

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ČREŠNIK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MAJA ČREŠNIK

**OVREDNOTENJE RAZLIČNIH MEDIJEV IN SILIKONSKIH VREČ
ZA IZVEDBO PRESKUSA SPROŠČANJA IZBRANIH VZORCEV
TRDIH KAPSUL NA NAPRAVI ZA POSNEMANJE ŽELODČNEGA
GIBANJA**

**EVALUATION OF DIFFERENT MEDIA AND SILICONE BAGS FOR
IMPLEMENTATION OF DISSOLUTION TESTING OF SELECTED
SAMPLES OF HARD CAPSULES ON AN APPARATUS
SIMULATING THE MOVEMENT OF HUMAN STOMACH**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek d.d. Ljubljana, na oddelku *In vitro-in vivo* korelacije, pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorstvom dr. Igorja Legna, mag. farm.

Zahvala

Zahvalila bi se rada doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. in somentorju dr. Igorju Legnu, mag. farm., za vse strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Posebna zahvala gre Meliti Hribar, mag. farm., za njen trud, koristne nasvete in, ker je bila vedno pripravljena pomagati.

Prav tako se zahvaljujem vodstvu in sodelavcem oddelka *In vitro-in vivo* korelacije v podjetju Lek d.d. Ljubljana, ki so mi omogočili izvedbo magistrske naloge.

Iskrena zahvala gre mojim staršem, sestri z družino in fantu za nenehno podporo, spodbudo, zaupanje in potrpežljivost.

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem za nepozabna študijska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorja dr. Igorja Legna, mag. farm.

Maja Črešnik

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Janez Ilaš

Član komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

VSEBINA

VSEBINA.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO TABEL.....	III
KAZALO GRAFOV	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
1. UVOD.....	1
1.1 ŽELODEC	1
1.1.1 ANATOMIJA ŽELODCA	1
1.1.2 FIZIOLOŠKI POGOJI V ŽELODCU	2
1.1.3 MOTILITETA ŽELODCA	3
1.1.4 VPLIV HRANE NA FARMACEVTSKE OBLIKE IN UČINKOVINE.....	4
1.1.5 ŽELODČNO PRAZNJENJE	6
1.2 SPROŠČANJE	6
1.3 FARMAKOPEJSKI PRESKUSI SPROŠČANJA	7
1.4 ALTERNATIVNI PRESKUSI SPROŠČANJA.....	7
1.4.1 ENOSTAVNI STATIČNI SISTEMI	7
1.4.2 DINAMIČNI SESTAVLJENI SISTEMI	9
1.5 TRDE ŽELATINSKE KAPSULE.....	14
1.5.1 KAPSULE KOT FARMACEVTSKA OBLIKA.....	14
1.5.2 STABILNOST TRDIH ŽELATINSKIH KAPSUL	14
1.5.3 RAZPAD TRDIH ŽELATINSKIH KAPSUL.....	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Farmacevtska oblika.....	18
3.1.2 Aparature	18
3.1.3 Kemikalije in standardi	18
3.1.4 Ostalo	19
3.2 METODE	19

3.2.1 Priprava medijev za preskuse sproščanja.....	19
3.2.2 Analitika vzorcev	21
3.3 NAPRAVA ZA POSNEMANJE ŽELODČNEGA GIBANJA	22
3.3.1 Opis naprave	22
3.3.2 Izvedba preskusa sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja	25
3.3.3 Pregled poskusov opravljenih v okviru magistrske naloge	26
3.4 IZDELAVA SILIKONSKE VREČE	28
3.5 SESTAVA TESTNIH FORMULACIJ.....	29
4. REZULTATI	30
5. RAZPRAVA.....	37
5.1 PRESKUSI SPROŠČANJA OPRAVLJENI NA NAPRAVI Z VESLI (USP II)	37
5.2 PRESKUSI SPROŠČANJA OPRAVLJENI NA NAPRAVI ZA POSNEMANJE ŽELODČNEGA GIBANJA	37
5.2.1 Gibanje relativnih standardnih deviacij (RSD).....	38
5.3 PRIMERJAVA REZULTATOV	41
5.3.1 Vpliv silikonske vreče	41
5.3.2 Vpliv izbora medija	44
5.3.3 Vpliv encima	46
5.3.4 Vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske obremenitve	47
5.3.5 Vpliv farmacevtske oblike	52
6. SKLEP	54
7. VIRI.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz anatomskih značilnosti želodca; povzeto po (5).

Slika 2: Shematski prikaz kontrakcij v želodcu na tešče in po obroku; povzeto po (8).

Slika 3: Shematski prikaz antralnih kontrakcij; povzeto po (4).

Slika 5: Shematski prikaz naprave z mrežico in balonom; povzeto po (17).

Slika 4: Shematski prikaz praznjenja želodca na tešče in po obroku; povzeto po (11).

Slika 6: Shematski prikaz dinamičnega modela želodca (DGM); povzeto po (23).

Slika 7: Shematski prikaz gastrointestinalnega TIM modela; povzeto po (12).

Slika 8: Prikaz človeškega želodčnega simulatorja. (1) motor; (2) ovojnica iz lateksa; (3) mrežasta vreča; (4) cevke za sekrecijo; (5) valji; (6) pasovi; (7) žarnica za nadzor temperature; (8) izolacijska komora; povzeto po (25).

Slika 9: Fotografija naprave za posnemanje želodčnega gibanja.

Slika 10 in 11: Prikaz zaslonk naprave za posnemanje želodčnega gibanja in mehanskih delov, potrebnih za ustvarjanje vzorcev gibanja, povzeto po (32).

Slika 12: Prikaz modela za izdelavo silikonske vreče.

Slika 13: Fotografija ročno izdelane silikonske vreče 8.

Slika 14: Fotografija posneta po koncu testa pri katerem smo v medij pH=5 dodali testenine.

Slika 15: Razlike med razpadanjem HGC in HPMC kapsul. Levo je prikazan razpad HGC kapsule v 4. in 8. minuti, desno je prikazan razpad HPMC kapsule v 4. in 8. minuti.

KAZALO TABEL

Tabela I: Opravljene serije eksperimentov na napravi za posnemanje želodčnega gibanja.

Tabela II: Nastavitve začetnega položaja zaslonk v primeru V_002_hitra ali V_002_hrana programa.

Tabela III: Nastavitve parametrov na napravi za posnemanje gibanja želodca pri izvedbi preskusov sproščanja, s katerima ponazorimo hitrost peristaltičnega vala.

Tabela IV: Sestava pomožnih snovi testnih formulacij.

Tabela V: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 6 (V6) v deionizirani vodi.

Tabela VI: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 6 (V6) v 0,01 M HCl + NaCl.

Tabela VII: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 7 (V7) v deionizirani vodi.

Tabela VIII: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 7 (V7) v 0,01 M HCl + NaCl.

Tabela IX: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v 0,01 M HCl + NaCl.

Tabela X: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v 0,01 M HCl + NaCl + HPMC.

Tabela XI: Preskusi sproščanja vzorca E na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v različnih medijih.

Tabela XII: Preskusi sproščanja vzorca E na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v mediju pH=5 z dodatkom steklenih kroglic in hrane.

Tabela XIII: Preskusi sproščanja na napravi z vesli (USPII) v deionizirani vodi.

Tabela XIV: Preskusi sproščanja na napravi z vesli (USPII) v 0,01 M HCl + NaCl.

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Profil sproščanja vzorca A, B, C in D v deionizirani vodi na napravi z vesli (USP II).

Graf 2: Profil sproščanja vzorca A, B, C in D v 0,01 M HCl + NaCl na napravi z vesli (USP II).

Graf 3: Primerjava povprečnih RSD vrednosti skozi serije preskusov pri eni izmed testnih formulacij (vzorec E z vrečo 8(V8)); serija 1 – voda, serija 2 - 0,01 M HCl + NaCl, serija 3 - 0,001 M HCl + NaCl, serija 4 - 0,1 M HCl + NaCl, serija 5 – SGF, serija 6 - SGF + pepsin, serija 7 – FaSSGF, serija 8 - 0,01 M HCl + NaCl + 1 % HMPC, serija 9 - pH=5 + hrana, serija 10 - pH=5 + kroglice (60), serija 11 - pH=5 + kroglice (100)

Graf 4: RSD vrednosti vzorca E v vreči 8 (V8) v enem izmed medijev, ki predstavljajo približno povprečje gibanja RSD vrednosti vseh vzorcev v različnih časovnih točkah tekom večkratnih ponovitev testiranja z napravo za posnemanje želodčnega gibanja.

Graf 5: Primerjava vpliva vreče na sproščanje v dveh medijih.

Graf 6: Ločljivost vreče 6 med različnimi testnimi formulacijami.

Graf 7: Ločljivost vreče 7 med različnimi testnimi formulacijami.

Graf 8: Primerjava vpliva silikonskih vreč na profil sproščanja formulacije referenčnega zdravila.

Graf 9: Vpliv pH medija na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

Graf 10: Vpliv encima na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

Graf 11: Vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske obremenitve na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

Graf 12: Vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske obremenitve na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

Graf 13: Vpliv FO (HGC / HPMC) na profil sproščanja testnih formulacij (vzorec E in F).

POVZETEK

Sproščanje zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike v okoliški medij je izrednega pomena, saj le raztopljena zdravilna učinkovina prehaja biološke membrane, kar pomeni njeno absorpcijo in biološko uporabnost. V farmacevtski industriji za testiranje sproščanja uporabljamo *in vitro* teste, ki predstavljajo pomemben del vrednotenja zdravil, saj z njimi izvajamo kontrolo kakovosti farmacevtskega izdelka. Poleg tega so pomembni za razvoj generičnih zdravil s primerjanjem testne in referenčne formulacije ter za napoved *in vivo* delovanja. Rezultati testov sproščanja se nadalje uporabijo za izdelavo modelov *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVC), s tem pa se lahko zmanjša število študij na ljudeh. Poleg klasičnih farmakopejskih preskusov sproščanja so za namene razvoja vedno bolj v uporabi alternativni preskusi sproščanja, s katerimi želimo simulirati realistične človeške pogoje s ciljem čim boljšega napovedovanja obnašanja zdravila po aplikaciji. Sisteme je mogoče nadzorovati in upravljati tako, da posnemajo specifične pogoje in vplive posameznih parametrov v gastrointestinalnem traktu. Eden izmed novih alternativnih *in vitro* modelov za preskuse sproščanja je tudi naprava za posnemanje želodčnega gibanja za sproščanje trdnih peroralnih farmacevtskih oblik v želodcu, razvita v podjetju Lek d.d. Ljubljana v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo (Univerza v Ljubljani).

Glavni namen magistrske naloge je bil opredeliti uporabnost tega novega *in vitro* modela za sproščanje trdnih kapsul. S predstavljenimi rezultati želimo demonstrirati uporabnost novega *in vitro* modela, za katerega pričakujemo, da bo lahko prikazal razlike med formulacijami, ki so pomembne *in vivo*. Preskusili smo pet testnih formulacij trdnih želatinskih kapsul, ena izmed testnih formulacij pa je bila vgrajena v hidroksipropilmetil celulozne kapsule. Ovrednotili smo vpliv različnih medijev in silikonskih vreč na sproščanje izbranih vzorcev. Pokazali smo, da je odziv naprave zelo odvisen od lastnosti uporabljene silikonske vreče, s katero izkazuje bolj ali manj diskriminatorno obnašanje in tako vpliva na hitrost in delež sproščene zdravilne učinkovine. Prav tako smo pokazali, da naprava smiselno razporedi vzorce z različnimi lastnostmi glede na hitrost sproščanja. Dobljeni profili sproščanja so bili prav tako razporejeni glede na pričakovan vpliv pH medija. Ovrednotili smo vpliv dodatkov, ki naj bi simulirali pogoje po hranjenju, na kinetiko sproščanja. Pričakovali smo, da bo dodatek dejanske hrane, steklenih kroglic ali povečane viskoznosti medija simuliral obnašanje farmacevtske oblike v želodcu po zaužitju obroka, vendar z izbrano formulacijo nismo pridobili pričakovanih rezultatov.

