenoj fazi postaju stalni. Slijedom toga, i brzina oslobađanja deksametazona postaje konstantna, a opaženi profil oslobađanja linearan. Linearni profil oslobađanja u drugoj fazi oslobađanja održava se i konstantnim koncentracijskim gradijentom koji je osiguran prikladnom brzinom miješanja medija, kao i samim dizajnom metode na način da su pouzdano zadovoljeni uvjeti osigurane topljivosti.

Linearnost profila oslobađanja karakteristika je kinetike nultog reda. Ona se može očekivati, općenito, kod formulacija kod kojih ne dolazi do raspadanja formulacije, te se oslobađanje API-ja odvija sporo. Mnogi ljekoviti oblici s modificiranim oslobađanjem (poput osmotskih pumpi, transdermalnih sustava i dr.) imaju profil oslobađanja koji slijedi kinetiku nultog reda. Temeljno obilježje kinetike nultog reda je da se u svakoj jedinici vremena oslobađa jednaka količina djelatne tvari, te se smatra idealnim modelom kinetike oslobađanja kod lijekova kojima se želi postići produljeni učinak (Cascone, 2017).

Zanimljivo je da je dvofazno oslobađanje lipofilne djelatne tvari iz uljnih otopina uz prisustvo hidrofilnog suotapala uočeno i *in vivo* u ljudi na primjeru otopine nandrolon-dekanoata u sezamovom ulju i benzilnom alkoholu (Kalicharan i sur., 2016). Rezultati eksperimenata opisanih u ovom radu i dobivenih *in vitro* u skladu su s onima dobivenim *in vivo* u istraživanju Kalicharana i suradnika. Oni su pokazali kako se korišteno suotapalo (benzilni alkohol) brzo apsorbira nakon supkutane primjene uljne otopine, te kako apsorpciju suotapala prati i početna brza apsorpcija djelatne tvari. Nakon prve, brze faze apsorpcije, koncentracija djelatne tvari u krvi ispitanika opada i postaje približno konstantna.

4.4.3. Utjecaj brzine miješanja medija na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola

Brzina miješanja medija smatra se vrlo važnim parametrom IVR testova i mora se pažljivo odabrati i evaluirati. U okviru ovog istraživanja, preniska brzina miješanja medija uzrokuje povećanje debljine difuzijskog sloja, što može dovesti do smanjenja koncentracijskog gradijenta API-ja na granici ulje-voda, a time i smanjenja difuzijskog potencijala, odnosno brzine oslobađanja. S druge strane, prevelika brzina miješanja medija može dovesti do smanjenja diskriminatornosti metode. Uz korištenje aparature USP II, FDA preporuča brzinu miješanja medija od 50 do 75 rpm (Gibson i sur., ured., 2004), pa je oslobađanje deksametazona ispitano pri te dvije brzine. Rezultati pokusa u kojima je brzina miješanja medija povećana s 50 na 75 rpm su prikazani u Tablicama 6 i 7.

Tablica 6. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm

	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0,00	0,40	1,10	**0,50**	0,56
10	0,80	1,30	1,40	**1,17**	0,32
15	1,70	2,20	2,00	**1,97**	0,25
20	2,50	3,10	2,50	**2,70**	0,35
30	4,10	4,60	3,50	**4,07**	0,55
45	6,20	6,80	5,20	**6,07**	0,81
60	8,00	8,80	6,70	**7,83**	1,06
90	11,40	12,10	9,60	**11,03**	1,29
120	14,30	15,10	11,70	**13,70**	1,78
150	16,90	17,60	13,90	**16,13**	1,97
180	19,20	19,90	16,10	**18,40**	2,02
240	23,20	23,90	19,70	**22,27**	2,25
300	26,80	27,60	22,90	**25,77**	2,51
360	30,10	30,80	25,90	**28,93**	2,65
720	47,10	45,60	39,50	**44,07**	4,03
1440	73,43	76,74	59,16	**69,78**	9,34

Tablica 7. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm

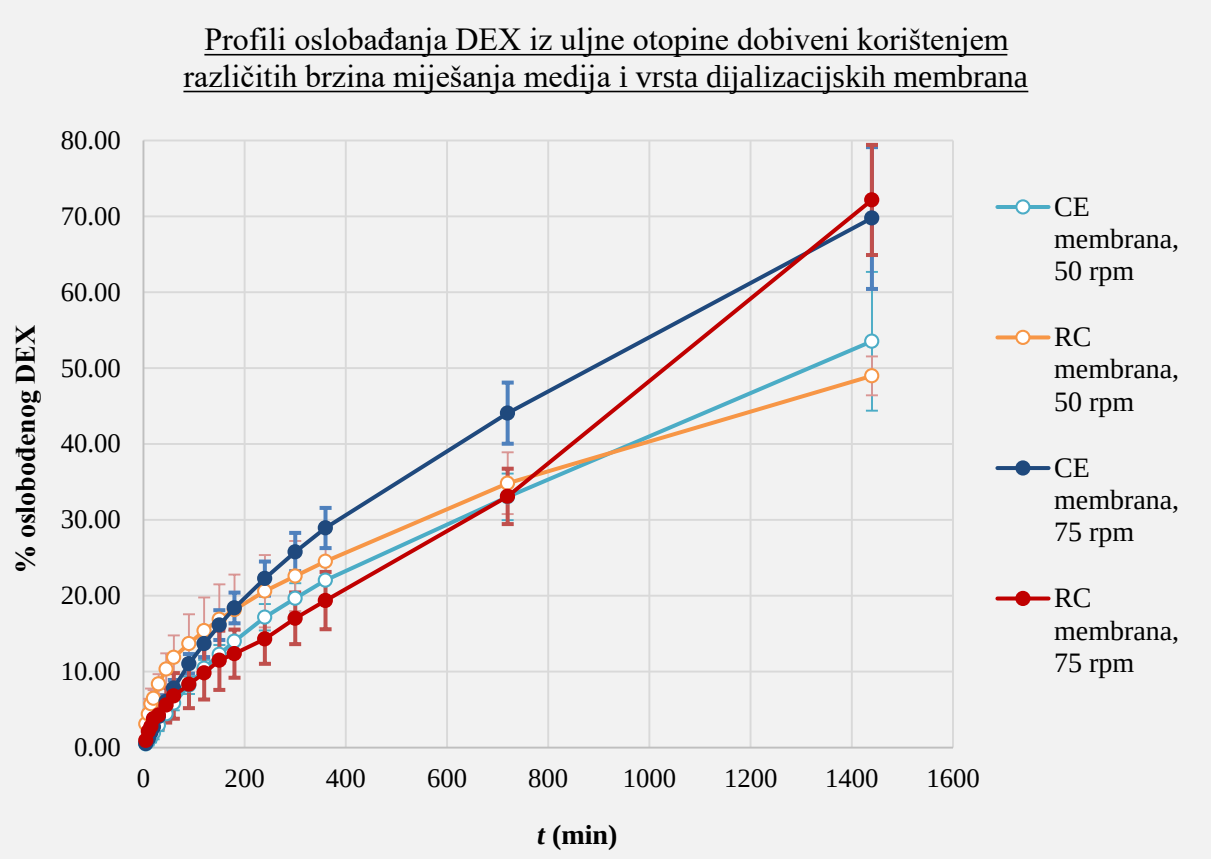
	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	1,40	1,10	0,30	**0,93**	0,57
10	3,50	2,10	0,80	**2,13**	1,35
15	4,00	3,00	1,30	**2,77**	1,37
20	5,80	3,60	2,00	**3,80**	1,91
30	5,90	4,50	2,40	**4,27**	1,76
45	7,80	5,80	3,20	**5,60**	2,31
60	9,80	6,80	3,80	**6,80**	3,00
90	11,40	8,50	5,10	**8,33**	3,15
120	13,30	9,90	6,30	**9,83**	3,50
150	15,40	11,50	7,60	**11,50**	3,90
180	15,30	12,80	9,00	**12,37**	3,17
240	17,10	15,10	10,70	**14,30**	3,27
300	19,70	18,20	13,20	**17,03**	3,40
360	22,30	20,70	15,10	**19,37**	3,78
720	35,00	35,40	28,90	**33,10**	3,64
1440	72,00	79,50	65,00	**72,17**	7,25

Može se očekivati da će se povećanjem brzine miješanja medija povećati i brzina oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije. Ta pretpostavka je ispitana i potvrđena za obje dijalizacijske membrane (slika 15): povećanjem brzine miješanja medija sa 50 na 75 rpm, pri temperaturi 37 °C, postotak oslobođenog deksametazona iz uljnih otopina tijekom 24 h ispitivanja povećan je za približno 20 %.

