

Ispitivanje stabilnosti farmaceutskih dozirnih oblika

Drača, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:204053>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Drača

ISPITIVANJE STABILNOSTI FARMACEUTSKIH DOZIRNIH OBLIKA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva:
prof. dr. sc. Gordana Matijašić
prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum
prof. dr. sc. Juraj Šipušić

Zagreb, rujan 2020.

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

SAŽETAK

Stabilnost je važan faktor koji utječe na kvalitetu, djelotvornost i sigurnost lijeka te su upravo zato studije stabilnosti jedan od temeljnih koraka u istraživanju i razvoju farmaceutskih proizvoda. Ispitivanje stabilnosti provodi se u svim fazama razvoja lijeka, od ispitivanja stabilnosti djelatne tvari do ispitivanja utjecaja pakiranja na stabilnost gotove formulacije. Dugoročne studije ispitivanja stabilnosti provode se s ciljem utvrđivanja roka valjanosti koji je definiran kao vrijeme unutar kojeg proizvod posjeduje iste karakteristike kao i u vrijeme proizvodnje.

Svrha ovog rada je ispitati oslobađanje dronedaron-hidroklorida *in vitro* metodom iz različitih dozirnih oblika te ispitati stabilnost dozirnih oblika nakon tri mjeseca.

Korištenjem metoda neovisnih o modelu, opisani su profili oslobađanja djelatne tvari. Na temelju izračunatih vrijednosti faktora razlike i faktora sličnosti može zaključiti da svi ispitani farmaceutski dozirni oblici ostaju stabilni nakon tri mjeseca. Najveću podudarnost profila oslobađanja djelatne tvari prije i nakon ispitivanja stabilnosti pokazuju 3D-tiskane tablete.

Ključne riječi:

Studije stabilnosti, dozirni oblici, *in vitro* ispitivanje, faktor sličnosti, faktor razlike.

ABSTRACT

Stability studies for pharmaceutical dosage form

Stability is an important factor that is related with the quality, efficacy and safety of a drug product. Consequently, stability studies are one of the fundamental steps of pharmaceutical research and development. The stability studies are performed at various stages of drug development, from stability testing of active pharmaceutical ingredient to the influence of packaging materials on the stability of drug products. Long-term stability testing is performed to provide information about the shelf life of a drug product, which is defined as the time-lapse during which the drug product retains within the same characteristics that it possessed at the time of manufacture.

The purpose of this study is to investigate the release of dronedarone hydrochloride from different dosage forms by *in vitro* tests in order to verify the stability of pharmaceutical dosage forms after three months.

Drug release profiles are described by using model-independent method. According to calculated values of the difference factors and the similarity factors it can be concluded that all tested dosage forms remain stable during three months. Best compatibility of drug release profiles was observed for 3D-printed tablets.

Key words:

Stability studies, dosage forms, *in vitro* methods, difference factor, similarity factor.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Dozirni oblici.....	2
2.1.1. Vrste dozirnih oblika	2
2.1.2. Oralni dozirni oblici	2
2.2. Stabilnost dozirnih oblika.....	3
2.2.1. Metode ispitivanja stabilnosti dozirnih oblika.....	4
2.2.2. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja prema Europskoj farmakopeji	5
2.3. Matematički modeli za opis i uspoređivanje profila oslobađanja	6
2.3.1. Statističke metode.....	6
2.3.2. Metode ovisne o modelima	6
2.3.3. Metode neovisne o modelima.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Dozirni oblici.....	11
3.1.1. 3D-tiskane kapsule	12
3.1.2. 3D-tiskane tablete.....	13
3.1.3. Pelete	14
3.1.4. Mikrokapsule.....	15
3.2. Ispitivanje oslobađanja <i>in vitro</i>	16
3.2.1. Umjerni pravac	16
3.2.2. Ispitivanje oslobađanja <i>in vitro</i>	16
3.2.3. UV/Vis spektrofotometrija	18
3.3. Obrada podataka	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA.....	26

1. UVOD

Stabilnost se definira kao sposobnost djelatne tvari ili gotovog proizvoda da zadrži svoj identitet, snagu, kvalitetu i čistoću do kraja roka valjanosti te da ostane unutar određenih specifikacijskih granica. Studije ispitivanja stabilnosti nužan su korak u formulaciji novih farmaceutskih proizvoda kao i u osiguranju kvalitete već postojećih. Ispitivanjem stabilnosti omogućeno je razumijevanje interakcija djelatne tvari s pomoćnim tvarima te utjecaj proizvodnog procesa i vrste pakiranja na životni vijek konačne formulacije. Podaci dobiveni ispitivanjem stabilnosti pomažu znanstvenicima u donošenju odluka pri formulaciji novih farmaceutskih oblika.

Smjernice za studije ispitivanja stabilnosti gotovih proizvoda izdaju razne regulatorne agencije, kao što su ICH (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), FDA (engl. *Food and Drug Administration*) i dr., a cilj im je osigurati djelotvornost gotovog proizvoda do utvrđenog roka valjanosti.

Nekada se smatralo da je za razvitak novog farmaceutskog proizvoda ključno sintetizirati novu djelatnu tvar, a danas je sve više naglasak na otkrivanju novih dozirnih oblika i spremišnih sustava u kojima je pohranjena farmakološki aktivna tvar.

Farmaceutski dozirni oblici mogu biti pripremljeni raznim tehnikama te korištenjem različitih pomoćnih tvari. Time je omogućen velik broj međusobnih interakcija između djelatnih i pomoćnih tvari te se razgradnja gotovog proizvoda ne može unaprijed predvidjeti. Upravo zato se mora ispitati stabilnost za svaki pojedini farmaceutski oblik.

Cilj ovog rada je ispitati stabilnost različitih farmaceutskih dozirnih oblika (3D-tiskane kapsule, 3D-tiskane tablete, pelete i mikrokapsule) nakon tri mjeseca skladištenja. Navedeni dozirni oblici sadrže istu djelatnu tvar, dronedaron-hidroklorid, ali se zbog različitih tehnika pripreme gotovog proizvoda očekuju različiti profili oslobađanja te različita ocjena stabilnosti nakon tri mjeseca.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Dozirni oblici

2.1.1. Vrste dozirnih oblika

Lijek je svaka tvar ili kombinacija tvari koja se može primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za postavljanje medicinske dijagnoze [1]. Ljekoviti se oblik sastoji od djelatne tvari koja je nositelj terapijskog djelovanja te pomoćnih tvari koje pomažu pri farmaceutskom oblikovanju gotovog lijeka te štiti, podupire ili poboljšava stabilnost, biološku raspoloživost i podnošljivost lijeka.

Djelatna se tvar može unijeti u organizam na razne načine što ovisi o vrsti i mjestu oboljenja, potrebnom terapijskom učinku te općem stanju pacijenta. S obzirom na put dostave lijeka, farmaceutske dozirne oblike možemo podijeliti na:

1. Parenteralne dozirne oblike – parenteralnom primjenom lijeka zaobilazi se probavni sustav, omogućuje se primjena točne i precizne doze lijeka jer doza ne ovisi o apsorpciji iz gastrointestinalnog trakta. Primjeri parenteralnih dozirnih oblika su injekcijske otopine i suspenzije, infuzijske otopine itd.
2. Nazalni dozirni oblici – primjenjuju se kroz nos.
3. Oralni dozirni oblici – čvrsti dozirni oblici koji se primjenjuju enteralno npr. tablete, kapsule, pastile itd.
4. Dozirni oblici za inhalaciju – prodiru u respiratorni sustav, a u organizam se mogu unijeti kroz nos ili usta.
5. Transdermalni dozirni oblici – unose se u organizam kroz kožu, a primjeri takvih dozirnih oblika su kreme, masti, losioni, gelovi i slično.
6. Oftamološki dozirni oblici – primjenjuju se kroz oko. [2]

2.1.2. Oralni dozirni oblici

Oralnim dozirnim oblicima se djelatna tvar dostavlja u organizam u čvrstom obliku i primjenjuju se enteralno. Oralni put primjene lijeka je danas najbolje prihvaćeni način aplikacije lijeka, jer predstavlja najmanje invazivan način dostave kojeg pacijent prihvaća i može sam koristiti.

