

In vitro oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnih pripravaka

Meštrović, Magda

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:733845>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Magda Meštrović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Magda Meštrović

Predala je izrađen završni rad dana: 6. srpnja 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Gordana Matijašić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Juraj Šipušić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Stanislav Kurajica, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, zamjena

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 9. srpnja 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Magda Meštrović

***IN VITRO* OSLOBAĐANJE DJELATNE TVARI IZ
TRANSDERMALNIH PRIPRAVAKA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Gordana Matijašić

izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

prof. dr. sc. Juraj Šipušić

Zagreb, srpanj 2021.

Završni rad izrađen je u Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

SAŽETAK

Cilj ovoga rada je provesti *in vitro* ispitivanje oslobađanja celekoksiba iz transdermalnog pripravka. Ispitivanje se provodi upotrebom Franzovih difuzijskih ćelija, a prvi je zadatak savladavanje metode *in vitro* ispitivanja.

Dobiveni podaci se obrađuju kako bi se proveo odabir odgovarajućeg kinetičkog modela kojim bi se potencijalno mogao opisati prijelaz djelatne tvari iz transdermalnog pripravka u sistemsku cirkulaciju. Za analizu kinetičkih modela koristi se dodatak za *Microsoft Excel* program, *DDSolver*.

Prema dobivenim podacima, oslobađanje celekoksiba iz transdermalnog pripravka opisuje se Korsmeyer-Peppasovim kinetičkim modelom. Taj model definiran je dvama parametrima: konstantom brzine oslobađanja djelatne tvari (k_r) i eksponentom difuzije (n) koji za ovaj model poprima vrijednosti u intervalu od 0,5 do 1. U tom slučaju, mehanizam oslobađanja djelatne tvari opisuje se difuzijom koja odstupa od Fickova zakona, tzv. anomalnom difuzijom.

Ključne riječi: *in vitro*, celekoksib, transdermalni pripravak, Franzova ćelija, Korsmeyer-Peppas

ABSTRACT

***In vitro* release of the active ingredient from transdermal system**

The aim of this work is to study the *in vitro* release of celecoxib from the transdermal system. For this purpose Franz diffusion cells are used and it is important to master the *in vitro* release method.

The results are analyzed to determine which kinetic model is appropriate for the observed drug release from the transdermal system into a systemic circulation. With the intention of analyzing kinetic models, *Microsoft Excel's DDSolver* program is used.

According to the results, the Korsmeyer-Peppas model describes the release of celecoxib from the transdermal system. This model is defined by two parameters: release constant (k_r) and diffusion exponent (n), which is in the range of 0.5 and 1. In this case, the release mechanism is described with anomalous diffusion. Thus, Fick's diffusion law cannot describe the release mechanism of celecoxib.

Key words: *in vitro*, celecoxib, transdermal system, Franz cell, Korsmeyer-Peppas

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Dermalna primjena lijeka	2
2.1.1. Transdermalni i topikalni pripravci	4
2.1.2. Transdermalni dozirni oblici	4
2.1.3. Polimeri u transdermalnoj dostavi.....	5
2.2. Oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnih pripravaka	5
2.2.1. Metode ispitivanja oslobađanja djelatne tvari	6
2.2.2. Opis kinetike oslobađanja.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Celekoksib	10
3.1.2. Polietilen glikol	10
3.2. Transdermalni pripravak.....	11
3.3. Ispitivanje oslobađanja <i>in vitro</i>	11
3.4. Obrada podataka	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
5. ZAKLJUČAK	20
6. LITERATURA.....	21
7. PRILOZI.....	23
7.1. Glavni tehnički parametri uređaja	23
7.2. Shematski prikaz početnog zaslona uređaja	23
7.3. Shematski prikaz glavnog izbornika.....	24
7.4. Shematski prikaz pokretanja grijanja na uređaju.....	25
7.5. Shematski prikaz pokretanja vrtnje u uređaju	26
7.6. Shematski prikaz gašenja uređaja.....	27

1. UVOD

In vitro ispitivanja nekog lijeka simuliraju primjenu lijeka na živom organizmu. Dakle, *in vitro* ispitivanjem ne provode se ispitivanja na živim organizmima, već se samo u laboratoriju stvaraju uvjeti koji oponašaju živi organizam. Pri tom ispitivanju koriste se sintetski materijali ili izolirana tkiva živih organizama.

Liječenje s transdermalnim pripravkom omogućuje unošenje ljekovite tvari u organizam “vanjskim“ putem, tj. kroz kožu. Takav način primjene lijeka ima mnogo prednosti poput zaobilaznja prvog prolaza kroz jetru, neuništavanje gastrointestinalnog trakta, rjeđa primjena lijeka zbog zadržavanja oslobođene djelatne tvari u koži i sl.

Profil transdermalnog pripravka sadrži više slojeva načinjenih pretežito i najčešće od polimera. Polimeri uglavnom služe kao nosači djelatne tvari. Aktivna ili djelatna tvar je spoj koji liječi ili ublažava simptome, a difundira iz transdermalnog pripravka kroz kožu u sistemsku cirkulaciju. *In vitro* ispitivanjem proučava se koliko djelatne tvari difundira iz pripravka u određenom vremenu.

U ovom radu promatra se oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnog dozirnog oblika kroz kožu. Ispitivanje se provodi u Franzovim difuzijskim ćelijama pri konstantnoj temperaturi od 37 °C. Ćelije se sastoje od dva dijela između kojih se nalazi membrana koja oponaša kožu. Koncentracija oslobođene djelatne tvari, celekoksiba, praćena je tijekom šest sati. Također, ispitana je kinetika oslobađanja djelatne tvari kako bi se odredio mehanizam prijelaza djelatne tvari iz pripravka u sistemsku cirkulaciju. Kinetički modeli koji se ispituju su model nultoga reda, model prvoga reda, Higuchijev model i Korsmejer-Peppasov model.

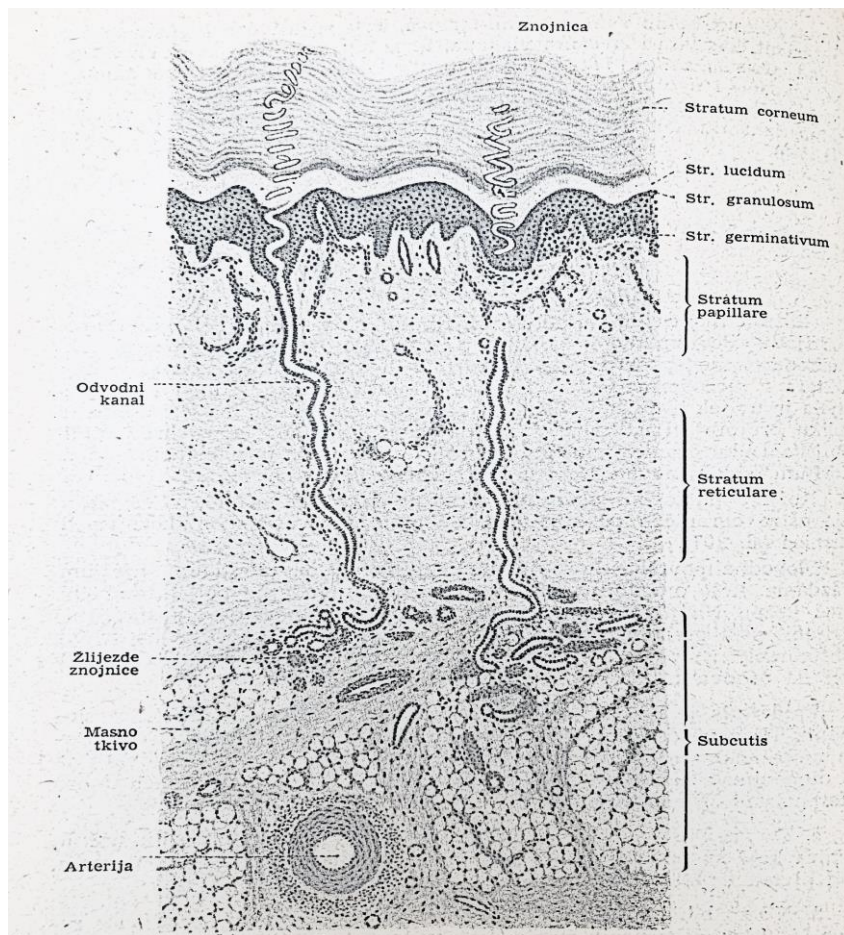
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Dermalna primjena lijeka

Dermalnom primjenom lijeka dostavlja se kontrolirana količina ljekovite tvari u tijelo bolesnika. Neke od prednosti ovakve primjene lijeka su zaobilaznje prvog prolaska kroz jetru, zaštita gastrointestinalnog trakta, smanjenje učestalosti primjene lijeka te lakši prekid terapije. [1, 2] Budući da se prijenos djelatne tvari odvija putem kože, ona ujedno predstavlja glavnu prepreku apsorpciji lijeka.