Nazorno pa smo uspeli pokazati, da novo razviti model uspešno razlikuje med trdimi želatinskimi in HPMC kapsulami.

Ključne besede: *model za posnemanje želodčnega gibanja, alternativni preskusi sproščanja, in vitro-in vivo korelacija, trda želatinska kapsula, pH medija, mehanska obremenitev*

ABSTRACT

The release of the active ingredient from its dosage form to the surrounding medium is of crucial importance as only the dissolved active substance passages through the biological membranes, leading to its absorption and bioavailability. In the pharmaceutical industry, in vitro tests are used for studying dissolution levels. These present an important part of evaluating medications as they indicate the quality of the pharmaceutical product. Additionally, they are important for the development of generic medications for the comparisons of the test and reference formulation and for the forecast of in vivo performance. The results of the tests are then used for establishment in vitro-in vivo correlation (IVIVC) models which can help decrease the number of human studies. In addition to the classical pharmacopoeial dissolution tests, there are more and more alternative dissolution tests with the aim to simulate the realistic human conditions for better prediction of the drug performance after its application. The systems can be monitored and managed in such a way that they replicate specific conditions and influences of individual parameters in the gastrointestinal tract. One of the new alternative in vitro models for dissolution testing is also a device that simulates the movements of the human stomach for evaluation of dissolution of solid oral dosage forms in the stomach. The device was developed in the company Lek d.d. Ljubljana in collaboration with the Faculty of mechanical engineering (University of Ljubljana).

The main aim of the master's thesis was to determine the applicability of this new in vitro model for dissolution of hard capsules. The main results of this study demonstrate that the newly developed dissolution model can be used successfully to differentiate among various formulations with divergent in vivo dissolution profiles. Five test formulations of hard gelatine capsules were tested and one of these formulations was incorporated into the hydroxypropyl cellulose capsules. Influences of various dissolution media and silicone bags were evaluated for their effect on dissolution profiles. We demonstrated that the model response is crucially dependant on the characteristics of the silicon which influence the rate and the extent of drug release. Consequently this also affects the model's discriminating power. We also demonstrated that the device successfully arranges the rank-order of the samples according to their different release rate characteristics. The obtained dissolution profiles at various pH values were also in line with the theoretically expected pH influences. We evaluated the influence of the supplements that should simulate the

conditions after feeding on the dissolution kinetics. We expected that adding actual food, glass balls or a medium with increased viscosity would simulate the behaviour of the dosage form in the stomach after consumption of food, but the chosen formulation and/or test parameters did not bring us the expected results. We were however able to show that the newly developed model successfully differentiates between capsules made from hard gelatin and HPMC.

Key words: *model for simulating the movements of the human stomach, alternative dissolution tests, in vitro-in vivo correlation, hard gelatine capsule, pH medium, mechanical stress*

SEZNAM OKRAJŠAV

ASD – umetni model želodca in dvanajstnika (ang. Artificial Stomach Duodenal Model)

BCS – biofarmacevtska klasifikacija (ang. Biopharmaceutics Classification System)

BU – biološka uporabnost

DGM – dinamični gastrični model (ang. Dynamic Gastric Model)

EMA – Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency)

FaSSGF – umetni želodčni sok, ki posnema pogoje na tešče (ang. Fasted State Simulated Gastric Fluid)

FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)

FO – farmacevtska oblika

GIT – gastrointestinalni trakt

HGC – ang. Hard Gelatin Capsules

HGS – človeški želodčni simulator (ang. Human Gastric Simulator)

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High-performance Liquid Chromatography)

HPMC – hidroksipropilmetilceluloza (ang. Hydroxipropil metil cellulose)

IVIVC – *in vitro-in vivo* korelacija (ang. *In vitro-In vivo* Correlation)

MCC – mikrokristalna celuloza (ang. Microcrystalline Cellulose)

MMC – migrirajoči motorični kompleks

MRI – magnetna resonanca (ang. Magnetic Resonance)

Ph.Eur. – Evropska farmakopeja (ang. European Pharmacopoeia)

RPM – število obratov na minuto (Revolutions Per Minute)

RSD – relativna standardna deviacija

SD – standardna deviacija

SGF – Simulirana želodčna tekočina (ang. Simulated Gastric Fluid)

SIF - Simulirana črevesna tekočina (ang. Simulated Intestinal Fluid)

USP – Ameriška farmakopeja (ang. United States Pharmacopeia)

USP I – naprava s košarico

USP II – naprava z vesli

USP III – naprava z recipročnimi valji

USP IV – naprava s pretočno celico

UV – ultravijolična svetloba

VIS – vidna svetloba

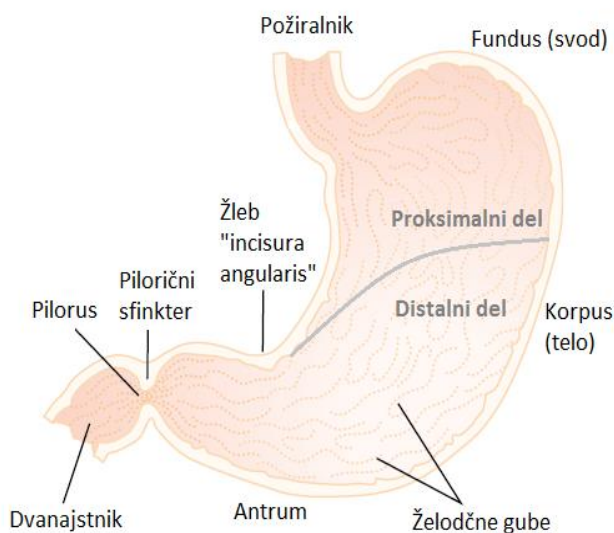
ZU – zdravilna učinkovina

1. UVOD

1.1 ŽELODEC

1.1.1 ANATOMIJA ŽELODCA

Človeški želodec je votel in elastičen organ v obliki črke »J« in je razdeljen na 4 glavne dele: *fundus*, *corpus*, *antrum* in *pilorus*. Najpomembnejše funkcije želodca so: shranjevanje, mešanje in praznjenje ter s tem tvorba himusa. Proksimalni del želodca sestavljata fundus in corpus, ki služita kot rezervoar za neprebavljeno hrano, hkrati pa sta odgovorna za praznjenje tekočin. Distalni del želodca je debela mišična stena sestavljena iz antruma in pilorusa, ki sta odgovorna za mletje, mešanje in sejanje himusa, hkrati pa služita kot črpalka za želodčno praznjenje ter kot mišica zapiralka (sfinkter). Želodec služi kot rezervoar zaradi svojega fleksibilnega volumna, saj lahko shranjuje hrano do volumna 1,5 L (1, 2). Volumen želodčne vsebine v stanju na tešče pa je relativno majhen in znaša od 10 do 50 mL. Prazen želodec je seseden kot prazna vrečka, razen fundusa, ki je lahko raztegnjen zaradi zraka, ki ga pogoltne ali zaradi ogljikova dioksida, ki je produkt razgradnje bikarbonata (3). Želodec je tako najširši (približno 10 cm) in najbolj prilagodljiv v delu fundusa (višina 2-4 cm), navzdol proti pilorusu pa postane ožji in manj prilagodljiv (premer človeškega pilorusa je 1 cm ali manj). Korpus se razteza od kardije do žleba, imenovanega incisura angularis. Bolusi hrane vstopijo iz požiralnika v želodec in se zbirajo v zračnem mehurčku fundusa, nato se premikajo do korpusa in od tam dalje zdrsnejo v distalni del želodca ob majhni krivini. Antrum je v obliki stožca, ko je napolnjen in v obliki cevi, ko je skrčen. Razdalja med najvišjo in najnižjo točko želodca je približno 20-22 cm. Razdalja med veliko krivino in izhodom želodca pa je približno 8 cm. Te razdalje narastejo ob polnjenju želodca in spet padejo ob presnovi in praznjenju želodca. Usedline težje od vode se zberejo v sinusu, medtem ko maščobe plavajo na vrhu želodčne vsebine. Navpična



Slika 1: Shematski prikaz anatomskih značilnosti želodca; povzeto po (5).

pozicija želodca povzroči plastenje hrane po viskoznosti. Zadnji vnosi bolusov hrane se naložijo navpično vzdolž male krivine, medtem ko se zgodnejši vnosi bolusov širijo vodoravno ob veliki krivini (2, 4).

1.1.2 FIZIOLOŠKI POGOJI V ŽELODCU

Narava želodčne vsebine je rezultat toka sline, želodčnih izločkov in stanja želodca, na tešče ali po obroku (3). Osnovne komponente želodčnega soka so klorovodikova kislina (HCl), pepsinogeni, mukus in voda. HCl pomaga pri razgradnji hrane, aktivira pepsinogen in ubije večino zaužitih bakterij. Pepsinogen je neaktivna oblika encima pepsina, ki je glavni encim želodčnega soka. Mukus pa tvori želatinsko prevleko čez površino sluznice (1). Vnos hrane in razširitev želodca povzroči izločanje želodčnega soka. Želodec izloči 2 – 3 L želodčnega soka na dan. Stopnja izločanja lahko iz 1 mL/min v pogojih na tešče naraste na 10 - 50 mL/min po obroku. Poleg povečanega vnosa hrane, izločanje želodčnega soka povečata tudi višja vsebnost proteinov v hrani in višja viskoznost obroka (3).

V pogojih na tešče je želodčni pH pri zdravih ljudeh v območju 1-3. pH v prebavnih sokovih lahko bistveno vpliva na raztapljanje zdravilne učinkovine (v nadaljevanju ZU) in posledično na njeno absorpcijo. Pod kislimi pogoji na tešče je očitno, da je raztapljanje šibkih kislin z višjimi pKa vrednostmi, kot je pH vrednost želodčnega okolja, ovirano, saj so takšne ZU primarno neionizirane. V nasprotju pa so šibke baze v takšnem okolju v veliki meri ionizirane, kar izboljša njihovo raztapljanje. Po zaužitju obroka lahko pH vrednost želodčne vsebine naraste tudi do 7 odvisno od sestave in volumna obroka, in traja tudi do več ur, da se vrne na osnovno vrednost, še posebej, če smo zaužili visoko kalorično hrano (3, 6).

