

Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti lijekova primjenom analitičkih tehnika: pregled istraživanja razvoja fiksne kombinacije 5-aminosalicilata i folne kiseline

M.-L. Jeličić*

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Uvođenjem fiksnih kombinacija lijekova potencijalni rizik od neadherencije nastoji se svesti na najmanju moguću mjeru, što je posebice važno kod pacijenata koji boluju od kroničnih bolesti. Razvoj takvog ljekovitog oblika složen je postupak u kojem važnu ulogu ima ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica predviđenih za izradu željenog proizvoda. U svrhu provedbe takvih studija često se primjenjuju različite analitičke tehnike, poput termoanalitičkih (DSC, DTA), spektroskopskih (FTIR, XRPD) te kromatografskih (HPLC) u kombinaciji s određenim studijama razgradnji, poput prisilne razgradnje i izotermalne razgradnje. U ovom radu, na primjeru razvoja fiksne kombinacije 5-aminosalicilata i folne kiseline, bit će opisani postupci prikladni za ispitivanje kompatibilnosti sastavnica lijeka kao i analitičke tehnike te razni načini interpretacije rezultata.

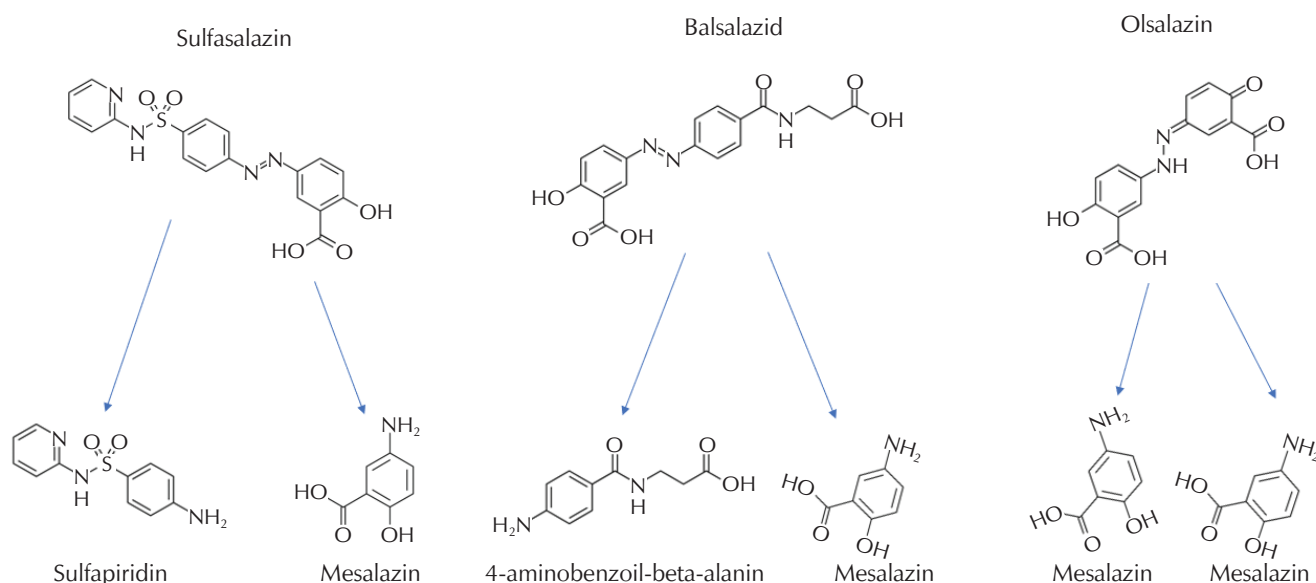
Ključne riječi

Fizikalno-kemijska kompatibilnost, analitičke tehnike, 5-aminosalicilati, folna kiselina, fiksne kombinacije

1. Uvod

Skupina protuupalnih lijekova pod nazivom 5-aminosalicilati upotrebljava se u ranoj fazi liječenja upalnih bolesti crijeva s ciljem postizanja remisije i sprječavanja relapsa bolesti.¹ U skupinu 5-aminosalicilata spadaju protuupalni lijek mesalazin, odnosno 5-aminosalicilna kiselina te njezina tri prolijeka; sulfasalazin, balsalazid i olsalazin (slika 1).

Terapijski učinak "prvog" 5-aminosalicilata, sulfasalazina, otkriven je početkom 19. stoljeća, a tek se naknadnim studijama utvrdilo da mesalazin, sastavnica njegove strukture djeluje protuupalno.^{2,3} Sulfasalazin se uspješno upotrebljava u liječenju upalnih bolesti crijeva još i danas, međutim poznato je da sulfapiridin, antibiotik vezan za mesalazin azo vezom, uzrokuje nuspojave kod gotovo trećine paci-



Slika 1 – Strukture 5-aminosalicilata te produkti enzimske razgradnje azoreduktazom

Fig. 1 – Structures of 5-aminosalicylates and products of enzymatic breakage with azoreductase

* Dr. sc. Mario-Livio Jeličić
e-pošta: mjeljelic@pharma.hr

jenata koji ga upotrebljavaju.⁴ Imajući na umu činjenicu da je mesalazin taj koji djeluje protuupalno, fokus znanstvenika usmjerio se na razvoj lijekova na bazi mesalazina, iako ni danas nije utvrđen točan mehanizam njegova protuupalnog djelovanja.^{5,6} Glavni nedostatak mesalazina je njegova izražena apsorpcija u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta, stoga su s ciljem zaustavljanja njegove prerane apsorpcije razvijeni prolijekovi balsalazid i olsalazin.⁷ Iz navedenog razloga, mehanizam djelovanja prolijekova temelji se na oslobađanju mesalazina u debelom crijevu pod utjecajem enzima azoreduktaze (slika 1).⁸ Prikazani prolijekovi pokazali su slabu apsorpciju u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava, čime je spriječena prerana apsorpcija mesalazina, a time i pojačan terapijski učinak samih lijekova.⁹

Neravnoteža unosa proteina i drugih nutrijenata glavna je posljedica upalnih bolesti crijeva i ponajprije je odgovorna za kroničan gubitak tjelesne težine. Folna kiselina, poznata i kao vitamin B9, sintetski je proizveden vitamin topljiv u vodi, koji se nalazi u hrani i dodacima prehrani. Ljudi nisu u stanju sintetizirati folate, stoga se prirodno dobivaju iz hrane, a važni su za sintezu i popravak DNA, interkonverziju aminokiselina, metilaciju te normalan rast stanica.¹⁰⁻¹² Nedostatak folata povećava rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze, megaloblastične anemije, karcinoma i neurodegenerativnih bolesti, dok nedostatak kod trudnica može uzrokovati malformacije na plodu.^{13,14} U dostupnoj literaturi postoje dokazi o uskoj povezanosti nedostatka folne kiseline i upalnih bolesti crijeva. Folna kiselina apsorbira se u tankom crijevu, koje može biti zahvaćeno Crohnovom bolešću, a zbog oštećenja stijenki crijeva onemogućena je njezina normalna apsorpcija. S druge strane, sulfasalazin je antagonist folne kiseline, odnosno inhibitor transportera folata, što dodatno doprinosi smanjenju koncentracije folne kiseline u organizmu pacijenta.¹⁵ Studije su pokazale da su koncentracije folne kiseline znatno niže kod pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva u odnosu na zdravu populaciju.¹⁶ Nedostatak folne kiseline kod pacijenata povezuje se s pojavom megaloblastične anemije, karcinoma debelog crijeva te malformacija na plodu kod trudnica, zbog čega se pacijentima koji boluju od upalnih bolesti crijeva propisuje folna kiselina uz redovitu terapiju.¹⁷⁻²⁰

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) adherencija predstavlja mjeru u kojoj ponašanje osobe (uzimanje lijekova, dijeta, i/ili provođenje promjena načina života), odgovara preporukama zdravstvenog djelatnika.²¹ Neaderencija je važan problem u liječenju upalnih bolesti crijeva te dovodi do neželjenih kliničkih ishoda, uključujući pojačanje simptoma bolesti, relaps, gubitak odgovora na anti-TNF agense, povećane zdravstvene troškove te veći morbiditet i smrtnost.²² Adherencija u pacijenata s kroničnim bolestima u razvijenim zemljama u prosjeku iznosi 50 %, dok u zemljama u razvoju postotak može biti i niži.²¹ Postoje mnogi načini kako potaknuti adherenciju pacijenata. Pojednostavljanje režima doziranja te prilagođavanje doze, fiksne kombinacije lijekova, uvođenje pomagala za adherenciju, poput kutija s lijekovima, zatim razgovor s liječnikom, lijekarnikom ili medicinskom sestrom te pristup informacijama o zdravstvenom odgoju na internetu i slanje podsjetnika putem pošte, e-pošte ili telefona, samo su neki od načina

na koji se može poboljšati adherencija.²³ Fiksne kombinacije lijekova dobar su način povećanja adherencije te su se pokazale kao logičan pristup kod liječenja bolesti koje zahtijevaju svakodnevno uzimanje više tableta istodobno te u konačnici smanjuju sveukupan broj farmaceutika o kojima pacijent svakodnevno mora voditi brigu.²⁴⁻²⁶

U ovom radu naglasak će biti na ispitivanju fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica kao jednog od najvažnijih koraka u ranoj fazi razvoja fiksne kombinacije lijekova.

2. Fiksne kombinacije lijekova

Fiksna kombinacija lijekova predstavlja jedan dozirni oblik (npr. tabletu ili kapsulu) koji sadrži dvije ili više aktivnih farmaceutskih tvari.²⁷ Prema Europskoj agenciji za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), definirane su potencijalne terapijske prednosti fiksnih kombinacija, poput poboljšano odgovora kod pacijenata s neadekvatnim odgovorom na monoterapiju te poboljšavanje sigurnost, pri čemu jedna djelatna tvar djeluje suprotno lijeku koji uzrokuje štetne reakcije.²⁸ Danas postoje mnoge kombinacije koje se uspješno primjenjuju u liječenju različitih bolesti, a neke od njih su kaptopril/hidroklorotiazid za hipertenziju, amoksisicilin/klavulanat kao antibiotik, ritonavir/lopinavir za liječenje HIV-a, rifampicin/izoniazid za liječenje tuberkuloze.²⁹

Razvoj fiksne kombinacije lijekova može se podijeliti u nekoliko glavnih skupina: razvoj dozirnog oblika, ispitivanje farmakokinetike i farmakodinamike te utvrđivanje kliničke učinkovitosti. Provedba farmakokinetičkih i farmakodinamičkih studija, odnosno studija kliničke učinkovitosti ovisi o svrsi primjene fiksne kombinacije u pacijenata. Tako razlikujemo primjenu fiksnih kombinacija u pacijenata koji imaju nedovoljan odgovor na monoterapiju, zamjenu lijekova u terapiji fiksnom kombinacijom ili inicijalno liječenje fiksnom kombinacijom. Osim ako se prisutnost ili odsutnost farmakokinetičke interakcije može utvrditi drugim dokazima, potrebno je provesti studije interakcije između aktivnih sastavnica u fiksnoj kombinaciji kao i nasumična kontrolirana klinička ispitivanja za dokazivanje superiornosti fiksne kombinacije nad zasebno primjenjivanim lijekovima.²⁸

Iako se u dostupnoj literaturi mogu pronaći radovi na temu razvoja fiksnih kombinacija, nedostadni su oni koji definiraju zahtjeve i uvjete za razvoj fiksnih kombinacija lijekova glede kvalitete samog proizvoda.³⁰⁻³² Svjetska zdravstvena organizacija jedina je organizacija koja je izdala smjernice za razvoj takvog proizvoda. Sam razvoj ne razlikuje se znatno od razvoja lijeka koji sadrži jednu aktivnu sastavnicu, međutim potrebno je napraviti niz dodatnih ispitivanja da bi se utvrdila sigurnost i učinkovitost novog proizvoda, a sama ispitivanja uglavnom se temelje na određivanju sadržaja, stabilnosti, fizikalno-kemijskih svojstava sastavnica te studija bioekvivalencije. Ispitivanja specifična za razvoj fiksnih kombinacija su sljedeća:

- fizikalno-kemijska svojstva čistih sastavnica i smjesa,
- kemijska i fizikalno-kemijska stabilnost aktivnih sastavnica te aktivnih sastavnica u interakciji s pomoćnim tvarima u formulaciji,

- definiranje razgradnih profila aktivnih sastavnica kad su istodobno izložene prisilnoj razgradnji,
- određivanje ujednačenosti sadržaja formulacije prije samog oblikovanja,
- provođenje studija oslobađanja lijekova iz dozirnih oblika,
- razvoj i validacija prikladnih analitičkih metoda za studije razgradnji i studije oslobađanja lijekova iz dozirnih oblika,
- definiranje proizvodnog procesa te kritičnih parametara i
- stabilitetne studije na pilot-formulacijama.

