

# Razvoj in vitro metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz polimernih mikročestica za topičku primjenu

---

Lusina Kregar, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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:163:674196>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MAJA LUSINA KREGAR

**RAZVOJ *IN VITRO* METODE ZA ISPITIVANJE  
OSLOBAĐANJA DJELATNE TVARI IZ POLIMERNIH  
MIKROČESTICA ZA TOPIČKU PRIMJENU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

MAJA LUSINA KREGAR

**DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* RELEASE TEST  
FOR TOPICAL MICROPARTICLE SYSTEMS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MAJA LUSINA KREGAR

**RAZVOJ *IN VITRO* METODE ZA ISPITIVANJE  
OSLOBAĐANJA DJELATNE TVARI IZ POLIMERNIH  
MIKROČESTICA ZA TOPIČKU PRIMJENU**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:  
prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Zagreb, 2016.





UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

MAJA LUSINA KREGAR

**DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* RELEASE TEST  
FOR TOPICAL MICROPARTICLE SYSTEMS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Zagreb, 2016

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija.

# ZAHVALA

Od srca zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić koja me s puno razumijevanja, strpljenja i topline usmjeravala i savjetovala u tijeku izrade ovog doktorskog rada.

Veliko hvala dr. sc. Biserki Cetina-Čižmek na trajnom vodstvu i podršci.

Hvala PLIVI Hrvatska d.o.o. koja je omogućila izradu ovog rada.

Iskreno zahvaljujem svim mojim kolegama i prijateljima iz PLIVE koji su kroz proteklih 15 godina sa mnom dijelili svoje znanje i iskustvo, pomagali mi, te usmjeravali i podržavali moj stručni i osobni razvoj.

Hvala Andrei Rožman na XRPD analizama, te na pomoći u svladavanju tehnika za karakterizaciju čvrstog stanja.

Zahvaljujem dr. sc. Želimiru Jelčiću na SEM analizama, kao i na korisnim diskusijama i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Hvala dr. sc. Marjani Dürriegl na utabanom putu i svijetlom primjeru koji sam slijedila.

Iskreno zahvaljujem Mirti Mikulecky i Sonji Vorkapić na nesebičnoj pomoći u izradi eksperimentalnog dijela ovog rada, u trenucima kada je dodatan par ruku bio najpotrebniji.

Hvala mami, tati i Marini na ljubavi i podršci.

Ivo i Mara, hvala na svemu, volim vas.

# SAŽETAK

Trenutno ne postoje farmakopejske ili standardne metode i aparature za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz topikalnih mikročestica. Cilj ovog rada bio je razviti i validirati diskriminatornu *in vitro* metodu za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz topikalnih mikročestica, uz korištenje imerzijske ćelije.

Za potrebe rada pripremljene su i karakterizirane kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom. Za izradu mikročestica korištena je tehnika sušenja raspršivanjem. Ispitana su sljedeća svojstva mikročestica: učinkovitost uklapanja lijeka, morfologija i veličina čestica, kristalno stanje, termička svojstva, spektralna svojstva, zeta potencijal, higroskopnost te sadržaj vode i ostatnih organskih otapala.

Kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom korištene su kao modelni topikalni terapijski sustavi za razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari. Imerzijska ćelija korištena je u kombinaciji s aparaturom s lopaticom. pH i temperatura medija (pH 5,5, 32°C) odabrani su u skladu s fiziološkim uvjetima na koži. Difuzija lijeka odvijala se preko membrane izrađene od smjese celuloznih estera, koja je pokazala nisku adsorpciju lijeka te nizak otpor difuziji lijeka. Nakon početnog zastoynog vremena količina oslobođenog lijeka postala je proporcionalna korijenu iz vremena. Nagib u linearnom području krivulje oslobađanja lijeka korišten je kao mjera brzine oslobađanja. Varijacije u brzini okretanja lopatica (25 o/min, 50 o/min, 100 o/min), visini lopatica (1 cm, 2,5 cm) i volumenu medija za ispitivanje oslobađanja (100 ml, 200 ml) nisu značajno utjecale na brzinu oslobađanja.

Analiza kitozanskih mikročestica izrađenih s kitozanim različitih molekulskih masa pokazala je da se kod povećane molekulske mase kitozana smanjuje brzina oslobađanja. S druge strane, brzina oslobađanja bila je veća pri većoj koncentraciji lijeka unutar donorskog odjeljka. Na taj je način pokazana diskriminatornost metode prema razlikama u formulaciji, kao i prema razlikama u koncentraciji uzorka unutar donorskog odjeljka ćelije. Metodom je nadalje potvrđena sličnost serija istog sastava proizvedenih istim procesom.

Metoda je validirana u skladu s ICH smjernicama. U sklopu validacije metode potvrđena je njena specifičnost, linearnost, točnost, preciznost i robusnost. Metoda je uspješno primijenjena kod kitozanskih i metakrilatnih čestica, čime je pokazan njen potencijal za karakterizaciju raznih tipova topikalnih čestičnih terapijskih sustava. Razvijena metoda može biti koristan alat u razvoju formulacije kod takvih terapijskih sustava.

# SUMMARY

Currently there are no compendial or standard methods and apparatuses for *in vitro* release testing of topical microparticles. The aim of this study was to develop and validate a discriminative *in vitro* release method for topical microparticles using the immersion cell.

For the purpose of this study chitosan-based and methacrylate-based microparticles with mupirocin were prepared by spray drying. The following characteristics of the microparticles were examined: encapsulation efficiency, particle size and morphology, crystallinity, thermal properties, spectral properties, surface charge, hygroscopicity, residual organic solvents and water content.

Chitosan-based and methacrylate-based microparticles with mupirocin were used as model topical delivery systems for *in vitro* release method development. The immersion cell was used in combination with paddle dissolution apparatus. The pH and temperature of the release medium (pH 5.5, 32°C) were selected to reflect the physiological skin conditions. Diffusion of the drug occurred across a mixed cellulose ester membrane, which demonstrated low drug adsorption and low diffusional resistance. After an initial lag phase the amount of drug released became proportional to the square root of time. The slope in the linear portion of the release curve was used as a measure of release rate. Variations in paddle rotation speed (25 rpm, 50 rpm, 100 rpm), paddle height (1 cm, 2.5 cm) and volume of release medium (100 ml, 200 ml) did not significantly alter the release rates.

Appropriate discriminatory power of the method was confirmed as the method was able to detect differences in formulation, as well as differences in drug concentration inside the sample compartment. The analysis of chitosan-based microparticles prepared with chitosans of different molecular weights has shown that the release rate decreases with increasing molecular weight of chitosan. On the other hand, the release rate increased with increasing drug concentration inside the sample compartment. The method was further used to confirm sameness between batches of the same composition prepared by the same process.

The method was validated for its specificity, linearity, accuracy, precision and robustness in line with International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines. The method was successfully applied both for chitosan-based and methacrylate-based microparticles, which demonstrates its potential application for various types of topical particulate delivery systems. The developed method can be a useful tool in formulation development of such delivery systems.

# KLJUČNE RIJEČI

- o *in vitro* ispitivanje oslobađanja djelatne tvari
- o mikročestice
- o topikalna primjena
- o imerzijska ćelija
- o razvoj metode

# SADRŽAJ

|           |                                                                                               |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>UVOD .....</b>                                                                             | <b>1</b>  |
| <b>2.</b> | <b>TEORIJSKI DIO .....</b>                                                                    | <b>4</b>  |
| 2.1.      | Otapanje lijeka .....                                                                         | 5         |
| 2.1.1.    | Matematički modeli otapanja lijeka.....                                                       | 8         |
| 2.2.      | Oslobađanje lijeka .....                                                                      | 9         |
| 2.2.1.    | Matematički modeli oslobađanja lijeka .....                                                   | 10        |
| 2.2.2.    | Oslobađanje kontrolirano difuzijom .....                                                      | 11        |
| 2.2.3.    | Oslobađanje kontrolirano bubrenjem .....                                                      | 13        |
| 2.2.4.    | Oslobađanje kontrolirano erozijom .....                                                       | 15        |
| 2.2.5.    | Higuchijeva jednačba .....                                                                    | 17        |
| 2.3.      | Ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari .....                                           | 19        |
| 2.3.1.    | Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz čvrstih oralnih ljekovitih oblika .....    | 19        |
| 2.3.2.    | Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz transdermalnih sustava.....                | 21        |
| 2.3.3.    | Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz čvrstih lipofilnih ljekovitih oblika ..... | 21        |
| 2.3.4.    | Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz ljekovitih guma za žvakanje .....          | 21        |
| 2.3.5.    | Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz polučvrstih topikalnih pripravaka .....    | 22        |
| 2.3.6.    | Ispitivanje oslobađanja iz novih/posebnih oblika .....                                        | 23        |
| 2.3.7.    | Ispitivanje oslobađanja iz prašaka .....                                                      | 24        |
| 2.3.8.    | Ispitivanje oslobađanja iz čestičnih topikalnih pripravaka .....                              | 26        |
| 2.3.9.    | Validacija metode za ispitivanje oslobađanja .....                                            | 34        |
| 2.4.      | Polimerne mikročestice .....                                                                  | 35        |
| 2.4.1.    | Primjena mikročestica .....                                                                   | 35        |
| 2.4.2.    | Metode pripreme mikročestica .....                                                            | 36        |
| 2.4.3.    | Sušenje raspršivanjem kao tehnika pripreme polimernih mikročestica .....                      | 36        |
| 2.4.4.    | Karakterizacija polimernih mikročestica .....                                                 | 39        |
| 2.4.5.    | Kitozanske mikročestice .....                                                                 | 41        |
| 2.4.6.    | Metakrilatne mikročestice .....                                                               | 44        |
| 2.5.      | Mupirocin.....                                                                                | 45        |
| <b>3.</b> | <b>CILJ RADA .....</b>                                                                        | <b>47</b> |
| 3.1.      | Specifični ciljevi .....                                                                      | 50        |
| <b>4.</b> | <b>MATERIJALI I METODE.....</b>                                                               | <b>51</b> |
| 4.1.      | Materijali.....                                                                               | 52        |
| 4.2.      | Metode .....                                                                                  | 53        |
| 4.2.1.    | Izrada mikročestica.....                                                                      | 53        |
| 4.2.2.    | Iskorištenje, sadržaj lijeka i učinkovitost uklanjanja lijeka .....                           | 54        |
| 4.2.3.    | Određivanje raspodjele veličina čestica.....                                                  | 54        |
| 4.2.4.    | Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC).....                                             | 55        |

|           |                                                                                      |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.5.    | Termogravimetrijska analiza (TGA) .....                                              | 55        |
| 4.2.6.    | Rendgenska difrakcija na prahu (XRPD) .....                                          | 55        |
| 4.2.7.    | Dinamička sorpcija pare (DVS).....                                                   | 55        |
| 4.2.8.    | Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR) .....                       | 56        |
| 4.2.9.    | Pretražna elektronska mikroskopija (SEM).....                                        | 56        |
| 4.2.10.   | Određivanje zeta potencijala .....                                                   | 56        |
| 4.2.11.   | Određivanje sadržaja visokotlačnom kromatografijom .....                             | 56        |
| 4.2.12.   | Određivanje metanola plinskom kromatografijom .....                                  | 57        |
| 4.2.13.   | Određivanje topljivosti .....                                                        | 58        |
| 4.2.14.   | Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka bez imerzijske ćelije.....                     | 59        |
| 4.2.14.1. | Aparatura s lopaticom .....                                                          | 59        |
| 4.2.14.2. | Aparatura s rotirajućim diskom .....                                                 | 60        |
| 4.2.15.   | Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka s imerzijskom ćelijom .....                    | 60        |
| 4.2.15.1. | Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka s imerzijskom ćelijom – obrada rezultata ..... | 61        |
| 4.2.15.2. | Razvoj i optimizacija metode .....                                                   | 62        |
| 4.2.16.   | Validacija metode .....                                                              | 63        |
| <b>5.</b> | <b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>                                                    | <b>65</b> |
| 5.1.      | Priprava mikročestica .....                                                          | 66        |
| 5.2.      | Morfologija mikročestica .....                                                       | 66        |
| 5.3.      | Veličina mikročestica .....                                                          | 68        |
| 5.4.      | XRPD analiza.....                                                                    | 69        |
| 5.5.      | DSC analiza.....                                                                     | 70        |
| 5.6.      | IR analiza .....                                                                     | 71        |
| 5.7.      | Zeta potencijal .....                                                                | 73        |
| 5.8.      | Sadržaj vode i higroskopnost uzoraka.....                                            | 74        |
| 5.9.      | Sadržaj metanola .....                                                               | 77        |
| 5.10.     | Topljivost.....                                                                      | 78        |
| 5.11.     | Razvoj HPLC metode.....                                                              | 78        |
| 5.12.     | Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka bez imerzijske ćelije.....                     | 79        |
| 5.12.1.   | Aparatura s lopaticom.....                                                           | 79        |
| 5.12.2.   | Aparatura s rotirajućim diskom .....                                                 | 80        |
| 5.13.     | Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka s imerzijskom ćelijom – razvoj metode .....    | 81        |
| 5.13.1.   | Aparatura i medij .....                                                              | 81        |
| 5.13.2.   | Odabir membrane .....                                                                | 83        |
| 5.13.3.   | Uzorkovanje .....                                                                    | 87        |
| 5.14.     | Utjecaj varijacija parametara metode na brzinu oslobađanja.....                      | 91        |
| 5.15.     | Validacija metode .....                                                              | 93        |
| 5.16.     | Primjena metode.....                                                                 | 96        |
| 5.16.1.   | Usporedba različitih formulacija i različitih koncentracija lijeka .....             | 96        |
| 5.16.2.   | Usporedba serija istog sastava i proizvodnog procesa.....                            | 99        |



|                                               |            |
|-----------------------------------------------|------------|
| <b>6. ZAKLJUČCI .....</b>                     | <b>101</b> |
| <b>LITERATURA .....</b>                       | <b>104</b> |
| <b>ŽIVOTOPIS .....</b>                        | <b>113</b> |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....</b> | <b>115</b> |
| <b>BASIC DOCUMENTATION CARD .....</b>         | <b>116</b> |

# **1. UVOD**

Oslobađanje djelatne tvari iz ljekovitog oblika je proces u kojem djelatna tvar napušta ljekoviti oblik, otapa se te postaje dostupna za apsorpciju i farmakološki učinak. Stoga je ispitivanje oslobađanja djelatne tvari jedan od osnovnih testova pri karakterizaciji ljekovitog pripravka kako tijekom razvoja formulacije tako i za potrebe kontrole kvalitete.

Ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari originalno je razvijeno za čvrste oralne pripravke, ali u posljednje je vrijeme primjena ovog testa proširena i na brojne druge ljekovite oblike (tablete za žvakanje, gume za žvakanje, suspenzije, supozitoriji, transdermalni terapijski sustavi, polučvrsti oblici, implantati, parenteralni mikročestični sustavi, liposomi itd.). Međutim, dok su kod nekih oblika metode i uređaji za ispitivanje oslobađanja standardizirani gotovo na globalnoj razini (u okviru tekućeg procesa harmonizacije farmaceutskih regulatornih zahtjeva) te farmakopejom propisani, za druge je još uvijek potreban razvoj i standardizacija testa za oslobađanje djelatne tvari. Mikročestice (i prašci općenito) ubrajaju se u takve oblike, kod kojih su potrebna dodatna istraživanja kako bi se mogla preporučiti prikladna metoda za ispitivanje oslobađanja (Brown i sur., 2011).

Kod standardnih metoda za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz oralnih oblika pripravak se unosi u relativno velik volumen medija i izlaže miješanju, što (u vrlo pojednostavljenom obliku) odražava situaciju kojoj je oralni pripravak izložen *in vivo*. Međutim, kod razvoja metoda za ispitivanje oslobađanja iz pripravaka za topikalnu primjenu valja uzeti u obzir malu količinu tekućine s kojom ti pripravci dolaze u dodir na mjestu primjene te odsutnost miješanja u fiziološkim uvjetima. Pritom postaje jasno da standardne metode i aparature koje se koriste za ispitivanje oslobađanja iz oralnih pripravaka ne simuliraju dobro uvjete kojima je topikalni pripravak izložen *in vivo*.

Istraživanje brzine oslobađanja iz topikalnih pripravaka vrlo je aktualna tema, te je nedavno u Američku farmakopeju uvedeno novo poglavlje <1724> koje opisuje aparature i način *in vitro* ispitivanja oslobađanja lijeka iz polučvrstih pripravaka namijenjenih za topikalnu primjenu. Za ispitivanje brzine oslobađanja iz polučvrstih topikalnih pripravaka koriste se tri tipa difuzijskih ćelija: vertikalna difuzijska ćelija (Franzova ćelija), imerzijska ćelija (Enhancer ćelija) i modificirana aparatura s protočnom ćelijom. Kod svih navedenih aparatura dolazi do difuzije lijeka iz donorskog odjeljka s pripravkom u receptorski odjeljak s receptorskim medijem preko visoko propusne membrane koja služi kao inertni nosač (USP, 2015a).

Važno je naglasiti da se *in vitro* ispitivanjem oslobađanja iz topikalnih pripravaka ne može direktno predvidjeti *in vivo* učinak lijeka s obzirom da su bioraspoloživost i klinička izvedba kod topikalnih pripravaka primarno uvjetovani barijernim svojstvima epitela (kože ili

sluznice) na koji je pripravak primijenjen. Ipak, *in vitro* testovima oslobađanja lijeka mogu se detektirati promjene koje mogu odgovarati promijenjenoj *in vivo* izvedbi ljekovitog pripravka. Te promjene mogu biti posljedica razlika u fizičko-kemijskim karakteristikama djelatne i/ili pomoćnih tvari, razlika u proizvodnom procesu, utjecaja uvjeta skladištenja itd. (USP, 2015a).

Čestični topikalni pripravci (npr. polimerne mikročestice namijenjene za primjenu na kožu ili sluznicu) su napredni oblik topikalnih prašaka. Primjena topikalnih prašaka opisana je u farmakopejama. Topikalni prašci se mogu primijeniti izravno na kožu ili se mogu nanijeti na zavoje ili odjeću (Ph.Eur., 2015a; USP, 2015b). U Američku farmakopeju uključene su monografije za nekoliko topikalnih prašaka s antibakterijskim i antimikotičkim djelovanjem.

Za čestične topikalne pripravke ne postoje propisane ili standardne metode i aparature za *in vitro* ispitivanje oslobađanja djelatne tvari. U nedostatku propisanih aparatura i metoda istraživači se za potrebe svojih ispitivanja koriste raznim dostupnim aparaturama (aparatura s lopaticom, aparatura s košaricom, protočna ćelija, vrećica za dijalizu, Franzova difuzijska ćelija itd.). Pregledom literature nije pronađen primjer istraživanja kod kojeg bi se za ispitivanje oslobađanja iz čestičnih pripravaka za topikalnu primjenu koristila imerzijska ćelija.

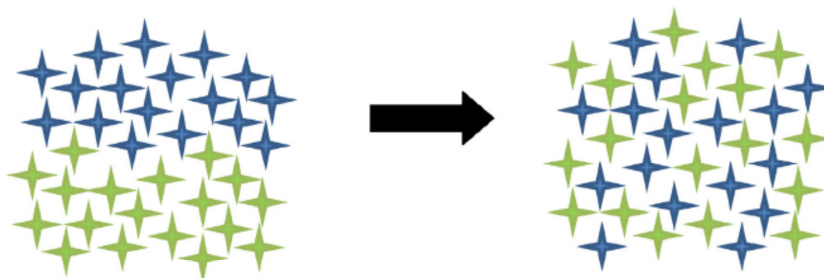
## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Otapanje lijeka

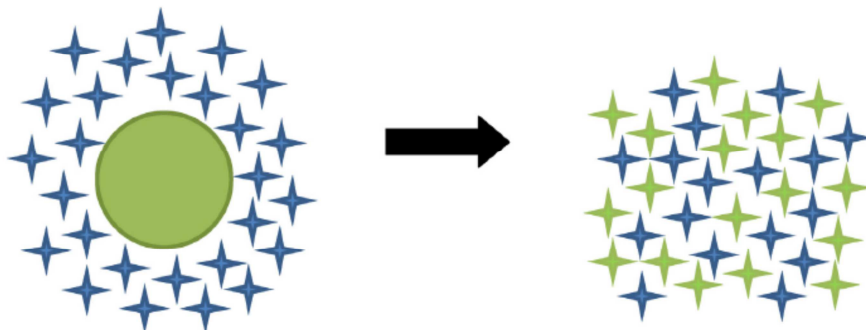
Otapanje lijeka preduvjet je za njegov učinkovit transport kroz tijelo, te za njegovu bioraspoloživost i terapijski učinak. Lijek se otapa u kontaktu s tjelesnim tekućinama, te prolazi razne barijere u organizmu kako bi stigao do ciljanog odredišta. Difuzijski procesi često igraju ključnu ulogu u prolazu bioloških barijera, kao što je primjerice sluznica probavnog sustava. Ukratko, difuzija je spontani prijelaz tvari otopljene u plinu, tekućini ili krutini iz područja njene više koncentracije u područje niže koncentracije. Važno je istaknuti da sposobnost difuzije imaju samo otopljene molekule/ioni/atom i lijeka.

Prema IUPAC-u pojam otapanja (engl. *dissolution*) definiran je kao miješanje dviju faza pri čemu se stvara jedna nova homogena faza (tj. otopina) (IUPAC, 1997). Ovaj je proces shematski prikazan na slici 1a. U početku su dvije faze odvojene, s jasnom granicom među njima. Zatim dolazi do miješanja dviju faza i stvaranja nove homogene faze, otopine (granica između dviju polaznih faza nestaje).

(a) IUPAC-ova definicija otapanja



(b) otapanje čvrste čestice lijeka u vodi

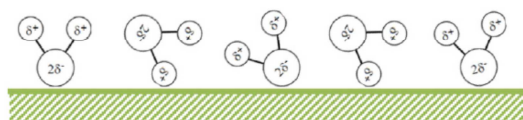


Slika 1. Shematski prikaz (a) IUPAC-ove definicije otapanja, (b) otapanja čvrste čestice lijeka u vodenom mediju (Siepmann i Siepmann, 2013).

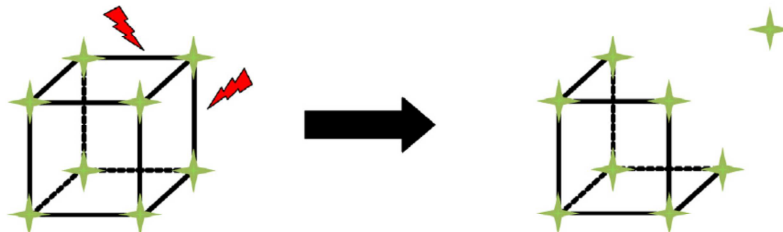
U slučaju čvrste čestice lijeka koja se otapa u vodenom mediju, jedna je faza lijek (u obliku kristala ili amorfne čestice), a druga je faza vodeni medij. Otapanjem lijeka također nestaje granica između dviju faza i nastaje jedna homogena faza (vodena otopina lijeka) (slika 1b). Ovaj se proces može podijeliti u 5 glavnih koraka (slika 2):

- 1) Močenje površine čestice lijeka vodom
- 2) Pucanje veza čvrstog stanja u čestici lijeka (npr. privlačne elektrostatske sile u kristalu koji se sastoji od kationa i aniona)
- 3) Pojedinačne molekule/ioni/atomi lijeka bivaju okruženi slojem molekula vode
- 4) Pojedinačne molekule/ioni/atomi lijeka difundiraju s površine čestice lijeka kroz površinski stacionarni sloj medija do mase miješanog medija. Tanki površinski stacionarni sloj medija postoji čak i pri snažnom miješanju medija (zbog adhezivnih sila), a njegova debljina ovisi o stupnju miješanja
- 5) Prijenos (konvekcija) molekula/ionatoma lijeka kroz tekućinu, uzrokovan miješanjem tekućine (Siepmann i Siepmann, 2013)

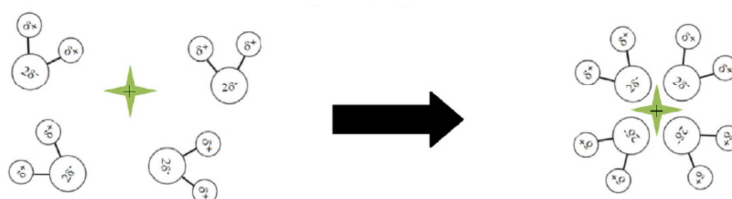
(a) močenje površine čestice vodom



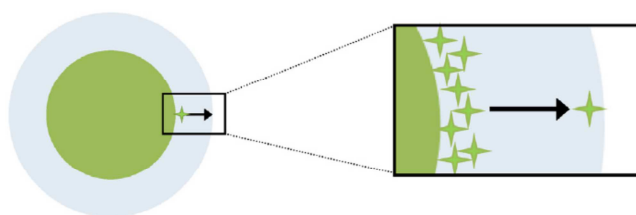
(b) pucanje veza čvrstog stanja, npr. u kristalu



(c) solvatacija pojedinačnih molekula/iona/atoma



(d) difuzija kroz stacionarni površinski sloj medija



(e) prijenos tvari (konvekcija) u dobro miješanom mediju



Slika 2. Shematski prikaz pet glavnih koraka uključenih u proces otapanja čvrste čestice lijeka u dobro miješanom vodenom mediju: (a) močenje čestice lijeka vodom, (b) pucanje veza čvrstog stanja, (c) okruživanje pojedinačnih molekula/iona/atoma slojem molekula vode, (d) difuzija pojedinačnih molekula/iona/atoma lijeka kroz stacionarni površinski sloj medija, (e) prijenos tvari (konvekcija) u dobro miješanom mediju (Siepmann i Siepmann, 2013).



### 2.1.1. Matematički modeli otapanja lijeka

Otapanje lijeka najčešće se matematički opisuje Noyes-Whitney jednadžbom, Nernst-Brunner jednadžbom ili Hixson-Crowell jednadžbom.

#### *Noyes-Whitney jednadžba*

Arthur A. Noyes i Willis R. Whitney krenuli su od pretpostavke da je difuzija lijeka kroz površinski stacionarni sloj medija (slika 2d) najsporiji korak u otapanju lijeka, te da stoga taj korak određuje brzinu otapanja (engl. *rate determining step*). Ispitivanjem brzine otapanja benzojeve kiseline i olovnog klorida u vodi pokazali su da je brzina otapanja lijeka proporcionalna razlici koncentracije zasićene otopine i trenutne koncentracije u otopini, što opisuje poznata Noyes-Whitney jednadžba:

$$\frac{dc}{dt} = K (c_s - c_t)$$

gdje je  $dc/dt$  brzina otapanja,  $K$  konstanta,  $c_s$  topljivost tvari, a  $c_t$  koncentracija otopljene tvari u vremenu  $t$  (Noyes i Whitney, 1897; Siepmann i Siepmann, 2013).

#### *Nernst-Brunner jednadžba*

Značenje konstante  $K$  iz Noyes-Whitney jednadžbe dodatno je razjašnjeno Nernst-Brunner jednadžbom:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{S * D}{\delta} (c_s - c_t)$$

gdje je  $dM$  količina tvari koja se otopi u vremenskom intervalu  $dt$ ,  $S$  je površina dostupna za difuziju/otapanje,  $D$  difuzijski koeficijent lijeka u površinskom stacionarnom sloju medija,  $\delta$  debljina tog sloja,  $c_s$  topljivost lijeka, a  $c_t$  koncentracija lijeka u masi miješanog medija u vremenu  $t$ . Usporedbom Noyes-Whitney jednadžbe i Nernst-Brunner jednadžbe može se zaključiti da za konstantu  $K$  vrijedi  $K = S*D/(\delta*V)$ , gdje je  $V$  volumen medija.

Iz Nernst-Brunner jednadžbe slijede moguće strategije povećanja brzine otapanja lijeka (npr. kako bi se povećala bioraspoloživost u slučaju slabo topljivog lijeka):

- 1) Povećanje površine dostupne za otapanje, primjerice smanjenjem veličine čestica

- 2) Povećanje prividne topljivosti lijeka, npr. dodatkom surfaktanta ili ciklodekstrina ili uklapanjem u polimerne micelle ili liposome
- 3) Održavanje niske koncentracije lijeka u mediju, npr. brzim odvođenjem lijeka s mjesta otapanja
- 4) Smanjenje debljine stacionarnog površinskog sloja medija, npr. povećanjem brzine miješanja
- 5) Povećanje difuzijskog koeficijenta lijeka u stacionarnom površinskom sloju medija, npr. smanjenjem viskoznosti medija

(Valja napomenuti da posljednje dvije strategije generalno nije moguće primijeniti *in vivo*.)

### *Hixson-Crowell jednadžba*

I kod Noyes-Whitney jednadžbe i kod Nernst-Brunner jednadžbe namjerno je zanemaren utjecaj promjene površine tvari koja se otapa. Uzevši u obzir činjenicu da se u stvarnosti površina tvari koja se otapa često mijenja s vremenom (npr. pri otapanju kugle polumjer kugle se kontinuirano smanjuje, pa se i površina čestice smanjuje s vremenom), Hixson i Crowell došli su do sljedeće jednadžbe:

$$\sqrt[3]{M_t} = \sqrt[3]{M_0} - kt$$

gdje je  $M_0$  masa čestice u vremenu  $t=0$ ,  $M_t$  masa čestice u vremenu  $t$ , a  $k$  je konstanta. Valja istaknuti da je Hixson-Crowell jednadžba razvijena pod pretpostavkama da su pri otapanju ispunjeni uvjeti osigurane topljivosti, da je čestica sferičnog oblika, da se geometrijski oblik čestice ne mijenja s vremenom, te da se sama čestica pri otapanju ne raspada u manje dijelove (Siepmann i Siepmann, 2013).

## **2.2. Oslobađanje lijeka**

Pojmovi „otapanje lijeka“ (engl. *drug dissolution*) i „oslobađanje lijeka“ (engl. *drug release*) nisu nužno sinonimi, iako se u literaturi često može naići na naizmjenično korištenje ovih pojmova. Otapanje lijeka obuhvaća pet prethodno opisanih koraka (slika 2), dok je oslobađanje lijeka znatno kompleksniji pojam (koji uključuje i otapanje lijeka).

Ovisno o tipu lijeka, dozi, vrstama i količinama pomoćnih tvari, uvjetima pri oslobađanju lijeka, tehnici pripreme, te obliku i geometriji terapijskog sustava, u oslobađanje lijeka mogu primjerice biti uključeni sljedeći fenomeni:

- močenje terapijskog sustava vodom
- penetracija vode u terapijski sustav
- fazni prijelaz polimernih ekscipijensa (npr. iz staklastog u gumasto stanje)
- otapanje lijeka i ekscipijensa
- otežano otapanje lijeka i ekscipijensa zbog ograničene topljivosti i/ili brzine otapanja pri zadanim uvjetima
- razgradnja lijeka i ekscipijensa
- otapanje i/ili taloženje razgradnih produkata
- nastanak pora ispunjenih vodom
- zatvaranje pora zbog bubrenja polimera
- stvaranje značajnog hidrostatskog tlaka unutar terapijskog sustava
- konvekcijsko oslobađanje lijeka uzrokovano hidrostatskim tlakom unutar terapijskog sustava
- nastanak kisele ili lužnate mikrookoline unutar ljekovitog oblika zbog prisutnosti razgradnih produkata
- promjena brzine razgradnje lijeka i/ili ekscipijensa zbog promjene u pH vrijednosti mikrookoline
- promjena topljivosti lijeka i/ili ekscipijensa zbog promjene uvjeta u mikrookolini (npr. pH, ionska jakost itd.)
- otežano oslobađanje lijeka i/ili ekscipijensa zbog značajne koncentracije lijeka/ekscipijensa u mediju (nisu ispunjeni uvjeti osigurane topljivosti)
- promjene u dimenzijama i/ili geometriji terapijskog sustava uzrokovane smičnim naprezanjem (Siepmann i Siepmann, 2008).

### **2.2.1. Matematički modeli oslobađanja lijeka**

Takeru Higuchi je 1961. godine objavio danas slavnu jednadžbu kojom se na iznenađujuće jednostavan način može opisati oslobađanje lijeka iz tankog sloja masti koja sadrži dispergirani neotopljeni lijek. Higuchijeva jednadžba predstavlja početak kvantitativnog pristupa oslobađanju lijeka iz ljekovitih pripravaka, pa se Higuchi smatra

„ocem“ matematičkog modeliranja oslobađanja lijeka. Brojni matematički modeli oslobađanja lijeka koji su otad predloženi mogu se podijeliti u mehanističke realistične modele i empirijske modele.

Mehanistički se modeli temelje na stvarnim fenomenima, kao što su difuzija, otapanje, bubrenje, taloženje i razgradnja. Oslobađanje lijeka u pravilu se sastoji od niza procesa (koraka). Ukoliko je jedan od koraka puno sporiji od ostalih, brzi se procesi mogu zanemariti kod kvantifikacije konačne brzine oslobađanja. Drugim riječima, matematički model oslobađanja u tom slučaju može biti ograničen samo na najsporiji korak u nizu, čime se smanjuje kompleksnost matematičkih jednadžbi. Mehanistički se modeli mogu podijeliti prema procesu koji dirigira brzinu oslobađanja (difuzija, bubrenje ili erozija). Korištenjem mehanističkih modela može se kvantitativno predvidjeti utjecaj formulacijskih i procesnih parametara na profile oslobađanja. U pravilu što je model bliži stvarnosti, to je veća i njegova složenost.

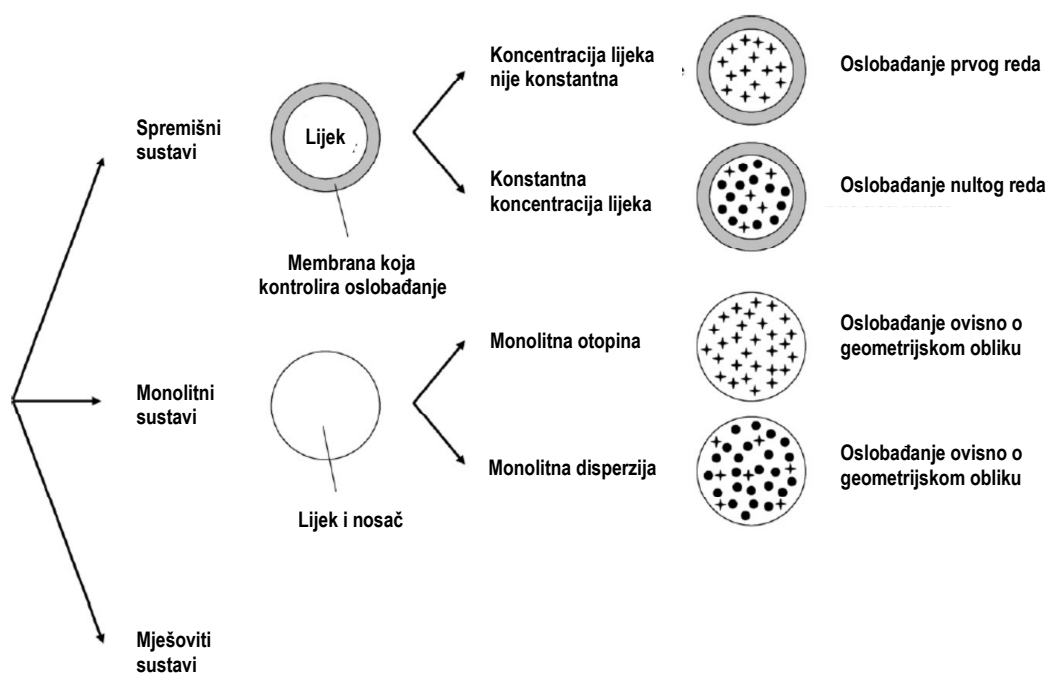
S druge strane, empirijski modeli najčešće su predstavljeni jednostavnim jednadžbama, a njihov je cilj samo da opišu ponašanje sustava na makroskopskom nivou, neovisno o pozadini tog ponašanja na mikroskopskom nivou. Drugim riječima, empirijski se modeli ne temelje na stvarnim fizičkim, kemijskim ili biološkim fenomenima. Stoga se korištenjem empirijskih modela ne može dobiti uvid u mehanizam oslobađanja (Grassi i sur., 2007; Siepmann i Siepmann, 2008).