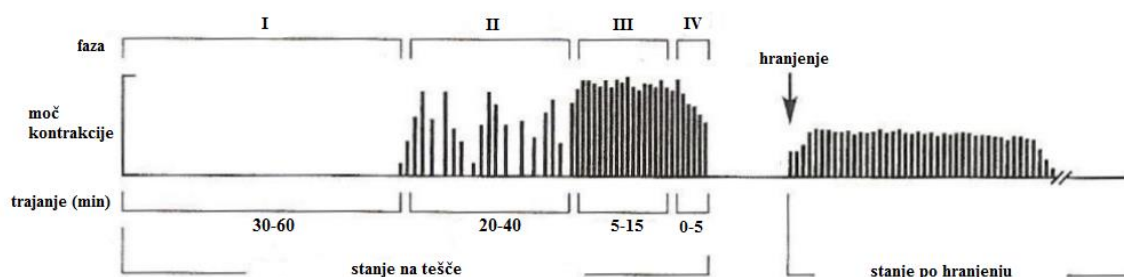
Puferska kapaciteta, površinska napetost, žolčne soli in osmolarnost prav tako pomembno vplivajo na prebavo hrane in zdravil. Puferska kapaciteta želodčne vsebine je visoka v stanju na tešče v primerjavi s stanjem po obroku in se nahaja v razponu od 5 do 30 mmol/L/pH. Povprečna koncentracija žolčnih soli je od 80 do 275 μ M, površinska napetost od 28 do 51 mN/m, osmolarnost pa od 191 do 200 mOsm/kg. Glavni kationi v želodčnem soku so natrijevi (70 mM), kalijeve (15 mM) in oksonijeve kationi, glavni anion pa je klor (100 mM). Tipičen želodčni sok je viskozna tekočina z viskoznostjo približno v območju od 10 do 2000 mPa*s in gostoto blizu gostoti vode (1). Viskoznost je zanimiva lastnost zaradi dejstva, da je obratno sorazmerna z difuzijo, ki nadalje vpliva na želodčno prebavo hrane in raztapljanje farmacevtske oblike (v nadaljevanju FO) in ZU. Poleg tega vpliva na

želodčno mešanje in pogoje pretoka v stanju po zaužitju obroka, kar posledično vpliva tudi na motiliteto želodca (3, 6).

1.1.3 MOTILITETA ŽELODCA

Motiliteta želodca na tešče

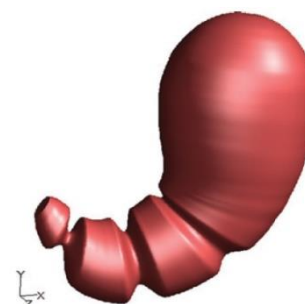
V stanju na tešče poznamo gibanje želodca v 4 fazah, tako imenovani migracijski motorični (mioelektrični) kompleks (v nadaljevanju MMC). Ciklični vzorec krčenja prevladuje zaradi krožnih mišičnih kontrakcij. Ta cikel nadalje razdelimo v 4 faze glede na moč kontrakcij, vsaka pa traja različno časa. Faza I traja 40 do 60 minut z redkimi kontrakcijami. Faza II se nadaljuje približno enako časa, ampak s povečano frekvenco in močjo kontrakcij (do 40 mm Hg). Faza III je kratka (4-6 minut), ampak ima največjo kontrakcijsko moč (do 80 mm Hg). Med to fazo želodec izprazni vso neprebavljeno hrano v tanko črevo. Faza IV je prehodna faza med fazo III in I, ki običajno traja 15 do 30 minut. Celoten MMC cikel se ponovi približno na 2 uri, dokler ne zaužijemo hrane (1, 7).



Slika 2: Shematski prikaz kontrakcij v želodcu na tešče in po obroku; povzeto po (8).

Motiliteta po obroku

Ob zaužitju hrane se vzorec kontrakcij spremeni v vzorec motilitete prebave, ki je kontinuiran z zmerno močjo v območju 15 do 20 mm Hg. Delujeta dva tipa kontrakcij, normalne tonične kontrakcije in peristaltične kontrakcije. Tonične kontrakcije ustvarjajo plitve vdolbine na proksimalni strani velike krivine, ki potiskajo hrano z vrha proti dnu želodca. Peristaltične kontrakcije so predvsem posledica kontrakcije vzdolž želodca, nastane pa iz toničnih kontrakcij na zgornji površini želodca. Vali kontrakcij, ponavadi 2 do 3, se zaporedno širijo navzdol proti pilorusu. Frekvenca kontrakcij je približno 3/min, njihova povprečna hitrost pa je 2,5



Slika 3: Shematski prikaz antralnih kontrakcij; povzeto po (4).

mm/s in narašča od proksimalnega proti distalnemu delu želodca. Vsaka kontrakcija potrebuje približno 1 minuto za napredovanje od fundusa proti pilorusu. (1, 3, 9).

Medtem se pilorus skrči, sfinkter pa zoža, tako da je odpiranje pilorusa ob prihodu peristaltičnega vala majhno. Himus je takrat potisnjen nazaj v želodec, kar imenujemo retropulzacija. Retropulzacija je odgovorna za drastično mešanje in emulgiranje hrane z želodčnimi sokovi, povzroča tudi mletje in drgnjenje med delci hrane in/ali želodčno steno. Ponavljajoče mešanje in retropulzacija zmanjša delce hrane v mehko konsistenco v obliki suspenzije. Pojavijo se antropilorične kontrakcije, ki povzročijo, da se pilorus delno odpre in deluje kot sito skozi katero kontinuirano prehajajo tekočine in majhni delci (< 1 do 2 mm) v dvanajstnik, medtem ko se neprebavljeni delci večji od 2 mm zadržijo v želodcu. Ko se obrok hrane popolnoma izprazni iz želodca, se ponovno vzpostavi vzorec motilitete, ki poteka v stanju na tešče. Še vedno neprebavljeni veliki delci hrane pa se izpraznijo iz želodca med naslednjimi III fazami (1, 2, 3, 9). Kontrakcije želodca, še posebej terminalna antralna kontrakcija, povzroči precejšnjo destruktivno mehansko silo na delce hrane in zato igra zelo pomembno vlogo pri razpadu trdnih snovi. Destruktivne mehanske sile delujejo v stanju na tešče s silo 1,50 N, v stanju po obroku pa s silo 1,89 N (1). Obroki, zaradi svojega volumna, kemijskih in fizikalnih lastnosti vplivajo na amplitudo kontrakcij, dolžino oz. razdaljo širjenja in na trajanje želodčne peristaltike (3).

1.1.4 VPLIV HRANE NA FARMACEVTSKE OBLIKE IN UČINKOVINE

Po vnosu zdravila v telo, mora FO, kot so klasične tablete ali kapsule s takojšnjim sproščanjem, najprej razpasti na porozne granule, čemur sledi hitro sproščanje ZU v okoliški medij. Razpad FO in sproščanje ZU sta odvisna tako od lastnosti ZU, njene morfologije, soli in tehnološkega procesa izdelave FO.

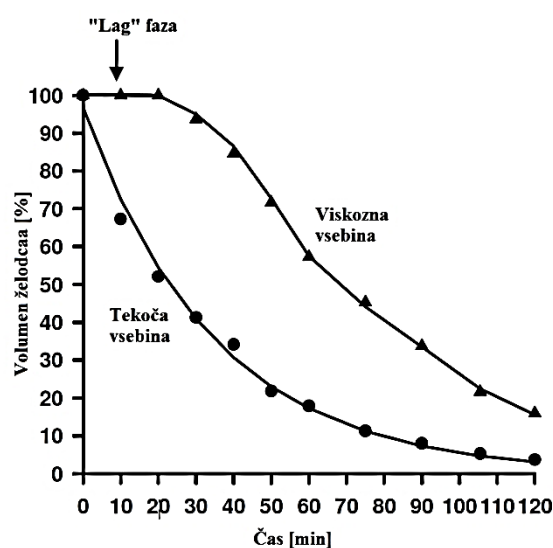
Po obroku trdne FO v želodcu podležejo podobnim pogojem kot hrana, poleg tega pa želodčna kislina, encimske reakcije ter hidrodinamske in mehanske sile vplivajo na potek raztapljanja (oz. sproščanja) (1, 3). Motiliteta želodca se kaže kot delovanje želodčnega toka vsebine, ki pa je odgovoren za mešanje želodčne vsebine z izločki in tekočinami. Intenzivno mesto mešanja predstavlja antrum, medtem ko v fundusu skoraj ne pride do mešanja. Mešanje želodčne vsebine je ključnega pomena za zagotavljanje enakomernega toka hranil in zdravil v dvanajstnik. Zato je za racionalni razvoj novih FO potrebno dobro poznati pogoje v želodcu. Obroki z nizko viskoznostjo se hitro razporedijo po želodcu in izpraznijo v kratkem času. V primeru visoko viskoznih in/ali trdnih obrokov je situacija

mnogo bolj kompleksna. Hrana je najprej shranjena v fundusu, nato se v antrumu predela, mogoče prerazporedi v proksimalni del želodca in šele nato se končno izloči. Vendar izloči se šele takrat, ko himus doseže določene lastnosti, kot so ustrezna velikost delcev in viskoznost. Glede na to, da se območja v želodcu razlikujejo po funkcionalnosti, je zelo pomembno, kje v želodcu pristane trdna FO. Delec hrane ali trdne FO, ki se zadrži v fundusu, je izpostavljen precej majhnim strižnim silam, je pa izpostavljen nižjim pH vrednostim in najverjetneje tudi mediju z variabilno sestavo, takšni pogoji pa lahko znatno vplivajo na raztapljanje. Zaradi izločkov, ki prihajajo iz želodčne stene, se med notranjim in zunanjim območjem želodčnega lumna ustvarijo gradienti pH-ja in viskoznosti. Viskoznost vpliva na difuzijo in mešanje, kar povzroča heterogeno porazdelitev zdravila. Volumen porazdelitve je manjši v visoko viskoznem homogenem obroku kot v nekem heterogenem obroku, ker je za slednjega značilno, da je dostop tekočine lažji (3).

Standardni zajtrk, ki ga priporoča FDA za uporabo v kliničnih preskusih, je visoko maščoben in kaloričen obrok. Zadrževanje netopnih enoodmernih trdnih FO v želodcu poteka skupaj z zaužitim obrokom v primerjavi s tistimi, ki jih zaužijemo v stanju na tešče. Testi s kapsulo SmartPill® so pokazali, da je čas zadrževanja zdravila v želodcu v takšnih pogojih več kot 6 ur ali dlje, če zaužijemo več hrane. Dolgi časi zadrževanja zdravila lahko vodijo v resne probleme za paciente. Na primer, če mora biti zdravilo zaužito večkrat na dan in je zaužit obrok hrane podoben navadam zahodnih držav, kar pomeni 3 do 4 obroke na dan, obstaja verjetnost, da so vsi odmerki FO zadržani v želodcu dlje časa in se lahko kasneje vsi naenkrat izpraznijo iz želodca. Posledica je lahko neželena visoka raven zdravila v sistemskem krvnem obtoku. V stanju po obroku delujejo drugačne sile na FO. MMC se ponovno pojavi, ko se celoten obrok prenese v dvanajstnik. V procesu praznjenja želodčne vsebine, med t.i. »housekeeping« valom, ki skrbi, da se celotna vsebina popolnoma izprazni iz želodca, delujejo na večje netopne FO močnejše sile. Visoki pritiski lahko povzročijo tako imenovan »dose dumping« FO s podaljšanim sproščanjem, kar pomeni, da se ves odmerek ali velik delež odmerka sprosti v zelo kratkem času po aplikaciji. Obstaja razlaga, da je manjša možnost »dose dumping« pojava na pelete kot na enoodmerne FO. Domneva se, da se v takšnem stanju na večje FO, kot so tablete in kapsule, izvaja večji pritisk, medtem ko na manjše FO, kot so pelete ni tako močnega pritiska (3, 10).