Nadalje, rezultati ovih pokusa potvrđuju da je razvijena metoda osjetljiva na brzinu miješanja medija. Faktor sličnosti f_2 dobiven *Bootstrap* metodom, nakon promjene brzine miješanja s 50 na 75 rpm, iznosi 54,807 u slučaju CE, a 51,246 u slučaju RC membrana. Međutim, 5 %-tni percentili f_2 manji su od 50 (46,354 uz CE, a 47,136 uz RC membrane), zbog čega se dobiveni profili oslobađanja ne smatraju sličnima.

Osjetljivost metode s obzirom na brzinu miješanja medija osobito je važna jer ukazuje na važnost miješanja medija, odnosno smanjenja difuzijskog sloja na kontaktnoj površini faza.

Također, promjene u brzini oslobađanja mogu biti indikator utjecaja agitiranosti formulacije *in vivo*, u smislu oslobađanja zbog promjene fizičke aktivnosti pacijenta, osobito kad je riječ o intramuskularno primijenjenim lijekovima.



Slika 15. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o brzini miješanja medija i tipu korištene dijalizacijske membrane. Ostali uvjeti ispitivanja: 37 °C, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4.

4.4.4. Utjecaj sastava receptorskog medija na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola

S ciljem skraćivanja trajanja analitičke metode, ispitano je oslobađanje deksametazona iz modelne formulacije u modificirani receptorski medij sastavljen od fosfatnog pufera pH 7,4 i apsolutnog etanola u volumnim omjerima 9:1, odnosno medij s 10 % volumnog udjela etanola. Kako je deksametazon bolje topljiv u etanolu nego u vodi, pretpostavka je da će njegovo oslobađanje u takav modificirani medij biti brže nego u „čisti medij“, tj. fosfatni pufer pH 7,4. U pokusima je korištena brzina miješanja medija od 75 rpm, za koju je prethodno utvrđeno da osigurava brže oslobađanje deksametazona iz formulacije (Slika 15). Rezultati ovih pokusa prikazani su u Tablicama 8 i 9, te na Slici 16.

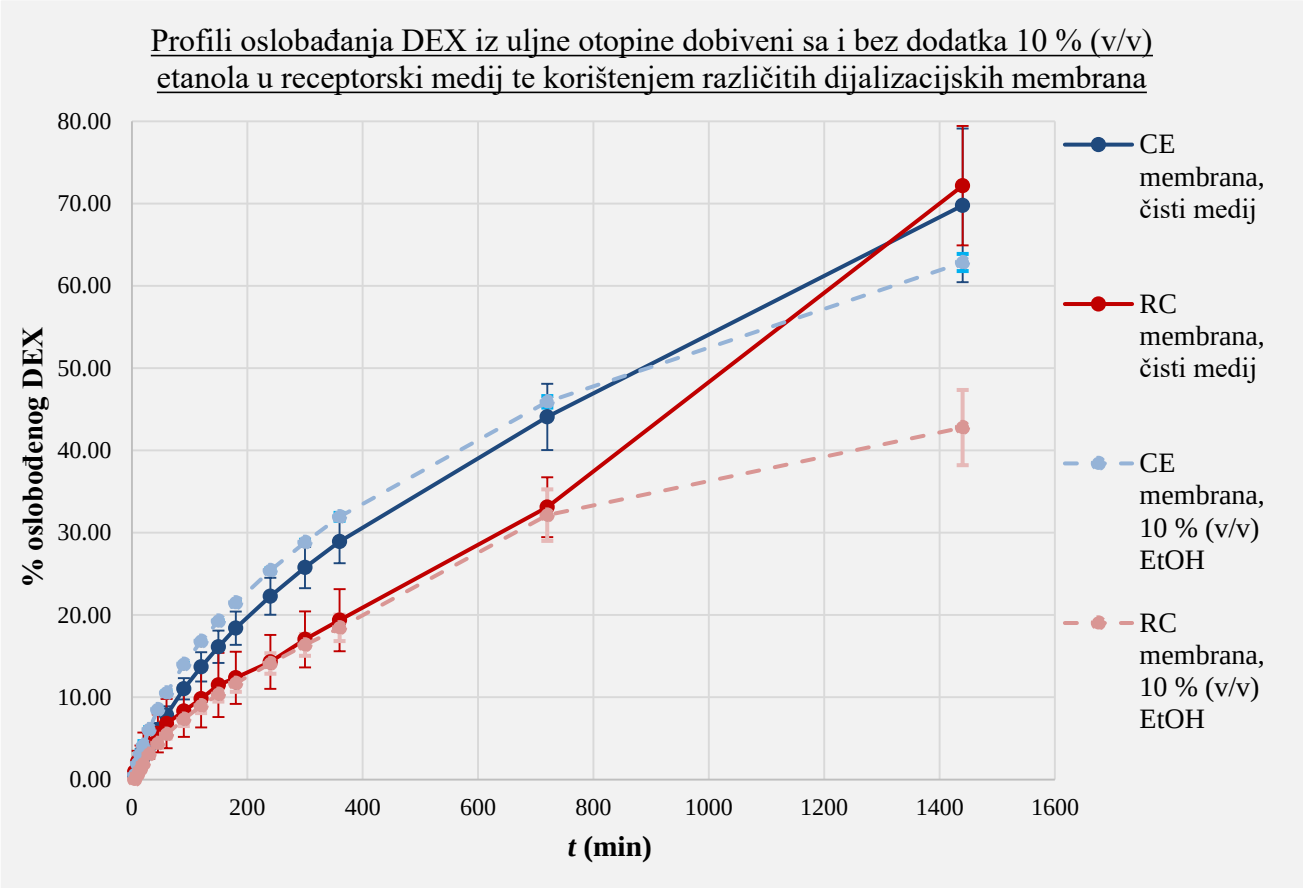
Tablica 8. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm uz dodatak 10 % (v/v) etanola u receptorski medij

	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0,10	0,60	1,10	**0,60**	0,50
10	1,50	1,90	2,50	**1,97**	0,50
15	2,70	3,10	3,60	**3,13**	0,45
20	3,70	4,10	4,70	**4,17**	0,50
30	5,80	6,00	6,40	**6,07**	0,31
45	8,30	8,50	8,70	**8,50**	0,20
60	10,30	10,60	10,70	**10,53**	0,21
90	13,80	14,10	14,10	**14,00**	0,17
120	16,70	16,90	16,80	**16,80**	0,10
150	19,20	19,40	19,20	**19,27**	0,12
180	21,50	21,60	21,30	**21,47**	0,15
240	25,50	25,60	25,10	**25,40**	0,26
300	29,10	28,90	28,50	**28,83**	0,31
360	32,30	32,10	31,40	**31,93**	0,47
720	46,20	46,40	45,10	**45,90**	0,70
1440	64,00	62,00	62,50	**62,83**	1,04

Tablica 9. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm uz dodatak 10 % (v/v) etanola u receptorski medij

	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0,00	0,00	0,00	**0,00**	0,00
10	0,70	0,70	0,50	**0,63**	0,12
15	1,40	1,30	1,10	**1,27**	0,15
20	2,00	2,10	1,70	**1,93**	0,21
30	3,00	3,50	2,70	**3,07**	0,40
45	4,30	4,90	4,00	**4,40**	0,46
60	5,20	6,10	5,20	**5,50**	0,52
90	6,90	8,30	6,80	**7,33**	0,84
120	8,50	10,00	8,40	**8,97**	0,90
150	9,80	11,40	9,90	**10,37**	0,90
180	11,00	12,90	11,20	**11,70**	1,04
240	13,10	15,50	13,70	**14,10**	1,25
300	15,20	17,80	16,10	**16,37**	1,32
360	16,90	20,10	18,30	**18,43**	1,60
720	35,60	31,30	29,50	**32,13**	3,13
1440	37,60	46,30	44,40	**42,77**	4,57

Suprotno prvotnom očekivanju, postotak oslobođenog deksametazona do 24. sata ispitivanja manji je nego onaj koji je utvrđen u pokusima bez etanola u receptorskom mediju. Jedno moguće objašnjenje leži u odličnim svojstvima etanola kao otapala. Dodatkom EtOH u receptorski medij, povećava se topljivost triglicerida s ostatcima ricinusove kiseline iz formulacije, kao i izopropanola u receptorskom mediju. Nadalje, moguće je da dodatak EtOH u receptorski medij, zbog jako dobrog miješanja s ricinusovim uljem i male veličine molekula, prolazi kroz pore dijalizacijskih membrana u formulaciju i dodatno povećava topljivost deksametazona i izopropanola u uljnoj fazi, a time uvjetuje sporije razdjeljivanje deksametazona u vodenu fazu, kao i smanjenje izmjerene brzine oslobađanja deksametazona iz formulacije.