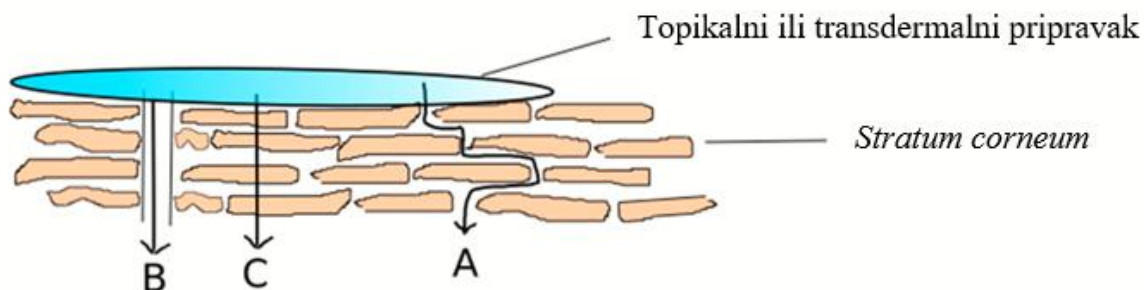
Koža je najveći čovjekov organ koji prekriva organizam kao zaštitni masnokiselni ogrtač ($\text{pH} \approx 5,5$) te je najveći organ za izlučivanje. Iako je resorpcija kroz kožu gotovo beznačajna, od velike je važnosti prilikom lokalne dermalne upotrebe transdermalnih ili topikalnih lijekova. [3]

Koža se sastoji od dva dijela: epiderme (površinski dio kože, lat. *epidermis*) koji je epitelnog karaktera te derme (dublji dio kože, lat. *corium*) koji je vezivnog karaktera. Granica između navedenih slojeva je oštra, no uglavnom nije ravna. Epiderma se na svim dijelovima tijela sastoji od rožnatog sloja (lat. *stratum corneum*), nazubljenog sloja (lat. *stratum spinosum*) i temeljnog sloja (lat. *stratum basale*). Nazubljeni i temeljni sloj zajedno čine zametni sloj (lat. *stratum germinativum*). Na dlanovima i tabanima još se između rožnatog i nazubljenog sloja nalaze svijetli sloj (lat. *stratum lucidum*) te zrnati sloj (lat. *stratum granulosum*). Derma se sastoji od slojeva *stratum papillare* i *stratum reticulare* te se u njemu nalaze dlake, znojnice, lojnice i lamelarna osjetilna tjelešca (slika 1). [4]



Slika 1. Okomiti rez kroz kožu stopala odraslog čovjeka po Möllendorfu. [3]

Od navedenih slojeva kože, *stratum corneum* predstavlja ograničavajući faktor prolaza lijeka kroz kožu. Lijek može proći na tri načina. Prvi način prolaza lijeka uključuje transfolikularni put (uz folikulu dlake), a drugi uključuje transglandularni put (preko žlijezda znojnice). Mnogo značajniji prolaz lijeka kroz kožu predstavlja transepidermalna difuzija koja omogućuje da lijek prođe intercelularnim (između korneocita) i transcelularnim (kroz korneocite) putem (slika 2). [5] Od navedenih, najvažniji je intercelularni prolaz. [1]



Slika 2. Načini prolaza. A: intercelularni prolaz; B: transfolikularni prolaz; C: transcelularni prolaz. [1]

2.1.1. Transdermalni i topikalni pripravci

Kada lijek prođe kroz *stratum corneum* on može djelovati topikalno ili sistemski. Topikalni pripravci koriste se za liječenje dermatoloških stanja kože, uglavnom djeluju lokalno, no male se količine lijeka ipak apsorbiraju u krvotok. Također, dostavljaju djelatnu tvar u različite slojeve kože te su dobro prihvaćeni od strane pacijenata. Nasuprot, transdermalni pripravci dostavljaju djelatnu tvar u sistemsku cirkulaciju, a koža predstavlja samo put po kojem se taj transport odvija.

Pripravci mogu biti tekući (emulzije, suspenzije, sprejevi i otopine), polučvrsti (kreme, masti, gelovi i pjene) te čvrsti (prašci i flasteri). Najčešće su topikalni pripravci u polučvrstom obliku, a transdermalni u čvrstom obliku, no to nije uvijek pravilo. [1, 6, 7]

2.1.2. Transdermalni dozirni oblici

Cilj transdermalnog dozirnog oblika je sistematično dostavljati ljekovite doze djelatne tvari za liječenje ili sprječavanje bolesti/poremećaja na mjestima udaljenim od topikalne primjene.[2] Transdermalni dozirni oblik je transdermalni flaster koji dostavlja lijek pasivnom difuzijom. Takav flaster načinjen je od polimernog filma te se direktno primjenjuje na kožu. Postoje dvije najčešće korištene vrste transdermalnih flastera: spremišni sustav i matrični sustav s ili bez polupropusne membrane.

Spremišni sustav sastoji se od pokrovne membrane, spremišta, polupropusne membrane i adhezivnog sloja. Stavljanjem takvog flastera na kožu, lijek iz spremišta prolazi kroz polupropusnu membranu sve dok se koncentracija lijeka u adhezivnom sloju ne izjednači s onom u spremištu. Zatim se lijek iz adhezivnog sloja razdjeljuje i difundira u slojeve kože do konačnog prijelaza u sistemsku cirkulaciju. Budući da se koncentracija lijeka održava konstantnom; kako lijek difundira iz adhezivnog sloja u kožu, tako i difundira iz spremišta u adhezivni sloj.

Matrični sustav sastoji se od pokrovne membrane, polimernog spremišta, adhezivnog sloja i zaštitnog sloja. Matrični sustav bez polupropusne membrane sastoji se od pokrovne membrane, adheziva i zaštitnog sloja. Kako se lijek nalazi u adhezivu, proizvodnja takvih sustava je komplicirana jer adheziv ima ulogu spremišta lijeka, kontrolira oslobađanje lijeka i zadržava formulaciju na koži određeno vrijeme. Kod sustava s polupropusnom membranom, membrana se nalazi između dva adhezivna sloja. [8]

2.1.3. Polimeri u transdermalnoj dostavi

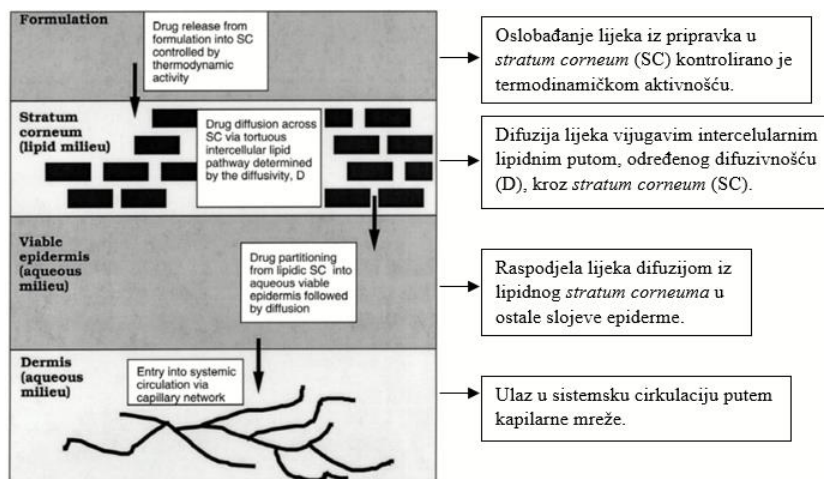
Polimeri su dobri materijali za primjenu jer s kožom tvore mekan i čvrst kontakt, a dovoljan je lagani pritisak kako bi se zalijepili na kožu. Pritiskom na površinu kože dolazi do adhezije čime se koža ovlažuje. Posljedično, polimer se navlažuje i širi. Polimeri se mogu koristiti za učvršćivanje flastera i/ili kao nosači lijeka. [8]

Transdermalni dozirni oblici mogu biti pripremljeni od različitih komponenata, no onaj pripremljen od djelatne tvari dispergirane u polimeru kontroliranom brzinom oslobađa djelatnu tvar. Brzina oslobađanja djelatne tvari iz dozirnog oblika može se regulirati mijenjanjem sastava polimera u matrici lijeka te koncentracijom djelatne tvari u lijeku. Također, brzina oslobađanja djelatne tvari iz netopljivog polimera može se povećati ukoliko se u formulaciju uključe hidrofilni polimeri. [9]

Shabbir i sur. [2] i Rao i sur. [9] pokazali su da se brzina oslobađanja djelatne tvari iz transdermalnog polimernog dozirnog oblika opisuje Higuchijevom jednačbom. Iz toga slijedi da je količina oslobođene djelatne tvari proporcionalna korijenu vremena. Uz to, konstanta brzine oslobađanja ovisi o početnoj količini lijeka i sastavu dozirnog oblika, ali je neovisna o njegovoj debljini. [9]

2.2. Oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnih pripravaka

Oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnog pripravka i njezin prijenos u sistemsku cirkulaciju višestupnjeviti je proces koji uključuje otapanje i oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnog pripravka; raspodjelu djelatne tvari u *stratum corneum*; difuziju kroz *stratum corneum* lipidnim intercelularnim putem; raspodjelu iz *stratum corneum* u polarni vodeni sloj epiderme; difuziju kroz epidermu u gornji sloj derme; apsorpciju u žile te ulaz u sistemsku cirkulaciju preko lokalne kapilarne mreže (slika 3.). [1, 10]



Slika 3. Shematski prikaz transporta djelatne tvari iz dozirnog oblika do kapilara. [10]