Obuhvaćanjem tih ispitivanja u postupku razvoja fiksne kombinacije osigurava se proizvod koji je u skladu sa specifikacijama, ujednačene kvalitete neovisno o proizvodnoj šarži, zadovoljavajuće fizikalno-kemijske stabilnosti te prikladnosti za stabilitetne studije i studije bioekvivalencije.³³

2.1. Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica

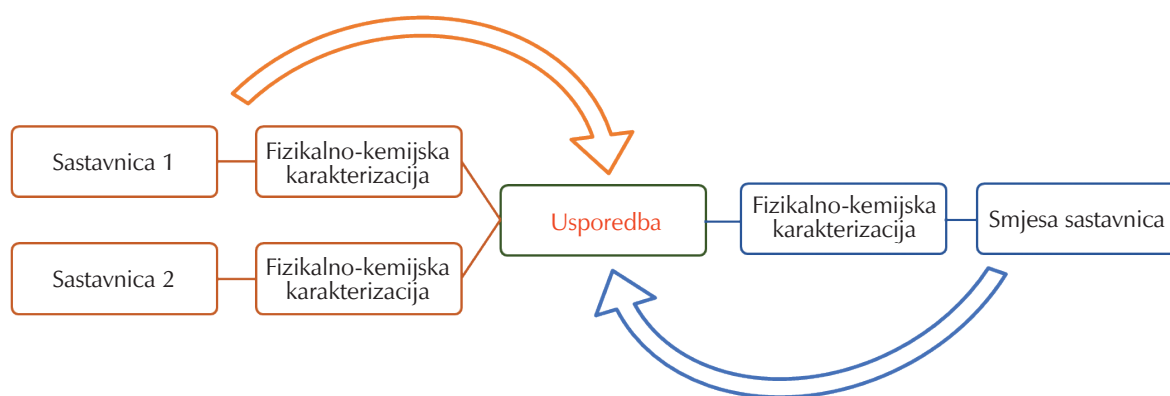
Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica igra važnu ulogu u razvoju lijekova, bilo u pitanju ispitivanja kompatibilnosti lijek-pomoćna tvar u razvoju formulacije koja sadrži jednu aktivnu tvar ili ispitivanje kompatibilnosti lijek-lijek za potrebe razvoja fiksne kombinacije. Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti u razvoju lijeka provodi se s ciljem razvoja stabilnog, sigurnog i učinkovitog lijeka. Stabilnost lijeka dolazi u obliku kemijske i fizikalne stabilnosti. Ispitivanjem kemijske stabilnosti dobivaju se podatci o potencijalnim kemijskim promjenama u lijeku koje mogu rezultirati smanjenjem učinkovitosti lijeka, ali i nastajanjem toksičnih produkata. Nadalje, ispitivanjem fizikalne stabilnosti uočavaju se promjene fizikalnih karakteristika, poput boje, okusa i mirisa, ali i promjene u strukturi samog lijeka, poput promjene polimornog oblika, hidracije/dehidracije, solvatacije i sličnih, koji u konačnici mogu utjecati na bioraspoloživost samog lijeka.^{34,35} U svrhu ispitivanja fizikalno-kemijske stabilnosti aktivnih sastavnica u procesu razvoja fiksne kombinacije uspješno se pri-

mjenjuju razne kromatografske, termalne i spektroskopske tehnike.³⁶⁻⁴²

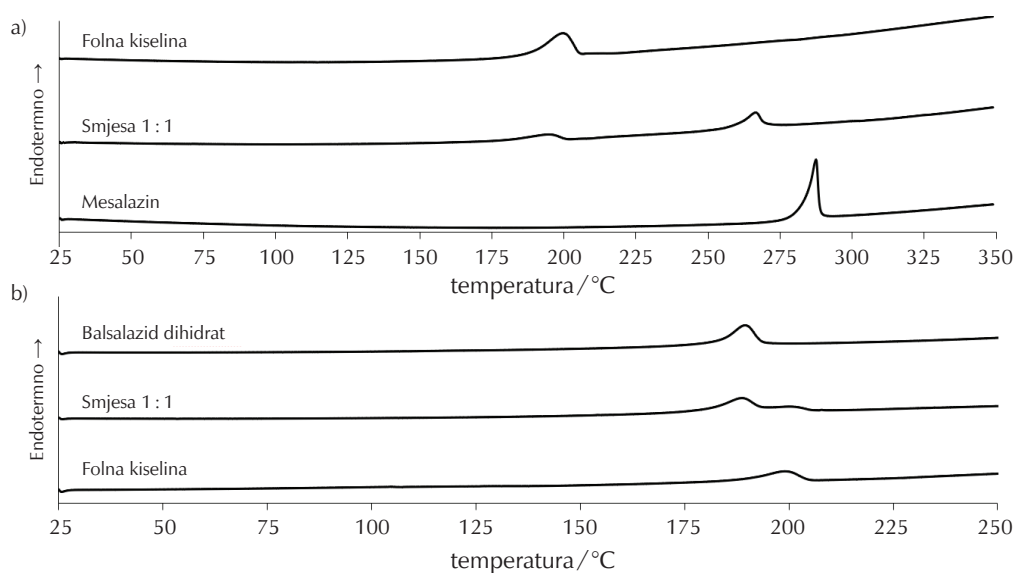
Princip ispitivanja fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica naizgled je jednostavan iako interpretacija rezultata ne dovodi uvijek do jednoznačnih rezultata. Utvrđivanje kompatibilnosti temelji se na usporedbi rezultata dobivenih provođenjem studija te primjenom raznih tehnika s ciljem fizikalno-kemijske karakterizacije čistih sastavnica i njihovih smjesa (slika 2).

2.2. Termalne tehnike

Jedne od prvih tehnika koje se primjenjuju u ispitivanju kompatibilnosti su termalne tehnike poput diferencijalne pretražne kalorimetrije (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) i diferencijalne termalne analize (engl. *Differential Thermal Analysis*, DTA) zbog jednostavnog i brzog uvida u moguće promjene u pripremljenim smjesama ispitivanih spojeva.^{43,44} Binarne smjese su najispitivnije te se mogu pripremati u omjerima u korist jedne i druge sastavnice. Međutim, da bi se pojačao intenzitet mogućih reakcija te ostvarila bolja vizualizacija promjena, zbog niske osjetljivosti navedenih instrumenata, poželjno je pripremati smjese u omjeru 1 : 1.^{43,45} Potencijalne interakcije u takvim sustavima mogu se pratiti kao pomaci specifičnih pikova, poput endotermnih pikova tališta, kao i promjene u entalpijama u dobivenim termogramima smjesa u odnosu na termograme čistih sastavnica.^{38,46-48} Iako nedostaju službeni kriteriji koji definiraju nekompatibilnost sastavnica, najčešće se prati pomak karakterističnog pika tališta, pri čemu se pomak veći od 5,0 °C smatra značajnom promjenom koja ukazuje na potencijalnu interakciju sastavnica. Također, nužno je pratiti i oblike krivulja kao i pojavu novih, a u nekim slučajevima uspoređuje se i površina ispod krivulja.⁴⁴ Termalne tehnike jednostavne su i brze. Međutim, zbog zagrijavanja uzoraka na visoke temperature, često dolazi do interakcija koje se u stvarnim uvjetima ne bi dogodile, stoga zaključke donesene na temelju termoanalitičkih mjerenja treba potvrditi primjenom drugih komplementarnih tehnika poput onih spektroskopskih ili uvođenjem drugih studija.^{43,49,50}



Slika 2 – Shema provedbe ispitivanja fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica
Fig. 2 – Scheme describing principle of physicochemical compatibility determination



Slika 3 – DSC termogrami čistih sastavnica i smjesa a) mesalazina i folne kiseline, b) balsalazid dihidrata i folne kiseline

Fig. 3 – DSC thermogram of pure compounds and 1 : 1 blends of a) mesalazine and folic acid, and b) balsalazide dihydrate folic acid

