

Čvrste disperzije sa karbamazepinom: optimizacija formulacija, karakterizacija i ispitivanje dugoročne stabilnosti

Marko Krstić¹, Igor Lukić², Alma Bušatlić³, Nenad Lazarević⁴, Dragana Vasiljević¹

¹Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

²ASV Beograd d.o.o., Kumodraška 380, 11221 Beograd, Srbija

³Adoc d. o. o., Milorada Jovanovića 11, 11030 Beograd, Srbija

⁴Centar za fiziku čvrstog stanje i nove materijale, Institut za fiziku, Univerzitet u Beogradu, Pregrevica 118, 11080 Beograd, Srbija

Izvod

U ovom radu je izvršena optimizacija formulacija čvrstih disperzija sa karbamazepinom, primenom metode D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše, u cilju povećanja brzine rastvaranja navedene teško rastvorljive aktivne supstance. Primenom metode eksperimentalnog dizajna smeše, formulisane su čvrste disperzije variranjem udela karbamazepina (30-50 %), *Gelucire*® 44/14 (20-40 %) i polimera *Soluplus*® (30-50 %) (ulazni parametri). Izrađeno je 16 formulacija, iz kojih je ispitana *in vitro* brzina rastvaranja karbamazepina. Kao izlazni parametri praćeni su procenti rastvorenog karbamazepina, nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta. Najveći udeo oslobođenog karbamazepina iz čvrstih disperzija (preko 80 % za 30 minuta) se postiže pri udelima aktivne supstance od oko 40 %, *Soluplus*® oko 45 % i *Gelucire*® 44/14 oko 25%. Nakon obrade podataka i optimizacije, iz različitih delova optimizacione oblasti odabrane su 3 formulacije za dalja ispitivanja. Rezultati ispitivanja odabranih optimizovanih uzoraka čvrstih disperzija nakon izrade, kao i nakon skladištenja 24 meseca pod ambijentalnim uslovima (25 °C, 40 % RH), dobijeni primenom metoda diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) i Ramanske spektroskopije potvrdili su njihovu stabilnost i očuvanje karbamazepina u polimrnom obliku III, jedinom farmakološki aktivnom obliku. Primenom PAMPA (*eng.* Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay) testa pokazano je da je u dve, od tri ispitivane optimizovane čvrste disperzije očuvana, odnosno blago povećana permeabilnost karbamazepina.

Ključne reči: čvrste disperzije, karbamazepin, optimizacija formulacija, eksperimentalni dizajn, *in vitro* oslobađanje, fizička stabilnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

UDC 615.015.14:004.896(043.3)

Hem. Ind. 72 (4) 191–204 (2018)

1. UVOD

Čvrste disperzije se definišu kao disperzije jedne ili više lekovitih supstanci u inertnom nosaču (matriksu), u čvrstom stanju, dobijene metodom topljenja, metodom rastvaranja ili kombinacijom ove dve metode. Lekovite supstance u čvrstim disperzijama mogu biti dispergovane kao odvojene molekule, amorfne ili kristalne čestice, dok nosač može biti u kristalnom ili amorfnom stanju. Glavni razlog izrade čvrstih disperzija je povećanje rastvorljivosti/brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci, a sledstveno tome i njihova biološka raspoloživost [1]. Mehanizmi, kojima se to postiže su: rastvaranje lekovite supstance u inertnom matriksu, smanjenje veličine čestica i smanjenje aglomeracije, poboljšano kvašenje i solubilizacija lekovite supstance molekulima nosača, povećana poroznost sistema, kao i prelazak lekovite supstance iz kristalnog u amorfni oblik [2 - 4].

Uprkos brojnim prednostima čvrstih disperzija sa teško rastvorljivim lekovitim supstancama, broj komercijalnih preparata tipa čvrstih disperzija na tržištu je mali, zbog problema koji se mogu javiti tokom procesa izrade/proizvodnje i skladištenja. Ovi problemi uključuju termičku nestabilnost lekovitih supstanci i nosača pri izradi čvrstih disperzija

Korespondencija: Marko Krstić, Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

E-mail: mkrstic109@gmail.com; telefon : +381 11 3951-356

Rad primljen: 25. oktobra 2017.

Rad prihvaćen: 25. juna 2018.

<https://doi.org/10.2298/HEMIND171025013K>



metodom topljenja, ostatke rastvarača, primenom metode rastvaranja, rekristalizaciju lekovitih supstanci pri očvršćavanju, taloženje lekovite supstance posle rastvaranja u vodi zbog prezasićenja [2]. Takođe, može doći do razdvajanja lekovite supstance od matriksa, što ima za posledicu njenu neravnomernu raspodelu u čvrstoj disperziji, što se može odraziti na nepravilno doziranje lekovite supstance. Takođe, u toku procesa usitnjavanja izrađene čvrste disperzije može doći do prelaska amornog oblika lekovite supstance u kristalni. Veliki broj tehnoloških operacija u farmaceutskoj industriji, koji se sprovodi u toku proizvodnje čvrstih disperzija je takođe ograničavajući faktor za njihovu širu proizvodnju i primenu [5].

Razvoj formulacije predstavlja složen proces i često se između sastava formulacija i njenih karakteristika ne može uspostaviti jasna, a gotovo nikada linearna korelacija. Iz tog razloga, sve češće se u razvoju formulacija koriste tehnike eksperimentalnog dizajna, kako bi se uz što manji broj eksperimenata došlo do optimalne formulacije. Dizajn smeše predstavlja vrstu eksperimentalnog dizajna, koji se koristi kada se optimizuju formulacije koje imaju više različitih sastojaka, čiji je zbir udela stalan. Jedna od često korišćenih metoda eksperimentalnog dizajna smeše je D-optimalni dizajn, koji omogućava da se na osnovu najmanjeg broja eksperimenata sa velikom pouzdanošću dođe do formulacije željenih karakteristika. Poslednjih godina je uspešno korišćen u razvoju tečnih i čvrstih samo-emulgujućih sistema, kao i čvrstih disperzija [6 - 8].

Tokom izrade formulacija u kojima se povećava rastvorljivost teško rastvorljive lekovite supstance, njena permeabilnost se može smanjiti, povećati ili ostati nepromenjena [9]. Sa ciljem da se proceni uticaj različitih faktora na resorpciju lekovite supstance, kao i da se smanji broj ispitivanja na ljudima i životinjama, stalno se razvijaju i unapređuju *in vitro* metode za procenu resorpcije lekovite supstance [10,11]. PAMPA (*eng.* Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay) test je brz, jeftin i jednostavan metod, kojim se može ispitati permeabilnost lekovitih supstanci pasivnom difuzijom. Simulacija bioloških membrana postiže se odgovarajućim odabirom rastvarača i supstanci od kojih se formira veštačka membrana. Dugi niz godina se PAMPA test koristio u proceni permeabilnosti nosilaca, a tek poslednjih godina se koristi za ispitivanje permeabilnosti lekovite supstance iz različitih farmaceutskih oblika i savremenih nosača [8,9,12,13].

Cilj rada bio je razvoj i optimizacija formulacija čvrstih disperzija sa karbamazepinom, primenom metode D-optimalnog eksperimentalnog dizajna, radi povećanja brzine rastvaranja navedene lekovite supstance. Takođe, cilj rada je bio i karakterizacija i ispitivanje dugoročne stabilnosti optimizovanih formulacija čvrstih disperzija, nakon skladištenja uzoraka 24 meseca pod ambijentalnim uslovima.

2. MATERIJALI I METODE

2. 1. Materijal

U eksperimentalnom radu korišćen je karbamazepin (Ph. Eur. 8.0), kao model lekovite supstance. Lauroil makrogol-32 gliceridi (*Gelucire*[®] 44/14; Gattefosse, Francuska) i makrogol 6000-poli(vinilkaprolaktam)-poli(vinilacetat) kalemljeni (*eng.* graft) polimer (*Soluplus*[®]; BASF ChemTrade GmbH, Nemačka) su korišćeni kao ekscipijensi za izradu čvrstih disperzija. Za rastvaranje polimera za izradu čvrstih disperzija korišćen je etanol (99,5 % V/V).

Dodekan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i lecitin jajeta (Lipoid GmbH, Nemačka) korišćeni su u PAMPA testu. Svi drugi reagensi, koji su korišćeni za HPLC analizu, bili su analitičke čistoće.