### **2.2.2. Oslobađanje kontrolirano difuzijom**

Terapijski sustavi kod kojih je oslobađanje primarno kontrolirano difuzijom mogu se podijeliti na sljedeći način:

- 1) Spremišni sustavi, okruženi membranom koja kontrolira brzinu oslobađanja
- 2) Monolitni (matriksni) sustavi, kod kojih je lijek jednolično uklopljen/raspršen u nosaču
- 3) Mješoviti sustavi

Svaki od ovih sustava može se dalje podijeliti ovisno o tome je li početna koncentracija lijeka veća ili manja od topljivosti lijeka u terapijskom sustavu (slika 3) (Siepmann i Siepmann, 2008; Siepmann i Siepmann, 2012).



Slika 3. Klasifikacija terapijskih sustava kod kojih je oslobađanje primarno kontrolirano difuzijom. Križići predstavljaju pojedinačne molekule lijeka, a crni kružići kristale lijeka ili amorfnе agregate. Na slici su prikazani samo sferični oblici, ali klasifikacija je primjenjiva i na ostale geometrijske oblike (Siepmann i Siepmann, 2008).

U slučaju spremišnih sustava s početnom koncentracijom lijeka nižom od topljivosti u sustavu, oslobađanje lijeka iz sustava dovodi do pada koncentracije lijeka unutar membrane. Oslobađanje lijeka u ovom slučaju slijedi kinetiku prvog reda, odnosno brzina oslobađanja je proporcionalna preostaloj količini lijeka u sustavu:

$$\frac{dc}{dt} = k_1 c$$

gdje je  $c$  koncentracija lijeka,  $t$  vrijeme, a  $k_1$  konstanta prvog reda.

Ukoliko je početna koncentracija lijeka veća od topljivosti u terapijskom sustavu, oslobođene molekule lijeka bivaju zamijenjene otapanjem lijeka iz kristala ili amorfnih agregata. Na taj se način unutar membrane održava konstantna koncentracija lijeka (koncentracija zasićene otopine), a oslobađanje lijeka slijedi kinetiku nultog reda:

$$\frac{dc}{dt} = k_0$$

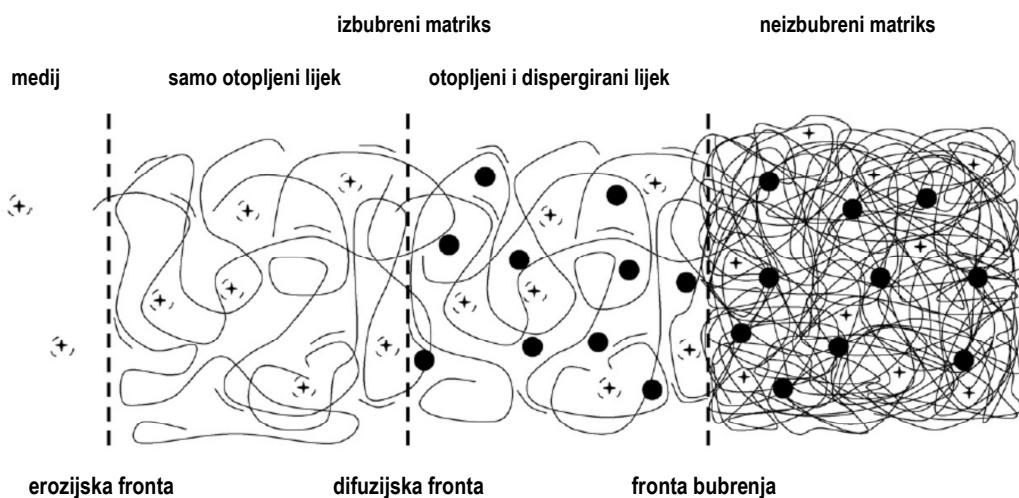
gdje je  $k_0$  konstanta nultog reda.

U slučaju monolitnih (matriksnih) sustava kinetika oslobađanja lijeka ovisi o geometriji terapijskog sustava. Ukoliko je početna koncentracija lijeka manja od topljivosti lijeka, molekule lijeka su otopljene u matriksu nosača (monolitne otopine). U literaturi su opisani kompleksni matematički modeli za pojedine geometrijske oblike monolitnih otopina (tanki film, kugla, cilindar) (Siepmann i Siepmann, 2008).

Matematički modeli za monolitne disperzije još su složeniji. Za najjednostavniji slučaj monolitne disperzije u obliku tankog filma koristi se Higuchijeva jednadžba, opisana u poglavlju 2.2.5.

### **2.2.3. Oslobađanje kontrolirano bubrenjem**

Fizički fenomeni prisutni kod terapijskih sustava koji bubre shematski su prikazani na slici 4. U dodiru s medijem voda difundira u sustav, pokretljivost polimernih lanaca ekscipijensa se povećava i dolazi do prijelaza polimera iz staklastog u gumasto stanje. Povećana pokretljivost polimernih lanaca ekscipijensa dovodi i do povećane pokretljivosti lijeka. Zbog koncentracijskog gradijenta i povećane pokretljivosti, otopljene molekule lijeka difundiraju kroz izbubreni matriks u medij. Ukoliko postoji suvišak neotopljenog lijeka u terapijskom sustavu (početna koncentracija veća od topljivosti), koncentracija otopljenog lijeka u polimernom matriksu biti će konstantna (koncentracija zasićene otopine). Uslijed hidratacije polimera te otapanja i difuzije lijeka stvaraju se tri pomične fronte: fronta bubrenja, difuzijska fronta i erozijska fronta (Siepmann i Siepmann, 2008; Grassi i sur, 2007).



Slika 4. Shematski prikaz terapijskog sustava kod kojeg je oslobađanje kontrolirano bubrenjem. Na lijevoj je strani dio terapijskog sustava izložen mediju, a na desnoj suha staklasta jezgra terapijskog sustava. Prisutne su tri pomične fronte: (1) fronta bubrenja odvaja izbubreni i neizbubreni matriks, (2) difuzijska fronta odvaja izbubreni matriks koji sadrži samo otopljeni lijek i izbubreni matriks koji sadrži otopljeni i dispergirani lijek, (3) erozijska fronta odvaja medij od terapijskog sustava. Križići predstavljaju otopljeni lijek, a crni kružići dispergirani lijek (Siepmann i Siepmann, 2008).

U najjednostavnijem slučaju kada homogeni terapijski sustav ima oblik tankog filma, te ukoliko je relaksacija polimera najsporiji korak u oslobađanju lijeka (ostali fenomeni, npr. difuzija i otapanje su mnogo brži), oslobađanje lijeka će se odvijati kinetikom nultog reda jer je brzina pomicanja fronte bubrenja konstantna (Siepmann i Siepmann, 2008).

Često korišten jednostavni poluempirijski model oslobađanja lijeka je takozvani eksponencijalni zakon (engl. *power law*) ili Peppasova jednadžba:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

gdje je  $M_t$  ukupna količina lijeka oslobođena u vremenu  $t$ ,  $M_\infty$  ukupna količina lijeka oslobođena u beskonačnom vremenu,  $k$  konstanta koja uključuje strukturna i geometrijska svojstva sustava, te  $n$  eksponent oslobađanja koji može upućivati na mehanizam oslobađanja

(Siepmann i Peppas, 2001).

Eksponecijalni zakon temelji se na opažanju da su u oslobađanje lijeka iz polimernog matriksa koji bubri često uključena dva fenomena: relaksacija polimernih lanaca i Fickova difuzija. U slučaju geometrije tankog filma vrijednost eksponenta  $n = 0,5$  ukazuje na oslobađanje lijeka kontrolirano difuzijom, dok vrijednost  $n = 1,0$  ukazuje na oslobađanje kontrolirano relaksacijom polimera (transport tipa II). Vrijednosti eksponenta  $n$  između 0,5 i 1,0 ukazuju na superpoziciju dvaju fenomena, odnosno kombinaciju relaksacije i difuzije (anomalni transport). Vrijednost eksponenta  $n$  ovisna je o geometriji sustava, kao što je prikazano u tablici 1 (Arifin i sur., 2006; Siepmann i Peppas, 2001).

Tablica 1. Vrijednost eksponenta  $n$  i mehanizam oslobađanja lijeka iz polimernih terapijskih sustava različitih geometrija

| Eksponent $n$   |                   |                   | Mehanizam oslobađanja |
|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Tanki film      | Cilindar          | Kugla             |                       |
| 0,5             | 0,45              | 0,43              | Fickova difuzija      |
| $0,5 < n < 1,0$ | $0,45 < n < 0,89$ | $0,43 < n < 0,85$ | Anomalni transport    |
| 1,0             | 0,89              | 0,85              | Relaksacija polimera  |

#### 2.2.4. Oslobađanje kontrolirano erozijom

Erozija je proces gubitka materijala (monomera, oligomera ili većih jedinica mase) iz mase polimera. Erozija je kompleksan proces koji može uključivati brojne fenomene prijenosa mase i kemijske reakcije kao što su na primjer:

- ulazak vode u sustav
- otapanje lijeka
- razgradnja polimera
- stvaranje vodenih pora
- difuzija lijeka ili produkata razgradnje polimera kroz polimerni matriks
- kristalizacija lijeka ili produkata razgradnje polimera
- promjene pH u mikrookolini unutar polimernog matriksa uzrokovane razgradnim produktima
- difuzija lijeka ili produkata razgradnje polimera kroz vodene pore

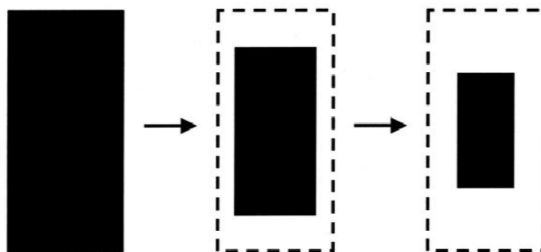


- promjena pH mikrookoline unutar sustava uzrokovana ulazom medija
- autokatalitički efekti pri razgradnji polimera
- osmotski efekti
- bubrenje polimera
- konvekcijski procesi
- adsorpcijski/desorpcijski procesi

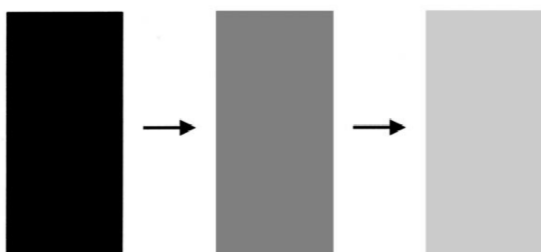
S obzirom da iz praktičnih razloga pri izradi matematičkog modela nije moguće uzeti u obzir sve ove fenomene, potrebno je identificirati dominantne fizičke i kemijske procese za pojedini promatrani sustav (Siepmann i Göpferich, 2001).

Razlikuju se dva osnovna mehanizma erozije: površinska erozija i erozija u masi (engl. *bulk erosion*) (slika 5). U pravilu se površinska erozija očekuje kod polimera s više reaktivnim funkcionalnim skupinama (npr. polianhidridi), dok je erozija u masi tipična za polimere s manje reaktivnim funkcionalnim skupinama (npr. poliesteri) (Arifin i sur., 2006; Siepmann i Göpferich, 2001).

#### Površinska erozija



#### Erozija u masi



Slika 5. Shematski prikaz površinske erozije i erozije u masi (Siepmann i Göpferich, 2001)

U literaturi su opisani empirijski i mehanistički matematički modeli za oslobađanje kontrolirano erozijom. Empirijski modeli se uglavnom odnose na sustave koji erodiraju površinski, te pretpostavljaju da se lijek oslobađa kinetikom nultog reda (npr. Hopfenberg i Cooney modeli). Mehanistički modeli uzimaju u obzir fizičko-kemijske fenomene kao što su difuzijski prijenos mase i kemijske reakcije u sustavu. Neki mehanistički modeli erozije koriste Monte Carlo tehniku za simulaciju razgradnje polimera kao slučajnog događaja (Siepmann i Göpferich, 2001).

### 2.2.5. Higuchijsva jednadžba

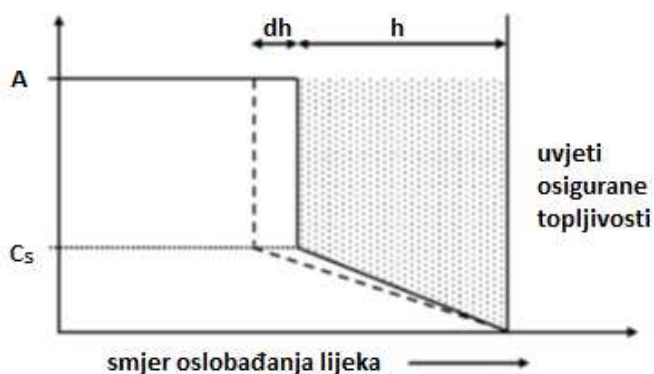
Brzinu oslobađanja lijeka dispergiranog u tankom sloju (filmu) masti opisao je Higuchi (1961). Pritom je u obzir uzeo sljedeće pretpostavke:

- a) Početna koncentracija lijeka u pripravku značajno je veća od topljivosti lijeka u nosaču (podlozi) pripravka.
- b) Površina tankog sloja masti je puno veća od njegove debljine pa je utjecaj rubova zanemariv (tanki sloj masti ima geometriju filma).
- c) Lijek je fino dispergiran u podlozi (veličina čestica lijeka je mnogo manja od debljine filma).
- d) Lijek je inicijalno homogeno dispergiran u pripravku.
- e) Nosač pripravka (podloga) se ne otapa i ne bubri tijekom eksperimenta.
- f) Otapanje čestica lijeka u podlozi je brzo u usporedbi s difuzijom lijeka.
- g) Difuzijski koeficijent lijeka u pripravku je konstantan (ne ovisi o vremenu i poziciji).
- h) Uvjeti osigurane topljivosti su održani tijekom cijelog eksperimenta (koncentracija lijeka u receptorskom odjeljku je zanemariva).

U doticaju pripravka s medijem dolazi do difuzije otopljenog lijeka iz pripravka u medij. Na početku u medij difundiraju molekule lijeka koje su najbliže površini pripravka koja je izložena mediju. Oslobođene molekule bivaju brzo zamijenjene otapanjem dodatne količine lijeka iz dispergiranih čestica lijeka. Koncentracija lijeka u tom sloju pripravka ostaje konstantna (koncentracija zasićene otopine) dokle god u njemu postoji suvišak neotopljenog lijeka. Tek kad se iscrpi sav neotopljeni lijek iz površinskog sloja pripravka, koncentracija lijeka u tom sloju pada ispod koncentracije zasićene otopine. Zbog koncentracijskog gradijenta tada i molekule lijeka iz sljedećeg sloja masti počinju difundirati prema

receptorskom odjeljku. I u ovom sljedećem sloju održava se konstantna koncentracija lijeka sve dok u njemu postoji suvišak neotopljenog lijeka.

Nakon određenog vremena  $t$  koncentracijski profil lijeka u pripravku može se shematski prikazati kako je prikazano na slici 6. Na udaljenosti  $h$  od površine pripravka nalazi se takozvana difuzijska fronta, koja odjeljuje dio pripravka u kojem još postoji neotopljeni lijek u suvišku i dio pripravka u kojem više nema neotopljenog lijeka. Na toj udaljenosti od površine pripravka koncentracija lijeka naglo raste od koncentracije zasićene otopine ( $C_s$ ) do početne koncentracije lijeka ( $A$ ). Nakon dodatnog intervala vremena  $dt$  difuzijska fronta se pomiče dalje od površine pripravka i dobiva se koncentracijski profil prikazan iscrtkanom linijom na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz koncentracijskog profila kod oslobađanja lijeka iz masti u vremenu  $t$  (puna linija) te u vremenu  $t+dt$  (iscrtkana linija). Pripravak je u doticaju s receptorskim medijem u kojem su ispunjeni uvjeti osigurane topljivosti (Siepmann i Peppas, 2011).

Pod navedenim se uvjetima oslobađanje lijeka iz masti može opisati sljedećom jednačinom:

$$Q = \sqrt{2 * A * D * C_s * t}$$

gdje je  $A$  ukupna količina lijeka u otopini i u suspenziji,  $D$  difuzijski koeficijent lijeka kroz matriks pripravka,  $C_s$  topljivost lijeka u pripravku, a  $t$  vrijeme. Može se zaključiti da je

količina oslobođenog lijeka  $Q$  proporcionalna korijenu iz vremena  $\sqrt{t}$  (Higuchi, 1961; Siepmann i Peppas, 2011; Siepmann i Siepmann, 2013).

## **2.3. Ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari**

Ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari danas je nezaobilazan alat u razvoju formulacije, praćenju proizvodnog procesa i kontroli kvalitete lijekovitog pripravka, a pod određenim se uvjetima može koristiti i kao surogat za bioekvivalencijska ispitivanja. Stoga je zanimljivo istaknuti da su se prvi regulatorni propisi za ispitivanje brzine oslobađanja pojavili tek 1970. godine. Naime, te je godine u Američku farmakopeju po prvi put uključen test brzine oslobađanja u monografije za 12 oralnih lijekovitih pripravaka. Kod tih je prvih farmakopejskih testova korištena aparatura s košaricom. Nakon toga, uslijedio je razvoj dodatnih aparatura za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari (danas najrasprostranjenija aparatura s lopaticom prvi je puta uključena u Američku farmakopeju 1978. godine), te njihovo usavršavanje i standardizacija (Krämer i sur., 2005; Shah, 2005).

Danas su metode i uređaji za ispitivanje oslobađanja iz pojedinih lijekovitih (prvenstveno oralnih) oblika standardizirani gotovo na globalnoj razini, u okviru tekućeg procesa harmonizacije farmaceutskih regulatornih zahtjeva.

### **2.3.1. Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz čvrstih oralnih lijekovitih oblika**

U Europskoj i Američkoj farmakopeji opisane su četiri aparature za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz čvrstih oralnih pripravaka (slika 7):

#### **1) Aparatura 1 (aparatura s košaricom)**

Aparatura 1 sastoji se od cilindrične posude s hemisferičnim dnom, izrađene od stakla ili nekog drugog inertnog i prozirnog materijala, te miješala s cilindričnom košaricom izrađenog od nehrđajućeg čelika. Pripravak se unosi u košaricu prije pokretanja testa. Rotacijom miješala oko svoje osi postiže se miješanje medija u posudi.

#### **2) Aparatura 2 (aparatura s lopaticom)**

Aparatura 2 sastoji se od cilindrične posude s hemisferičnim dnom, izrađene od stakla ili nekog drugog inertnog i prozirnog materijala, te miješala s lopaticom izrađenog od

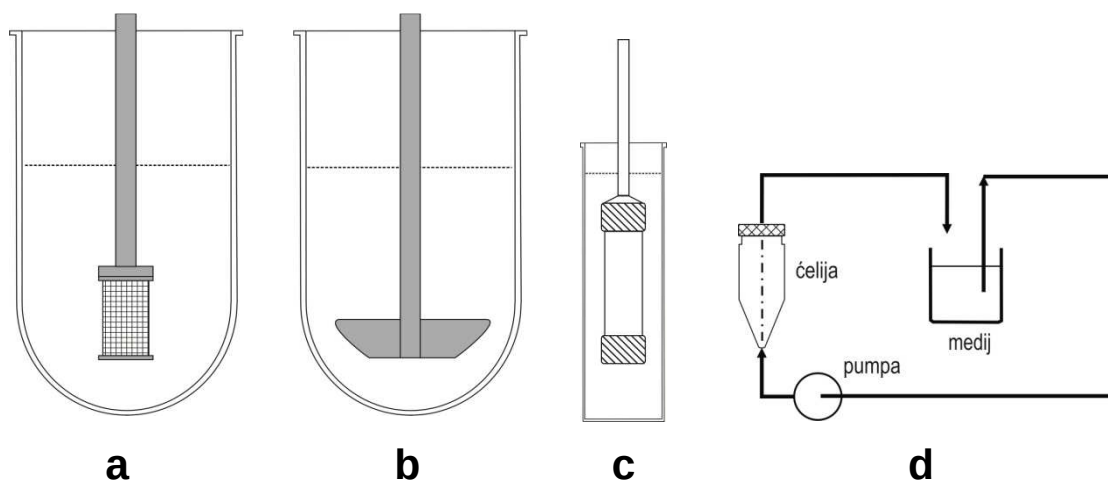
nehrđajućeg čelika. Pripravak se unosi u posudu s medijem. Rotacijom miješala oko svoje osi postiže se miješanje medija u posudi.

### 3) Aparatura 3 (aparatura s uranjajućim cilindrom)

Aparatura 3 sastoji se od cilindrične staklene posude ravnog dna i staklenog cilindra s poklopcima. Pripravak se unosi u stakleni cilindar. Cilindar se pomiče po vertikalnoj osi, uranja u posudu s medijem i na taj način se postiže miješanje medija.

### 4) Aparatura 4 (protočna ćelija)

Aparatura 4 sastoji se od protočne ćelije od inernog i prozirnog materijala i pumpe koja medij tjera kroz ćeliju odozdo prema gore. Pripravak se unosi u ćeliju. Pulsirajućim pumpanjem medija kroz ćeliju postiže se miješanje medija (Ph.Eur., 2015b; USP, 2015c).



Slika 7. Shematski prikaz aparatura za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz čvrstih oralnih pripravaka: (a) aparatura s košaricom; (b) aparatura s lopaticom; (c) aparatura s uranjajućim cilindrom; (d) protočna ćelija.

Farmakopejom su propisane točne dimenzije i dopuštena odstupanja za sve komponente opisanih aparatura (posude, miješala, cilindri, ćelije). Naime, hidrodinamika unutar posude i sama geometrija aparature mogu imati značajan utjecaj na brzinu oslobađanja. Stalna temperatura ( $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) u posudama ili ćelijama održava se pomoću vodene kupelji (ili drugog prikladnog tipa grijaćeg uređaja). Dodatno, detaljno je opisan sam postupak provođenja testa (priprema aparature i medija, način unošenja pripravka, mjesto uzorkovanja itd.) jer male razlike u postupku analize također mogu dovesti do razlika u rezultatima

ispitivanja brzine oslobađanja. Stoga je standardizacija aparatura i metoda za ispitivanje oslobađanja od presudne važnosti.

### **2.3.2. Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz transdermalnih sustava**

U Američkoj su farmakopeji opisane i tri aparature za ispitivanje oslobađanja iz transdermalnih sustava („flastera“):

- 1) Aparatura 5 (lopatica iznad diska)
- 2) Aparatura 6 (cilindar)
- 3) Aparatura 7 (uranjajući držač)

Pripravak se fiksira na disk, cilindar ili držač i na taj način se izbjegava njegovo plutanje tijekom analize (Ph.Eur., 2015c; USP, 2015d).

### **2.3.3. Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz čvrstih lipofilnih ljekovitih oblika**

Europska farmakopeja predviđa i specijalno dizajniranu protočnu ćeliju za ispitivanje oslobađanja iz čvrstih lipofilnih ljekovitih oblika, kao što su supozitoriji i uljne kapsule. Modificirana protočna ćelija sastoji se od dvije komore i dodatnog proširenja u kojem se skupljaju lipofilni ekscipijensi koji plutaju iznad medija (Ph.Eur., 2015d).

### **2.3.4. Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz ljekovitih guma za žvakanje**

Aparatura za ispitivanje oslobađanja iz ljekovitih guma za žvakanje opisana je u Europskoj farmakopeji. Aparatura se sastoji od komorice za uzorak te klipova ili osovina pomoću kojih se na gumu za žvakanje primjenjuje mehanička sila, čime se simulira proces žvakanja (Ph.Eur., 2015e).

### 2.3.5. Farmakopejske metode za ispitivanje oslobađanja iz polučvrstih topikalnih pripravaka

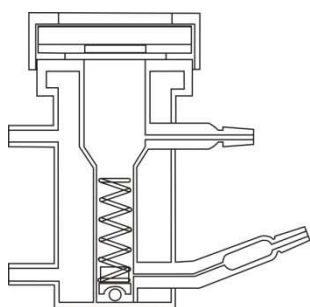
U polučvrste ljekovite oblike ubrajaju se kreme, masti, gelovi i losioni. Polučvrsti se pripravci mogu smatrati pripravcima s produljenim oslobađanjem, a oslobađanje djelatne tvari iz takvih pripravaka značajno će ovisiti o formulaciji i proizvodnom procesu.

Farmakopeja sugerira da je test oslobađanja iz polučvrstih oblika najprikladniji za procjenu utjecaja manjih promjena u procesu ili formulaciji, promjena u mjestu proizvodnje ili za ispitivanje stabilnosti (USP, 2015a). U skladu s tim propisana je upotreba *in vitro* testa oslobađanja kod procjene prihvatljivosti manjih izmjena u procesu ili formulaciji za već odobrene polučvrste pripravke (FDA, 1997).

Za ispitivanje brzine oslobađanja iz polučvrstih topikalnih pripravaka koriste se tri tipa difuzijskih ćelija: vertikalna difuzijska ćelija, imerzijska ćelija i modificirana aparatura s protočnom ćelijom.

#### 1) Vertikalna difuzijska ćelija (slika 8)

Tijelo difuzijske ćelije izrađeno je najčešće od stakla. Medij u receptorskom odjeljku miješa se pomoću teflonskog magnetskog mješača. Vanjski plašt ćelije ima funkciju cirkulirajuće vodene kupelji pomoću koje se održava zadana temperatura ćelije ( $32 \pm 1^\circ\text{C}$  u slučaju pripravaka za primjenu na kožu). U farmakopeji su opisani modeli A, B i C vertikalnih difuzijskih ćelija, među kojima postoje male varijacije u dizajnu ćelije.



Slika 8. Shematski prikaz vertikalne difuzijske ćelije

#### 2) Imerzijska ćelija

Imerzijska ćelija izrađena je od teflona, a koristi se u kombinaciji s aparaturom s lopaticom (aparatura 2). Rotacijom miješala s lopaticom oko svoje osi postiže se miješanje medija u receptorskom odjeljku. U farmakopeji su opisani modeli A i B imerzijskih ćelija,





- Implantati i stentovi.
- Parenteralni mikročestični, nanočestični i liposomski pripravci.
- Aerosoli.

Kod odabira aparature, sastava medija, temperature i brzine miješanja/protoka za određeni novi lijekoviti oblik valja voditi računa o njegovim fizičko-kemijskim karakteristikama te o specifičnom mjestu i načinu primjene. S obzirom na različitosti među lijekovitim oblicima nije moguće osmisliti jedinstvenu aparaturu i metodu koja bi bila primjenjiva za sve lijekovite oblike. Međutim, kao prvi izbor kod razvoja metoda za nove oblike preporuča se korištenje postojećih farmakopejskih aparatura kako bi se izbjeglo nepotrebno povećanje broja aparatura i metoda za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari. Upotrebu alternativnih aparatura treba razmotriti tek ukoliko se pokaže da postojeće aparature nisu prikladne za određeni novi lijekoviti oblik (Brown i sur., 2011).

### **2.3.7. Ispitivanje oslobađanja iz prašaka**

Kod praškastih oblika na brzinu oslobađanja značajno utječu močljivost, raspodjela veličine čestica i površina čestica. U medij za ispitivanje oslobađanja iz prašaka ponekad je (pogotovo kod prašaka s lošom močljivošću) potrebno dodati površinski aktivnu tvar (surfaktant) kako bi se dobili ponovljivi rezultati. Pritom treba voditi računa da dodatak površinski aktivne tvari ne ugrozi diskriminatorsnost metode (Brown i sur., 2011). Plutanje praška na površini medija problem je koji se često javlja kod ispitivanja oslobađanja iz praškastih pripravaka, ponekad čak i usprkos dodatku površinski aktivne tvari u medij (Heng i sur., 2008). U pojedinim slučajevima moguće je močljivost poboljšati miješanjem praška staklenim kuglicama.

U Europskoj i Američkoj farmakopeji opisan je test intrinzičke brzine oslobađanja (Ph.Eur., 2015f; USP, 2015e). Kod ovog se testa iz praška izrađuje komprimat, te se prati brzina oslobađanja s definirane površine komprimata (Azarmi i sur., 2007). Pritom se gubi utjecaj veličine i površine čestica na brzinu oslobađanja, a osim toga test nije prikladan za praške koji se ne daju komprimirati ili kod kojih površina komprimata nije konstantna (npr. prašci koji bubre). Dodatno je u Europskoj farmakopeji opisan i test oslobađanja za čiste supstancije na modificiranoj protočnoj ćeliji (engl. *apparent dissolution*) (Ph.Eur., 2015g).

Kod ispitivanja brzine oslobađanja iz prašaka za oralnu primjenu najčešće se koriste aparatura s lopaticom (aparatura 2) i protočna ćelija (aparatura 4) (Azarmi i sur., 2007; Brown i sur., 2011; Heng i sur., 2008). Međutim, kod pojedinih je praškastih smjesa uočeno da se

dispergiranjem praška u velikom volumenu medija (npr. kod aparature s lopaticom) gubi kontakt između djelatne tvari i polimera, te se na taj način umanjuje utjecaj polimera na otapanje lijeka. Stoga je za praškaste smjese razvijena i metoda s modificiranom aparaturom s košaricom (aparatura 1) kod koje se prašak unosi u košaricu kojoj je dno prethodno učinjeno nepropusnim umakanjem u rastaljeni vosak. Na taj se način postiže dulji kontakt djelatne tvari i polimera, a samim tim i bolja interakcija djelatne tvari i polimera (Shaw i sur., 2002). S druge strane, kod nekih je prašaka primijećeno da kod ispitivanja u košaricama dolazi do stvaranja agregata unutar košarice, lošeg močenja i lijepljenja agregata na stijenke košarice (Nicklasson i sur., 1991).

Metode za ispitivanje oslobađanja iz parenteralnih čestičnih sustava mogu se svrstati u tri kategorije:

1) Metode uzorkovanja i odvajanja (engl. *sample and separate*)

Pripravak se unosi u spremnik s medijem za ispitivanje oslobađanja. Miješanje se postiže rotacijom lopatica (ukoliko se test provodi u standardnim posudama za ispitivanje oslobađanja) ili pomoću magnetske miješalice, tresilice i slično (kad se test provodi u tikvicama, bocama ili vialima). U određenim vremenskim intervalima odvaja se supernatant od mikročestica filtriranjem ili centrifugiranjem, te se prati oslobađanje lijeka kroz vrijeme (D'Souza i DeLuca, 2006).

2) Metode kontinuiranog protoka

U literaturi su opisane razne prilagodbe protočnih ćelija za potrebe ispitivanja parenteralnih čestičnih sustava. Na primjer, Bhardwaj i Burgess (2010) su koristili standardizirane komercijalno dostupne protočne ćelije (aparatura 4) uz dodatak adaptera s membranom za dijalizu, dok su Rawat i sur. (2011) za analize oslobađanja iz mikročestica koristili protočne ćelije ispunjene staklenim kuglicama.

3) Metode dijalize

Kod metoda dijalize čestični pripravak je odvojen od receptorskog medija membranom/vrećicom za dijalizu. Na ovaj se način simulira imobilizacija uzorka u slučaju intramuskularne ili supkutane primjene. Uzorkovanje se vrši iz receptorskog medija i pritom nije potrebno dodatno filtriranje/centrifugiranje uzorka (D'Souza i DeLuca, 2006).

Parenteralni mikročestični sustavi namijenjeni su za produljeno oslobađanje lijeka u periodu od nekoliko tjedana, mjeseci ili čak godina. S obzirom na vrlo dugo trajanje oslobađanja „u stvarnom vremenu“, za ovakve su proizvode posebno interesantne ubrzane metode. Ubrzano oslobađanje može se postići pri povišenoj temperaturi, promjenom pH i

slično. Pritom je cilj da se ne promijeni mehanizam oslobađanja već samo ubrza proces oslobađanja (Brown i sur., 2011).

### **2.3.8. Ispitivanje oslobađanja iz čestičnih topikalnih pripravaka**

Za čestične topikalne pripravke (npr. polimerne mikročestice namijenjene za primjenu na kožu ili sluznicu) ne postoje propisane ili standardne metode i aparature. U literaturi je opisana upotreba vrlo raznolikih metoda za ispitivanje ove vrste pripravaka – npr. metoda s košaricom ili lopaticom i slične jednostavne aparature kod kojih se ispitivani prašak dodaje u spremnik s medijem, zatim metoda s protočnom ćelijom, metoda s vrećicom za dijalizu i metoda s Franzovom difuzijskom ćelijom ili njenim modifikacijama (tablica 2).

U nekoliko je radova zabilježeno kako se korištenjem standardnih aparatura za ispitivanje oslobađanja (npr. aparatura s lopaticom ili košaricom) ne postiže zadovoljavajuća diskriminatornost među uzorcima, na primjer s obzirom na udio lijeka te na udio, sastav (baza ili sol) i molekulsku masu polimera (Alhalaweh i sur., 2009; Gavini i sur., 2006, Gavini i sur., 2008, Salama i sur., 2008). Izlaganjem topikalnih mikročestica velikom volumenu medija dolazi do naglog oslobađanja lijeka što ne odgovara situaciji *in vivo*. Upotrebom difuzijskih ćelija za ovaj tip pripravka postiže se bolja diskriminatornost u odnosu na ostale metode, a dodatno difuzijski model bolje simulira *in vivo* uvjete zbog male količine tekućine koja je u direktnom dodiru s pripravkom (Moebus i sur., 2009, Moebus i sur., 2012, Salama i sur., 2008).

Tablica 2. Metode korištene za ispitivanje oslobađanja iz mikročestica za topikalnu primjenu

| Lijek                        | Nosač                                                                                                          | Primjena                               | Metoda                                                                                                                                                | Komentar                                                                                                                                                                                                         | Literatura                                   |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Albumin<br>Terbutalin sulfat | Smjesa kitozana i poloksamera                                                                                  | Mukozna (bukalna, nazalna, pulmonarna) | 1) Vrećica za dijalizu u staklenom spremniku, 10 ml medija, tresilica<br>2) Modificirana Franzova difuzijska ćelija, 10 ml medija, tresilica          | Metoda s difuzijskom ćelijom pokazala je bolju diskriminatornost s obzirom na sadržaj lijeka u mikročesticama. Metoda s difuzijskom ćelijom bolje simulira uvjete na sluznici (ograničena količina tekućine).    | Moebus i sur., 2009.<br>Moebus i sur., 2012. |
| Dinatrij kromoglikat         | PVA                                                                                                            | Mukozna (sluznica dišnog sustava)      | 1) Rotirajuća lopatica, 1000 ml medija<br>2) Protočna ćelija, 1000 ml medija<br>3) Modificirana (protočna) Franzova difuzijska ćelija, 1000 ml medija | Samo je metoda s difuzijskom ćelijom razlikovala uzorke s različitim udjelom PVA. Difuzijski model je prikladniji za respiratorne pripravke zbog male količine tekućine koja je u direktnom dodiru s pripravkom. | Salama i sur., 2008..                        |
| Ekonazol nitrat              | Kombinacija lipidno-hidrofilnog matriksa (Gelucire) i mukoadhezivnog polimera (kitozan, Na CMC ili poloksamer) | Vaginalna                              | Rotirajuća košarica, 900 ml medija                                                                                                                    | Metoda razlikuje uzorke izrađene od različitih polimera.                                                                                                                                                         | Albertini i sur., 2009.                      |
| Gentamicin sulfat            | Smjesa alginata i pektina                                                                                      | Kožna (rane)                           | Franzova difuzijska ćelija                                                                                                                            | Među pripremljenim uzorcima postoje određene razlike u profilima oslobađanja, ali u članku mogući razlozi navedenih razlika nisu komentirani.                                                                    | Aquino i sur., 2013.                         |
| Karbamazepin                 | Kitozan HCl, kitozan glutamat                                                                                  | Nazalna                                | Rotirajuća košarica, 1000 ml                                                                                                                          | Metodom se dobivaju slični profili oslobađanja neovisno o korištenoj soli kitozana i udjelu lijeka u mikročesticama.                                                                                             | Gavini i sur., 2006.                         |

Tablica 2 - nastavak

| Lijek                     | Nosač                               | Primjena       | Metoda                                         | Komentar                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Literatura                    |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Kvercetin                 | Lipidi                              | Kožna          | Spremnik s medijem i miješalica, 100 ml medija | Metoda je korištena samo za usporedbu brzine oslobađanja iz lipidnih mikročestica s brzinom otapanja samog lijeka.                                                                                                                                                                              | Scalia i sur., 2009.          |
| Loratadin                 | Smjesa kitozana i etilceluloze      | Nazalna        | Franzova difuzijska ćelija                     | Metoda razlikuje uzorke s različitim udjelom lijeka, različitim omjerima polimera te različitim metodama pripreme.                                                                                                                                                                              | Martinac i sur., 2005.        |
| Metoklopramid hidroklorid | 5-metilpirolidinon kitozan, kitozan | Nazalna        | Rotirajuća košarica, 400 ml medija             | Metoda je pokazala brzo oslobađanje i slabu diskriminatornost među uzorcima (s obzirom na vrstu i udio polimera), za razliku od <i>ex vivo</i> testa na nazalnoj sluznici ovce.                                                                                                                 | Gavini i sur., 2008.          |
| Minoksidil sulfat         | Kitozan                             | Kožna          | Modificirana Franzova difuzijska ćelija        | Metoda je korištena samo za usporedbu brzine oslobađanja iz mikročestica s brzinom difuzije iz otopine lijeka.                                                                                                                                                                                  | Gelfuso i sur., 2011.         |
| Mupirocin kalcij          | Eudragit RS                         | Kožna, nazalna | Rotirajuća lopatica, 500 ml medija             | Metoda razlikuje uzorke s različitim udjelom lijeka te uzorke izrađene uz različite procesne parametre.                                                                                                                                                                                         | Dürriegl i sur., 2011a.       |
| Mupirocin                 | Silicij dioksid                     | Kožna (rane)   | Vrećica za dijalizu, 200 ml medija             | Rezultati oslobađanja iz mikročestica (metoda dijalize) uspoređeni su s rezultatima oslobađanja iz kolagenske mreže s uklopljenim mikročesticama (metoda s Franzovom difuzijskom ćelijom). Uspoređivanje rezultata dobivenih različitim metodama otežava evaluaciju i interpretaciju rezultata. | Perumal i sur., 2014.         |
| Verapamil hidroklorid     | Eudragit L, Eudragit RS             | Kožna          | Erlenmeyer tikvica i tresilica, 20 ml medija   | Metoda razlikuje uzorke s različitim sastavom polimera (različit omjer Eudragita L i Eudragita RS).                                                                                                                                                                                             | Labouta i El-Khordagui, 2010. |

Tablica 2 - nastavak

| <b>Lijek</b>             | <b>Nosač</b>                 | <b>Primjena</b> | <b>Metoda</b>                                     | <b>Komentar</b>                                                                                                                             | <b>Literatura</b>            |
|--------------------------|------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Verapamil<br>hidroklorid | Kitozan                      | Nazalna         | Spremnik s medijem i<br>miješalica, 300 ml medija | Metoda razlikuje uzorke s različitim<br>udjelom polimera i uzorke izrađene<br>različitim metodama pripreme.                                 | Abdel Mouez i sur.,<br>2013. |
| Zolmitriptan             | Kitozan, kitozan<br>glutamat | Nazalna         | Rotirajuća košarica, 900 ml<br>medija             | Metoda razlikuje uzorke s različitim<br>udjelom kitozana, ali pokazuje slabu<br>diskriminatornost za različite molekulske<br>mase polimera. | Alhalaweh i sur.,<br>2009.   |

PVA – polivinil alkohol, Na CMC – natrij karboksimetil celuloza

Pregledom literature nije pronađen primjer istraživanja kod kojeg bi se za ispitivanje oslobađanja iz čestičnih pripravaka za topikalnu primjenu koristila imerzijska ćelija. Imerzijska ćelija do sada je uglavnom korištena za ispitivanje oslobađanja iz polučvrstih pripravaka (krema, gelova, masti) za što je originalno i dizajnirana, iako je zabilježena i njena upotreba za ispitivanje oslobađanja iz drugih vrsta pripravaka: npr. mikroemulzija, supozitorija i parenteralnih otopina (tablica 3).