1.1.5 ŽELODČNO PRAZNJENJE

Spremembe v želodčnem tonusu in želodčna peristaltika povzročijo praznjenje želodca. Po vodenem in izotoničnem obroku se proksimalni del želodca hitro skrči, distalni del želodca in pilorus pa se razširita. Želodčni pretok v stanju na tešče v povprečju ne preseže 2 mL/min. V nasprotju pa visoko kaloričen in težje prebavljiv obrok vodi do globoke in podaljšane relaksacije proksimalnega dela želodca in tonusno zaprtje antruma, pilorusa in dvanajstnika. Želodčni pretok je pulzirajoč, ki s posameznimi pulzi teče skozi pilorus v razponu od 2-4 ml/min po običajnem obroku. Tekočine se izpraznijo iz želodca po kinetiki 1. reda, kar lahko najbolje prikažemo z izrazito eksponentno krivuljo. Sile, odgovorne za to, so visoka napetost želodčne stene, ki se ustvari zaradi velikih volumnov. Trdni delci se iz želodca izpraznijo z bistveno drugačno kinetiko, 0. reda, ki je neodvisna od želodčnega volumna. Želodec zadrži delce, katerih premer presega 2 mm in tiste, katerih gostota je drugačna od gostote vode za nadaljnjo prebavo. Trajanje faze prebavljanja v želodcu je odvisno od fizikalnih lastnosti hrane. Lahko preteče tudi do nekaj ur med zaužitjem in dejanskim efluksom delcev oz. himusa. To fazo imenujemo »lag« faza oz.



Slika 4: Shematski prikaz praznjenja želodca na tešče in po obroku; povzeto po (11).

faza zakasnitve praznjenja. Trdne jedi izzovejo močnejšo inhibicijo želodčnih kontrakcij kot tekočine, prav tako pa izzovejo tudi večje izločanje želodčnih tekočin in encimov. Vsak tok, ki ga ustvari kontrakcija, mora biti kontroliran, da se veliki in kompaktni delci zadržijo in počakajo na prebavo, medtem ko se tekočine in majhni delci raztopljeni v tekočini praznijo v dvanajstnik (2, 11).

1.2 SPROŠČANJE

Sproščanje je proces prehoda ZU iz FO v okoliški medij, kjer je ZU v raztopljenem stanju (8), od koder se potem lahko absorbira in pride na mesto delovanja. V farmacevtski industriji za testiranje sproščanja uporabljamo *in vitro* teste, ki predstavljajo pomemben del vrednotenja zdravil, saj z njimi izvajamo kontrolo kakovosti farmacevtskega izdelka. To nam omogoča spremljanje skladnosti med proizvodnimi serijami ter vrednotenje manjših

sprememb, ki jih želimo implementirati po uvedi zdravila na trg. Poleg tega so pomembni za razvoj generičnih zdravil s primerjanjem testne in referenčne formulacije ter za oceno *in vivo* delovanja. Rezultati testov sproščanja se nadalje uporabijo za izdelavo modelov *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVC), s tem pa se lahko zmanjša število študij na ljudeh (12). Poleg lastnosti ZU in FO na hitrost *in vitro* sproščanja vplivajo tudi pogoji testiranja. Pomembna je predvsem sestava medija (ionska moč, osmolarnost, pH in prisotnost žolčnih soli), njegova viskoznost, temperatura in tudi volumen. Običajno se uporablja volumne medija, ki omogočajo »sink« pogoje, kar pomeni, da je hitrost raztapljanja neodvisna od koncentracije že raztopljene ZU (13).

1.3 FARMAKOPEJSKI PRESKUSI SPROŠČANJA

Ameriška farmakopeja (USP) je prva objavila standarde za testiranje razpadnosti in raztapljanja tablet in kapsul. Standardi predvidevajo, da je *in vitro* sproščanje nadomestek za *in vivo* absorpcijo. Po USP zahtevah in FDA smernicah obstajajo 4 vrste osnovnih tipov naprav za testiranje sproščanja. USP I ali napravo s košarico sestavlja žična vrteča se košarica v mediju za raztapljanje. Košarica se vrti s konstantno hitrostjo med 25 in 150 obratov na minuto. USP II ali naprava z vesli je podobna USP I, s to razliko, da se namesto košarice vrti veslo. USP III ali naprava z recipročnimi valji je sestavljena iz valja, ki se recipročno premika gor in dol v mediju in kamor vstavimo FO. Pri USP IV ali napravi s pretočno celico se medij za raztapljanje kontinuirano črpa skozi pretočno celico, v katero je vstavljena FO. USP I in USP II sta prednostni metodi, ki se običajno uporabljata pri izvajanju *in vitro* sproščanja ZU iz FO. Kot medij se uporablja prečiščena voda ali razredčene raztopine HCl in pufrov z različnimi pH-ji (1,2-7,5). Vse posode so postavljene v vodno kopel in termostahirani na $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (1).

1.4 ALTERNATIVNI PRESKUSI SPROŠČANJA

1.4.1 ENOSTAVNI STATIČNI SISTEMI

Kombinacija USP II in polistirenskih kroglic

Gastrointestinalno motiliteto in s tem mehanski stres so ponazorili s kombinacijo USP II in polistirenskih kroglic, ki se dodajo v medij za raztapljanje. V medij dodamo ustrezno število kroglic (500-4000) s premerom 35 mm in gostoto $1,05 \text{ g/cm}^3$. V posodo za raztapljanje lahko vstavimo tudi manometrični kateter, s katerim spremljamo mehanske obremenitve na FO preko merjenja tlaka (14).

Steklene kroglice

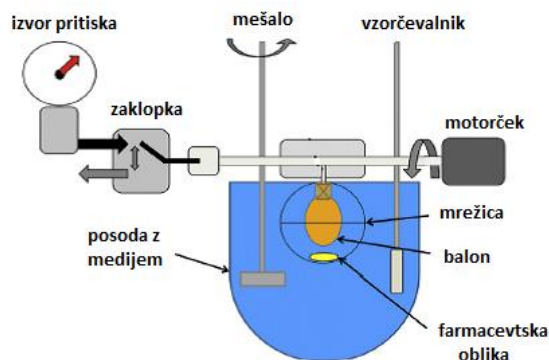
Osnova metode s kroglicami je naprava USP II. Najprej se izvede klasičen *in vitro* test sproščanja v napravi USP II, nato pa se po 1 uri raztapljanja FO prenesejo v 50 mL epruveto z dodatkom 60 g steklenih kroglic (premer: 4 mm; gostota: 2,5 g/cm³) in 2 mL vode. Zaprto epruveto se vpne na stresalnik za 10 minut, pri čemer se izvaja mehanski stres na FO. Po stresanju se celotno vsebino epruvete prenese v medij za raztapljanje, nadaljuje pa se *in vitro* sproščanje v napravi USP II. Metoda dobro oponaša *in vivo* pogoje sproščanja, predvsem mehanski stres, ki je prisoten v gastrointestinalnem traktu (v nadaljevanju GIT) (15).

Vrteča se posoda

Na osnovi slikanja z magnetno resonanco (MRI) je nastal računalniški model človeškega želodca v stanju po obroku, na podlagi katerega so s simulacijo tekočinske dinamike določili strižne sile, ki delujejo na površino FO. Sledil je razvoj vrteče se posode, katere namen je *in vitro* ponazoritev strižnih sil na trdne FO ter ovrednotenje mehanskega vpliva hrane. Med testom je trdna FO pritrjena na žico; čaša, v kateri se izvaja test, pa se vrti z izbrano hitrostjo. Za povečevanje strižnih sil lahko povišamo hitrost vrtenja čaše ali viskoznost medija. (16). V primerjavi z USP I in USP II napravama se v primeru vrteče se posode ustvarja bolj fiziološko relevantna mehanska obremenitev, večje strižne sile pa omogočajo večjo stopnjo erozije na površini trdne FO. Slabost te metode je, da se raztopljena ZU ne porazdeli enakomerno po mediju, zato se koncentracija ne more določiti z UV-Vis spektrometrijo, ampak z izgubo mase po tehtanju trdne FO v časovnih točkah (16).

Naprava z mrežico in balonom

Napravo sestavlja mrežica, v katero se vstavi FO. Mrežica je pritrjena na rotirajočo se os, ki se izmenično potaplja v posodo za raztapljanje. V posodo je vstavljeno tudi mešalo za mešanje medija. Os je povezana s tlačno napravo, ki ustvarja periodičen tlak. Tok zraka potuje do balona na mrežici in ga napihne, s čimer se ponazori gibanje v GIT. Povprečno se ustvarijo 1-3 pritiski na uro po 6 s z amplitudo 300 mbar, nato sledi 1 minutna rotacija osi s 100 vrtljaji/min. Metoda zelo dobro ponazori tlačne in strižne sile, ki jim je FO izpostavljena vzdolž GIT, saj se izmenjujeta faza mešanja in faza mirovanja. V fazi mirovanja FO izgubi stik s tekočino, kar simulira stanje v GIT, ko se FO nahaja v črevesnih žepkih. Metoda je predvsem primerna za FO s podaljšanim sproščanjem (17).



Slika 5: Shematski prikaz naprave z mrežico in balonom; povzeto po (17).

Kombinacija USP III in plastičnih kroglic

Model sestavlja naprava USP III in plastične kroglice s premerom 1 – 8 mm in z gostoto okoli $1,1 \text{ g/cm}^3$. Gostota plastičnih kroglic mora biti približno enaka gostoti medija za raztapljanje, saj le to omogoča ustrezno gibanje kroglic v recipročnem valju in pogoste interakcije s FO. Test se izvaja v 250 mL medija pri temperaturi $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. V recipročni valj se vstavijo plastične kroglice, ki predstavljajo približno $\frac{1}{4}$ volumna posode in FO. Naprava je izkazala zelo primerljivo ponazoritev mehanskih *in vivo* sil v GIT. (18, 19).

Pretočni sistem s kroglicami

Sistem sestavlja 150 mL čaša, v kateri je 20 - 70 g steklenih kroglic, ki jih meša magnetno mešalo in 40 mL medija. Peristaltična črpalka omogoča konstanten volumen medija, saj ves čas dovaja svež medij s pretokom 2 mL/min in ga tudi izčrpava. Med mešanjem je FO v kontaktu s slojem kroglic, njihovo premikanje pa posnema gibanje v GIT, ko je FO v stiku z mukozo. S spreminjanjem jakosti mešanja in števila kroglic pa lahko prilagajamo mehansko obremenitev, ki poteka v določenih pogojih v GIT. Test se je na številnih primerih izkazal za dobro simulacijo *in vivo* pogojev pri vrednotenju FO s podaljšanim sproščanjem (20).

1.4.2 DINAMIČNI SESTAVLJENI SISTEMI

Izzivi simulacije dinamičnega okolja zgornjega GIT trakta so dobro poznani, zato je bilo razvitih mnogo sistemov, ki poskušajo zagotavljati fiziološko simulacijo *in vivo* sproščanja. V nasprotju z drugimi bolj preprostimi in statičnimi metodami, dinamične metode poskušajo dosledno zajeti vse dejavnike, ki so vključeni v razpadanje FO skupaj z ZU med prehodom GIT. Dinamični sistemi predstavljajo veliko prednosti pred

enostavnimi sistemi, saj rezultati temeljijo na realističnih človeških pogojih in zato ne potrebujejo dosti interpretacije. Prav tako pa je sisteme mogoče nadzorovati in upravljati tako, da posnemajo specifične pogoje in vplive posameznih parametrov v GIT (12). Vendar pa je tudi najbolj kompleksni model še vedno poenostavitev bolj kompleksnega delovanja GIT. Zaradi tega je zelo pomembno, da razumemo razliko med modelom in realnim stanjem v GIT, saj je potrebna interpretacija rezultatov, ki omogočijo ekstrapolacijo ugotovitev na realno stanje *in vivo* (12).