Slika 16. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o sastavu receptorskog medija (fosfatni pufer, pH 7,4 sa ili bez dodatka etanola do volumnog udjela 10%). Čisti medij = fosfatni pufer, pH 7,4. Ostali uvjeti ispitivanja: 75 rpm, 37 °C, 1 mL formulacije.

Statistički test *Bootstrap* f_2 pokazao je kako uz korištenje CE membrana metoda nije osjetljiva na dodatak etanola u receptorski medij (f_2 = 71,714; 5 %-tni percentil = 64,626), no uz RC membrane jest. Korištenjem RC membrana dobiveni su profili koji nisu slični (f_2 = 48,978; 5 %-tni percentil = 44,114).

Topljivost deksametazona u fosfatnom puferu pH 7,4 uz 10 % volumnog udjela etanola iznosi 0,167 mg/mL, a uz 20 % (v/v) etanola 0,324 mg/mL (Šutić, 2016). Prema tome, tijekom opisanih pokusa bili su zadovoljeni uvjeti osigurane topljivosti (za to je potreban volumen od minimalno 238,1 mL prema USP, a prema preporukama Ph. Eur. 238,1 mL – 473,4 mL).

Korištenjem 20 % (v/v) etanola i 500 mL medija u pokusu bi bila zadovoljena donja granica uvjeta osigurane topljivosti prema Europskoj farmakopeji (volumen tri puta veći od volumena zasićenja, koji odgovara preporuci USP), dok gornja vrijednost preporuka Ph. Eur. (volumen deset puta veći od volumena zasićenja) ne bi bila zadovoljena (918,4 mL medija za oslobađanje) (USP 40-NF 35, 2015; Ph. Eur. 4th ed, 2008). Stoga pokusi s većim udjelima etanola u receptorskom mediju nisu provedeni.

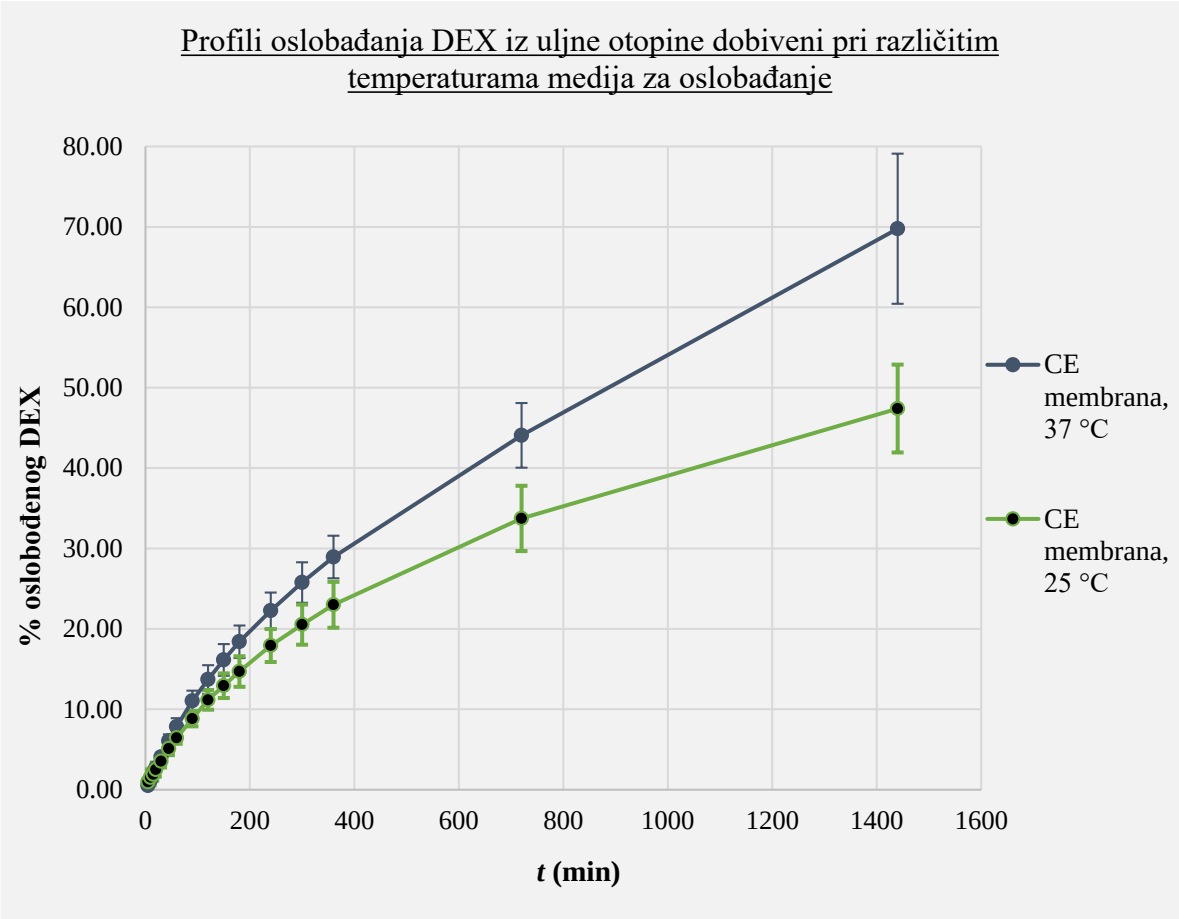
4.4.5. Utjecaj temperature na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola

Utjecaj temperature na profil oslobađanja ispitan je pokusom izvedenom pri sobnoj temperaturi, korištenjem CE membrana uz brzinu miješanja od 75 rpm. Rezultati pokusa prikazani su u Tablici 10 i grafički na Slici 17.

Provođenjem pokusa pri nižoj temperaturi očekuje se sporije oslobađanje deksametazona iz formulacije zbog manje brzine svih procesa kojima se deksametazon oslobađa iz otopine (difuzija kroz uljnu fazu, raspodjela, difuzija kroz vodenu fazu). Rezultati potvrđuju tu pretpostavku.

Tablica 10. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 25 °C i 75 rpm

	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0,40	0,00	2,50	**0,97**	1,34
10	1,00	0,90	2,70	**1,53**	1,01
15	1,40	1,50	2,80	**1,90**	0,78
20	1,90	2,10	3,50	**2,50**	0,87
30	2,90	3,30	4,40	**3,53**	0,78
45	4,30	5,10	5,90	**5,10**	0,80
60	5,60	6,80	6,90	**6,43**	0,72
90	7,80	9,70	9,00	**8,83**	0,96
120	10,10	12,50	10,90	**11,17**	1,22
150	11,60	14,60	12,60	**12,93**	1,53
180	13,10	16,80	14,20	**14,70**	1,90
240	16,70	20,30	16,80	**17,93**	2,05
300	18,80	23,40	19,40	**20,53**	2,50
360	21,20	26,30	21,50	**23,00**	2,86
720	31,80	38,40	31,00	**33,73**	4,06
1440	45,30	53,60	43,30	**47,40**	5,46



Slika 17. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o temperaturi medija za oslobađanje. Ostali uvjeti ispitivanja: CE membrana, 75 rpm, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4.

Metoda se pokazala osjetljiva s obzirom na temperaturu medija, jer profili oslobađanja dobiveni pri 37 °C i 25 °C uz nepromijenjene ostale uvjete ispitivanja nisu slični prema *Bootstrap* metodi određivanja f_2 faktora sličnosti: f_2 iznosi 51,443, a 5 %-tni percentil 44,165. Kako svi navedeni parametri nisu veći od 50, dobiveni profili oslobađanja ne mogu se smatrati sličnima.