Odabir djelatne tvari u transdermalnom obliku određen je mnogim čimbenicima uključujući i fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva lijeka te međudjelovanje lijeka i membrane. [10] Stoga, idealni lijek trebao bi biti male molekulske mase (< 600 Da); niskog tališta (< 200 °C) kako bi se postigla odgovarajuća topljivost; visokog, ali stabilnog koeficijenta raspodjele kako ne bi došlo do neotapanja i zadržavanja lijeka u koži; topljiv u vodi i uljima kako bi se postigao odgovarajući koncentracijski gradijent i povećana difuzija kroz kožu. [1] U takvoj formulaciji lipofilnost (otapanje u nepolarnom) omogućava raspodjelu lijeka kroz *stratum corneum*, dok hidrofilnost (polarni karakter) omogućava raspodjelu po epidermi i ulazak u sistemska cirkulaciju. [10]

2.2.1. Metode ispitivanja oslobađanja djelatne tvari

Postoje dvije glavne skupine metoda za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari kroz kožu: kvantitativne i kvalitativne ili polu-kvalitativne metode. Kvantitativne metode uključuju metode s difuzijskim ćelijama, PAMPA metodu i tzv. *tape-stripping* metodu. U kvalitativne ili polu-kvalitativne metode ubrajaju se mikroskopske tehnike i Ramanova spektroskopija. U tim metodama koriste se razne mikroskopske i spektroskopske metode te njihove kombinacije. Kvantitativna *in vitro* ispitivanja provode se sa svrhom mjerenja i određivanja količine djelatne tvari (API) koja je propuštena kroz membranu u određenom vremenu, u odnosu na površinu difuzije i ukupnu količinu oslobođene djelatne tvari u prihvatnoj ćeliji. Nasuprot tome, svrha kvalitativnih metoda je pratiti djelatnu tvar te njenu prisutnost u različitim slojevima kože.

Metode ispitivanja s difuzijskim ćelijama, od kojih je najpoznatija metoda s Franzovom difuzijskom ćelijom, danas se najčešće koriste. U ovoj metodi određuju se veze između djelatne tvari, formulacije dozirnog oblika i kože. Materijali koji su potrebni za provedbu ispitivanja su ćelija koja se sastoji od prihvatnog i donorskog dijela te membrana koja predstavlja kožu. Ćelije mogu biti statične i protočne te su uglavnom napravljene od stakla. Franzova ćelija je statična vertikalna ćelija, no postoje i statične ćelije koje se postavljaju horizontalno. Nadalje, Franzove ćelije koje rade pri atmosferskom tlaku su otvorene, dok zatvorene ćelije rade pri povišenom tlaku što dovodi do boljeg prodiranja uzorka kroz membranu.

U difuzijskim ispitivanjima *in vitro* koriste se sintetičke membrane (IVRT – engl. *in vitro release test*) i/ili životinjska i ljudska koža (IVPT – engl. *in vitro skin permeation studies*). Pri korištenju sintetičke membrane donorska ćelija mora biti zatvorena, a ispitivani uzorak u

suvišku tako da se donorska ćelija ne može isprazniti u normalnim okolnostima. U slučaju IVPT, vrijedi upravo suprotno, donorska ćelija je otvorena, a količina uzorka je točno određena.

PAMPA metoda (engl. *The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) koristi pločicu s 96 utora za brzo određivanje propusnosti molekula kroz membranu putem pasivnog transporta. Membrana za ovu metodu napravljena je koristeći kolesterol, slobodne masne kiseline te analoge ceramida kako bi se imitirala svojstva lipidnog sloja, tj. *stratum corneum*. Donorska pločica zahtijeva veliku količinu uzorka čime se ne postiže ograničena doza kao kod IVPT-a.

Tape-stripping metoda može biti kvantitativna ili polu-kuantitativna, a podrazumijeva ljepljivu traku koja otkida slojeve *stratum corneum*. Na taj način promatra se sadržaj proteina po slojevima kože i količina djelatne tvari u određenom sloju. Ova metoda može biti *in vitro* i *in vivo*, na ljudskoj i životinjskoj koži, ali i na odgovarajućim modelima kože. Ispitivanje započinje topikalnim nanošenjem ispitivane tvari na kožu. Nakon određenog vremena inkubacije, uzorak se može ukloniti ili ostaviti. Zatim se na kožu postavlja ljepljiva traka koju je potrebno izravnati valjkom. Nadalje, traka se uklanja. Što je brzina uklanjanja flastera sporija, veće su sile adhezije što znači da je manja količina kože uklonjena flasterom. Uklonjeni flaster sadrži slojeve *stratum corneum* i djelatne tvari iz primijenjenog uzorka. Uzorak na flasteru analizira se spektroskopskim metodama ili primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Od mikroskopskih i spektroskopskih metoda najznačajnije su dvofotonska ekscitacijska mikroskopija, konfokalna laserska mikroskopija (CLSM) te Ramanova spektroskopija. [1]

2.2.2. Opis kinetike oslobađanja

Za određivanje kinetike oslobađanja lijeka iz transdermalnog dozirnog oblika primjenjuje se nekoliko matematičkih modela: kinetički model nultoga reda, model prvoga reda, Higuchijev model i Korsmejer-Peppasov model.

I. Model nultoga reda

Model se koristi za dozirne oblike koji se ne raspadaju i koji jako sporo oslobađaju djelatnu tvar. Također, površina dozirnog oblika se ne mijenja značajno te nisu ostvareni uvjeti za uspostavljanje bilance tvari. Model je opisan jednadžbom:

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (1)$$

gdje je Q_t količina oslobođenog lijeka u vremenu t , Q_0 je početna količina lijeka u receptorskoj otopini (uobičajeno iznosi nula) [11], k_0 je konstanta brzine oslobađanja nultoga reda izražena kao omjer koncentracije i vremena [2].

II. Model prvoga reda

Model se uobičajeno koristi za opis apsorpcije i oslobađanja djelatne tvari topive u vodi iz poroznog dozirnog oblika. Jednadžba modela:

$$Q_t = Q_0 \cdot e^{k_1 t} \quad (2)$$

gdje je Q_t količina oslobođenog lijeka u vremenu t , Q_0 je početna količina lijeka u receptorskoj otopini (uobičajeno iznosi nula), k_1 je konstanta brzine oslobađanja prvoga reda [s^{-1}], a t predstavlja vrijeme [11].

III. Higuchijev model

Model se koristi za opis oslobađanja topivih i slabo topivih djelatnih tvari u vodenom mediju. Dozirni oblik može biti u različitim čvrstim ili polučvrstim oblicima, a model se opisuje jednadžbom:

$$Q_t = k_H \sqrt{t} \quad (3)$$

gdje je Q_t količina oslobođene djelatne tvari u vremenu t , a k_H je Higuchijeva konstanta brzine oslobađanja. [11]

IV. Korsmejer-Peppasov model

Ovaj model je općeniti prikaz Higuchijeva modela koji objašnjava mehanizam dostavljanja lijeka prilikom raspada i/ili otapanja dozirnog oblika. Model se koristi za opis oslobađanja lijeka iz polimernih oblika. Izraz modela:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_r t^n \quad (4)$$

gdje je Q_t / Q_∞ omjer oslobođene djelatne tvari u vremenu t , Q_t je ukupna količina oslobođene tvari u vremenu t , Q_∞ je ukupna količina djelatne tvari u dozirnog obliku, k_r je konstanta brzine oslobađanja karakteristična za međudjelovanja polimer-lijek, n je eksponent difuzije karakterističan za odgovarajući mehanizam oslobađanja.

Eksponent n može poprimiti četiri vrijednosti:

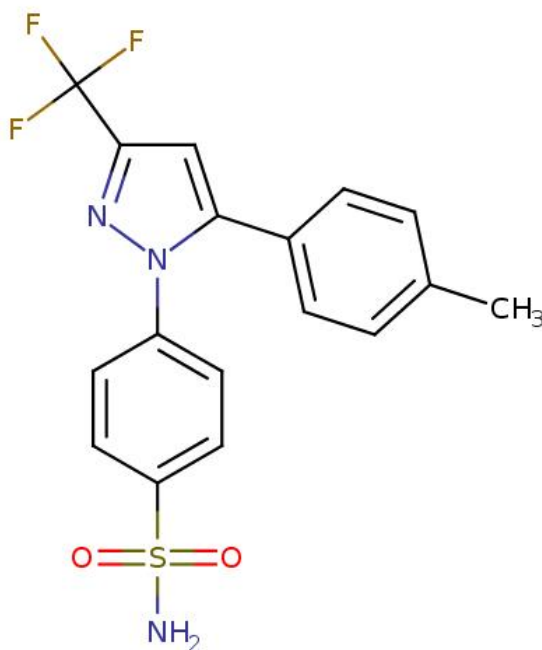
1. $n = 0,5$; model je jednak Higuchijevom modelu, a mehanizam oslobađanja slijedi Fickov zakon
2. $0,5 < n < 1$; mehanizam oslobađanja ne slijedi Fickov zakon
3. $n = 1$; način oslobađanja je sličan opisanom modelu nultoga reda
4. $n > 1$; oslobađanje djelatne tvari ovisi o opuštanju polimernih lanaca u filmu, prelazeći iz čvrstog i krhkog stanja u meko (niža kinetička energija i viša potencijalna energija), savitljivo stanje (visoka kinetička energija i niža potencijalna energija). [2, 11]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Celekoksib

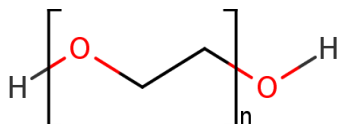
Celekoksib je pirazol supstituiran na pozicijama jedan, tri i pet s 4-sulfonamid-fenilom, trifluorometilom i p-tolilom; molekulske formule $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$. Prema IUPAC-ovoj nomenklaturi ime spoja je: 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]benzensulfonamid. [12]



Slika 4. Kemijska struktura celekoksiba. [13]

3.1.2. Polietilen glikol

Polietilen glikol je polimer sastavljen od monomera etilen glikola molekulske formule $C_2H_6O_2$. Prema IUPAC-ovoj nomenklaturi ime spoja je etan-1,2-diol. [14]



Slika 5. Kemijska struktura polietilen glikola. [15]

3.2. Transdermalni pripravak

Ispitan je transdermalni pripravak koji se sastoji od 1,5 mg celekoksiba umiješanog u rastaljeni polietilen glikol. Pripravak je kružnog oblika, promjera manjeg od 1,6 cm (slika 6.).