2. 2. Metode

2. 2. 1. Formulacija čvrstih disperzija

Primenom optimizacione tehnike, uz pomoć kompjuterskog programa *Design Expert*[®] (version 8.0.7.1, Stat-Ease, SAD), definisan je D-optimalni eksperimentalni dizajn smeše, koju čine tri komponente, sastojci čvrstih disperzija: A –karbamazepin (koncentracija 30 – 50 %), B –*Gelucire*[®] 44/14 (koncentracija 20-40 %) i C –*Soluplus*[®] (koncentracija 30-50 %). Ove tri komponente predstavljaju ulazne parametre i njihov ukupan udeo je 100 %. Granične vrednosti udela komponenti postavljene su na osnovu literaturnih podataka i prethodnih ispitivanja. Kao izlazni parametri (odgovori sistema) praćeni su procenti rastvorenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta, označeni sa R₁ - R₅.

Primenom D-optimalnog eksperimentalnog dizajna dobijen je eksperimentalni plan (Tabela 1.), koji se sastojao od 16 formulacija čvrstih disperzija, od kojih su 11 različitih i 5 ponovljenih, radi smanjenja eksperimentalne greške.

2. 2. 2. Izrada čvrstih disperzija

Čvrste disperzije su izrađene kombinacijom metoda topljenja i rastvaranja. *Gelucire*[®] 44/14 se otopi na temperaturi od 50 °C i dodaje, uz stalno mešanje, u patenu sa karbamazepinom. U disperziju karbamazepina i *Gelucire*[®] 44/14 dodaje se etanolni rastvor *Soluplus*[®], uz neprekidno mešanje. Dobijena smeša se ostavi 72 h na sobnoj temperaturi, da etanol ispari. Izrađene čvrste disperzije su usitnjavane i prosejavane kroz sito 600 (Ph. Eur. 9.0).

Tabela 1. Eksperimentalni plan

Table 1. Experimental plan

| Redni broj formulacije | Ulazni parametri | | |
|------------------------|------------------------------|---|--|
| | A - Sadržaj karbamazepina, % | B - Sadržaj <i>Gelucire</i> [®] 44/14, % | C - Sadržaj <i>Soluplus</i> [®] , % |
| F1 | 34,22 | 33,59 | 32,19 |
| F2 | 33,54 | 23,93 | 42,53 |
| F3 | 50,00 | 20,00 | 30,00 |
| F4 | 30,00 | 20,01 | 49,99 |
| F5 | 41,07 | 20,00 | 38,93 |
| F6 | 30,00 | 31,48 | 38,52 |
| F7 | 43,84 | 23,32 | 32,84 |
| F8 | 30,00 | 36,08 | 33,92 |
| F9 | 40,59 | 29,41 | 30,00 |
| F10 | 36,44 | 27,30 | 36,26 |
| F11 | 30,01 | 39,99 | 30,00 |
| F12 | 50,00 | 20,00 | 30,00 |
| F13 | 41,07 | 20,00 | 38,93 |
| F14 | 30,01 | 39,99 | 30,00 |
| F15 | 40,59 | 29,41 | 30,00 |
| F16 | 30,00 | 20,01 | 49,99 |

2. 2. 3. *In vitro* procena brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija (prašak, veličine čestica $\leq 600 \mu\text{m}$) i komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem (ravne površine, prečnika 10 mm), kao i čiste lekovite supstance, izvedeno je u aparaturi sa rotirajućom lopaticom (Erweka DT70, Nemačka). Prilikom ispitivanja, masa čvrstih disperzija je sadržala 200 mg karbamazepina, kao i komercijalne tablete. Kao akceptorski medijum je korišćena prečišćena voda (900 ml), zagrejana na 37°C , a brzina obrtanja rotirajuće lopatice bila je 50 obrtaja/min. Po 4 ml uzorka je uzimano nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta, uz nadoknađivanje medijuma. U uzorcima je, nakon filtriranja, spektrofotometrijski (spektrofotometar Evolution 300, Termo Fisher Scientific, Engleska) određena količina rastvorenog karbamazepina na 287 nm. Kalibraciona kriva za određivanje karbamazepina data je u prilogu, na slici S1, pri čemu je postignuta visoka vrednost koeficijenta korelacije $r^2 = 0,999$, kao i visoka preciznost metode, pri merenju apsorbancije za svaki standardni rastvor 10 puta RSD nije prelazila 0,61%. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja procenta oslobođenog karbamazepina iz tri uzorka, \pm SD.

2. 2. 4. Modelovanje uticaja ulaznih na izlazne parametre primenom metode dizajna smeše

D-optimalnim eksperimentalnim dizajnom smeše moguće je dobiti odgovarajući regresioni model, koji, u ovom slučaju, opisuje uticaj udela komponenata čvrstih disperzija, kao nezavisno promenljivih, na procenat rastvorenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta, kao zavisno promenljivih. Modeli, koje je najčešće moguće dobiti pri ovakvim ispitivanjima su:

$$\text{specijalni kubni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC \quad (1)$$

$$\text{kubni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC + \gamma_{12}AB(A - B) + \gamma_{13}AC(A - C) + \gamma_{23}BC(B - C), \quad (2)$$

gde su b_1 - b_{123} i γ_{12} - γ_{23} koeficijenti, koji pokazuju uticaj nezavisno promenljivih, kao i njihovih međusobnih interakcija na vrednost zavisno promenljive. Vrednosti koeficijenata izračunavane su regresionom analizom, korišćenjem programa *Design Expert*[®].

Regresioni model, tj. finalna jednačina, razmatra L-Pseudo vrednosti ulaznih parametara (A, B, C), koje se kreću od 0 do 1. Vrednost 0 se dodeljuje donjoj granici, a vrednost 1 gornjoj granici ulaznih parametara, dok se sve ostale vrednosti izračunavaju iz sledećih jednačina:

$$\text{Karbamazepin: } A_{1(L\text{-Pseudo})} = (A_1 - 30)/20 \quad (3)$$

$$\text{Gelucire}^{\text{®}} \text{ 44/14: } B_{1(L\text{-Pseudo})} = (B_1 - 20)/20 \quad (4)$$

$$\text{Soluplus}^{\text{®}}: C_{1(L\text{-Pseudo})} = (C_1 - 30)/20 \quad (5)$$

gde su A_1 , B_1 i C_1 bilo koje vrednosti koncentracija karbamazepina, *Gelucire*[®] 44/14 i *Soluplus*[®], u okviru postavljenih granica.

Regresioni model, koji najbolje opisuje vezu između ulaznih i izlaznih parametara bira se na osnovu poređenja nekoliko statističkih parametara, uključujući standardnu devijaciju (SD), koeficijent višestruke korelacije (R^2), prilagođen koeficijent višestruke korelacije (prilagođeni R^2) i predvidiv ostatak zbira kvadrata (PRESS). PRESS pokazuje koliko se podaci dobro uklapaju u model i za izabrani model njegova vrednost treba da bude manja, u poređenju sa drugim modelima. Za razliku od vrednosti PRESS, vrednosti za R^2 i prilagođeni R^2 treba da budu veće u odnosu na druge modele, dok vrednost standardne devijacije treba da bude manja. Kompromisom između postavljenih zahteva vrši se odabir najpogodnijeg regresionog modela.

2. 2. 5. Optimizacija formulacija čvrstih disperzija

Nakon dobijanja regresionih modela, izvršena je optimizacija formulacija čvrstih disperzija sa sledećim zahtevima za procenat oslobođenog karbamazepina: $60\% < R_1 < 75\%$, $75\% < R_2 < 85\%$, $85\% < R_3 < 95\%$, $90\% < R_4 < 95\%$, $90\% < R_5 < 100\%$. Iz različitih delova optimizacione oblasti odabrane su 3 formulacije čvrstih disperzija, koje su izrađene i iz kojih je ispitana *in vitro* brzina oslobađanja karbamazepina, na prethodno opisan način. Radi procene uspešnosti predviđanja, predviđeni i eksperimentalno dobijeni profili brzine oslobađanja su upoređeni računanjem faktora sličnosti (f_1) i faktora razlike (f_2) [14].

2. 2. 6. Ispitivanja optimizovanih formulacija čvrstih disperzija

Iz tri optimizovane formulacije čvrstih disperzija izvršeno je *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina, kao i ispitivanje permeabilnosti karbamazepina, primenom PAMPA testa. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (FT-IR) i Ramanska spektroskopija su sprovedene nakon izrade, kao i nakon 24 meseca čuvanja uzoraka pod ambijentalnim uslovima (25 °C, 40 % RH), u cilju procene dugoročne stabilnosti čvrstih disperzija.

2. 2. 7. Procena permeabilnosti karbamazepina

Procena permeabilnosti karbamazepina iz odabranih formulacija i čistog karbamazepina izvršena je korišćenjem PAMPA testa.