Umetni model želodca in dvanajstnika

V smislu kompleksnosti modelov je takoj za konvencionalnimi napravami za sproščanje med najenostavnejšimi umetni model želodca in dvanajstnika (artificial stomach duodenal model – ASD model). Model sestavljata dva medsebojno povezana dela. Kapaciteta predela želodca je 400 mL, dvanajstnika pa 50 mL. Iz želodčnega dela, ki vsebuje simulirano želodčno tekočino, je tekočina z nadzorovano hitrostjo prečrpana v del dvanajstnika. Mešanje s simulirano črevesno tekočino omogoča spremljanje dinamičnega procesa raztapljanja, precipitacije, rekristalizacije in ponovnega raztapljanja. Po končanem testiranju se raztapljanje iz obeh predelov določi z UV-Vis spektroskopijo. Primarno načelo ASD modela je količina ZU v raztopini v delu dvanajstnika neposredno povezana z biološko uporabnostjo (v nadaljevanju BU), ki se testira. (12, 21).

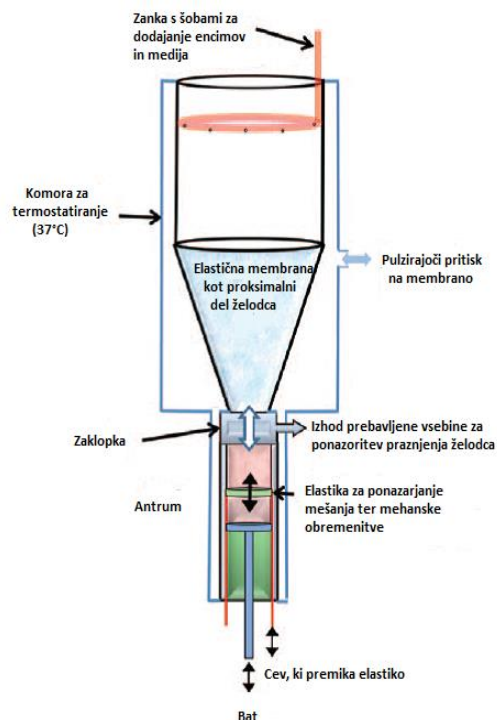
ASD model ima tudi nekaj omejitev. Med glavnimi so predvsem odsotnost ustvarjanja ustrezno intenzivnega mešanja in hidrodinamičnih pogojev v želodčnem delu ter omogočanje »sink« pogojev, kar lahko predstavlja omejitev pri slabo topnih ZU. (12, 21).

Dinamični model želodca

Dinamični model želodca (Dynamic Gastric Model – DGM) posnema realno časovne spremembe pH-ja, dodajanje encimov, strižne sile, mešanje in čas zadrževanja FO. Prav tako prenese vzorec iz predela antruma v predel dvanajstnika v enaki obliki in z enako hitrostjo, kot se to dogaja *in vivo*. Model tako povečuje možnost izpeljave IVIVC in bolj jasnega razumevanja mehanizmov obnašanja peroralnih formulacij (12, 22).

Glavni del modela je elastična membrana v obliki stožca, ki predstavlja proksimalni del želodca. Po vnosu tekočine ali hrane se membrana raztegne, programske nastavitve pa omogočajo gnetenje vsebine ter dodajanje kisline in encimov. Drugi del, v obliki valja, predstavlja antrum, kjer poteka glavno stiskanje in mešanje, kar predstavlja *in vivo*

premikanje hrane v antrumu. Med elastično membrano in antrumom je zaklopka, ki večino časa delovanja odprta, razen takrat, ko se antrum prazni. To omogoča degaziranje in refluks med proksimalnim delom želodca in antrumom, hkrati pa omogoča natančno kontrolo procesiranega volumna. Celoten volumen antruma ni odstranjen v vsakem ciklu praznjenja. Del volumna je zadržan in se zmeša z naslednjim delom vsebine, ki pride v antrum. Ko se proksimalni del želodca enkrat izprazni, lahko model izvede »housekeeper« kontrakcijo (faza III MMK), s čimer zagotovi, da se vsebina popolnoma izprazni (23).

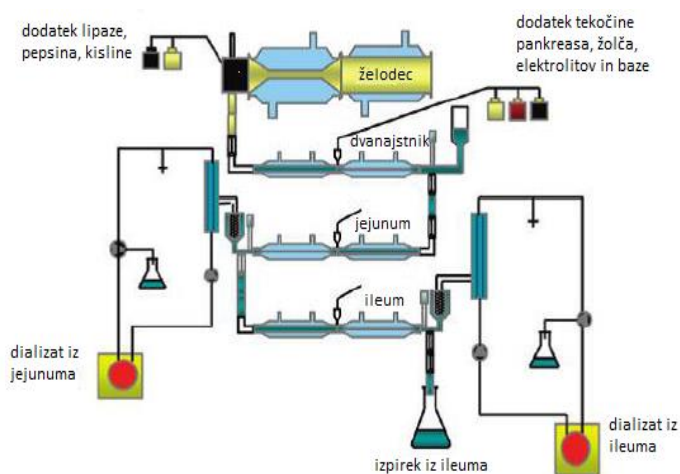


Do danes je bilo v literaturi omenjenih zelo malo poskusov na DGM s FO. Rezultati vseh študij so pokazali veliko podobnost z *in vivo* pridobljenimi rezultati in tako pokazali tudi veliko prednost v primerjavi s konvencionalno USP II napravo (12).

Slika 6: Shematski prikaz dinamičnega modela želodca (DGM); povzeto po (23).

Gastrointestinalni model TIM

TIM-1 je večkomponentni računalniško nadzorovan dinamičen model, ki posnema zgornji del človeškega GIT. TIM-1 model simulira fiziološke pogoje želodca in tankega črevesa, vključno z dinamiko mešanja, praznjenja želodca in prehoda do tankega črevesa, pH vrednostmi, telesno temperaturo ter sestavo in aktivnostjo GI tekočin. Sistem je sestavljen iz štirih delov, ki ponazarjajo želodec, dvanajstnik, jejunum in ileum. Spremembe v pritisku na fleksibilne membrane okrog vsakega od predelov ustvarjajo peristaltične kontrakcije, prehod tekočin in hrane oz. delcev ZU pa je uravnavan z odpiranjem in zapiranjem peristaltičnih zaklopk,



Slika 7: Shematski prikaz gastrointestinalnega TIM modela; povzeto po (12).

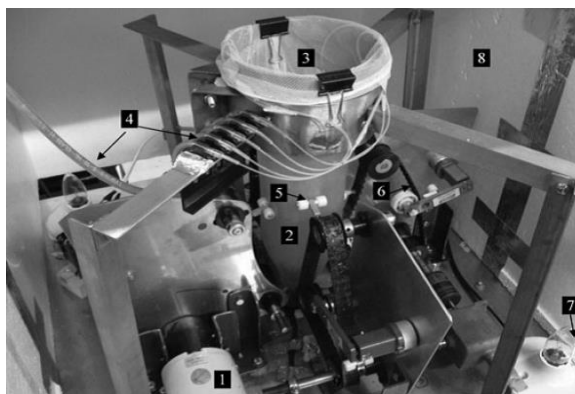
ki povezujejo vsakega od predelov. Frekvenco in moč kontrakcij je mogoče nadzorovati. Preko sistema dialize ali membranske filtracije se iz delov jejunuma in ileuma kontinuirano odstranjujejo majhne molekule. Prebavo lipidov in BU lipofilnih ZU se proučuje s 50 nm filtri. Uporaba filtrov omogoča odstranitev micelov, ki vsebujejo lipofilno ZU, medtem ko se neprebavljena maščoba in neraztopljene ZU zadržijo v sistemu. Vse to omogoča napovedovanje BU neke ZU (12).

Kljub temu, da ne obstaja veliko primerov, ki bi opisovali uporabo TIM-1 modela za vrednotenje FO, ima TIM-1 model mnogo prednosti pred konvencionalnimi metodami za sproščanje ZU tako v stanju na tešče in po obroku. Preučuje se lahko FO s podaljšanim sproščanjem in njihovo obnašanje v stresnih pogojih, na primer pri prehodu čez pilorični ali ileocekalni sfinkter. Model tudi zelo dobro ponazarja zakasnen razpad FO po vnosu hrane v želodec. (12, 24). Kot odstopanje od dejanskega *in vivo* stanja pa lahko navedemo odsotnost *in vivo* porazdeljevanja tekočine v majhnih žepkih tankega črevesa. Taka razporeditev tekočine lahko teoretično pomeni tveganje za ZU, ki imajo slabše lastnosti močenja, saj lahko izkazujejo boljše lastnosti, kot jih imajo v resnici. Prav tako ne moremo simulirati *in vivo* procesov, kot so aktivni transport, efluks in metabolizem v črevesni steni. V ta namen lahko TIM-1 model kombiniramo z modelom črevesne absorpcije (TIM-2), pri čemer pa lahko napovemo peroralno BU ZU (12, 24).

Človeški želodčni simulator

Človeški želodčni simulator (Human gastric simulator – HGS) je bil razvit posebej za ponazarjanje kontrakcijskih valov peristaltike antruma *in vivo*. Model zelo dobro ponazarja mehanske sile fluidov, ki povzročajo razpad hrane med prebavo (25).

HGS je sestavljen iz cilindričnega dela z vrečo iz lateksa, ki predstavlja želodec, nanj pa so naslonjeni štirje majhni valji. Valji so pritrjeni s trakovi, ki periodično povzročajo njihove premike ob steni vreče, s čimer posnemajo motorično gibanje od proksimalnega dela želodca k antrumu. Pri antrumu sta nasprotna valja na minimalni



Slika 8: Prikaz človeškega želodčnega simulatorja.
(1) motor; (2) ovojnica iz lateksa; (3) mrežasta vreča;
(4) cevke za sekrecijo; (5) valji; (6) pasovi; (7)
žarnica za nadzor temperature; (8) izolacijska
komora; povzeto po (25).

oddaljenosti, saj so sile tam največje. Na ta način je želodčna vsebina potisnjena zopet proti proksimalnemu delu želodca. Nadzorujemo lahko amplitudo in frekvenco gibanja. Sistem deluje znotraj izolirane komore, kjer se vzdržuje 37°C, hkrati pa omogoča stalno in kontrolirano dostavo želodčnih sokov in praznjenje prebavljenih snovi. Za simulacijo sejalnega efekta pilorusa med praznjenjem želodca se uporablja mrežasta vrečka iz poliestra (velikost por je 1,5 mm) na notranji površini, ki preprečuje večjim delcem prehod iz želodčnega predela. Želodčno praznjenje je kontrolirano s pomočjo peristaltične črpalke, ki je priključena na dno želodčnega predela (25). HGS sistem bolj realno ponazori mehansko gibanje kot dinamični model želodca ali gastrointestinalni model TIM, vendar se zaenkrat uporablja le za preučevanje prebavljanja hrane in ne za testiranje sproščanja ZU (25).