Slika 6. Fotografija transdermalnog pripravka u Franzovoj ćeliji na početku ispitivanja.

3.3. Ispitivanje oslobađanja *in vitro*

Za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz transdermalnog pripravka koristi se ispitivač RYJ-68 tvrtke Xiangtan Xiangyi Instrument Limited (slika 7.). Uređaj može primiti šest Franzovih difuzijskih ćelija, svake volumena $6,5 \pm 0,1$ mL. U *Prilogu* se nalaze sheme za rukovanje uređajem kao i dodatne specifikacije.



Slika 7. Fotografija ispitivača RYJ-68, Xiangtan Xiangyi Instrument Limited.

Uređaj se prije pokretanja napuni destiliranom vodom do ruba posude. Nakon pokretanja se provodi baždarenje temperature te se postavljaju radni uvjeti – temperatura i brzina vrtnje miješala: 37 °C i 300 min^{-1} .

Slijedi priprema ćelija. Na prihvatnu se ćeliju nanese tanak sloj masti kako bi membrana bolje prijanjala. U prihvatnu ćeliju ubaci se magnetič veličine 10×3 mm te se na namašćenu površinu

položi membrana. Kao membrana koristi se filter of politetrafluoretilena (PTFE) koji se smješta između ćelija tako da je glatka strana s gornje, a hrapava strana s donje strane. Na prihvatnu ćeliju s membranom postavi se donorski dio ćelije s namašćenim rubom. Spoj ćelija učvrsti se metalnom kvačicom. U složenu ćeliju doda se 6,5 mL akceptorske otopine, puferirane otopine fosfatnih soli (PBS pufer) s 1 % otopljenog natrijevog dodecil-sulfata (SDS).

Za pripremu 1 L PBS pufera potrebno je u 800 mL destilirane vode otopiti 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ i 245 mg KH₂PO₄. Otopina se nadopuni destiliranom vodom do 1 L.

U špricu se uzme volumen od 6,5 mL pripremljene otopine, na špricu se natakne igla te se ćelija puni kroz cjevčicu za uzorkovanje na prihvatnoj ćeliji. Punjenju prihvatne ćelije treba pridati posebnu pozornost jer se u ćeliji ne smiju nalaziti mjehurići nastali uslijed zaostajanja zraka. Dakle, ćelija se puni tako da otopina ne dođe do otvora između prihvatne ćelije i cjevčice kroz koju se puni ćelija. To se postiže laganim naginjanjem ćelije prilikom punjenja. Stoga, važno je prvo napuniti cijelu ćeliju, a tek onda cjevčicu kroz koju se uzima uzorak.



Slika 8. Fotografija pripremljene Franzove difuzijske ćelije.

Nakon punjenja, ćelija se položi u za to predviđeno mjesto u uređaju. Ostale ćelije pripreme se na isti način. U jednu prihvatnu ćeliju ulije se PBS pufer i takva se položi u jedno mjesto u uređaju. Ta otopina služi za dodavanje i nadomještanje uzetog volumena prilikom uzorkovanja. Uređaj s pripremljenim ćelijama se poklopi i pusti da se termostatira 30 min. Nakon termostatiranja, na membranu, tj. u donorsku ćeliju polaže se ispitivani dozirni oblik. Uključi se štoperica, što označava početak ispitivanja. Uzorak se uzima svakih 20 min.

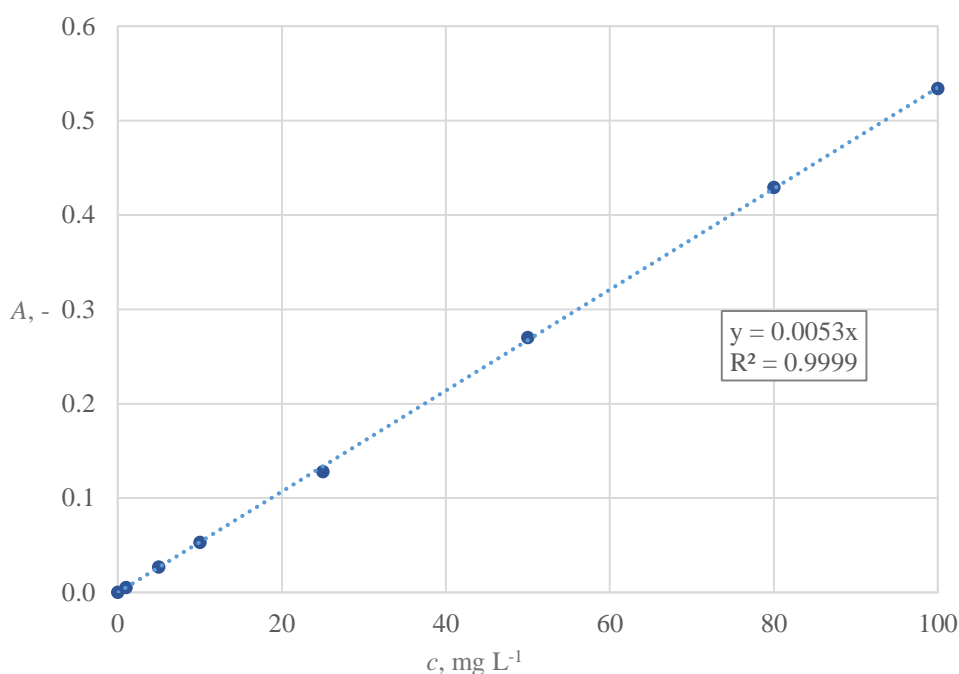
Iz ćelije se automatskom pipetom na koju je nataknut nastavak s cjevčicom uzima uzorak od 100 µL koji se ispusti u mikroeprevetu. U ćeliju iz koje je uzet volumen doda se 100 µL akceptorske otopine. Postupak je identičan za sve ćelije.

Nakon uzimanja uzorka iz svih ćelija, uređaj se poklopi te se za određeno vrijeme (20 min) ponovno uzorkuje. Uzorkovanje se provodi tijekom 6 h.

Provedena su dva paralelna *in vitro* ispitivanja. Dakle, ispitivano je oslobađanje djelatne tvari iz dva transdermalna pripravka (uzorak 1 i uzorak 2).

Koncentracija djelatne tvari u uzetim uzorcima određena je mjerenjem apsorbancije pomoću UV-Vis spektrofotometra (Shimadzu UV-1280) pri valnoj duljini od 256 nm. Pri analizi koristi se protočna kvarcna ćelija duljine 1 nm. Na temelju umjernog pravca i izmjerenih apsorbancija određene su koncentracije u uzetim uzorcima (slika 9.).

Rezultat ispitivanja je srednja vrijednost dviju koncentracija određenih za isti trenutak uzorkovanja.



Slika 9. Umjerni pravac za celekoksib u PBS puferu.

3.4. Obrada podataka

Profil oslobađanja djelatne tvari potrebno je opisati nekim kinetičkim modelom. Različiti modeli imaju različiti broj parametara, a modeli s većim brojem parametara mogu bolje opisati eksperimentalne podatke. Kako bi se kinetički modeli s različitim brojem parametara mogli uspoređivati, uvodi se prilagođeni koeficijent determinacije ($R^2_{\text{adj.}}$):

$$R^2_{\text{adj.}} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)} \cdot (1 - R^2) \quad (5)$$

gdje je n broj eksperimentalnih podataka, a p broj parametara modela.

Adekvatnost modela određuje se usporedbom vrijednosti $R^2_{\text{adj.}}$ za promatrane kinetičke modele. Što je iznos prilagođene vrijednosti koeficijenta determinacije bliže broju jedan, to model bolje opisuje dobivene eksperimentalne podatke.

Obrada podataka i ispitivanje kinetičkih modela provodi se u programu *DDSolver* koji je besplatni dodatak za *Microsoft Excel* program.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pomoću UV-Vis spektrofotometra dobivene su odgovarajuće vrijednosti apsorbancije, a na temelju prethodno pripremljenog umjernog pravca i koncentracije oslobođene djelatne tvari iz dozirnog oblika. Dobivene koncentracije potrebno je preračunati budući da se uzorak uzet iz ćelije razrjeđivao. Kako volumen uzetog uzorka iznosi 0,1 mL, a razrijeđen je 10 puta, stvarna koncentracija (c_{iR}) računa se prema izrazu:

$$c_{iR} = \frac{c_i V_2}{V_1} \quad (6)$$

gdje je c_i koncentracija dobivena na temelju izmjerene apsorbancije, V_2 je volumen razrijeđenog uzorka u iznosu od 1,1 mL, V_1 je volumen uzetog uzorka koji iznosi 0,1 mL.