Topljivost djelatnih tvari, a posljedično i brzina oslobađanja, u vodenim medijima znatno ovisi o temperaturi. *In vitro* pokusi se obično provode na 37 °C, što odgovara tjelesnoj temperaturi. Međutim, bitno je ispitati ponašanje pripravka i osjetljivost metode i pri drugim temperaturama, osobito sobnoj. Ovim pokusom utvrđena je značajna osjetljivost brzine oslobađanja deksametazona iz uljnog depoa na temperaturu medija, zbog čega je taj parametar važno precizno kontrolirati tijekom provođenja pokusa.

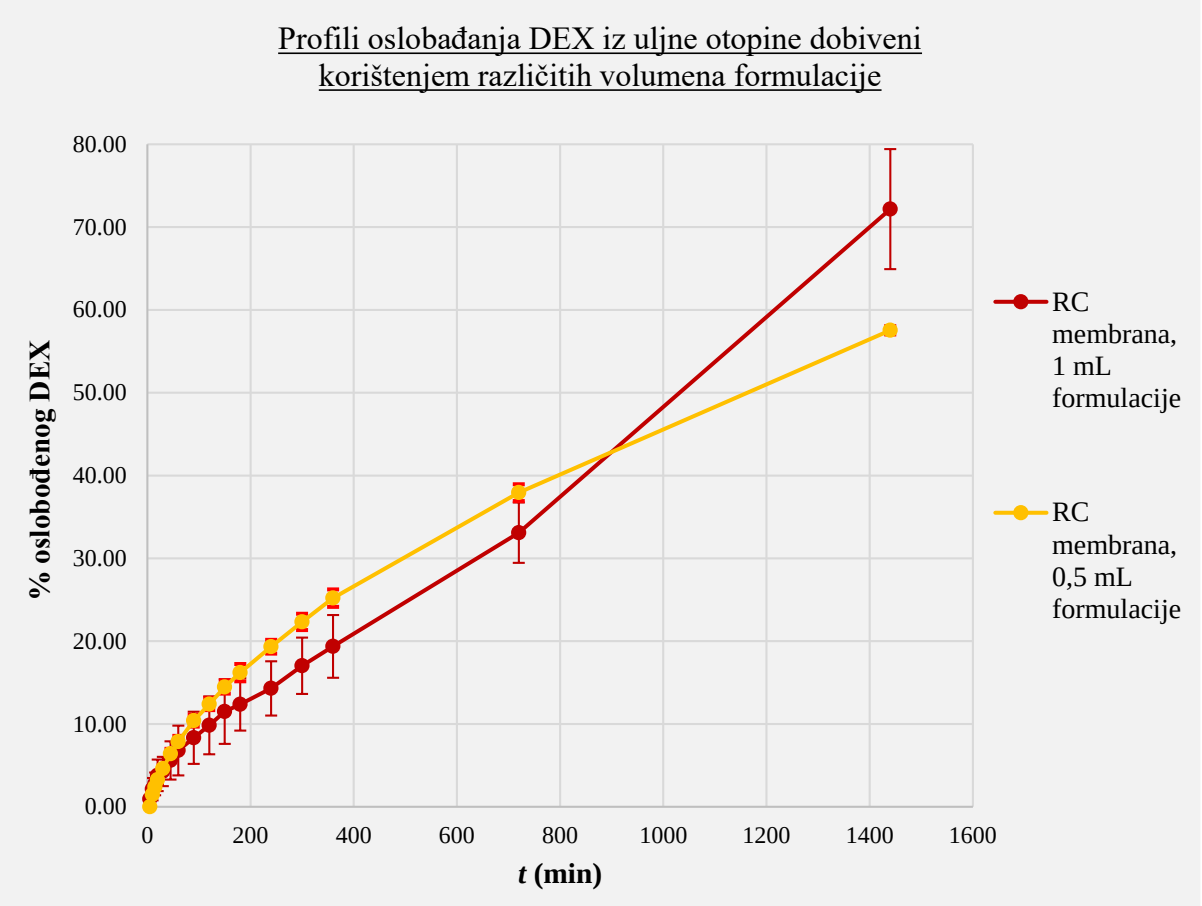
4.4.6. Utjecaj volumena formulacije na profil oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola

Volumen formulacije parametar je koji se rutinski ispituje u razvoju i evaluaciji IVR metoda. Kako bi se ispitalo utječe li sam volumen uljne otopine na profil oslobađanja deksametazona, proveden je pokus s dvostruko manjim volumenom formulacije u odnosu na prethodne pokuse. Korištene su RC membrane i brzina miješanja medija od 75 rpm, pri 37 °C.

Rezultati pokusa prikazani su u Tablici 11 i grafički na Slici 18.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm i 500 μL (dvostruko manji volumen) formulacije

	% oslobođenog DEX				
***t* / min**	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	srednja vrijednost	standardna devijacija
5	0,00	0,00	0,00	**0,00**	0,00
10	1,40	1,40	1,60	**1,47**	0,12
15	2,20	2,40	2,60	**2,40**	0,20
20	3,00	3,20	3,60	**3,27**	0,31
30	4,20	4,60	5,00	**4,60**	0,40
45	5,80	6,40	7,00	**6,40**	0,60
60	7,20	7,80	8,60	**7,87**	0,70
90	9,60	10,60	11,00	**10,40**	0,72
120	11,60	12,60	13,00	**12,40**	0,72
150	13,60	14,60	15,20	**14,47**	0,81
180	15,00	16,80	16,80	**16,20**	1,04
240	18,40	19,60	20,00	**19,33**	0,83
300	21,20	22,80	23,00	**22,33**	0,99
360	24,00	25,60	26,00	**25,20**	1,06
720	37,80	37,00	39,00	**37,93**	1,01
1440	58,00	57,00	57,60	**57,53**	0,50



Slika 18. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o volumenu formulacije. Ostali uvjeti ispitivanja: RC membrana, 37 °C, 75 rpm, medij: fosfatni pufer pH 7,4.

Profil oslobađanja ne mijenja se značajno promjenom volumena formulacije. Faktor sličnosti f_2 određen *Bootstrap* metodom iznosi 59,610, a 5%-tni percentil 55,590, zbog čega se profili oslobađanja korištenjem 1,0 i 0,5 mL formulacije, uz nepromijenjene ostale uvjete ispitivanja, mogu smatrati sličnima. Međutim, treba imati na umu da prikazani profili oslobađanja ne uzimaju u obzir samu količinu oslobođenog deksametazona, već njegov udio u odnosu na količinu koja je bila sadržana u odgovarajućem volumenu formulacije.

Ovi rezultati upućuju na to da se promjenom volumena formulacije ne mijenja mehanizam oslobađanja deksametazona. Stoga se može očekivati da će nakon primjene različitih doza (volumena) formulacije *in vivo*, profil oslobađanja biti sličan, te da bi na temelju *in vivo* određene farmakokinetike (apsorpcije i eliminacije) jedne doze bilo moguće pretpostaviti farmakokinetiku druge, uzimajući u obzir samo razliku u količini API između primijenjenih doza, a ne i moguće razlike između brzine oslobađanja.