Prilikom izvođenja PAMPA testa, kao nosač veštačke membrane i akceptorski panel korišćen je filtracioni panel sa 96 bazena, izrađen od hidrofилnog poliviniliden difluorida (PVDF) (Millipore, SAD). U bazene akceptorske ploče naneto je po 5 μ l rastvora lecitina jajeta u dodekanu (1 %, m/V) i ostavljeno 2 h na sobnoj temperaturi, da rastvarač potpuno ispari. Na ovaj način je dno akceptorske ploče impregnirano lecitinom i formirana je veštačka membrana, koja u kontaktu sa rastvorom pufera formira multilamelarni lipidni dvosloj između pora filtera. Akceptorska ploča je postavljena na donorsku, u čije je bazene prethodno naneto po 300 μ l suspenzije čistog karbamazepina i odabranih formulacija u fosfatnom puferu pH 5,5. Istovremeno je u bazene akceptorske ploče naneto po 300 μ l fosfatnog pufera pH 5,5. Akceptorska ploča je prekrivena folijom, kako bi se sprečilo isparavanje rastvarača. Ispitivanje za svaki uzorak je vršeno u triplikatu, a rezultat je predstavljen kao srednja vrednost \pm SD. Nakon inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, koncentracija karbamazepina u bazenima akceptorske ploče određivana je prethodno razvijenom i validiranom HPLC metodom [8,13].

Koeficijenti permeabilnosti (P_{app}) izračunati su primenom sledećih jednačina [15]:

$$T/\% = 100 \frac{A_R V_R}{A_{D0} V_D} \quad (6)$$

$$P_{app} = \frac{V_D V_R}{(V_D + V_R) S t} \ln \frac{100 V_D}{100 V_D - T (V_D + V_R)} \quad (7)$$

gde su:

V_D i V_R – zapremine donorskog i akceptorskog rastvora (ml);

A_{D0} i A_R – HPLC površine pikova pripremljenog rastvora ispitivanog uzorka i akceptorskog rastvora;

S – površina membrane između komora (0,28 cm²);

t – vreme inkubacije (s).

2. 2. 8. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC merenja izvršena su na Mettler–Toledo AG termalnom analizatoru (Mettler–Toledo AG, Analytical, Švajcarska). Precizno odmerena masa uzorka (2–5 mg) stavljena je u T-Zero® aluminijumske posude, koje su potom hermetički zatvarane, a merenja vršena na temperaturama od 20 do 200 °C, pri brzini zagrevanja od 10 °C/min, u struji azota, sa protokom od 100 ml/min.

2. 2. 9. Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektri u regionu od 600–4000 cm^{-1} , čistog karbamazepina i tri optimizovane formulacije, dobijeni su korišćenjem Shimadzu IR-Prestige-21 FT-IR spektrometra spojenog sa horizontalnim Golden Gate MKII jednorefleksnim ATR sistemom (Specac, 214 Kent, Velika Britanija) i opremljenog sa Zn-Se sočivom. Nakon odgovarajuće pripreme uzorka urađeno je šesnaest snimanja za svaki uzorak.

2. 2. 10. Ramanska spektroskopija

Merenje Ramanskih spektra je izvedeno korišćenjem JY T64000 Ramanskog spektrometra (Horiba Scientific, Nemačka) sa 1800/1800/1800 zarez/mm kombinacijom rešetki i Symphony detektorom hlađenim tečnim azotom. Sistem je postavljen u mikro-konfiguraciju sa objektivom x100. Ulazni slit je postavljen na 100 μm . Za ekscitaciju je korišćen čvrstotelni laser, talasne dužine 532 nm.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3. 1. *In vitro* procena brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija

Rezultati *in vitro* brzine rastvaranja karbamazepina iz 16 izrađenih čvrstih disperzija, komercijalnih tableta i čiste supstance, prikazani su u tabeli 2 (i na slici S2., Prilog rada).

Tabela 2. Procenti rastvorenog karbamazepina iz čvrstih disperzija, komercijalnih tableta i čiste lekovite supstance, u funkciji vremena
Table 2. Percentages of dissolved carbamazepine from solid dispersions, a commercial tablet and pure drug, as a function of time

| Uzorak | Količina rastvorenog karbamazepina u funkciji vremena, % | | | | | | |
|--------------|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 10 min | 20 min | 30 min | 45 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| F1 | 56,20±1,24 | 80,60±3,21 | 90,60±1,24 | 96,00±0,37 | 95,60±0,21 | 96,70±0,43 | 98,80±0,21 |
| F2 | 67,70±1,06 | 85,40±1,74 | 92,00±1,21 | 96,80±0,65 | 98,30±0,23 | 98,70±0,37 | 98,20±0,09 |
| F3 | 60,60±0,86 | 78,30±1,27 | 85,30±2,29 | 90,30±1,57 | 93,30±0,33 | 94,80±0,54 | 96,50±0,71 |
| F4 | 62,50±1,94 | 85,04±0,68 | 93,62±0,71 | 98,26±1,02 | 99,30±0,09 | 99,61±0,23 | 99,81±0,15 |
| F5 | 65,00±0,33 | 90,40±0,23 | 95,60±0,17 | 97,50±0,06 | 97,70±0,38 | 99,00±0,16 | 99,20±0,25 |
| F6 | 31,00±2,21 | 49,20±3,21 | 62,80±3,24 | 83,10±1,16 | 83,50±1,53 | 94,50±0,34 | 93,90±0,11 |
| F7 | 53,48±0,97 | 73,86±1,12 | 78,92±0,86 | 83,33±0,14 | 83,01±0,21 | 84,36±0,21 | 87,32±1,23 |
| F8 | 48,37±1,46 | 76,99±2,23 | 82,92±2,96 | 89,71±0,32 | 90,53±0,45 | 92,65±0,23 | 94,87±0,87 |
| F9 | 42,26±2,14 | 61,53±1,32 | 70,87±1,31 | 83,19±0,96 | 83,23±0,14 | 89,42±1,54 | 90,61±0,37 |
| F10 | 63,28±1,32 | 79,26±0,78 | 87,40±0,65 | 91,11±0,32 | 92,14±0,85 | 94,77±1,09 | 96,23±1,23 |
| F11 | 52,77±2,87 | 70,39±2,21 | 79,14±0,33 | 87,15±0,39 | 87,69±0,65 | 92,10±1,12 | 94,58±2,22 |
| F12 | 60,60±0,86 | 78,30±1,27 | 85,30±2,29 | 90,30±1,57 | 93,30±0,33 | 94,80±0,54 | 96,50±0,71 |
| F13 | 65,00±0,33 | 90,40±0,23 | 95,60±0,17 | 97,50±0,06 | 97,70±0,38 | 99,00±0,16 | 99,20±0,25 |
| F14 | 52,77±2,87 | 70,39±2,21 | 79,14±0,33 | 87,15±0,39 | 87,69±0,65 | 92,10±1,12 | 94,58±2,22 |
| F15 | 42,26±2,14 | 61,53±1,32 | 70,87±1,31 | 83,19±0,96 | 83,23±0,14 | 89,42±1,54 | 90,61±0,37 |
| F16 | 62,50±1,94 | 85,04±0,68 | 93,62±0,71 | 98,26±1,02 | 99,30±0,09 | 99,61±0,23 | 99,81±0,15 |
| Karbamazepin | 4,91±0,09 | 26,42±0,87 | 41,56±0,24 | 41,89±0,11 | 48,85±0,98 | 53,00±0,21 | 59,41±1,04 |
| Tablete* | 13,99±1,02 | 22,52±1,21 | 30,36±0,76 | 38,08±0,34 | 46,45±1,98 | 50,98±2,36 | 55,63±0,47 |

*Komercijalne tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance

Najveće razlike u procentu rastvorenog karbamazepina iz ispitivanih čvrstih disperzija primećene su posle 10 minuta (od 31,00 % do 67,70 %). Kod većine ispitivanih formulacija (F1 – F5, F8, F10, F12 - F14; Tabela 2.) nakon 30 minuta dolazi do oslobađanja više od 80% karbamazepina, što odgovara zahtevima Američke farmakopeje (USP 38/NF33) za preparate sa trenutnim oslobađanjem aktivne supstance. Može se smatrati da je povećanje brzine oslobađanja karbamazepina iz ispitivanih čvrstih disperzija posledica površinske aktivnosti korišćenih ekscipijenasa. Procenti oslobođenog karbamazepina nakon 30 minuta iz uzoraka F6, F9 i F16, znatno manji od 80%, ukazuju da udeli tj. međusobni odnosi karbamazepina i ekscipijenasa (*Gelucire*® 44/14 i *Soluplus*®) nisu odgovarajući, jer ne dovode do željenog oslobađanja aktivne supstance. I pored toga, procenti oslobođenog karbamazepina iz čvrstih disperzija su veći u poređenju sa čistom supstancom (41,56 %, nakon 30 min) i komercijalnim tabletama (30,36 %, nakon 30 min). Nakon 90 i 120 minuta se ne uočavaju značajne razlike u brzini rastvaranja karbamazepina (Tabela 2.), pa se vrednosti procenta oslobođenog karbamazepina nakon 60-og minuta nisu koristile kao izlazni parametri za modelovanje u eksperimentalnom dizajnu.