U odnosu na metode kod kojih se pripravak unosi u spremnik s medijem (uz miješanje), metoda s imerzijskom ćelijom bolje simulira fiziološke uvjete kojima je pripravak za topikalnu primjenu izložen. S druge strane, u odnosu na ostale tipove difuzijskih ćelija prednosti imerzijske ćelije su sljedeće: sveprisutnost aparature s lopaticom (uz koju se imerzijska ćelija koristi), niža novčana ulaganja, jednostavnija upotreba, veća fleksibilnost u odabiru volumena donorskog i receptorskog odjeljka, lakše postizanje uvjeta osigurane topljivosti (zbog većeg volumena receptorskog odjeljka) te izrada od inertnog i neslomljivog materijala (Olejniki i sur., 2012; Rege i sur., 1998).

Tablica 3. Upotreba imerzijskih ćelija za ispitivanje oslobađanja

| Lijek                                                                                              | Tip priprava        | Metoda                                                                                                                                                  | Membrana                           | Literatura                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Deksametazon<br>Deksametazon acetat<br>Hidrokortizon<br>Hidrokortizon acetat<br>Prednizolon acetat | Supozitorij         | Medij: fiziološka otopina (200 ml)<br>Temperatura: 37°C<br>Lopatica, 100 o/min<br>Visina lopatice 1 cm<br>Volumen donorskog odjeljka 1 ml               | Membrana od poliviniliden fluorida | Usayapant i Iyer, 1999.     |
| Diklofenak dietilamin                                                                              | Mikroemulzija       | Medij: pH 7,4<br>Temperatura: 32°C<br>Lopatica, 100 o/min<br>2 g uzorka<br>Površina membrane 4,9 cm <sup>2</sup>                                        | Membrana od regenerirane celuloze  | Djordjevic i sur., 2005.    |
| Diklofenak dietilamin                                                                              | Emulzija (krema)    | Medij: pH 7,4 (300 ml)<br>Temperatura: 32°C<br>Mini lopatica, 50 o/min<br>Površina membrane 4 cm <sup>2</sup>                                           | Membrana od celuloznog acetata     | Pantelic i sur., 2014.      |
| Diklofenak dietilamin                                                                              | Višestruka emulzija | Medij: pH 7,4 (500 ml)<br>Temperatura: 32°C<br>Lopatica, 100 o/min<br>2 g uzorka<br>Površina membrane 4,9 cm <sup>2</sup>                               | Membrana od regenerirane celuloze  | Vasiljevic i sur., 2006.    |
| 2-fenilbenzimidazol-5-sulfonska kiselina                                                           | Emulzija (krema)    | Medij: pH 7,2 (200 ml)<br>Temperatura: 32°C<br>Mini lopatica, 100 o/min<br>Visina lopatice 1 cm<br>3 g uzorka<br>Površina membrane 3,46 cm <sup>2</sup> | Membrana od celuloznog acetata     | Rapedius i Blanchard, 2001. |



Tablica 3 – nastavak

| Lijek                | Tip pripravka                               | Metoda                                                                                                                                                                          | Membrana                            | Literatura                                               |
|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Fentanil             | Parenteralna otopina za epiduralnu primjenu | Medij: pH 8,0 (150 ml)<br>Temperatura: 25°C<br>Volumen donorskog odjeljka 7 ml<br>Površina membrane 10,75 cm <sup>2</sup>                                                       | Polupropusna membrana               | Holvoet i sur., 2003.                                    |
| Hidrokortizon        | Mast                                        | Medij: voda (200 ml)<br>Mini lopatica, 100 o/min<br>0,5 g uzorka<br>Promjer membrane 3 cm                                                                                       | Celulozna membrana ili koža štakora | Sanghvi i Collins, 1993.                                 |
| Ibuprofen            | Mikroemulzija, gel                          | Medij: pH 7,4 (750 ml)<br>Temperatura: 32°C<br>Lopatica, 100 o/min<br>2 g uzorka<br>Površina 4 cm <sup>2</sup>                                                                  | Membrana od regenerirane celuloze   | Djekic i sur., 2012.                                     |
| Lidokain hidroklorid | Liposomski gel                              | Medij: voda<br>Temperatura: 32°C                                                                                                                                                | Membrana od regenerirane celuloze   | Glavas-Dodov i sur., 2002.                               |
| Nifedipin            | Gel                                         | Medij: 50% EtOH (500 ml)<br>Temperatura: 37°C<br>Lopatica, 100 o/min<br>0,5 g uzorka<br>Promjer donorskog odjeljka 2 cm                                                         | Membrana od celuloznog nitrata      | Devarakonda i sur., 2005.                                |
| Paracetamol          | Gel                                         | Medij: voda, pH 6,8 ili 0,1M HCl (900 ml)<br>Temperatura: 37°C<br>Lopatica, 50 o/min<br>Visina lopatice 1,5 cm<br>Volumen donorskog odjeljka 4 ml<br>Površina 4 cm <sup>2</sup> | Membrana nije korištena             | Bonacucina i Palmieri, 2006.<br>Bonacucina i sur., 2006. |

Tablica 3 – nastavak

| Lijek                                                            | Tip pripravka                  | Metoda                                                                                                                                                                | Membrana                                                                   | Literatura           |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Placebo pripravak<br>(praćeno je<br>oslobađanje<br>ekscipijensa) | Gel                            | Medij: pH 6,8 (500 ml)<br>Temperatura: 37°C<br>4 g uzorka                                                                                                             | Membrana od regenerirane celuloze                                          | Murphy i sur., 2012. |
| Teofilin                                                         | Gel<br>(hidrofilna disperzija) | Medij: pH 6,8 (900 ml)<br>Temperatura: 37°C<br>Lopatica, 100 o/min<br>Visina lopatice 3 cm<br>1,5 g uzorka<br>Površina membrane 1,77 cm <sup>2</sup>                  | Membrana od celuloznog nitrata                                             | Lucero i sur., 2013. |
| Triamcinolon acetonid                                            | Krema, mast                    | Medij: 38% EtOH ili 76% EtOH (200 ml)<br>Temperatura: 32°C, 37°C ili 50°C<br>Mini lopatica, 50 o/min, 100 o/min ili 200 o/min<br>Visina lopatice 1 cm<br>1,5 g uzorka | Membrana od regenerirane celuloze, polietilenska membrana ili koža štakora | Rege i sur., 1998.   |

### 2.3.9. Validacija metode za ispitivanje oslobađanja

Cilj validacije analitičkog postupka je dokazati da je on prikladan za svoju namjenu. U okviru validacije metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari evaluiraju se sljedeći parametri: specifičnost, linearnost, raspon, točnost, preciznost, stabilnost i robusnost.

Specifičnost je sposobnost metode da jednoznačno odredi analit od interesa u prisutnosti drugih očekivanih komponenti (npr. placebo, razgradnih produkata i slično). Placebo čine svi sastojci pripravka bez djelatne komponente. Utjecaj placeba može se ispitati otapanjem placebo smjese u koncentraciji očekivanoj kod testa oslobađanja. Rezultat mjerenja tako dobivene otopine placeba uspoređuje se s rezultatom mjerenja za 100%-tni standard, te pritom utjecaj placeba ne smije biti veći od 2%. Ukoliko je utjecaj placeba veći od 2% potrebno je modificirati metodu kako bi se interferencija placeba umanjila, primjerice promjenom valne duljine ili korištenjem tekućinske kromatografije umjesto spektrofotometrije.

Linearnost je sposobnost metode da (u određenom koncentracijskom području) daje rezultate koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. U svrhu ispitivanja linearnosti pripremaju se otopine lijeka u rasponu od ispod najniže očekivane koncentracije do iznad najviše očekivane koncentracije. Ukoliko je moguće otopine za ispitivanje linearnosti se pripremaju iz zajedničke ishodne otopine. Uobičajeno je da se kao dokaz linearnosti uzima koeficijent determinacije ( $r^2 \geq 0,98$ ) određen regresijskom analizom. Dodatno, odsječak na y osi ne smije se značajno razlikovati od nule.

Raspon metode je područje između najniže i najviše koncentracije analita za koje je pokazana odgovarajuća linearnost, točnost i preciznost metode.

Točnost analitičke metode definira se kao stupanj podudaranja (sličnost) izmjerene vrijednosti s pravom ili prihvaćenom vrijednosti. Ispitivanje točnosti se uobičajeno provodi dodavanjem analita u otopinu placeba. Uobičajeni zahtjev za točnost je iskorištenje (izmjerena količina analita u odnosu na dodanu količinu analita) od 95-105%.

Preciznost analitičkog postupka pokazuje stupanj podudaranja rezultata za niz mjerenja istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Preciznost se može ispitati na tri nivoa: ponovljivost, intermedijaska preciznost (unutar laboratorija) i reproducibilnost (između laboratorija). Ponovljivost se utvrđuje ponovljenim mjerenjem otopine standarda i uzorka te računanjem relativnog standardnog odstupanja za niz mjerenja. Ispitivanjem intermedijske preciznosti utvrđuje se utjecaj slučajnih očekivanih promjena (drugi dan, drugi analitičar, drugi set otopina, drugi instrument i kolona) na rezultate ispitivanja. Uobičajeni je kriterij

prihvatljivosti za intermedijску preciznost da razlika među srednjim vrijednostima za postotak oslobođenog lijeka ne prelazi 10% u vremenskim točkama u kojima je oslobođeno manje od 85% lijeka, odnosno 5% u vremenskim točkama u kojima je oslobođeno više od 85% lijeka, ali mogu biti prikladni i drugi zahtjevi ovisno o specifičnim karakteristikama ispitivanog pripravka.

Stabilnost otopina standarda i uzorka utvrđuje se uzastopnim analizama otopina kroz određeni vremenski period uz svježije pripremljene otopine standarda. Uobičajeni kriterij prihvatljivosti za stabilnost otopina je 98-102% u odnosu na početnu vrijednost.

Robusnost metode je mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Odabir parametara koji će se varirati u okviru ispitivanja robusnosti ovisi o samom postupku analize, a može uključivati volumen i sastav medija, brzinu miješanja, sastav mobilne faze, brzinu protoka, valnu duljinu, temperaturu kolone i slično (ICH Q2(R1), 2005; USP, 2015f).

## **2.4. Polimerne mikročestice**

### **2.4.1. Primjena mikročestica**

Uklapanjem lijeka u polimerne mikročestice mogu se ostvariti brojne prednosti u terapiji. Mikroinkapsulacijom lijeka stvara se fizička barijera koja osjetljive lijekove štiti od temperature, vlage, svjetla, oksidacije, hidrolize ili isparavanja. Na taj se način postiže bolja stabilnost lijeka. Lijekovi neugodnih organoleptičkih svojstava uklapaju se u mikročestice kako bi se maskirao njihov okus i miris.

Uklapanjem u mikročestice može se postići i kontrolirano oslobađanje lijeka. Do željenog profila oslobađanja dolazi se pravilnim odabirom polimera, otapala i procesnih parametara. Kod mikročestica s produljenim oslobađanjem smanjuje se učestalost doziranja, čime se povećava suradljivost pacijenata. Mikročestice s ciljanim djelovanjem dostavljaju lijek na ciljano mjesto u organizmu, uz minimalnu sistemsku izloženost lijeku. Ciljano djelovanje, kontrolirano oslobađanje i fizička barijera koju polimerne mikročestice pružaju dodatno mogu dovesti do smanjene lokalne iritacije (npr. u gastrointestinalnom sustavu), te do smanjenih nuspojava i toksičnosti lijeka (Lam i Gambari, 2014).

## **2.4.2. Metode pripreme mikročestica**

U literaturi su opisane brojne tehnike za pripremu polimernih mikročestica. Najčešće korištene tehnike opisane su u nastavku.

### **1) Polimerizacija monomera**

Kod tehnike polimerizacije koristi se emulzija ili suspenzija monomera, najčešće uz dodatak inicijatora (koji se prevode u slobodne radikale pomoću topline, fotolize ili elektrolize). Djelovanjem slobodnih radikala događa se polimerizacija i rast polimernih lanaca te nastaju mikročestice (Freiberg i Zhu, 2004; Lam i Gambari, 2014).

### **2) Otparavanje/ekstrakcija otapala**

Kod tehnike otparavanja otapala izrađuje se emulzija s lijekom i polimerom (tip emulzijskog sustava odabire se ovisno o svojstvima lijeka i polimera). Otparavanjem organskog otapala iz unutarnje faze (koja sadrži lijek i polimer) nastaju mikročestice. Alternativni način uklanjanja organskog otapala i dobivanja mikročestica je putem dodatka drugog otapala koje će ekstrahirati otapalo polimera u vanjsku fazu (Freiberg i Zhu, 2004; Lam i Gambari, 2014; Vasir i sur., 2003).

### **3) Sušenje raspršivanjem**

Tehnika sušenja raspršivanjem detaljnije je opisana u poglavlju 2.4.3.

### **4) Koacervacija i precipitacija**

Kod tehnike koacervacije (odvajanja faza) lijek se prvo dispergira u otopini polimera. Dodatkom kiseline ili lužine (promjena pH), soli ili neotapala ili uslijed promjene temperature dolazi do precipitacije polimera. Nastale mikročestice mogu se dodatno učvrstiti dodatkom sredstva za umrežavanje (engl. *cross linking*) (Agnihotri i sur., 2004; Lam i Gambari, 2014).

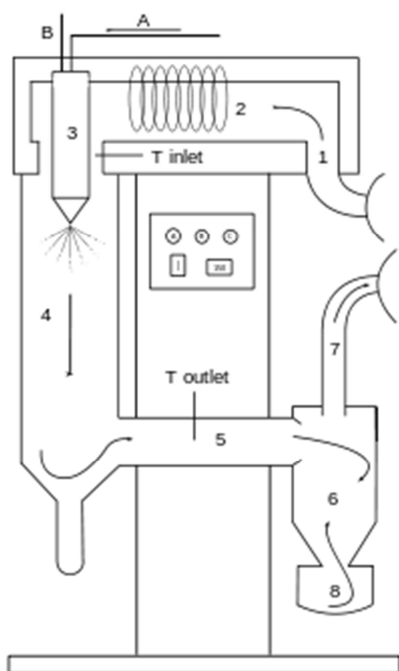
### **5) Ionotropno geliranje**

Kod ove tehnike dolazi do elektrostatske interakcije između nabijene makromolekule (polimera) i iona suprotnog naboja. Zbog kompleksacije između suprotno nabijenih iona dolazi do precipitacije polimera odnosno nastanka mikročestica (Agnihotri i sur., 2004; Lam i Gambari, 2014).

## **2.4.3. Sušenje raspršivanjem kao tehnika pripreme polimernih mikročestica**

Sušenje raspršivanjem je tehnika koja se u industrijskom mjerilu koristi već preko stotinu godina, te danas nalazi primjenu u raznim granama industrije. U farmaceutskoj

industriji sušenje raspršivanjem primjenjuje se na same djelatne tvari (prevođenje u amorfni oblik), ekscipijense (postizanje željenih tehnoloških svojstava) ili smjese djelatnih i pomoćnih tvari (priprema terapijskih sustava). Uređaj za sušenje raspršivanjem shematski je prikazan na slici 10.



Slika 10. Shematski prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem (A – ulaz tekućine za raspršivanje, B – ulaz plina za atomizaciju, 1 – ulaz plina za sušenje, 2 – grijač plina za sušenje, 3 – sapnica, 4 – komora za sušenje, 5 – spoj komore za sušenje i ciklona, 6 – ciklon, 7 – izlaz plina za sušenje, 8 – posuda za skupljanje produkta)

Proces sušenja raspršivanjem uključuje sljedeće faze:

1. atomizacija (raspršivanje tekućine),
2. kontakt raspršenih kapljica i plina za sušenje,
3. sušenje kapljica i stvaranje čestica,
4. odvajanje osušenih čestica od plina (Masters, 1985; Miller i Gil, 2012).

Tekućina za raspršivanje atomizira se pomoću sapnice. Sapnice se klasificiraju prema tipu energije koju koriste za atomizaciju. Pneumatske (dvofluidne) sapnice za raspršivanje koriste kinetičku energiju komprimiranog plina. Rotacijske sapnice raspršuju tekućinu

pomoću centrifugalne sile. Dodatno postoje i sapnice kod kojih se tekućina raspršuje primjenom tlaka ili ultrazvuka.

Raspršene kapljice dolaze u kontakt s plinom za sušenje (zrak ili dušik). Zbog velike specifične površine raspršenih kapljica dolazi do brzog sušenja. S obzirom na smjer kretanja tekućine i plina za sušenje razlikuju se istosmjerni i protusmjerni tipovi uređaja. Kod istosmjernih uređaja uzorak i plin kreću se u istom smjeru te raspršene kapljice dolaze u dodir s vrućim plinom za sušenje u trenutku kada sadrže najviše otapala. Najviša temperatura kojoj su izložene čestice u ovom je slučaju znatno niža od ulazne temperature plina za sušenje, pa je ovakav dizajn uređaja pogodan i za sušenje termolabilnih supstancija.

Osušene čestice se od plina za sušenje najčešće odvajaju pomoću ciklona ili vreća za filtriranje. U ciklonu se čestice odvajaju od plina na temelju razlike u gustoći između dviju faza. Veće i gušće čestice lakše će se odvojiti od plinovite faze dok će manje čestice zaostati u plinu za sušenje. U odnosu na ciklon vreće za filtriranje mogu bolje odvojiti vrlo sitne čestice, neovisno o njihovoj gustoći (Miller i Gil, 2012; Paudel i sur., 2013; Walters i sur., 2014).

Ukoliko je otapalo u tekućini za raspršivanje voda, kao plin za sušenje najčešće se koristi zrak. U tom slučaju plin za sušenje se koristi samo jednom, a nakon sušenja (i filtriranja) se otpušta u atmosferu. Kod upotrebe organskih otapala za sušenje se umjesto zraka koristi inertni plin (najčešće dušik) koji recirkulira u tzv. zatvorenom sustavu (engl. *closed-loop system*). U zatvorenom je sustavu potrebno ukloniti pare otapala iz plina za sušenje prije nego plin opet uđe u komoru za sušenje, što se najčešće postiže upotrebom kondenzatora (Miller i Gil, 2012; Ré, 2006).

U produktu sušenja raspršivanjem može zaostati određena količina otapala. Ostatna otapala mogu dovesti do fizičke ili kemijske nestabilnosti. U tom se slučaju udio otapala u produktu može smanjiti sekundarnim sušenjem u sušnicama ili zračno-vrtložnim uređajima za sušenje (engl. *fluid bed*) (Miller i Gil, 2012).

Sušenje raspršivanjem često je metoda odabira za izradu polimernih mikročestica zbog svoje jednostavnosti i brzine, te široke primjenjivosti. Naime, sušenje raspršivanjem može se primijeniti i za lijekove topljive u vodi i za one topljive u organskim otapalima, za termostabilne i termolabilne lijekove, te za hidrofilne i hidrofobne polimere.

Veličina, struktura i morfologija mikročestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem ovise o ravnoteži između brzine otparavanja otapala i brzine difuzije otopljenih komponenti tijekom sušenja raspršenih kapljica tekućine. Ta se ravnoteža može kvantificirati pomoću Pecletovog broja. Visoka vrijednost Pecletovog broja ( $Pe > 1$ ) znači da otopljene komponente difundiraju sporije od povlačenja površine kapljice, te dolazi do

ukoncentriravanja komponente s visokim Pecletovim brojem na površini (nastaje ljuska ili ovojnica). S druge strane, niska vrijednost Pecletovog broja ( $Pe < 1$ ) govori da otopljene komponente difundiraju brže od povlačenja površine kapljice, te nastaju čestice s jednolikom radijalnom raspodjelom tvari (Vehring, 2008).

#### **2.4.4. Karakterizacija polimernih mikročestica**

Karakterizacija mikročestica najčešće obuhvaća sljedeće parametre: iskorištenje procesa, učinkovitost uklapanja lijeka, morfologiju i veličinu čestica, površinski naboj čestica, termička svojstva, spektralna svojstva, kristalno stanje, higroskopsnost, sadržaj vode i ostalih otapala te brzinu oslobađanja lijeka.

##### *Iskorištenje procesa i učinkovitost uklapanja lijeka*

Iskorištenje procesa predstavlja omjer mase mikročestica i ukupne mase suhe tvari (polimera i lijeka) korištene za pripravu mikročestica.

Učinkovitost uklapanja lijeka odnosi se na omjer stvarnog sadržaja lijeka i teoretskog sadržaja lijeka u mikročesticama. Sadržaj lijeka najčešće se određuje kromatografskim ili spektrofotometrijskim metodama.

##### *Morfologija čestica*

Morfologija mikročestica određuje se mikroskopskim tehnikama (npr. optičkom mikroskopijom ili pretražnom elektronskom mikroskopijom). Kombinacijom mikroskopskih tehnika i kompjuterske obrade slike mogu se dobiti dodatne informacije o morfologiji mikročestica. Kao rezultat ovakve analize dobivaju se numeričke vrijednosti za razne parametre oblika čestica (npr. cirkularnost, konveksnost, izduljenost).

##### *Veličina čestica*

Za određivanje veličine mikročestica i raspodjele veličine mikročestica najčešće se koriste metoda raspršenja laserske svjetlosti pod malim kutom (engl. *low angle laser light scattering*, LALLS) ili mikroskopske metode (u kombinaciji s kompjuterskom obradom slike).

Kod LALLS metode laserska zraka se pri prolasku kroz uzorak ogiba (nakon sudara s česticom), a kut ogiba ovisi o veličini čestice. Iz izmjerenih se kutova ogiba matematičkom transformacijom dobiva raspodjela veličine čestica za uzorak.



### *Površinski naboj čestica*

Uz površinu koloidnih čestica nalazi se sloj slabo pokretnih iona (Sternov sloj) te sloj pokretnih iona suprotnog naboja iz otapala (difuzijski sloj). Nabijene dispergirane čestice putuju u električnom polju prema suprotno nabijenoj elektrodi (elektroforetska pokretljivost). Skupa s česticom giba se i Sternov sloj i dio vezanih molekula otapala, odijeljen od ostalih molekula otapala plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti plohe smicanja je elektrokinetički zeta potencijal ( $\zeta$ ). Zeta potencijal se određuje tehnikom laserske dopler mikroeletroforeze.

### *Termička svojstva*

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je tehnika koja mjeri razliku topline potrebne za postizanje iste temperature kod posudice s uzorkom i referentne posudice. Kad u tijeku zadanog temperaturnog programa kod uzorka dođe do određene fizičke ili kemijske promjene, bit će potreban viši ili niži protok topline za posudicu s uzorkom kako bi se održala ista temperatura kao kod referentne posudice. Rezultat DSC mjerenja je termogram na kojem se razlikuju endotermni procesi kod kojih se toplina prima (npr. taljenje) i egzotermni procesi kod kojih se toplina otpušta (npr. kristalizacija). Površina ispod pika na termogramu proporcionalna je primljenoj ili otpuštenoj toplini.

Termogravimetrijskom analizom (TGA) mjeri se promjena mase kao funkcija temperature (npr. pri gubitku otapala ili termičkoj razgradnji).

### *Spektralna svojstva*

Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR) je tip vibracijske spektroskopije koji se koristi za identifikaciju tvari, s obzirom da svaka tvar ima specifičan IR spektar („otisak prsta“). Osim toga, FTIR se koristi i za utvrđivanje interakcija između komponenti smjese (npr. lijeka i polimera). Pomak ili nestanak pojedinih vrpca u FTIR spektru ili pak nastanak novih vrpca ukazuju na interakciju komponenti.

Među vibracijske spektroskopske tehnike ubraja se i Raman spektroskopija. Raman spektroskopija i infracrvena spektroskopija su komplementarne tehnike jer vrpce koje slabo apsorbiraju u IR području u pravilu jako apsorbiraju u Raman području i obratno.

### *Kristalno stanje*

Kristalno stanje uzorka određuje se rendgenskom difrakcijom na praškastom uzorku (engl. *X-ray powder diffraction*, XRPD). Monokromatska rendgenska zraka nakon sudara s

praškastim uzorkom ogiba se u raznim smjerovima. Kristal pritom djeluje kao trodimenzionalna difrakcijska rešetka. Na detektoru se snima intenzitet izlaznog zračenja za određeni raspon difrakcijskih kutova. Oštri difrakcijski „pikovi“ ukazuju na uređenost kristalne rešetke, odnosno na postojanje kristalne faze. Svaka kristalna forma (polimorf) određene tvari pokazuje karakteristične difrakcijske maksimume. S druge strane, odsutnost difrakcijskih maksimuma u difraktogramu uzorka ukazuje na nered u molekularnom poretku, odnosno na nekristaliničnost (amorfnost) uzorka.

#### *Higroskopnost*

Higroskopnost uzorka određuje se tehnikom dinamičke sorpcije pare (engl. *dynamic vapour sorption*, DVS). Pritom se gravimetrijski mjeri količina primljene (sorpcija) ili otpuštene (desorpcija) vodene pare pri izlaganju uzorka određenoj relativnoj vlazi.

#### *Sadržaj vode i ostalih organskih otapala*

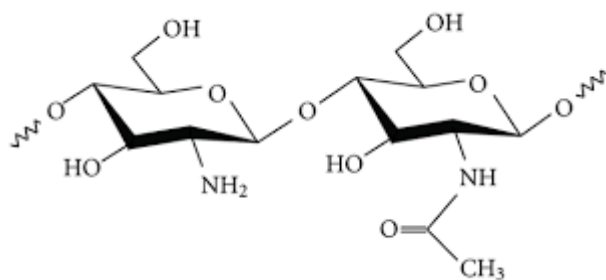
Ovisno o postupku pripreme mikročestica, u uzorku se određuje sadržaj vode i ostalih organskih otapala. Sadržaj vode u uzorku specifično se može odrediti Karl-Fischer titracijom, a sadržaj organskih otapala plinskom kromatografijom. Termogravimetrijskom analizom ili analizom gubitka sušenjem može se odrediti sadržaj vode i organskih otapala u uzorku.

#### *Brzina oslobađanja lijeka*

*In vitro* metode ispitivanja brzine oslobađanja lijeka detaljno su opisane u poglavlju 2.3.

### **2.4.5. Kitozanske mikročestice**

Kitozan je kationski polisaharid, kopolimer N-acetil glukozamina i glukozamina (slika 11), koji se proizvodi alkalnom deacetilacijom hitina. Hitin je drugi najzastupljeniji polimer u prirodi (nakon celuloze), a dobiva se iz oklopa rakova i škampa.



Slika 11. Struktura kitozana

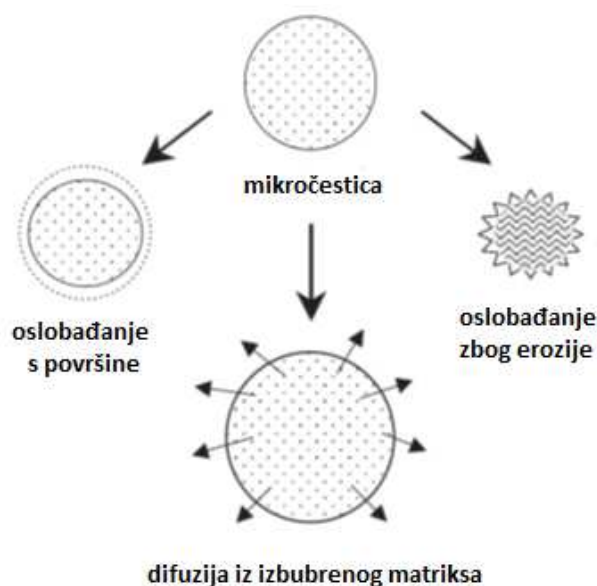
Komercijalno dostupni kitozani razlikuju se po molekularnoj masi, viskoznosti i stupnju deacetilacije. Pri neutralnom i bazičnom pH kitozan sadrži slobodne amino skupine i netopljiv je u vodi. U kiselom pH području dolazi do protonacije amino skupina i kitozan postaje topljiv (Agnihotri i sur., 2004; Singla i Chawla, 2001).

Kitozan posjeduje brojna biološka svojstva koja ga čine interesantnim kandidatom za izradu terapijskih sustava. Kitozan je biorazgradiv, biokompatibilan, bioadhezivan i mukoadhezivan polimer koji ubrzava zacjeljivanje rana te pokazuje antimikrobno i hipokolesterolemijsko djelovanje (Dash i sur., 2011; Singla i Chawla, 2001; Sinha i sur., 2004).

Oslobađanje lijeka iz kitozanskih mikročestica uključuje tri mehanizma: oslobađanje s površine čestica, difuziju kroz izbubreni matriks i oslobađanje zbog erozije polimera (slika 12). U većini slučajeva, oslobađanje lijeka odvija se kombinacijom više mehanizama.

Lijek adsorbiran na površini čestica u dodiru s medijem trenutno se otapa. Nakon izlaganja mediju brzo se oslobađa i lijek uklopljen u površinski sloj čestica. Posljedica oslobađanja s površine čestica je naglo početno oslobađanje lijeka (engl. *burst effect*).

Oslobađanje lijeka mehanizmom difuzije odvija se kroz tri faze. U prvoj fazi voda prodire u čestice. Polimer zatim prelazi iz staklastog u gumasto stanje (polimerni lanci se relaksiraju), što dovodi do bubrenja matriksa. Treća je faza difuzija lijeka kroz izbubreni gumasti matriks (Agnihotri i sur., 2004; Dash i sur., 2011).



Slika 12. Mehanizmi oslobađanja lijeka iz kitozanskih mikročestica (Agnihotri i sur., 2004)

Brzina oslobađanja iz kitozanskih mikročestica ovisi o molekularnoj masi i stupnju umreženosti kitozana, morfologiji, veličini i gustoći čestica, fizičko-kemijskim svojstvima lijeka i prisutnosti pomoćnih tvari. Dodatno na brzinu oslobađanja utječu i pH i polarnost medija te prisutnost enzima u mediju (Agnihotri i sur., 2004).

Brzina oslobađanja u pravilu se smanjuje s povećanjem molekulske mase kitozana. To se može pripisati manjoj topljivosti kitozana visoke molekulske mase, te većoj viskoznosti gela stvorenog pri doticaju s vodenim medijem (Agnihotri i sur., 2004; Illum, 1998; Sinha i sur., 2004).

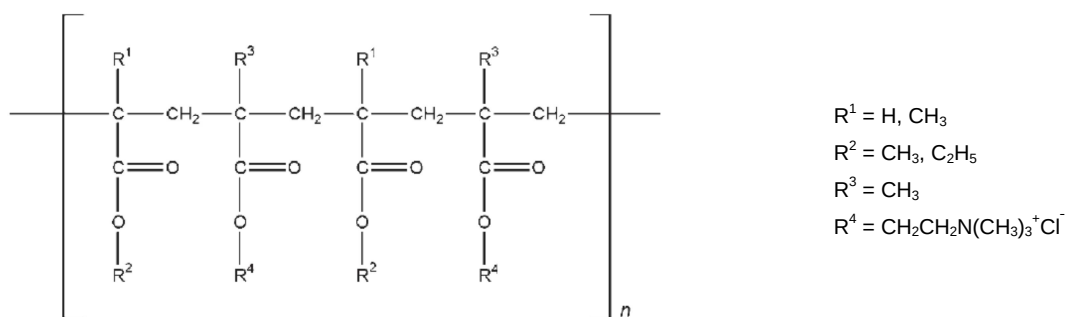
Reaktivne amino skupine kitozana omogućuju umrežavanje (engl. *crosslinking*) kitozana s aldehidnim skupinama sredstva za umrežavanje (npr. formaldehida ili glutaraldehida). Osim kemijskog umrežavanja, moguće je i reverzibilno fizičko umrežavanje putem elektrostatskih interakcija s anionom (npr. tripolifosfat, TPP). Na ovaj se način izbjegava upotreba toksičnih reagensa potrebnih za kemijsko umrežavanje. Stupanj umreženosti kitozanskih lanaca ima značajan utjecaj na brzinu oslobađanja iz kitozanskih mikročestica. Kod veće umreženosti kitozana postiže se sporije oslobađanje (Agnihotri i sur., 2004; Anal i sur., 2006; Shu i Zhu, 2000; Sinha i sur., 2004).

Brzina oslobađanja smanjuje se i s povećanjem koncentracije kitozana. Kod veće koncentracije kitozana, kao i kod veće molekulske mase kitozana, postiže se veća viskoznost gela što dovodi do sporijeg oslobađanja lijeka (Ko i sur., 2002).

## 2.4.6. Metakrilatne mikročestice

Polimetakrilati se dobivaju polimerizacijom akrilne i metakrilne kiseline i njihovih estera, a komercijalno su dostupni pod trgovačkim nazivima Eudragit<sup>®</sup>, Acryl-EZE<sup>®</sup>, Eastacryl<sup>®</sup> i Kollicoat<sup>®</sup>. Ovisno o strukturi i udjelu monomernih jedinica razlikuje se nekoliko podtipova metakrilatnih polimera (Crowe i sur., 2009).

Eudragit<sup>®</sup> RS je kopolimer estera akrilne i metakrilne kiseline koji sadrži oko 5% monomernih jedinica s kvaternim amonijevim skupinama (slika 13).



Slika 13. Struktura Eudragita RS. Odnos monomernih jedinica etil akrilata, metil metakrilata i trimetilamonijetil metakrilat klorida u Eudragitu RS je 1:2:0,1.