4.5. Evaluacija rezultata

4.5.1. Osjetljivost i optimalni uvjeti metode

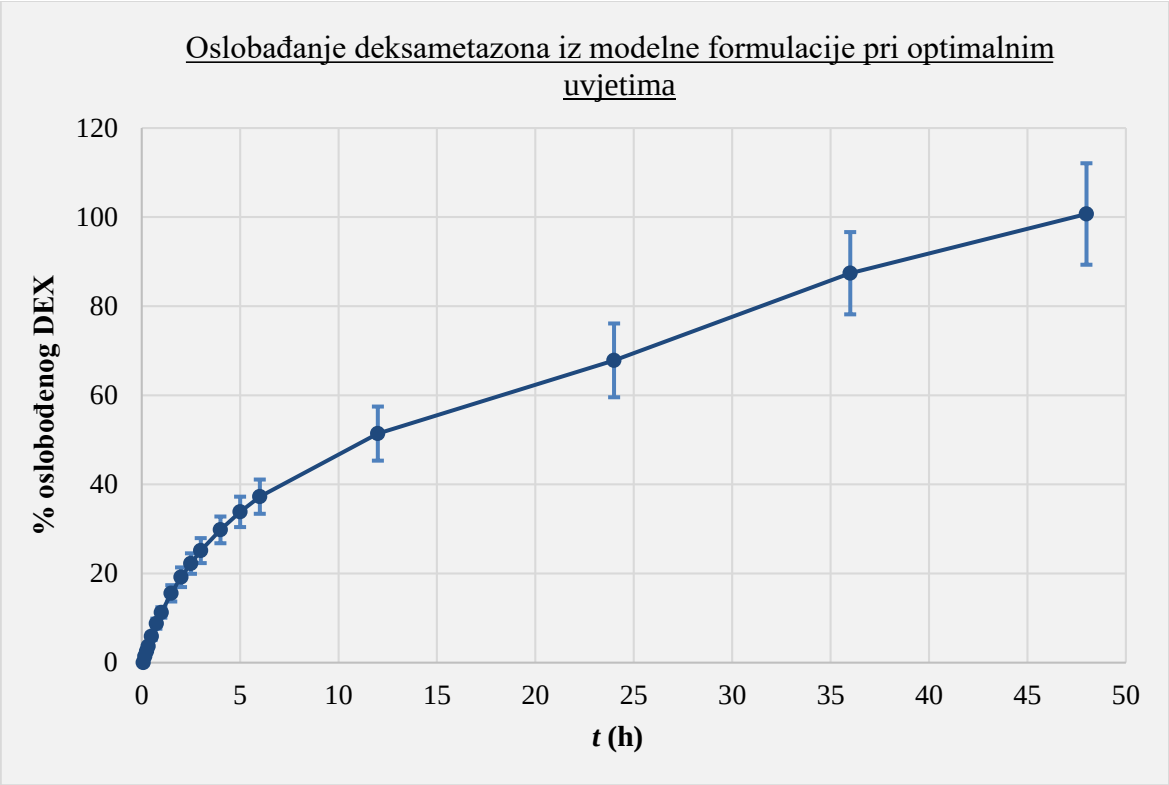
Rezultati prikazani u poglavljima 4.4.2. – 4.4.6. pokazuju kako je razvijena metoda osjetljiva na temperaturu i brzinu miješanja receptorskog medija, a nije osjetljiva na vrstu korištenih dijalizacijskih vrećica, prisutnost etanola u receptorskom mediju te volumen korištene formulacije.

Kao optimalni uvjeti za ispitivanje oslobađanja *in vitro* iz modelne formulacije odabrani su:

- dijalizacijske vrećice od celuloza-estera, zbog jednostavnijeg rukovanja ovim tipom dijalizacijskih membrana u odnosu na membrane od regenerirane celuloze;
- temperatura: 37 °C, zbog bržeg oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije pri višoj temperaturi;
- brzina miješanja medija: 75 rpm, zbog bržeg oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije pri većoj brzini miješanja medija;
- receptorski medij: fosfatni pufer pH 7,4, koji je biorelevantan s obzirom na pH.

Pri tim uvjetima provedeni su dodatni pokusi kako bi se evaluirala ponovljivost metode i ispitao profil oslobađanja tijekom dva dana. Rezultati dvodnevnog ispitivanja provedenog u triplikatu pri navedenim optimalnim uvjetima, prikazani su na Slici 19. Nakon 48 h postignuto je potpuno oslobađanje deksametazona iz modelne formulacije. U vremenskoj točki 48 h izmjereni prosječni udio oslobođenog deksametazona iznosi 100,70 %, što je posljedica blagog isparavanja receptorskog medija tijekom ispitivanja, zbog toga što sustav nije u potpunosti hermetički zatvoren.

Kako se postupno oslobađanje pri navedenim uvjetima postiže u relativno kratkom roku, to čini odabrane uvjete i metode pogodnima za ispitivanja oslobađanja ljekovitih tvari iz formulacija s prikladnom topljivosti u uljnim otapalima te prikladnim particijskim koeficijentom, poput onih koji su izmjereni za modelnu formulaciju. Takva svojstva formulacije omogućuju produljeno oslobađanje djelatne tvari, ali istovremeno i relativno kratkotrajna ispitivanja oslobađanja *in vitro* u usporedbi s očekivanim vremenom potrebnim da se ista količina API oslobodi iz uljne otopine *in vivo*.



Slika 19. Profil oslobađanja deksametazona tijekom dva dana pri optimalnim uvjetima metode (CE membrane, 37 °C, 75 rpm, receptorski medij: 500 mL fosfatnog pufera pH 7,4)

4.5.2. Ponovljivost metode

Ponovljivost metode pri svim ispitivanim uvjetima zadovoljavajuća je, jer su vrijednosti standardnih devijacija između dobivenih profila oslobađanja iz ispitivanja u triplikatu manje od 10 % (udjela oslobođenog deksametazona).

Kako bi se detaljnije evaluirala ponovljivost metode pri optimalnim uvjetima (CE membrane, 37 °C, 75 rpm, receptorski medij: 500 mL fosfatnog pufera pH 7,4), proveden je dodatan pokus u trajanju od 24 h te su tim rezultatima pridruženi rezultati prethodno provedenih pokusa pri optimalnim uvjetima. Rezultati pokusa (ukupno 9 mjerenja) prikazani su u Tablici 12. Vrijednosti standardne devijacije između 9 mjerenja također su ispod 10 %, što se za ovu vrstu ispitivanja smatra zadovoljavajućim.

Tablica 12. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola pri optimalnim uvjetima (CE membrane, 37 °C, 75 rpm, receptorski medij: 500 mL fosfatnog pufera pH 7,4)

	% oslobođenog DEX										
***t* / min**	uzorak 1*	uzorak 2*	uzorak 3*	uzorak 4	uzorak 5	uzorak 6	uzorak 7	uzorak 8	uzorak 9	**srednja vrijednost**	**standardna devijacija**
5	0,00	0,40	1,10	0,00	0,00	1,10	0,00	0,00	0,00	**0,29**	0,48
10	0,80	1,30	1,40	1,10	1,20	2,20	1,10	1,20	1,90	**1,36**	0,43
15	1,70	2,20	2,00	2,40	5,10	3,40	2,30	2,30	3,00	**2,71**	1,03
20	2,50	3,10	2,50	3,60	3,40	4,40	3,40	3,40	4,10	**3,38**	0,64
30	4,10	4,60	3,50	5,50	8,70	5,90	5,50	5,30	6,80	**5,54**	1,54
45	6,20	6,80	5,20	8,30	8,60	8,10	8,30	7,90	10,00	**7,71**	1,43
60	8,00	8,80	6,70	10,80	11,30	10,20	11,00	10,20	12,50	**9,94**	1,80
90	11,40	12,10	9,60	14,70	15,50	13,20	15,20	13,90	17,50	**13,68**	2,39
120	14,30	15,10	11,70	18,00	18,20	16,00	18,90	17,10	21,50	**16,76**	2,87
150	16,90	17,60	13,90	20,90	21,30	18,30	22,30	19,90	24,50	**19,51**	3,19
180	19,20	19,90	16,10	23,50	26,50	20,70	25,20	22,30	27,90	**22,37**	3,79
240	23,20	23,90	19,70	28,10	29,10	24,90	30,00	26,70	32,70	**26,48**	3,98
300	26,80	27,60	22,90	32,00	n/a **	28,70	34,30	30,20	37,00	**29,94**	4,47
360	30,10	30,80	25,90	35,60	36,80	32,00	37,90	33,10	40,70	**33,66**	4,55
720	47,10	45,60	39,50	51,80	53,30	47,00	53,00	44,70	56,50	**48,72**	5,31
1440	73,43	76,74	59,16	78,60	78,20	71,00	70,70	58,50	74,30	**71,18**	7,55

*Rezultati prikazani prethodno u Tablici 6; **n/a = nije izmjereno.

5. ZAKLJUČCI

Zaključci ovog rada, dobiveni temeljem opisanih rezultata i rasprave, navedeni su u nastavku.

- Između 5 ispitanih biljnih ulja (kikirikijevo, pamučnih sjemenki, kukuruzovo, ricinusovo i sezamovo), topljivost deksametazona daleko je najveća u ricinusovom ulju, a u ostalim uljima podjednaka.

- Izopropanol je dobro suotapalo za deksametazon u otopinama u biljnim uljima te mu značajno povećava topljivost u svim ispitanim biljnim uljima.