U tablici 1. prikazane su vrijednosti apsorbancija dobivenih pomoću UV-Vis spektrofotometra te izračunate vrijednosti koncentracija za dva mjerenja označena kao uzorak 1 i uzorak 2.

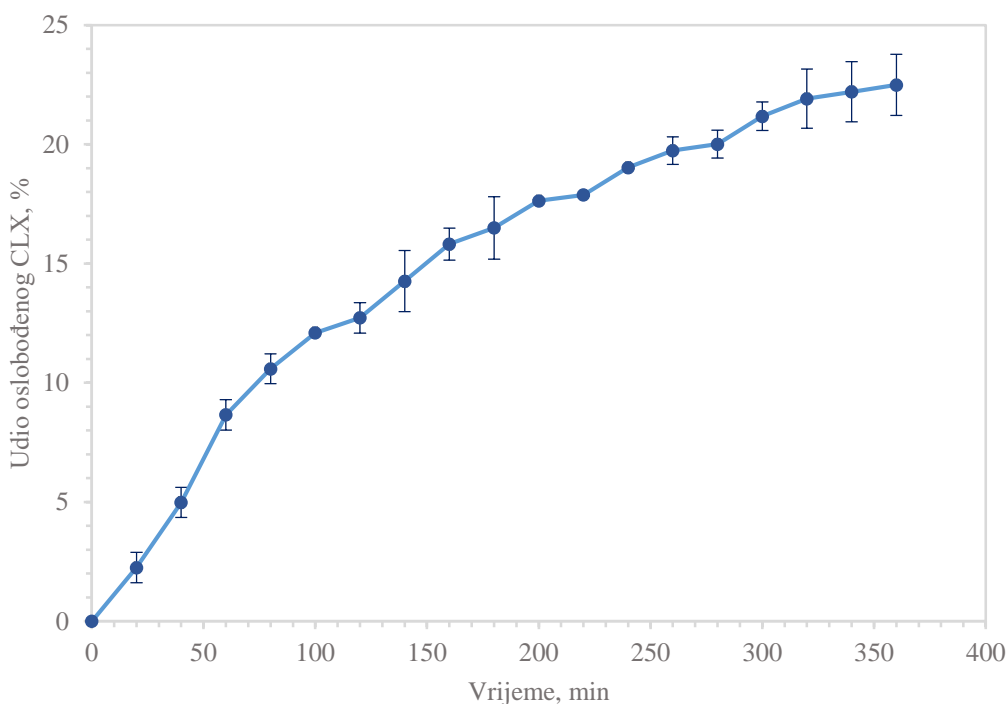
Tablica 1. Rezultati za uzorak 1 (A_1 , c_1) i uzorak 2 (A_2 i c_2) dobiveni analizom s UV-Vis spektrofotometrom te preračunate koncentracije za oba uzorka (c_{1R} i c_{2R}).

t/min	$A_1, -$	$A_2, -$	$c_1 / \text{mg L}^{-1}$	$c_2 / \text{mg L}^{-1}$	$c_{1R} / \text{mg L}^{-1}$	$c_{2R} / \text{mg L}^{-1}$
20	0,002	0,003	0,377	0,566	4,151	6,226
40	0,006	0,005	1,132	0,943	12,453	10,377
60	0,010	0,009	1,887	1,698	20,755	18,679
80	0,011	0,012	2,075	2,264	22,830	24,906
100	0,013	0,013	2,453	2,453	26,981	26,981
120	0,013	0,014	2,453	2,642	26,981	29,057
140	0,014	0,016	2,642	3,019	29,057	33,208
160	0,016	0,017	3,019	3,208	33,208	35,283
180	0,016	0,018	3,019	3,396	33,208	37,358
200	0,018	0,018	3,396	3,396	37,358	37,358
220	0,018	0,018	3,396	3,396	37,358	37,358
240	0,019	0,019	3,585	3,585	39,434	39,434
260	0,020	0,019	3,774	3,585	41,509	39,434
280	0,020	0,019	3,774	3,585	41,509	39,434
300	0,021	0,020	3,962	3,774	43,585	41,509
320	0,022	0,020	4,151	3,774	45,660	41,509
340	0,022	0,020	4,151	3,774	45,660	41,509
360	0,022	0,020	4,151	3,774	45,660	41,509

Tijekom ispitivanja uzima se 100 μL akceptorske otopine koja sadrži određenu količinu oslobođene djelatne tvari (CLX), no u prihvatnu ćeliju vraća se 100 μL čistog PBS pufera. Stoga je potrebno provesti korekciju volumena kako bi se izračunao točan udio oslobođene djelatne tvari. Proračun se provodi unutar *DDSolvera* u kojem se odabire opcija *Dissolution – With Volume Correction* te se unose volumeni uzetog uzorka i ukupni volumen pufera.

Udio oslobođene djelatne tvari pri tome se proračunava kao omjer količine oslobođene djelatne tvari u nekom vremenu i ukupne količine koju sadrži dozirni oblik, 1,5 mg.

Budući da se provode dva paralelna *in vitro* ispitivanja, za dva transdermalna pripravka (uzorak 1 i uzorak 2), računa se srednja vrijednost dvaju udjela oslobođene djelatne tvari. Također, određuju se vrijednosti standardne devijacije, tj. rasponi udjela oslobođene djelatne tvari dvaju mjerenja (slika 10.).

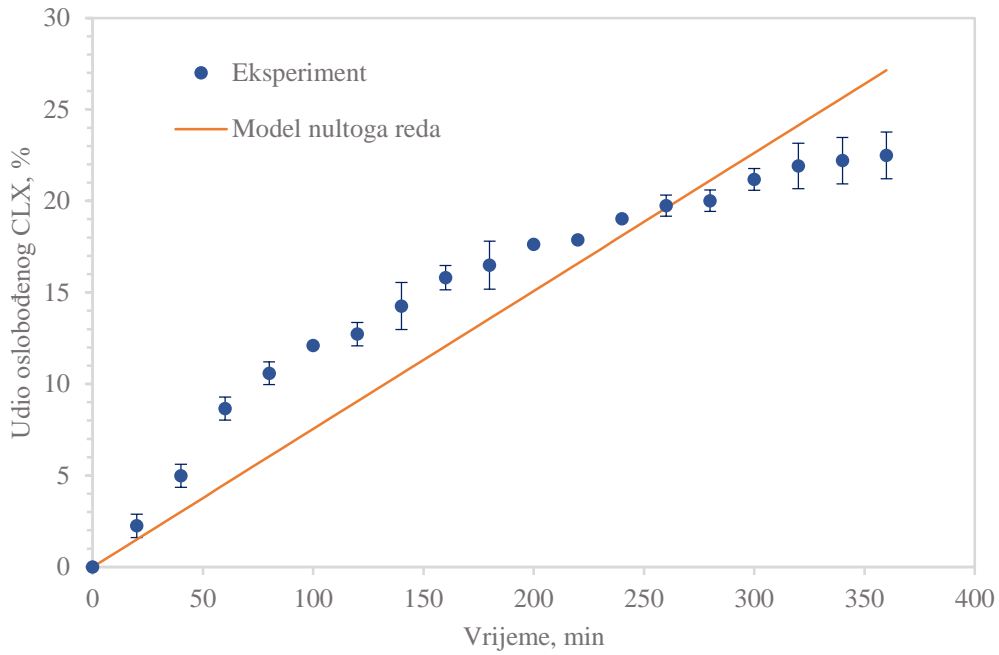


Slika 10. Grafički prikaz oslobađanja djelatne tvari u periodu od šest sati.

Iz dobivenih podataka uočava se porast udjela oslobođene djelatne tvari (CLX) s porastom vremena. Tijekom šest sati oslobodi se 22,49 % celekoksiba iz transdermalnog pripravka. Međutim, brzina rasta udjela oslobođenog celekoksiba smanjuje se s porastom vremena.

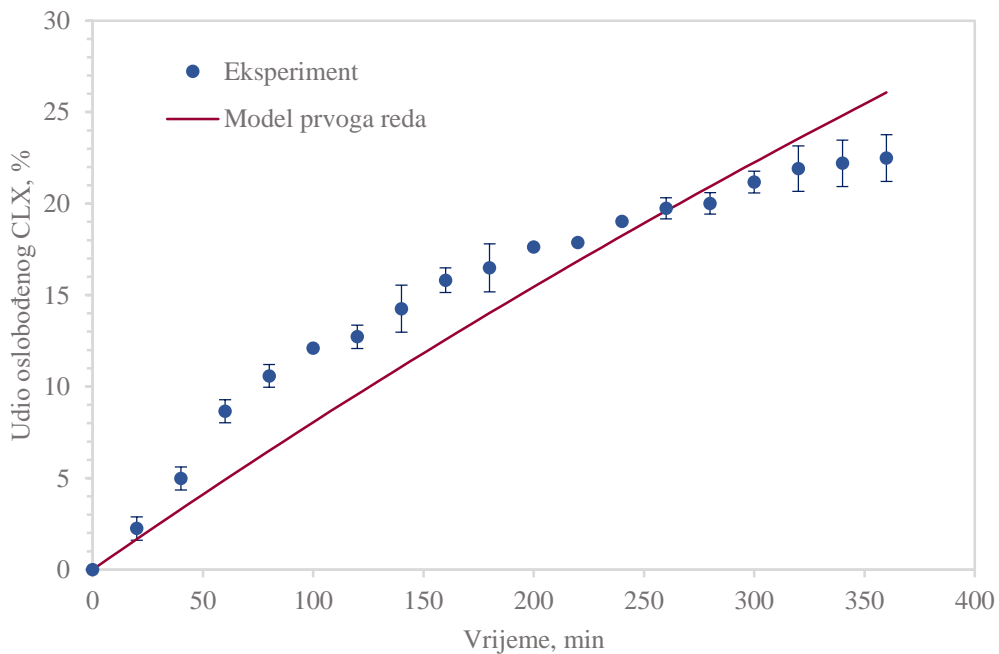
Kako bi se uočeni trend oslobađanja djelatne tvari iz dozirnog oblika opisao matematičkim izrazom, ispituju se kinetički modeli: model nultoga reda, model prvoga reda, Higuchijev model i Korsmejer-Peppasov model.