3. 2. Modelovanje uticaja ulaznih na izlazne parametre primenom metode dizajna smeše

Primenom metode D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše, izvršen je izbor regresionog modela, koji prema statističkim parametrima najbolje opisuje vezu između ulaznih i izlaznih parametara. Na osnovu poređenja statističkih parametara (pomenutih u delu: Materijali), odabran je kubni model, koji je najviše odgovarao zahtevima za izlazni parametar R_1 (procenat rastvorenog karbamazepina nakon 10 minuta) (Tabela 3.). Prilikom primene regresionih modela isprobane su linearna i kvadratna funkcija, međutim na osnovu dobijenih profila brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija nije ni bilo očekivano dobro uklapanje u ove modele, na šta ukazuju i niske vrednosti koeficijenta determinacije za ova dva modela (Tabela 3.).

Tabela 3. Prikaz statističkih parametara za izbor regresionog modela za R_1 (procenat rastvorenog karbamazepina nakon 10 minuta)
Table 3. Presentation of statistical parameters for selecting a regression model for R_1 (percentage of dissolved carbamazepine after 10 minutes)

| Model | Standardna devijacija | R^2 | Prilagođeni R^2 | PRESS |
|------------------|-----------------------|---------------|-------------------|----------------|
| Linearni | 8,93 | 0,3365 | 0,2344 | 1402,84 |
| Kvadratni | 7,96 | 0,5941 | 0,3911 | 1814,92 |
| Specijalni kubni | 4,67 | 0,8743 | 0,7905 | 723,03 |
| Kubni | 1,59 | 0,9903 | 0,9757 | 1368,88 |

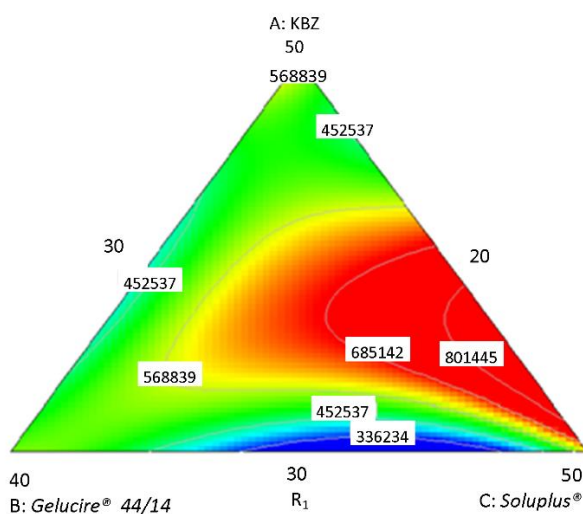
Nakon dobijanja regresionog modela vršeno je isključivanje parametara, koji nemaju statističku značajnost ($p > 0,05$). Za izlazni parametar R_1 (procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10 minuta) isključen je koeficijent uz parametar AB(A-B), čiji je $p = 0,7204$. Uticaj svih ostalih parametara je bio statistički značajan. U tabeli S1 (Prilog) prikazana je statistička značajnost parametara pre i nakon isključivanja parametra AB(A-B) koji nema statistički značaj.

Nakon toga je dobijena jednačina, na osnovu koje je moguće za bilo koje vrednosti ulaznih parametara, a u okviru postavljenih graničnih vrednosti, predvideti procenat rastvorenog karbamazepina nakon 10 minuta. Statistički parametri ove jednačine su $p < 0,0001$ i $F = 87,06$, a ona glasi:

$$R_1 = 60,76A + 53,03B + 62,69C - 57,81AB + 39,90AC - 124,23BC + 639,92ABC - 235,24AC(A-C) + 132,67BC(B-C) \quad (8)$$

Na slici 1. prikazan je 2D trokomponentni dijagram, koji opisuje uticaj ulaznih parametara na izlazni parametar R_1 . Sa ovog dijagrama se može uočiti da se udelima *Soluplus*[®] u formulaciji od oko 45% i *Gelucire*[®] 44/14 od oko 25 % povećava procenat rastvorenog karbamazepina nakon 10 minuta.

Najveći procenat rastvorenog karbamazepina, nakon 10 minuta, dobija se sa udelom ove supstance od oko 40 % u formulaciji, dok je pri udelima karbamazepina od oko 30 % ili oko 50 % manji procenat rastvorene supstance (Slika 1.). Ovakava zavisnost uočava se i nakon 20, 30, 45 i 60 minuta. Povećanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija koje sadrže *Soluplus*[®] i *Gelucire*[®] 44/14, verovatno je posledica boljeg kvašenja lekovite supstance, kao i njene solubilizacije ekscipijensima [16].



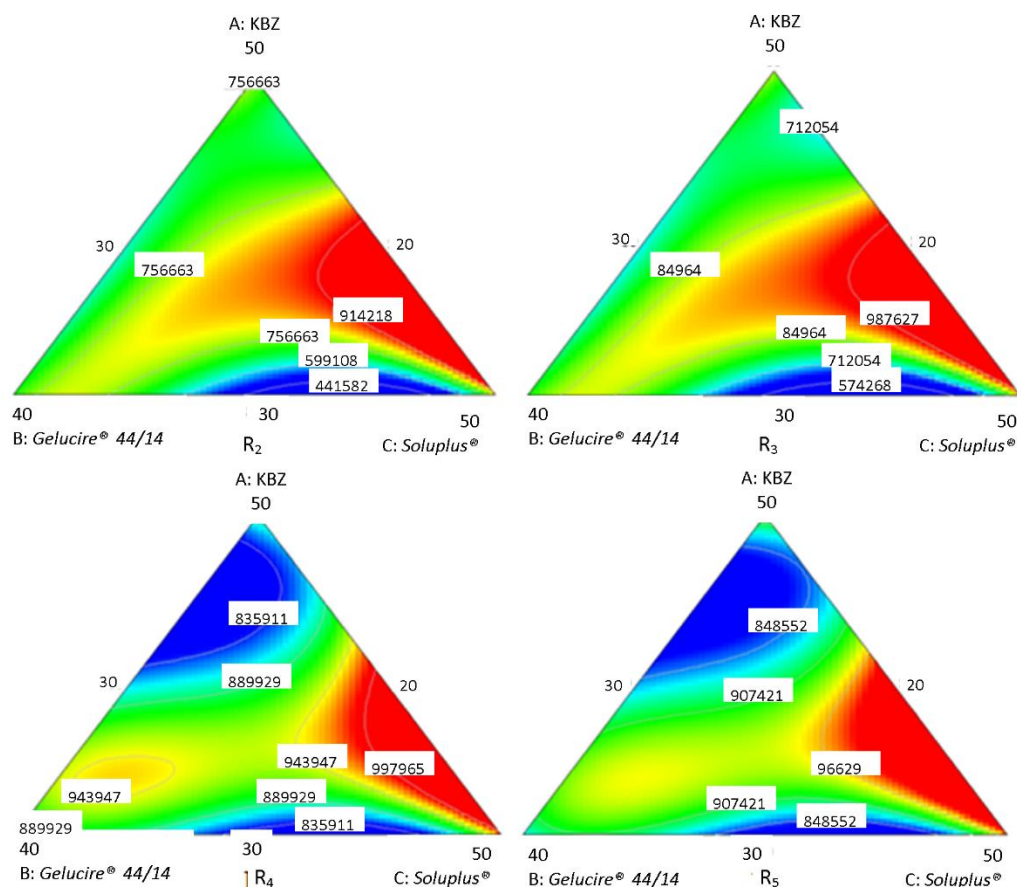
Slika 1. 2D trokomponentni dijagram koji opisuje uticaj ulaznih parametara na R_1 . Na temena trouglova predstavljene su maksimalne vrednosti ispitivanih parametara, dok se na sredinama naspramnih stranica nalaze minimalne vrednosti. Crveni, žuti, zeleni, svetlo plavi i tamno plavi regioni predstavljaju regione u kojima su postignuti različiti procenti oslobođenog karbamazepina, od najvišeg (crveni) ka najnižem (tamno plavi)
Figure 1. 2D ternary diagram which describes the effect of input parameters on R_1 . The maximum values of the tested parameters are presented on the triangle vertex, while the minimal values are presented in the center of the contrary sides. Red, yellow, green, light blue and dark blue regions represent regions where different percentages of released carbamazepine have been achieved, from the highest (red) to the lowest value (dark blue), respectively.