2.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

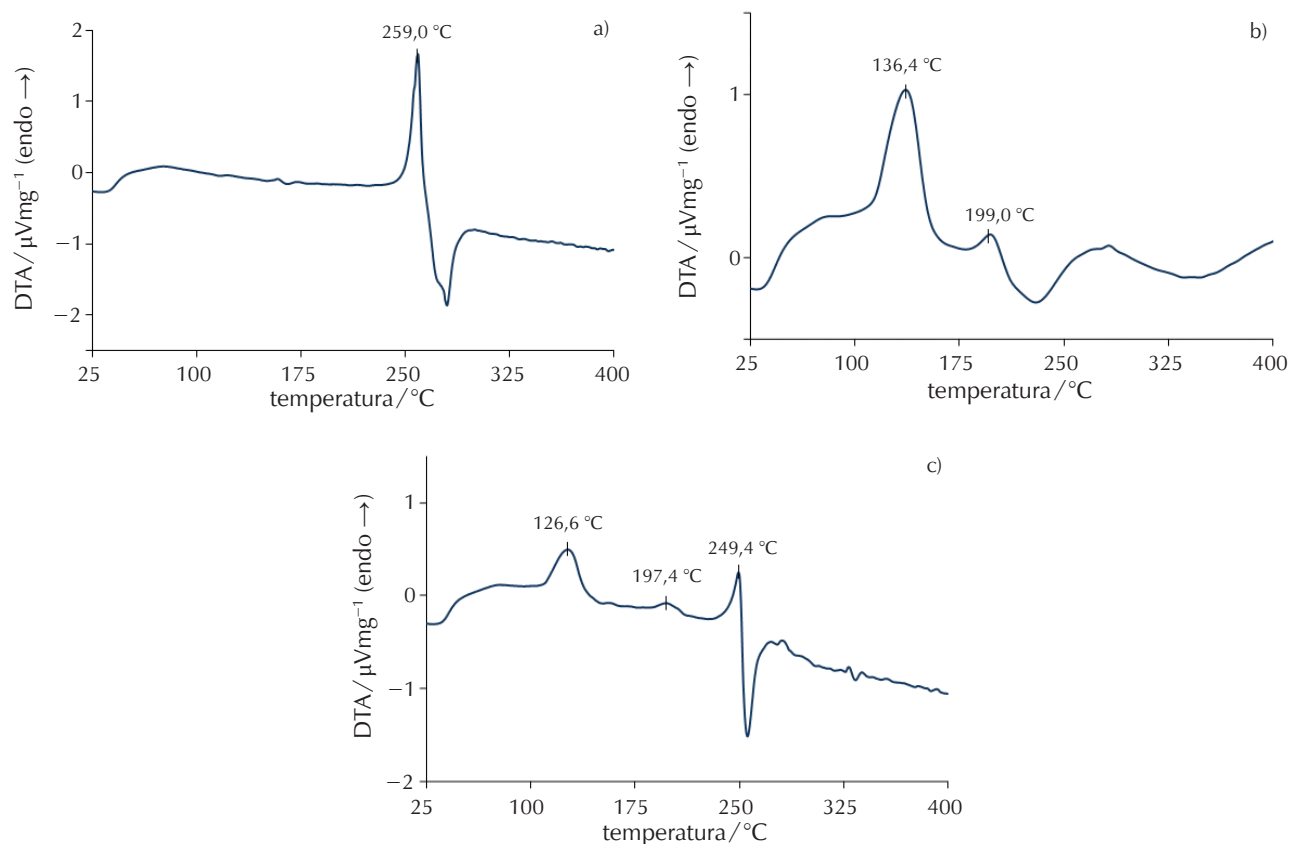
Diferencijalna pretražna kalorimetrija je tehnika koja se temelji na praćenju promjene toka energije kao funkcije temperature kad se i uzorak i referentni materijal zagrijava po definiranom temperaturnom programu.⁵¹ Rezultat analize je termogram na kojem se, ovisno o promjeni u uzorku, vide egzotermne odnosno endotermne promjene. U ispitivanju kompatibilnosti sastavnica lijeka najčešće se prate endotermni pikovi taljenja spojeva, odnosno njihov egzotermni raspad. Jedan takav primjer je primjer ispitivanja kompatibilnosti 5-aminosalicilata i folne kiseline (slika 3). Pik mesalazina pokazao je endotermni pik taljenja pri 287,6 °C (slika 3a), dok je u smjesama 5 : 1 i 1 : 1 s folnom kiselinom pokazao pomak od 13,8 °C te 21,0 °C prema nižim temperaturama. Osim toga, pik taljenja folne kiseline (199,7 °C) također se pomaknuo prema nižim temperaturama (za 22,6 °C i 5,2 °C) u pripremljenim smjesama. Također, uočeno je da je pomak pika pojedine sastavnice značajniji što je udio druge sastavnice u smjesi veći. Međutim, krivulje nisu promijenile svoj oblik, niti su se pojavile druge. Na slici 3a prikazan je primjer promjena na termogramima koji može uputiti na moguću nekompatibilnost sastavnica.

U slučaju izostanka pika tališta, kod spojeva koji ne pokazuju talište ili se tale na izrazito visokim temperaturama u odnosu na drugu tvar u smjesi, nekompatibilnost sastavnica može se ispitati praćenjem drugih karakterističnih pikova uz pretpostavku da njihov pomak indicira interakcije između sastavnica smjesa.⁵² U slučaju ispitivanja kompatibilnosti folne kiseline i balsalazid dihidrata koji ne pokazuje karakterističan pik tališta za ispitivanje kompatibilnosti praćen je pik dehidracije spoja (190,0 °C), pri čemu je izmjereno da su pomaci pikova na termogramima manji od 5,0 °C (slika 3b), što upućuje na to da su te sastavnice kompatibilne.^{53,54}

2.2.2. Diferencijalna termalna analiza

Diferencijalna termalna analiza temelji se na praćenju promjene temperature između uzorka i referentnog materijala prilikom njihova zagrijavanja po definiranom temperaturnom programu. Rezultat analize je, kao i kod diferencijalne pretražne kalorimetrije, termogram koji pokazuje egzotermne i endotermne pikove što te metode čini vrlo sličnima, međutim DSC još uvijek slovi kao preciznija i osjetljivija metoda, iako je DTA robusnija, čime je moguće postizanje većih temperatura, ali i analizirati uzorke koji pokazuju iznimno endotermne odnosno egzotermne reakcije.⁵⁵ To je bio i primjer kod ispitivanja kompatibilnosti sulfasalazina i folne kiseline. Zbog izrazito endotermnog taljenja sulfasalazina, praćenog egzotermnim raspadom (slika 4a), bilo je potrebno smanjiti količinu uzorka koji se mjerio da bi se izbjeglo potencijalno oštećenje DSC instrumenta, čime se i utjecalo na intenzitet pika folne kiseline koji je bio slabo vidljiv.^{56,57} S ciljem mjerenja veće količine uzorka, smjesa sulfasalazina i folne kiseline u omjeru 1 : 1 mjerena je na robusnijem DTA uređaju. Pik tališta sulfasalazina (259,0 °C) pokazao je pomak od 9,6 °C, dok pik folne kiseline (199,0 °C) nije pokazao značajan pomak (1,6 °C) (slika 4).⁵⁸

Ovo je primjer koji je teško interpretirati. Ukratko, pik folne kiseline nije se značajno pomaknuo niti je krivulja promijenila oblik, dok je sulfasalazin pokazao značajan pomak. Takav slučaj moguće je interpretirati kao potencijalno otapanje sulfasalazina u talini folne kiseline, što ovom tehnikom nije moguće vidjeti. Međutim, primjenom tehnike poput termalne mikroskopije uvelike bi se olakšao postupak interpretacije takvih rezultata.^{59–61}



Slika 4 – Termogrami diferencijalne termalne analize: a) sulfasalazina, b) folne kiseline, c) smjese sulfasalazina i folne kiseline 1 : 1
 Fig. 4 – Thermograms obtained with differential thermal analysis of a) sulfasalazine, b) folic acid, c) blend of sulfasalazine and folic acid din 1 : 1 ratio

2.3. Spektroskopske tehnike

Infracrvena spektroskopija i rendgenska difrakcija na prahu su nedestruktivne spektroskopske tehnike koje se primjenjuju u fizikalno-kemijskoj karakterizaciji lijekova kao i u ispitivanjima kompatibilnosti sastavnica lijeka s ciljem utvrđivanja kemijskih ili fizikalnih promjena u ispitivanim smjesama. Kao i kod drugih tehnika, temelje se na praćenju promjena između čistih sastavnica i smjesa. Te tehnike mogu se, a i ne moraju, kombinirati s drugim studijama, poput studija izotermalne razgradnje da bi se ubrzala potencijalna interakcija između sastavnica.

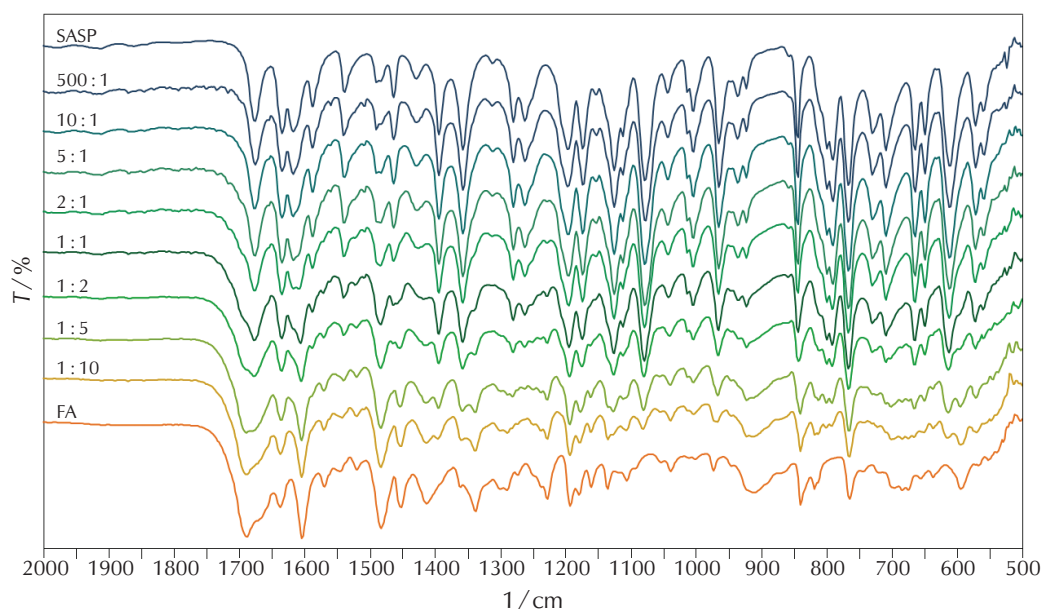
2.3.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija, uglavnom s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), tehnika je koja se redovito primjenjuje za karakterizaciju aktivnih tvari, međutim sve više se primjenjuje u studijama kompatibilnosti s ciljem uočavanja promjena u smjesama. Kod infracrvene spektroskopije prate se promjene na spektru, odnosno dolazi li do nastajanja novih apsorpcijskih vrpca u spektrima smjesa ili nestanka onih vidljivih na spektrima čistih sastavnica. Kad dolazi do promjene u spektrima, to je izravan pokazatelj kemijske reakcije između sastavnica, odnosno nastajanja novih kemijskih veza. Međutim, prisutnost preklapljenih vrpca može otežati interpretaciju dobivenih spektara, pogotovo kad su

u pitanju molekule poput sulfasalazina, koje u svojoj strukturi imaju brojne veze vidljive na spektrima.^{36,62,63} Rezultat analize čistih sastavnica i smjesa u ispitivanju kompatibilnosti sulfasalazina i folne kiseline prikazan je na slici 5.

Klasičan pristup interpretaciji takvih rezultata bilo bi vizualno praćenje prisutnosti svake vrpce karakteristične za čistu sastavnicu u spektrima smjesa. Takav pristup je dugotrajan, iscrpljujuć, a ponekad i nemoguć, pogotovo kad je u pitanju velik broj apsorpcijskih vrpca koje se preklapaju. Jedan od načina interpretacije FTIR spektara je primjena statističkih metoda poput analize glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) i klaster-analize (engl. *Cluster Analysis*), koje su se pokazale posebno učinkovite kod spektara koji sadrže mnogo vrpca koje se preklapaju.^{64–66}

U slučaju analiziranih uzoraka, čiste sastavnice zauzimaju krajnje vrijednosti, odnosno najpozitivniju (folna kiselina) i najnegativniju (sulfasalazin) vrijednost te predstavljaju FTIR spektre čistih sastavnica. Dobivene vrijednosti FTIR spektara analiziranih smjesa smještene su između vrijednosti čistih sastavnica, s time da vrijednost najbliža vrijednosti čiste sastavnice imaju smjese 10 : 1 i 1 : 10, odnosno one koje imaju najveći udio te iste čiste sastavnice, dok se smjesa 1 : 1 nalazi u sredini, a ostale smjese su poredane prema udjelu sastavnica (5-aminosalicilat, 10 : 1, 5 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10 te folna kiselina). Takav raspored smjesa potvrđuje sličnost između FTIR spektara susjednih smjesa,



Slika 5 – Primjer FTIR spektara sulfasalazina, folne kiseline i njihovih smjesa u različitim omjerima
Fig. 5 – FTIR spectra of sulfasalazine, folic acid and their blends in different ratios