Čvrsti oralni dozirni oblici se mogu podijeliti na:

- Tablete

- Kapsule
- Pastile
- Granule

Tablete su čvrsti pripravci od kojih svaki sadrži dozu jednu ili više djelatnih tvari, a pripravlja se raznim proizvodnim tehnikama kao što su komprimiranje, ekstrudiranje, kalupljenje ili liofiliziranje te mogu biti proizvedene u različitim veličinama i oblicima. Također, tablete mogu biti obložene i neobložene. Oblaganje se provodi radi zaštite sastojaka od zraka, vlage ili svjetla, radi zaštite djelatne tvari od želučanih kiselina ili kontrole oslobađanja djelatne tvari u gastrointestinalnom traktu te u svrhu prekrivanja neugodnih okusa ili mirisa.

Kapsule su prema hrvatskoj farmakopeji čvrsti pripravci s tvrdim ili mekanim kapicama različitih oblika i volumena, a čiji sadržaj može biti čvrst ili tekući. Sadržaj kapsule ne uzrokuje uništavanje kapice kapsule, već se ona razgrađuje u prisutnosti probavnih sokova te se pritom oslobađa djelatna tvar.

Pastile su čvrsti ili polučvrsti pripravci namijenjeni za primjenu u usnoj šupljini ili grlu radi postizanja lokalnog ili sustavnog učinka.

Granule su pripravci koji se sastoje od čvrstih, suhih nakupina praškastih čestica koje se mogu nepromijenjene žvakati i gutati ili se rasprše u vodi ili drugoj prikladnoj tekućini prije primjene.

[3]

Nadalje, oralni dozirni oblici se prema karakteristikama oslobađanja djelatne tvari mogu podijeliti na oblike s trenutnim oslobađanjem te na oblike s modificiranim oslobađanjem. Trenutnim oslobađanjem se djelatna tvar oslobađa ubrzo nakon primjene, dok oblici s modificiranim oslobađanjem omogućuju produljeno ili odgođeno otpuštanje djelatne tvari. U svrhu modificiranog profila oslobađanja lijeka razvijaju se razni spremišni sustavi za koje je karakteristično postojanje ovojnice koja potpuno okružuje djelatnu tvar te na taj način utječe na profil oslobađanja djelatne tvari. Primjeri takvih sustava su mikrokapsule i pelete. [4]

2.2. Stabilnost dozirnih oblika

Stabilnost je važan faktor koji direktno utječe na kvalitetu, sigurnost i djelotvornost lijeka. Stabilnost se definira kao sposobnost djelatne tvari ili gotovog proizvoda da zadrži svoj identitet, snagu, kvalitetu i čistoću do kraja roka valjanosti te da ostane unutar određenih specifikacijskih granica. [5] Ispitivanje stabilnosti se provodi u svim fazama razvoja farmaceutskog proizvoda, a omogućava razumijevanje utjecaja okolišnih uvjeta na gotovi

proizvod. Također, na stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda, osim okolišnih uvjeta utječe i stabilnost same djelatne tvari, potencijalne interakcije između djelatnih i pomoćnih tvari, farmaceutski dozirni oblik, proizvodni postupak, interakcije između gotovog proizvoda i spremnika u kojem se nalazi itd. Nestabilnost dozirnih oblika najčešće rezultira promjenama u izgledu, tvrdoći, sadržaju djelatne tvari i razgradnih produkata, brzini oslobađanja djelatne tvari, a može dovesti i do stvaranja novih spojeva s potencijalnim toksičnim djelovanjem.

2.2.1. Metode ispitivanja stabilnosti dozirnih oblika

Metode ispitivanja stabilnosti dozirnih oblika se prema namjeni ispitivanja mogu podijeliti na:

- Dugoročne studije ispitivanja stabilnosti (engl. *Real-Time stability testing*)
Dugoročne studije ispitivanja stabilnosti trebaju se izvoditi dovoljno dugo vremena kako bi se pokazalo da nema mjerljivih produkata degradacije u preporučenim uvjetima skladištenja. Okolišni uvjeti provođenja ispitivanja odabiru se prema klimatskim uvjetima tržišta za koje je proizvod namijenjen.
- Ubrzane studije ispitivanja stabilnosti (engl. *Accelerated stability testing*)
U studijama ubrzanog ispitivanja dozirni se oblik izlaže pretjeranim uvjetima skladištenja (npr. povišena temperatura), a rezultati takvih ispitivanja nisu uvijek indikatori fizikalnih promjena. Ova metoda ispitivanja stabilnosti se koristi u slučajevima uvođenja novih proizvoda na tržište kada nije moguće čekati podatke o stabilnosti pri sobnoj temperaturi.
- Studije ispitivanja zadržanih uzoraka (engl. *Retained sample stability testing*)

Ispitivanje ljekovitih oblika može se provoditi *in vitro* (izvan živog organizma u umjetno stvorenim uvjetima) ili *in vivo* (u živom organizmu). *In vitro* ispitivanja pokazuju određena svojstva ljekovitih oblika, ali ne daju pouzdane informacije o oslobađanju u živom organizmu. Metode *in vitro* oslobađanja koriste se za potrebe usporedbe brzine i mehanizma oslobađanja za vrijeme farmaceutskog razvoja, promjene mjesta proizvodnje i procesne opreme te za proporcionalno povećanje serija s laboratorijskog na industrijsko mjerilo proizvodnje. Profil oslobađanja djelatne tvari metodom *in vivo* primjenjuje se mjerenjem koncentracije djelatne tvari u plazmi ili krvi. *In vitro* metoda ispitivanja oslobađanja ima određene prednosti radi kraćeg trajanja, jednostavnosti i ekonomičnosti, ali ona nije zamjena za *in vivo* procjenu

bioekvivalentnosti i biološke raspoloživosti, već služi kako bi se dobiveni podaci mogli evaluirati za moguću *in vitro*–*in vivo* korelaciju. [4-6]

2.2.2. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja prema Europskoj farmakopeji

In vitro metoda oslobađanja se može provoditi na više načina, a glavna obilježja svih tehnika su:

- Primjena medija za ispitivanje prikladnog sastava i volumena.
- Provođenje pokusa u određenom vremenskom intervalu pri konstantnoj temperaturi.
- Različito pokretanje pripravaka te geometrijski oblik posude za ispitivanje.
- Kontinuirano ili diskontinuirano određivanje sadržaja lijeka.

Razvoj *in vitro* metode oslobađanja uključuje odabir adekvatne aparature, sastava medija, protoka, temperature, vremena uzorkovanja i trajanja testa itd., a potrebno je težiti da se tako razvijena metoda što je moguće više približi *in vivo* oslobađanju i apsorpciji lijeka.

Europska farmakopeja čini skup stručnih tekstova koji utvrđuju kakvoću lijeka, zahtjeve izradbe i postupke za provjeru kakvoće lijekova i medicinskih proizvoda na europskom tržištu te je kao takva izdala smjernice za razvoj *in vitro* metoda oslobađanja.

- Primjena medija za ispitivanje – izbor medija za ispitivanje ponajviše ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka, mora biti što sličnija fiziološkoj tekućini, mora imati određenu pH-vrijednost koja ima utjecaj na brzinu oslobađanja, volumen medija mora biti toliki da se postignu uvjeti osigurane topljivosti djelatne tvari te mora biti prikladan za jednostavno i precizno određivanje sastava.
- Vremenski interval i temperatura provođenja ispitivanja – vremenski interval provođenja *in vitro* oslobađanja ovisi o namjeni pripravka pa sukladno tome ispitivanje oblika s trenutnim oslobađanjem traje najkraće, a ispitivanje oblika s produženim oslobađanjem duže; temperatura se najčešće podešava na 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) što čini prosječnu tjelesnu temperaturu
- Pokretanje pripravaka i geometrijski oblik posude – ovisno o konstrukciji aparature, miješanje može biti vertikalno, rotacijsko i vibracijsko, a mora biti takvo da se osigura jednolika koncentracija oslobođene djelatne tvari u svakom dijelu volumena medija.