Za ostale izlazne parametre ($R_2 - R_5$) odabrani regresioni model bio je takođe kubni, a dobijene su jednačine, čije su vrednosti faktorskih efekata i njihovi statistički parametri prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Vrednosti faktorskih efekata i njihovi statistički parametri za izlazne parametre $R_2 - R_5$
 Table 4. Values of factor effects, and their statistical parameters for output parameters $R_2 - R_5$

| | R_2 | R_3 | R_4 | R_5 |
|---|---------|---------|---------|---------|
| A | +78,67 | +85,30 | +90,43 | +93,41 |
| B | +70,95 | +79,57 | +87,31 | +87,81 |
| C | +85,42 | +93,88 | +98,38 | +99,41 |
| AB | -50,59 | -42,78 | -16,71 | -24,49 |
| AC | +68,08 | +54,49 | +25,77 | +21,22 |
| BC | -146,39 | -127,33 | -44,88 | -47,95 |
| ABC | +573,90 | +504,94 | +130,63 | +155,06 |
| AB(A-B) | / | / | -88,81 | -82,33 |
| AC(A-C) | -281,97 | -259,30 | -99,20 | -130,66 |
| BC(B-C) | +261,15 | +228,41 | +71,52 | +79,88 |
| Statistički parametri odabranih (kubnih) modela | | | | |
| p | 0,0003 | 0,0003 | 0,0001 | <0,0001 |
| F | 21,38 | 20,84 | 41,19 | 75,98 |

Na slici 2. prikazani su 2D trokomponentni dijagrami, koji opisuju uticaj ulaznih parametara na R_2 , R_3 , R_4 i R_5 (procenat rastvorenog karbamazepina nakon 20, 30, 45 i 60 minuta).

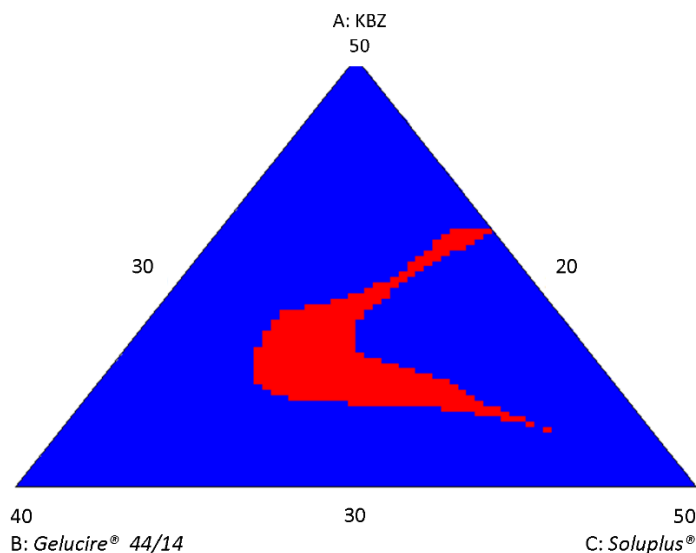


Slika 2. 2D trokomponentni dijagrami koji opisuju uticaj ulaznih parametara na R_2 (gore levo), R_3 (gore desno), R_4 (dole levo) i R_5 (dole desno). Na temena trouglova predstavljene su maksimalne vrednosti ispitivanih parametara, dok se na sredinama naspramnih stranica nalaze minimalne vrednosti. Crveni, žuti, zeleni, svetlo plavi i tamno plavi regioni predstavljaju regione u kojima su postignuti različiti procenti oslobođenog karbamazepina, od najvišeg (crveni) ka najnižem (tamno plavi)

Figure 2. 2D ternary diagram which describes the effect of input parameters on R_2 (up left), R_3 (up right), R_4 (down left) i R_5 (down right). The maximum values of the tested parameters are presented on the triangle vertex, while the minimal values are presented in the center of the contrary sides. Red, yellow, green, light blue and dark blue regions represent regions where different percentages of released carbamazepine have been achieved, from the highest (red) to the lowest value (dark blue), respectively

3. 3. Optimizacija formulacija čvrstih disperzija

Trokomponentni dijagram (Slika 3.) pokazuje oblast u kojoj se ukrštaju zadate vrednosti odgovora, postavljene tokom optimizacije. Kompiuterski program *Design Expert*® je u okviru ove oblasti predvideo 22 formulacije, čiji su sastavi (udeli komponenti) i predviđene vrednosti izlaznih parametara prikazani u tabeli 5.



Slika 3. 2D trokomponentni dijagram sa regionom (označenom crvenom bojom) u okviru koga se nalaze optimalne formulacije. Na temena trouglova predstavljene su maksimalne vrednosti ispitivanih parametara, dok se na sredinama naspramnih stranica nalaze minimalne vrednosti.

Figure 3. 2D ternary diagram with the region (marked in red) indicating optimal formulations. The maximum values of the tested parameters are presented on the triangle vertex, while the minimal values are presented in the center of the contrary sides.

Tabela 5. Formulacije čvrstih disperzija predložene kompiuterskim programom *Design Expert*® (sastav i vrednosti izlaznih parametara)

Table 5. Formulations of optimal solid dispersions proposed by computer program *Design Expert*® (the composition and values of the output parameters)

| Oznaka formulacije | Ulazni parametri | | | Izlazni parametri | | | | |
|--------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Sadržaj karbamzepina, % | Sadržaj Gelucire® 44/14, % | Sadržaj Soluplus®, % | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
| O1 | 33,92 | 26,24 | 39,84 | 62,80 | 78,63 | 87,07 | 93,35 | 94,56 |
| O2 | 36,90 | 27,13 | 35,97 | 65,55 | 84,47 | 91,32 | 92,40 | 92,95 |
| O3 | 39,15 | 24,59 | 36,26 | 65,67 | 84,39 | 90,69 | 90,59 | 90,96 |
| O4 | 35,30 | 30,33 | 34,37 | 60,53 | 81,84 | 89,23 | 93,80 | 94,10 |
| O5 | 38,66 | 25,11 | 36,23 | 66,08 | 84,72 | 91,12 | 90,97 | 91,41 |
| O6 | 37,91 | 25,99 | 36,10 | 66,13 | 84,78 | 91,37 | 91,54 | 92,04 |
| O7 | 33,56 | 25,39 | 41,05 | 62,44 | 77,39 | 86,16 | 93,52 | 94,91 |
| O8 | 35,69 | 26,77 | 37,54 | 66,64 | 84,69 | 91,84 | 93,64 | 94,54 |
| O9 | 40,94 | 21,62 | 37,44 | 63,68 | 84,90 | 90,49 | 92,46 | 92,49 |
| O10 | 36,20 | 27,60 | 36,20 | 65,28 | 84,28 | 91,30 | 93,02 | 93,64 |
| O11 | 34,52 | 29,84 | 35,64 | 61,16 | 81,79 | 89,37 | 93,85 | 94,41 |
| O12 | 34,67 | 28,71 | 36,62 | 62,66 | 81,95 | 89,56 | 93,57 | 94,29 |
| O13 | 36,87 | 26,85 | 36,28 | 66,15 | 84,89 | 91,71 | 92,57 | 93,18 |
| O14 | 35,28 | 29,64 | 35,08 | 61,85 | 82,51 | 89,86 | 93,67 | 94,11 |
| O15 | 36,27 | 29,03 | 34,70 | 62,27 | 82,55 | 89,72 | 92,81 | 93,15 |
| O16 | 35,90 | 29,77 | 34,33 | 61,09 | 81,94 | 89,23 | 93,23 | 93,50 |
| O17 | 37,22 | 26,81 | 35,97 | 65,75 | 84,58 | 91,35 | 92,11 | 92,65 |
| O18 | 33,78 | 24,83 | 41,39 | 61,82 | 80,18 | 88,61 | 94,48 | 96,01 |
| O19 | 35,49 | 29,28 | 35,23 | 62,45 | 82,80 | 90,08 | 93,49 | 93,96 |
| O20 | 34,12 | 29,08 | 36,80 | 61,02 | 80,40 | 88,29 | 93,43 | 94,17 |
| O21 | 41,56 | 21,32 | 37,12 | 61,05 | 82,32 | 88,01 | 91,67 | 91,45 |
| O22 | 37,98 | 27,44 | 34,58 | 62,53 | 81,91 | 88,85 | 90,56 | 90,81 |

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅: procenat rastvorenog karbamzepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 minuta.

3. 4. Ispitivanja odabranih optimizovanih formulacija čvrstih disperzija

Radi procene uspešnosti predviđanja, iz različitih delova optimizacione oblasti odabrane su tri formulacije čvrstih disperzija (O2, O4 i O21; Tabela 5.), koje su izrađene na prethodno opisan način i iz kojih je ispitana *in vitro* brzina rastvaranja karbamazepina.