Eudragit RS je inertni i biokompatibilni polimer. Hidrofoban je i netopljiv u vodi. Međutim, zbog prisutnosti hidrofilnih amonijevih grupa Eudragit RS je blago permeabilan za vodu i bubri. Bubrenje Eudragita odvija se u tri koraka: (1) difuzija vode u polimerni matriks, (2) relaksacija polimernih lanaca uslijed hidratacije i (3) širenje polimerne mreže. Otopljeni lijek može difundirati kroz izbubreni polimerni matriks ili kroz pore ispunjene vodom. Kvaterne amonijske skupine ionizirane su kroz cijelo fiziološko područje pH (pH 1-8), pa je permeabilnost Eudragita RS neovisna o pH.

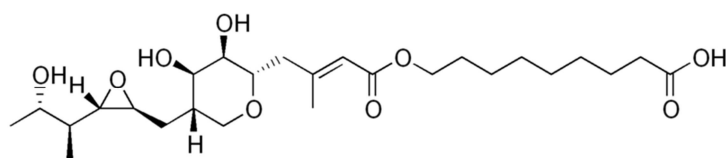
Zbog svoje hidrofobnosti i niske permeabilnosti neovisne o pH, Eudragit RS se često koristi za izradu matriksnih sustava s produljenim oslobađanjem ili funkcionalnih ovojnica za čvrste dozirne oblike s produljenim oslobađanjem (Abu-Diak i sur., 2012; Dittgen i sur., 1997).

Eudragit RS koristi se i za izradu polimernih mikročestica. Kim i sur. (2002) koristili su tehniku otparavanja otapala za pripremu metakrilatnih mikročestica s felodipinom.

Oslobađanje lijeka bilo je sporije iz mikročestica izrađenih od Eudragita RS nego iz onih od Eudragita RL. Eudragit RL je polimetakrilat sličan Eudragitu RS, ali sadrži oko 10% monomera s kvaternom amonijevom skupinom i stoga pokazuje veću permeabilnost. Autori su dodatno pokazali da je kombinacijom Eudragita RS i RL unutar istog terapijskog sustava moguće podešavati brzinu oslobađanja lijeka. Hombreiro-Perez i sur. (2003) izradili su mikročestice od smjese Eudragita RS i Eudragita RL tehnikom otparavanja otapala. U njih su uklopili propranolol hidroklorid kao primjer hidrofilnog lijeka i nifedipin kao primjer lipofilnog lijeka. Izrađene mikročestice su pokazale sposobnost kontroliranog oslobađanja lijeka u periodu od najmanje 8 sati. Palmieri i sur. (2001) su tehnikom sušenja raspršivanjem uklopili paracetamol u mikročestice od Eudragita RS, Eudragita RL ili etilceluloze. Uklapanjem lijeka u mikročestice nije postignuto produljeno oslobađanje u odnosu na sam lijek. Međutim, tablete dobivene komprimiranjem mikročestica od Eudragita RS ili etilceluloze pokazale su dobru kontrolu oslobađanja lijeka. Kristmundsdóttir i sur. (1996) izradili su mikročestice s Eudragitom RS ili Eudragitom RL i diltiazemom tehnikom sušenja raspršivanjem. Ovisno o korištenom otapalu (diklorometan ili toluen) dobivene su mikrosfere (matriksni sustavi) ili mikrokapsule (spremišni sustavi). Dürriegl i sur. (2011) izradili su mikročestice od Eudragita RS i mupirocina tehnikom sušenja raspršivanjem. Brzina oslobađanja lijeka ovisila je o omjeru lijeka i polimera te o procesnim parametrima sušenja.

## 2.5. Mupirocin

Mupirocin (slika 14) je antibiotik širokog spektra namijenjen za topikalnu terapiju. Izoliran je iz kulture *Pseudomonas fluorescens*, te otuda potječe i njegov drugi naziv, pseudomonična kiselina A.



Mupirocin je djelotvoran protiv *Staphylococcus aureus* (uključujući sojeve koji stvaraju betalaktamazu i sojeve rezistentne na meticilin, MRSA), koagulaza negativne stafilokoke, *Streptococcus* vrste, *Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae*.

Nakon lokalne primjene mupirocin dobro prodire u površinske slojeve kože. Sistemska apsorpcija mupirocina je minimalna, a apsorbirana količina lijeka se brzo metabolizira u inaktivni metabolit moničnu kiselinu (HALMED, 2010).

Mupirocin se koristi za liječenje primarnih bakterijskih infekcija kože (impetigo, folikulitis, furunkuloza), te sekundarnih infekcija kože (inficirane dermatoze, inficirana kožna oštećenja) (HALMED, 2010). Osim toga, mupirocin se koristi i za privremenu eliminaciju *S. aureus* iz nosa bolničkih pacijenata, kako bi se smanjila mogućnost samoinfekcije (Wertheim i sur., 2005).

Mehanizam djelovanja mupirocina zasniva se na reverzibilnom i specifičnom vezanju za bakterijski enzim izoleucil-transportnu RNK sintetazu, što uzrokuje inhibiciju sinteze RNK i bjelančevina. Ovaj mehanizam djelovanja jedinstven je za mupirocin, što umanjuje mogućnost unakrsne rezistencije s ostalim topikalnim antibioticima (HALMED, 2010; Parenti i sur., 1987).

### **3. CILJ RADA**



Cilj ovog rada je razviti *in vitro* metodu za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz čestičnih terapijskih sustava za topikalnu primjenu korištenjem standardizirane, komercijalno dostupne aparature za ispitivanje oslobađanja, te uzimajući u obzir fiziološke uvjete na mjestu primjene ovakvih terapijskih sustava.

*In vitro* metoda za ispitivanje oslobađanja iz čestičnih terapijskih sustava za topikalnu primjenu bit će razvijena korištenjem polimernih mikročestica kao modelnih pripravaka. Za izradu polimernih mikročestica odabrani su:

- o mupirocin, antibiotik širokog spektra koji se u farmakoterapiji koristi isključivo za lokalnu primjenu,
- o kitozan i Eudragit RS, kao polimeri koji se često koriste za izradu mikročestičnih sustava,
- o sušenje raspršivanjem kao tehnologija izrade mikročestica.

Kod mikročestica će biti ispitane sljedeće karakteristike: učinkovitost uklapanja lijeka (HPLC), morfologija (SEM), raspodjela veličine čestica (mikroskopska analiza slike), površinski naboj čestica (laserska dopler mikroeletroforeza), kristalno stanje (XRPD), termička svojstva (DSC, TGA), interakcije među komponentama (FTIR), sadržaj vode i higroskopnost (TGA, DVS), sadržaj metanola (GC) i brzina oslobađanja lijeka.

Metodu za ispitivanje oslobađanja lijeka iz ljekovitog pripravka čine aparatura, medij i eksperimentalni uvjeti. Metoda za ispitivanje oslobađanja mora biti diskriminatorna, ali s druge strane i dovoljno robusna i reproducibilna kako bi davala ponovljive i pouzdane rezultate (USP, 2015f).

Ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari provest će se korištenjem imerzijske ćelije u kombinaciji s aparaturom s lopaticom. Uzimajući u obzir veliki broj uzoraka koje je potrebno analizirati kod ispitivanja profila oslobađanja, poželjno je razviti HPLC metodu s kratkim vremenom analize, kako bi se postigla velika protočnost uzoraka.

pH i temperatura medija za ispitivanje oslobađanja lijeka iz topikalnih pripravaka bit će odabrani u skladu s fiziološkim uvjetima na koži. U okviru razvoja metode bit će odabrana membrana koja predstavlja prikladan inertni nosač za pripravak (ne adsorbira djelatnu tvar i pruža što manji otpor njenoj difuziji), te će biti ispitan utjecaj instrumentalnih parametara na brzinu oslobađanja lijeka (broj okretaja lopatica, visina lopatica, volumen receptorskog medija). Primjenjivost metode bit će evaluirana na dva nivoa:

- o diskriminatornost prema različitim formulacijama i prema različitim koncentracijama lijeka,
- o sličnost među serijama istog sastava i proizvodnog procesa.

Prikladnost metode za njenu namjenu bit će dokazana kroz validaciju metode.

Očekivani znanstveni doprinos predloženog istraživanja je dvostruk. Razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz polimernih mikročestica za kožnu ili mukoznu primjenu predstavlja značajan doprinos razvoju i karakterizaciji čestičnih sustava za topikalnu primjenu. Propisane ili standardne metode ili aparature za ispitivanje oslobađanja iz čestičnih topikalnih pripravaka za sada ne postoje. Stoga ovo istraživanje predstavlja značajan doprinos području ispitivanja oslobađanja lijeka.

### 3.1. Specifični ciljevi

Glavni cilj ovog istraživanja je razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz polimernih mikročestica za topikalnu primjenu. Specifični ciljevi istraživanja su sljedeći:

- Izraditi kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom, primjenom tehnike sušenja raspršivanjem
- Ispitati karakteristike mikročestičnih sustava s potencijalnim utjecajem na brzinu oslobađanja djelatne tvari: morfologija i veličina čestica, interakcije lijeka i polimera, termička svojstva te ostale karakteristike čvrstog stanja (amorfnost/kristaliničnost)
- Istražiti mogućnosti primjene imerzijske ćelije za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari iz polimernih mikročestica za topikalnu primjenu
- Ispitati utjecaj odabira membrane i instrumentalnih parametara metode na oslobađanje djelatne tvari
- Istražiti diskriminatornost metode, odnosno njenu sposobnost da detektira promjene u formulaciji i/ili procesu koje mogu biti povezane s *in vivo* izvedbom terapijskog sustava
- Validirati razvijenu analitičku metodu (putem ispitivanja njene specifičnosti, linearnosti, točnosti, preciznosti, stabilnosti i robusnosti)

## **4. MATERIJALI I METODE**

## 4.1. Materijali

U ovom radu korišteni su mupirocin kalcij dihidrat (PLIVA Hrvatska d.o.o., Hrvatska), Eudragit® RS 100 (amonij metakrilat kopolimer tip B, Evonik, Njemačka), kitozan niske molekulske mase i kitozan srednje molekulske mase (stupanj deacetilacije 75-85%, Sigma-Aldrich, SAD).

Ledena octena kiselina i natrij hidroksid analitičkog stupnja čistoće, te kalij bromid za IR spektroskopiju nabavljeni su od Mercka (Njemačka). Natrij acetat trihidrat i natrij dihidrogen fosfat dihidrat analitičkog stupnja čistoće nabavljeni su od Kemike (Hrvatska). Acetonitril (ACN) i metanol kromatografskog stupnja čistoće nabavljeni su od Mercka. Dimetilsulfoksid (DMSO) kromatografske čistoće nabavljen je od Sigma Aldricha. Radni standard mupirocin litija nabavljen je od PLIVA Hrvatska d.o.o.

Sastav i veličina pora korištenih membrana prikazani su u Tablici 4. Membrane HNWP od najlona, HVLP Durapore od poliviniliden fluorida i HAWP od smjese celuloznih estera nabavljene su od Millipore (Irska). Membrane od celuloznog nitrata nabavljene su od GE Healthcare Life Sciences (Njemačka). Polipropilenske GH Polypro membrane i polisulfonske HT Tuffryn membrane nabavljene su od Pall Corporation (SAD). Membrane od regenerirane celuloze, polietersulfona i celuloznog acetata nabavljene su od Sartorius Stedim Biotech (Njemačka).

Tablica 4. Sastav i veličina pora korištenih membrana

| Membrana  | Materijal                | Veličina pora (µm) |
|-----------|--------------------------|--------------------|
| NA 0,45   | najlon                   | 0,45               |
| PVDF 0,45 | poliviniliden fluorid    | 0,45               |
| CE 0,45   | smjesa celuloznih estera | 0,45               |
| CN 0,2    | celulozni nitrat         | 0,2                |
| CN 0,45   | celulozni nitrat         | 0,45               |
| PP 0,45   | polipropilen             | 0,45               |
| PSU 0,45  | polisulfon               | 0,45               |
| RC 0,2    | regenerirana celuloza    | 0,2                |
| RC 0,45   | regenerirana celuloza    | 0,45               |
| PESU 0,45 | polietersulfon           | 0,45               |
| CA 0,45   | celulozni acetat         | 0,45               |

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Izrada mikročestica

Mikročestice su pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem provedeno je na uređaju Mini Spray Dryer B-290 s ukapljivačem otapala Inert Loop B-295 (Büchi, Švicarska), koji omogućuje siguran rad s organskim otapalima u zatvorenom sustavu. Otopine za raspršivanje su pomoću peristaltičke pumpe dovedene do sapnice te raspršene u sitne kapljice (atomizirane) pomoću komprimiranog dušika. Raspršene fine kapljice su zatim sušene u cilindru, te odvojene od struje plina u ciklonu. Korišteni su dvofluidna sapnica promjera 0,7 mm i mali visokoučinkoviti ciklon.

Uzorci polimernih mikročestica s mupirocinom pripremljeni su u triplicatu. Dodatno su za usporedbu izrađene i jednokomponentne mikročestice. Uzorci su čuvani u dobro zatvorenim staklenim spremnicima pri ambijentalnim laboratorijskim uvjetima.

#### a) Kitozanske mikročestice s mupirocinom (*Mupi–Kit N*, *Mupi–Kit S*)

Odgovarajuća količina kitozana niske ili srednje molekulske mase otopljena je u 0,5% (v/v) octenol kiseline kako bi se postigla koncentracija kitozana 1,6% (m/m). Mupirocin kalcij dihidrat je otopljen u metanolu u koncentraciji 1,2% (m/m). Otopina kitozana i otopina mupirocin kalcij dihidrata pomiješane su u omjeru 3:1 (m/m), kako bi se u otopini za raspršivanje postigao omjer polimera i lijeka 4:1 (m/m). Ukupna koncentracija suhe tvari u otopini za raspršivanje bila je 1,5% (m/m). Procesni parametri sušenja bili su sljedeći: aspirator 100%, pumpa 20%, brzina protoka komprimiranog dušika 414 Nl/h, ulazna temperatura 130°C, izlazna temperatura 73-80°C.

#### b) Metakrilatne mikročestice s mupirocinom (*Mupi–Eud*)

Eudragit je otopljen u metanolu u koncentraciji 2,4% (m/m). Odgovarajuća količina mupirocin kalcij dihidrata otopljena je u metanolnoj otopini Eudragita kako bi se u otopini za raspršivanje postigao omjer polimera i lijeka 4:1 (m/m). Ukupna koncentracija suhe tvari u otopini za raspršivanje bila je 3% (m/m). Procesni parametri sušenja bili su sljedeći: aspirator 100%, pumpa 40%, brzina protoka komprimiranog dušika 414 Nl/h, ulazna temperatura 110°C, izlazna temperatura 60-66°C.

*c) Jednokomponentne mikročestice (Mupi, Kit N, Kit S, Eud)*

Mikročestice mupirocina (Mupi) pripremljene su sušenjem raspršivanjem iz 2%-tne metanolne otopine. Procesni parametri sušenja bili su sljedeći: aspirator 100%, pumpa 40%, brzina protoka komprimiranog dušika 414 Nl/h, ulazna temperatura 90°C, izlazna temperatura 47-52°C.

Mikročestice kitozana niske i srednje molekulske mase (Kit N, Kit S) pripremljene su sušenjem raspršivanjem iz otopine pripremljene prema postupku za kitozanske mikročestice s mupirocinom, ali bez dodatka mupirocina. Procesni parametri sušenja bili su isti kao za uzorke Mupi–Kit N i Mupi–Kit S.

Mikročestice Eudragita (Eud) pripremljene su sušenjem raspršivanjem iz otopine pripremljene prema postupku za metakrilatne mikročestice s mupirocinom, ali bez dodatka mupirocina. Procesni parametri sušenja bili su isti kao za uzorak Mupi-Eud.

#### **4.2.2. Iskorištenje, sadržaj lijeka i učinkovitost uklapanja lijeka**

Iskorištenje procesa (%) izračunato je kao omjer mase mikročestica i ukupne mase suhe tvari (polimera i lijeka) pomnožen sa 100.

Sadržaj lijeka u mikročesticama određen je kao postotni udio (m/m %) mupirocina prisutnog u mikročesticama. Kako bi se odredio sadržaj lijeka u metakrilatnim mikročesticama izvagano je točno oko 5 mg uzorka, otopljeno u 5 ml metanola te razrijeđeno do 50 ml s acetatnim puferom pH 5,5. Kod kitozanskih mikročestica izvagano je točno oko 5 mg uzorka, otopljeno u 5 ml metanola i 5 ml 1%-tne (v/v) octene kiseline, te razrijeđeno do 50 ml s acetatnim puferom pH 5,5. Otopine uzoraka su pripremljene u duplikatu i analizirane HPLC metodom.

Učinkovitost uklapanja izračunata je kao omjer (m/m %) stvarnog sadržaja lijeka i teoretskog sadržaja lijeka u mikročesticama.

#### **4.2.3. Određivanje raspodjele veličina čestica**

Raspodjela veličina čestica određena je pomoću uređaja za mikroskopsku analizu slike Morphologi G3-ID (Malvern Instruments, Velika Britanija). Suhi uzorci su raspršeni na staklenu ploču na automatiziranom postolju za uzorke korištenjem integrirane automatizirane jedinice za raspršivanje uzorka. Pri mjerenju je korištena leća s povećanjem od 50 puta. Izmjereno je najmanje 10000 čestica po uzorku.

#### **4.2.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)**

Diferencijalna pretražna kalorimetrija provedena je korištenjem uređaja Q2000 (TA Instruments, SAD) u atmosferi dušika (50 ml/min). Oko 0,5 – 3,0 mg uzorka je odvagano u aluminijsku hermetičku posudicu s probušenim poklopcem (koji omogućuje izlaz otapala pri zagrijavanju). Uzorci su zagrijavani brzinom 5°C/min od 0°C do 250°C. Analize su provedene u duplikatu.

#### **4.2.5. Termogravimetrijska analiza (TGA)**

Termogravimetrijske analize provedene su korištenjem uređaja Q5000 IR (TA Instruments). Uzorci (2-10 mg) su zagrijavani u struji dušika (25 ml/min) u platinastim posudicama brzinom 5°C/min, od ambijentalne temperature do 300°C.

#### **4.2.6. Rendgenska difrakcija na prahu (XRPD)**

Difraktogrami praha snimani su pomoću Philips X'Pert PRO difraktometra (PAN Analytical, Njemačka) opremljenog X'Celerator detektorom ( $2,022^\circ 2\theta$ ) uz  $\text{CuK}\alpha$  zračenje pri 45 kV i 40 mV. Kut snimanja ( $2\theta$ ) bio je  $3\text{--}40^\circ$ , korak ( $2\theta$ )  $0,017^\circ$ , a vrijeme po koraku 100 sekundi. Uzorak je homogeniziran u tarioniku, te nanesen na originalni Philipsov silikonski nosač (promjera 32 mm). Difraktogrami su analizirani korištenjem računalnog programa X'Pert Data Viewer.

#### **4.2.7. Dinamička sorpcija pare (DVS)**

Dinamička sorpcija pare određena je na uređaju DVS Intrinsic (Surface Measurement Systems, Velika Britanija) pri temperaturi 25°C. Uzorak (5-30 mg) je uravnotežen pri 0% relativne vlage (RV) kako bi se odredila suha masa uzorka. Nakon toga uzorak je postupno izlagan sve višoj relativnoj vlazi (u koracima od 10% RV do konačnih 90% RV), a razlika u masi je mjerena preciznom vagom u sklopu instrumenta. Na svakoj zadanoj relativnoj vlazi uzorak je bio do postizanja konstantne mase (promjena mase najviše 0,002 %/min). Količina adsorbirane vode izražena je kao postotak suhe mase uzorka.



#### **4.2.8. Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR)**

Infracrveni spektri snimljeni su na uređaju Spectrum GX (Perkin Elmer, SAD), uz pomoć računalnog programa Spectrum. Korištena je metoda KBr pastile (s približno 0,7% uzorka) u rasponu valnih brojeva od 4000-370  $\text{cm}^{-1}$ , uz rezoluciju 4  $\text{cm}^{-1}$  te sa 16 snimaka po spektru.

#### **4.2.9. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)**

Morfologija mikročestica analizirana je pomoću elektronskog mikroskopa JSM-5800 (JEOL, Japan) pri naponu od 20 kV. Uzorci su fiksirani na aluminijsku pločicu pomoću vodljive dvostrano ljepljive trake i napareni zlatom pomoću uređaja Edwards S150.

Na isti je način analizirana i morfologija membrana korištenih za ispitivanje brzine oslobađanja.

#### **4.2.10. Određivanje zeta potencijala**

Zeta potencijal određen je laserskom dopler mikroeletroforezom na uređaju Zetasizer Nano (Malvern Instruments). Zeta potencijal mikročestica određen je nakon dispergiranja 1 mg uzorka u 10 ml HPLC vode. Za svaki su uzorak napravljena po tri mjerenja u automatskom modu (10-100 snimanja po mjerenju), pri temperaturi 25°C.

#### **4.2.11. Određivanje sadržaja visokotlačnom kromatografijom**

Kao ishodište za razvoj HPLC metode za određivanje mupirocina korištena je metoda iz monografije za mupirocin, opisana u Američkoj farmakopeji (USP, 2015g). Farmakopejska metoda je modificirana kako je opisano u nastavku.

Mobilna se faza sastojala od acetonitrila i natrij dihidrogenfosfatnog pufera (pH 6,3; 0,05M) u omjeru 25:75 (v/v). Za pripremu pufera za mobilnu fazu korištena je ultračista voda (Ultra Clear UV Plus water system, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Njemačka). Pufer za mobilnu fazu je filtriran kroz 0,2  $\mu\text{m}$  filter.

Analize su provedene pomoću uređaja Agilent 1100/1200 Series (Agilent Technologies, Njemačka), opremljenih detektorom s nizom dioda (DAD). Korištena je kolona Kinetex C18 (50 x 4,6 mm, veličina čestica 2,6  $\mu\text{m}$ ) s prefilterom KrudKatcher Ultra,

proizvođača Phenomenex (SAD). Temperatura kolone bila je 30°C, brzina protoka mobilne faze 1 ml/min, volumen injektiranja 25 µl, valna duljina 229 nm, a vrijeme analize (engl. *run time*) 2,5 min.

Za potrebe HPLC analiza pripremljene su otopine standarda u koncentraciji unutar linearnog područja metode. Tipično je za otopinu standarda odvagano 3 mg mupirocin litij radnog standarda, preneseno u 100 ml volumetrijsku tikvicu, otopljeno s 5 ml metanola te dopunjeno do 100 ml s acetatnim puferom pH 5,5. Otopine standarda pripremljene su u duplikatu i injektirane naizmjenično kroz sekvencu s uzorcima. U svakoj su sekvenci s uzorcima otopine standarda injektirane najmanje pet puta.

Prikladnost sustava je provjerena prema sljedećim zahtjevima: relativno standardno odstupanje (RSD) odgovora detektora za sva injektiranja otopina standarda kroz sekvencu ne smije biti veće od 2,0%; faktor razvlačenja pika mupirocina ne smije biti veći od 2,0.

#### **4.2.12. Određivanje metanola plinskom kromatografijom**

Analize su provedene pomoću plinskog kromatografa Agilent 6890 Series opremljenog plameno-ionizacijskim detektorom (FID) u kombinaciji s headspace (HS) automatskim sustavom za uzorkovanje G1888 (Agilent Technologies). Korištena je kolona DB-624 (30 m x 0,53 mm x 3 µm), proizvođača Agilent. Kromatografski parametri prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Parametri kromatografske metode za određivanje metanola

| Parametar                                      | Zadana vrijednost                                     |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Plin nositelj                                  | He                                                    |
| Brzina protoka                                 | 4,9 ml/min                                            |
| Temperatura kolone                             | 5 min izotermno pri 40°C<br>20°C/min od 40°C do 200°C |
| Vrijeme analize (engl. <i>run time</i> )       | 13 min                                                |
| Temperatura injektora                          | 140°C                                                 |
| Temperatura detektora                          | 250°C                                                 |
| Omjer injektiranja (engl. <i>split ratio</i> ) | 10:1                                                  |
| Temperatura HS pećnice                         | 80°C                                                  |
| Temperatura lupe                               | 90°C                                                  |
| Temperatura prijenosnika                       | 100°C                                                 |
| Termostatiranje uzorka                         | 20 min                                                |
| Izjednačavanje tlaka                           | 0,2 min                                               |
| Punjenje lupe                                  | 0,2 min                                               |
| Izjednačavanje tlaka u lupi                    | 0,02 min                                              |
| Vrijeme injektiranja                           | 1,0 min                                               |

Za otopinu slijepe probe 5 ml dimetilsulfoksida (DMSO) je dodano u HS vial od 20 ml i odmah zatvoreno.

Za otopinu standarda 100 µL (oko 79 mg) metanola je dodano u odmjernu tikvicu od 25 ml, te razrijeđeno i dopunjeno s DMSO. 0,1 ml ove otopine preneseno je u odmjernu tikvicu od 10 ml, te razrijeđeno i dopunjeno s DMSO. 5 ml ove otopine dodano je u HS vial od 20 ml i odmah zatvoreno.

Za otopinu uzorka odvagano je 50 mg uzorka u HS vial od 20 ml. Zatim je u isti HS vial dodano 5 ml DMSO i odmah zatvoreno.

#### 4.2.13. Određivanje topljivosti

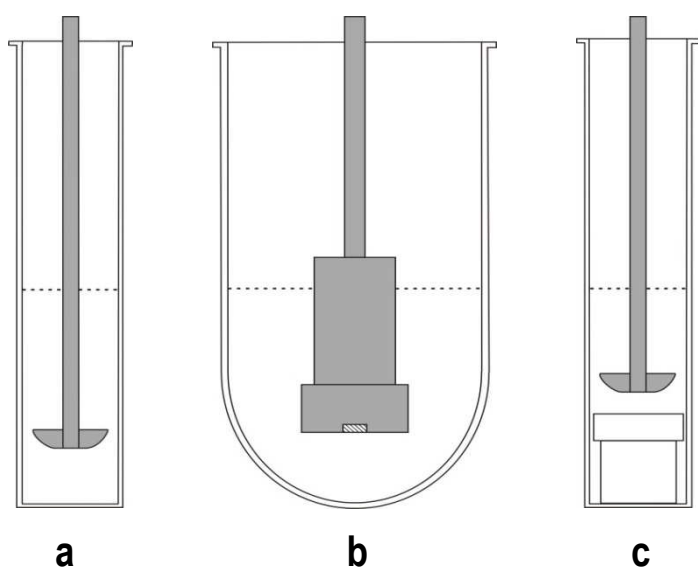
Topljivost lijeka u mediju za ispitivanje brzine oslobađanja (acetatni pufer pH 5,5) ispitana je u triplicatu metodom prezasićene otopine. Mupirocin kalcij dihidrat je dodan u suvišku u staklene cilindre s 10 ml medija. Zatvoreni cilindri su potresivani 48 sati brzinom 50 min<sup>-1</sup> na termostatiranoj orbitalnoj tresilici pri 32°C. Nakon 24 i 48 sati supernatant je

uzorkovan, filtriran, razrijeđen s medijem i analiziran HPLC metodom. pH medija je bio unutar raspona  $5,5 \pm 0,2$  kroz cijelo ispitivanje.

#### 4.2.14. Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka bez imerzijske ćelije

##### 4.2.14.1. Aparatura s lopaticom

Ispitivanje brzine oslobađanja na aparaturi s lopaticom provedeno je korištenjem uređaja VK 7010 s 200 ml posudama ravnog dna i mini-lopaticama (Agilent) (slika 15a). U svaku je posudu dodano 100 ml medija za ispitivanje oslobađanja (degazirani acetatni pufer pH 5,5) te odgovarajuća količina uzorka mikročestica, koja sadrži 5 mg mupirocina. Analizirane su četiri posude po uzorku. Temperatura medija je održavana u rasponu  $32,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  pomoću termostatisane vodene kupelji. Visina lopatica je podešena na 2,5 cm od dna posude. Brzina okretanja lopatica bila je 50 o/min. U vremenskim točkama 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 i 240 minuta uzorkovano je po 2 ml otopine. Oduzeti volumen je nadoknađen istim volumenom termostatisanog medija. Uzorci su filtrirani pomoću GHP Acrodisc GF 0,45  $\mu\text{m}$  filtera (Pall Corporation, SAD) i analizirani HPLC metodom. Kod izračuna količine oslobođenog lijeka primijenjena je korekcija za kumulativno razrjeđenje uzrokovano zamjenom uzorka sa svježim medijem.



Slika 15. Shematski prikaz (a) aparature s lopaticom (konfiguracija s posudom malog volumena s ravnim dnom te mini-lopaticom); (b) aparature s rotirajućim diskom; (c) imerzijske ćelije u kombinaciji s aparaturom s lopaticom

#### **4.2.14.2. Aparatura s rotirajućim diskom**

Aparatura s rotirajućim diskom (poznata i kao Woodova aparatura) korištena je u kombinaciji s VK 7010 uređajem i 1000 ml posudama (Agilent) (slika 15b). Za izradu svakog komprimata korištena je odgovarajuća količina uzorka koja sadrži 10 mg mupirocina. Komprimati su pripremljeni na hidrauličkoj preši korištenjem čeličnog kalupa, pritiskivača i donje ploče. Kako bi se izradili komprimati primijenjen je pritisak od 1,5 t u periodu od jedne minute. Analizirana su tri komprimata po uzorku. Analiza je provedena u 500 ml degaziranog acetatnog pufera pH 5,5 pri temperaturi 32°C i brzini okretanja diskova 100 o/min. Izložena površina komprimata bila je 0,5 cm<sup>2</sup>. U vremenskim točkama 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta uzorkovano je po 5 ml otopine. Uzorci su filtrirani i analizirani HPLC metodom. Oduzeti volumen je nadoknađen istim volumenom termostatiranog medija. Kod HPLC analize uzoraka iz testa s rotirajućim diskom korišten je volumen injektiranja od 100 µl kako bi se postigao odgovarajući odgovor (površina pika). Kod izračuna količine oslobođenog lijeka primijenjena je korekcija za kumulativno razrjeđenje uzrokovano zamjenom uzorka sa svježim medijem.

#### **4.2.15. Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka s imerzijskom ćelijom**

Imerzijske ćelije (Enhancer Cell<sup>TM</sup>, Agilent) površine 4 cm<sup>2</sup> korištene su u kombinaciji s uređajem za ispitivanje oslobađanja VK 7010, te 200 ml posudama ravnog dna i mini-lopaticama (Agilent) (slika 15c).

U svaku je posudu dodano 100 ml medija za ispitivanje oslobađanja (degazirani acetatni pufer pH 5,5). Temperatura medija je održavana u rasponu 32,0 ± 0,5°C pomoću termostatirane vodene kupelji. Visina lopatica podešena je na 1 cm od površine membrane. Korištene su membrane od smjese celuloznih estera, veličine pora 0,45 µm (HAWP, Millipore). Membrane su namakane u mediju 30 minuta prije početka analize. Volumen donorskog odjeljka ćelije podešen je na 2 ml. U donorski odjeljak dodana je odgovarajuća količina uzorka koja sadrži 5 mg mupirocina. Preostali volumen donorskog odjeljka ispunjen je medijem, te je sadržaj donorskog odjeljka nježno izmiješan pomoću špatule. Zatim je preko vrha ćelije postavljena membrana, te je membrana zabrtvljena i učvršćena brtvenim prstenom i prstenom za učvršćivanje. Sastavljena ćelija je unesena u posudu za ispitivanje oslobađanja, s membranom prema gore.

Brzina okretanja lopatica bila je 50 o/min. U vremenskim točkama 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 i 360 minuta uzorkovano je po 2 ml otopine. Oduzeti volumen je nadoknađen istim volumenom termostatisanog medija. Uzorci su analizirani HPLC metodom. Kod izračuna količine oslobođenog lijeka primijenjena je korekcija za kumulativno razrjeđenje uzrokovano zamjenom uzorka sa svježim medijem.

#### **4.2.15.1. Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka s imerzijskom ćelijom – obrada rezultata**

Račun i evaluacija rezultata ispitivanja brzine oslobađanja provedeni su prema Američkoj farmakopeji (USP, 2015a). Za izračun 90%-tnog intervala pouzdanosti za omjer nagiba između testnog (T) i referentnog (R) uzorka korišten je Mann-Whitney U test. Za evaluaciju rezultata koristi se neparametrijski statistički test jer česti artefakti testa, kao što su mjehurići zraka i nesavršenosti membrane, daju rezultate mjerenja koji nisu normalno distribuirani.

Kako bi se usporedila dva uzorka, analizira se 6 ćelija po uzorku (prvi nivo ispitivanja). Za svaku ćeliju odredi se količina oslobođenog lijeka ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) za svako vrijeme uzorkovanja, te se ukupna količina oslobođenog lijeka grafički prikaže u ovisnosti o korijenu iz vremena. Nagib dobivene linije je mjera brzine oslobađanja lijeka. Svaki T nagib se usporedi sa svakim R nagibom računanjem T/R omjera (tablica 6). Svih 36 pojedinačnih T/R omjera nagiba se poreda od najmanjeg do najvećeg. Osmi i dvadeset deveti T/R omjeri predstavljaju 90%-tni interval pouzdanosti za omjere brzina oslobađanja testnog i referentnog uzorka. Kako bi zahtjev za sličnost uzoraka bio zadovoljen na prvom nivou, ti omjeri (pretvoreni u postotke množenjem sa 100) moraju biti unutar raspona 75%-133,33%.

Ukoliko rezultati ne zadovoljavaju ovaj kriterij, analiziraju se dva dodatna seta od šest ćelija za svaki uzorak, čime se dobiva dodatnih 12 nagiba po uzorku (drugi nivo ispitivanja). Zatim se računaju T/R omjeri nagiba za svih 18 nagiba po uzorku. Sva 324 pojedinačna T/R omjera nagiba se poreda od najmanjeg do najvećeg. Kako bi zahtjev za sličnost uzoraka bio zadovoljen na dugom nivou, 110. i 215. omjer nagiba, koji predstavljaju 90%-tni interval pouzdanosti, moraju biti unutar raspona 75%-133,33%.

Zadovoljavanje zahtjeva na prvom ili drugom nivou potvrđuje sličnost T i R uzoraka (USP, 2015a). Za potrebe ovog istraživanja zaključeno je da uzorci nisu slični ukoliko njihovi omjeri nagiba nisu zadovoljili zahtjev za sličnost na prvom ni na drugom nivou.

Tablica 6. Usporedba nagiba oslobađanja testnog (T) i referentnog (R) uzorka putem računanja T/R omjera nagiba

|           | <b>R1</b> | <b>R2</b> | <b>R3</b> | <b>R4</b> | <b>R5</b> | <b>R6</b> |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>T1</b> | T1/R1     | T1/R2     | T1/R3     | T1/R4     | T1/R5     | T1/R6     |
| <b>T2</b> | T2/R1     | T2/R2     | T2/R3     | T2/R4     | T2/R5     | T2/R6     |
| <b>T3</b> | T3/R1     | T3/R2     | T3/R3     | T3/R4     | T3/R5     | T3/R6     |
| <b>T4</b> | T4/R1     | T4/R2     | T4/R3     | T4/R4     | T4/R5     | T4/R6     |
| <b>T5</b> | T5/R1     | T5/R2     | T5/R3     | T5/R4     | T5/R5     | T5/R6     |
| <b>T5</b> | T6/R1     | T6/R2     | T6/R3     | T6/R4     | T6/R5     | T6/R6     |

#### 4.2.15.2. Razvoj i optimizacija metode

Kako bi se odabrala prikladna membrana za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lijeka ispitana je adsorpcija lijeka na 11 membrana: NA 0,45, PVDF 0,45, CE 0,45, CN 0,2, CN 0,45, PP 0,45, PSU 0,45, RC 0,2, RC 0,45, PESU 0,45 i CA 0,45 (detaljan opis membrana nalazi se u poglavlju 4.1). Kroz membrane su filtrirane otopine mupirocina koncentracija 0,001 mg/ml i 0,06 mg/ml. Nefiltrirane i filtrirane otopine su analizirane HPLC metodom, te je izračunato iskorištenje za svaku membranu kao omjer površine pika mupirocina u filtriranoj i nefiltriranoj otopini.

U sljedećem koraku je za membrane koje su pokazale nisku adsorpciju lijeka ispitan otpor difuziji. U tu svrhu provedena je *in vitro* analiza brzine oslobađanja na tri ćelije po uzorku. Ispitivanje je provedeno za kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom (uzorci Mupi-Kit N i Mupi-Eud).