što je dobiveno i kod statističke analize FTIR spektara u ispitivanju kompatibilnosti balsalazida i olsalazina s folnom kiselinom (tablica 1), dok bi nasumičan razmještaj ukazao na promjene u spektrima, odnosno na prisutnost novih kemijskih veza kao posljedica kemijske interakcije sastavnica.^{53,58}

Analizu glavnih komponenata prati klaster-analiza koja prikazuje jačinu sličnosti, odnosno različitosti, između dobivenih spektara. Klaster-analiza u slučaju sulfasalazina pokazala je formiranje dva glavna klastera, jedan koji obuhvaća 5-aminosalicilat i smjese s njegovim većim udjelom te drugi koji sadrži folnu kiselinu i smjese s njezinim većim udjelom, dok su potklasteri formirani povezivanjem najslabijih uzoraka (čista sastavnica te 10 : 1, 5 : 1 i 2 : 1, itd.).^{53,58}

2.3.2. Rendgenska difrakcija na prahu

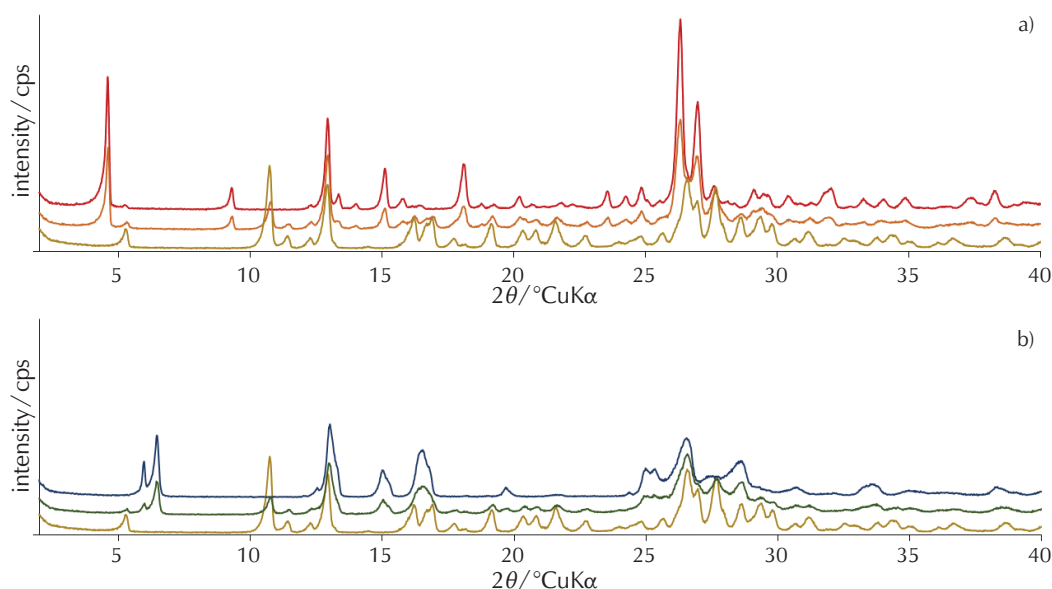
Rendgenska difrakcija na prahu (engl. *X-Ray Powder Diffraction*, XRPD) često je primjenjivana tehnika karakterizacije kristaliničnih sastavnica lijekova, pri čemu se mjeri intenzitet izlaznih zraka u ovisnosti o difrakcijskom kutu.^{67–69}

Sastavnice lijeka koje su u kristalnom obliku imaju svoj karakterističan difraktogram, a promjene u kristalnoj strukturi (prijelaz u drugi polimorfni oblik ili u amorfno stanje) jasno se očituju kao nastajanje ili nestajanje karakterističnih pikova te pomak i promjena njihova intenziteta.³⁶ Upravo se na tom principu temelji ispitivanje kompatibilnosti sastavnica lijeka tom tehnikom, odnosno prate se promjene u strukturi spojeva kad su prisutni u istoj smjesi.^{37,67,70–72} Primjenom rendgenske difrakcije na prahu, moguće je pratiti promjene u kristalnoj strukturi lijekova jer bilo koja promjena polimornog oblika lijeka može utjecati na njegovu topljivost, što u konačnici i mijenja njegovu bioraspoloživost, a time i terapijski učinak.^{44,63,64,73,74} U slučaju ispitivanja kompatibilnosti balsalazida i olsalazina s folnom kiselinom čiste sastavnice pokazale su intenzivne oštre pikove karakteristične za kristalne tvari (slika 6). Na difraktogramima smjesa pripremljenih u omjeru 1 : 1 vidljivi su svi karakteristični pikovi bez pomaka u vrijednosti difrakcijskog kuta (2θ) te nisu primijećeni novonastali pikovi niti pojava takozvanog "halo" efekta, koji upućuje na pojavu amorfne faze.^{53,75,76}

Tablica 1 – PCA vrijednosti izmjerenih FTIR spektara

Table 1 – PCA values of obtained FTIR spectra

Uzorak Sample	PCA vrijednosti PCA values								Folna kiselina Folic acid
	5-amino salicilat 5-amino salicylate	10 : 1	5 : 1	2 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 5	1 : 10	
sulfasalazin/ folna kiselina sulfasalazine/ folic acid	-27,5	-21,5	-21,1	-15,9	-11,4	-0,5	9,7	24,4	26,0
balsalazid/ folna kiselina balsalazide/ folic acid	-30,1	-27,7	-25,3	-9,9	-7,8	15,0	22,2	30,4	33,5
olsalazin/ folna kiselina olsalazine/ folic acid	-30,3	-26,1	-23,6	-17,0	0,3	10,8	25,4	28,5	31,0



Slika 6 – Difraktogrami: a) balsalazida (crvena), 1 : 1 smjese balsalazida i folne kiseline (narančasta) i folne kiseline (žuta), b) olsalazina (plava), 1 : 1 smjese olsalazina i folne kiseline (zelena) i folne kiseline (žuta)

Fig. 6 – Diffractograms of: a) balsalazide (red), balsalazide and folic acid 1 : 1 blend (orange) and folic acid (yellow), b) olsalazine (blue), olsalazine and folic acid 1 : 1 blend (green) and folic acid (yellow)

Da bi se potvrdila sličnost difraktograma čistih sastavnica i smjesa, moguće je primijeniti i statističku analizu. U tom slučaju izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije između eksperimentalno dobivenog difraktograma smjese i teorijskog difraktograma smjese, koji se izračuna kao prosjek vrijednosti intenziteta dvaju spektara čistih sastavnica. Dobiveni koeficijenti korelacije (r) u oba slučaja iznose više od 0,98, što upućuje na njihovu sličnost, odnosno odsutnost interakcija između sastavnica smjesa te izostanak promjene njihovih polimorfnih oblika, iako je u literaturi navedeno da posjeduju polimorfizam.^{76–78}

2.4. Studije stabilnosti praćene kromatografskim tehnikama

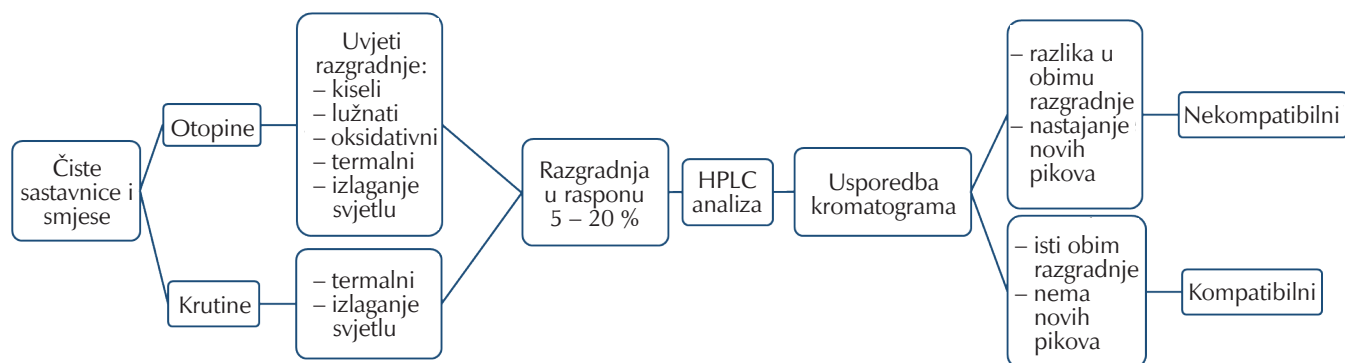
Jedan od pristupa ispitivanju stabilnosti i kompatibilnosti sastavnica buduće kombinacije je provođenje studije razgradnje. Temelji se na izlaganju sastavnica uvjetima poput povišene temperature, hidrolize, oksidacije ili izlaganjem svjetlu s ciljem praćenja njihove stabilnosti odnosno nestabilnosti, kad su prisutne u istoj otopini ili u smjesi. Da bi bilo moguće pratiti promjene poput pada sadržaja ili nastajanja razgradnih produkata, potrebno je razviti i validirati odgovarajuće analitičke metode.⁷⁹ Iako tehnike poput UV/VIS spektrofotometrije mogu služiti u tu svrhu, radi točnijeg i preciznijeg određivanja primjenjuju se kromatografske tehnike, odnosno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u kombinaciji s detektorom s nizom dioda ili masenom spektrometrijom.

2.4.1. Studija prisilne razgradnje

Razgradni produkti nastali uslijed interakcije lijek-lijek u razvoju fiksnih kombinacija mogu se jasno utvrditi provođenjem prisilne razgradnje pojedinih sastavnica i njihovih smjesa te usporedbom profila razgradnji.⁸⁰ Prisilna razgradnja temelji se na razgradnji uzoraka u raznim uvjetima; kiselim, lužnatim, oksidativnim, termalnim i svjetlosnim, a informacija o stabilnosti u određenim uvjetima služi kao vodilja u fazi razvoja stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda i formulacije lijeka. Preporučeno je njezino provođenje prema smjernicama Međunarodnog vijeća za usklađivanje (engl. *International Council for Harmonisation, ICH*) tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku uporabu.^{81,82} Ne postoji jasno definiran protokol po kojem se moraju provoditi studije prisilne razgradnje. Iako nije službeno definirano, postoje literaturni zapisi u kojima se definiraju uvjeti razgradnje, međutim ključna je činjenica da se razgradnja mora provoditi u rasponu od 5 do 20 % da bi se izbjeglo nastajanje nereprezentativnih razgradnih profila koji bi mogli istraživanje usmjeriti u pogrešnom smjeru (slika 7).^{33,83,84}

Uvjeti razgradnje ovise o stabilnosti ispitivanog spoja, poželjno je spoj razgraditi polako, a ako se uoči značajan pad sadržaja u kratkom vremenu, potrebno je prilagoditi uvjete razgradnje. U tablici 2 prikazani su okvirni uvjeti koji predstavljaju dobar početak za provedbu prisilne razgradnje.^{85–87}

Koncentracija stresora i vrijeme izlaganja ovise o stabilnosti ispitivanog spoja. Ako je spoj jako nestabilan u određenim uvjetima, potrebno je smanjiti koncentraciju stresora i obrnuto. Ako spoj ne pokazuje razgradnju nakon 7 dana u 1 M NaOH, on se može smatrati stabilnim u navedenim uvjetima. Ultimativni ishod provedbe prisilne razgradnje je



Slika 7 – Shema provedbe forsirane razgradnje u ispitivanju kompatibilnosti sastavnica
Fig. 7 – Scheme of forced degradation procedure in compatibility evaluation