Aparature se mogu podijeliti u tri skupine:

- Aparature s jednim odjeljkom

- Protočne aparature
- Aparature s dva odjeljka
- Kontinuirano/diskontinuirano određivanje sadržaja – sadržaj djelatne tvari može se određivati kontinuirano ili diskontinuirano direktno u mediju za ispitivanje ili u preostalom čvrstom pripravku. [4,7]

2.3. Matematički modeli za opis i uspoređivanje profila oslobađanja

Matematičko modeliranje se široko primjenjuje u različitim disciplinama kao što su genetika, medicina, psihologija, ekonomija, biologija, inženjerstvo itd. Cilj matematičkog modeliranja je prikazati realne procese odgovarajućim matematičkim modelom. Razumijevanje svih fenomena koji utječu na kinetiku oslobađanja djelatne tvari te upotrebom matematičkog modeliranja bit ćemo u stanju predvidjeti kinetiku oslobađanja prije stvarnog ostvarivanja oslobađanja tvari. Korištenjem matematičkih modela za opis profila oslobađanja mogu se usporediti profili oslobađanja nakon određenog roka valjanosti te na taj način odrediti stabilnost dozirnih oblika.

2.3.1. Statističke metode

- **Metoda analize podataka** – metoda kojom se na grafički i numerički način uspoređuju profili oslobađanja.
- **Raznoliki pristup** – metoda u kojoj se mjerenja ponavljaju, vrijeme predstavlja ponavljajuću varijablu, a udio oslobođene tvari zavisnu varijablu.
- **Ponovljena mjerenja.**

2.3.2. Metode ovisne o modelima

- **Model nultog reda**

Model nultog reda opisuje oslobađanje djelatnih tvari iz dozirnih oblika kod kojih je oslobađanje sporo. Primjer takvog oslobađanja tvari je idealno oslobađanje pri čemu bi se koncentracija lijeka u krvi održavala konstantnom. Model se može prikazati jednačinom:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (1)$$

gdje je Q_0 početna doza lijeka u otopini (u većini slučajeva je $Q_0=0$ na početku otapanja), Q_t predstavlja količinu lijeka otpuštenu u vremenu t , K_0 je konstanta brzine otpuštanja koja se izražava u jedinicama koncentracija/vrijeme. Dozirni oblici čiji profili oslobađanja odgovaraju kinetici nultog reda oslobađaju konstantnu djelatne tvari po jedinici vremena.

- **Model prvog reda**

Model prvog reda primjenjuje se u opisu apsorpcije i/ili eliminacije nekih lijekova, a prikazuje se jednadžbom:

$$\frac{dc}{dt} = Kc \quad (2)$$

A može se napisati i u linearnom obliku kao:

$$\ln c = \ln c_0 - Kt \quad (3)$$

gdje c_0 predstavlja početnu koncentraciju djelatne tvari, t vrijeme, a K predstavlja konstantu brzine oslobađanja prvog reda koja je izražena u jedinici vremena.

- **Higuchijev model**

Higuchijev model temelji se na sljedećim pretpostavkama:

- 1) Početna koncentracija lijeka u matrici je puno veća od topljivosti lijeka.
- 2) Difuzija tvari je jednodimenzionalna.
- 3) Difuzivnost lijeka je konstantna.
- 4) Čestice lijeka su puno manje od debljine dozirnog oblika.
- 5) Bubrenje i topljenje matrice je zanemarivo.

Model se može prikazati jednadžbom:

$$f_t = Q = A\sqrt{D(2c - c_s)c_s t} \quad (4)$$

gdje je Q količina lijeka oslobođena u vremenu t po jedinici površine A , c je početna koncentracija lijeka, c_s predstavlja topljivost lijeka u matričnom mediju a D

koeficijent difuzije molekule lijeka u matricnom sadržaju. Model se može pojednostavljeno izraziti kao:

$$f_t = Q = K_H \sqrt{t} \quad (5)$$

gdje K_H predstavlja Higuchijevu konstantu otapanja.

- **Hixon – Crowellov model**

Hixon i Crowell su na temelju činjenice da je redovna površina čestice proporcionalna trećem korijenu volumena te čestice izveli model koji se može prikazati:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = \kappa t \quad (6)$$

gdje W_0 predstavlja početnu količinu lijeka u dozirnog obliku, W_t preostalu količinu lijeka u vremenu t , a κ konstantu ugradnje površno-volumnog odnosa.

Jednadžba opisuje oslobađanja iz sustava gdje postoji promjena površine i promjera čestice ili tableta.

- **Korsmeyer- Peppasov model**

Korsmeyer- Peppasov model opisuje oslobađanje lijeka iz polimernog sustava prema jednadžbi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (7)$$

gdje omjer $\frac{M_t}{M_\infty}$ predstavlja dio oslobođenog lijeka u vremenu t , K predstavlja konstantu brzine oslobađanja, a n eksponent koji se koristi u karakterizaciji različitih vrsta oslobađanja za cilindrične oblike matrica.

- **Hopfenbergov model**

Hopfenbergov model opisuje oslobađanje lijeka s površinski erodiranim polimerima sve dok površina ostaje konstantna tijekom postupka degradacije. Model se može izraziti jednadžbom:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_L a} \right]^n \quad (8)$$

gdje C_L predstavlja početnu količinu lijeka u sustavu, k_0 predstavlja konstantu brzine nultog reda za proces površinske erozije, a predstavlja polovicu debljine sustava, a n eksponent ovisan o geometriji ($n = 1$ za ravnu ploču, $n = 2$ cilindričan oblik, $n = 3$ sferičan oblik).

2.3.3. Metode neovisne o modelima

Metode neovisne o modelima se ne zasnivaju na kinetičkim modelima, već se profili oslobađanja uspoređuju korištenjem dva statistička faktora; faktora razlike (f_1) i faktora sličnosti (f_2). Faktor razlike izračunava razliku u postotku između dviju krivulja u svakoj vremenskoj točki te je mjera relativne greške između dviju krivulja. Faktori se izražavaju sljedećim izrazima:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} * 100 \quad (9)$$

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n |R_t - T_t|^2 \right]^{-0,5} * 100 \right\} \quad (10)$$

gdje je n broj vremenskih točaka, R je udio oslobođene tvari referentne serije u vremenu t , a T_t je udio oslobođene tvari ispitivane serije T u vremenu t .

Kako bi se dva profila smatrala sličnima, faktor f_1 treba biti manji ili jednak 15 (0-15), a f_2 veći ili jednak 50 (50-100).

Odabir modela provodi se na temelju R^2 vrijednosti. Kada se uspoređuju modeli koji ne sadrže jednak broj parametara uobičajeno je koristiti prilagođenu vrijednost R^2 koja se izračunava iz izraza:

$$R_p^2 = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)} (1 - R^2) \quad (11)$$

gdje je p broj parametara modela, a n broj eksperimentalnih podataka. [8, 9]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Tijek eksperimentalnog dijela prikazan je shematski na slici 1. Dozirni oblici pripremljeni su u okviru doktorskih, diplomskih i završnih radova kako je navedeno dalje u tekstu. Takvi dozirni oblici uskladišteni su u kontroliranim uvjetima tri mjeseca. Po isteku tri mjeseca provedena su ispitivanja *in vitro* te su dobiveni profili oslobađanja (oznake 3M) uspoređeni s onima dobivenim prije skladištenja (oznake 0M), a prikazanim u spomenutim radovima. Sličnost profila izražena je kvantitativno pomoću faktora sličnosti i faktora razlike. Podaci su obrađeni u besplatnom dodatku za Microsoft Excel, DDSolver.



Slika 1. Shematski prikaz eksperimentalnog postupka

3.1. Dozirni oblici

Ispitana je stabilnost sljedećih farmaceutskih dozirnih oblika:

- 3D-tiskane kapsule
- 3D-tiskane tablete
- Pelete
- Mikrokapsule

Navedeni dozirni oblici sadrže istu djelatnu tvar, dronedaron-hidroklorid (DNR), koja je namijenjena reguliranju srčane aritmije. Dozirni oblici su pripremljeni različitim tehnikama, a gotovi proizvodi su zatim skladišteni tri mjeseca u primarnom ambalažnom obliku (staklenim bočicama) kao što je prikazano slikom 2. Za vrijeme skladištenja dozirnih oblika dnevno su bilježene vrijednosti temperature i vlažnosti zraka.