Kako bi se odabrala prikladna vremena uzorkovanja provedena je produljena analiza uzoraka Mupi-Kit N i Mupi-Eud. Analizirane su tri ćelije po uzorku, s vremenima uzorkovanja 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 540, 720, 1200, 1440 i 1800 min. Ostali parametri metode bili su isti kao što je opisano u poglavlju 4.2.15.

U okviru optimizacije metode varirani su sljedeći parametri: broj okretaja lopatica (25 o/min, 50 o/min ili 100 o/min), visina lopatica (1 cm ili 2,5 cm iznad membrane) i volumen receptorskog medija (100 ml ili 200 ml). Istovremeno je variran samo po jedan parametar, a ostali parametri su pritom bili isti kao što je opisano u poglavlju 4.2.15 (standardni uvjeti). Ispitivanje je provedeno za kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom (Mupi-Kit N i Mupi-Eud). Pri svakoj varijaciji parametara metode analizirano je šest ćelija. Utjecaj

varijacija evaluiran je usporedbom nagiba oslobađanja dobivenih pod modificiranim uvjetima s nagibima oslobađanja dobivenim pod standardnim uvjetima. Ukoliko je 90%-tni interval pouzdanosti za omjere nagiba unutar raspona 75%-133,33% zaključeno je da modifikacija nema značajan utjecaj na brzinu oslobađanja.

#### **4.2.16. Validacija metode**

Metoda je validirana u skladu sa smjernicama Internacionalne konferencije za harmonizaciju (International Conference on Harmonisation, ICH) (ICH Q2(R1), 2005). U okviru validacije ispitane su sljedeće karakteristike metode: specifičnost, linearnost, točnost, ponovljivost, intermedijaska preciznost, stabilnost otopina i robusnost.

Specifičnost je evaluirana kroz usporedbu kromatograma otopine standarda, uzorka, placebo i medija za ispitivanje oslobađanja. Otopine uzoraka (Mupi-Kit N, Mupi-Kit S, Mupi-Eud) pripremljene su prema metodi za ispitivanje brzine oslobađanja. Za potrebe ispitivanja specifičnosti i stabilnosti korištena je otopina uzorka dobivena nakon 6 sati testa oslobađanja. Otopina placebo za svaki tip uzorka pripremljena je prema metodi za ispitivanje brzine oslobađanja, s razlikom da je u imerzijsku ćeliju, umjesto mikročestica s mupirocinom, unesena odgovarajuća količina polimera (u skladu s količinom polimera prisutnom u ćeliji u tijeku analize uzorka). Za potrebe ispitivanja specifičnosti i točnosti korištene su otopine placebo dobivene nakon 6 sati testa oslobađanja.

Linearnost odgovora detektora ispitana je pomoću otopina analita pripremljenih razrjeđivanjem iste ishodne otopine medijem za ispitivanje oslobađanja. Teoretska koncentracija mupirocina u otopini uzorka (pod pretpostavkom potpunog oslobađanja djelatne tvari) je 0,05 mg/ml. Za potrebe ispitivanja linearnosti pripremljene su otopine na sedam koncentracijskih nivoa (0,001 mg/ml, 0,002 mg/ml, 0,004 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml), kako bi se pokrio raspon od 2–120% u odnosu na teoretsku koncentraciju. Napravljene su po dvije pripreme za svaki koncentracijski nivo.

Točnost metode ispitana je korištenjem ranije opisanih otopina placebo. Otopine placebo su cijepljene otopinom standarda. Pripremljene su otopine na istim koncentracijskim nivoima kao za ispitivanje linearnosti. Napravljene su po dvije pripreme za svaku otopinu placebo i svaki koncentracijski nivo.

U svrhu ispitivanja ponovljivosti metode proveden je test oslobađanja na šest imerzijskih ćelija. Dobiveno je šest pojedinačnih nagiba po uzorku (uzorci Mupi-Kit N, Mupi-Kit S, Mupi-Eud) te je izračunato relativno standardno odstupanje (RSD) nagiba za svaki



uzorak. U svrhu ispitivanja intermedijske preciznosti drugi je analitičar drugog dana ponovio test oslobađanja korištenjem drugog uređaja za ispitivanje oslobađanja, te je izračunato relativno standardno odstupanje za svih 12 nagiba po uzorku.

Kako bi se ispitala stabilnost otopina, otopine standarda i otopine uzoraka čuvane su pri ambijentalnim laboratorijskim uvjetima te pri 20°C (u automatskom uzorkivaču HPLC uređaja) i analizirane narednih dana u odnosu na svježe pripremljene otopine standarda.

Robusnost metode ispitana je putem namjernih varijacija u parametrima metode. Sljedeći parametri metode su varirani kako bi se potvrdila robusnost metode: sastav mobilne faze ( $\pm 2\%$  ACN), pH pufera za mobilnu fazu ( $\pm 0,2$  pH), temperatura termostata kolone ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), brzina protoka ( $\pm 0,2$  ml/min) i valna duljina ( $\pm 2$  nm). Pri svakoj kombinaciji uvjeta praćeni su retencijsko vrijeme, faktor razvlačenja i relativno standardno odstupanje odgovora detektora.

## **5. REZULTATI I RASPRAVA**

## 5.1. Priprava mikročestica

Kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom pripremljene su tehnikom sušenja raspršivanjem uz visoko iskorištenje (tablica 7). Učinkovitost uklapanja bila je blizu teoretske vrijednosti za metakrilatne čestice, te nešto niža za kitozanske mikročestice (tablica 7). Dobivene vrijednosti su u skladu sa ranije objavljenim podacima za slične sustave (Dürriegl i sur., 2011b; Filipović-Grčić i sur., 2003; Rizi i sur., 2011).

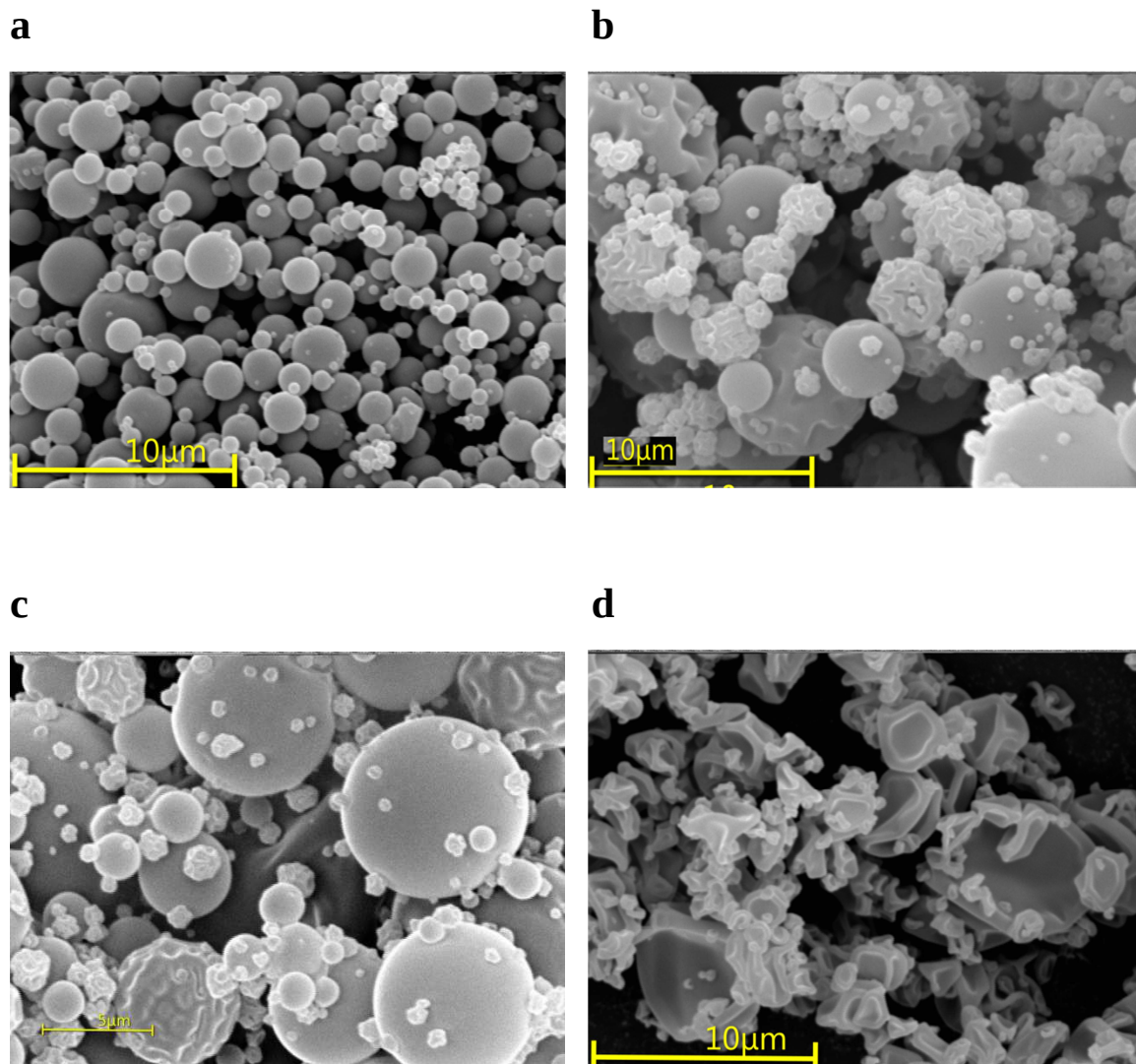
Tablica 7. Karakteristike mikročestica s mupirocinom: iskorištenje procesa, sadržaj lijeka i učinkovitost uklapanja (n=3).

| Uzorak     | Iskorištenje<br>(%±SD) | Sadržaj<br>mupirocina<br>(%±SD) | Učinkovitost<br>uklapanja<br>(%±SD) |
|------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Mupi–Kit N | 78±4                   | 16,7±0,2                        | 89,9±0,8                            |
| Mupi–Kit S | 63±11                  | 15,0±0,3                        | 80,4±1,6                            |
| Mupi–Eud   | 73±8                   | 18,2±0,2                        | 97,9±1,2                            |

## 5.2. Morfologija mikročestica

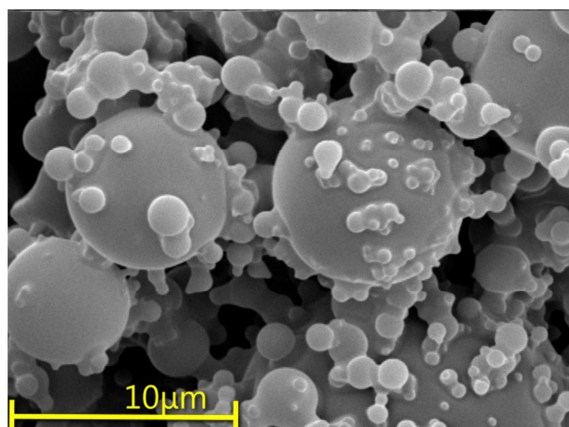
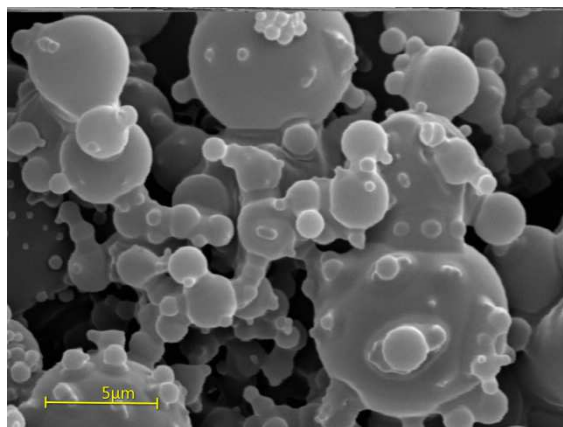
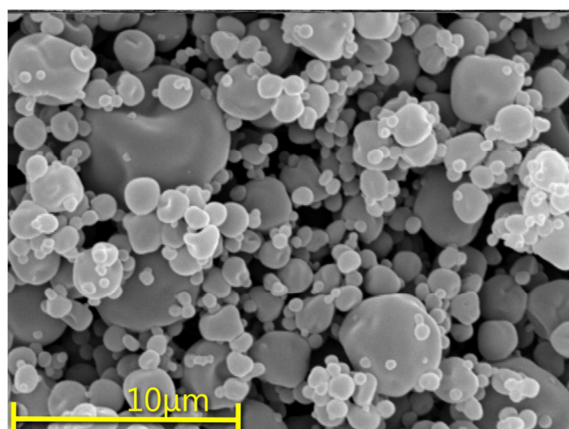
Morfologija polimernih mikročestica s mupirocinom analizirana je pretražnom elektronskom mikroskopijom. Za usporedbu je analizirana i morfologija jednokomponentnih mikročestica. Na površini analiziranih mikročestica nisu primijećene pore.

Sušenjem otopine mupirocina dobivene su pravilne sferične mikročestice (uzorak Mupi, slika 16a). Sušenjem otopine kitozana dobivena je smjesa sferičnih čestica i čestica naborane površine, nalik golf lopticama (uzorci Kit N i Kit S, slika 16b-c), dok su iz otopine Eudragita dobivene izrazito naborane čestice, nalik groždicama (uzorak Eud, slika 16d).



Slika 16. SEM slike mikročestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem: (a) uzorak Mupi; (b) uzorak Kit N; (c) uzorak Kit S; (d) uzorak Eud, povećanje 5000x.

Kitozanske čestice s mupirocinom bile su sferičnog oblika. Primijećeno je da se dio kitozanskih mikročestica s mupirocinom nije osušio u obliku pojedinačnih kuglica, već su spojene sa susjednim česticama (uzorci Mupi-Kit N i Mupi-Kit S, slika 17a-b). Metakrilatne mikročestice s mupirocinom bile su subsferičnog oblika (uzorak Mupi-Eud, slika 17c). Općenito se može primijetiti da je uklapanjem mupirocina u kitozanske i metakrilatne mikročestice smanjena naboranost mikročestica.

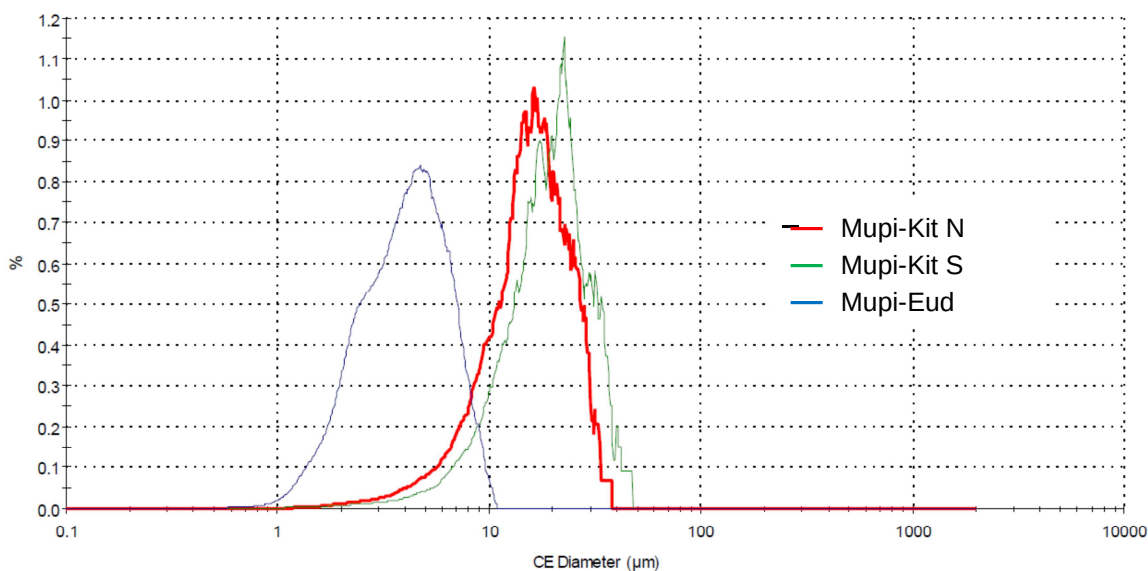
**a****b****c**

Slika 17. SEM slike mikročestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem: (a) uzorak Mupi-Kit N; (b) uzorak Mupi-Kit S; (c) uzorak Mupi-Eud, povećanje 5000x

### 5.3. Veličina mikročestica

Kao rezultat brojčane raspodjele veličine čestica iskazan je srednji CE promjer (engl. *circle equivalent diameter*, promjer kruga ekvivalentne površine). Srednji CE promjeri za kitozanske i metakrilatne uzorke bili su međusobno slični. Kod kitozanskih mikročestica izmjereni su srednji CE promjeri od 3,2 µm (Mupi-Kit N) i 2,4 µm (Mupi-Kit S), dok je kod metakrilatnih mikročestica (Mupi-Eud) srednji CE promjer bio 1,9 µm.

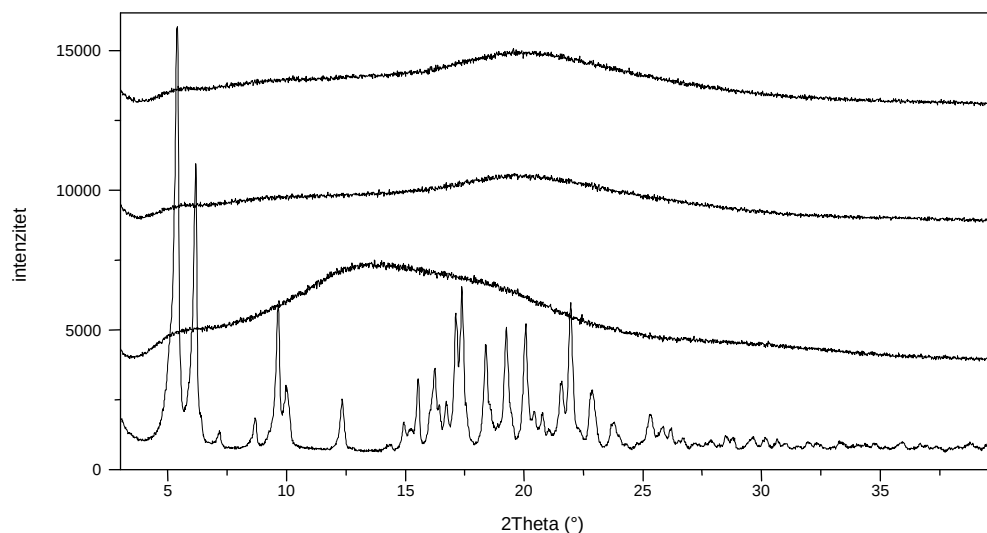
S druge strane, volumna razdioba veličine čestica (slika 18) ukazuje na nešto veći udio krupnijih čestica kod kitozanskih uzoraka (Mupi-Kit N, Mupi-Kit S) u odnosu na metakrilatni uzorak (Mupi-Eud).



Slika 18. Volumna raspodjela veličine čestica za uzorke Mupi-Kit N, Mupi-Kit S i Mupi-Eud

## 5.4. XRPD analiza

Difraktogrami mupirocin kalcij dihidrata i mikročestica s mupirocinom prikazani su na slici 19. Mupirocin kalcij dihidrat ima difraktogram tipičan za kristalnu supstanciju. S druge strane, za mikročestice pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem dobiveni su halo difraktogrami karakteristični za amorfne materijale.

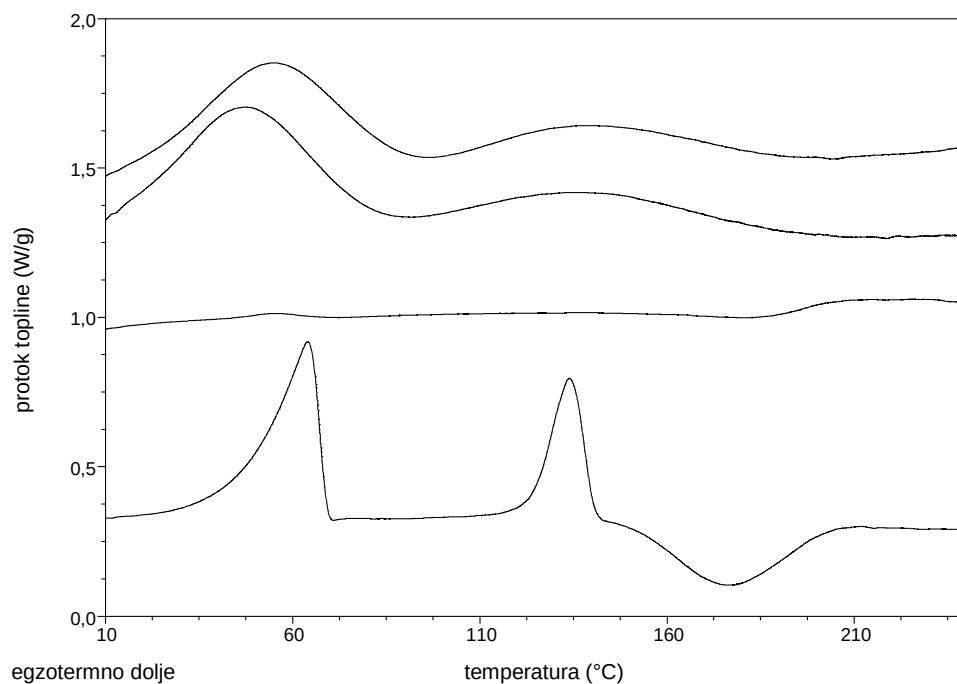


Slika 19. Difraktogrami uzoraka Mupi-Kit N, Mupi-Kit S, Mupi-Eud, te mupirocin kalcij dihidrata (od vrha prema dnu)

## 5.5. DSC analiza

Amorfnost mikročestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem potvrđena je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (slika 20). Termogram mupirocin kalcij dihidrata sadrži endotermni pik pri oko 130°C koji se pripisuje taljenju kristalnog lijeka (drugi endotermni događaj oko 60°C odgovara izlazu molekula vode). S druge strane, termogrami mikročestica s mupirocinom ne sadrže pik taljenja mupirocina, što upućuje na gubitak kristaliničnosti kod uzoraka pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem.

Pri sušenju kitozana otopljenog u razrijeđenoj octenoj kiselini nastaje kitozan acetat. Endotermni događaji u termogramima kitozanskih mikročestica odgovaraju gubitku vode te gubitku acetatne skupine iz kitozan acetata (Fernández Cervera i sur., 2011; Nunthanid i sur., 2004).



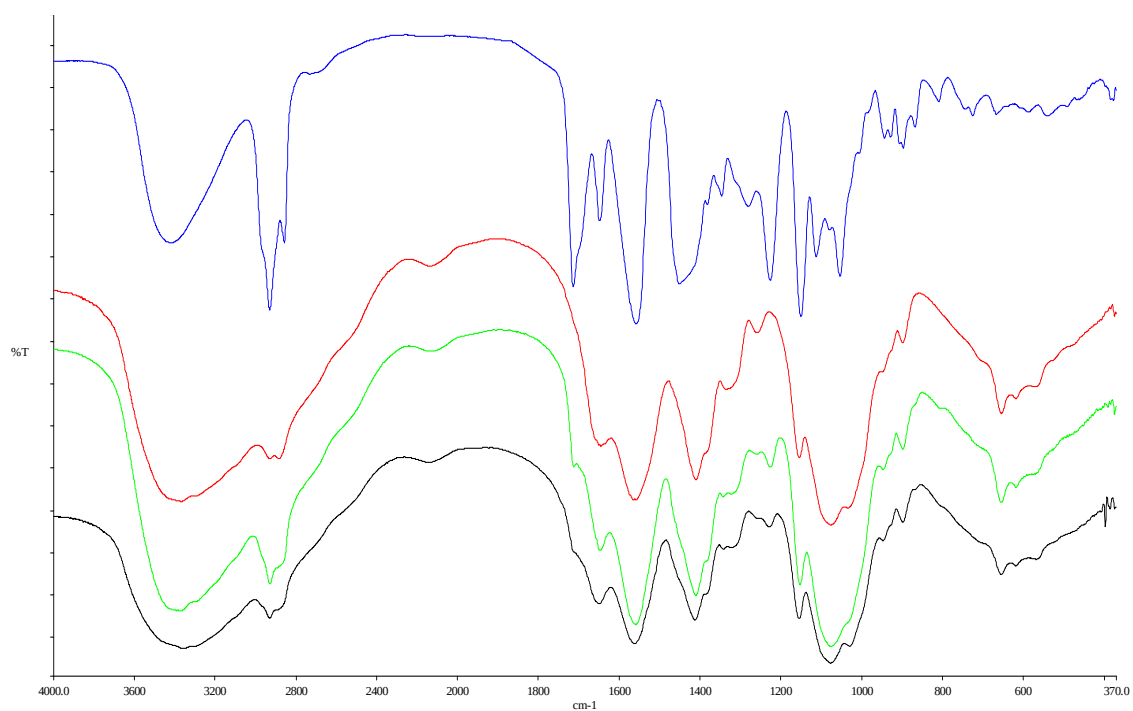
Slika 20. Termogrami uzoraka Mupi-Kit N, Mupi-Kit S, Mupi-Eud, te mupirocin kalcij dihidrata (od vrha prema dnu)

## 5.6. IR analiza

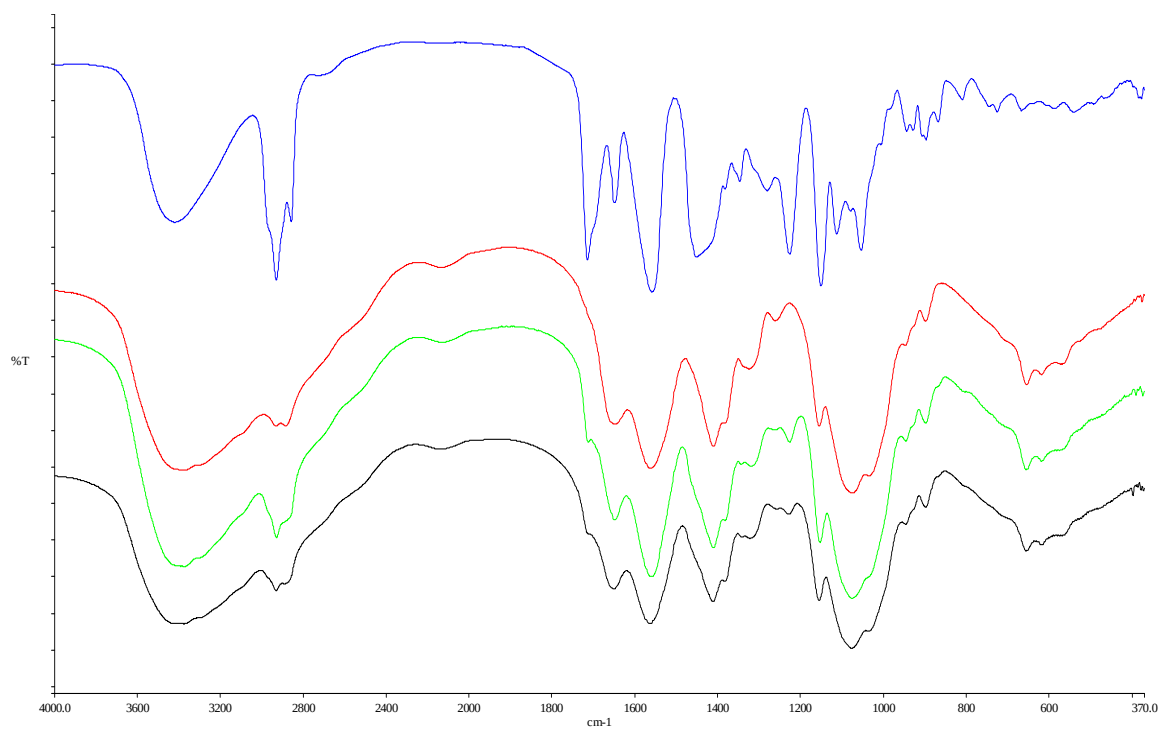
Snimljeni su IR spektri dvokomponentnih mikročestica (Mupi-Kit N, Mupi-Kit S i Mupi-Eud), jednokomponentnih mikročestica (Mupi, Kit N, Kit S i Eud), te fizičkih smjesa lijeka i polimera (Mupi + Kit N, Mupi + Kit S i Mupi + Eud). Fizičke smjese izrađene su od jednokomponentnih mikročestica prema teoretskim udjelima komponenti u dvokomponentnim mikročesticama.

IR spektri dvokomponentnih mikročestica sadrže vrpce obiju ugrađenih komponenti (lijek i polimer). Dodatno IR spektri dvokomponentnih mikročestica odgovaraju IR spektrima odgovarajućih fizičkih smjesa. Nisu primijećeni pomaci vrpce ili nastanak/nestanak vrpce koji bi ukazivali na interakcije među komponentama mikročestica (slika 21-23).

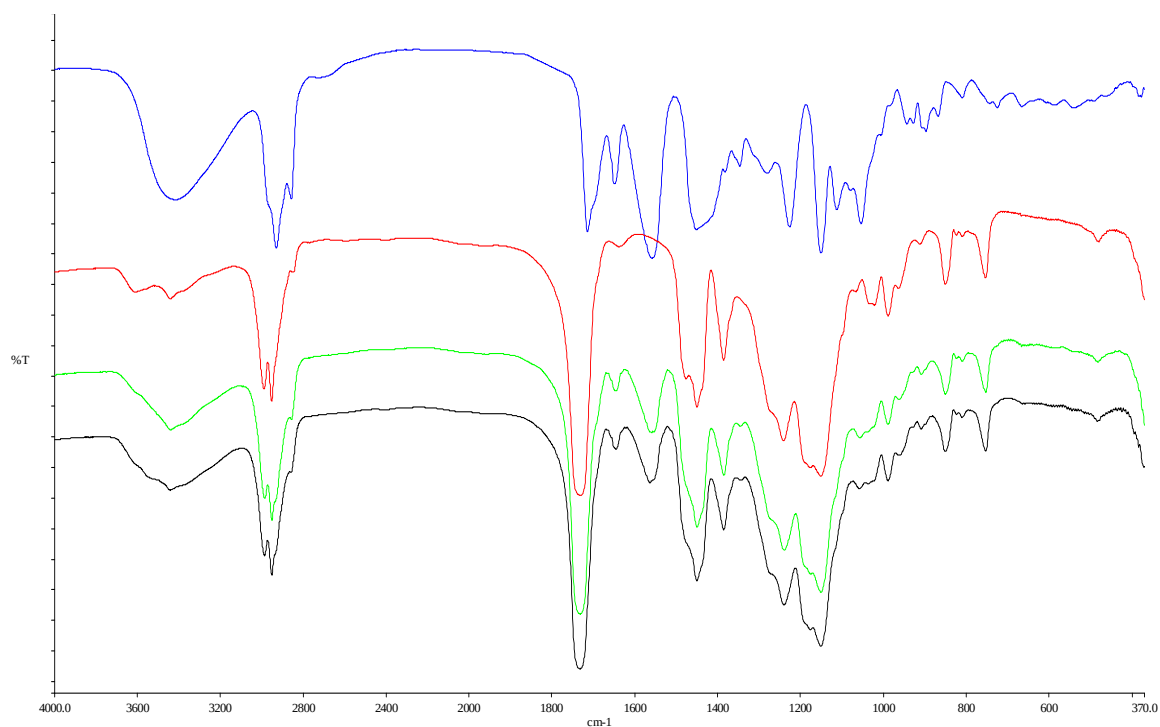




Slika 21. Infracrveni spektri uzoraka Mupi, Kit N, Mupi + Kit N (fizička smjesa) i Mupi-Kit N (od vrha prema dnu)



Slika 22. Infracrveni spektri uzoraka Mupi, Kit S, Mupi + Kit S (fizička smjesa) i Mupi-Kit S (od vrha prema dnu)



Slika 23. Infracrveni spektri uzoraka Mupi, Eud, Mupi + Eud (fizička smjesa) i Mupi-Eud (od vrha prema dnu)

## 5.7. Zeta potencijal

Mikročestice samog lijeka (uzorak Mupi) imale su negativan zeta potencijal (tablica 8). S druge strane, zeta potencijal polimernih mikročestica bez mupirocina (uzorci Kit N, Kit S, Eud) bio je pozitivan. Nakon uklapanja mupirocina u polimerne mikročestice (uzorci Mupi-Kit N, Mupi-Kit S, Mupi-Eud) postignut je pozitivan površinski naboj čestica, što ukazuje da je površina čestica uglavnom prekrivena polimerom. Općenito se smatra da je pozitivan naboj kitozana zaslužan za njegova antimikrobna i bioadhezivna svojstva (Dai i sur., 2011).

Tablica 8. Zeta potencijal kitozanskih i metakrilatnih mikročestica s mupirocinom, te zeta potencijal jednokomponentnih uzoraka (n=3)

| <b>Uzorak</b> | <b>Zeta potencijal<br/>(mV±SD)</b> |
|---------------|------------------------------------|
| Mupi          | -21±6                              |
| Kit N         | 28±13                              |
| Kit S         | 35±12                              |
| Eud           | 22±1                               |
| Mupi-Kit N    | 60±1                               |
| Mupi-Kit S    | 58±12                              |
| Mupi-Eud      | 43±5                               |

## 5.8. Sadržaj vode i higroskopsnost uzoraka

Sadržaj vode u mikročesticama određen je termogravimetrijskom analizom. Udio vode u kitozanskim mikročesticama s mupirocinom bio je veći nego u metakrilatnim mikročesticama s mupirocinom (tablica 9). Kitozan je hidrofilan i higroskopsan polimer dok je Eudragit hidrofoban, pa je stoga veći udio vlage u kitozanskim uzorcima u skladu s očekivanjima.

Sadržaj vode analiziran je i u jednokomponentnim mikročesticama (tablica 9). I kod jednokomponentnih mikročestica od kitozana izmjeren je visok sadržaj vode, dok je sadržaj vode u metakrilatnim i mupirocinskim mikročesticama bio nizak.

Za usporedbu, sadržaj vode u dvokomponentnim uzorcima dodatno je računski određen iz teoretskog udjela komponenti i izmjerenog sadržaja vode u jednokomponentnim uzorcima (tablica 9). Računski određen sadržaj vode u uzorcima dobro se poklapa s izmjerenim vrijednostima, što potvrđuje utjecaj sastava mikročestica na sadržaj vode.

Tablica 9. Sadržaj vode u jednokomponentnim i dvokomponentnim uzorcima određen termogravimetrijskom analizom, te teoretski sadržaj vode u dvokomponentnim uzorcima izračunat iz udjela komponenti i izmjerenog sadržaja vode u jednokomponentnim uzorcima

| <b>Uzorak</b> | <b>Izmjeren<br/>sadržaj vode<br/>(%)</b> | <b>Računski određen<br/>sadržaj vode<br/>(%)</b> |
|---------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Mupi          | 1,3                                      | -                                                |
| Kit N         | 7,9                                      | -                                                |
| Kit S         | 7,4                                      | -                                                |
| Eud           | 0,6                                      | -                                                |
| Mupi-Kit N    | 6,7                                      | 6,6                                              |
| Mupi-Kit S    | 6,5                                      | 6,2                                              |
| Mupi-Eud      | 0,6                                      | 0,7                                              |

Na sadržaj vode u mikročesticama osim njihovog sastava značajan utjecaj mogu imati i parametri sušenja. Kitozanske mikročestice pripremaju se sušenjem iz smjese vode i metanola, te je moguće da zbog neprikladnih uvjeta sušenja dolazi do prevelikog zaostajanja vode u konačnom produktu.

U fazi optimizacije procesa sušenja za kitozanske mikročestice s mupirocinom proveden je niz pokusa s ciljem smanjenja sadržaja vode u mikročesticama. Variranje ulazne temperature u rasponu od 110-140°C, te variranje pumpe u rasponu od 20-30% nije imalo značajnog utjecaja na sadržaj vode u mikročesticama (tablica 10).