Inženirski model želodca in tankega črevesja

Inženirski model želodca in tankega črevesja (Engineered Stomach and small Intestinal – ESIN) je dinamičen računalniško nadzorovan sistem, ki simulira človeški zgornji GIT. Sistem je sestavljen iz šestih zaporednih predelov: rezervoar za hrano, ki omogoča postopen vnos hrane v želodec; ampula slin, ki je namenjena za postopno mešanje hrane s slino; želodec in trije deli tankega črevesja (dvanajstnik, jejunum, ileum). Glavni parametri človeške prebave kot so telesna temperatura, želodčne in črevesne variacije pH-ja skozi čas, prihod izločkov v ustrezni predel prebave z variabilnimi pretoki, transportni časi, mešanje himusa, različno praznjenje želodca tekoče ali trdne hrane oz. FO ter pasivna absorpcija zaužitih produktov, so v tem prototipu postavljeni na osnovi *in vivo* podatkov. Temperatura se vzdržuje pri 37°C z vodno kopeljo. V vsakem predelu so senzorji in sistem za uravnavanje, tako volumna medija kot pH tekočin. Računalniško nadzorovane peristaltične črpalke omogočajo prenos vsebine iz enega predela v drugega ter skrbijo za uravnavanje sestave tekočin z dodatki (npr. pepsin, lipaza ...). Jejunum in ileum sta opremljena s sistemom dialize, ki ustvarja pasivno absorpcijo vode in presnovo vsebine. V namene farmacevtskega razvoja je model opremljen tudi s perforirano košarico, v katero se vstavi FO, ki jo lahko poljubno prestavljamo med posameznimi predeli modela (26).

1.5 TRDE ŽELATINSKE KAPSULE

1.5.1 KAPSULE KOT FARMACEVTSKA OBLIKA

Po evropski farmakopeji (Ph.Eur.) so kapsule trdne FO s trdo ali mehko ovojnico, različnih oblik in kapacitet. Običajno vsebujejo eno, lahko pa tudi več ZU. Namenjene so peroralni aplikaciji. Ovojnico trde kapsule sestavljata dva dela cilindrične oblike, katerega en del je zaokrožen in zaprt, drugi del pa je odprt. Ena ali več ZU, običajno v trdni obliki (prašek ali granulat), so polnjenje v en del kapsule, ki se nato zapre z drugim delom kapsule. Podoben opis lahko najdemo tudi v ameriški farmakopeji (USP). Poleg ZU so v kapsuli običajno ena do štiri pomožne snovi (topila, drsila, močljivci, razgrajevala, stabilizatorji). Izbira pomožnih snovi je odvisna od lastnosti ZU, odmerka, topnosti, velikosti in oblike delcev ZU ter od velikosti kapsule, ki se bo uporabila (27, 28). Trde želatinske kapsule so ene izmed najpogostejše in tradicionalno uporabljenih oblik kapsule. Razlogi za široko uporabo se skrivajo v lastnostih želatine, saj je le-ta netoksična in široko uporabljena v živilski industriji, lahko topna v bioloških tekočinah pri telesni temperaturi, omogoča tvorbo močnega fleksibilnega filma (debelina 100 μm), poleg tega so raztopine visoke koncentracije (40 % m/v) še vedno tekoče pri 50°C, medtem ko drugi biološki polimeri niso, nenazadnje pa vodna raztopina želatine ali vodna raztopina želatine z dodatkom plastifikatorja omogoča reverzibilno spremembo iz sol v gel stanje pri temperaturi, ki je samo nekaj stopinj nad sobno temperaturo (27).

1.5.2 STABILNOST TRDIH ŽELATINSKIH KAPSUL

Prazne kapsule vsebujejo veliko količino vode, ki se obnaša kot plastifikator želatinskega filma in je nujno potrebna za obstoj kapsule. Specifikacija standardne vsebnosti vlage trdih želatinskih kapsul je med 13,0 % in 16,0 % m/m. Te vrednosti so močno odvisne od tega kakšnim pogojem so izpostavljene trde želatinske kapsule: pri nizki vlažnosti izgubijo vlažnost in postanejo krhke, pri visoki vlažnosti pa pridobijo vlago in se zmechčajo. Vsebnost vlage po specifikaciji se lahko ohrani ob primernem shranjevanju v ustrezno zaprtih posodah pri določeni temperaturi. Ustrezna vlažnost shranjevanja je na 40 do 60 % relativne vlage, kar omogoča stabilno raztapljanje ovojnice. Shranjevanje na relativni vlažnost nad 60 % zelo močno vpliva na proces razpadanja in raztapljanja ovojnice. Lahko se zgodi, da ovojnica sploh ne začne razpadati in se raztapljati. Kapsule so dobro topne v vodi pri 37°C. Ko temperatura pade pod to vrednost, se zmanjša tudi topnost. Pri temperaturi pod 30°C so netopne, enostavno samo absorbirajo vodo in nabreknejo. To je

zelo pomemben dejavnik, ki ga je treba upoštevati med testiranjem razpadnosti in raztapljanja. Prav zaradi tega je v vseh farmakopejah nastavljena meja temperature medija na $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (27, 29). Želatina je relativno inerten material. Vendar pa moramo biti pri polnjenju kapsul previdni pri izbiri sestavin, ki bi lahko reagirale z želatino. Aldehidi povzročijo reakcijo premreževanja, ki onemogoči topnost kapsul. Raziskave so pokazale, da premreževanje ni neizogibno, saj je odvisno od več dejavnikov. Glavni dejavniki so stresni pogoji shranjevanja (visoka temperatura, visoka vlaga, preveč svetlobe) in prisotnost aldehydov (npr. formaldehid). Prav tako se je potrebno izogniti snovem, ki vplivajo na integriteto ovojnice. To so na primer sestavine, ki vsebujejo prosto vodo, ki jo želatina absorbira in tako povzroči zmešanje in uničenje kapsule. Glavne omejitve lastnosti materialov, ki se polnijo v kapsule so, da ne smejo reagirati z želatino, ne smejo vsebovati visoke količine proste vode, volumen zmesi pa ne sme presegati velikosti kapsule, ki je na voljo (27).

1.5.3 RAZPAD TRDIH ŽELATINSKIH KAPSUL

Za polnjenje trdi želatinskih kapsul je najboljše, da so delci ZU in pomožnih snovi izometričnih oblik. Idealna velikost delcev je med 10 μm in 150 μm . Bolj kot je formulacija za polnjenje kapsul hidrofilna, hitrejši je razpad kapsule in sproščanje ZU. Močljivost formulacije ima kritični pomen za sproščanje ZU (28). Prvo dejanje pri sproščanju ZU iz trde želatinske kapsule je razpad ovojnice. V primeru, da so kapsule v ustreznem mediju s 37°C , se začne želatina raztapljati, v 1 minuti razpade, običajno na obeh koncih kapsule. V primeru, da je bila kapsula napolnjena z ustrezno zasnovano formulacijo, se le-ta začne sproščati iz kapsule, še preden je celotna ovojnica kapsule raztopljena. Kapsule običajno v 10 minutah popolnoma razpadejo (27, 28).

Če povzamemo, so trde želatinske kapsule enostavne v njihovi formulaciji in tehnologiji izdelave, njihovo razpadanje pa je dobro poznano in lahko kontrolirano (28).

2. NAMEN DELA

Glavni namen magistrske naloge bo opredeliti uporabnost novega *in vitro* modela za sproščanje trdnih peroralnih FO v želodcu, ki je bil razvit s sodelovanjem podjetja Lek d.d. Ljubljana in Fakultete za strojništvo Univerze v Ljubljani. V ta namen bomo z eksperimenti skušali ovrednotiti, ali je naprava za posnemanje želodčnega gibanja zmožna prikazati razlike v hitrosti sproščanja med različnimi formulacijami, mediji in FO ter da imajo pridobljeni rezultati visoko napovedno moč *in vivo* sproščanja. To je še posebej pomembno v generični industriji, kjer želimo natančno predvideti obnašanje FO v *in vivo* okolju, saj lahko s tem vplivamo na zmanjšanje števila bioekvivalenčnih študij.

Z uporabo različnih silikonskih vreč bomo ovrednotili njihovo sposobnost ločbe med različnimi mediji in testnimi formulacijami. Zanimalo nas bo, ali ročna izdelava silikonske vreče vpliva na hitrost sproščanja, čeprav so silikonske vreče po sestavi, velikosti in obliki skoraj identične. Zanimalo nas bo tudi, ali naprava za posnemanje želodca smiselno razporedi vzorce z različnimi sestavami pomožnih snovi glede na hitrost sproščanja.

Z uporabo različnih medijev bomo ovrednotili njihov vpliv na sproščanje ene izmed testnih formulacij. Želeli bomo ugotoviti, ali pH medija vpliva na razpadnost FO in raztapljanje ZU. Pri preskusih sproščanja bomo uporabili naslednje medije:

- 0,001 M HCl + NaCl pH=3
- 0,01 M HCl + NaCl pH=2
- 0,1 M HCl + NaCl pH=1
- Simulated Gastric Fluid (SGF) pH=1,2
- Simulated Gastric Fluid (SGF) + Pepsin pH=1,2
- Fasted State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF) pH=1,6

Nato bomo preverili, kako dodatek encima vpliva na profil sproščanja. Na tak način bomo ugotovili, ali je pri testnih trdih želatinskih kapsulah prišlo do pojava »crosslinking-a«, saj bo tako dodatek encima povečal hitrost sproščanja v primerjavi s sproščanjem v mediju brez dodatka encima.

Eden izmed glavnih namenov bo preveriti vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske obremenitve na FO, ki se pojavi v primeru zaužitja FO skupaj s hrano ali po obroku. Zanimalo nas bo, ali se lahko z uvedbo realne hrane v

silikonsko vrečo skupaj s FO dejansko približamo *in vivo* relevantnim pogojem, ki praviloma upočasnijo sproščanje, saj se FO dlje časa zadržuje v želodcu. Nadalje nas bo zanimalo, ali lahko kot nadomestilo za uporabo realne hrane uporabimo steklene kroglice, ki prav tako izkazujejo mehansko obremenitev na FO kot hrana in pa, ali lahko kot nadomestek hrane uporabimo tudi medij s povečano viskoznostjo, saj lahko le-ta vpliva na difuzijo FO.

Želeli bomo tudi ovrednotiti, ali je naprava za posnemanje želodčnega gibanja sposobna ločiti med različnimi FO, natančneje, na hitrost sproščanja iz trdih želatinskih kapsul in hidroksipropilmetil celuloznih kapsul (v nadaljevanju HPMC kapsule).

Za primerjavo pa bomo izvedli preskus sproščanja z nekaterimi mediji še na napravi z vesli (USP II).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Farmacevtska oblika

Preskušali smo sproščanje ZU iz trdih želatinskih kapsul s takojšnjim sproščanjem. Na voljo smo imeli 5 različnih testnih formulacij, ki so bile razvite v podjetju Lek d.d. Formulacije so se med seboj razlikovale glede na sestavo pomožnih snovi, kar je bil razlog za njihove različne kinetike sproščanja. Za primerjavo smo ZU vgradili tudi v HPMC kapsule.

ZU se uvršča v razred I po BCS klasifikaciji, kar pomeni, da je zelo dobro topna in permeabilna ter se hitro raztaplja. Topnost ZU je v območju 10-30 mg/mL v širokem pH območju od 1 do 10, kar kaže na to, da je raztapljanje ZU neodvisno od pH-ja. Je zmerno topna v vodi (nad 10 mg/mL) pri 25°C in nehigroskopna. Je zelo dobro topna v metanolu, prosto topna v etilnem alkoholu, acetonu in kloroformu ter zmerno topna v 1.0 M HCl.