Grafički prikaz usporedbe eksperimentalnih podataka i modela nultoga reda dan je na slici 11. Eksperimentalne vrijednosti značajno odstupaju od modela pa se može zaključiti da model nultoga reda nije pogodan za opis oslobađanja celekoksiba.



Slika 11. Ispitivanje kinetičkog modela nultoga reda.

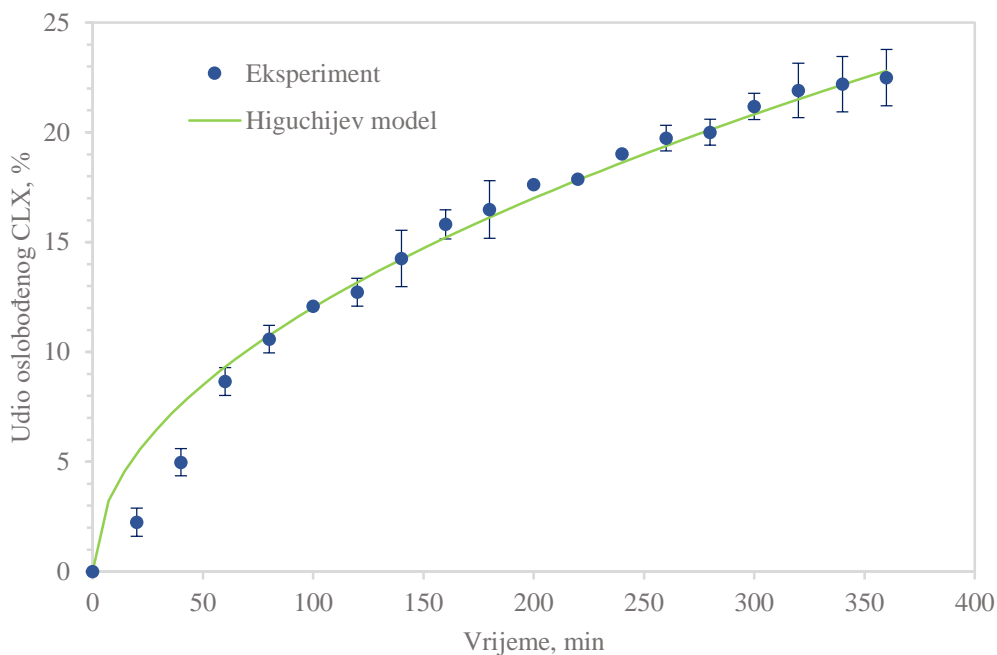
Na slici 12. prikazana je usporedba eksperimentalnih podataka i vrijednosti dobivenih modelom prvoga reda.



Slika 12. Ispitivanje kinetičkog modela prvoga reda.

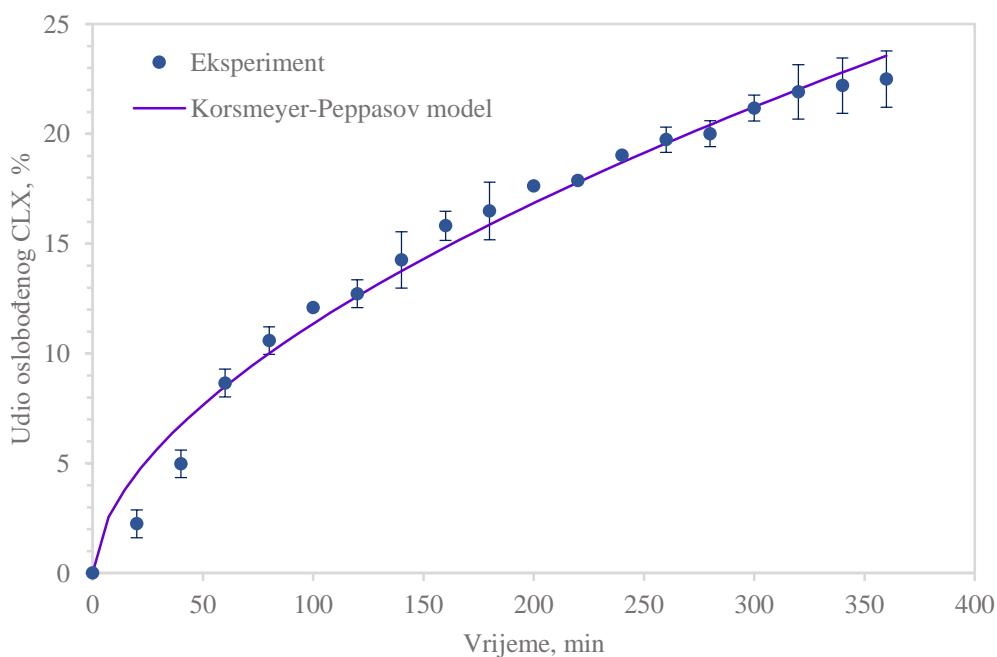
Kinetički model prvoga reda nešto bolje opisuje eksperimentalne podatke od modela nultoga reda, no odstupanje je i dalje veliko što potvrđuju i vrijednosti prilagođenog koeficijenta determinacije prikazane u tablici 2.

Higuchijev kinetički model pokazuje veće odstupanje od eksperimentalnih vrijednosti za uzorke uzete unutar 40 minuta. Ostale eksperimentalne vrijednosti udjela oslobođene djelatne tvari vrlo su bliske vrijednostima dobivenih pomoću Higuchijevog modela (slika 13.).



Slika 13. Ispitivanje Higuchijevog kinetičkog modela.

Na slici 14. prikazano je slaganje vrijednosti udjela oslobođenog celekoksiba dobivenih u provedenom *in vitro* ispitivanju i primjenom izraza za Korsmejer-Peppasov model (jedin. 4).



Slika 14. Ispitivanje Korsmejer-Peppasovog kinetičkog modela.

Korsmeyer-Peppasov kinetički model, kao i Higuchijev model, dobro opisuje eksperimentalne podatke. Budući da su u oba modela odstupanja eksperimentalnih vrijednosti udjela oslobođene djelatne tvari i onih prema modelu vrlo slične, potrebno je usporediti parametre svakog modela i prilagođene koeficijente determinacije ($R^2_{adj.}$). Pregled parametara i prilagođenih koeficijenata determinacije za svaki model prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Dobivene vrijednosti parametara i vrijednost $R^2_{adj.}$ za pojedini kinetički model.

MODEL	PARAMETRI MODELA		$R^2_{adj.}$
	k	n	
Nultoga reda	0,075	–	0,796
Prvoga reda	0,001	–	0,851
Higuchijev	1,202	0,500	0,971
Korsmeyer-Peppasov	0,841	0,570	0,978

Parametar k u tablici 2. predstavlja konstantu brzine oslobađanja djelatne tvari, a odgovara parametru k_0 u izrazu (1), parametru k_1 u izrazu (2), parametru k_H u izrazu (3) i parametru k_r u izrazu (4). Brzina oslobađanja celekoksiba u prvom je periodu (do 240 min) veća od one koju predviđaju modeli nultoga i prvoga reda. Prilagođeni koeficijent determinacije za Korsmeyer-Peppasov model najbliže je vrijednosti jedan pa je to model koji najbolje opisuje kinetiku oslobađanja djelatne tvari iz ispitivanog transdermalnog pripravka. Također, Salamanca i sur. [11] pokazali su da Korsmeyer-Peppasov kinetički model najbolje opisuje oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnog pripravka u obliku gela. U istraživanju je navedeno da bi takav način oslobađanja mogao biti povezan s brzim otapanjem pripravka unutar kojeg se nalazi djelatna tvar.

Vrijednost prilagođenog koeficijenta determinacije za Higuchijev model nešto je manja od Korsmeyer-Peppasova modela pa bi i njegova primjena bila opravdana.

Korsmeyer-Peppasov kinetički model najbolje opisuje ispitivano *in vitro* oslobađanje djelatne tvari iz transdermalnog pripravka. Vrijednost dobivenog parametra n iznosi 0,570 čime se svrstava u kategoriju vrijednosti između 0,5 i 1 ($0,5 < n < 1$). Prema tome se može procijeniti da je dominirajući mehanizam oslobađanja celekoksiba iz transdermalnog pripravka difuzija, ali ona koja odstupa od Fickova zakona, tzv. anormalna difuzija.

5. ZAKLJUČAK

In vitro ispitivanje transdermalnog pripravka provodi se u svrhu dobivanja profila oslobađanja djelatne tvari tijekom određenog vremena. Takvo ispitivanje najčešće se provodi primjenom Franzovih difuzijskih ćelija koje oponašaju živi organizam.