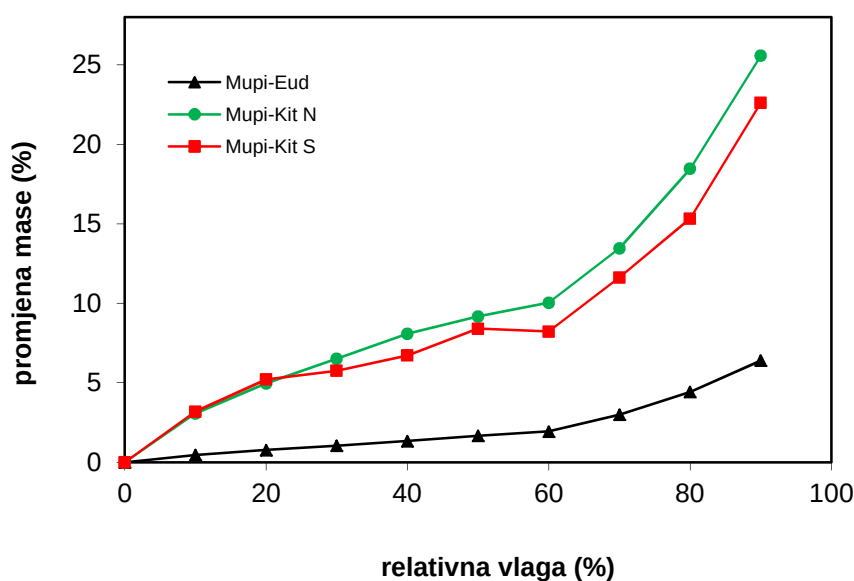
Tablica 10. Sadržaj vode u kitozanskim mikročesticama s mupirocinom (Mupi-Kit N) pri različitim parametrima sušenja

| <b>Temperatura<br/>(°C)</b> | <b>Pumpa<br/>(%)</b> | <b>Sadržaj vode<br/>(%)</b> |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 110                         | 30                   | 6,6                         |
| 130                         | 20                   | 6,7                         |
| 130                         | 30                   | 6,1                         |
| 140                         | 20                   | 6,4                         |
| 140                         | 30                   | 6,9                         |

Kod zatvorenih konfiguracija uređaja za sušenje raspršivanjem dolazi do recirkulacije plina za sušenje nakon uklanjanja (kondenzacije) otapala. Plin za sušenje koji ponovo ulazi u proces sušenja ipak sadrži određenu količinu zaostalog otapala, pa je zasićenost plina za sušenje otapalom veća kod zatvorenih nego kod otvorenih konfiguracija uređaja za sušenje raspršivanjem. Stoga je u pravilu i sadržaj ostatnih otapala veći kod produkata izrađenih na uređajima zatvorene konfiguracije (Miller i Gil, 2012). Suvišak otapala iz produkta se može ukloniti sekundarnim sušenjem.

U fazi optimizacije procesa za kitozanske mikročestice s mupirocinom ispitan je utjecaj sekundarnog sušenja na sadržaj vode. U tu svrhu mikročestice su nakon izrade dodatno sušene 24 sata u vakuum sušnici pri temperaturi 30°C i tlaku od 10 mbar. Međutim, sadržaj vode u mikročesticama izmjeren termogravimetrijskom analizom nakon sekundarnog sušenja bio je sličan sadržaju vode prije sekundarnog sušenja. S druge strane, kod izotermne termogravimetrijske analize provedene pri 30°C u trajanju od 24 sata, uklonjena je gotovo sva voda iz uzorka. Stoga se može pretpostaviti da se voda uklanja iz uzorka i pri sekundarnom sušenju mikročestica pri istoj temperaturi, međutim nakon ponovnog izlaganja uzorka ambijentalnim uvjetima izvan vakuum sušnice dolazi do readsorpcije vode iz okoliša na uzorak. Do sličnih su zaključaka došli i Maa i sur. (1998) u slučaju proteinskih praškastih pripravaka za inhalaciju. Na osnovi provedenih ispitivanja može se zaključiti da visoki sadržaj vode u kitozanskim mikročesticama nije posljedica neprikladnih uvjeta sušenja.

Analiza dinamičke sorpcije vode potvrdila je da pri istim uvjetima relativne vlage kitozanski uzorci adsorbiraju veću količinu vode od metakrilatnih uzoraka (slika 24). Ambijentalna vlaga u laboratorijima u kojima su uzorci skladišteni i analizirani kreće se u rasponu od oko 20-40% RV. Izmjereni sadržaj vode u uzorcima polimernih mikročestica s mupirocinom (tablica 9) preklapa se s ravnotežnim vrijednostima sadržaja vode pri uvjetima skladištenja uzoraka (slika 24).



Slika 24. Krivulja sorpcije vodene pare za uzorke Mupi-Eud, Mupi-Kit N i Mupi-Kit S

Iz prikupljenih se rezultata može zaključiti da sadržaj vode u pripremljenim mikročesticama ovisi o sastavu mikročestica, higroskopnosti ugrađenih komponenti i uvjetima skladištenja uzoraka.

## 5.9. Sadržaj metanola

Sadržaj ostatnog organskog otapala (metanola) u polimernim mikročesticama s mupirocinom određen je plinskom kromatografijom. Prema ICH smjernicama (ICH Q3C(R5), 2011) metanol je svrstan u otapala klase II (otapala koja treba ograničiti), te je za njega postavljena granica od 3000 ppm. Kod svih je analiziranih polimernih mikročestica s mupirocinom (Mupi-Kit N, Mupi-Kit S, Mupi-Eud) sadržaj metanola bio ispod 300 ppm, odnosno manje od 10% limita propisanog ICH smjernicama.

## 5.10. Topljivost

Topljivost mupirocina određena je u mediju za ispitivanje oslobađanja (acetatni pufer pH 5,5) pri 32°C. Razlika između koncentracija izmjerenih nakon 24 i 48 sati bila je manja od 3%, stoga je zaključeno da je postignuta ravnoteža. Topljivost mupirocina iznosi 7,7 mg/ml.

Koncentracija u slučaju potpunog oslobađanja djelatne tvari kod analize s imerzijskom ćelijom je 0,05 mg/ml. Rezultati ispitivanja topljivosti potvrđuju da su tijekom analize s imerzijskim ćelijom zadovoljeni uvjeti osigurane topljivosti. Općenito su uvjeti osigurane topljivosti postignuti u volumenu medija koji je najmanje 3 puta (USP, 2015f) ili najmanje 3-10 puta veći od volumena zasićenja (Ph.Eur., 2015h).

## 5.11. Razvoj HPLC metode

HPLC metoda za ispitivanje brzine oslobađanja razvijena je iz metode za određivanje sadržaja opisane u monografiji Američke farmakopeje za mupirocin (USP, 2015g). Kod analize provedene prema propisu iz monografije, uz korištenje kolone Waters Symmetry C18 (250 x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm) te uz protok 2 ml/min dobiven je kromatogram s retencijskim vremenom mupirocina od 7,5 min. Uzevši u obzir velik broj uzoraka koje je potrebno analizirati kod ispitivanja profila oslobađanja, bilo je poželjno razviti HPLC metodu s kraćim vremenom analize, kako bi se postigla veća protočnost uzoraka i smanjila potrošnja mobilne faze. Stoga je odabrana kraća kolona, Phenomenex Kinetex C18 (50 x 4,6 mm, veličina čestica 2,6 µm). Pri protoku mobilne faze od 1 ml/min mupirocin eluira pri retencijskom vremenu od 1,9 min. Na taj je način značajno skraćeno vrijeme analize (duljina analize po injektiranju 2,5 min umjesto 9 min), te smanjena potrošnja mobilne faze (2,5 ml po injektiranju umjesto 18 ml po injektiranju).

U monografiji za mupirocin nije specificirana temperatura kolone, pa se može pretpostaviti da se kolona koristi pri ambijentalnoj temperaturi. S obzirom da je na ovaj način odabir temperature kolone podložan interpretaciji analitičara i varijacijama ambijentalnih uvjeta, te da je temperature niže od 30°C teško održavati u toplim klimatskim područjima, u okviru provedenog istraživanja primijenjena je temperatura kolone od 30°C.

Za analizu su korištene mobilna faza (smjesa acetonitrila i natrij dihidrogenfosfatnog pufera (25:75, v/v)) i analitička valna duljina (229 nm) specificirane u monografiji Američke farmakopeje. Medij za ispitivanje oslobađanja (acetatni pufer pH 5,5) korišten je kao diluent

za otopinu standarda, kako bi sastav otopine standarda nalikovao sastavu uzoraka iz analize brzine oslobađanja. Uzevši u obzir očekivani raspon metode (0,001-0,06 mg/ml), prikladnim se pokazao volumen injektiranja od 25 µl. Metoda je validirana kako je opisano u poglavlju 5.15.

## **5.12. Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka bez imerzijske ćelije**

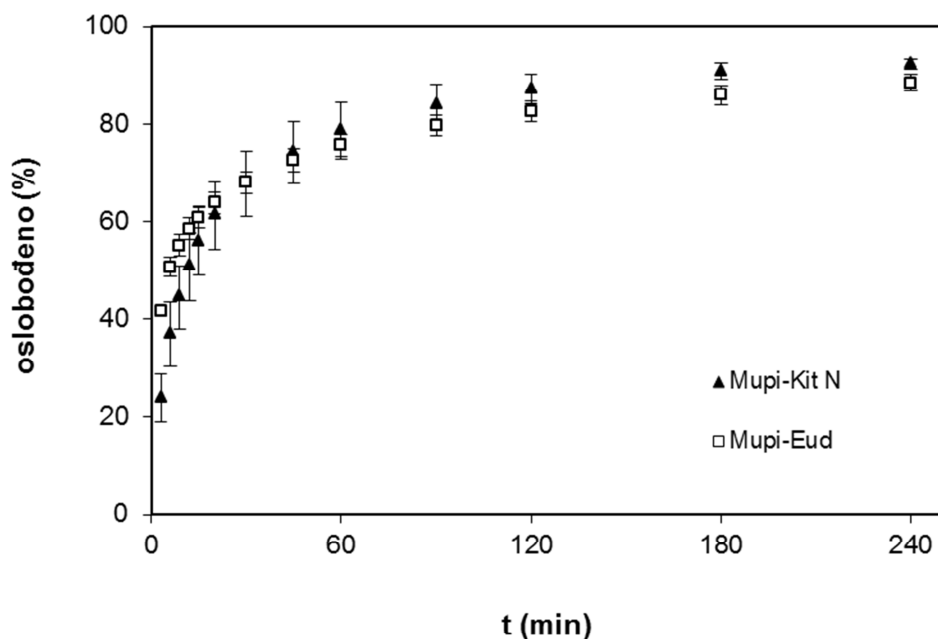
### **5.12.1. Aparatura s lopaticom**

Kitozanski i metakrilatni uzorci različito su se ponašali tijekom testa na aparaturi s lopaticom. U početku testa uzorak Mupi-Kit N je plutao na površini medija zbog svoje niske gustoće. U kontaktu uzorka s medijem postepeno se stvarao gel koji se lijepio na miješala i stijenke posuda a zatim polako otapao. S druge strane, uzorak Mupi-Eud tonuo je na dno posude i bio u potpunosti izložen mediju.

Tijekom ispitivanja oslobađanja lijeka iz mikročestica na aparaturi s lopaticom uzorkovanje je otežano zbog lijepljenja neotopljenih čestica na kanule za uzorkovanje i značajnog tlaka koji se javlja tijekom filtriranja. Kako bi se smanjio tlak pri filtriranju korišteni su filteri sa staklenim predfiltrom. Nadalje, kanule su bile trajno uronjene u medij kako bi se izbjegao gubitak neotopljenih mikročestica iz medija pri vađenju kanula.

Oblik profila oslobađanja za dva analizirana uzorka bio je sličan, međutim u početku je oslobađanje lijeka iz uzorka Mupi-Kit N bilo sporije nego iz uzorka Mupi-Eud (slika 25). Pri ispitivanju brzine oslobađanja iz mikročestica količina oslobođenog lijeka u prvoj točki uzorkovanja često se smatra indikatorom naglog oslobađanja lijeka (engl. *burst release*). Međutim, sporo početno oslobađanje lijeka iz uzorka Mupi-Kit N u odnosu na uzorak Mupi-Eud (24% odnosno 42% oslobođeno u 3 min) je bar djelomično posljedica neprikladnog položaja uzorka Mupi-Kit N unutar posude za ispitivanje oslobađanja i njegove ograničene izloženosti mediju.





Slika 25. Profili oslobađanja iz mikročestica s mupirocinom na aparaturi s lopaticom (bez imerzijske ćelije): uzorci Mupi-Kit N i Mupi-Eud ( $\% \pm \text{SE}$ ,  $n=4$ )

Valja naglasiti da se plutanje uzorka na površini medija kod ispitivanja brzine oslobađanja smatra neprikladnim jer značajno utječe na izloženost uzorka mediju i posljedično na brzinu oslobađanja. Stoga je zaključeno da ovakva aparatura nije prikladna za ispitivanje brzine oslobađanja iz uzorka Mupi-Kit N.

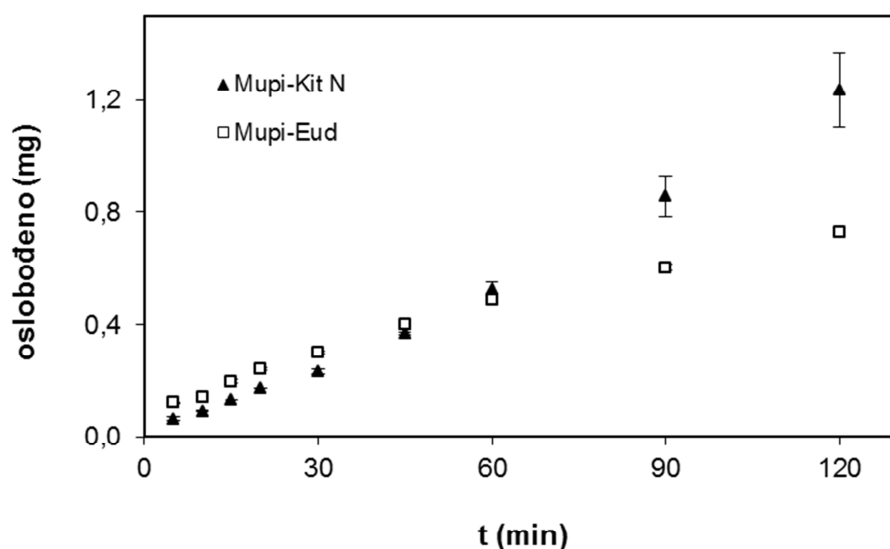
### 5.12.2. Aparatura s rotirajućim diskom

Kako bi se izbjegli plutanje i lijepljenje uzorka te problemi s uzorkovanjem i filtriranjem (koji su primijećeni kod analize mikročestica na aparaturi s lopaticom), dodatno je provedena analiza uzoraka Mupi-Kit N i Mupi-Eud na aparaturi s rotirajućim diskom. Tijekom testa s rotirajućim diskom prati se brzina oslobađanja s konstantne površine komprimiranog praha. Stoga je svaka promjena površine komprimata (npr. zbog erozije, ljuštenja, bubrenja) tijekom testa nepoželjna.

Međutim, u slučaju uzorka Mupi-Kit N komprimati su počeli bubriti odmah nakon uranjanja u medij. S druge strane, komprimati uzorka Mupi-Eud su bili krhki i lako su pucali

tijekom pripreme. Iako su za analizu korišteni samo komprimati s glatkom površinom i bez vidljivih pukotina, primijećeno je ljuštenje Mupi-Eud komprimata nakon pokretanja testa.

S obzirom da površina komprimata Mupi-Kit N i Mupi-Eud nije bila konstantna tijekom testa zaključeno je da dobiveni rezultati (slika 26) nisu prikladni za računanje brzine oslobađanja.



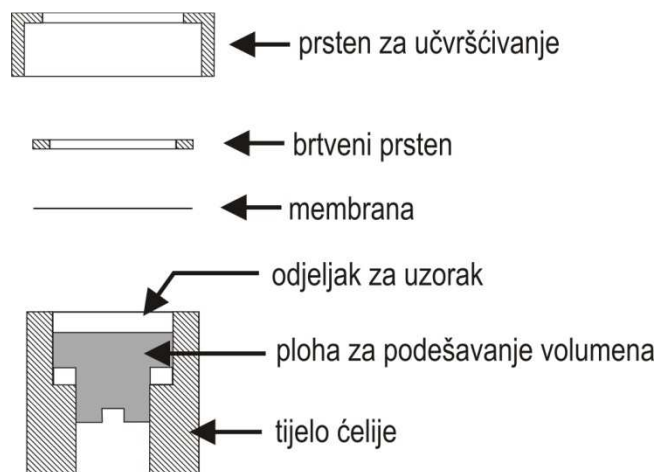
Slika 26. Profili oslobađanja iz mikročestica s mupirocinom na aparaturi s rotirajućim diskom: uzorci Mupi-Kit N i Mupi-Eud (mg  $\pm$  SE, n=3)

## 5.13. Ispitivanje brzine oslobađanja lijeka s imerzijskom ćelijom – razvoj metode

### 5.13.1. Aparatura i medij

Imerzijska ćelija koristi se u kombinaciji s aparaturom s lopaticom (USP/Ph.Eur. aparatura 2). Volumen posuda može varirati od 100 ml do 4 l, ali najčešće se koriste posude volumena 150 ml ili 200 ml. Uz posude malog volumena potrebno je provesti odgovarajuće prilagodbe na uređaju za ispitivanje oslobađanja (držači za posude malog volumena i mini-lopatice) (USP, 2015a). Kako bi se izbjegao „mrtvi“ prostor ispod ćelije mogu se koristiti posude ravnog dna. U okviru ovog istraživanja korištene su imerzijske ćelije u kombinaciji s posudama ravnog dna volumena 200 ml.

Imerzijska ćelija (Enhancer Cell™) sastoji se od sljedećih dijelova: tijelo ćelije, ploha za podešavanje volumena, brtveni prsten i prsten za učvršćivanje (slika 27). Pomicanjem plohe za podešavanje unutar tijela ćelije može se varirati volumen odjeljka za uzorak unutar ćelije. Brtveni prsten i prsten za učvršćivanje pričvršćuju membranu za tijelo ćelije te osiguravaju njen potpuni kontakt s uzorkom.



Slika 27. Shematski prikaz dijelova imerzijske ćelije

Kod analize polučvrstih pripravaka donorski odjeljak imerzijske ćelije treba napuniti uzorkom do vrha kako bi se smanjila mogućnost stvaranja mjehurića zraka između uzorka i membrane. Mjehurići zraka smanjuju površinu dostupnu za difuziju i posljedično utječu na brzinu oslobađanja. Međutim, kod analize praškastih uzoraka (kao što su mikročestice) nije moguće izbjeći zaostajanje zraka u odjeljku za uzorak. Preliminarni pokusi provedeni u okviru ovog istraživanja s imerzijskim ćelijama i mikročestičnim uzorcima bili su neuspješni jer je zrak u donorskom odjeljku uzrokovao veliku varijabilnost u brzini oslobađanja (rezultati nisu prikazani). Kako bi se uklonio ovaj problem preostali volumen donorskog odjeljka ispunjen je medijem za ispitivanje oslobađanja. S obzirom da je nakon primjene pripravka na kožu ili sluznicu dostupna mala količina tekućine, za analizu je odabran najmanji volumen medija koji je potreban za reproducibilnu pripremu uzorka. Utvrđeno je da je potreban volumen donorskog odjeljka od 2 ml kako bi se u njega bez pritiskanja mogla smjestiti količina uzorka s 5 mg mupirocina, te kako bi se sadržaj donorskog odjeljka mogao nježno

izmiješati špatulom bez prelijevanja. Za sve je analize korišten volumen donorskog odjeljka od 2 ml.

pH i temperatura medija (pH 5,5, 32°C) odabrani su u skladu s fiziološkim uvjetima na koži (Olejn timer i sur., 2012; Schmid-Wendtner i Korting, 2006; USP, 2015a). Ispitivanjem topljivosti mupirocina u mediju za ispitivanje oslobađanja potvrđeno je da su ispunjeni uvjeti osigurane topljivosti (poglavlje 5.10).

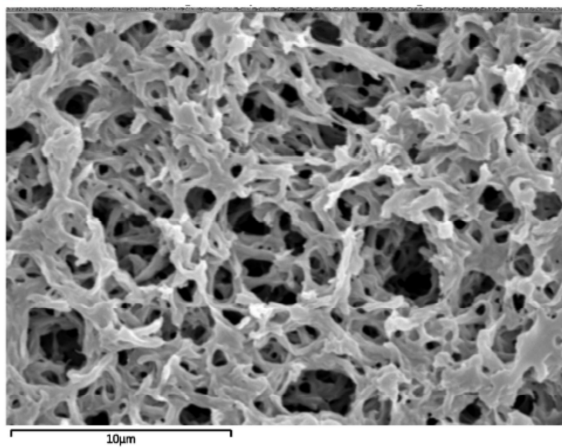
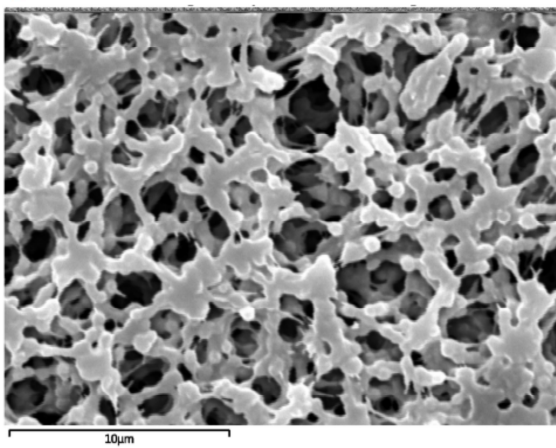
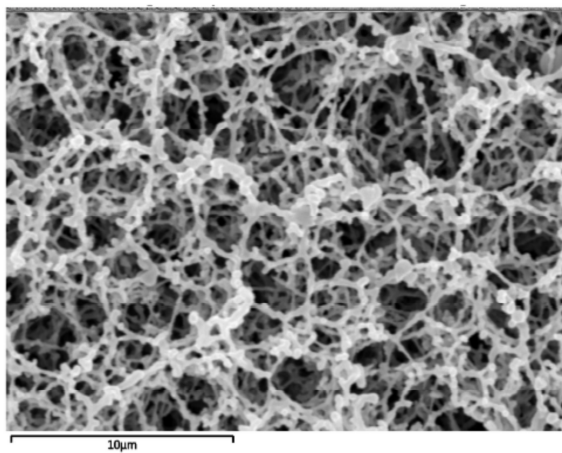
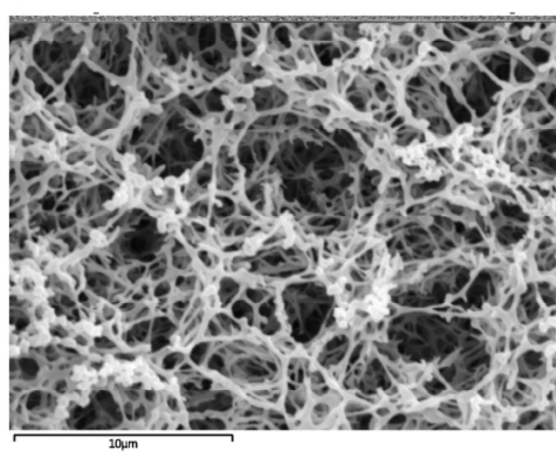
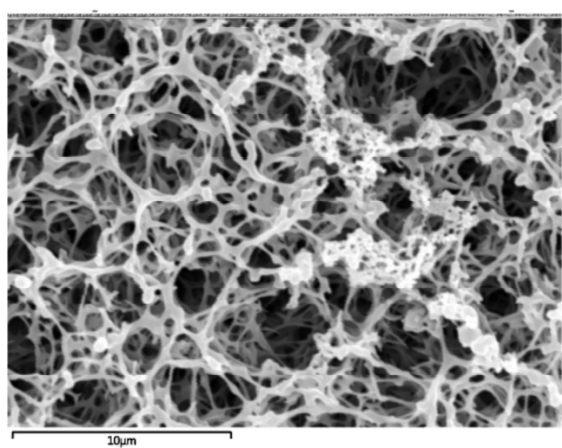
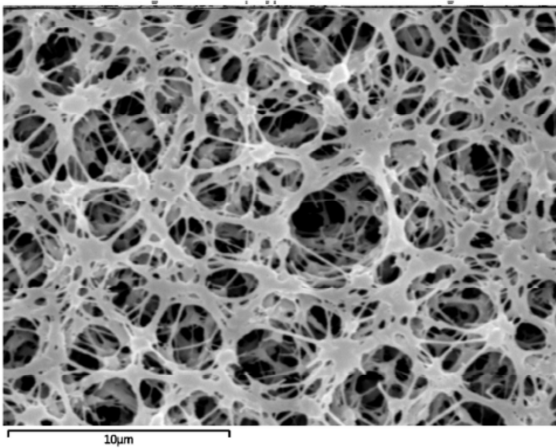
Dodatno je ispitan utjecaj varijacija u brzini okretanja lopatica, visini lopatica i volumenu medija za ispitivanje oslobađanja (poglavlje 5.14).

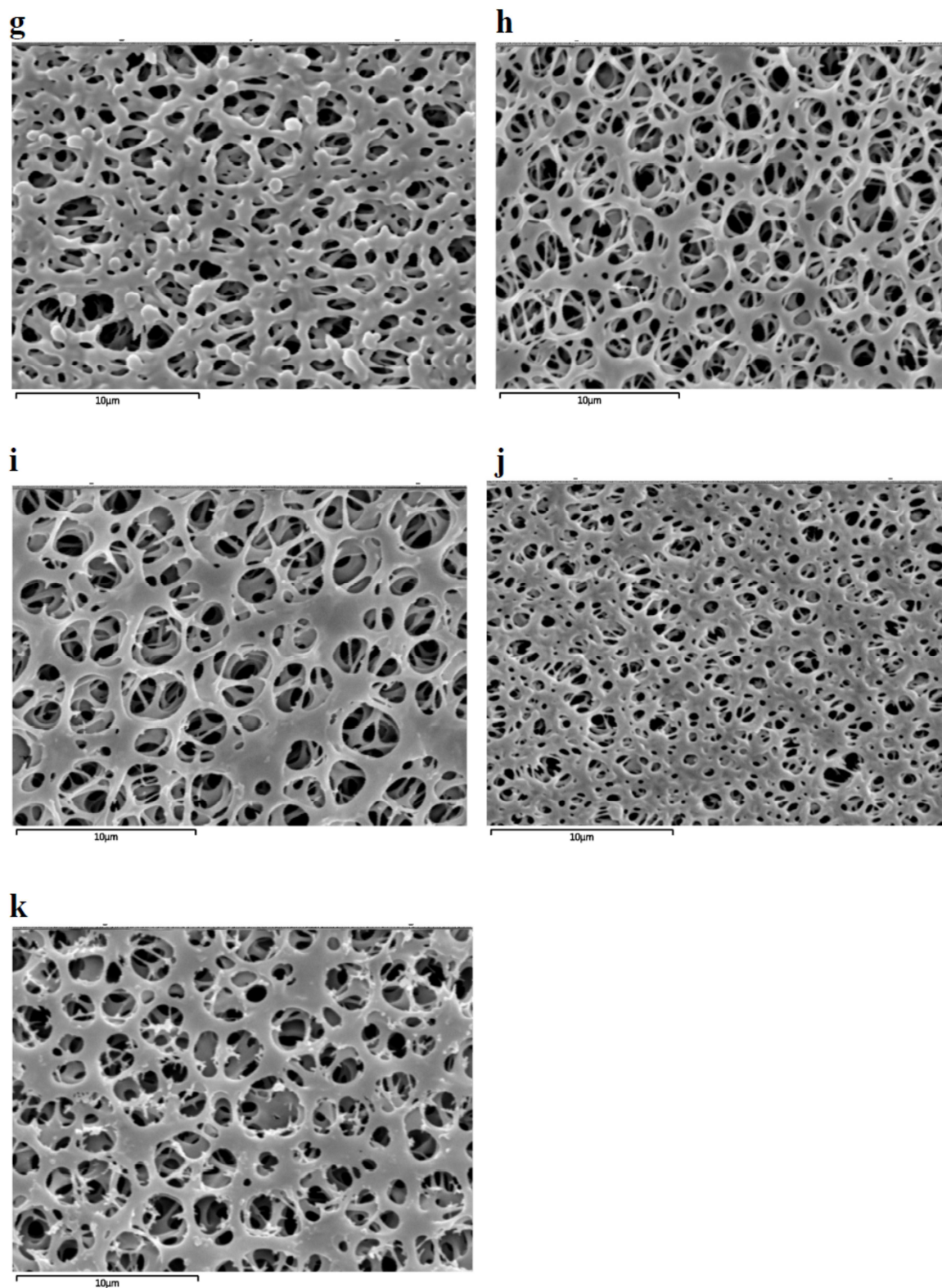
### 5.13.2. Odabir membrane

Membrana koja se koristi za analizu brzine oslobađanja u kombinaciji s difuzijskom ćelijom služi kao nosač za uzorak te fizički odvaja uzorak od receptorskog medija. Membrana ne smije adsorbirati djelatnu tvar, te mora biti inertna i visoko permeabilna. Permeabilnost membrane definira se kao  $P = D \cdot k_p / h$ , pri čemu je  $D$  koeficijent difuzije lijeka kroz membranu,  $k_p$  je partijski koeficijent između membrane i prijanjajuće tekućine, a  $h$  je debljina membrane (Grassi i sur., 2007). Membrana i s njom povezani stacionarni sloj pružaju određeni otpor difuziji djelatne tvari te stoga utječu na brzinu oslobađanja. Membrana mora biti tanka i visoko porozna kako bi pružala što manji otpor difuziji (odnosno kako bi bila visoko permeabilna) (USP, 2015a; Zatz, 1995).

Općenito su za ispitivanje brzine oslobađanja u kombinaciji s difuzijskim ćelijama korištene membrane od raznih materijala: npr. celuloze, celuloznih estera, polipropilena, najlona, polisulfona, polietersulfona, polikarbonata, poliviniliden difluorida, teflona, silikona itd. (Olejn timer i sur., 2012; Thakker i Chern, 2003)

U okviru ovog istraživanja ispitano je jedanaest membrana (detaljan opis korištenih membrana naveden je u poglavlju 4.1, tablica 4). Ispitane membrane se međusobno razlikuju po sastavu, veličini pora i morfologiji (slika 28).

**a****b****c****d****e****f**



Slika 28. SEM slike membrana različitog sastava i veličine pora pri povećanju 5000x: (a) NA 0,45; (b) PVDF 0,45; (c) CE 0,45; (d) CN 0,2; (e) CN 0,45; (f) PP 0,45; (g) PSU 0,45; (h) RC 0,2; (i) RC 0,45; (j) PESU 0,45; (k) CA 0,45. Detaljan opis korištenih membrana naveden je u poglavlju 4.1.



Odabir membrane za ispitivanje brzine oslobađanja proveden je u dva stupnja. U prvom stupnju ispitana je adsorpcija djelatne tvari na membranu. Otopine mupirocina koncentracija 0,001 mg/ml i 0,06 mg/ml filtrirane su kroz jedanaest membrana. Koncentracije su odabrane u skladu s očekivanim rasponom metode za ispitivanje brzine oslobađanja.

Iskorištenje nakon filtriranja otopine mupirocina koncentracije 0,06 mg/ml bilo je uglavnom visoko (uz iznimku membrane NA 0,45). Međutim, za velik broj membrana dobiveno je nisko iskorištenje nakon filtriranja otopine koncentracije 0,001 mg/ml (tablica 11). Za daljnje ispitivanje odabrane su samo membrane PVDF 0,45, CE 0,45, RC 0,2 i RC 0,45, kod kojih je iskorištenje nakon filtriranja za obje koncentracije bilo u rasponu 98,0-102,0%.

Tablica 11. Iskorištenje nakon filtriranja 0,06 mg/ml i 0,001 mg/ml otopina mupirocina kroz razne membrane

| Membrana  | Iskorištenje (%) |             |
|-----------|------------------|-------------|
|           | 0,06 mg/ml       | 0,001 mg/ml |
| NA 0,45   | 94,9             | 88,9        |
| PVDF 0,45 | 100,4            | 98,7        |
| CE 0,45   | 98,4             | 98,3        |
| CN 0,2    | 100,6            | 88,1        |
| CN 0,45   | 100,0            | 89,9        |
| PP 0,45   | 98,9             | 95,9        |
| PSU 0,45  | 97,9             | 89,9        |
| RC 0,2    | 99,1             | 99,3        |
| RC 0,45   | 99,5             | 98,5        |
| PESU 0,45 | 99,5             | 94,7        |
| CA 0,45   | 98,0             | 96,7        |

Otpor difuziji djelatne tvari kod odabranih membrana ispitan je provođenjem analize brzine oslobađanja na tri ćelije po membrani. Zatz (1995) je pokazao da pri manjim vrijednostima permeabilnosti membrane (odnosno pri višem otporu membrane) nagib oslobađanja postaje manji, a odsječak na apscisi veći.

Profili oslobađanja za kitozanski uzorak (Mupi-Kit N) kod analize na odabranim membranama pokazali su međusobno slične nagibe oslobađanja, međutim primijećene su

određene razlike u odsječku na apscisi (odnosno u zastojskom vremenu) (tablica 12). Za ispitivanje brzine oslobađanja iz kitozanskih uzoraka odabrana je membrana CE 0,45 (s najnižim odsječkom).

U slučaju metakrilatnog uzorka (Mupi-Eud) dobiveni su vrlo slični profili za sve ispitane membrane (tablica 12). Za potrebe ovog istraživanja za ispitivanje brzine oslobađanja iz metakrilatnih uzoraka odabrana je membrana CE 0,45 (ista membrana kao za kitozanske uzorke).

U ispitivanju koje su proveli Shah i suradnici (1989) također su dobivene slične brzine oslobađanja u slučaju kreme analizirane pomoću raznih sintetskih membrana, pod uvjetom da su membrane tanke i visoko porozne.

Tablica 12. Nagibi i odsječci na apscisi profila oslobađanja iz kitozanskog (Mupi-Kit N) i metakrilatnog uzorka (Mupi-Eud), uz korištenje odabranih membrana (RC 0,45, RC 0,2, PVDF 0,45, CE 0,45) (n=3).

| Membrana  | Mupi-Kit N        |                      | Mupi-Eud          |                      |
|-----------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|           | Nagib ( $\pm$ SD) | Odsječak ( $\pm$ SD) | Nagib ( $\pm$ SD) | Odsječak ( $\pm$ SD) |
| RC 0,45   | 37,7 $\pm$ 1,3    | 4,8 $\pm$ 0,6        | 22,6 $\pm$ 0,4    | 6,6 $\pm$ 0,4        |
| RC 0,2    | 37,1 $\pm$ 0,6    | 3,6 $\pm$ 0,4        | 23,1 $\pm$ 0,7    | 6,8 $\pm$ 0,3        |
| PVDF 0,45 | 36,5 $\pm$ 2,3    | 2,2 $\pm$ 0,2        | 24,7 $\pm$ 1,0    | 7,1 $\pm$ 0,2        |
| CE 0,45   | 38,6 $\pm$ 2,6    | 2,0 $\pm$ 0,3        | 24,2 $\pm$ 1,1    | 6,7 $\pm$ 0,3        |

### 5.13.3. Uzorkovanje

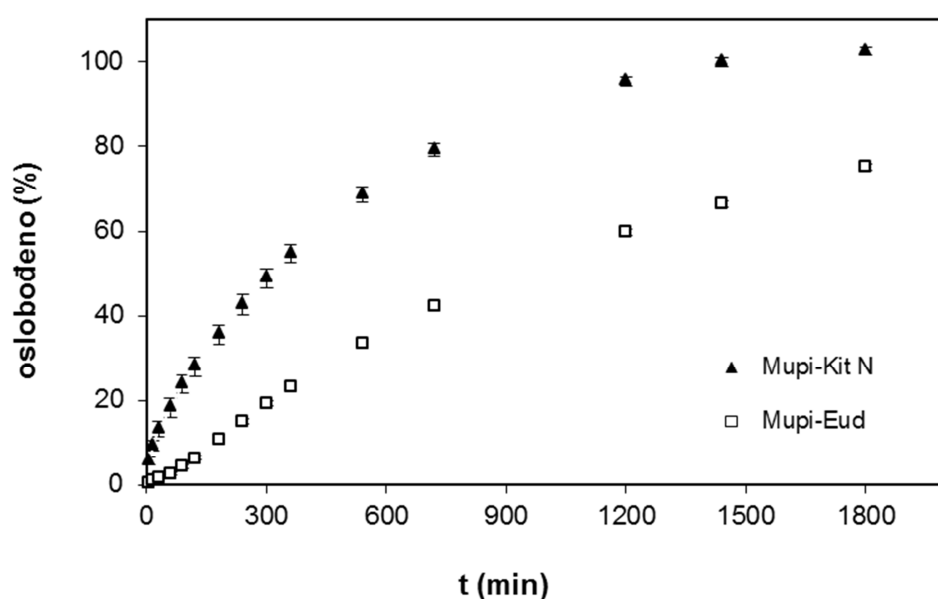
Kako bi se odabrale odgovarajuće točke uzorkovanja za *in vitro* test brzine oslobađanja, potrebno je poznavati oblik krivulje oslobađanja kao i općenito ponašanje uzorka tijekom testa.