Slika 2. Dozirni oblici u primarnoj ambalaži

3.1.1. 3D-tiskane kapsule

3D-tiskane kapsule su izrađene u okviru doktorske disertacije Matije Gretića, mag. ing. cheming. Za izradu je korišten 3D-printer FlashForge Inventor. Kapsule su izrađene od poli(vinil-alkohola), komercijalnog filameta proizvođača Formfutura BV, a printane su pri 185 °C. Izrađene kapsule imaju različite debljine stijenki kojima se regulira vrijeme oslobađanja DNR. Ispitivanje stabilnosti provedeno je za kapsule čije su debljine stijenki 0,75 mm i 1 mm (3M), a podaci su uspoređeni s prethodno dobivenim podacima u okviru doktorske disertacije Matije Gretića, mag. ing. cheming. (0M). U tablici 1 prikazane su vrijednosti masa DNR kojim su punjene kapsule, a na slici 3 prikazana je napunjena 3D-tiskana kapsula.

Tablica 1. Vrijednosti masa DNR u 3D-tiskanim kapsulama (3M)

	0,75 mm	1 mm
m_1 , mg	197,1	196,8
m_2 , mg	199,2	195,7
m_3 , mg	198,7	199,6



Slika 3. 3D-tiskana kapsula

3.1.2. 3D-tiskane tablete

3D-tiskane tablete (slika 4) izrađene su od pripremljenih filamenata koji sadrže poli(vinil-alkohol), poli(etilen-glikol) i dronedaron-hidroklorid. Filamenti su pripremljeni korištenjem ekstrudera Noztek Pro, promjera dize 1,75 mm, pri temperaturi 170 °C uz broj okretaja puža 60 o/min. Za tisak je korišten 3D-printer FlashForge Inventor. Temperatura tiska je 185 °C. Izrađene su tablete različitih gustoća ispune, a stabilnost je ispitana za tablete čija je ispuna 25 % i 100 % (3M). Rezultati za 3D-tiskane tablete (0M) preuzeti su iz diplomskog rada studentice Kristine Kezerić. [10] U tablici 2 prikazane su vrijednosti masa ispitanih tableta kao i sadržaj DNR u svakoj tableti.

Tablica 2. Vrijednosti masa pripremljenih 3D-tiskanih tableta i sadržaj DNR (3M)

	TP 25%		TP 100%	
	tableta	DNR	tableta	DNR
m_1 , mg	602	58,57	968	102,50
m_2 , mg	606	60,71	972	97,50
m_3 , mg	636	63,21	947	94,64



Slika 4. 3D-tiskane tablete: ispuna a) 25 % i b) 100 %

3.1.3. Pelete

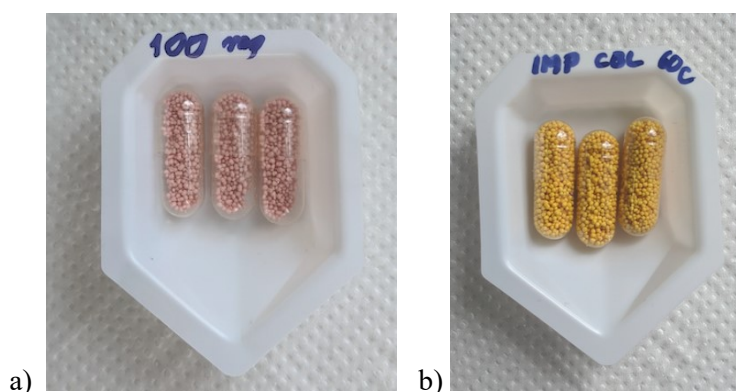
Pelete su pripravljene u okviru diplomskog rada studentice Mateje Štanfel. [11] Ispitane su dvije vrste peleta označene kao 100 mg OBL_60C (slika 5a) i IMP OBL_60C (slika 5b). 100 mg OBL_60C pelete dobivene su ekstrudiranjem mješavine mikrokristalne celuloze, poli(etilen-glikola) i dronedaron-hidroklorida u aksijalnom ekstruderu MG-55 (Fuji Paundal, Japan). Ekstrudati su sferonizirani u sferonizatoru QJ-230T-1 (Fuji Paundal, Japan).

Pelete IMP OBL_60C dobivene su ekstrudiranjem mješavine mikrokristalne celuloze, poli(etilen-glikola), natrijeva klorida i dronedaron-hidroklorida u aksijalnom ekstruderu MG-55 (Fuji Paundal, Japan). Ekstrudati su sferonizirani u sferonizatoru QJ-230T-1 (Fuji Paundal, Japan). Natrijev klorid ispran je iz peleta kako bi se dobila porozna struktura u koju je vakuumskim impregniranjem nanesen dronedaron-hidroklorid u obliku nanosuspenzije korištenjem uređaja Cito Vac (Struers, Njemačka).

Oblaganje obje vrste peleta je provedeno u fluidiziranom sloju uz dodatak Wursterove cijevi u uređaju UniGlatt (Glatt GmbH, Njemačka). Sferične pelete obložene su otopinom hidroksipropil-metil-celuloze. Rezultati za pelete (0M) preuzeti su iz diplomskog rada studentice Mateje Štanfel. [11]. U tablici 3 prikazane su vrijednosti masa peleta punjenih u želatinozne kapsule kao i sadržaj DNR u jednoj dozi.

Tablica 3. Vrijednosti masa pripremljenih peleta i sadržaj DNR (3M)

	100 mg OBL_60C		IMP OBL_60C	
	pelete	DNR	pelete	DNR
m_1 , mg	228,3	33,93	468,1	30,71
m_2 , mg	238,0	35,36	472,1	30,36
m_3 , mg	233,5	35,71	447,0	30,00



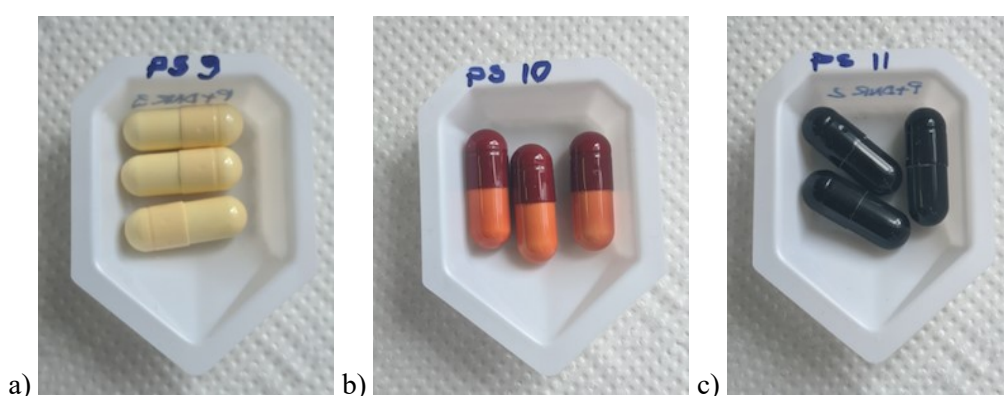
Slika 5. Pelete: a) 100 mg OBL_60C, b) IMP OBL_60C

3.1.4. Mikrokapsule

Mikrokapsule su pripravljene u okviru diplomskog rada studenta Jurja Petanjeka [12], pomoću sušenja raspršivanjem u laboratorijskom sušioniku Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Switzerland). Dronedaron-hidroklorid obložen je poli(vinil-alkoholom) proizvođača Acros Organics, prosječne molekulske mase 50000 do 85000 g/mol. Za postupak sušenja raspršivanjem pripravljene su otopine koje sadrže DNR i PVA u omjeru 1:3, tako da su 3 g PVA otopljeni u 100 mL vode miješanjem na magnetnoj miješalici uz zagrijavanje, a 1 g DNR u 100 mL etanola, nakon čega su dvije otopine pomiješane te je dobiveno 200 mL otopine koja se koristila kao pojna smjesa za proces sušenja raspršivanjem. Stabilnost je ispitana za tri uzorka mikrokapsula koje su dobivene uz različite protoke zraka za raspršivanje: PS9 ($4,84 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), PS10 ($2,92 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) i PS11 ($1,85 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). Želatinozne kapsule napunjene su mikrokapsulama (slika 6). Mase punjenja i sadržaj DNR u svakoj kapsuli prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Vrijednosti masa pripremljenih mikrokapsula i sadržaj DNR (3M)

	PS9		PS10		PS11	
	MK	DNR	MK	DNR	MK	DNR
m_1 , mg	130,0	46,43	165,5	36,79	167,6	36,07
m_2 , mg	165,0	43,21	168,3	39,29	169,0	35,71
m_3 , mg	145,0	50,00	175,1	37,50	164,5	38,57