Ispitivani čvrsti transdermalni pripravak, koji se sastoji od 1,5 mg celekoksiba i polimera polietilen glikola, može osloboditi 22,49 % celekoksiba unutar šest sati. Oslobađanje celekoksiba iz takvog transdermalnog pripravka opisuje se Korsmeyer-Peppasovim kinetičkim modelom. Budući da se ispituje polimerni transdermalni oblik koji se lako otapa, to se moglo i očekivati jer Korsmeyer-Peppasov model objašnjava mehanizam dostavljanja lijeka upravo iz takvih transdermalnih oblika. Nadalje, prema eksponentu difuzije (n) koji iznosi 0,570, oslobađanje celekoksiba opisuje se difuzijskim mehanizmom koji ne slijedi Fickov zakon difuzije, tzv. anomalnom difuzijom.

Radi usporedbe ispitivanih kinetičkih modela izračunat je prilagođeni koeficijent determinacije. Najviša vrijednost dobivena je za Korsmeyer-Peppasov model, a najmanja za model nultoga reda. Eksperimentalni podaci ne slijede model nultoga i prvoga reda te se ne bi se trebali koristiti za opis oslobađanja celekoksiba iz transdermalnog pripravka. Koeficijent determinacije pokazao je da je Higuchijev model dobra alternativa Korsmeyer-Peppasovom modelu i također se može koristiti za opis oslobađanja celekoksiba iz ispitivanog transdermalnog pripravka.

6. LITERATURA

- [1] S. Zsikó, E. Csányi, A. Kovács, M. Budai-Szűcs, A. Gácsi, S. Berkó, Methods to evaluate skin penetration in vitro, *Sci. Pharm.* 87 (2019) 1-21.
- [2] M. Shabbir, S. Ali, I. Hamid, A. Sharif, M. Furqan Akhtar, M. Raza, S. Ahmed, S. Peerzada, M. Umair Amin, Influence of different formulation variables on the performance of transdermal drug delivery system containing tizanidine hydrochloride: in vitro and ex vivo evaluations, *Braz. J. Pharm. Sci.* 54 (2018) 1-12.
- [3] M. Betetto, J. Fettich, *Mala dermatovenerologija*, Založba Mladinska knjiga, 1974.
- [4] V. Duančić, *Osnovi histologije čovjeka*, Medicinska knjiga, 1962.
- [5] I. Zadro, Razvoj i odobravanje lijekova za dermalnu primjenu, specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
- [6] I. Zadro, Razvoj i odobravanje lijekova za dermalnu primjenu, specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
- [7] R. Sheshala, N. K. Anuar, N. H. A. Samah, T. W. Wong, In vitro dissolution/permeation testing of nanocarriers for skin application: A comprehensive review, *AAPS PharmSciTech* 20:164 (2019) 1-28.
- [8] M. Tokić, *Transdermalni flasteri*, diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
- [9] P. Rama Rao, S. Ramakrishna, P. V. Diwan, Drug release kinetics from polymeric films containing propranolol hydrochloride for transdermal use, *Pharm. Dev. Techn.* 5 (2000) 465-472.
- [10] Y. N. Kalia, R. H. Guy, Modeling transdermal drug release, *Adv. Drug Deliv. Reviews* 48 (2001) 159-172.
- [11] C. H. Salamanca, A. Barrera-Ocampo, J. C. Lasso, N. Camacho, C. J. Yarce, Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms, *Pharmaceutics* 10:148 (2018) 3-10.
- [12] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Celecoxib#section=2D-Structure> (pristup 26.5.2021.)

- [13] URL: <http://www.t3db.ca/toxins/T3D4771> (pristup 26.5.2021.)
- [14] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174> (pristup 21.6.2021.)
- [15] URL: <http://www.t3db.ca/toxins/T3D0772> (pristup 21.6.2021.)

7. PRILOZI

7.1. Glavni tehnički parametri uređaja

Tablica 3. Tehničke specifikacije uređaja

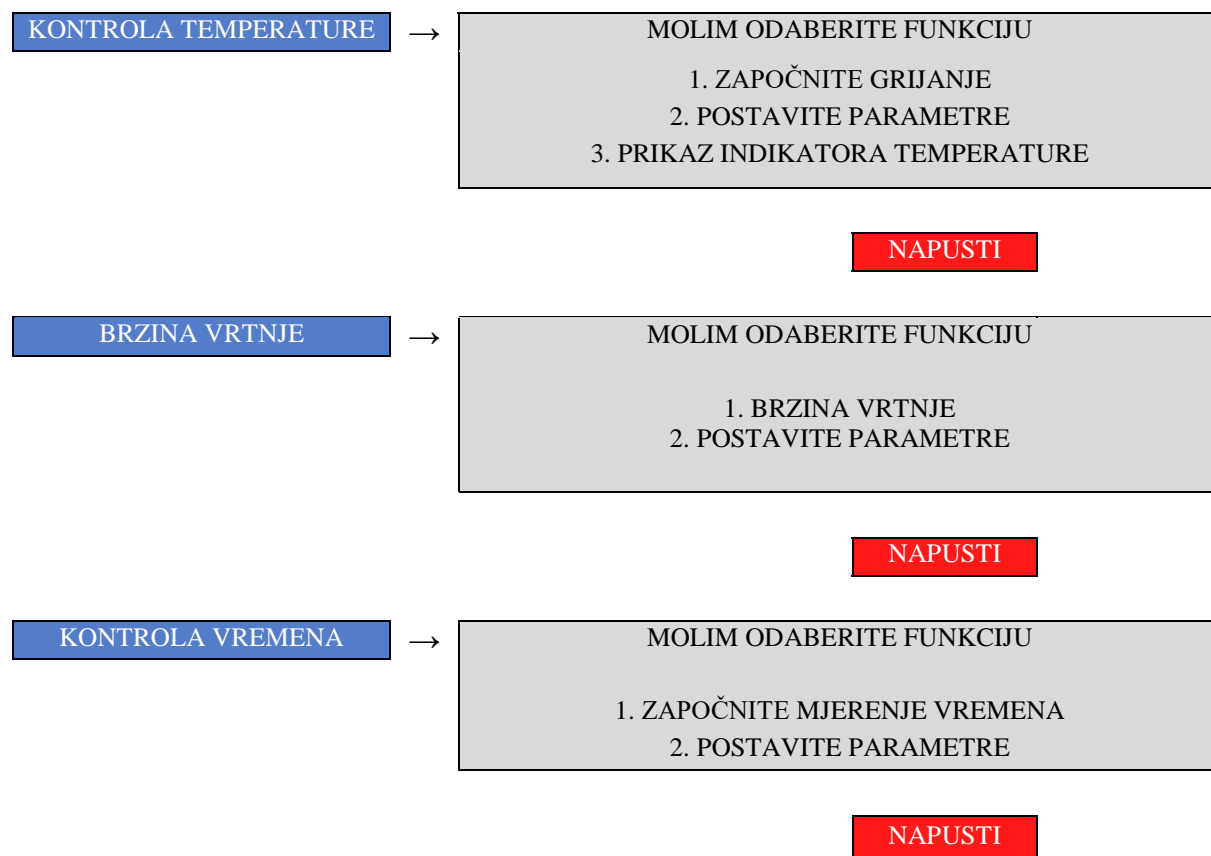
Broj difuzijskih ćelija	6
Površina transdermalne difuzije	2.2 cm ²
Volumen akceptorske ćelije	6.5 ± 0.1 mL
Interval kontrole temperature	sobna temperatura – 45 °C
Točnost kontrole temperature	≤ ± 0.3 °C
Interval brzine vrtnje	100 – 500 o/min
Pogreška stabilizacije brzine vrtnje	≤ ± 0.20 %
Snaga zagrijavanja	300 W
Izvor napajanja	220 V ± 10% 50 Hz
Kontinuirano vrijeme rada	više od 48 h
Vanjski uvjeti rada	temperatura: 5 °C ~ 30 °C relativna vlažnost: ≤ 80 %