- Otopina deksametazona u ricinusovom ulju uz dodatak izopropanola u volumnom udjelu 20 %, odabrana kao modelna formulacija, ima:
    - zadovoljavajuću vrijednost prividnog particijskog koeficijenta, koja pokazuje potencijal produljenog oslobađanja deksametazona iz te formulacije;
    - bitno manju viskoznost u odnosu na otopinu u ricinusovom ulju bez dodatka izopropanola, što upućuje na njenu bolju injektibilnost.

- Metoda s rotirajućim lopaticama (USP II) i dijalizacijskim vrećicama pokazala se pogodnom za ispitivanje oslobađanja deksametazona iz otopine deksametazona u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola kao modelne formulacije zahvaljujući njenoj:
    - osjetljivosti prema ključnim parametrima koji se mogu promijeniti *in vitro* i tijekom procesa proizvodnje uljnih otopina (temperatura, brzina miješanja medija);
    - zadovoljavajućoj ponovljivosti;
    - jednostavnosti i širokoj dostupnosti.

- Spektrofotometrija potpomognuta optičkim vlaknima prikladna je za analizu oslobađanja djelatnih tvari iz uljnih otopina, ako je zadovoljen preduvjet da ispitana djelatna tvar u strukturi sadrži kromofor, te omogućuje:
    - potpunu automatiziranost metode ispitivanja oslobađanja *in vitro*;
    - potpuni izostanak interferencije s uvjetima osigurane topljivosti zbog vanjskih utjecaja tijekom uzorkovanja medija.

- Razvijena metoda mogla bi biti korisna u predformulacijskim istraživanjima novih uljnih otopina, te tijekom razvoja takvih formulacija.

6. LITERATURA

Adams CE, Fenton MK, Quraishi S, David AS. Systematic meta-review of depot antipsychotic drugs for people with schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 2001, 179, 290-299.

Abrahamson B, Ungell AL. Biopharmaceutical Support in Formulation Development. U: Pharmaceutical Preformulation and Formulation. Gibson M, urednik, Boca Raton, CRC Press LLC, 2004, str. 239-291.

Aydogdu A, Swerdloff RS. Emerging medication for the treatment of male hypogonadism. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2016, 21(3), 255-266.

Billany M. Solutions. U: Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design. Aulton ME, urednik, Edinburgh, Churchill Livingstone, 2002, str. 309-322.

Cascone S. Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 106, 352-361.

Cary 60 Fiber Optics Accessories, 2018, www.agilent.com, pristupljeno: 23.1.2018.

Chrousos GP. The Gonadal Hormones & Inhibitors. U: Basic & Clinical Pharmacology. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw Hill Medical, 2012, str. 715-741.

Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 123-133.

Deksametazon Krka 20 mg tablete, Sažetak opisa svojstava lijeka, 2017, www.halmed.hr, pristupljeno 24.1.2018.

Dexamethasone: Calculation, www.chemicalize.com, pristupljeno 24.1.2018.

European Pharmacopoeia Commision. European Pharmacopoeia, 4th edition. Strasbourg, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, 2008, str. 194-199.

Florence AT, Attwood D. Physicochemical Principles of Pharmacy. London, Pharmaceutical Press, 2006, str. 349-355.

From Cuvettes to Fiber Optics, 2011, www.agilent.com, pristupljeno 23.1.2018.

Fundamentals of Membrane Dialysis, 2018, www.spectrumlabs.com, pristupljeno 2.2.2018.

Grodzinsky AJ, Wang Y, Kakar S, Vrahas MS, Evans CH. Intra-articular dexamethasone to inhibit the development of post-traumatic osteoarthritis. *J Orthop Res*, 2017, 35(3), 406-411.

Improving the Capability and Performance of UV-Vis Analysis using Fiber Optics, 2012, www.agilent.com, pristupljeno 23.1.2018.

Intra-Articular Dexamethasone to Prevent Post-Traumatic Osteoarthritis: A Pilot Study, 2015, www.clinicaltrials.gov, pristupljeno 24.1.2018.

Jacobeit JW, Gooren LJ, Schulte HM. Safety aspects of 36 months of administration of long-acting intramuscular testosterone undecanoate for treatment of female-to-male transgender individuals. *Eur J Endocrinol*, 2009, 161(5), 795-798.

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

Kane JM, Kishimoto T, Correll CU. Assessing the comparative effectiveness of long-acting injectable vs. oral antipsychotic medications in the prevention of relapse provides a case study in comparative effectiveness research in psychiatry. *J Clin Epidemiol*, 2013, 66(8 Suppl), S37-41.

Kastellorizios M, Burgess DJ. In Vitro Drug Release Testing and In Vivo/In Vitro Correlation for Long Acting Implants and Injections. U: Long Acting Injections and Implants. Wright JC, Burgess DJ, urednici, New York, Springer, 2012, str. 475-503.

Kirson NY, Weiden PJ, Yermakov S, Huang W, Samuelson T, Offord SJ, Greenberg PE, Wong BJ. Efficacy and effectiveness of depot versus oral antipsychotics in schizophrenia: synthesizing results across different research designs. *J Clin Psychiatry*, 2013, 74(6), 568-575.

Larsen C, Larsen SW, Jensen H, Yaghmur A, Østergaard J. Role of in vitro release models in formulation development and quality control of parenteral depots. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6(12), 1289-1295.

Larsen C, Ostergaard J, Larsen SW, Jensen H, Jacobsen S, Lindegaard C, Andersen PH. Intra-articular depot formulation principles: role in the management of postoperative pain and arthritic disorders. *J Pharm Sci*, 2008, 97(11), 4622-4654.

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(1-2), 107-117.

Larsen SW, Thing MA, Larsen C. Oily (Lipophilic) Solutions and Suspensions. U: Long Acting Injections and Implants. Wright JC, Burgess DJ, urednici, New York, Springer, 2012, str. 113-136.

Lee RW, Mitchnick M. Early-Stage Formulation Considerations. *Curr Protoc Chem Biol*, 2017, 9(4), 306-314.

Miller DD, Brueggemeier RW, Dalton JT. Adrenocorticoids. U: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lemke TL, Williams DA, urednici, New York, Lippincot Williams and Wilkins, 2008, str. 877-912.

Nebido 1000 mg/4 ml otopina za injekciju, Sažetak opisa svojstava lijeka, 2017, www.halmed.hr, pristupljeno 18.1.2018.

Nieschlag E, Nieschlag S. Testosterone deficiency: a historical perspective. *Asian J Androl*, 2014, 16(2), 161-168.

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

Prata A, Coimbra P, Pina ME. Preparation of dexamethasone ophthalmic implants: a comparative study of in vitro release profiles. *Pharm Dev Technol*, 2018, 23(3), 218-224.

Preskorn SH. Pharmacokinetics and Therapeutics of Acute Intramuscular Ziprasidone. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44(11), 1117-1133.

Rowe RC, Sheskey PJ, Sian CO. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Pharmaceutical Press, str. 128-132; 371-374.

Sartorius G, Fennell C, Spasevska S, Turner L, Conway AJ, Handelsman DJ. Factors influencing time course of pain after depot oil intramuscular injection of testosterone undecanoate. *Asian J Androl*, 2010, 12(2), 227-233.

Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm*, 2012, 2012, 195727.

Schultz K, Møllgaard B, Frokjaer S, Larsen C. Rotating dialysis cell as in vitro release method for oily parenteral depot solutions. *Int J Pharm*, 1997, 157(2), 163-169.

Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. New York, McGraw-Hill, 2005, str. 619-662.

Spanarello S, La Ferla T. The pharmacokinetics of long-acting antipsychotic medications. *Curr Clin Pharmacol*, 2014, 9(3), 310-317.

Steele G. Preformulation as an Aid to Product Design in Early Drug Development. U: Pharmaceutical Preformulation and Formulation. Gibson M, urednik, Boca Raton, CRC Press LLC, 2004, str. 175-237.

Stevens RE, Gray V, Dorantes A, Gold L, Pham L. Scientific and regulatory standards for assessing product performance using the similarity factor, f2. *AAPS J*, 2015, 17(2), 301-306.

Suitthimeathegorn O, Turton JA, Mizuuchi H, Florence AT. Intramuscular absorption and biodistribution of dexamethasone from non-aqueous emulsions in the rat. *Int J Pharm*, 2007, 331(2), 204-210.

Šutić A. Razvoj *in vitro* metode za ispitivanje brzine oslobađanja deksametazona iz topikalne nanosuspenzije. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016, str. 22.