Tablica 2 – Uvjeti provedbe prisilne razgradnje
Table 2 – Forced degradation study conditions

Vrsta razgradnje Condition	Uzorak Sample	Koncentracija uzorka Sample concentration	Koncentracija stresora Stressor concentration	Temperatura Temperature	Vrijeme izlaganja Degradation time
kisela acid	otopina solution	0,1 – 1 mg ml ⁻¹	0,1 – 1 M HCl	25 °C	5 – 20 % razgradnje ili do 7 dana 5–20 % degradation or up to 7 days
lužnata basic			0,1 – 1 M NaOH	25 °C	
oksidativna oxidative			3 – 30 % H ₂ O ₂	25 °C	
termalna thermal	otopina/ krutina solution/solid	0,1 – 1 mg ml ⁻¹ /tanki film thin layer	/	60 – 80 °C (25 °C kontrola) (25 °C control)	
svjetlosna light			/	prema ICH as per ICH	

upoznavanje sa stabilnosti ispitivanog spoja te utvrđivanje njegovih razgradnih produkata kao i razvoj stabilitetno-indikativne analitičke metode s kojom je moguće uočiti sve razgradne produkte koji mogu nastati njegovom razgradnjom.^{84,88,89} Razvoj takve metode predstavlja velik izazov, pogotovo u razvoju fiksne kombinacije lijekova, a tu činjenicu potvrđuje ograničen broj publikacija na temu razvoja takvih analitičkih metoda.^{90–93}

Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti 5-aminosalicilata i folne kiseline primjenom prisilne razgradnje provedeno je u studijama sa sulfasalazinom i mesalazinom. Sulfasalazin je pokazao stabilnost u svim uvjetima kroz sedam dana, dok se folna kiselina pokazala stabilnom u lužnatim i termalnim uvjetima te fotostabilnom u krutom obliku.⁵⁸ Iznimno visoka stabilnost sulfasalazina posljedica je *para*-položaja diazo skupine u odnosu na sulfonilnu skupinu. Takvo *para* usmjerenje dviju skupina omogućuje delokalizaciju elektrona i štiti sumpor iz sulfonilne skupine od nukleofilnog napada.^{94,95} Uočena je razgradnja folne kiseline u kiselim i oksidativnim uvjetima te prilikom izlaganja svjetlu, što je u skladu s literaturnim zapisima.^{96–99} Prisilne razgradnje smjesa standarda i gotovih dozirnih oblika nisu pokazale znatno drugačije obime razgradnje osim prilikom termalnog izlaganja, gdje je došlo do 100 % razgradnje folne kiseline nakon jednog dana, u usporedbi s 1,1 % raz-

gradnje folne kiseline u sedmodnevnom razdoblju kad je termalno stresirana samostalno.⁵⁸ Taj je fenomen objašnjen činjenicom da je izmjerena pH-vrijednost pripremljene otopine sulfasalazina i folne kiseline iznosila 2,85 (u usporedbi s čistim otapalom, pH = 6,35), pri čemu je sulfasalazin odgovoran za stvaranje kiselih uvjeta u kojima se folna kiselina raspada, a samo zagrijavanje uzorka znatno povećava kinetiku reakcije, što je dovelo do potpune razgradnje folne kiseline u kratkom razdoblju. Utjecaj pH-vrijednosti na nestabilnost folne kiseline kao i utjecaj pH-vrijednosti u kombinaciji s povišenim temperaturama dobro je opisan u literaturi.^{100–103} Međutim, činjenicu da sulfasalazin snižava pH-vrijednost otopine treba uzeti u obzir tijekom postupka razvoja i pripreme formulacije kao i dozirnog oblika.

Mesalazin se pokazao nestabilnijim u odnosu na sulfasalazin, dok se folna kiselina razgrađivala u istim uvjetima kao i u studiji ispitivanja kompatibilnosti sa sulfasalazinom. U slučaju s mesalazinom uočen je fenomen pri svjetlosnoj razgradnji otopine koja sadrži mesalazin i folnu kiselinu. Uočen je znatno manji pad sadržaja kad se folna kiselina nalazi u istoj otopini s mesalazinom. Ako se uzme u obzir da je studija provedena u omjeru mesalazina i folne kiseline 500 : 1, posljedica veće apsorpcije zračenja od strane mesalazina zbog njegova suviška u otopini rezultirala je manjom razgradnjom folne kiseline.⁵⁴

Oba primjera pokazuju da je rezultate prisilne razgradnje potrebno pažljivo interpretirati da se ne bi donijeli krivi zaključci. Iako je na prvu izgledalo da sulfasalazin i folna kiselina nisu kompatibilni, pažljivim ispitivanjem drugih utjecaja utvrđeno je da je razgradnja folne kiseline posljedica promjene u sustavu, a ne reakcije folne kiseline sa sulfasalazinom.

2.4.2. Studije izotermalne razgradnje

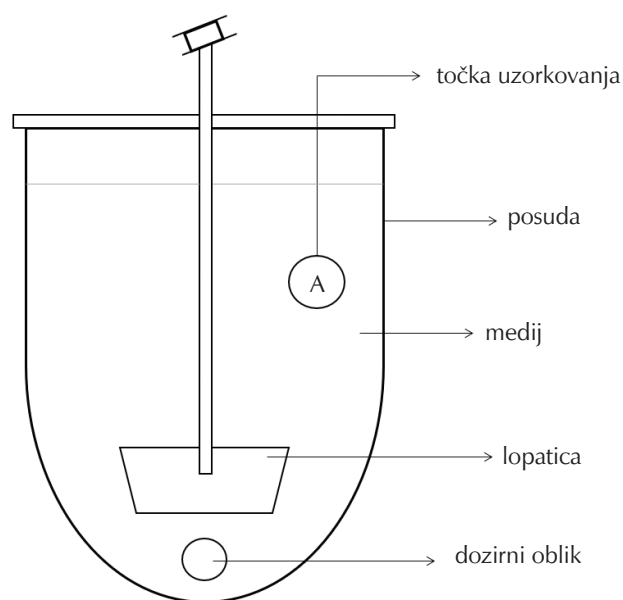
Izotermalna studija razgradnje (engl. *Isothermal Stress Testing*, IST) često je primjenjivana prilikom ispitivanja kompatibilnosti sastavnica lijeka. Temelji se na skladištenju uzoraka u uvjetima definirane povišene temperature (40 – 50 °C) nakon čega slijedi analiza prikladnom analitičkom tehnikom.⁷³ Najčešće primjenjivane tehnike analize uzoraka nakon IST-a su kromatografske tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i/ili spektroskopske tehnike poput FTIR-a.^{73,74,89,104-107}

Izotermalne studije razgradnje provedene su na čistim sastavnicama sulfasalazina, mesalazina i folne kiseline te na smjesama standarda i gotovih dozirnih oblika pripremljenim u omjeru u kojem se očekuje da će sastavnice biti u gotovom proizvodu (500 : 1). Svi uzorci su vizualno pregledani prije i nakon skladištenja u izotermalnim uvjetima da bi se uočile potencijalne promjene u samom izgledu uzoraka. Analitički povrati dobiveni kromatografskom analizom uzoraka nakon razgradnje iznosili su od 98,4 do 103,6 % sa standardnom devijacijom ne većom od 2,7 %. Takvi rezultati pokazuju da nema kemijske reakcije između mesalazina i folne kiseline kao i sulfasalazina i folne kiseline te, uzimajući u obzir omjer u kojem su smjese pripremljene (500 : 1), svaka interakcija dovela bi do značajnog pada sadržaja folne kiseline.⁵⁴

U slučaju izotermalne razgradnje balsalazida i olsalazina primijenjen je drugačiji pristup. Pripremljene su smjese u omjeru 1 : 1 te omjerima 10 : 1, 5 : 1, 2 : 1 u korist i 5-aminosalicilata i folne kiseline da bi se ustanovio utjecaj količine pojedine sastavnice na nekompatibilnost. Kromatografskom analizom smjesa balsalazida i folne kiseline nakon izotermalne razgradnje dobiveni su analitički povrati u rasponu od 98,2 do 102,5 % s maksimalnom relativnom standardnom devijacijom od 2,7 %, dok su u slučaju olsalazina i folne kiseline povrati bili u rasponu od 97,9 do 103,7 % uz relativnu standardnu devijaciju ne veću od 3,6 %.⁵³ Takvi rezultati također upućuju na izostanak kemijske interakcije između 5-aminosalicilata i folne kiseline, uzimajući u obzir duljinu trajanja primijenjenog izotermalnog stresa te primijenjenu temperaturu kao i omjere u kojima su smjese pripremljene (4 tjedna na 50,0 °C).

2.4.3. Studije stabilnosti u biološki relevantnom mediju

Studija oslobađanja lijekova iz dozirnih oblika je test *in vitro* koji se izvodi da bi se ispitalo koliko se učinkovito lijek oslobađa iz dozirnog oblika. Međutim, ta se tehnika primjenjuje i u svrhu ispitivanja interakcija sastavnica lijeka i njihove stabilnosti kad se istodobno nalaze u istom biološki relevantnom mediju.¹⁰⁸⁻¹¹¹ Studije stabilnosti u biološki relevantnom mediju provode se u tzv. "dissolution" aparaturi (slika 8).



Slika 8 – Aparatura za provođenje studija stabilnosti u biološki relevantnom mediju; USP aparatura tipa 2
Fig. 8 – USP apparatus type 2 for dissolution studies

U američkoj farmakopeji (engl. *United States Pharmacopoeia*, USP) definirane su dimenzije posude i lopatica, a mogu se pronaći i metode za otapanje pojedinih dozirnih oblika, što uključuje sastav i volumen medija, temperaturu medija, brzinu okretanja lopatica, vrijeme uzorkovanja otopine i način analize sadržaja.¹¹² Za praćenje sadržaja najčešće se primjenjuju kromatografske tehnike poput HPLC-a. U svrhu ispitivanja kompatibilnosti sastavnica prati se količina oslobođene aktivne komponente iz dozirnog oblika u ovisnosti o vremenu kad se samostalno nalazi u otopini i količina oslobođene aktivne komponente kad se otapa u prisutnosti druge komponente. U idealnom slučaju dobivene krivulje oslobađanja samih dozirnih oblika ne bi se trebale razlikovati od onih dobivenih njihovim istodobnim otapanjem. U slučaju da u određenom trenutku dolazi do pada sadržaja ili nedovoljnog otapanja pojedine aktivne komponente dok je i druga prisutna u otopini, može se pretpostaviti potencijalna nekompatibilnost sastavnica, bilo da dolazi do kemijske reakcije između njih ili jedna tvar mijenja uvjete u otopini čime onemogućuje otapanje druge.