Ponašanje uzorka i oblik krivulje oslobađanja kod analize topikalnih polučvrstih oblika korištenjem difuzijskih ćelija je dobro poznato. Nakon početnog zastojskog vremena difuzija lijeka kroz polučvrsti pripravak postaje ograničavajući korak u oslobađanju lijeka (Flynn i sur., 1999; Zatz i Segers, 1998). Postiže se pseudo-ravnoteža (engl. *pseudo steady state*) te količina oslobođenog lijeka postaje proporcionalna korijenu iz vremena (Higuchi, 1961). Konačno, nakon produljenog vremena analize oslobađanje lijeka iz polučvrstog pripravka može odstupati od linearnosti. Zabilježeno je da do odstupanja od linearnosti dolazi



nakon što je oslobođeno više od oko 35-45% lijeka. Posljedično, postoji specifičan vremenski interval tijekom kojeg je potrebno provesti uzorkovanje kod analize brzine oslobađanja. Podatke za određivanje brzine oslobađanja treba prikupiti nakon zastoynog vremena ali prije opsežnog gubitka lijeka iz polučvrstog pripravka (Olejník i sur., 2012; Zatz i Segers, 1998).

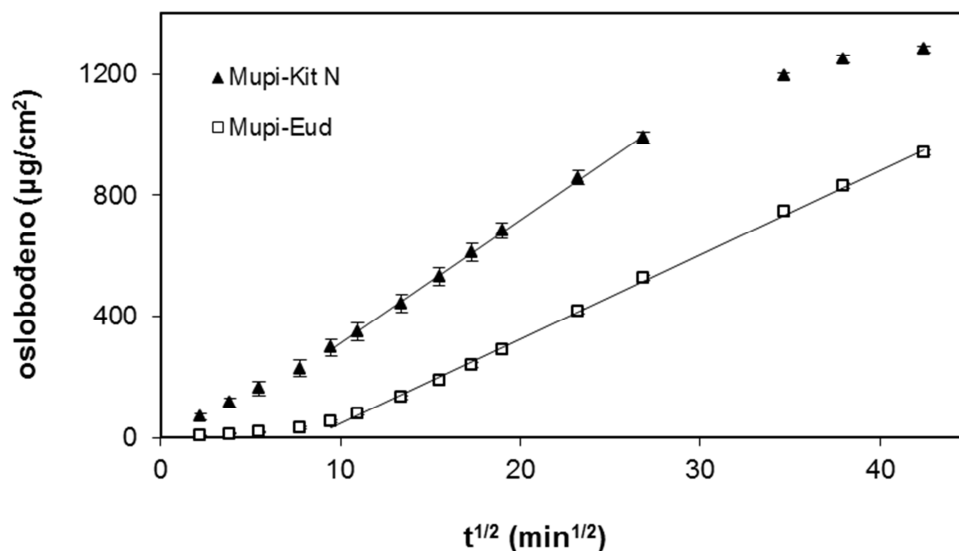
Kako bi se prikupilo više podataka o ponašanju uzoraka mikročestica tijekom *in vitro* testa oslobađanja provedena je produljena analiza (do 1800 min) uzoraka Mupi-Kit N i Mupi-Eud. Kod uzorka Mupi-Kit N postignuto je potpuno oslobađanje, dok je kod uzorka Mupi-Eud oslobođeno oko 75% mupirocina (slika 29).



Slika 29. Profili oslobađanja iz mikročestica s mupirocinom na aparaturi s imerzijskom ćelijom: uzorci Mupi-Kit N i Mupi-Eud (%  $\pm$  SE, n=3)

S obzirom da imerzijske ćelije prethodno nisu bile korištene za ispitivanje brzine oslobađanja iz topikalnih mikročestica, ne postoje smjernice ni preporuke za evaluaciju i usporedbu dobivenih rezultata. Međutim, poznate su i dostupne metode za izračun i usporedbu brzina oslobađanja za polučvrste pripravke analizirane korištenjem imerzijskih ćelija (USP, 2015a). Kako bi se provjerilo jesu li te metode primjenjive za topikalne mikročestice, grafički je prikazana ovisnost rezultata ispitivanja oslobađanja iz mikročestica o korijenu iz vremena. Krivulje oslobađanja iz mikročestica (slika 30) slične su krivuljama

oslobađanja tipičnim za polučvrste oblike (iako nedvojbeno postoje određene razlike u procesima unutar imerzijske ćelije među ova dva tipa uzoraka).



Slika 30. Profili oslobađanja iz mikročestica s mupirocinom na aparaturi s imerzijskom ćelijom, prikazani u ovisnosti o korijenu iz vremena: uzorci Mupi-Kit N i Mupi-Eud ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{SE}$ ,  $n=3$ )

Na krivulji oslobađanja uzorka Mupi-Eud vidljiva je početna zastojna faza, karakterizirana vrlo sporim oslobađanjem lijeka. Međutim, nakon otprilike jednog sata brzina oslobađanja raste, te količina oslobođenog lijeka postaje proporcionalna korijenu iz vremena (slika 30). Zastojno vrijeme u krivulji oslobađanja uzorka Mupi-Kit N nije tako očito, ali nakon jednog sata analize također dolazi do promjene u nagibu. Oslobađanje je tada proporcionalno korijenu iz vremena sve dok se ne oslobodi oko 80% lijeka (odnosno  $1 \text{ mg}/\text{cm}^2$ ), kada dolazi do odstupanja od linearnosti (slika 30).

U slučaju analize mikročestica donorski odjeljak imerzijske ćelije sadrži smjesu mikročestica i medija (za razliku od homogenog uzorka u slučaju polučvrstih pripravaka). Posljedično, kod analize mikročestica unutar donorskog odjeljka dolazi do dodatnih procesa koji mogu imati utjecaja na brzinu oslobađanja. Točnije, dolazi do interakcije uzorka i medija ovisno o hidrofilnosti, močljivosti i topljivosti uzorka.

Tijekom *in vitro* testa oslobađanja kitozanski uzorci stvarali su homogeni viskozni gel unutar donorskog odjeljka, dok su metakrilatni uzorci ostali neotopljeni. Kitozan je hidrofilni polimer topljiv pri pH vrijednostima  $<6,5$  (Singla i Chawla, 2001). Zbog hidrofilnosti

kitozana mupirocin u kitozanskim mikročesticama biva izložen mediju na samom početku analize brzine oslobađanja. Lijek prisutan na površini kitozanskih mikročestica može se brzo otopiti i difundirati kroz područja niske viskoznosti unutar donorskog odjeljka (dok kitozanski gel još nije u potpunosti formiran). S druge strane, Eudragit RS je hidrofobni polimer netopljiv u vodenim medijima. Eudragit RS odgađa penetraciju medija u matriks i usporava oslobađanje lijeka (Abu-Diak i sur., 2012).

Prethodno je istaknuto da *in vitro* test oslobađanja nije prikladan za usporedbu uzoraka sa značajnim razlikama u formulaciji (npr. masti i kreme), te da bi usporedba uzoraka s tako velikim međusobnim razlikama u formulaciji mogla dati lažne rezultate (Flynn i sur., 1999; USP, 2015a). Na sličan način, moglo bi biti neprikladno *in vitro* testom oslobađanja uspoređivati mikročestice bazirane na hidrofilnim i hidrofobnim polimerima. U okviru ovog istraživanja *in vitro* test oslobađanja nije korišten za međusobnu usporedbu kitozanskih i metakrilatnih mikročestica.

Kod oba tipa ispitanih mikročestica s mupirocinom nakon početne zastojne faze postiže se linearan odnos između količine oslobođenog lijeka i korijena iz vremena. Proporcionalnost količine oslobođenog lijeka i korijena iz vremena obično se smatra indikatorom difuzijski kontroliranog oslobađanja lijeka. Međutim, kod donošenja zaključka o mehanizmu oslobađanja valja biti oprezan. Superponiranje više mehanizama (npr. difuzije, bubrenja, otapanja polimera) također može dovesti do prividne kinetike korijena iz vremena (Siepmann i Peppas, 2001). Iako je difuzijski mehanizam zasigurno uključen u proces oslobađanja lijeka iz ispitanih mikročestičnih sustava, na temelju postojećih podataka ne može se isključiti mogući doprinos i ostalih mehanizama oslobađanja.

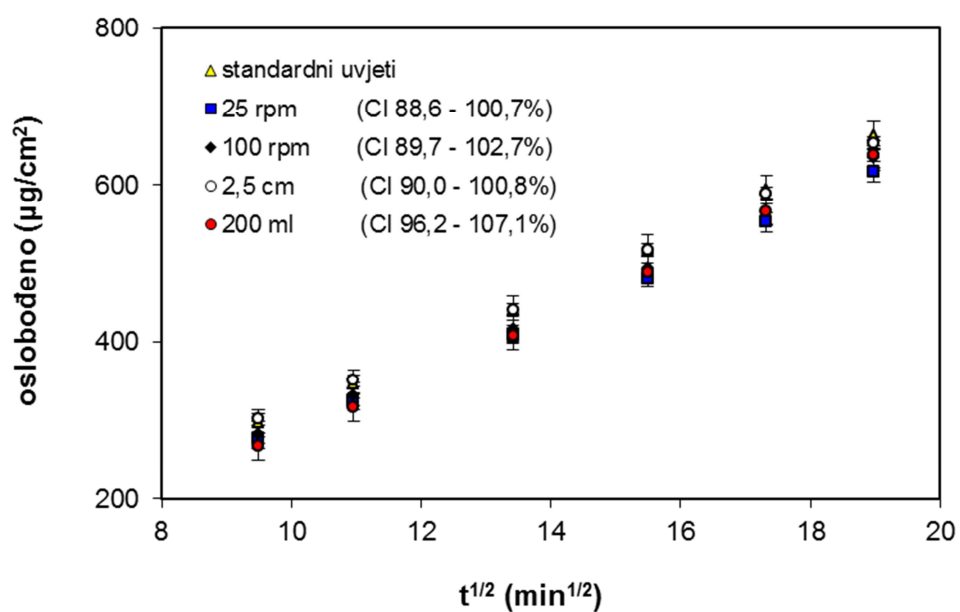
Ispitivanje brzine oslobađanja s imerzijskom ćelijom općenito se provodi u periodu od 4-6 sati, s najmanje pet točaka u linearnom dijelu profila oslobađanja (USP, 2015a). Pri odabiru točaka uzorkovanja za analizu brzine oslobađanja iz mupirocinskih mikročestica uzete su u obzir navedene smjernice, kao i karakteristike dobivenih krivulja oslobađanja. Za određivanje i usporedbu brzina oslobađanja u okviru ovog istraživanja odabrana su sljedeća vremena uzorkovanja: 90, 120, 180, 240, 300 i 360 min.

## **5.14. Utjecaj varijacija parametara metode na brzinu oslobađanja**

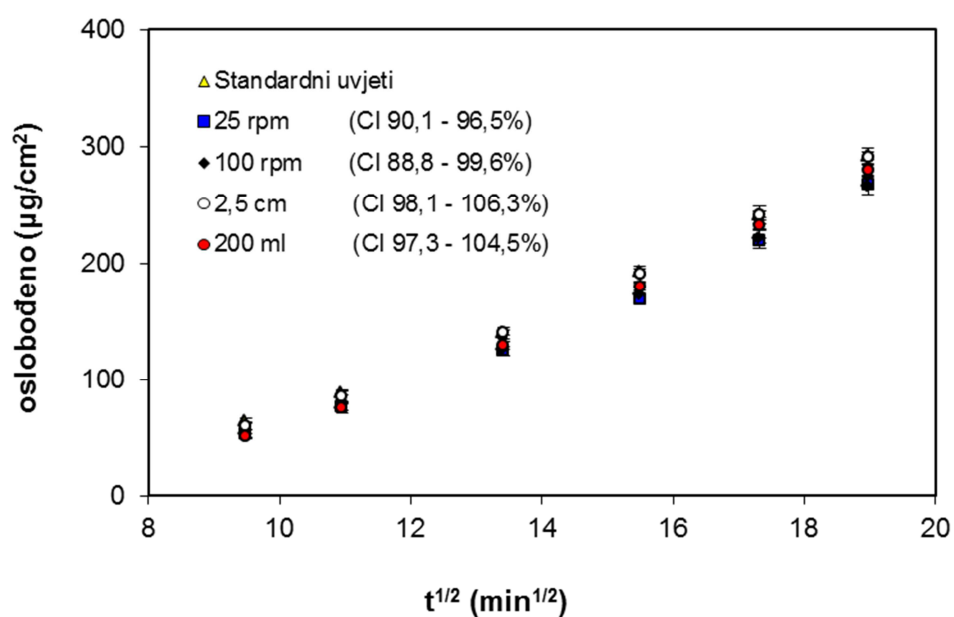
Sljedeći parametri metode za ispitivanje oslobađanja su varirani kako bi se ispitao njihov utjecaj na brzinu oslobađanja: brzina okretanja lopatica (25 o/min, 50 o/min ili 100 o/min), visina lopatica (1 cm ili 2,5 cm) i volumen receptorskog medija (100 ml ili 200 ml).

Brzina okretanja lopatica može utjecati na brzinu oslobađanja jer utječe na debljinu stacionarnog difuzijskog sloja iznad membrane. Općenito povećanje brzine okretanja lopatica dovodi do smanjenja debljine stacionarnog sloja. Na sličan način, udaljenost od membrane do lopatice također može utjecati na debljinu stacionarnog sloja. U Američkoj farmakopeji (USP, 2015a) specificirana je visina lopatica od 1 cm iznad membrane. Zabilježene su i druge visine lopatica (Bonacucina i sur., 2006). Rege i suradnici (1998) ispitivali su utjecaj brzine okretanja lopatica na brzinu oslobađanja iz polučvrstih pripravaka i utvrdili da brzina okretanja nije značajno utjecala na brzinu oslobađanja. U okviru ovog istraživanja brzine oslobađanja pri različitim brzinama okretanja lopatica i različitim visinama lopatica bile su međusobno slične (slika 31), čime je pokazano da stacionarni sloj ima minimalni utjecaj na rezultate pri navedenim uvjetima. Za daljnje analize odabrani su brzina okretanja lopatica od 50 o/min, kao uobičajena polazna vrijednost kod razvoja metoda s lopaticama (USP, 2015f), te farmakopejom propisana visina lopatica od 1 cm.

Razlike u volumenu medija također nisu imale utjecaja na brzinu oslobađanja (slika 31). To je bilo u skladu s očekivanjima, s obzirom da su uvjeti osigurane topljivosti bili ispunjeni i u 100 ml i u 200 ml medija. Za daljnje analize odabran je volumen medija od 100 ml kako bi se osigurala dovoljno visoka koncentracija uzoraka u ranim točkama uzorkovanja.



**a**

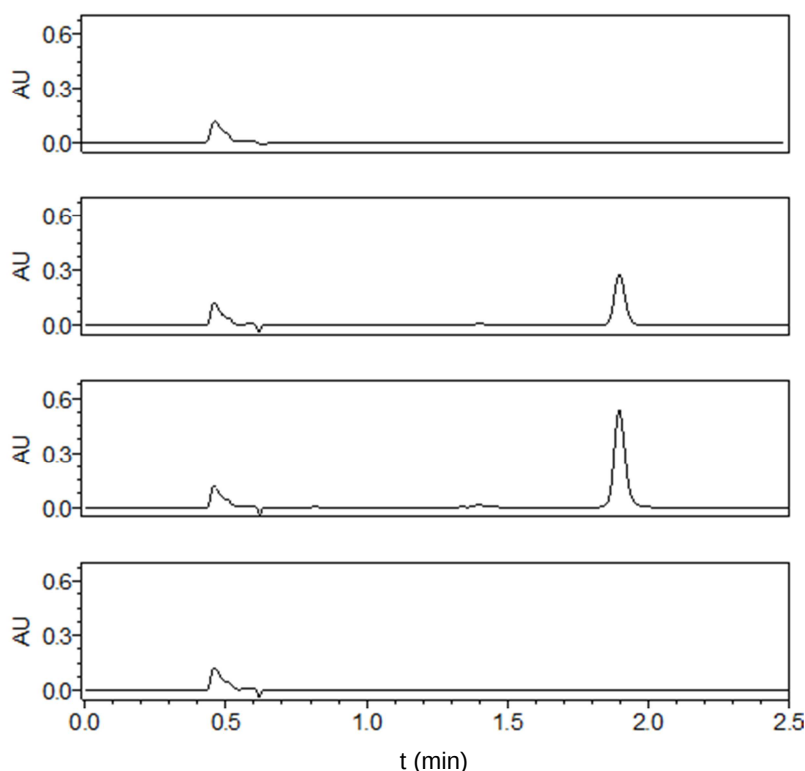


**b**

Slika 31. Profili oslobađanja iz uzoraka Mupi-Kit N (a) i Mupi-Eud (b), pod standardnim uvjetima i pod modificiranim uvjetima. Standardni uvjeti su: brzina okretanja lopatica 50 o/min, visina lopatica 1 cm, volumen medija 100 ml. U zagradama su prikazani 90%-tni intervali pouzdanosti (CI) za omjere nagiba u odnosu na standardne uvjete ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{SE}$ ,  $n=6$ )

## 5.15. Validacija metode

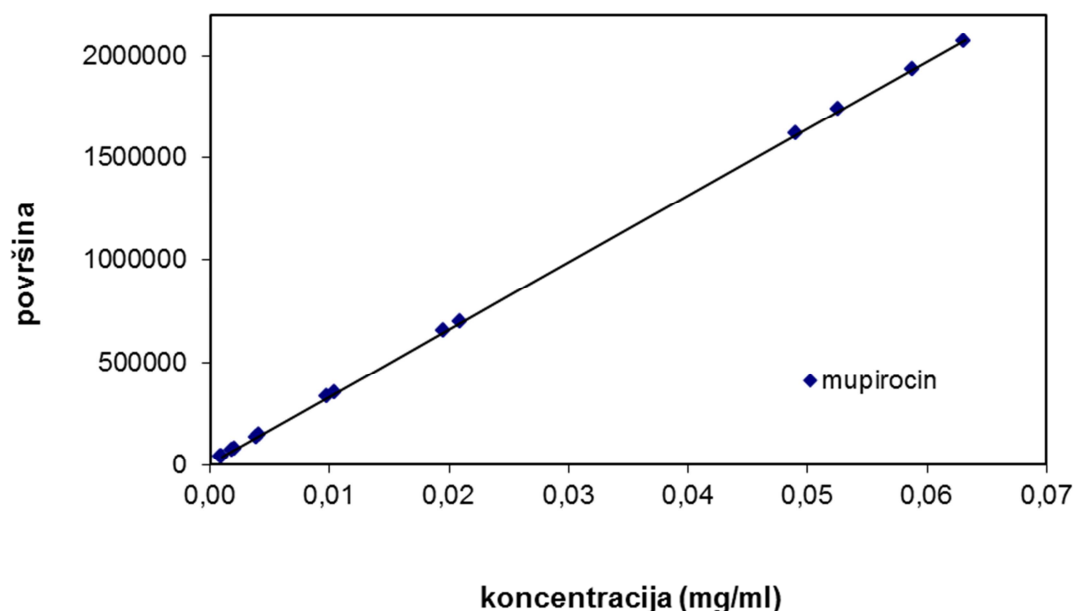
U svrhu procjene specifičnosti metode uspoređeni su kromatogrami otopine standarda, uzoraka, placeba i medija. U kromatogramima medija i otopine placeba nije bilo interferirajućih pikova na retencijskom vremenu mupirocina (oko 1,9 min). Na slici 32 prikazan je set kromatograma za uzorak Mupi-Kit N. Slični kromatogrami uzoraka i placebo otopina dobiveni su i za uzorke Mupi-Kit S i Mupi-Eud (rezultati nisu prikazani).



Slika 32. Kromatogrami medija, otopine uzorka (Mupi-Kit N), otopine standarda i otopine placeba (odozgo prema dolje)

Linearnost odgovora detektora ispitana je u koncentracijskom rasponu od 0,001 – 0,06 mg/ml (slika 33). Dobivena je jednadžba regresije  $y = 32799018x + 2861$ , s koeficijentom determinacije  $r^2 > 0,999$ . 95%-tni interval pouzdanosti za odsječak na osi y (-110 do 5833) uključuje nulu, iz čega se može zaključiti da odsječak nije statistički značajan. Prikladnost korištenja modela linearne regresije provjerena je analizom rezidualnih vrijednosti. Analiza

reziduala nije pokazala nikakav trend. Rezultati ukazuju da postoji linearna ovisnost između odgovora detektora i koncentracije analita u ispitanom rasponu koncentracija.



Slika 33. Rezultati ispitivanja linearnosti metode

Točnost metode određena je kao postotak iskorištenja poznate dodane količine analita u otopini placebo. Srednje iskorištenje za mupirocin u otopini placebo s kitozanom niske molekulske mase bilo je 100,2% (RSD=1,1%, n=14), u otopini placebo s kitozanom srednje molekulske mase 99,7% (RSD=1,1%, n=14), a u otopini placebo s Eudragitom 100,1% (RSD=0,9%, n=14). Pojedinačni rezultati ispitivanja točnosti za primjer uzorka Mupi-Kit N prikazani su u tablici 13. Slični rezultati točnosti dobiveni su i za uzorke Mupi-Kit S i Mupi-Eud (pojedinačni rezultati nisu prikazani).

Tablica 13. Rezultati ispitivanja točnosti metode za uzorak Mupi-Kit N

| Koncentracijski<br>nivo | Otopina | Koncentracija<br>dodano<br>(mg/ml) | Koncentracija<br>nađeno<br>(mg/ml) | Iskorištenje<br>(%) | Srednje<br>iskorištenje<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-------------------------|---------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|------------|
| T1                      | T1 / 1  | 0,0009                             | 0,0009                             | 99,2                |                                |            |
|                         | T1 / 2  | 0,0010                             | 0,0011                             | 100,8               |                                |            |
| T2                      | T2 / 1  | 0,0018                             | 0,0018                             | 101,9               |                                |            |
|                         | T2 / 2  | 0,0021                             | 0,0021                             | 101,0               |                                |            |
| T3                      | T3 / 1  | 0,0035                             | 0,0036                             | 101,6               |                                |            |
|                         | T3 / 2  | 0,0042                             | 0,0042                             | 101,2               |                                |            |
| T4                      | T4 / 1  | 0,0088                             | 0,0088                             | 100,0               |                                |            |
|                         | T4 / 2  | 0,0105                             | 0,0106                             | 101,1               |                                |            |
| T5                      | T5 / 1  | 0,0176                             | 0,0175                             | 100,0               |                                |            |
|                         | T5 / 2  | 0,0209                             | 0,0208                             | 99,2                |                                |            |
| T6                      | T6 / 1  | 0,0439                             | 0,0437                             | 99,6                |                                |            |
|                         | T6 / 2  | 0,0523                             | 0,0518                             | 99,0                |                                |            |
| T7                      | T7 / 1  | 0,0527                             | 0,0521                             | 98,9                |                                |            |
|                         | T7 / 2  | 0,0628                             | 0,0621                             | 98,9                | 100,2                          | 1,1        |

Preciznost metode evaluirana je kroz ispitivanje ponovljivosti i intermedijske preciznosti. U tablici 14 prikazani su rezultati ponovljivosti i intermedijske preciznosti za uzorke Mupi-Kit N, Mupi-Kit S i Mupi-Eud, izraženi kao relativno standardno odstupanje (RSD) nagiba krivulje oslobađanja.

Tablica 14. Rezultati ispitivanja ponovljivosti (n=6) i intermedijske preciznosti (n=12) za uzorke Mupi-Kit N, Mupi-Kit S i Mupi-Eud

|            | Ponovljivost<br>RSD (%) | Intermedijska preciznost<br>RSD (%) |
|------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Mupi-Kit N | 5,8                     | 5,7                                 |
| Mupi-Kit S | 7,3                     | 6,9                                 |
| Mupi-Eud   | 3,7                     | 4,5                                 |



Stabilnost otopine standarda ispitana je kroz 6 dana. Stabilnost otopina uzoraka ispitana je kroz 2 dana. Svi su rezultati iskorištenja (u usporedbi s početnim rezultatima) bili unutar raspona 98-100%, čime je potvrđena stabilnost otopina standarda i uzoraka u ispitanoj periodu.

Robusnost metode ispitana je putem namjernih varijacija sljedećih kromatografskih uvjeta: sastav mobilne faze, pH pufera za mobilnu fazu, temperatura termostata kolone, brzina protoka i valna duljina. Parametri prikladnosti sustava (faktor razvlačenja i relativno standardno odstupanje faktora odgovora) bili su u skladu s postavljenim zahtjevima pri svim ispitanim uvjetima. Međutim, zabilježeno je produljenje retencijskog vremena mupirocina ( $t_R$ ) zbog kojeg je bilo potrebno produljiti vrijeme analize kod smanjenog udjela acetonitrila u mobilnoj fazi (23% ACN,  $t_R$  3,1 min, vrijeme analize 3,5 min) te kod smanjene brzine protoka (0,8 ml/min,  $t_R$  2,5 min, vrijeme analize 3 min). Analize provedene uz modifikacije u parametrima metode za ispitivanje brzine oslobađanja (poglavlje 5.14) dodatno potvrđuju robusnost razvijene metode.

Validacijom metode dokazano je da je razvijena metoda specifična, linearna, točna, precizna i robusna.

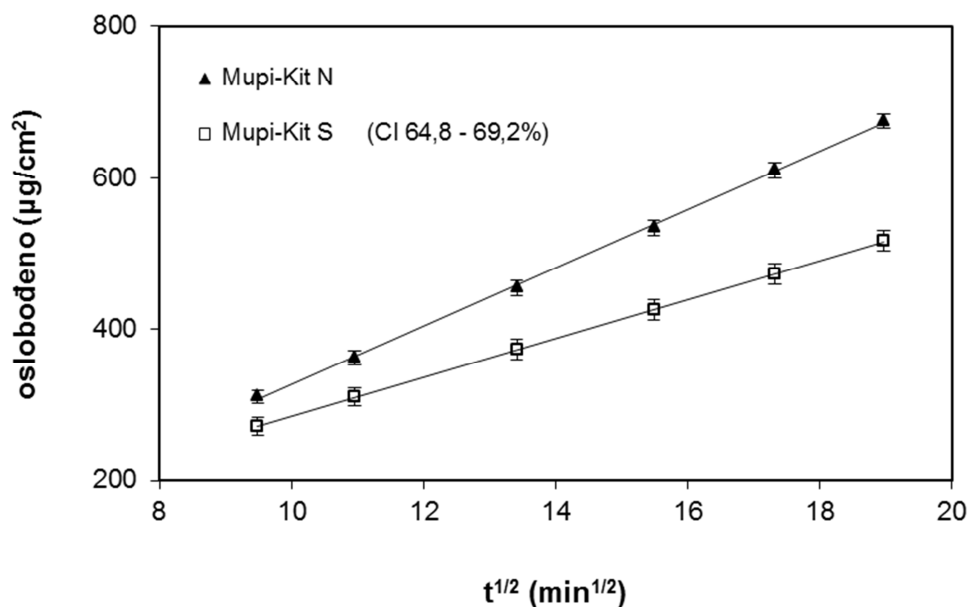
## **5.16. Primjena metode**

### **5.16.1. Usporedba različitih formulacija i različitih koncentracija lijeka**

*In vitro* metoda za ispitivanje brzine oslobađanja mora biti diskriminatorna, odnosno mora imati sposobnost razlučivanja promjena u formulaciji ili proizvodnom procesu koje bi mogle imati utjecaja na učinak pripravka *in vivo*.

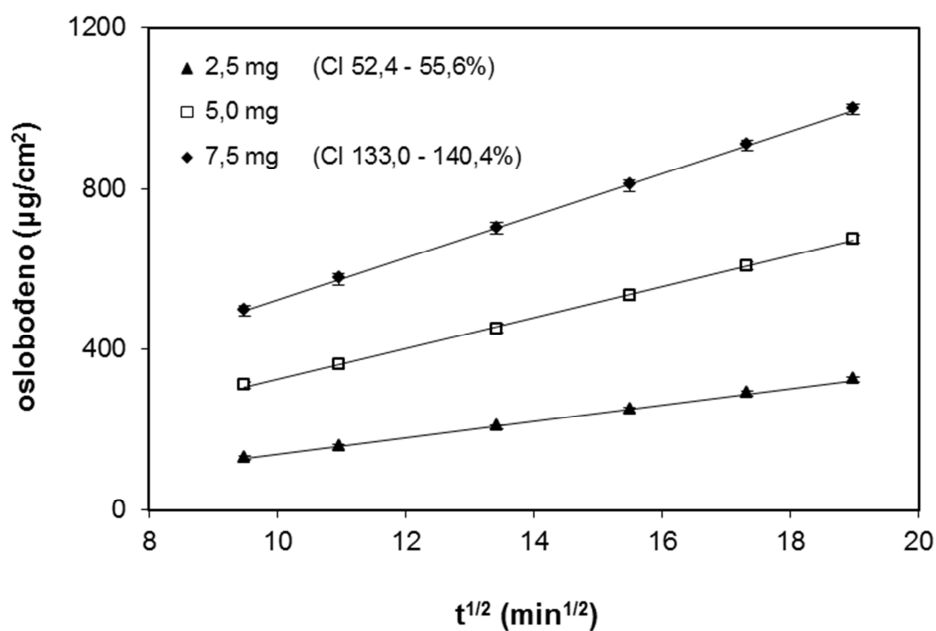
U svrhu provjere diskriminatornosti razvijene metode pripremljene su i analizirane kitozanske mikročestice s kitozanim različitih molekulskih masa (uzorci Mupi-Kit N i Mupi-Kit S). Analiza je provedena u dva stupnja (kako je opisano u poglavlju 4.2.15.1), s ukupno 18 analiziranih ćelija po uzorku. Nagibi oslobađanja uspoređeni su računanjem 90%-tnih intervala pouzdanosti za omjere nagiba. Omjeri nagiba oslobađanja nisu zadovoljili ni prvi ni drugi stupanj zahtjeva za sličnost (90%-tni intervali pouzdanosti nisu bili unutar raspona 75%-133,33%). Brzina oslobađanja bila je veća za uzorak Mupi-Kit N nego za uzorak Mupi-Kit S (slika 34). Brzina oslobađanja lijeka iz kitozanskih mikročestica općenito se smanjuje pri povećanju molekulske mase kitozana. Porast molekulske mase kitozana dovodi do

povećanja viskoznosti gela, što utječe na brzinu difuzije lijeka kao i na brzinu erozije mikročestica (Sinha i sur., 2004).

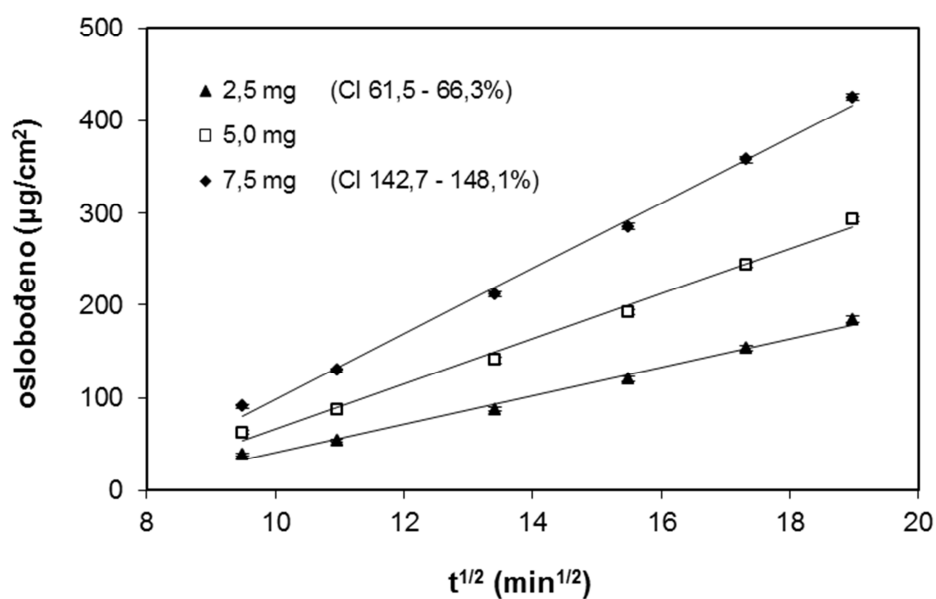


Slika 34. Profili oslobađanja za uzorke s kitozanom niske (Mupi-Kit N) i srednje molekulske mase (Mupi-Kit S). U zagradi je prikazan 90%-tni interval pouzdanosti (CI) za omjere nagiba oslobađanja ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{SE}$ ,  $n=18$ )

Provedene su i analize brzine oslobađanja pri različitim koncentracijama lijeka unutar donorskog odjeljka. Prethodno je pokazano, na primjerima polučvrstih formulacija, da je test brzine oslobađanja s difuzijskom ćelijom osjetljiv na koncentraciju uzorka (Rege i sur., 1998; Thakker i Chern, 2003). Nagibi oslobađanja dobiveni korištenjem količine uzorka koji sadrži 2,5 mg ili 7,5 mg mupirocina uspoređeni su s nagibima oslobađanja za uzorak koji sadrži 5 mg mupirocina. Utjecaj koncentracije lijeka unutar donorskog odjeljka ispitan je i za kitozanske (uzorak Mupi-Kit N) i za metakrilatne (uzorak Mupi-Eud) mikročestice. Brzina oslobađanja bila je veća pri većoj koncentraciji lijeka unutar donorskog odjeljka (slika 35a-b). Omjeri nagiba oslobađanja nisu zadovoljili ni prvi ni drugi stupanj zahtjeva za sličnost.



**a**



**b**

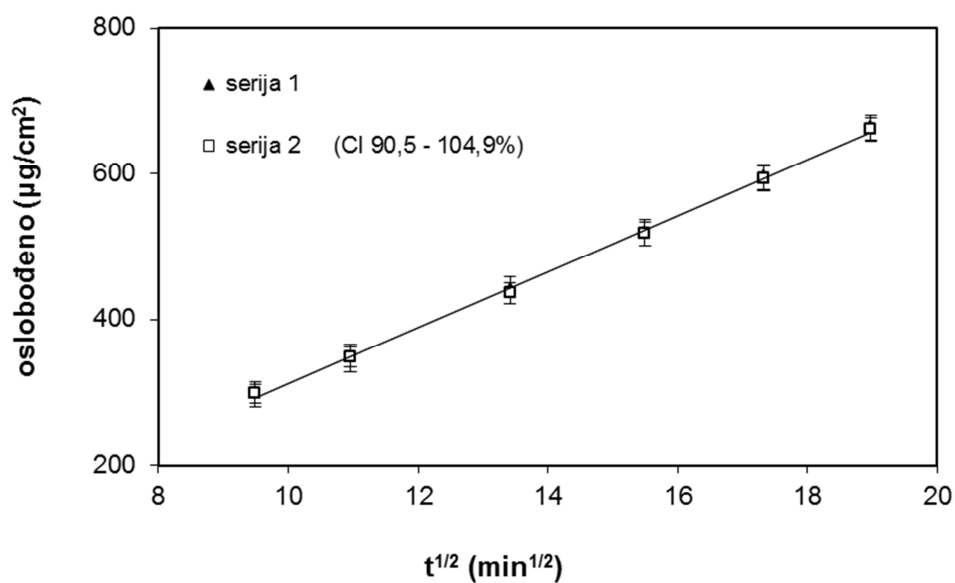
Slika 35. Profili oslobađanja pri različitim koncentracijama lijeka unutar donorskog odjeljka, za uzorke Mupi-Kit N (a) i Mupi-Eud (b). Imerzijske ćelije su napunjene količinom mikročestica koja sadrži 2,5 mg, 5,0 mg ili 7,5 mg mupirocina. U zagradama su prikazani 90%-tni intervali pouzdanosti (CI) za omjere nagiba oslobađanja (u odnosu na 5,0 mg mupirocina) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{SE}$ ,  $n=18$ )

Provedena ispitivanja pokazala su da je razvijena metoda sposobna detektirati razlike u formulaciji, kao i razlike u koncentraciji lijeka u donorskom odjeljku.