3.1.2 Aparature

- Tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Analitska tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- pH meter, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- UZ kadička, VWR, Radnor, Pensilvanija, ZDA
- Štoparica, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Nemčija
- Naprava z vesli (USP II), Pharma Test Apparatebau AG, Hainburg, Nemčija
- Pipete, Rainin E4 XLS, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Pipete, Pirolino®, BioHit, Finska
- HPLC sklopljen z UV sistemom, Waters, Milford, Massachusetts, USA
- Magnetno mešalo z grelcem, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- Stresalnik, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- Termometer, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, ZDA
- Termometer, Precision, Thermvo Products Inc, ZDA
- Peristaltična črpalka, BVP Process, IP 65, ISMATEC®

3.1.3 Kemikalije in standardi

- SIF Powder, Biorelevant.com, London, Velika Britanija

- NaCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- HCl, TITRISOL®, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Pepsin from porcine gastric mucosa, Sigma Aldrich, Misuri, ZDA
- Ocetna kislina (brezvodna, ledocet, 100%), EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev acetat ($C_2H_3NaO_2$), EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- HPMC, Methocel K4M, Colorcon Co., Dartford, Velika Britanija
- Delovni standard ZU ($p = 99,5 \%$)
- Pufri za kalibracijo pH metra, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Deionizirana voda

3.1.4 Ostalo

- Steklovina: čase, merilni valji, merilne bučke, stekleni čolnički, steklene palčke
- Plastične brizge, kapalke, čolnički
- Kovinske spatule, žličke
- Magnetna mešala
- Membranski filtri $0,45 \mu m$

3.2 METODE

3.2.1 Priprava medijev za preskuse sproščanja

0,001 M HCl + NaCl pH=3; 0,01 M HCl + NaCl pH=2; 0,1 M HCl + NaCl pH=1

V 5 L plastično čašo smo nalili približno 4500 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Za pripravo 0,001 M HCl + NaCl smo s pipeto smo odmerili 5 mL 1M HCl in jo kvantitativno prenesli v čašo. Za pripravo 0,01 M HCl + NaCl smo s pipeto smo odmerili 50 mL 1M HCl in jo kvantitativno prenesli v čašo. Za pripravo 0,1 M HCl + NaCl pa smo s pipeto smo odmerili 500 mL 1M HCl in jo kvantitativno prenesli v čašo. Na plastičen čolniček smo natehtali 10 g NaCl in ga kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je NaCl povsem raztopil in premešal z deionizirano vodo skupaj z 1M HCl. Raztopino smo kvantitativno prelili v 5 L merilno bučo ter jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

Simulated Gastric Fluid (SGF) pH=1,2

V 5 L plastično čašo smo nalili približno 4500 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. S pipeto smo odmerili 400 mL 1M HCl in jo kvantitativno prenesli v čašo. Na plastičen čolniček smo natehtali 10 g NaCl in ga kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je NaCl dobro raztopil in premešal z deionizirano vodo skupaj z 1M HCl. Raztopino smo kvantitativno prelili v 5 L merilno bučo ter jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

Simulated Gastric Fluid (SGF) + Pepsin pH=1,2

V 5 L plastično čašo smo nalili približno 4500 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. S pipeto smo odmerili 400 mL 1M HCl in jo kvantitativno prenesli v čašo. Na plastičen čolniček smo ločeno natehtali 10 g NaCl in 16 g pepsina ter ju kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je vse dobro raztopilo in premešalo z deionizirano vodo. Raztopino smo kvantitativno prelili v 5 L merilno bučo ter jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

Fasted State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF) pH=1,6

V 5 L plastično čašo smo nalili približno 4500 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Na plastičen čolniček smo natehtali 10 g NaCl in ga kvantitativno prenesli v čašo. S pH metrom smo pomerili pH tako pripravljeni raztopini in ga uravnali na 1,6 z dodatkom 1 M HCl. Počakali smo, da se je vse dobro raztopilo in premešalo z deionizirano vodo. Raztopino smo kvantitativno prelili v 5 L merilno bučo ter jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake. 2500 mL tako pripravljenega pufra smo prelili v 3 L plastično čašo, vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Na plastičen čolniček smo natehtali 0.3 g FaSSGF praška in ga kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je prašek popolnoma raztopil. Raztopino smo kvantitativno prelili v 5 L čašo ter jo dopolnili do oznake s prej pripravljeno raztopino (pufer pH=1,6).

Acetatni pufer pH=5

V 5 L plastično čašo smo nalili približno 4500 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Na plastičen čolniček smo ločeno natehtali 69,25 g NaCl in 20,02 g natrijevega acetata ter ju kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je vse dobro raztopilo in premešalo z deionizirano vodo. Tako

pripravljeni raztopini smo z dodatkom 1 M HCl uravnali pH na 5. Raztopino smo kvantitativno prelili v 5 L merilno bučo ter jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

0.01 M HCl + NaCl pH=2 z dodatkom 1% HPMC

V 3 L plastično čašo smo nalili približno 1000 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Vodo smo segreli na 80°C in nato postopoma dodali 30 g HPMC, kar predstavlja 1 m/v % končne raztopine.

V 3 L plastično čašo smo nalili približno 2000 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. S pipeto smo odmerili 30 mL 1M HCl in jo kvantitativno prenesli v plastično čašo. Na plastičen čolniček smo natehtali 6 g NaCl in ga kvantitativno prenesli v plastično čašo. Počakali smo, da se je oboje povsem raztopilo in premešalo z deionizirano vodo. Raztopino smo kvantitativno prelili v 3 L merilno bučo ter jo dopolnili do oznake s prej pripravljeno HPMC raztopino. Viskoznost tako pripravljene raztopine je bila 150 cP.

3.2.2 Analitika vzorcev

Zbrane vzorce smo 20-krat redčili s testiranim medijem (60 µL vzorca + 1140 µL medija). Razredčenim vzorcem smo nato določili vsebnost ZU s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (v nadaljevanju HPLC). V računalniški program Empower smo vnesli pogoje testa, program pa nam je nato s pomočjo enačbe za izračun količine sproščene ZU in vnesenega odmerka ZU sam izračunal delež sproščene ZU v posameznih časovnih točkah.

Kromatografski pogoji analize

Mobilna faza: vodni del: acetonitril/voda = 50/50
organski modifikator: orto-fosforna kislina in trietilamin
Kolona: nepolarna C18
Pretok: 1 mL/min
Volumen injiciranja: 10 µL
Valovna dolžina: fiksna; nekje v območju med 250 in 350 nm

Enačba za izračun odstotka sproščene učinkovine v N-ti časovni točki

$$\frac{\frac{Area_{vn}}{Area_{st}} * m_{st} * P_{uc} * V * R_{vn}}{R_{st} * D} = \%_{sproščene\ učinkovine} \quad \text{Enačba 1}$$

$Area_{vn}$ = površina kromatografskega vrha učinkovine vzorčne raztopine

$Area_{st}$ = površina kromatografskega vrha učinkovine standardne učinkovine

m_{st} = natehta delovnega standarda v mg

$P_{uč}$ = čistota standarda v % učinkovine, na snov kot je

V = volumen medija za raztapljanje

R_{st} = redčenje standardne raztopine

R_{vn} = redčenje vzorčne raztopine

D = deklarirana količina učinkovine v mg

Priprava standardov

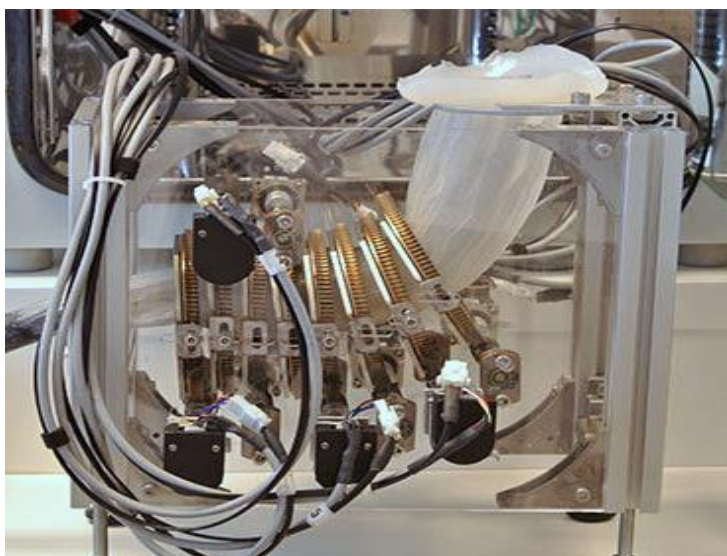
Natančno smo natehtali približno predpisano količino delovnega standarda ZU in ga kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko s pomočjo 20 mL deionizirane vode. Bučko smo postavili v ultrazvočno kadičko za približno 3 min, da se je ZU v celoti raztopila. Nato smo z deionizirano vodo dopolnili bučko do oznake ter premešali.

5 mL tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v 25 mL bučko, dopolnili do oznake z deionizirano vodo ter premešali (5-kratno redčenje). Standardno raztopino smo pripravljali v 2 paralelah za potrditev ustreznosti standarda.

3.3 NAPRAVA ZA POSNEMANJE ŽELODČNEGA GIBANJA

3.3.1 Opis naprave

Napravo za posnemanje želodčnega gibanja so razvili v podjetju Lek d.d., v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo v Ljubljani. Napravo sestavlja inertna silikonska fleksibilna vreča, ki je po obliki in velikosti podobna človeškemu želodcu, vzdolžno po notranji steni pa so iz istega materiala narejene gube, ki posnemajo želodčne gube. Vreča je umeščena med 8 zaslonk - mehanizmi, ki se periodično zapirajo in odpirajo, ter na tak način posnemajo mišične kontrakcije in s tem želodčno peristaltiko. Na ta način lažje preučujemo vpliv sil in hidrodinamike tekočin na sproščanje ZU iz FO. Vreča se ob koncu zoži v tanko cevko, ki predstavlja mesto izhoda



Slika 9: Fotografija naprave za posnemanje želodčnega gibanja.

vsebine vreče. Prehod med vrečo in cevko zapira ventil, ki uravnava pretok tekočine iz vreče in predstavlja pilorus. Končni del vreče lahko skozi odprtino v komori usmerimo v čašo na tehtnici, ki je povezana z računalnikom. Spreminjanje mase v čaši se računalniško beleži in vpliva na krčenje ventila in posledično na pretok skozi želodec. Na drugi strani je vreča odprta in omogoča dodajanje svežega medija za ponazarjanje izločanja želodčnega soka. Vse skupaj je postavljeno v komoro, ki vzdržuje temperaturo primerljivo fiziološkim pogojem, 37°C. Naprava je računalniško krmiljena, vsa gibanja je možno prilagajati oziroma programirati (30).