Studije otapanja mesalazina, sulfasalazina te studije njihova simultanog otapanja s folnom kiselinom provedene su prema metodama opisanim u američkoj farmakopeji.¹¹³ Profili oslobađanja pojedinačnih dozirnih oblika uspoređeni su s profilima dobivenim istodobnim otapanjem dvaju dozirnih oblika, a temelji se na računanju faktora različitosti (f_1) te faktora sličnosti (f_2). U nastavku teksta nalaze se jednadžbe za izračun faktora različitosti (f_1) i sličnosti (f_2):

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

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (2)$$

U jedn. (1) i (2) n je ukupni broj uzorkovanja, odnosno vremenskih točaka, a R_t i T_t predstavljaju vrijednosti sadržaja referentnog i testnog mjerenja, odnosno onog provedenog simultanim otapanjem i onog kad je lijek otapan sam.¹¹⁴ Faktor sličnosti od 100 % predstavlja dvije identične krivulje, a vrijednost faktora sličnosti ne smije biti manja od 50 %, ¹¹⁵ dok se faktor različitosti mora nalaziti unutar prihvatljivog kriterija do 15 %.¹¹⁶ Faktor različitosti između krivulja mesalazina i krivulja folne kiseline iznosio je 4,51 % odnosno 3,16 %, dok je u slučaju sulfasalazina i folne kiseline faktor različitosti iznosio 1,60 % odnosno 3,01 %. Faktori sličnosti od 82,09 % i 77,01 % dobiveni su usporedbom krivulja u studijama mesalazina i folne kiseline, dok su faktori sličnosti od 92,40 % te 77,91 % dobiveni u studijama sulfasalazina i folne kiseline.^{54,58} Visoka sličnost, odnosno mala različitost, između krivulja oslobađanja dobivenih samostalnim otapanjem dozirnih oblika i njihovih kombinacija, kao i odsutnost novih pikova ukazuju na izostanak interakcija između sastavnica.

U slučaju olsalazina i balsalazida studije stabilnosti u biološki relevantnim medijima provedene su na pripremljenim dozirnim oblicima predloženih fiksnih kombinacija. Analitički povrati nakon provedbe studija otapanja pripremljenih dvanaest fiksnih kombinacija balsalazida i folne kiseline, u biološki relevantnom mediju, u rasponu su od 91,9 do 102,0 % za balsalazid te od 94,9 do 101,6 % za folnu kiselinu, odnosno u rasponima od 89,6 do 102,8 % i od 93,4 do 103,4 % u slučaju olsalazina i folne kiseline. Visoki analitički povrati svih sastavnica navode na njihovo zadovoljavajuće oslobađanje iz dozirnog oblika odnosno na izostanak kemijske interakcije između ispitivanih spojeva, uzevši u obzir da su kombinacija pripremljene u omjerima 750 : 1 u korist balsalazida i 250 : 1 u korist olsalazina.⁵³

3. Zaključak

U ovom preglednom radu opisane su neke od tehnika koje se primjenjuju u ispitivanju fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica lijekova. Taj postupak vrlo je važan u ranoj fazi razvoja fiksnih kombinacija, ali i razvoja lijekova općenito, da bi se razvio stabilan, siguran i učinkovit proizvod. Iako provedba samih mjerenja nije zahtjevnija, interpretacija rezultata je ono gdje je potrebno objektivno sagledati sve činjenice. Ponekad se na prvu, na temelju rezultata pojedine tehnike, čini da sastavnice nisu kompatibilne, dok druge tehnike mogu pokazati izostanak interakcija. Stoga je potrebno uzeti u obzir koja tehnika ima veću težinu i tek na temelju rezultata dobivenih primjenom većeg broja tehnika donositi zaključke. Također, potrebno je naglasiti da uvjeti provedbe studija kao i mogućnost njihove provedbe može ovisiti o vrsti tvari čija se kompatibilnost ispituje. Iz tog razloga ne postoje jasno definirane upute za provedbu ispitivanja fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica.

ZAHVALA

Rad je izrađen u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva, HR-ZZ-UIP-2017-05-3949).

Popis kratica List of abbreviations

DSC	– diferencijalna ili razlikovna pretražna kalorimetrija – differential scanning calorimetry
DTA	– diferencijalna termalna analiza – differential thermal analysis
FTIR	– infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom – Fourier-transform infrared spectroscopy
XRPD	– rendgenska difrakcija na prahu – X-ray powder diffraction
HPLC-DAD	– tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda – high performance liquid chromatography with diode array detector
EMA	– Europska agencija za lijekove – European Medical Agency
TNF	– faktor nekroze tumora – tumour necrosis factor
PCA	– analiza glavnih sastavnica – principal component analysis
ICH	– Međunarodno vijeće za usklađivanje – International Council for Harmonisation
IST	– izotermalna razgradnja – isothermal stress testing
USP	– Američka farmakopeja – United States Pharmacopoeia

Literatura References

1. C. Williams, R. Panaccione, S. Chosh, K. Rioux, Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease, *Therap. Adv. Gastroenterol.* **4** (2011) 237–248, doi: <https://doi.org/10.1177/1756283X11405250>.
2. D. J. Mulder, A. J. Noble, C. J. Justinich, J. M. Duffin, A tale of two diseases: The history of inflammatory bowel disease, *J. Crohn's Colitis* **8** (2014) 341–348, doi: <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.09.009>.
3. C. von Ritter, M. B. Grisham, D. N. Granger, Sulfasalazine Metabolites and Dapsone Attenuate Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced Mucosal Injury in Rat Ileum, *Gastroenterology* **96** (1989) 811–816, doi: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(89\)80081-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(89)80081-2).
4. H. Masuda, Y. Takahashi, Y. Nishida, S. Asai, Comparison of the effect of mesalazine and sulfasalazine on laboratory parameters: A retrospective observational study, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **68** (2012) 1549–1555, doi: <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1289-3>.
5. E. S. Jung, H. J. Jang, E. M. Hong, H. L. Lim, S. P. Lee, S. H. Kae, J. Lee, The protective effect of 5-aminosalicylic acid against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced injury through free radical scavenging in small intestinal epithelial

- cells, *Med.* **56** (2020) 515, doi: <https://doi.org/10.3390/medicina56100515>.
6. S. T. Radhakrishnan, A. Mohanaruban, S. Hoque, Mesalazine-induced myocarditis: A case report, *J. Med. Case Rep.* **12** (2018) 10–12, doi: <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1557-z>.
 7. B. Ye, D. van Langenberg, Mesalazine preparations for the treatment of ulcerative colitis: Are all created equal?, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **6** (2015) 137–144, doi: <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v6.i4.137>.
 8. T. Sousa, V. Yadav, V. Zann, A. Borde, B. Abrahamsson, A. W. Basit, On the colonic bacterial metabolism of Azo-bonded prodrugs of 5-aminosalicylic acid, *J. Pharm. Sci.* **103** (2014) 3171–3175, doi: <https://doi.org/10.1002/jps.24103>.
 9. Y. Cheng, P. Desreumaux, 5-Aminosalicylic acid is an attractive candidate agent for chemoprevention of colon cancer in patients with inflammatory bowel disease, *World J. Gastroenterol.* **11** (2005) 309–314, doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i3.309>.
 10. N. Delchier, A. L. Herbig, M. Rychlik, C. M. G. C. Renard, Foliates in Fruits and Vegetables: Contents, Processing, and Stability, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15** (2016) 506–528, doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12193>.
 11. L. Pellis, Y. Dommels, D. Venema, A. van Polanen, E. Lips, H. Baykus, F. Kok, E. Kampman, J. Keijer, High folic acid increases cell turnover and lowers differentiation and iron content in human HT29 colon cancer cells, *Br. J. Nutr.* **99** (2008) 703–708, doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114507824147>.
 12. R. Iyer, S. K. Tomar, Folate: A Functional Food Constituent, *J. Food Sci.* **74** (2009) 114–122, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01359.x>.
 13. A. Myszczyzyn, R. Krajewski, M. Ostapów, L. Hirnle, Folic acid-role in the body, recommendations and clinical significance, *Pielęgniarstwo XXI Wieku* **18** (2019) 50–59, doi: <https://doi.org/10.2478/pielxxiw-2019-0007>.
 14. H. McNulty, M. Rollins, T. Cassidy, A. Caffrey, B. Marshall, J. Dornan, M. McLaughlin, B. A. McNulty, M. Ward, J. J. Strain, A. M. Molloy, D. J. Lees-Murdock, C. P. Walsh, K. Pentieva, Effect of continued folic acid supplementation beyond the first trimester of pregnancy on cognitive performance in the child: A follow-up study from a randomized controlled trial (FASSTT Offspring Trial), *BMC Med.* **17** (2019) 196, doi: <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1432-4>.
 15. J. Selhub, G. J. Dhar, I. H. Rosenberg, Inhibition of folate enzymes by sulfasalazine, *J. Clin. Invest.* **61** (1978) 221–224, doi: <https://doi.org/10.1172/JCI108921>.
 16. Y. Pan, Y. Liu, H. Guo, M. S. Jabir, X. Liu, W. Cui, D. Li, Associations between folate and vitamin B12 levels and inflammatory bowel disease: A meta-analysis, *Nutrients* **9** (2017) 382, doi: <https://doi.org/10.3390/nu9040382>.
 17. G. Biasco, M. C. Di Marco, Folate and prevention of colorectal cancer in ulcerative colitis, *Eur. J. Cancer Prev.* **14** (2005) 395–398, doi: <https://doi.org/10.1097/00008469-200508000-00013>.
 18. F. Gomollón, J. P. Gisbert, Anemia and inflammatory bowel diseases, *World J. Gastroenterol.* **15** (2009) 4659–4665, doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.15.4659>.
 19. S. Poturoglu, A. C. Ormeci, A. E. Duman, Treatment of pregnant women with a diagnosis of inflammatory bowel disease, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **7** (2016) 490–502, doi: <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i4.490>.
 20. J. Safi, L. Joyeux, G. E. Chalouhi, Periconceptional folate deficiency and implications in neural tube defects, *J. Pregnancy* **2012** (2012) 295083, doi: <https://doi.org/10.1155/2012/295083>.
 21. World Health Organization 2003 - Adherence to long-term therapies - Evidence for action, ISBN 92 4 154599 2.
 22. W. Chan, A. Chen, D. Tiao, C. Selinger, R. Leong, Medication adherence in inflammatory bowel disease, **15** (2017) 434–445, doi: <https://doi.org/10.5217/ir.2017.15.4.434>.
 23. A. Atreja, N. Bellam, S. R. Levy, Strategies to enhance patient adherence: making it simple, *Med. Gen. Med.* **7** (2005) 4.
 24. L. P. Du, Z. W. Cheng, Y. X. Zhang, Y. Li, D. Mei, The impact of fixed-dose combination versus free-equivalent combination therapies on adherence for hypertension: A meta-analysis, *J. Clin. Hypertens.* **20** (2018) 902–907, doi: <https://doi.org/10.1111/jch.13272>.
 25. G. Schernthaner, Fixed-dose combination therapies in the management of hyperglycaemia in Type 2 diabetes: An opportunity to improve adherence and patient care, *Diabet. Med.* **27** (2010) 739–743, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03000.x>.
 26. S. Bangalore, A. Shahane, S. Parkar, F. H. Messerli, Compliance and fixed-dose combination therapy, *Curr. Hypertens. Rep.* **9** (2007) 184–189, doi: <https://doi.org/10.1007/s11906-007-0033-3>.
 27. B. Godman, H. McCabe, T. D. Leong, Fixed dose drug combinations—are they pharmaco-economically sound? Findings and implications especially for lower- and middle-income countries, *Expert Rev. Pharm. Out.* **20** (2020) 1–26, doi: <https://doi.org/10.1080/14737167.2020.1734456>.
 28. EMA. Guideline on Clinical Development of Fixed Combination Medicinal Products. EMEA Eur. Med. Agency **44** (2009) 1–9.
 29. A. I. Wertheimer, The Economics of Polypharmacology: Fixed Dose Combinations and Drug Cocktails, *Curr. Med. Chem.* **20** (2013) 1635–1638, doi: <https://doi.org/10.2174/0929867311320130003>.
 30. B. Hens, M. Corsetti, M. Bermejo, R. Löbenberg, P. M. González, A. Mitra, D. Desai, D. M. Chilukuri, A. Aceituno, “Development of Fixed Dose Combination Products” Workshop Report: Considerations of Gastrointestinal Physiology and Overall Development Strategy, *AAPS J.* **21** (2019) 75, doi: <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0346-6>.
 31. H. Khan, J. Ali, Fixed Dose Combination (FDC) Products: Introduction, Development and Regulations, *Res. J. Pharm. Dos. Forms Technol.* **8** (2016) 207–210, doi: <https://doi.org/10.5958/0975-4377.2016.00028.8>.
 32. C. Moon, E. Oh, Rationale and strategies for formulation development of oral fixed dose combination drug products, *J. Pharm. Investig.* **46** (2016) 615–631, doi: <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0286-4>.
 33. URL: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/GuidelinesRegistrationFixedDoseCombinationTRS929Annex5.pdf (20.02.2022).
 34. I. V. Rounds, What you should know about drug compatibility, *Nursing (Lond)* **38** (2008) 15, doi: <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000312600.67772.13>.
 35. S. G. Begum, Y. D. Reddy, B. S. Divya, P. K. Komali, K. Sushmitha, S. Ruksar, Pharmaceutical Incompatibilities: a Review, *Asian J. Pharm. Res. Dev.* **6** (2018) 56–61, doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.22270/ajprd.v6i6.448>.
 36. R. Chadha, S. Bhandari, Drug-excipient compatibility screening-Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 82–97, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.016>.
 37. A. Marini, V. Berbenni, M. Pegoretti, G. Bruni, P. Cofrancesco, C. Sinistri, M. Villa, Drug-excipient compatibility studies by physico-chemical techniques: The case of atenolol, *J. Therm. Anal. Calorim.* **73** (2003) 547–561, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1025478129417>.
 38. M. S. Lopes, T. A. Catelani, A. L. C. S. Nascimento, J. S. Garcia, M. G. Trevisan, Ketoconazole: compatibility with pharmaceutical excipients using DSC and TG techniques, *J.*