Predviđeni i eksperimentalno dobijeni procenti rastvorenog karbamazepina iz odabranih čvrstih disperzija prikazani su u tabeli 6. Na osnovu poređenja eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija i izračunatih vrednosti za faktore razlike f_1 i faktore sličnosti f_2 (Tabela 6.), uočava se veliko slaganje između predviđenih i dobijenih profila brzine rastvaranja lekovite supstance i zaključuje se da se ovi profili mogu smatrati sličnim, jer je $f_1 < 15$ i $f_2 > 50$ [14], kao i da nema statistički značajne razlike među njima.

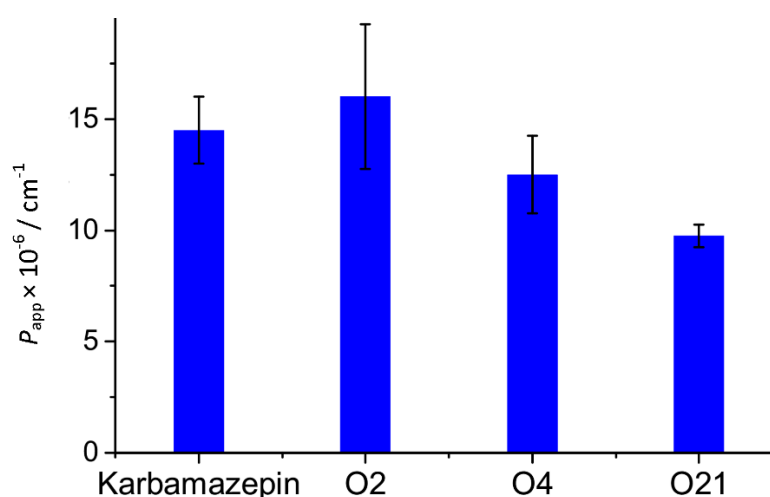
Tabela 6. Dobijeni i predviđeni sadržaj rastvorenog karbamazepina iz čvrstih disperzija, faktori razlike (f_1) i faktori sličnosti (f_2)

Table 6. Obtained and predicted percentages of dissolved carbamazepine from solid dispersions, the difference factors (f_1) and the similarity factors (f_2)

| | Sadržaj rastvorenog karbamazepina, % | | | | | |
|-------|--------------------------------------|------------|----------------|------------|-----------------|------------|
| | Formulacija O2 | | Formulacija O4 | | Formulacija O21 | |
| | dobijeno | predviđeno | dobijeno | predviđeno | dobijeno | predviđeno |
| 10 | 59,21 | 63,19 | 61,61 | 61,12 | 54,55 | 60,17 |
| 20 | 78,22 | 81,97 | 75,82 | 75,81 | 78,74 | 80,57 |
| 30 | 88,70 | 89,60 | 85,90 | 85,30 | 88,18 | 87,84 |
| 45 | 93,42 | 93,52 | 96,45 | 94,86 | 94,21 | 91,65 |
| 60 | 96,55 | 94,31 | 98,76 | 96,56 | 96,19 | 91,78 |
| f_1 | 2,64 | | 1,17 | | 3,58 | |
| f_2 | 88,12 | | 96,02 | | 83,93 | |

3. 5. Procena permeabilnosti karbamazepina

Rezultati ispitivanja permeabilnosti karbamazepina (PAMPA test) iz ispitivanih formulacija i čistog karbamazepina dati su na slici 4. Dobijena vrednost koeficijenta permeabilnosti za čist karbamazepin ($14,52 \pm 1,50 \times 10^{-6}$ cm/s) bila je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima u sličnim ispitivanjima [8, 13, 15]. Rezultati PAMPA testa pokazuju da je postignuto izvesno povećanje permeabilnosti karbamazepina iz formulacije O2 ($16,18 \pm 3,17 \times 10^{-6}$ cm/s), dok je permeabilnost neznatno smanjena u slučaju uzorka O4 ($12,41 \pm 1,88 \times 10^{-6}$ cm/s), ali ove razlike nisu statistički značajne ($p > 0,05$). Permeabilnost karbamazepina iz formulacije O21 je značajno smanjena ($9,71 \pm 0,61 \times 10^{-6}$ cm/s) ($p < 0,05$), što može biti posledica najnižeg udela *Gelucire*® 44/14 u ovoj formulaciji. Ovaj ekscipijens verovatno stupa u interakciju sa veštačkom membranom, pa se može pretpostaviti da se sa smanjenjem njegove koncentracije smanjuje i propustljivost membrane, a sa tim i permeabilnost karbamazepina iz navedenog uzoraka čvrste disperzije [17].



Slika 4. Rezultati PAMPA testa za prašak karbamazepina i tri odabrane optimizovane formulacije (O2, O4 i O21) (P_{app} - koeficijent permeabilnosti)

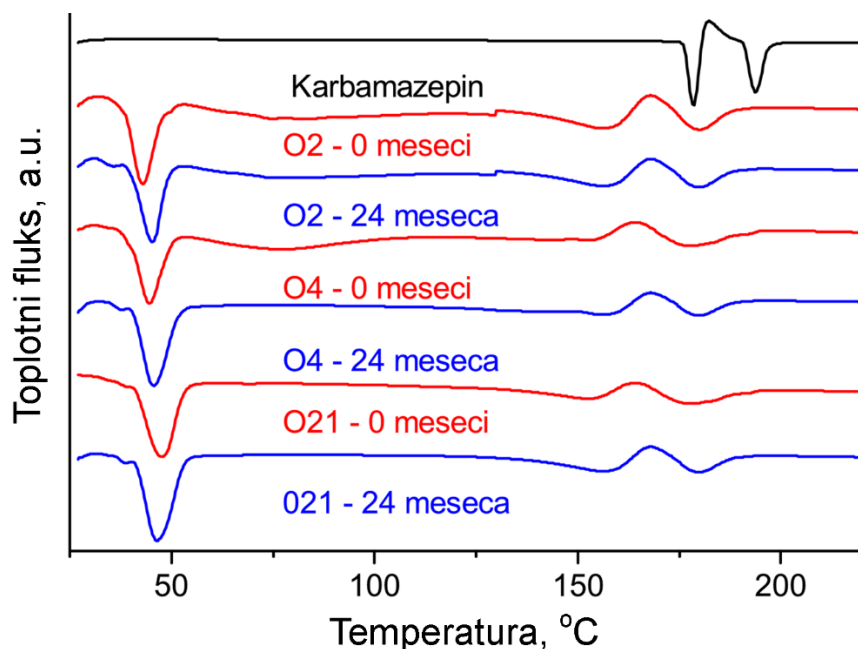
Figure 4. Results of the PAMPA test for carbamazepine powder and three selected optimized formulations (O2, O4 i O21) (P_{app} - permeability coefficient)

Rezultati ove studije idu u prilog osnovnoj pretpostavci da prilikom razvoja formulacija sa teško rastvorljivom lekovitom supstancom treba postići kompromis između brzine rastvaranja, sa jedne, i permeabilnosti, sa druge strane. Dobra rastvorljivost lekovite supstance u vodenoj sredini gastrointestinalnog trakta je skoro uvek preduslov za dobru

bioraspoloživost lekovite supstance nakon peroralne primene. Međutim, tokom izrade formulacija u kojima se povećava rastvorljivost lekovitih supstanci, može doći do promene permeabilnosti, odnosno uticaja na resorpciju [12]. Prilikom povećanja brzine rastvaranja lekovite supstance, najčešće dolazi do formiranja struktura koje su veće od molekula same lekovite supstance. Veličina čestica je važan faktor koji utiče na resorpciju lekovite supstance, naročito onih koje su teško rastvorljive u vodi ili biološkim tečnostima. Kao posledica formiranja struktura koje su veće od molekula same lekovite supstance, može nastati problem sa permeabilnošću aktivne supstance iz ovakvih formulacija. Takođe, primena površinski aktivnih materija za povećanje rastvorljivosti lipofilnih lekovitih supstanci, koje pokazuju visoku permeabilnost, kakav je i sam karbamazepin (BSK klasa II), usled solubilizacije lekovite supstance primenom površinski aktivne materije može doći do smanjenja slobodne frakcije lekovite supstance, što posledično vodi smanjenju permeabilnosti, što verovatno jeste još jedan od razloga za smanjenje permeabilnosti iz formulacije O21. Iz svega navedenog, može se smatrati da su formulacije čvrstih disperzija O2 i O4 prihvatljive, jer je postignuta ravnoteža između brzine rastvaranja i permeabilnosti karbamazepina [13,18].