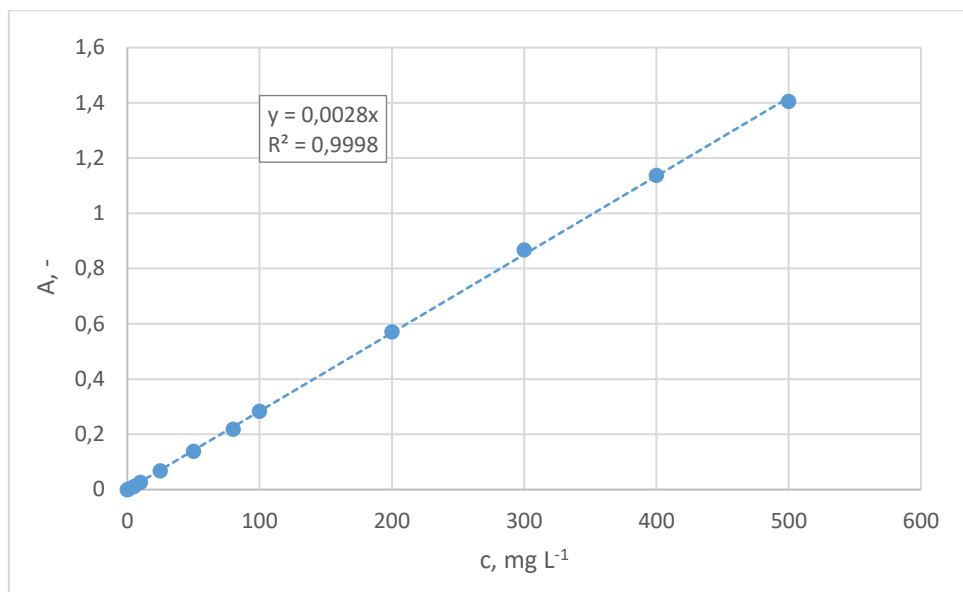


Slika 6. Mikrokapsule: a) PS9, b) PS10, c) PS11

3.2. Ispitivanje oslobađanja *in vitro*

3.2.1. Umjerni pravac

Mjerenjem apsorbancije standardnih otopina DNR u fosfatnom puferu (koncentracija 1, 5, 10, 25, 50, 80, 100, 200, 300, 400 i 500 mg L⁻¹) izrađen je umjerni pravac (slika 7) na temelju kojeg se određuje sadržaj oslobođenog dronedaron-hidroklorida tijekom vremena.



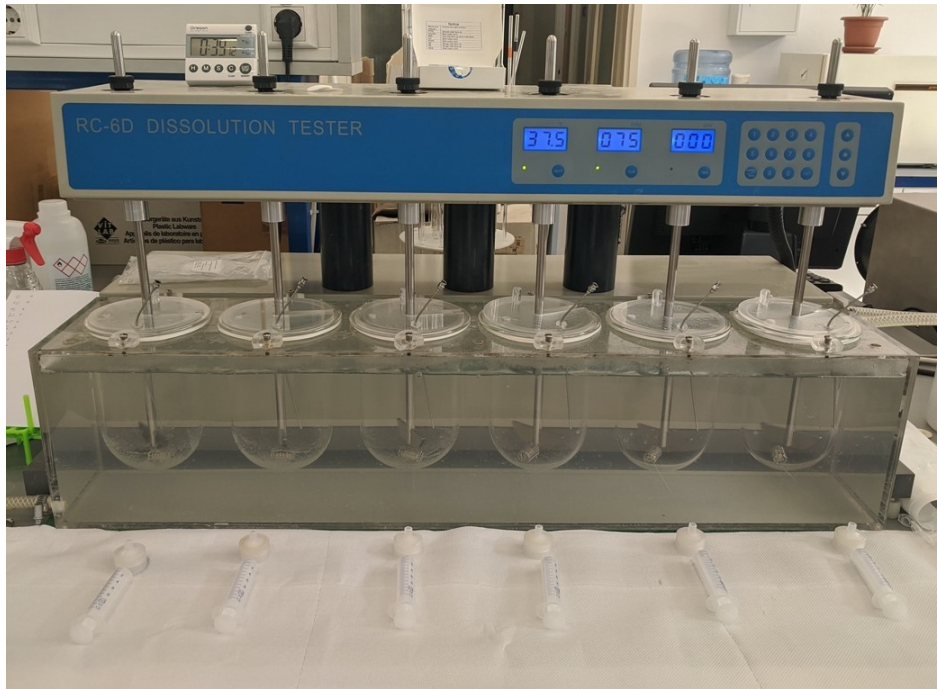
Slika 7. Umjerni pravac dronedaron-hidroklorida u fosfatnom puferu (pH = 4,5)

3.2.2. Ispitivanje oslobađanja *in vitro*

Oslobađanje dronedaron-hidroklorida iz dozirnih oblika ispitano je *in vitro* na uređaju Dissolution tester (RC-6D, Zhengzhou Nanbei Instrument) prikazanom na slici 8. Za svaki dozirni oblik provedena su tri mjerenja, a prikazani profili predstavljaju srednju vrijednost mjerenja.

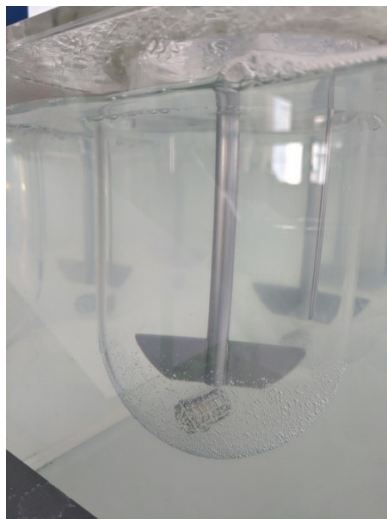
Kao medij za ispitivanje korišten je fosfatni pufer volumena 1000 mL i pH vrijednosti 4,5. Fosfatni pufer pripremljen je miješanjem odgovarajućih volumena otopina kalijevog hidrogenfosfata (K₂HPO₄) te kalijevog dihidrogenfosfata (KH₂PO₄). Temperatura pufera podešena je na 37 ± 0,5 °C, a broj okretaja miješala na 75 o/min.

U određenim vremenskim razmacima uzorkovani su alikvoti medija koji se zatim filtrira pomoću filtra Chromafil Xtra H-PTFE-45/25 veličine pora od 0,45 μm te analizira UV/Vis spektrofotometrom kako bi se odredila koncentracija djelatne tvari.



Slika 8. Dissolution tester (*RC-6D, Zhengzhou Nanbei Instrument*)

U eksperimentu je korištena naprava s lopaticama (USP aparatura II), a dozirni su oblici stavljani u tzv. japanske košarice čime je osigurana potopljenost dozirnih oblika u mediju za otapanje (slika 9).



Slika 9. USP aparatura II, japanska košarica

3.2.3. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je jedna od najčešće primjenjivanih metoda kojom se određuje sadržaj djelatne tvari. Metoda se temelji na mjerenju intenziteta svjetlosti koja je prošla kroz analizirani uzorak te usporedbom s intenzitetom svjetlosti ulaznog zračenja. Osnovni dijelovi svakog spektrofotometra su izvor svjetlosti, monokromator, držač uzorka i detektor.

Za određivanje koncentracije dronedarona za vrijeme *in vitro* ispitivanja, korišten je UV/Vis spektrofotometar Shimadzu UV-1280 (slika 10). Radno područje spektrofotometra je od 190,0 – 1100,0 nm, a mjerenja su provedena pri valnoj duljini 289,8 nm koja odgovara maksimumu apsorpcije dronedarona u fosfatnom puferu (pH = 4,5).

Na temelju dobivenih vrijednosti apsorpcija i umjernog pravca izračunate su vrijednosti koncentracija dronedarona-hidroklorida te je prikazan njegov profil oslobađanja iz različitih farmaceutskih dozirnih oblika.