- Therm. Anal. Calorim. **141** (2020) 1371–1378, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-09137-0>.
39. R. Z. C. Meira, I. F. B. Biscaia, C. Nogueira, F. S. Murakami, L. S. Bernardi, P. R. Oliveira, Solid-state characterization and compatibility studies of penciclovir, lysine hydrochloride, and pharmaceutical excipients, *Materials* (Basel). **12** (2019) 3154, doi: <https://doi.org/10.3390/ma12193154>.
40. T. V. Sachin, M. N. Deodhar, V. Prakya, Advances in analytical techniques used in predicting drug-excipient interactions, *Int. J. Pharm. Technol.* **6** (2014) 6388–6417.
41. F. Ali, R. Kumar, P. L. Sahu, G. N. Singh, Physicochemical characterization and compatibility study of roflumilast with various pharmaceutical excipients, *J. Therm. Anal. Calorim.* **130** (2017) 1627–1641, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6274-8>.
42. P. Niguram, S. N. Polaka, R. Rathod, K. Kalia, A. S. Kate, Update on compatibility assessment of empagliflozin with the selected pharmaceutical excipients employed in solid dosage forms by thermal, spectroscopic and chromatographic techniques, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **46** (2020) 209–218, doi: <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1716371>.
43. B. Rojek, M. Wesolowski, DSC supported by factor analysis as a reliable tool for compatibility study in pharmaceutical mixtures, *J. Therm. Anal. Calorim.* **138** (2019) 4531–4539, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08223-7>.
44. E. P. Lavor, M. V. M. Navarro, F. D. Freire, C. F. S. Aragão, F. N. Raffin, E. G. Barbosa, T. F. A. De Lima E Moura, Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs-excipient compatibility, *J. Therm. Anal. Calorim.* **115** (2014) 2303–2309, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3050-2>.
45. D. Dourado, Thermal Analysis as a Useful Tool in Drug-Excipient Compatibility Studies: The Impact in Pharmaceuticals Products, *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **22** (2019) 16634–16635, doi: <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.22.003745>.
46. F. Balestrieri, A. D. Magri, A. L. Magri, D. Marini, A. Sacchini, Application of differential scanning calorimetry to the study of drug-excipient compatibility, *Thermochim. Acta* **285** (1996) 337–345, doi: [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(96\)02904-8](https://doi.org/10.1016/0040-6031(96)02904-8).
47. S. A. Botha, A. P. Lötter, Compatibility study between naproxen and tablet excipients using differential scanning calorimetry, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **16** (1990) 673–683, doi: <https://doi.org/10.3109/03639049009104410>.
48. S. Botha, A. P. Lotther, J. L. du Preez, DSC screening for drugs-drug interactions in polypharmaceuticals intended for the alleviation of the symptoms of colds and flu, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **12** (2008) 811–827, doi: <https://doi.org/10.3109/03639048609048039>.
49. N. R. Pani, L. K. Nath, S. Acharya, Compatibility studies of nateglinide with excipients in immediate release tablets, *Acta Pharm.* **61** (2011) 237–247, doi: <https://doi.org/10.2478/v10007-011-0016-4>.
50. S. A. Pires, W. N. Mussel, M. I. Yoshida, Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility between citalopram and excipients using thermal and non-thermal techniques, *J. Therm. Anal. Calorim.* **127** (2017) 535–542, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5769-z>.
51. C. Schick, D. Lexa, L. Leibowitz, Differential Thermal Analysis and Differential Scanning Calorimetry, u E. N. Kaufmann (ur.), *Characterization of Materials*, Vol. 2, Wiley, 2012., str. 483–495.
52. A. Veiga, P. R. Oliveira, L. S. Bernardi, C. Mendes, M. A. S. Silva, M. S. Sangoi, P. R. Janissek, F. S. Murakami, Solid-state compatibility studies of a drug without melting point, *J. Therm. Anal. Calorim.* **131** (2018) 3201–3209, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6756-8>.
53. M. L. Jeličić, E. Brusač, S. Kurajica, M. Cvetnić, D. A. Klarić, B. Nigović, A. Mornar, Thermoanalytical, spectroscopic and chromatographic approach to physicochemical compatibility investigation of 5-aminosalicylates and folic acid, *Croat. Chem. Acta* **94** (2021) 25–33, doi: <https://doi.org/10.5562/cca3799>.
54. M.-L. Jeličić, E. Brusač, D. Amidžić Klarić, B. Nigović, S. Keser, A. Mornar. Physicochemical Compatibility Investigation of Mesalazine and Folic Acid Using Chromatographic and Thermoanalytical Techniques, *Pharmaceuticals* **13** (2020) 187, doi: <https://doi.org/10.3390/ph13080187>.
55. B. Gorain, H. Choudhury, M. Pandey, T. Madheswaran, P. Kesharwani, R. K. Tekade, Chapter 11 - Drug-Excipient Interaction and Incompatibilities, u R. K. Tekade (ur.), *Dosage Form Design Parameters*, Academic Press, 2018., str. 363–402.
56. M. V. Ol'khovich, A. V. Sharapova, S. V. Blokhina, G. L. Perlovich, Sulfasalazine: Dissolution and distribution in pharmaceutically relevant mediums, *J. Chem. Eng. Data* **62** (2017) 123–128, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.6b00497>.
57. C. S. Proikakis, P. A. Tarantili, A. G. Andreopoulos, The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly(DL-lactic acid) tablets, *Eur. Polym. J.* **42** (2006) 3269–3276, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.08.023>.
58. M. L. Jeličić, E. Brusač, S. Kurajica, M. Cvetnić, D. A. Klarić, B. Nigović, A. Mornar, Drug-drug compatibility evaluation of sulfasalazine and folic acid for fixed-dose combination development using various analytical tools, *Pharmaceutics* **13** (2021) 400, doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030400>.
59. A. Kumar, P. Singh, A. Nanda, Hot stage microscopy and its applications in pharmaceutical characterization, *Appl. Microsc.* **50** (2020) 12, doi: <https://doi.org/10.1186/s42649-020-00032-9>.
60. P. Mura, M. T. Faucci, A. Manderioli, G. Bramanti, L. Ceccarelli, Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18** (1998) 151–163, doi: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00171-X).
61. N. Stieger, M. Aucamp, S. W. Zhang, M. M. De Villiers, Hot-stage optical microscopy as an analytical tool to understand solid-state changes in pharmaceutical materials, *Am. Pharm. Rev.* **15** (2012) 1–5.
62. K. Pramod, C. V. Suneesh, S. Shanavas, S. H. Ansari, J. Ali, Unveiling the compatibility of eugenol with formulation excipients by systematic drug-excipient compatibility studies, *J. Anal. Sci. Technol.* **6** (2015) 34, doi: <https://doi.org/10.1186/s40543-015-0073-2>.
63. A. S. El-Houssiny, A. A. Ward, D. M. Mostafa, S. L. Abd-El-Messieh, K. N. Abdel-Nour, M. M. Darwish, W. A. Khalil, Drug-polymer interaction between glucosamine sulfate and alginate nanoparticles: FTIR, DSC and dielectric spectroscopy studies, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **7** (2016) 025014, doi: <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/2/025014>.
64. B. Rojek, M. Wesolowski, Fourier transform infrared spectroscopy supported by multivariate statistics in compatibility study of atenolol with excipients, *Vib. Spectrosc.* **86** (2016) 190–197, doi: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.07.011>.
65. B. Rojek, M. Wesolowski, B. Suchacz, Detection of compatibility between baclofen and excipients with aid of infrared spectroscopy and chemometry, *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **116** (2013) 532–538, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.102>.
66. P. Saganowska, M. Wesolowski, Principal component and