Owen A, Rannard S. Strengths, weaknesses, opportunities and challenges for long acting injectable therapies: insights for applications in HIV therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 103, 114-156.

Tobradex 3 mg + 1 mg/ml kapi za oko, suspenzija, Sažetak opisa svojstava lijeka, 2017, www.halmed.hr, pristupljeno 24.1.2018.

Tobradex 3 mg + 1 mg/ml mast za oko, Sažetak opisa svojstava lijeka, 2017, www.halmed.hr, pristupljeno 24.1.2018.

The United States Pharmacopeial Convention. <711> Dissolution. U: United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 40-NF 35), 2015, Rockville, The United States Pharmacopeial Convention, str. 588-598.

The United States Pharmacopeial Convention. <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation. U: United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 40-NF 35), 2015, Rockville, The United States Pharmacopeial Convention, str. 588-598.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. Edinburgh, Churchill Livingstone Elsevier, 2012, str. 90-114.

Xie XS. Molecular Modeling and *In Silico* Drug Design. U: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lemke TL, Williams DA, urednici. New York, Lippincot Williams and Wilkins, 2008, str. 54-84.

Yassin AA, Haffejee M. Testosterone depot injection in male hypogonadism: a critical appraisal. *Clin Interv Aging*, 2007, 2(4), 577-590.

Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, Xie S. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J*, 2010, 12(3), 263-271.

Zuidema J, Pieters FAJM, Duchateau GSMJE. Release and absorption rate aspects of intramuscularly injected pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 1988, 47, 1-12.

Zuo J, Gao Y, Bou-Chacra N, Löbenberg R. Evaluation of the DDSolver software applications. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:204925.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Filip Kozlina

Razvoj metode za *in vitro* ispitivanje oslobađanja deksametazona iz uljne formulacije s dodatkom izopropanola

Uljne otopine jednostavni su tekući farmaceutski oblici koji pružaju mogućnost parenteralne primjene djelatnih tvari (API, eng. *active pharmaceutical ingredient*) slabo topljivih ili nestabilnih u vodenim medijima. Osim toga, uljne otopine su tip formulacije iz kojih je oslobađanje API produljeno, čime se omogućuje značajno manja učestalost doziranja lijekova, koja je osobito prikladna za terapiju kroničnih bolesti, kao i bolesti kod kojih je adherencija pacijenata varijabilna. Među trenutno razvijenim metodama za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari *in vitro* ne postoji standardizirana metoda za analizu oslobađanja *in vitro* iz uljnih otopina. U ovom radu opisan je razvoj jedne takve analitičke metode, korištenjem jednostavne i široko dostupne aparature s lopaticom (USP II) i dijalizacijskih vrećica.

Kao modelni lijek za razvoj analitičke metode odabran je potentni glukokortikoid deksametazon, čija je topljivost ispitana u pet biljnih ulja te njihovim kombinacijama s izopropanolom u ulozi suotapala. Izopropanol zasad nije primijenjen kao suotapalo u uljnim otopinama, a u ovom istraživanju pokazao se kao dobro suotapalo. Najveća topljivost deksametazona izmjerena je u smjesi ricinusovog ulja i izopropanola u volumnom udjelu 20 %, a prividni particijski koeficijent deksametazona iz te otopine ima vrijednost koja upućuje na potencijal produljenog oslobađanja iz formulacije, pa je ona odabrana kao modelna formulacija za razvoj metode.

Za analizu količine oslobođenog deksametazona korištena je spektrofotometrija potpomognuta optičkim vlaknima, kojom je omogućena potpuna automatiziranost metode te osigurano zadovoljavanje uvjeta osigurane topljivosti tijekom ispitivanja, koji se ne mogu poremetiti jer, zahvaljujući probi optičkog vlakna koja je uronjena u medij za oslobađanje tijekom cijelog ispitivanja, uzorkovanje medija tijekom analize nije potrebno.

Razvijena metoda pokazala se osjetljivom prema ključnim parametrima koji se mogu promijeniti *in vitro* ili tijekom procesa proizvodnje (temperatura i brzina miješanja medija) te je zadovoljavajuće ponovljivosti, jednostavna i potpuno automatizirana. Zbog toga, razvijena metoda mogla bi se koristiti za analizu oslobađanja *in vitro* djelatnih tvari iz uljnih otopina tijekom predformulacijskih istraživanja, kao i razvoja novih formulacija.

Filip Kozlina

Development of an *in vitro* release method for an oily formulation of dexamethasone with addition of isopropanol

Oily solutions are simple liquid dosage forms which allow parenteral application of active pharmaceutical ingredients (API) that are poorly soluble or unstable in aqueous systems. Additionally, release of APIs from these formulations is extended, which makes their application significantly less frequent. This property makes oily solutions especially suitable for the treatment of chronic diseases, as well as diseases characterised by variable patient adherence. Among the currently developed *in vitro* release methods, there are no standardised methods for the analysis of drug release *in vitro* from oily solutions. This paper describes the development of such method using the simple and widely available paddle apparatus (USP II) with addition of dialysis bags.

The potent glucocorticoid dexamethasone was chosen as the model drug for the development of this method. Solubility of dexamethasone was examined in five vegetable oils and their mixtures with isopropanol as a cosolvent. Isopropanol has not yet been used as a cosolvent in oily solutions, but has demonstrated good solubilization properties. The highest solubility of dexamethasone was measured in the mixture of castor oil and isopropanol in a volume percentage of 20 %, with an apparent partition coefficient indicating a potential for extended release of dexamethasone from this formulation, which was consequently chosen as the model formulation for the development of this *in vitro* release method.

Optic fiber assisted UV-Vis spectrophotometry was used to determine the amount of released dexamethasone. This setup enabled complete automatization of the *in vitro* release method with ensured sink conditions throughout the experiment, as there was no need to sample the release medium due to the fact that the fiber optic probe is immersed in the dissolution medium for the whole duration of the experiment.

The developed *in vitro* release method has shown appropriate sensitivity regarding parameters that might change *in vitro* or during the manufacturing process (temperature and agitation rate), as well as satisfactory repeatability, simplicity and complete automatization. Therefore, the developed method can be a useful tool for the analysis of *in vitro* release from oily solutions during preformulation investigations as well as development of new formulations.

8. PRILOZI

8.1. Popis slika

Slika 1. Prikaz procesa koji kontroliraju apsorpciju intramuskularno primijenjenog lijeka (preuzeto i prilagođeno iz Zuidema i sur., 1988) 3
Slika 2. Strukture linolne, oleinske i ricinolne kiseline 6
Slika 3. Strukturna formula deksametazona 8
Slika 4. Uobičajena USP II aparatura i aparatura s posudom s uzdignutim dnom (preuzeto i prilagođeno iz Gibson i sur., ured., 2004) 12
Slika 5. Shematski prikaz probe optičkim vlaknima potpomognutog spektrofotometra (preuzeto i prilagođeno s www.agilent.com) 14
Slika 6. Probe od nehrđajućeg čelika s različitim duljinama optičkog puta (2 mm, 10 mm i 20 mm) (preuzeto s www.agilent.com) 14
Slika 7. Degaziranje receptorskog medija (autorska fotografija) 23
Slika 8. Dijalizacijske vrećice (CE) s formulacijom i magnetima (autorska fotografija) 24
Slika 9. Aparatura za ispitivanje oslobađanja (autorska fotografija) 24
Slika 10. Grafički prikaz rezultata ispitivanja topljivosti deksametazona u biljnim uljima sa i bez dodatka izopropanola u volumnim udjelima 10 % i 20 %. 30
Slika 11. Dijalizacijska vrećica s magnetom i proba spektrofotometra s optičkim vlaknima u upotrebi (autorska fotografija) 34
Slika 12. Profili oslobađanja deksametazona bez prethodnog degaziranja medija za oslobađanje. Uvjeti ispitivanja: CE membrane, 37 °C, 50 rpm, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4. 34
Slika 13. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz modelne formulacije sa i bez prethodnog degaziranja medija za oslobađanje. Uvjeti ispitivanja: CE membrane, 37 °C, 50 rpm, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4. Za profil dobiven bez degaziranja medija na grafu nisu naznačene standardne devijacije udjela oslobođenog deksametazona (u rasponu od 7,82 do 109,2). 35
Slika 14. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o tipu korištene dijalizacijske membrane. Ostali uvjeti ispitivanja: 50 rpm, 37 °C, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4. 38
Slika 15. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o brzini miješanja medija i tipu korištene dijalizacijske membrane. Ostali uvjeti ispitivanja: 37 °C, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer, pH 7,4. 42