3. 6. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Na DSC krivoj čistog karbamazepina (Slika 5), na osnovu karakterističnih pikova, može se zaključiti da je karbamazepin u polimorfnom obliku III, jedinom farmakološki aktivnom obliku [19-21]. Na to ukazuje endotermni pik na oko 178 °C, koji je posledica topljenja polimorfnog oblika III karbamazepina, a egzotermni pik na oko 181 °C predstavlja rekristalizaciju polimorfnog oblika III karbamazepina u polimorfni oblik I. Topljenje polimorfnog oblika I je verovatno uzrok pojave endoternog pika na 194 °C. Karakteristični pikovi topljenja polimorfnog oblika III karbamazepina u temperaturnom opsegu od 150 do 180 °C [7,19,20] su uočeni na DSC krivama svih ispitivanih formulacija, kako u trenutku izrade, tako i nakon 24 meseca čuvanja pod ambijentalnim uslovima. Uočavaju se na gotovo svim DSC krivama i endotermni pikovi topljenja polimorfnog oblika I, međutim rekristalizacioni egzotermni pikovi prelaska polimorfnog oblika III u polimorfni oblik I nisu uočeni na svim DSC krivama. Izostajanje egzotermnih pikova prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik I su verovatno posledica malog udela lekovite supstance u uzorku i prisustva ekscipijenasa u formulaciji. Takođe, na DSC krivama ispitivanih formulacija uočavaju se i endotermni pikovi topljenja u opsegu temperatura od 40 do 50 °C, koji su verovatno posledica topljenja *Gelucire*® 44/14, prisutnog u formulacijama. Rezultati DSC analize ukazuju da je karbamazepin u svim ispitivanim formulacijama prisutan u polimorfnom obliku III i da su uzorci stabilni tokom dvogodišnjeg čuvanja.



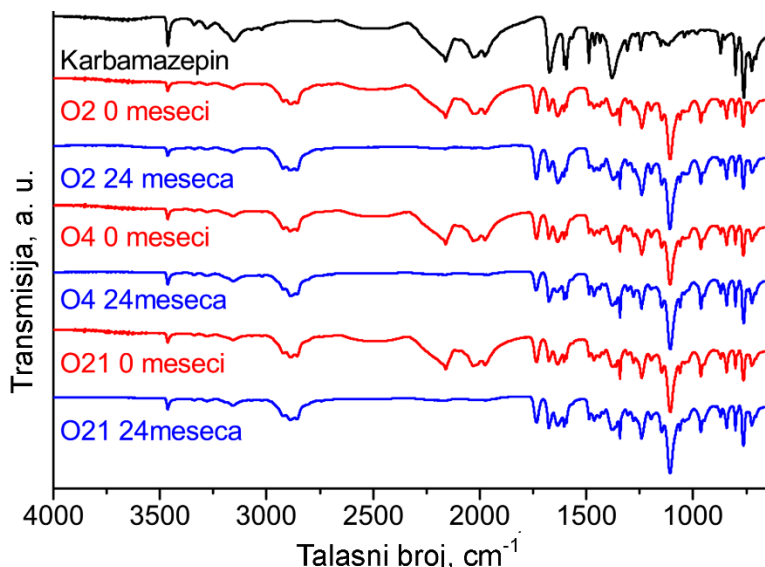
Slika 5. DSC krive karbamazepina i ispitivanih uzoraka O2, O4 i O21 nakon izrade i nakon 24 meseca

Figure 5. DSC curve of carbamazepine and investigated samples O2, O4 i O21 initially after preparation and after 24 months

3. 7. Infracrvena spektroskopija sa Furjeovom transformacijom

Na spektru čistog karbamazepina (Slika 6.) se uočavaju karakteristične trake na 3462 cm^{-1} (–NH valenciona vibracija), 1674 cm^{-1} (–CO–R vibracija), 1593 cm^{-1} i 1605 cm^{-1} (opseg za –C=C– i –C=O vibraciju i –NH deformaciju), što takođe ukazuje da je on u polimorfnom obliku III [22, 23]. U tri izrađene optimizovane formulacije se takođe uočavaju ove karakteristične trake, što ukazuje da nije došlo do interakcije između karbamazepina i ekscipijenasa i da je karbamazepin ostao u polimorfnom obliku III. Nakon čuvanja uzoraka 24 meseca pod ambijentalnim uslovima, takođe se uočavaju

karakteristične trake na spektru ovih formulacija. I ovi rezultati idu u prilog tome da je karbamazepin i nakon navedenog vremenskog perioda ostao u kristalnom polimorfnom obliku III.



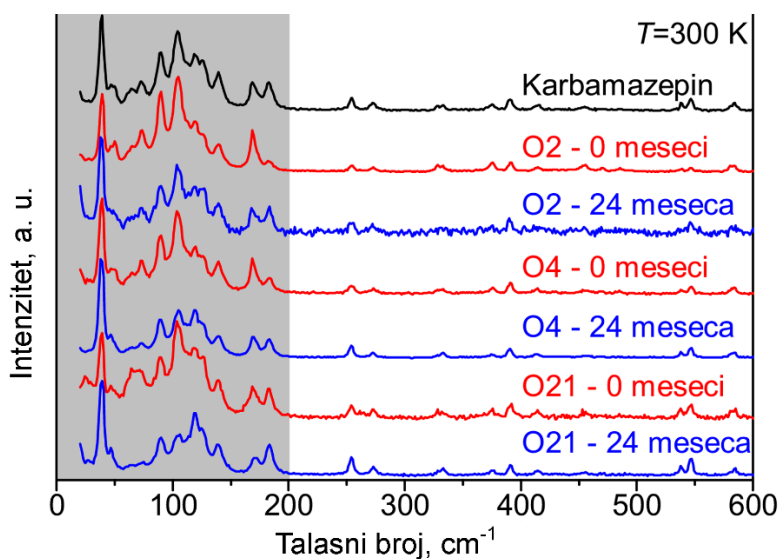
Slika 6. FT-IR spektri karbamazepina i ispitivanih uzoraka O2, O4 i O21 nakon izrade i nakon 24 meseca

Figure 6. FT-IR spectra of pure carbamazepine and investigated samples O2, O4 i O21 initially after preparation and after 24 months

3. 8. Ramanska spektroskopija

Na slici 7. prikazani su spektri Ramanovog rasejanja karbamazepina i tri odabrane optimizovane formulacije, nakon izrade i nakon 24 meseca čuvanja pod ambijentalnim uslovima.

U molekularnom kristalu, generalno, mogu se razlikovati dva spektralna opsega Ramanovog rasejanja, visoko energetske (konvencionalni) opseg, koji se sastoji od intramolekulskih vibracija i nisko energetske opseg (ispod 200 cm^{-1}) u kojem dominiraju intermolekulske vibracije (Slika 7) [24]. Iako visoko energetske opseg takođe može nositi informaciju vezanu za kristalnu strukturu, uočene promene između različitih polimorfnih oblika su obično male i često ograničene na varijacije u intenzitetu Ramanskih pikova. Istraživanje nisko energetske opsega pruža direktan uvid u kristalnu strukturu materijala [24]. U Ramanskim spektrima prisutni su svi karakteristični pikovi polimorfnog oblika III karbamazepina, sa naglaskom na pikove na oko 40 , 91 i 141 cm^{-1} [25, 26]. Isti pikovi su prisutni i u uzorcima nakon 24 meseca, čime se potvrđuje očuvanje polimorfnog oblika III i stabilnost izrađenih formulacija nakon 24 meseca čuvanja. Varijacije u relativnim intenzitetima Ramanskih pikova posledica su različite orijentacije kristalita.



Slika 7. Ramanski spektri karbamazepina i ispitivanih uzoraka O2, O4 i O21 nakon izrade i nakon 24 meseca

Figure 7. Raman scattering spectra of carbamazepine and investigated samples O2, O4 i O21 initially after preparation and after 24 months

Rezultati ispitivanja, dobijeni primenom tri tehnike karakterizacije (DSC, FT-IR i Ramanska spektroskopija) su u saglasnosti i potvrđuju da je karbamazepin u uzorcima ostao u polimorfnom obliku III, kao i da su tri odabrane formulacije stabilne nakon 24 meseca čuvanja pod ambijentalnim uslovima.

4. ZAKLJUČAK

Primenom metode eksperimentalnog dizajna smeše, formulisane su čvrste disperzije variranjem udela karbamazepina, *Gelucire*[®] 44/14 i polimera *Soluplus*[®]. Rezultati ispitivanja *in vitro* brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija su pokazali da je postignuto povećanje procenta rastvorenog karbamazepina iz čvrstih disperzija, u odnosu na čistu supstancu i komercijalne tablete sa trenutnim oslobađanjem. Najveće vrednosti procenta oslobođenog karbamazepina dobijene su pri udelima karbamazepina od oko 35 – 40 %, *Gelucire*[®] 44/14 od oko 25 – 30 % i *Soluplus*[®] od oko 35 – 40 %. Na osnovu dobijenih rezultata matematičke regresije, sa velikom tačnošću se može predvideti procenat rastvorenog karbamazepina, za bilo koju kombinaciju ulaznih parametara, u ispitivanom opsegu.