- cluster analyses as supporting tools for co-crystals detection, *J. Therm. Anal. Calorim.* **130** (2017) 45–55, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6436-8>.
67. I. Jendrzejewska, P. Zajdel, E. Pietrasik, Z. Barsova, T. Goryczka, Application of X-ray powder diffraction and differential scanning calorimetry for identification of counterfeit drugs, *Monatshfte fur Chemie* **149** (2018) 977–985, doi: <https://doi.org/10.1007/s00706-018-2193-z>.
68. I. Rodríguez, R. Gautam, A. D. Tinoco, Using x-ray diffraction techniques for biomimetic drug development, formulation, and polymorphic characterization, *Biomimetics* **6** (2021) 1, doi: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6010001>.
69. I. Jendrzejewska, T. Goryczka, E. Pietrasik, J. Klimontko, J. Jampilek, X-ray and Thermal Analysis of Selected Drugs Containing Acetaminophen, *Molecules* **25** (2020) 5909, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25245909>.
70. H. Seçilmiş Canbay, M. Doğantürk, Compatibility Studies of Sildenafil with Different Excipients by Using TGA, DSC, XRD and FTIR, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilim. Derg.* **15** (2019) 401–407, doi: <https://doi.org/10.18466/cbayarfb.613951>.
71. B. V. Joshi, V. B. Patil, V. B. Pokharkar, Compatibility studies between carbamazepine and tablet excipients using thermal and non-thermal methods, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28** (2002) 687–694, doi: <https://doi.org/10.1081/DDC-120003860>.
72. M. Skotnicki, J. A. Aguilar, M. Pyda, P. Hodgkinson, Bisoprolol and bisoprolol-valsartan compatibility studied by differential scanning calorimetry, nuclear magnetic resonance and X-Ray powder diffractometry, *Pharm. Res.* **32** (2015) 414–429, doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1471-7>.
73. K. Litorp, T. G. Larsen, B. Willumsen, R. Holm, Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55** (2011) 424–428, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.02.016>.
74. M. Chidambaram, K. Krishnasamy, Drug-drug/drug-excipient compatibility studies on curcumin using non-thermal methods, *Adv. Pharm. Bull.* **4** (2014) 309–312, doi: <https://doi.org/10.5681/apb.2014.045>.
75. F. Atassi, C. Mao, A. S. Masadeh, S. R. Byrn, Solid-State Characterization of Amorphous and Mesomorphous Calcium Ketoprofen, *J. Pharm. Sci.* **99** (2010) 3684–3697, doi: <https://doi.org/10.1002/jps.21925>.
76. S. Kurajica, *Rendgenska difrakcija na prahu*, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb, 2020.
77. URL: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2011137103> (20. 2. 2022.).
78. M. A. Hofšäss, J. de Souza, N. M. Silva-Barcellos, K. R. Belavinha, B. Abrahamsson, R. Cristofolletti, D. W. Groot, A. Parr, P. Langguth, J. E. Polli, V. P. Shah, T. Tajiri, M. U. Mehta, J. B. Dressman, Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Folic Acid, *J. Pharm. Sci.* **106** (2017) 3421–3430, doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.08.007>.
79. M. L. Jeličić, E. Brusač, D. A. Klarić, B. Nigović, N. Turk, A. Mornar, A chromatographic approach to development of 5-aminosalicylate/folic acid fixed-dose combinations for treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis, *Sci. Rep.* **10** (2020) 20838, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77654-2>.
80. T. Rawat, I. P. Pandey, Forced degradation studies for drug substances and drug products- scientific and regulatory considerations, *J. Pharm. Sci. Res.* **7** (2015) 238–241.
81. T. P. Aneesh, A. Rajasekaran, Forced degradation studies-A tool for determination of stability in pharmaceutical dosage forms, *Int. J. Biol. Pharm. Res.* **3** (2012) 699–702.
82. ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products, Eur. Med. Agency.
83. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review, *J. Pharm. Anal.* **4** (2014) 159–165, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.09.003>.
84. J. Cha, T. Gilmor, P. Lane, J. S. Ranweiler, 12 – Stability Studies, u S. Ahuja, S. Scypinski (ur.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Vol. 10, Academic Press, San Diego, SAD, 2011, str. 459–505.
85. B. Roberto de Alvarenga Junior, R. Lajarim Carneiro, Chemometrics Approaches in Forced Degradation Studies of Pharmaceutical Drugs, *Molecules* **24** (2019) 3804, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24203804>.
86. R. Bhaskar, M. Ola, V. Agnihotri, A. Chavan, H. Girase, Current Trend in Performance of Forced Degradation Studies for Drug Substance and Drug Product's, *J. Drug Deliv. Ther.* **10** (2020) 149–155, doi: <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i2-s.4040>.
87. ICH Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. Eur. Med. Agency.
88. N. Žigart, Z. Časar, Development of a Stability-Indicating Analytical Method for Determination of Venetoclax Using AQBd Principles, *ACS Omega* **5** (2020) 17726–17742, doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02338>.
89. S. Sonawane, S. Jadhav, P. Rahade, S. Chhajed, S. Kshirsagar, Development and Validation of Stability-Indicating Method for Estimation of Chlorthalidone in Bulk and Tablets with the Use of Experimental Design in Forced Degradation Experiments, *Scientifica* **2016** (2016) 4286482, doi: <https://doi.org/10.1155/2016/4286482>.
90. Q. Xu, Advancing USP compendial methods for fixed dose combinations: A case study of metoprolol tartrate and hydrochlorothiazide tablets, *J. Pharm. Anal.* **9** (2019) 77–82, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.003>.
91. R. A. Sversut, J. C. Vieira, N. M. Kassab, D. B. Silva, H. R. N. Salgado, Forced degradation behavior of two-drug combinations: Isolation and characterization of major degradation products by LC-MS, *Microchem. J.* **150** (2019) 104074, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104074>.
92. P. N. Vaingankar, P. D. Amin, Development and Validation of Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metformin HCl and Glimepiride in Fixed-Dose Combination, *Anal. Chem. Insights* **2016** (2016) 13–20, doi: <https://doi.org/10.4137/ACI.S38137>.
93. A. Goel, S. Baboota, J. K. Sahni, K. S. Srinivas, R. S. Gupta, A. Gupta, V. P. Semwal, J. Ali, Development and validation of stability-indicating assay method by UPLC for a fixed dose combination of atorvastatin and ezetimibe, *J. Chromatogr. Sci.* **51** (2013) 222–228, doi: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms131>.
94. B. Saini, G. Bansal, Degradation Study on Sulfasalazine and a Validated HPLC-UV Method for its Stability Testing, *Sci. Pharm.* **82** (2014) 295–306, doi: <https://doi.org/10.3797/scipharm.1311-15>.
95. J. Kaur, Y. Bansal, G. Bansal, Understanding unconventional routes to impurities from drugs in hydrolytic conditions, *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **50** (2016) 161–190, doi: <https://doi.org/10.5530/ijper.50.3.28>.
96. A. M. Gazzali, M. Lobry, L. Colombeau, S. Acherar, H. Azais, S. Mordon, P. Arnoux, F. Baros, R. Vanderesse, C. Frochot, Stability of folic acid under several parameters, *Eur. J. Pharm. Sci.* **93** (2016) 419–430, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.045>.
97. T. R. Kanubhai, P. Mukesh C, K. Amit R, Determination of Mesalamine Related Impurities from Drug Product by Reversed Phase Validated UPLC Method, *Journal Chem.* **8** (2011) 131–148, doi: <https://doi.org/10.1155/2011/382137>.

98. N. Sahoo, M. Sahu, P. Rao, G. Ghosh, Validation of stability indicating RP-HPLC method for the estimation of mesalamine in bulk and tablet dosage form, *Pharm. Methods* **4** (2013) 56–61, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phme.2013.12.003>.
99. R. K. Palsmeier, D. M. Radzik, C. E. Lunte, Investigation of the Degradation Mechanism of 5-Aminosalicylic Acid in Aqueous Solution, *Pharm. Res.* **9** (1992) 933–938, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1015813302412>.
100. E. Daniel, O. Kline, Factors affecting folic acid determination, *J. Biol. Chem.* **170** (1947) 739–746, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30856-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30856-6).
101. M. Dick, I. Harrison, K. Farrer, The thermal stability of folic acid, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **26** (1948) 239–244, doi: <https://doi.org/10.1038/icb.1948.25>.
102. B. Paine-Wilson, T. Chen, Thermal destruction of folacin: Effect of pH and buffer ions, *J. Food Sci.* **44** (2006) 717–722, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08484.x>.
103. X. S. Liang, F. Q. Zhao, L. X. Hao, Research on stability of synthetic folic acid, *Adv. Mater. Res.* **781–784** (2013) 1215–1218, doi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.781-784.1215>.
104. V. K. Marothu, P. Yerramothu, M. Correpati, S. Majeti, S. K. Mamidala, A. Nellutla, Application of HPLC to assess the compatibility of bisoprolol fumarate with selected excipients in mixtures by isothermal stress testing, *Ann. Pharm. Fr.* **73** (2015) 442–451, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.05.001>.
105. R. Kandarapu, V. Grover, H. P. S. Chawla, S. Garg, Evaluation of compatibility of ketorolac tromethamine with selected polymers and common tablet excipients by thermal and isothermal stress testing, *S.T.P. Pharma Sci.* **11** (2001) 449–457.
106. P. Karwa, P. Kasture, R. Kimbahune, Application of thermal and isothermal methods for compatibility studies of metoprolol succinate with carbopol polymers, *Indo Am. J. Pharm. Res.* **3** (2013) 9085–9092.
107. K. S. Veras, F. N. S. Fachel, V. Pittol, K. R. Garcia, V. L. Bassani, V. dos Santos, A. T. Henriques, H. F. Teixeira, L. S. Koester, Compatibility study of rosmarinic acid with excipients used in pharmaceutical solid dosage forms using thermal and non-thermal techniques, *Saudi Pharm. J.* **27** (2019) 1138–1145, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.010>.
108. V. S. Dave, R. V. Haware, N. A. Sangave, M. Sayles, M. Popielarczyk, Drug-Excipient Compatibility Studies in Formulation Development: Current Trends and Techniques, *Am. Assoc. Pharm. Sci.* (2015) 9–15.
109. N. Zaborenko, Z. Shi, C. C. Corredor, B. M. Smith-Goettler, L. Zhang, A. Hermans, C. M. Neu, M. A. Alam, M. J. Cohen, X. Lu, L. Xiong, B. M. Zaccour, First-Principles and Empirical Approaches to Predicting In Vitro Dissolution for Pharmaceutical Formulation and Process Development and for Product Release Testing, *AAPS J.* **21** (2019) 32, doi: <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0297-y>.
110. C. J. Shishoo, S. A. Shah, I. S. Rathod, S. S. Savale, J. S. Kotecha, P. B. Shah, Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid, *Int. J. Pharm.* **190** (1999) 109–123, doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00286-0).
111. S. Singh, T. T. Mariappan, R. Shankar, N. Sarada, B. Singh, A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem, *Int. J. Pharm.* **228** (2001) 5–17, doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00754-2).
112. United States Pharmacopeial Convention. U.S. Pharmacopeial guidelines Dissolution. <711> Dissolution (2011) 1–8.
113. The United States pharmacopeia. The National formulary. Vol. 3, United States Pharmacopoeial Convention, 2014.
114. E. Vranić, A. Mehmedagić, S. Hadžović, Mathematical methods for quantification and comparison of dissolution testing data, *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2** (2002) 49–52, doi: <https://doi.org/10.17305/bjbm.2002.3581>.
115. V. P. Shah, Y. Tsong, P. Sathe, R. L. Williams, Dissolution profile comparison using similarity factor, f₂, *Dissolution Technol.* **15** (1999) 889–896, doi: <https://doi.org/10.14227/DT060399P15>.
116. L. Kassaye, G. Genete, Evaluation and comparison of in-vitro dissolution profiles for different brands of amoxicillin capsules, *Afr. Health Sci.* **13** (2013) 369–375, doi: <https://doi.org/10.4314/ahs.v13i2.25>.

SUMMARY

Determination of Physicochemical Compatibility of Drugs Using Analytical Techniques: A Review of 5-aminosalicylate and Folic Acid Fixed-dose Combination Development

Mario-Livio Jeličić

With the use of fixed-dose drug combinations, the potential risk of non-adherence needs to be minimised, which is particularly important in patients with chronic diseases. The development of such dosage form is a complex process in which an important role is played by testing the physicochemical compatibility of the components intended for the manufacture of the desired product. Various analytical techniques, such as thermoanalytical (DSC, DTA), spectroscopic (FTIR, XRPD) and chromatographic (HPLC), in combination with certain degradation studies, such as forced degradation and isothermal degradation, are often used. In this review, on the example of the development of a fixed-dose combination of 5-aminosalicylate and folic acid, procedures suitable for testing the compatibility of drug components, as well as analytical techniques and various ways of interpretation of results are described.

Keywords

Physicochemical compatibility, analytical techniques, 5-aminosalicylates, folic acid, fixed-dose combinations

Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
University of Zagreb, Ante Kovačića 1,
10 000 Zagreb, Croatia

Review
Received February 22, 2022
Accepted April 6, 2022