Slika 16. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o sastavu receptorskog medija (fosfatni pufer, pH 7,4 sa ili bez dodatka etanola do volumnog udjela 10%). Čisti medij = fosfatni pufer, pH 7,4. Ostali uvjeti ispitivanja: 75 rpm, 37 °C, 1 mL formulacije. 45
Slika 17. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o temperaturi medija za oslobađanje. Ostali uvjeti ispitivanja: CE membrana, 75 rpm, 1 mL formulacije, medij: fosfatni pufer pH 7,4. 48
Slika 18. Usporedba profila oslobađanja deksametazona iz formulacije ovisno o volumenu formulacije. Ostali uvjeti ispitivanja: RC membrana, 37 °C, 75 rpm, medij: fosfatni pufer pH 7,4. 50
Slika 19. Profil oslobađanja deksametazona tijekom dva dana pri optimalnim uvjetima metode (CE membrane, 37 °C, 75 rpm, receptorski medij: 500 mL fosfatnog pufera pH 7,4) 52

8.2. Popis tablica

Tablica 1. Program eluacije u HPLC metodi korištenoj za analizu sadržaja deksametazona tijekom ispitivanja topljivosti i raspodjele 21
Tablica 2. Rezultati ispitivanja topljivosti deksametazona u biljnim uljima sa i bez dodatka iPrOH 29
Tablica 3. Omjeri koncentracija deksametazona u uljnoj i vodenoj fazi izmjereni nakon 2 i 24 sata miješanja otopine deksametazona u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanolu s fosfatnim puferom pH 7,4 31
Tablica 4. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 37 °C i 50 rpm..... 36
Tablica 5. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 50 rpm 37
Tablica 6. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm..... 40
Tablica 7. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm 41
Tablica 8. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm uz dodatak 10 % (v/v) etanola u receptorski medij 43

Tablica 9. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm uz dodatak 10 % (v/v) etanola u receptorski medij 44
Tablica 10. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći CE dijalizacijske membrane pri 25 °C i 75 rpm..... 47
Tablica 11. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola koristeći RC dijalizacijske membrane pri 37 °C i 75 rpm i 500 µL (dvostruko manji volumen) formulacije 49
Tablica 12. Rezultati ispitivanja oslobađanja deksametazona iz otopine u ricinusovom ulju i 20 % (v/v) izopropanola pri optimalnim uvjetima (CE membrane, 37 °C, 75 rpm, receptorski medij: 500 mL fosfatnog pufera pH 7,4)..... 53

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Industrijska farmacija (Samostalni kolegij)
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ METODE ZA *IN VITRO* ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA DEKSAMETAZONA IZ ULJNE FORMULACIJE S DODATKOM IZOPROPANOLA

Filip Kozlina

SAŽETAK

Uljne otopine jednostavni su tekući farmaceutski oblici koji pružaju mogućnost parenteralne primjene djelatnih tvari (API, eng. *active pharmaceutical ingredient*) slabo topljivih ili nestabilnih u vodenim medijima. Osim toga, uljne otopine su tip formulacije iz kojih je oslobađanje API produljeno, čime se omogućuje značajno manja učestalost doziranja lijekova, koja je osobito prikladna za terapiju kroničnih bolesti, kao i bolesti kod kojih je adherencija pacijenata varijabilna. Među trenutno razvijenim metodama za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari *in vitro* ne postoji standardizirana metoda za analizu oslobađanja *in vitro* iz uljnih otopina. U ovom radu opisan je razvoj jedne takve analitičke metode, korištenjem jednostavne i široko dostupne aparature s lopaticom (USP II) i dijalizacijskih vrećica.

Kao modelni lijek za razvoj analitičke metode odabran je potentni glukokortikoid deksametazon, čija je topljivost ispitana u pet biljnih ulja te njihovim kombinacijama s izopropanolom u ulozi suotapala. Izopropanol zasad nije primijenjen kao suotapalo u uljnim otopinama, a u ovom istraživanju pokazao se kao dobro suotapalo. Najveća topljivost deksametazona izmjerena je u smjesi ricinusovog ulja i izopropanola u volumnom udjelu 20 %, a prividni particijski koeficijent deksametazona iz te otopine ima vrijednost koja upućuje na potencijal produljenog oslobađanja iz formulacije, pa je ona odabrana kao modelna formulacija za razvoj metode.

Za analizu količine oslobođenog deksametazona korištena je spektrofotometrija potpomognuta optičkim vlaknima, kojom je omogućena potpuna automatiziranost metode te osigurano zadovoljavanje uvjeta osigurane topljivosti tijekom ispitivanja, koji se ne mogu poremetiti jer, zahvaljujući probi optičkog vlakna koja je uronjena u medij za oslobađanje tijekom cijelog ispitivanja, uzorkovanje medija tijekom analize nije potrebno.

Razvijena metoda pokazala se osjetljivom prema ključnim parametrima koji se mogu promijeniti *in vitro* ili tijekom procesa proizvodnje (temperatura i brzina miješanja medija) te je zadovoljavajuće ponovljivosti, jednostavna i potpuno automatizirana. Zbog toga, razvijena metoda mogla bi se koristiti za analizu oslobađanja *in vitro* djelatnih tvari iz uljnih otopina tijekom predformulacijskih istraživanja, kao i razvoja novih formulacija.

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

Rad sadrži: 71 stranica, 19 grafičkih prikaza, 12 tablica i 54 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ispitivanje oslobađanja *in vitro*, uljne otopine, deksametazon, izopropanol, ricinusovo ulje, spektrofotometrija potpomognuta optičkim vlaknima

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *znanstveni savjetnik, naslovni redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Biljana Nigović, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj, 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Industrial pharmacy (Independent course)
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* RELEASE METHOD FOR AN OILY FORMULATION OF DEXAMETHASONE WITH ADDITION OF ISOPROPANOL

Filip Kozlina

SUMMARY

Oily solutions are simple liquid dosage forms which allow parenteral application of active pharmaceutical ingredients (API) that are poorly soluble or unstable in aqueous systems. Additionally, release of APIs from these formulations is extended, which makes their application significantly less frequent. This property makes oily solutions especially suitable for the treatment of chronic diseases, as well as diseases characterised by variable patient adherence. Among the currently developed *in vitro* release methods, there are no standardised methods for the analysis of drug release *in vitro* from oily solutions. This paper describes the development of such method using the simple and widely available paddle apparatus (USP II) with addition of dialysis bags.
The potent glucocorticoid dexamethasone was chosen as the model drug for the development of this method. Solubility of dexamethasone was examined in five vegetable oils and their mixtures with isopropanol as a cosolvent. Isopropanol has not yet been used as a cosolvent in oily solutions, but has demonstrated good solubilization properties. The highest solubility of dexamethasone was measured in the mixture of castor oil and isopropanol in a volume percentage of 20 %, with an apparent partition coefficient indicating a potential for extended release of dexamethasone from this formulation, which was consequently chosen as the model formulation for the development of this *in vitro* release method.
Optic fiber assisted UV-Vis spectrophotometry was used to determine the amount of released dexamethasone. This setup enabled complete automatization of the *in vitro* release method with ensured sink conditions throughout the experiment, as there was no need to sample the release medium due to the fact that the fiber optic probe is immersed in the dissolution medium for the whole duration of the experiment.
The developed *in vitro* release method has shown appropriate sensitivity regarding parameters that might change in vitro or during the manufacturing process (temperature and agitation rate), as well as satisfactory repeatability, simplicity and complete automatization. Therefore, the developed method can be a useful tool for the analysis of in vitro release from oily solutions during preformulation investigations as well as development of new formulations.

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

Thesis includes: 71 pages, 19 figures, 12 tables and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *in vitro* release testing, oily solution, dexamethasone, isopropanol, castor oil, optic fiber assisted spectrophotometry

Mentor: **Biserka Cetina-Čižmek**, **Ph.D.** *Senior Research Advisor, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Biserka Cetina-Čižmek**, **Ph.D.** *Senior Research Advisor, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Biljana Nigović, **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: April 2018.