Slika 10. Shimadzu UV-1280 spektrofotometar

3.3. Obrada podataka

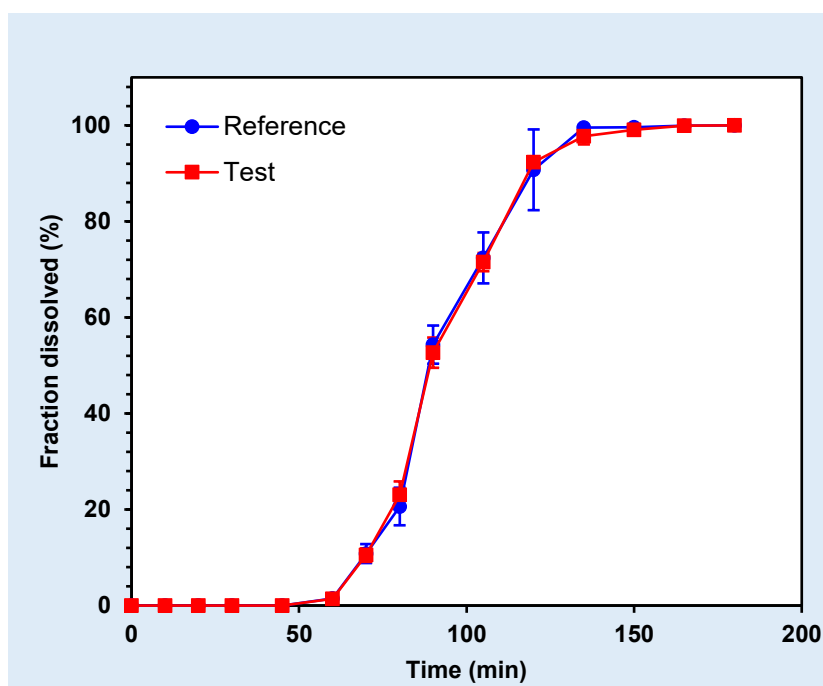
Eksperimentalni podaci su obrađeni pomoću besplatnog dodatka za Microsoft Excel, DDSolver. U ovaj su dodatak implementirani brojni modeli koji služe za opis kinetike oslobađanja djelatne tvari te ga tako čine prikladnim za uspoređivanje profila oslobađanja.

Korištenjem DDSolver-a izračunati su faktor razlike (f_1) i faktor sličnosti (f_2) prema jednadžbama (9) i (10) te su dobiveni grafički prikazi profila oslobađanja djelatne tvari iz uzoraka 0M i 3M. Na temelju dobivenih vrijednosti navedenih statističkih faktora može se ocijeniti stabilnost farmaceutskih dozirnih oblika nakon tri mjeseca.

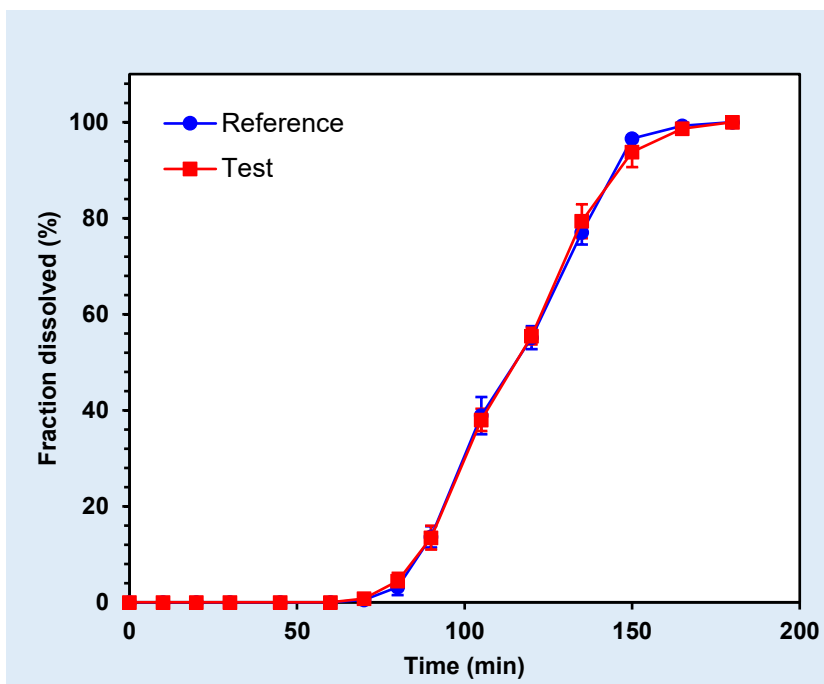
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivana je stabilnost farmaceutskih dozirnih oblika – 3D-tiskanih kapsula, 3D-tiskanih tableta, peleta i mikrokapsula. Jedan od koraka ispitivanja stabilnosti je provjera *in vitro* ponašanja lijeka. Uspoređeni su profili oslobađanja dronedaron-hidroklorida iz pripremljenih dozirnih oblika. Eksperimentalni dio uključuje pripremu dozirnih oblika za njihovo skladištenje u kontroliranim uvjetima te ispitivanje oslobađanja djelatne tvari *in vitro*. Uzorci su skladišteni u staklenim bočicama, a za vrijeme skladištenja su dnevno bilježene vrijednosti temperature i vlažnosti zraka. Prosječna vrijednost temperature iznosila je 26,3 °C, a relativna vlažnost zraka 36,3 %.

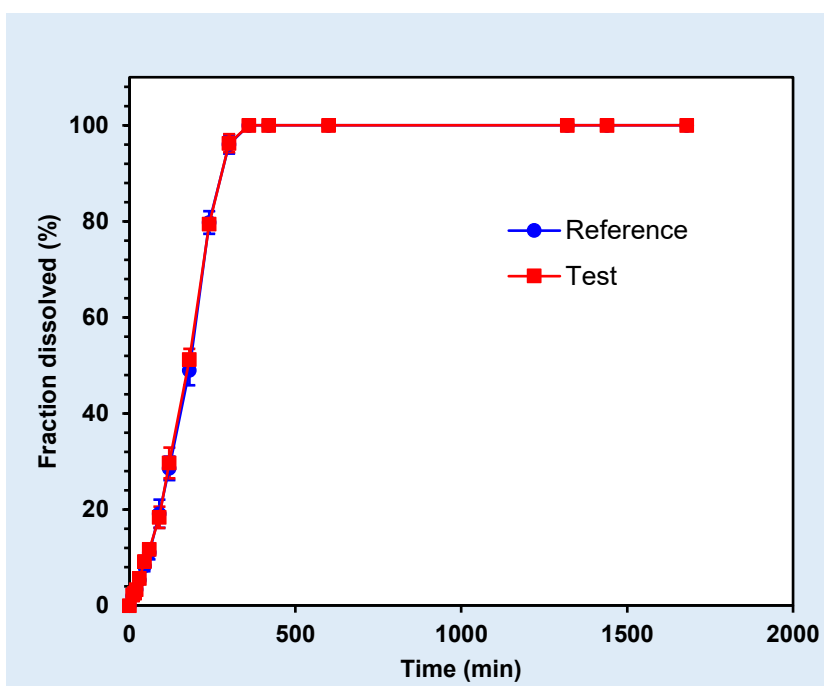
Metoda *in vitro* ispitivanja je provedena na uređaju za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari. Vrijeme ispitivanja i periodi uzorkovanja odabrani su ovisno o vrsti dozirnog oblika. 3D-tiskane kapsule i pelete ispitivane su tijekom tri sata, dok je oslobađanje DNR iz 3D-tiskanih tableta i mikrokapsula ispitivano tijekom 24 sata. Dobiveni profili oslobađanja uspoređeni su s profilima oslobađanja za iste dozirne oblike prije skladištenja, a preuzetim iz drugih radova [10-12]. Na slikama 11 – 19 prikazana je usporedba profila oslobađanja za svaki dozirni oblik prije ispitivanja (0M; označeno na grafu kao *Reference*) i nakon tri mjeseca skladištenja (3M; označeno na grafu kao *Test*).