Poređenjem eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila brzine rastvaranja karbamazepina iz tri izrađene optimizovane formulacije čvrstih disperzija, uočava se veliko slaganje ($f_1 < 15$; $f_2 > 50$).

Primenom PAMPA testa je pokazano da je u dve, od tri ispitivane optimizovane čvrste disperzije očuvana, odnosno blago povećana permeabilnost karbamazepina.

Rezultati ispitivanja uzoraka čvrstih disperzija nakon izrade, kao i nakon skladištenja 24 meseca, dobijeni primenom metoda DSC, FT-IR i Ramanske spektroskopije su potvrdili njihovu stabilnost i očuvanje karbamazepina u polimorfnom obliku III, jedinom farmakološki aktivnom obliku.

Zahvalnica: Ovaj rad je realizovan u okviru projekata TR34007 i ON171032, koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] Potta S, Minemi S, Nukala N, Peinado C, Lamprou DA, Urquhart A, Douroumis D. Development of solid lipid nanoparticles for enhanced solubility of poorly soluble drugs. *J Biomed Nanotechnol.* 2010; 6: 634–640.
- [2] Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50: 47–60.
- [3] Damian F, Blaton N, Naesens L, Balzarini J, Kinget R, Augustijns P, Vanden Mooter G. Physicochemical characterization of solid dispersions of the antiviral agent UC-781 with polyethylene glycol 6000 and Gelucire 44/14. *Eur J Pharm Sci.* 2000; 10: 311–322.
- [4] Kalivoda A, Fischbach M, Kleinebudde P. Application of mixtures of polymeric carriers for dissolution enhancement of oxeglitazar using hotmelt extrusion. *Int J Pharmaceut.* 2012; 439: 145–156.
- [5] Serajuddin A. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J Pharm Sci-US.* 1999; 88(10): 1058-1066.
- [6] Djuris J, Ioannis N, Ibric S, Djuric Z, Kachrimanis K. Effect of composition in the development of carbamazepine hot-melt extruded solid dispersions by application of mixture experimental design. *J Pharm Pharmacol.* 2014; 66 (2):232-243.
- [7] Krstić M, Ibrić S. Primena dizajna smeše u formulaciji i karakterizaciji čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. *Hem Ind.* 2016; 70(5): 525-537. (in Serbian)
- [8] Krstić M, Ražić S, Đekić Lj, Dobričić V, Momčilović M, Vasiljević D, Ibrić S. Application of a mixture experimental design in the optimization of the formulation of solid self-emulsifying drug delivery systems containing carbamazepine. *Lat Am J Pharm.* 2015; 34 (5): 885-894.
- [9] Dahan A, Miller MJ, Hoffman A, Amidon EG, Amidon LG. The solubility - permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone. *J Pharm Sci-US.* 2010; 99(6): 2739-2749.
- [10] Kataoka M, Tsuneishi S, Maeda Y, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. A new *in vitro* system for evaluation of passive intestinal drug absorption: Establishment of a double artificial membrane permeation assay. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014; 88(3): 840-846.
- [11] Kostewicz ES, Aarons L, Bergstrand M, Bolger MB, Galetin A, Hatley O, Jamei M, Lloyd R, Pepin X, Rostami-Hodjegan A, Sjögren E, Tannergren C, Turner DB, Wagner C, Weitschies W, Dressman J. PBPK models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* 2014; 57: 300-321.
- [12] Dahan A, Miller JM. The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. *AAPS J.* 2012; 14(2): 244-251.
- [13] Krstić M, Popović M, Dobričić V, Ibrić S. Influence of Solid Drug Delivery System Formulation on Poorly Water-Soluble Drug Dissolution and Permeability. *Molecules.* 2015; 20: 14684-14698.
- [14] Moore JW, Flanner HH. Mathematical Comparison of curves with an emphasis on *in vitro* dissolution profiles. *Pharm Tech.* 1996; 20(6): 64-74.
- [15] Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high-throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem.* 2002; 37: 399-407.
- [16] Shamma RN, Basha M. Soluplus[®]: A novel polymeric solubilizer for optimization of Carvedilol solid dispersion: Formulation design and effect of method of preparation. *Powder Technol.* 2013; 29(1): 161-165.
- [17] Porter C, Trevaskis N, Charman W. Nature Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 231-248.

- [18] Löbenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50: 3-12.
- [19] Grzesiak A, Lang M, Kim K, Matzger A. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. *J Pharm Sci-US.* 2003; 92: 2261-2271.
- [20] Yu L, Reutzel-Edens SM, Mitchell CA. Crystallization and Polymorphism of Conformationally Flexible Molecules: Problems, Patterns, and Strategies. *Org Process Res Dev.* 2000; 4(5): 396-402.
- [21] Krstić M, Ražić S, Vasiljević D, Spasojević Đ, Ibrić S. Application of experimental design in the examination of the dissolution rate of carbamazepine from formulations. Characterization of the optimal formulation by DSC, TGA, FT-IR and PXRD analysis. *J Serb Chem Soc.* 2015; 80(2): 209-222.
- [22] Rustichelli C, Gamberini G, Ferioli V, Gamberini MC, Ficarra R, Tommasini S. Solid-state study of polymorphic drugs: Carbamazepine. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 23(1): 41-54.
- [23] Kobayashi Y, Ito S, Itai S, Yamamoto K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *Int J Pharm.* 2000; 193: 137-146.
- [24] Lazarević J, Uskoković-Marković S, Jelikić-Stankov M, Radonjić M, Tanasković D, Lazarević N, Popović Z. Intermolecular and low-frequency intramolecular Raman scattering study of racemic ibuprofen. *Spectrochim Acta A.* 2014; 126: 301-305.
- [25] Saikat R, Chamberlin B, Matzger A. Polymorph Discrimination Using Low Wavenumber Raman Spectroscopy. *Org Process Res Dev.* 2013;17(7): 976-980.
- [26] Krstić M, Djurić J, Petrović O, Lazarević N, Cvijic S, Ibrić S. Application of the melt granulation technique in development of lipid matrix tablets with immediate release of carbamazepine. *J Drug Deliv Sci Tech.* 2017; 39: 467-474.

SUMMARY

Solid dispersions with carbamazepine: optimization of formulation, characterization and examination of long-term stability

Marko Krstić¹, Igor Lukić², Alma Bušatlić³, Nenad Lazarević⁴, Dragana Vasiljević¹

¹Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

²ASV Beograd d.o.o., Kumodraška 380, 11221 Belgrade, Serbia

³Adoc d. o. o., Milorada Jovanovića 11, 11030 Belgrade, Serbia

⁴Center for Solid State Physics and New Materials, Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Pregrevica 118, 11080 Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Solid dispersions are defined as dispersions of one or more active pharmaceutical ingredients in inert solid-state carriers. They are made with the aim to increase solubility and the dissolution rate of low solubility active pharmaceutical ingredients, with the subsequent increase in their bioavailability.

The aim of this study was the development and optimization of solid dispersion formulations with carbamazepine, using D-optimal experimental design, in order to increase the dissolution rate of the selected model drug. By using the method of experimental mixture design, solid dispersions were formulated by varying the ratio of carbamazepine (30-50 %), *Gelucire*® 44/14 (20-40 %) and *Soluplus*® polymer (30-50 %) (input parameters). Sixteen formulations were made and used for in vitro testing of the carbamazepine dissolution rate. The observed output parameters were the percentages of carbamazepine released after 10, 20, 30, 45, and 60 minutes. After the data analysis, three test formulations were chosen from different parts of the optimization area. They were prepared and the carbamazepine dissolution rate was determined, followed by stability assessment for 24 months under ambient conditions (25 °C, 40 % RH).

The highest dissolution rate of carbamazepine from solid dispersions (more than 80 % in 30 minutes) was achieved at the carbamazepine mass fraction of about 40 %, *Soluplus*® of about 45 % and *Gelucire*® 44/14 of about 25 %. Comparing the predicted and the experimental obtained release rate profiles of carbamazepine from the three prepared optimized formulations, a significant compliance of the results was observed ($f_1 < 15$; $f_2 > 50$). The application of the PAMPA (Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay) test has shown that carbamazepine permeability was maintained and mildly increased in two out of the three tested optimized solid state formulations. Raman spectroscopy, FT-IR and DSC analyses showed that in the three optimized solid dispersions, after preparation and 24 months of storage, interactions between carbamazepine and the excipients were not present and that carbamazepine remained in the single pharmacologically active crystal polymorph form III.

Proper selection of solid dispersion proportions of carbamazepine, *Gelucire*® 44/14 and *Soluplus*® may significantly increase the dissolution rate of the active substance, and the method of experimental mixture design can be successfully used for optimization of these formulations.

Keywords: solid dispersions, carbamazepine, formulation optimization, experimental design, in vitro release, physical stability