7.2. Shematski prikaz početnog zaslona uređaja

ZASLON				
1	2	3	KONTROLA TEMPERATURE	
4	5	6	BRZINA VRTNJE	∧
7	8	9	KONTROLA VREMENA	∨
*	0	PROGRAMIRANJE NAPUSTI	POTVRDA	

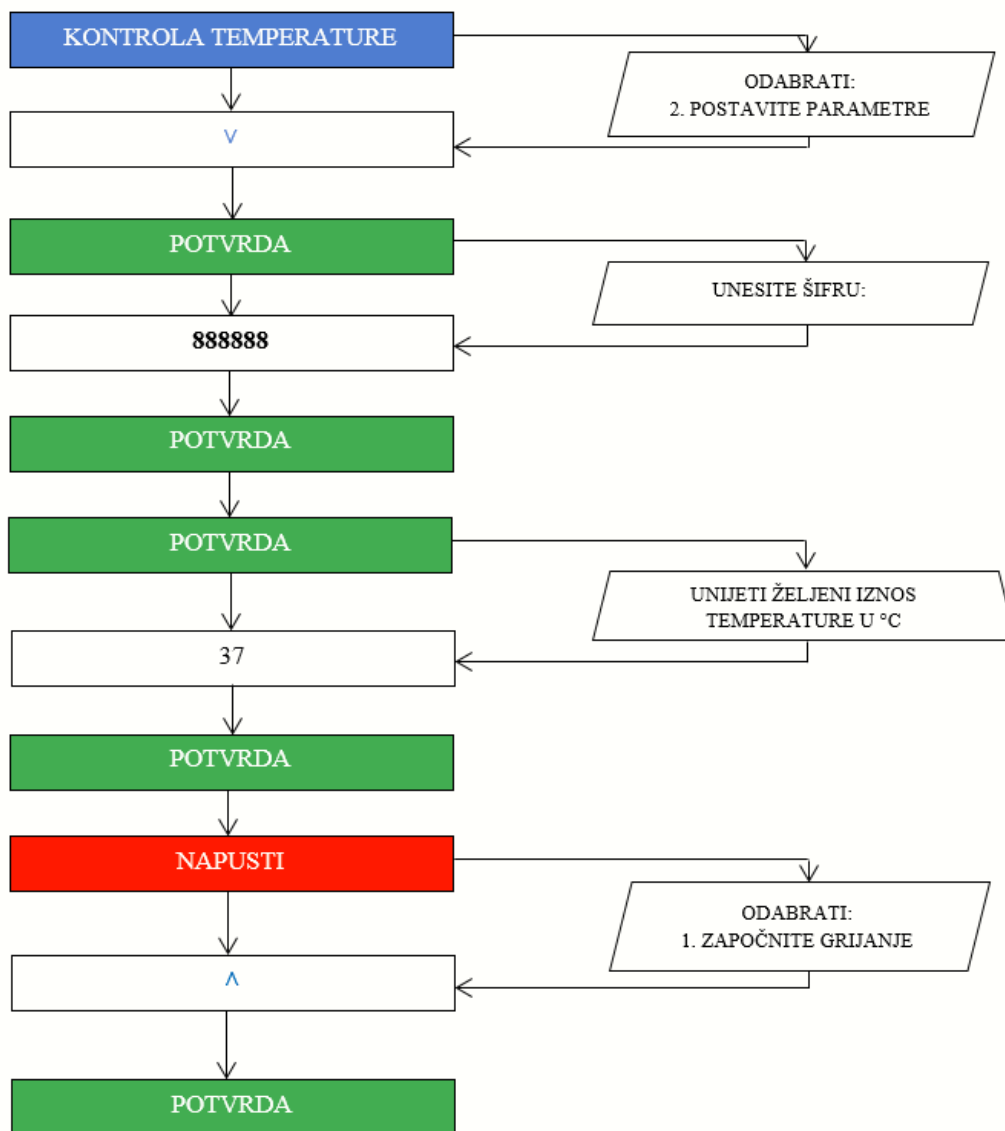
Slika 15. Sučelje testera za transdermalnu difuziju lijeka RYJ-68.

7.3. Shematski prikaz glavnog izbornika



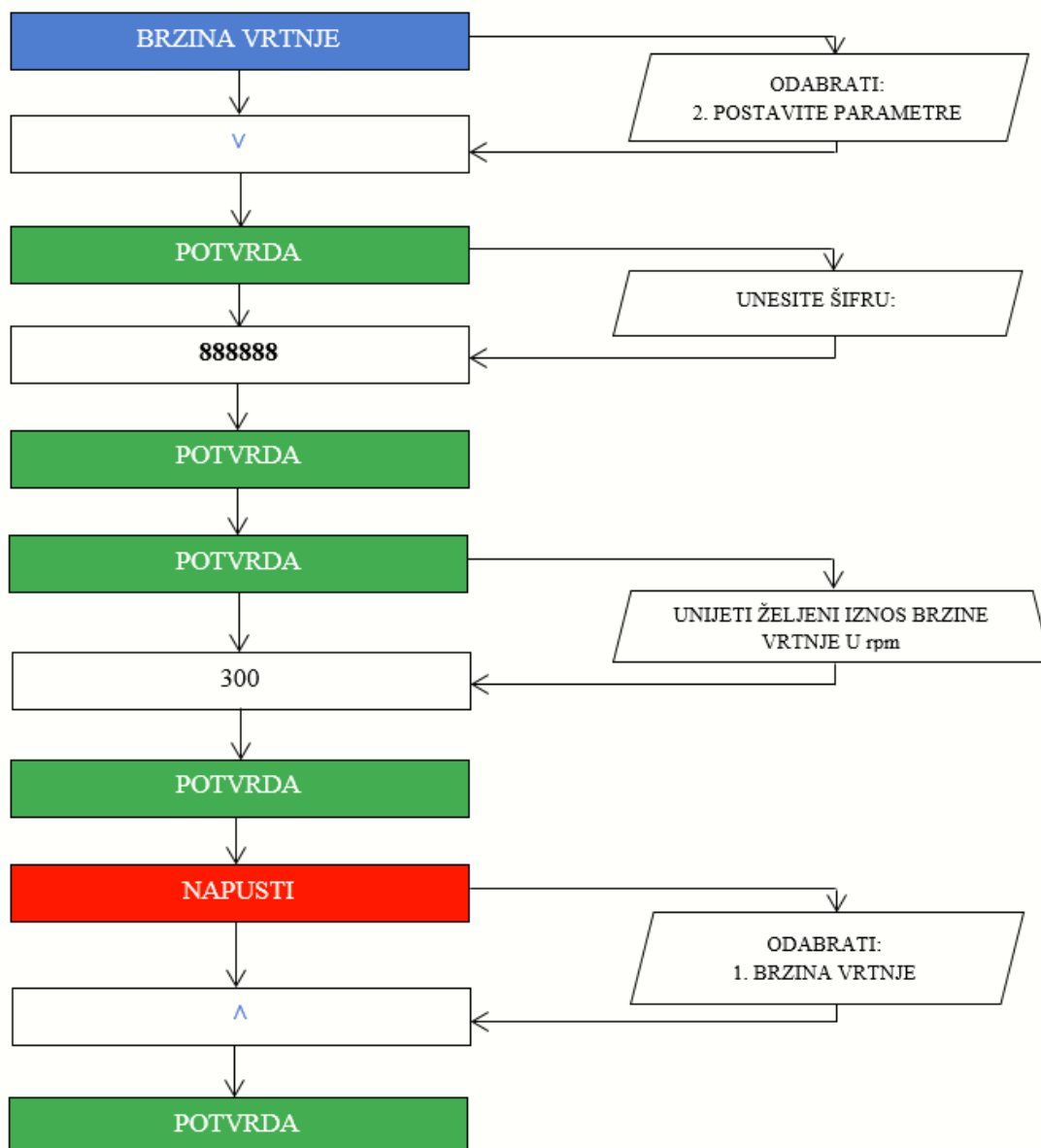
Slika 16. Prikaz zaslona nakon pritiskanja gumbiju: kontrola temperature, brzina vrtnje i kontrola vremena.

7.4. Shematski prikaz pokretanja grijanja na uređaju



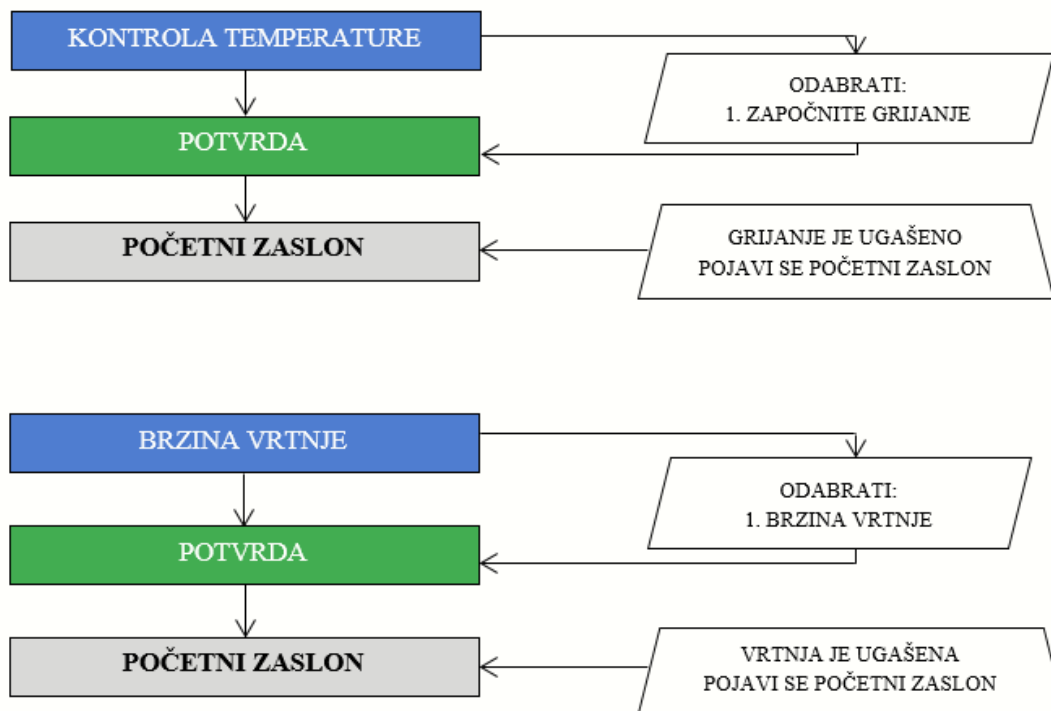
Slika 17. Postupak postavljanja radne temperature i pokretanja grijanja na uređaju.

7.5. Shematski prikaz pokretanja vrtnje u uređaju



Slika 18. Postupak postavljanja željene brzine vrtnje te pokretanje vrtnje.

7.6. Shematski prikaz gašenja uređaja



Slika 19. Postupak gašenja zagrijavanja i miješanja.