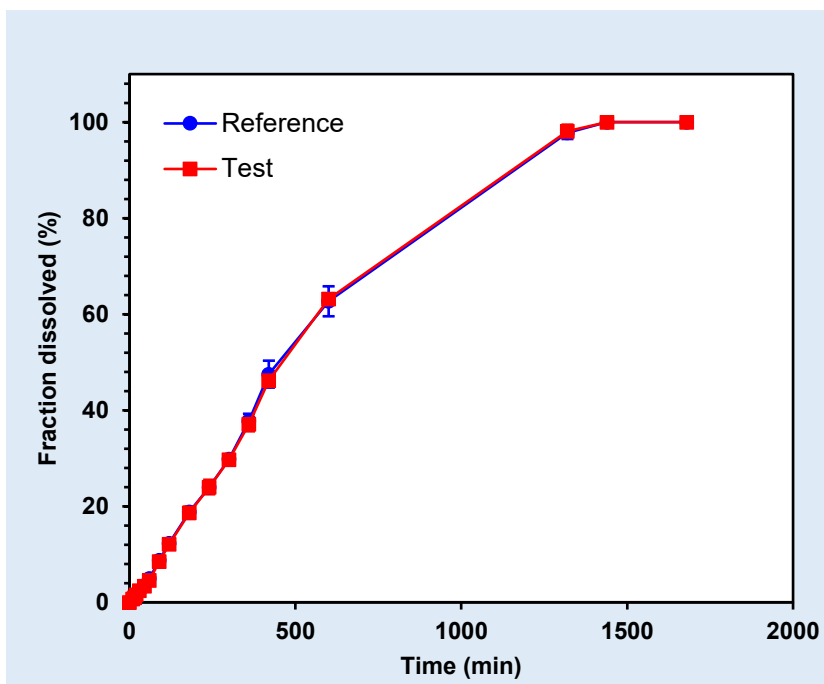
Slika 11. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz 3D-tiskanih kapsula (0,75 mm)



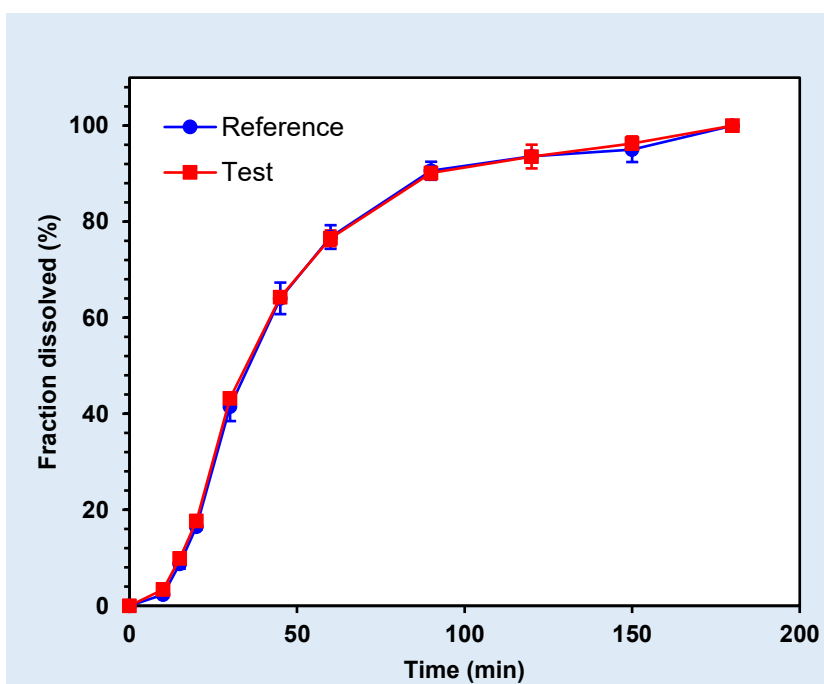
Slika 12. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz 3D-tiskanih kapsula (1 mm)



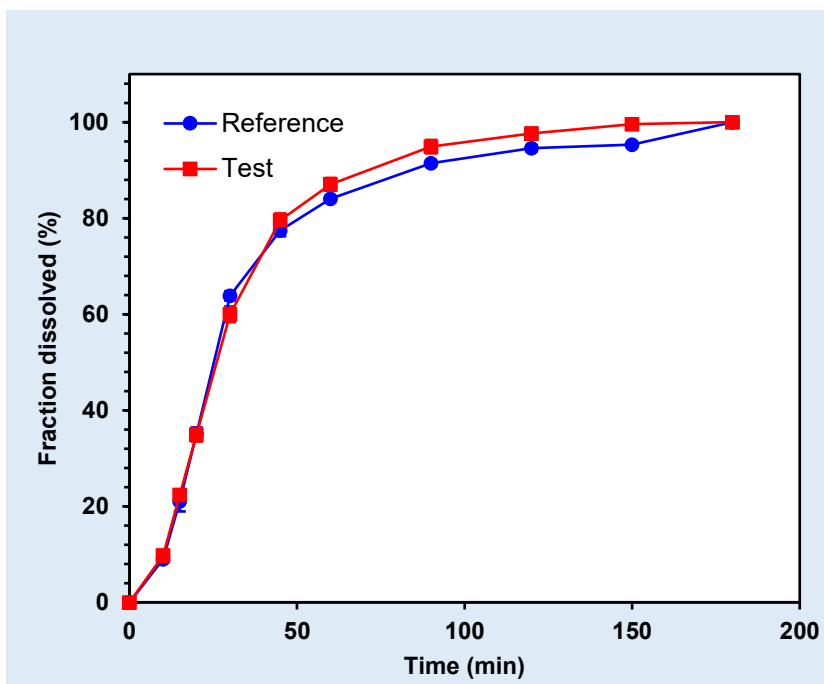
Slika 13. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz 3D-tiskanih tableta (TP 25%)



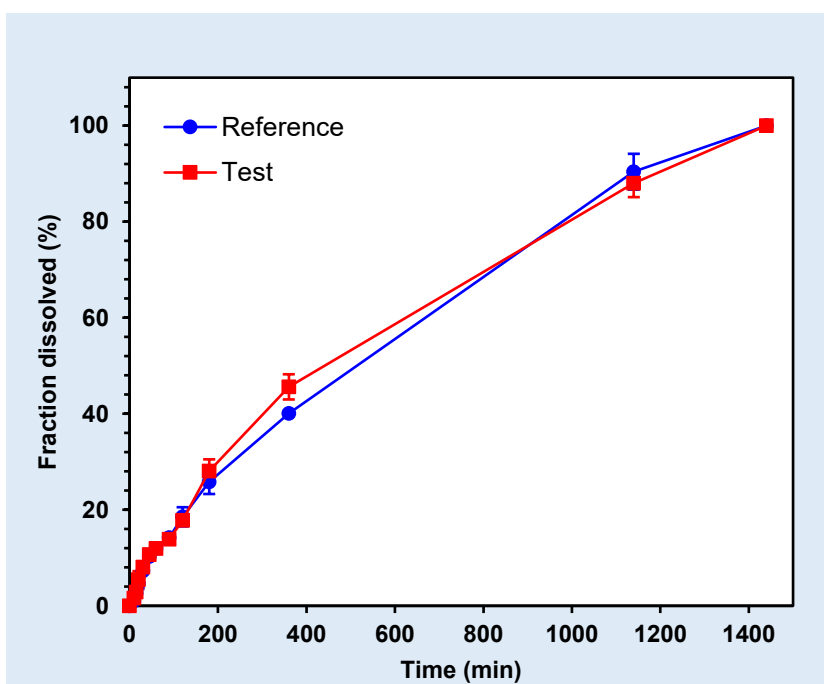
Slika 14. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz 3D-tiskanih tableta (TP 100%)



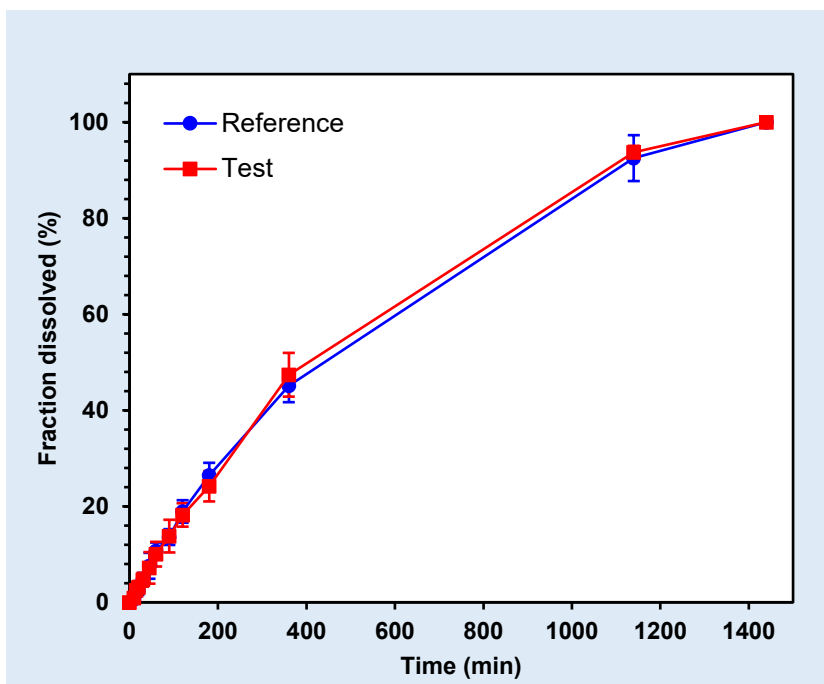
Slika 15. Usporedba oslobađanja dronedarona iz peleta (100 mg OBL_60C)