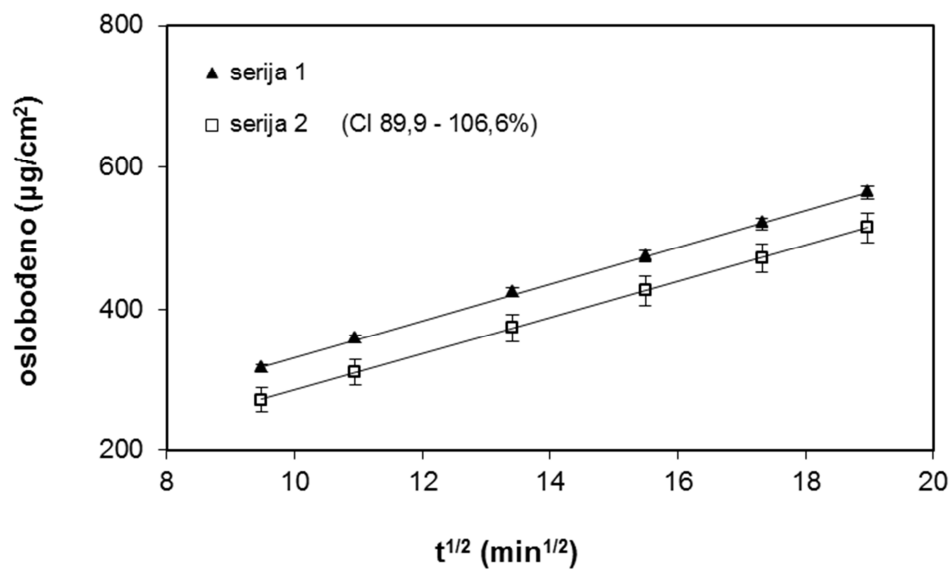
### 5.16.2. Usporedba serija istog sastava i proizvodnog procesa

Uz provjeru diskriminatornosti metode provjerena je i sličnost među serijama istog sastava, proizvedenim istim procesom. Kako bi se potvrdila sličnost analizirane su po dvije serije za svaku formulaciju (Mupi-Kit N, Mupi-Kit S, Mupi-Eud), te su uspoređeni nagibi oslobađanja za dvije serije.

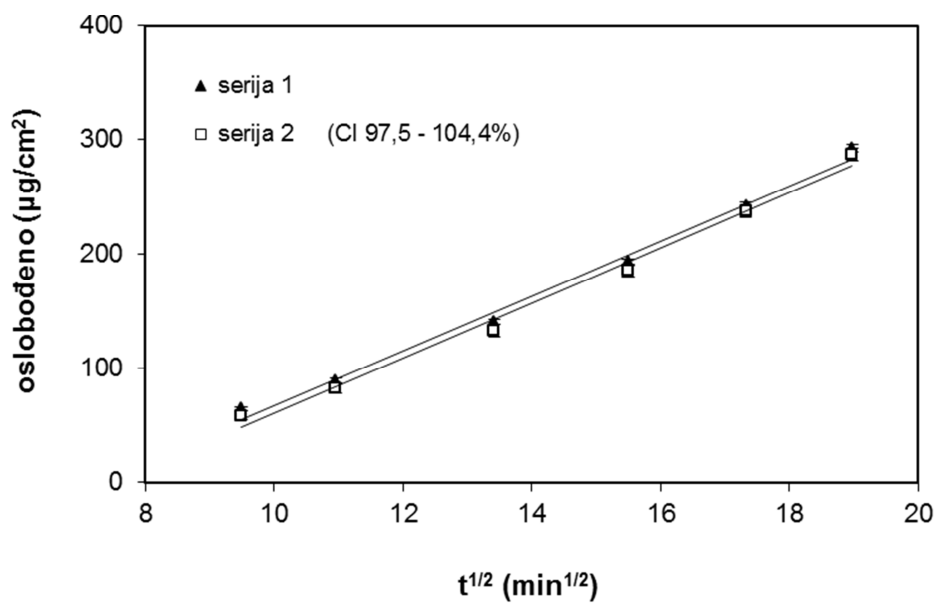
Prvi stupanj zahtjeva za sličnost bio je zadovoljen za sve ispitane formulacije (90%-tni intervali pouzdanosti bili su unutar raspona 75%-133,33%), čime je potvrđena sličnost serija istog sastava i proizvodnog procesa (slika 36a-c).



**a**



**b**



**c**

Slika 36. Sličnost među serijama istog sastava, pripremljenim istim proizvodnim procesom: uzorci Mupi-Kit N (a), Mupi-Kit S (b) i Mupi-Eud (c). U zagradama su prikazani 90%-tni intervali pouzdanosti (CI) za omjere nagiba oslobađanja ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{SE}$ ,  $n=6$ )

## **6. ZAKLJUČCI**

- Kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom uspješno su pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem, uz visoko iskorištenje.
- Učinkovitost uklapanja bila je blizu teoretske vrijednosti (98%) za metakrilatne čestice, te nešto niža za kitozanske čestice (80-90%).
- Kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom bile su sferičnog i subsferičnog oblika. Na površini mikročestica nisu primijećene pore.
- Srednji CE promjeri čestica (prema brojčanoj raspodjeli veličine čestica) za kitozanske i metakrilatne čestice bili su međusobno slični i kretali su se u rasponu od 1,9-3,2  $\mu\text{m}$ . Međutim, volumna razdioba veličine čestica ukazuje na nešto veći udio krupnijih čestica kod kitozanskih mikročestica nego kod metakrilatnih mikročestica.
- Rezultati XRPD i DSC analize pokazali su da je mupirocin kalcij dihidrat kristalinična tvar, dok su sve mikročestice pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem amorfne.
- Rezultati IR analize ne ukazuju na interakcije lijeka i polimera u dvokomponentnim mikročesticama.
- Mikročestice samog lijeka imale su negativan zeta potencijal, dok je zeta potencijal polimernih mikročestica bez lijeka bio pozitivan. Zeta potencijal polimernih mikročestica s mupirocinom bio je pozitivan, što ukazuje da je površina mikročestica uglavnom prekrivena polimerom.
- Sadržaj ostatnog metanola u kitozanskim i metakrilatnim mikročesticama s mupirocinom bio je vrlo nizak (<300 ppm).
- Sadržaj vode u kitozanskim mikročesticama bio je veći nego u metakrilatnim mikročesticama. Sadržaj vode u pripremljenim mikročesticama ovisi o sastavu mikročestica, higroskopnosti ugrađenih komponenti i uvjetima skladištenja uzoraka.
- Za određivanje mupirocina u uzorcima iz testa oslobađanja razvijena je HPLC metoda s kratkim vremenom analize, čime je povećana protočnost uzoraka i smanjena potrošnja mobilne faze.
- Aparatura s lopaticom (bez imerzijske ćelije) nije prikladna za ispitivanje brzine oslobađanja iz kitozanskih mikročestica zbog plutanja uzorka na površini medija.
- Aparatura s rotirajućim diskom nije prikladna za ispitivanje brzine oslobađanja iz kitozanskih i metakrilatnih mikročestica zbog toga što u tijeku testa dolazi do promjene u površini komprimata.

- Razvijena je nova *in vitro* metoda za ispitivanje oslobađanja iz mikročestica za topikalnu primjenu, korištenjem imerzijske ćelije u kombinaciji s aparaturom s lopaticom.
- Kako pri analizi praškastog uzorka ne bi zaostajao zrak u odjeljku za uzorak imerzijske ćelije, bilo je potrebno ispuniti preostali volumen donorskog odjeljka medijem za ispitivanje oslobađanja.
- Membrana izrađena od smjese celuloznih estera, veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ , pokazala je nisku adsorpciju lijeka te nizak otpor difuziji lijeka.
- Ispitivanjem topljivosti mupirocina potvrđeno je da su u tijeku ispitivanja brzine oslobađanja ispunjeni uvjeti osigurane topljivosti u receptorskom mediju (acetatni pufer pH 5,5 pri 32°C).
- Nakon početnog zastoynog vremena količina oslobođenog lijeka postaje proporcionalna korijenu iz vremena. Nakon iscrpljivanja veće količine lijeka iz donorskog odjeljka dolazi do odstupanja od linearnosti. Za određivanje i usporedbu brzina oslobađanja odabrane su sljedeće vremenske točke: 90, 120, 180, 240, 300 i 360 min.
- Varijacije u brzini okretanja lopatica (25 o/min, 50 o/min ili 100 o/min), visini lopatica (1 cm ili 2,5 cm) i volumenu receptorskog medija (100 ml ili 200 ml) nisu imale znatnog utjecaja na brzinu oslobađanja lijeka. Za daljnje analize odabrani su sljedeći eksperimentalni parametri: brzina okretanja lopatica 50 o/min, visina lopatice 1 cm iznad membrane, te volumen receptorskog medija od 100 ml.
- Validacijom metode dokazano je da je razvijena metoda specifična, linearna, točna, precizna i robusna.
- Metoda je diskriminatorna prema razlikama u koncentraciji lijeka unutar donorskog odjeljka. Brzina oslobađanja bila je veća pri većoj koncentraciji lijeka unutar donorskog odjeljka.
- Metoda je diskriminatorna prema razlikama u formulaciji. Brzina oslobađanja bila je veća kod kitozanskih mikročestica s kitozanom niske molekulske mase nego kod onih s kitozanom srednje molekulske mase.
- Metodom je potvrđena sličnost među serijama istog sastava i proizvodnog procesa.
- Metoda je uspješno primijenjena i kod kitozanskih i kod metakrilatnih mikročestica s mupirocinom, čime je pokazana primjenjivost metode za razne tipove topikalnih čestičnih terapijskih sustava.



# LITERATURA

- Abdel Mouez, M., Zaki, N.M., Mansour, S., Geneidi, A.S., 2013. Bioavailability enhancement of verapamil HCl via intranasal chitosan microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci.* 51, 59-66.
- Abu-Diak, O.A., Andrews, G.P., Jones, D.S., 2012. Hydrophobic polymers of pharmaceutical significance, u: Siepmann, J., Siegel, R.A., Rathbone, M.J. (urednici), *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. Springer, New York, SAD, str. 47-73.
- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M., 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release* 100, 5-28.
- Albertini, B., Passerini, N., Di Sabatino, M., Vitali, B., Brigidi, P., Rodriguez, L., 2009. Polymer-based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 591-601.
- Alhalaweh, A., Andersson, S., Velaga, S.P., 2009. Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 206-214.
- Anal, A.K., Stevens, W.F., Remuñán-López, C., 2006. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* 312, 166-173.
- Aquino, R.P., Auriemma, G., Mancherini, T., Russo, P., Porta, A., Adami, R., Liparoti, S., Della Porta, G., Reverchon, E., Del Gaudio, P., 2013. Design and production of gentamicin/dextran microparticles by supercritical assisted atomization for the treatment of wound bacterial infections, *Int. J. Pharm.* 440, 188-194.
- Arifin, D.Y., Lee, L.Y., Wang, C.-H., 2006. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1274-1325.
- Azarmi, S., Roa, W., Lobenberg, R., 2007. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *Int. J. Pharm.* 328, 12-21.
- Bhardwaj, U., Burgess, D.J., 2010. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems, *Int. J. Pharm.* 388, 287-294.
- Bonacucina, G., Cespi, M., Misici-Falzi, M., Palmieri, G.F., 2006. Rheological, adhesive and release characterisation of semisolid Carbopol/tetraglycol systems. *Int. J. Pharm.* 307, 129-140.
- Bonacucina, G., Palmieri, G.F., 2006. Acrylic polymers as thickening agents for tetraglycol cosolvent. *J. Pharm. Sci.* 95, 726-736.

- Brown, C.K., Friedel H.D., Barker, A.R., Buhse, L.F., Keitel, S., Cecil, T.L., Kraemer, J., Morris, J.M., Reppas, C., Stickelmeyer, M.P., Yomota, C., Shah, V.P., 2011. FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/*In Vitro* Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. AAPS PharmSciTech 12, 782-794.
- Crowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E., 2009. Handbook of pharmaceutical excipients, 6. izdanje, Pharmaceutical Press, London, Velika Britanija, str. 525-530.
- Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y.Y., Hamblin, M.R., 2011. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 9, 857-879.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., 2011. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Prog. Polym. Sci. 36, 981-1014.
- Devarakonda, B., Li, N., de Villiers, M.M., 2005. Effect of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on the in vitro release of water-insoluble nifedipine from aqueous gels. AAPS PharmSciTech 6, E504-E512.
- Dittgen, M., Durrani, M., Lekmann, K., 1997. Acrylic polymers: A review of pharmaceutical applications. S.T.P. Pharma Sci. 7, 403-437.
- Djekic, L., Primorac, M., Filipic, S., Agbaba, D., 2012. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. Int. J. Pharm. 433, 25-33.
- Djordjevic, Lj., Primorac, M., Stupar, M., 2005. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycolides based microemulsions. Int. J. Pharm. 296, 73-79.
- D'Souza, S.S., DeLuca, P.P., 2006. Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. Pharm. Res. 23, 460-474.
- Dürriegl, M., Kwokal, A., Hafner, A., Šegvić Klarić, M., Dumičić, A., Cetina-Čižmek, B., Filipović-Grčić, J., 2011a. Spray dried microparticles for controlled delivery of mupirocin calcium: Process-tailored modulation of drug release. J. Microenc. 28, 108-121.
- Dürriegl, M., Lusina Kregar, M., Hafner, A., Šegvić Klarić, M., Filipović-Grčić, J., 2011b. Mupirocin calcium microencapsulation via spray drying: feed solvent influence on microparticle properties, stability and antimicrobial activity. Drug. Dev. Ind. Pharm. 37, 1402-1414.
- FDA, 1997. FDA guidance for industry – Nonsterile semisolid dosage forms, Scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing and controls; in vitro release testing

- and *in vivo* bioequivalence documentation, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, SAD.
- Fernández Cervera, M., Heinämäki, J., de la Paz, N., López, O., Maunu, S.L., Virtanen, T., Hatanpää, T., Antikainen, O., Nogueira, A., Fundora, J., Yliruusi, J., 2011. Effect of spray drying on physicochemical properties of chitosan acid salts, *AAPS PharmSciTech* 12, 637-649.
- Filipović-Grčić, J., Perissutti, B., Moneghini, M., Voinovich, D., Martinac, A., Jalšenjak, I., 2003. Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation. *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 921-931.
- Flynn, G.L., Shah, V.P., Tenjarla, S.N., Corbo, M., DeMagistris, D., Feldman, T.G., Franz, T.J., Miran, D.R., Pearce, D.M., Sequeira, J.A., Swarbrick, J., Wang, J.C.T., Yacobi, A., Zatz, J.L., 1999. Assessment of value and applications of *in vitro* testing of topical dermatological drug products. *Pharm. Res.* 16, 1325-1330.
- Freiberg, S., Zhu, X.X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* 282, 1-18.
- Gavini, E., Hegge, A.B., Rassu, G., Sanna, V., Testa, C., Pirisino, G., Karlsen, J., Giunchedi, P., 2006. Nasal administration of carbamazepine using chitosan microspheres: *in vitro/in vivo* studies. *Int. J. Pharm.* 307, 9-15.
- Gavini, E., Rassu, G., Muzzarelli, C., Cossu, M., Giunchedi, P., 2008. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 245-252.
- Gelfuso, G.M., Gratieri, T., Simao, P.S., de Freitas, L.A.P., Lopez, R.F.V., 2011. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *J. Microencapsul.* 28, 650-658.
- Glavas-Dodov, M., Goracinova, K., Mladenovska, K., Fredro-Kumbaradzi, E., 2002. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. *Int. J. Pharm.* 242, 381-384.
- Grassi, M., Grassi, G., Lapasin, R., Colombo, I., 2007. *Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms, A physical and mathematical approach*, CRC Press, Boca Raton, SAD.
- HALMED, 2010. Sažetak opisa svojstava lijeka: Betrion mast. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-10-02-69.pdf>, pristupljeno 27.09.2015.

- Heng, D., Cutler, D.J., Chan, H.K., Yun, J., Raper, J.A., 2008. What is a Suitable Dissolution Method for Drug Nanoparticles? *Pharm. Res.* 25, 1696-1701.
- Higuchi, T., 1961. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* 50, 874-875.
- Holvoet, C., Plaizier-Vercammen, J., Vander Heyden, Y., Gabriels, M., Camu, F., 2003. Preparation and *in-vitro* release rate of fentanyl-cyclodextrin complexes for prolonged action in epidural analgesia. *Int. J. Pharm.* 265, 13-26.
- Hombreiro-Perez, M., Siepmann, J., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Hoffman, M., Bodemeier, R., Maincent, P., 2003. Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling. *J. Control. Release* 88, 413-428.
- ICH Q2(R1), 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology. International Conference on Harmonisation (ICH), Geneva, Švicarska.
- ICH Q3C(R5), 2011. Impurities: Guideline for residual solvents. International Conference on Harmonisation (ICH), Geneva, Švicarska.
- Illum, L., 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.* 15, 1326-1330.
- IUPAC, 1997. Compendium of Chemical Terminology, drugo izdanje (the "Gold Book"). Sastavili A. D. McNaught i A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. XML on-line ispravljena verzija: <http://goldbook.iupac.org> (2006-), sastavili M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; nadopunio A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
- Kim, B.K., Hwang, S.J., Park, J.B., Park, H.J., 2002. Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *J. Microenc.* 19, 811-822.
- Ko, J.A., Park, H.J., Hwang, S.J., Park, J.B., Lee, J.S., 2002. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* 249, 165-174.
- Krämer, J., Grady, L. T., Gajendran, J., 2005. Historical development of dissolution testing, u: Dressman, J., Krämer, J. (urednici), *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Taylor & Francis, New York, SAD.
- Kristmundsdóttir, T., Gudmundsson, Ó.S., Ingvarsdóttir, K., 1996. Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. *Int. J. Pharm.* 137, 159-165.

- Labouta, H.I., El-Khordagui, L.K., 2010. Polymethacrylate microparticles gel for topical drug delivery. *Pharm. Res.* 27, 2106-2118.
- Lam, P.L., Gambari, R., 2014. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *J. Control. Release* 178, 25-45.
- Lucero, M.J., Claro, C., Casas, M., Jimenez-Castellanos, M.R., 2013. Drug diffusion from disperse systems with a hydrophobically modified polysaccharide: Enhancer vs Franz cells. *Carbohydr. Polym.* 92, 149-156.
- Maa, Y.-F., Nguyen, P.-A., Andya, J.D., Dasovich, N., Sweeney, T.D., Shire, S.J., Hsu, C.C., 1998. Effect of spray drying and subsequent processing conditions on residual moisture content and physical/biochemical stability of protein inhalation powders. *Pharm. Res.* 15, 768-774.
- Martinac, A., Filipović-Grčić, J., Perissutti, B., Voinovich, D., Pavelić, Ž., 2005. Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: Swelling study and evaluation of *in vitro* drug release properties. *J. Microenc.* 22, 549-561.
- Masters, K., 1985. Spray drying handbook, 4. izdanje, Longman Scientific & Technical, Harlow, Engleska.
- Miller, D.A., Gil, M., 2012. Spray-drying technology, u: Williams III, R.O., Watts, A.B., Miller, D.A. (urednici), *Formulating poorly water soluble drugs*, Springer, New York, SAD
- Moebus, K., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2009. Alginate-ploxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 42-53.
- Moebus, K., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2012. Novel preparation techniques for alginate-ploxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 358-366.
- Murphy, D.J., Sankalia, M.G., Loughlin, M.G., Donnelly, R.F., Jenkins, M.G., McCarron, P.A., 2012. Physical characterisation and component release of poly(vinyl alcohol)-tetrahydroxyborate hydrogels and their applicability as potential topical drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 423, 326-334.
- Nicklasson, M., Orbe, A., Lindberg, J., Borgå, B., Magnusson, A.-B., Nilsson, G., Ahlgren, R., Jacobsen, L., 1991. A collaborative study of the in vitro dissolution of phenacetin crystals comparing the flow through method with the USP paddle method. *Int. J. Pharm.* 69, 255-264.

- Noyes, A.A., Whitney, W.R., 1897. The rate of solution of solid substances in their own solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 19, 930-934.
- Nunthanid, J., Laungтана-anan, M., Srimornsak, P., Limmatvapirat, S., Puttipatkhachorn, S., Lim, L.Y., Khor, E., 2004. Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets, *J. Control. Release* 99, 15-26.
- Olejnik, A., Goscianska, J., Nowak, I., 2012. Active compounds release from semisolid dosage forms. *J. Pharm. Sci.* 101, 4032-4045.
- Palmieri, G.F., Bonacucina, G., di Martino, P., Martelli, S., 2001. Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. Water-soluble drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 195-204.
- Pantelic, I., Lukic, M., Markovic, B., Lusiana, Hoffmann, C., Müller-Goymann, C., Milic, J., Daniels, R., Savic, S., 2014. Development of a prospective isopropyl alcohol-loaded pharmaceutical base using simultaneous in vitro/in vivo characterization methods of skin performance. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40, 960-971.
- Parenti, M.A., Hatfield, S.M., Leyden, J.J., 1987. Mupirocin: A topical antibiotic with a unique structure and mechanism of action. *Clin. Pharm.* 6, 761-770.
- Paudel, A., Worku, Z.A., Meeus, J., Guns, S., Van den Mooter, G., 2013. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: formulation and process considerations. *Int. J. Pharm.* 453, 253-284.
- Perumal, S., Ramadass, S.K., Madhan, B., 2014. Sol-gel processed mupirocin silica microspheres loaded collagen scaffold: A synergistic bio-composite for wound healing. *Eur. J. Pharm. Sci.* 52, 26-33.
- Ph.Eur., 2015a. General Notices, Powders for cutaneous application, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 799.
- Ph.Eur., 2015b. 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 288-295.
- Ph.Eur., 2015c. 2.9.4. Dissolution test for transdermal patches, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 295-297.
- Ph.Eur., 2015d. 2.9.42. Dissolution test for lipophilic solid dosage forms, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 361.

- Ph.Eur., 2015e. 2.9.25. Dissolution test for medicated chewing gums, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 325-329.
- Ph.Eur., 2015f. 2.9.29. Intrinsic dissolution, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 331-333.
- Ph.Eur., 2015g. 2.9.43. Apparent dissolution, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 361-362.
- Ph.Eur., 2015h. 5.17.1. Recommendations on dissolution testing, u: European Pharmacopoeia 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francuska, str. 727-729.
- Rapedius, M., Blanchard, J., 2001. Comparison of the Hanson Microette and the Van Kel apparatus for in vitro release testing of topical semisolid formulations. *Pharm. Res.* 18, 1440-1447.
- Rawat, A., Stippler, E., Shah, V.P., Burgess, D.J., 2011. Validation of USP apparatus 4 method for microsphere in vitro release testing using Risperdal Consta. *Int. J. Pharm.* 420, 198-2015.
- Ré, M.-I., 2006. Formulation drug delivery systems by spray drying. *Drying Technology* 24, 433-446.
- Rege, P.R., Vilivalam, V.D., Collins, C.C., 1998. Development in release testing of topical dosage forms: use of the Enhancer Cell<sup>TM</sup> with automated sampling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 1225-1233.
- Rizi, K., Green, R.J., Donaldson, M., Williams, A.C., 2011. Production of pH-responsive microparticles by spray drying: investigation of experimental parameter effects on morphological and release properties. *J. Pharm. Sci.* 100, 566-579.
- Salama, R.O., Traini, D., Chan, H.K., Young, P.M., 2008. Preparation and characterisation of controlled release co-spray dried drug-polymer microparticles for inhalation 2: Evaluation of *in vitro* release profiling methodologies for controlled release respiratory aerosols. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 145-152.
- Sanghvi, P.P., Collins, C.C., 1993. Comparison of diffusion studies of hydrocortisone between the Franz cell and the Enhancer cell. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19, 1573-1585.

- Scalia, S., Mezzena, M., 2009. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical stability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 90-94.
- Schmid-Wendtner, M.H., Korting, H.C., 2006. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19, 296-302.
- Shah, V.P., 2005. The role of dissolution testing in the regulation of pharmaceuticals: the FDA perspective, u: Dressman, J., Krämer, J. (urednici), *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Taylor & Francis, New York, SAD.
- Shah, V.P., Elkins, J., Lam, S.Y., Skelly, J.P., 1989. Determination of *in vitro* drug release from hydrocortisone creams. *Int. J. Pharm.* 53, 53-59.
- Shaw, L.R., Irwin, W.J., Grattan, T.J., Conway, B.R., 2002. The development of modified dissolution method suitable for investigating powder mixtures. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 1147-1153.
- Shu, X.Z., Zhu, K.J., 2000. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *Int. J. Pharm.* 201, 51-58.
- Siepmann, J., Göpferich, A., 2001. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 229-247.
- Siepmann, J., Peppas, N.A., 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 139-157.
- Siepmann, J., Peppas, N.A., 2011. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *Int. J. Pharm.* 418, 6-12.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2008. Mathematical modeling of drug delivery. *Int. J. Pharm.* 364, 328-343.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2012. Modelling of diffusion controlled drug delivery. *J. Control. Release* 161, 351-362.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2013. Mathematical modeling of drug dissolution. *Int. J. Pharm.* 453, 12-24.
- Singla, A.K., Chawla, M., 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1047-1067.
- Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* 274, 1-33.
- Thakker, K.D., Chern, W.H., 2003. Development and validation of *in vitro* release tests for semisolid dosage forms – case study. *Dissolution Technol.* 10(2) 10-15.
- Usayapant, A., Iyer, B.R., 1999. The effect of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on *in vitro* drug release of steroids from suppository bases. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 25, 387-390.



- USP, 2015a. <1724> Semisolid drug products – performance tests, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 1625-1637.
- USP, 2015b. <1151> Pharmaceutical dosage forms, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 1278-1301.
- USP, 2015c. <711> Dissolution, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 486-496.
- USP, 2015d. <724> Drug Release, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 497-504.
- USP, 2015e. <1087> Apparent intrinsic dissolution – dissolution testing procedures for rotating disk and stationary disk, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 1066-1070.
- USP, 2015f. <1092> The dissolution procedure: Development and validation, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 7103-7123.
- USP, 2015g. Mupirocin, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 4459-4460.
- Vasiljevic, D., Parojcic, J., Primorac, M., Vuleta, G., 2006. An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. *Int. J. Pharm.* 309, 171-177.
- Vasir, J.K., Tambwekar, K., Garg, S., 2003. Bioadhesive microspheres as s controlled drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 255, 13-32.
- Vehring, R., 2008. Pharmaceutical particle engineering via spray drying, *Pharm Res* 25, 999-1022.
- Walters, R.H., Bhatnagar, B., Tchessalov, S., Izutsu, K.-I., Tsumoto, K., Ohtake, S., 2014. Next-generation drying technologies for pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.* 103, 2673-2695.
- Wertheim, H.F.L., Verveer, J., Boelens, H.A.M., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Vos, M.C., 2005. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1465-1467.
- Zatz, J.L., 1995. Drug release from semisolids: effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. *Pharm. Res.* 12, 787-789.
- Zatz, J.L., Segers, J.D., 1998. Techniques for measuring *in vitro* release from semisolids. *Dissolution Technol.* 5(1), 3-17.

# ŽIVOTOPIS

**Maja Lusina Kregar** (djevojačko prezime Lusina)

## Osobni podaci

Datum i mjesto rođenja: 3. svibnja 1977. g. u Rijeci

Državljanstvo: Republike Hrvatske

## Školovanje

Od 2000. g. Poslijediplomski studij Farmaceutske znanosti, Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu

1995. – 2000. g. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, studij Farmacija

## Radno iskustvo

Od 2013. g. Voditelj projekata u Analitici  
PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Analitika

2007. – 2013. g. Viši istraživač analitičar  
PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Analitika

2000. – 2007. g. Istraživač analitičar  
PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Analitika

## Znanstveni radovi

- 1) **Lusina Kregar M**, Dürriegl M, Rožman A, Jelčić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development and validation of an *in vitro* release method for topical particulate delivery systems. Int J Pharm 485 (2015) 201-214
- 2) Dürriegl M, **Lusina Kregar M**, Hafner A, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J. Mupirocin calcium microencapsulation via spray drying: feed solvent influence on microparticle properties, stability and antimicrobial activity. Drug Dev Ind Pharm 27 (2011) 1402-1414
- 3) **Lusina M**, Cindrić T, Tomaić J, Peko M, Pozaić L, Musulin N. Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. Int J Pharm 291 (2005) 127-137

## Stručni radovi

- 1) **Lusina M**. Ispitivanje stabilnosti lijekova – teorija, regulativa i praksa. Farm glas 62 (2006) 395-404
- 2) **Lusina M**, Zorc B. Muški spolni hormoni i anabolici. Farm glas 56 (2000) 235-247

## **Predavanja**

- 1) **Lusina M.** Ispitivanje stabilnosti lijekova – teorija, regulativa i praksa, Hrvatsko farmaceutsko društvo, ožujak 2006.
- 2) **Lusina M.** Ispitivanje stabilnosti ljekovitih supstancija i gotovih oblika, Hrvatsko farmaceutsko društvo, svibanj 2003.

## **Sudjelovanje na znanstvenim skupovima**

- 1) **Lusina Kregar M**, Rožman A, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Influence of process parameters and composition on water content and hygroscopicity of mupirocin microparticles. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, Velika Britanija, 2016 (poster prezentacija)
- 2) Bartolec M, Pranjić J, Radošević S, **Lusina Kregar M**. Implementation of Analytical Quality by Design (AQbD) approach to RP-HPLC method for dissolution testing. 4th World Conference on Physico Chemical Methods in Drug Discovery and Development, Crveni Otok, 2015 (poster prezentacija)
- 3) **Lusina Kregar M**, Dürriegl M, Rožman A, Jelčić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development of antimicrobial wound dressings: spray dried mupirocin microparticles. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology Portorož, Slovenija, 2014 (poster prezentacija)
- 4) Dragić T, Jelčić Ž, **Lusina Kregar M**, Mirić S. HPMC matrix tablets swelling properties as a prediction tool for gliclazide release behavior by texture analysis. 7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biodelivery Systems, Ljubljana, Slovenija, 2008 (poster prezentacija)
- 5) **Lusina M**, Biškupić S, Golja P, Cindrić S. Ispitivanje stabilnosti Loperamid kapsula. Treći hrvatski kongres farmacije, Cavtat, 2005 (poster prezentacija)
- 6) **Lusina M**, Jurlina S, Pozaić Frketić L, Mihoci M. Stability testing of Sildenafil tablets. World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 65th Congress of FIP, Cairo, Egipat, 2005 (poster prezentacija)
- 7) **Lusina M**, Jurlina S, Dumičić A, Dragić T. Stability Testing and Selection of Final Packaging for Pravastatin Tablets. World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 64th Congress of FIP, New Orleans, SAD, 2004 (poster prezentacija)
- 8) **Lusina M**, Cindrić T, Tomačić J, Ballian D. Stability Study of Losartan Potassium and Hydrochlorothiazide tablets. 5th Central Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Ljubljana, Slovenija, 2003 (poster prezentacija)

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## RAZVOJ *IN VITRO* METODE ZA ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA DJELATNE TVARI IZ POLIMERNIH MIKROČESTICA ZA TOPIČKU PRIMJENU

Maja Lusina Kregar

PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj generičkih proizvoda, Zagreb

### Sažetak

Trenutno ne postoje farmakopejske ili standardne metode i aparature za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz topikalnih mikročestica. Cilj ovog rada bio je razviti i validirati diskriminatornu *in vitro* metodu za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz topikalnih mikročestica, uz korištenje imerzijske ćelije.

Za potrebe rada pripremljene su i karakterizirane kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom. Za izradu mikročestica korištena je tehnika sušenja raspršivanjem. Ispitana su sljedeća svojstva mikročestica: učinkovitost uklapanja lijeka, morfologija i veličina čestica, kristalno stanje, termička svojstva, spektralna svojstva, zeta potencijal, higroskopsnost te sadržaj vode i ostalih organskih otapala.

Kitozanske i metakrilatne mikročestice s mupirocinom korištene su kao modelni topikalni terapijski sustavi za razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari. Imerzijska ćelija korištena je u kombinaciji s aparaturom s lopaticom. pH i temperatura medija (pH 5,5, 32°C) odabrani su u skladu s fiziološkim uvjetima na koži. Difuzija lijeka odvijala se preko membrane izrađene od smjese celuloznih estera, koja je pokazala nisku adsorpciju lijeka te nizak otpor difuziji lijeka. Nakon početnog zastoynog vremena količina oslobođenog lijeka postala je proporcionalna korijenu iz vremena. Nagib u linearnom području krivulje oslobađanja lijeka korišten je kao mjera brzine oslobađanja. Varijacije u brzini okretanja lopatica (25 o/min, 50 o/min, 100 o/min), visini lopatica (1 cm, 2,5 cm) i volumenu medija za ispitivanje oslobađanja (100 ml, 200 ml) nisu značajno utjecale na brzinu oslobađanja.

Analiza kitozanskih mikročestica izrađenih s kitozanim različitih molekulskih masa pokazala je da se kod povećane molekulske mase kitozana smanjuje brzina oslobađanja. S druge strane, brzina oslobađanja bila je veća pri većoj koncentraciji lijeka unutar donorskog odjeljka. Na taj je način pokazana diskriminatornost metode prema razlikama u formulaciji, kao i prema razlikama u koncentraciji uzorka unutar donorskog odjeljka ćelije. Metodom je nadalje potvrđena sličnost serija istog sastava proizvedenih istim procesom.

Metoda je validirana u skladu s ICH smjernicama. U sklopu validacije metode potvrđena je njena specifičnost, linearnost, točnost, preciznost i robusnost. Metoda je uspješno primijenjena kod kitozanskih i metakrilatnih čestica, čime je pokazan njen potencijal za karakterizaciju raznih tipova topikalnih čestičnih terapijskih sustava. Razvijena metoda može biti koristan alat u razvoju formulacije kod takvih terapijskih sustava.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu.

(128 stranica, 36 slika, 14 tablica, 110 literaturnih navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: *in vitro* ispitivanje oslobađanja djelatne tvari, mikročestice, topikalna primjena, imerzijska ćelija, razvoj metode

Voditelj: prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Anita Hafner, izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić, dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, znanstv. savj.

Datum prihvatanja rada: 20. siječnja 2016.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

## DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* RELEASE TEST FOR TOPICAL MICROPARTICLE SYSTEMS

**Maja Lusina Kregar**

PLIVA Croatia Ltd., Generics Research and Development, Zagreb

### Summary

Currently there are no compendial or standard methods and apparatuses for *in vitro* release testing of topical microparticles. The aim of this study was to develop and validate a discriminative *in vitro* release method for topical microparticles using the immersion cell.

For the purpose of this study chitosan-based and methacrylate-based microparticles with mupirocin were prepared by spray drying. The following characteristics of the microparticles were examined: encapsulation efficiency, particle size and morphology, crystallinity, thermal properties, spectral properties, surface charge, hygroscopicity, residual organic solvents and water content.

Chitosan-based and methacrylate-based microparticles with mupirocin were used as model topical delivery systems for *in vitro* release method development. The immersion cells were used in combination with paddle dissolution apparatus. The pH and temperature of the release medium (pH 5.5, 32°C) were selected to reflect the physiological skin conditions. Diffusion of the drug occurred across a mixed cellulose ester membrane, which demonstrated low drug adsorption and low diffusional resistance. After an initial lag phase the amount of drug released became proportional to the square root of time. The slope in the linear portion of the release curve was used as a measure of release rate. Variations in paddle rotation speed (25 rpm, 50 rpm, 100 rpm), paddle height (1 cm, 2.5 cm) and volume of release medium (100 ml, 200 ml) did not significantly alter the release rates.

Appropriate discriminatory power of the method was confirmed as the method was able to detect differences in formulation, as well as differences in drug concentration inside the sample compartment. The analysis of chitosan-based microparticles prepared with chitosans of different molecular weights has shown that the release rate decreases with increasing molecular weight of chitosan. On the other hand, the release rate increased with increasing drug concentration inside the sample compartment. The method was further used to confirm sameness between batches of the same composition prepared by the same process.

The method was validated for its specificity, linearity, accuracy, precision and robustness in line with International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines. The method was successfully applied both for chitosan-based and methacrylate-based microparticles, which demonstrates its potential application for various types of topical particulate delivery systems. The developed method can be a useful tool in formulation development of such delivery systems.

Thesis is deposited at the library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry and at National and University Library in Zagreb.

(128 pages, 36 figures, 14 tables, 110 references, original in Croatian language)

Key words: *in vitro* drug release, microparticles, topical application, immersion cell, method development

Supervisor: prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Reviewers: Anita Hafner, PhD, Associate Professor, Jasmina Lovrić, PhD, Associate Professor, Biserka Cetina-Čižmek, PhD, Scientific Advisor

Thesis accepted: 20 Jan 2016