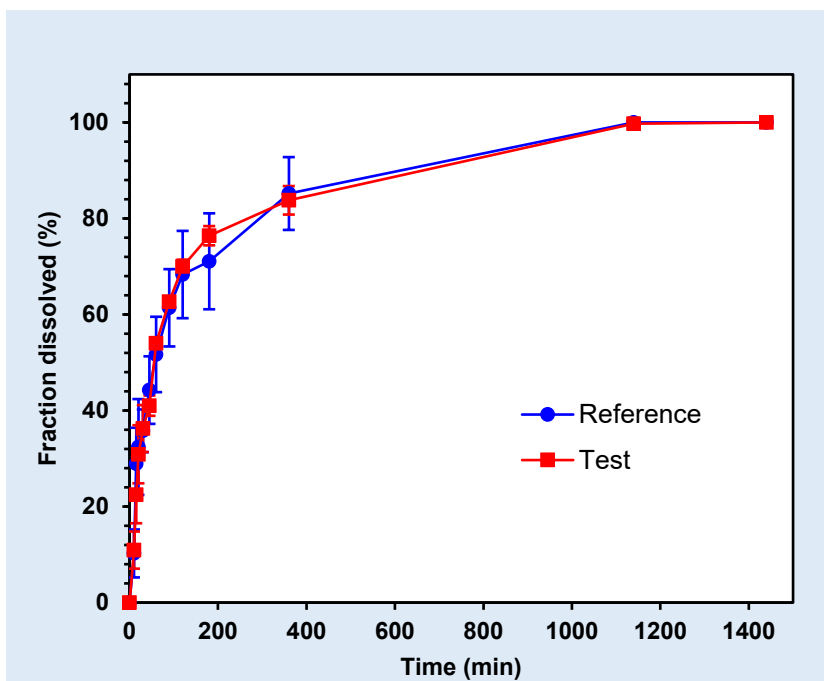
Slika 16. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz peleta (IMP OBL_60C)



Slika 17. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz mikrokapsula (PS9)



Slika 18. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz mikrokapula (PS10)



Slika 19. Usporedba profila oslobađanja dronedarona iz mikrokapula (PS11)

Pomoću dodatka za Microsoft Excel, DDSolver, na temelju izračunatih vrijednosti koncentracija dronedaron-hidroklorida izrađeni su grafički prikazi profila oslobađanja. Usporede li se profili oslobađanja različitih dozirnih oblika vidljivo je da je kod 3D-tiskanih tableta i mikrokapula postignuto produljeno oslobađanje, dok je kod 3D-tiskanih kapsula i

peleta postignuto brže oslobađanje koje se može svrstati u kategoriju kontroliranog oslobađanja. Usporedbom profila oslobađanja prije (*Reference*) i nakon ispitivanja stabilnosti (*Test*) dobivene su vrijednosti faktora razlike (f_1) i faktora sličnosti (f_2). Vrijednosti statističkih faktora dane su u tablici 6. Faktor razlike za različite dozirne oblike poprima vrijednosti od 0,78 do 4,33. Manje vrijednosti faktora razlike imaju 3D-tiskane tablete (TP 25% i TP 100%), a veće vrijednosti dobivene su za mikrokapsule (PS9 i PS11). Faktor razlike pokazuje odstupanje testnog uzorka (3M) od referentnog (0M), dok faktor sličnosti kvantificira njihovo podudaranje. Vrijednosti faktora sličnosti iznose od 77,01 (za mikrokapsule PS11) do 98,21 za 3D-tiskane tablete (TP 100%). Najmanja sličnost uočena kod mikrokapsula PS11 (slika 19) posljedica je velikih standardnih devijacija u ponovljenim mjerenjima za jedan uzorak.

Faktori razlike i faktori sličnosti kao statističke veličine često se koriste za usporedbu profila oslobađanja [13, 14]. Smatra se da vrijednosti faktora razlike u intervalu $<0, 15>$ i faktora sličnosti u intervalu $<50, 100>$, razliku između profila svrstavaju u neznatnu. Analizom dobivenih rezultata vidljivo je da su sve vrijednosti faktora unutar navedenih intervala čime se zaključuje da su svi ispitani dozirni oblici stabilni nakon tri mjeseca.

Tablica 5. Statistički faktori profila oslobađanja za sve dozirne oblike

Dozirni oblik	Uzorak	Statistički faktor	
		f1	f2
3D-tiskane kapsule	0,75 mm	1,42	92,27
	1 mm	1,77	92,16
3D-tiskane tablete	TP 25%	0,78	95,87
	TP 100%	0,91	98,21
Pelete	100 mg OBL_60C	1,26	93,63
	IMP OBL_60C	3,29	78,24
Mikrokapsule	PS9	4,33	83,96
	PS10	2,89	92,03
	PS11	3,57	77,01

5. ZAKLJUČAK

Primjenom metode *in vitro* ispitivanja oslobađanja djelatne tvari testirana je stabilnost farmaceutskih dozirnih oblika.

Usporedba profila oslobađanja prije i nakon skladištenja provedena je primjenom metoda neovisnih o modelima tj. korištenjem statističkih faktora koji prikazuju mjeru odstupanja i podudarnosti između dva modela.

Ispitani dozirni oblici imaju vrijednosti faktora razlike u rasponu od 0,78 – 4,33 te faktora sličnosti od 77,01 – 98,21 te se na temelju tih vrijednosti može zaključiti da su svi navedeni dozirni oblici stabilni nakon tri mjeseca.

Brzina oslobađanja djelatne tvari uvelike se mijenja ovisno o dozirnom obliku, a procjena koji je dozirni oblik najprikladniji bi se trebala zasnivati na potrebnom terapijskom učinku te općem stanju pacijenta.

6. LITERATURA

[1]	Zakon o lijekovima, NN 76/2013 Dostupno na : https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1522.html Pristup dana 04.07.2020.
[2]	R. Senjković, Osnove oblikovanja lijekova, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
[3]	Hrvatska farmakopeja, NN 33/2007 (28.3.2007.) Dostupno na : https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2007_03_33_1095.html Pristup dana 04.07.2020.
[4]	I. Jalšenjak, V. Jalšenjak, J. Filipović-Grčić, Farmaceutika, Školska knjiga, Zagreb, 1998.
[5]	H. Khan, M. Ali, A. Ahuja, J. Ali, Stability Testing of Pharmaceutical Products – Comparison of Stability Testing Guidelines, 2010., 142-150
[6]	S. Bajaj, D. Singla, N. Sakhuja, Stability Testing of Pharmaceutical Products, Journal of Applied Pharmaceutical Science; 2012, 129-138
[7]	J. Limberg, H. Potthast, Regulatory status on the role of in vitro dissolution testing in quality control and biopharmaceutics in Europe, 2013., 247-253
[8]	P. Costa, J. M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 13 (2001) 123–133
[9]	S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, <i>Acta Poloniae Pharm. – Drug Res.</i> 67 (2010)
[10]	K. Kezerić, 3D-tiskani oralni dozirni oblici dronedaron-hidroklorida, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
[11]	M. Štanfel, Proizvodnja farmaceutskih peleta, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
[12]	J. Petanjek, Mikrokapsuliranje djelatne tvari polimerima, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
[13]	J. R. Karmoker, S. Sarkar, P. Joydhar, S. F. Chowdhury, Comparative in vitro equivalence evaluation of some Aceclofenac generic tablets marketed in Bangladesh, <i>Pharma Innovation J.</i> 5 (2016) 3-7
[14]	L. Kassaye, G. Genete, Evaluation and comparison of in-vitro dissolution profiles for different brands of amoxicillin capsules, <i>Afr. Health Sci.</i> 13 (2013) 369-375