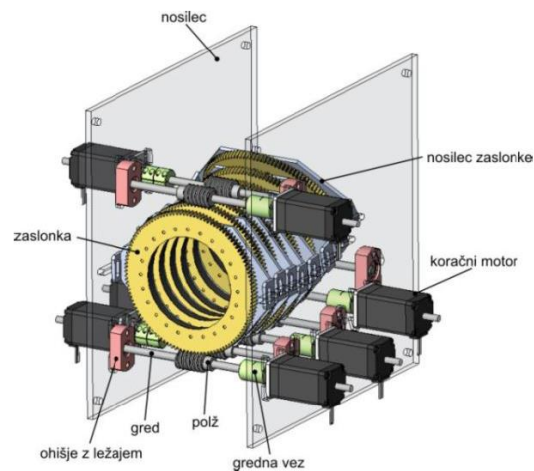
Fleksibilna vreča

Vreča je po obliki in velikosti podobna človeškemu želodcu, ki je v obliki črke »J«. V dolžino meri približno 250 mm, v širino pa v svoji najširši točki meri približno 100 mm, v najožji pa 25 mm. Pilorična odprtina v premeru meri nekoliko manj kot 10 mm. Volumen vreče je prav tako podoben volumnu želodca in znaša 800 mL. Vreča je izdelana iz inertne silikonske gume, za katero sklepamo, da izkazuje podobne mehanske lastnosti, kot jih opazimo v steni človeškega želodca. Vreča je dovolj fleksibilna, da omogoča aplikacijo mehanskih kontrakcij preko zapiranja zaslonk, a hkrati dovolj toga, da se vrne v svojo primarno obliko, ko kontrakcije pojenjajo. Materialu je ob izdelavi vreče dodan tudi aditiv za zmanjševanje površinske energije, da je stena vreče bolj gladka, kar preprečuje lepljenje farmacevtske oblike na steno vreče. Zgornji del vreče je odprt in omogoča enostavno vzorčenje s kanilo in brizgo oz. nadomeščanje medija s črpalko. Spodnji del vreče se konča z ozko cevjo, ki jo vpnemo med ventil, ki preprečuje nenadzorovano iztekanje medija iz vreče in omogoča nadzorovanje izbranih pretokov skozi želodec (31).

Mehanske zaslonke

Za izvedbo krožnih kontrakcij oziroma aplikacijo mehanskih obremenitev preko fleksibilne vreče na našo FO so odgovorne mehanske zaslonke, ki omogočajo zvezno spreminjanje velikosti premera odprtine. Na fleksibilni vreči se nahaja 8 zaslonk, ki so razporejene po distalnem delu vreče, kjer so tudi v želodcu v *in vivo* pogojih kontrakcije najmočnejše. Na tak način zaslonke izvajajo zunanji pritisk na vrečo ter s tem vplivajo na obliko in premikanje vsebine v vreči. Vsako zaslonko preko polževega gonila odpira in zapira svoj koračni motor. Z zakasnitvijo začetka gibanja vsake naslednje zaslonke lahko ustvarimo sinusni vzorec gibanja kontrakcij, ki posnema bodisi segmentacijsko gibanje bodisi peristaltične kontrakcije v želodcu človeka. Mehanizem delovanja je natančen in

ponovljiv, saj gibanje uravnavajo električni motorji. Zaslonke so vpete v dve navpični prozorni plastični steni (32).



Slika 10 in 11: Prikaz zaslonk naprave za posnemanje želodčnega gibanja in mehanskih delov, potrebnih za ustvarjanje vzorcev gibanja, povzeto po (32).

Ventil, ki ponazarja pilorični sfinkter

Zadnji zaslonki sledi ventil, v katerega vpremo zožen končni del silikonske vreče. Ventil se premika vertikalno, s čimer se odpira in zapira ter na tak način dovoljuje pretok tekočin in s tem praznjenje vsebine želodca skozi cevko v čašo na tehtnici izven komore. Čaša služi za zbiranje frakcij v različnih časovnih točkah in daje podatek o masi prepuščene tekočine. Tako dobimo kumulativno zbrane frakcije v različnih časovnih točkah, preko katerih lahko določimo koncentracijo ZU v posamezni časovni točki. Hitrost odpiranja in zapiranja ventila nastavimo preko računalniškega programa, s čimer določimo želeni pretok, izražen v g/min. V našem primeru je bil pretok nastavljen na 2 g/min in je reguliran s pomočjo tehtnice, ki je povezana s programom. Tak sistem imenujemo odprti sistem vzorčenja, pri katerem običajno s črpalko skozi zgornjo odprtino vreče nadomeščamo svež medij. Na črpalki za nadomeščanje nastavimo enak pretok, kot je izbran na programu v računalniku, s čimer se izognemo spremembam volumna vsebine v vreči.

Ogrodje in oprema

Ogrodje je narejeno iz aluminijastih profilov, kamor je vpeta naprava, ob straneh pa sta vpeti dva nosilca iz akrilnega stekla. Ogrodje je nadalje s pomočjo izvlečnih vodil montirano v notranjost komore, kar omogoča lažje rokovanje s samo napravo in enostavno vzorčenje. Komora omogoča vzdrževanje želenih pogojev eksperimenta, termostatisiranje na

37°C, z natančnostjo $\pm 0,1$ °C in je proizvod podjetja Kambič laboratorijska oprema d.o.o. Na zgornjem delu ima komora tipkovnico za vnos temperature in prikazovalnik trenutne temperature v notranjosti komore.

Programska oprema

Naprava je povezana z računalniško programsko opremo, ki nadzoruje delovanje sestavnih delov. Motorji in stikala so povezani s krmilniki, le-ti pa nadalje preko USB povezave na računalnik. Za ustrezno delovanje naprave skrbi namenska programska oprema za računalnik, ki uporabniku omogoča krmiljenje in nadzor. Glavni parametri, ki jih lahko spreminjamo, so začetno odprtje zaslonk, njihova amplituda zaprtja, čas trajanja posameznega zaprtja in odprtja zaslonk, zakasnitev med sosednjimi zaslonkami, trajanje posameznega cikla, čas odprtja posamezne zaslonke in tudi reset faznih razlik, ki ob nastavljenem času odpravi manjša odstopanja pri gibanju zaslonk. Omogočena je tudi nastavitev odpiranja in zapiranja ventila s čimer nastavimo pretok praznjenja vsebine iz vreče. Programska oprema nam torej omogoča razvoj želenih vzorcev gibanja želodca z namenom zagotavljanja razmer, ki naj bi bile čim bolj podobne tistim v človeškem telesu.

3.3.2 Izvedba preskusa sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja

Najprej smo vklopili komoro in nastavili temperaturo na 37°C. Fleksibilno vrečo smo namestili med zaslonke, začetni del cevke pa v ventil. Nato smo prižgali program na računalniku, vmesnik na aparaturi in tehtnico. Pred začetkom testa smo na računalniškem programu s klikom na gumb »inicializacija« povezali programsko opremo z vmesnikom in tega z elektromotorji ter ostalimi ključnimi deli naprave za posnemanje želodčnega gibanja. Medij za preskus sproščanja smo predhodno segreli na magnetnem mešalu na 39,5°C, saj pri vnosu medija v vrečo njegova temperatura rahlo pade. Z merilnim valjem smo odmerili 250 mL medija ter ga prenesli v fleksibilno vrečo. Počakali smo še 5 min, da sta se izenačili temperaturi medija in vreče. Temperaturo medija smo preverili s termometrom, da je znašala $37,0 \pm 0,5$ °C, nato smo lahko začeli s preskusom. V vrečo smo vstavili vzorec ter zagnali program. Testi so bili izpeljani z usmerjeno postavitvijo kapsule, ki smo jo izvedli s podaljšano pinceto, tako da smo kapsulo previdno položili med 6. in 7. zaslonko.

Vzorčenje smo izvajali vsakih 5 ali 10 min (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 min), tako, da smo zbirali 10 ali 20 mL frakcije v čaše, odvisno od vrste uporabljenega medija. S pomočjo plastične brizge in kanile smo iz zbirne čaše vzeli 10 ali 20 mL vzorca,

ki smo ga prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 μm (model Minisart®, Sartorius) v stekleno vialo (prvih 5 mL vzorca smo zavrgli, da smo nasitili filter). Odvzeti medij smo nadomeščali s svežim preko peristaltične črpalke. Po 25. ali 60. min smo s poskusom zaključili. Po končanem testu smo vrečo previdno odstranili iz ogrodja in jo prelili v večjo čašo. Vsebino smo s stekleno palčko premešali do homogene raztopine in vzorčili. Na ta način smo dobili točko neskončno, kjer smo pričakovali 100 % delež sproščene ZU. V kolikor je bila vrednost sproščene ZU nižja, je to pomenilo, da dolžina testa ni ustrezna, da se ZU adsorbira na steno silikonske vreče, ali da se kako drugače izgublja iz sistema.

Odprt sistem

Za delovanje odprtega sistema je potrebna povezava programske opreme s tehtnico. Ta je nameščena ob komori, ki ima na strani odprtino za cevko silikonske vreče, skozi katero poteka praznjenje vsebine vreče. Pred začetkom testa smo si pripravili steklene čaše s podobno maso, hkrati pa smo napolnili tudi epruvete s količino vode, ki je bila enaka volumnu ene odvzete frakcije v določenem intervalu vzorčenja. Pred začetkom testa smo tehtnico vedno nastavili na 0 in na tehtnico nastavili 1. čašo za zbiranje posamezne frakcije ter čašo za reguliranje mase, v katero smo nadomeščali ustrezen volumen vode, ki smo ga predhodno odmerili v epruvete. Ob želenem času vzorčenja (večinoma po 5 min) smo čašo z vsebino odstranili iz tehtnice in nadomestili z novo. V prazno čašo za reguliranje mase pa smo prelili vsebino ene epruvete. Tehtnica tako ni zaznala izgube mase, ventil pa je s pravilnim pretokom deloval naprej. Vsebino čaše smo posrkali z brizgo in kanilo, brizgo dvakrat vertikalno obrnili, da se je vsebina premešala in prefiltrirali. Medij smo nadomeščali s črpalko skozi zgornjo odprtino komore.

3.3.3 Pregled poskusov opravljenih v okviru magistrske naloge

Magistrsko nalogo smo nadaljevali v točki, ko so bili osnovni parametri naprave že zelo dobro poznani in optimizirani v okviru prejšnjih raziskav. Na napravi za posnemanje želodčnega delovanja smo opravili 22 serij eksperimentov (5 testnih formulacij, z isto farmacevtsko obliko, 10 medijev, 3 vreče), ki so povzete v Tabeli I. Za vsako serijo eksperimentov je bilo v povprečju izvedenih 6 preskusov sproščanja, skupno pa smo izvedli 132 preskusov sproščanja.

Tabela I: Opravljene serije eksperimentov na napravi za posnemanje želodčnega gibanja.

Vzorec	Medij	Fleksibilna vreča	Farmacevtska oblika	Program	Volumen medija	
Vzorec A	Voda	V6, V7	Trda želatinska kapsula	V_002_hitra	250 mL	
	0,01 M HCl + NaCl	V6, V7, V8				
Vzorec B	Voda	V7	Trda želatinska kapsula	V_002_hitra	250 mL	
	0,01 M HCl + NaCl	V6				
Vzorec C	Voda	V7	Trda želatinska kapsula	V_002_hitra	250 mL	
	0,01 M HCl + NaCl	V6				
Vzorec D	Voda	V7	Trda želatinska kapsula	V_002_hitra	250 mL	
	0,01 M HCl + NaCl	V6				
Vzorec E	Voda	V8	Trda želatinska kapsula	V_002_hitra	250 mL	
	0,001 M HCl + NaCl					
	0,01 M HCl + NaCl					
	0,1 M HCl + NaCl					
	SGF					
	SGF + pepsin					
	FaSSGF					
	0,01 M HCl + NaCl + 1 % HMPC					
	pH=5 + hrana			V_002_hrana		
	pH=5 + kroglice (60/100)					
Vzorec F	0,01 M HCl + NaCl	V8	HPMC kapsula	V_002_hitra	250 mL	

Za izvedbo preskusov sproščanja smo uporabili 2 različni nastavitvi gibanja zaslonk - program imenovan V_002_hitra in V_002_hrana. Primerjava programov in bistvene razlike med njima so razvidne v Tabeli II.

Tabela II: Nastavitve začetnega položaja zaslonk v primeru V_002_hitra ali V_002_hrana programa.

V_002_hitra	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8
Začetni položaj (mm):	45	60	60	60	65	65	70	75
Amplituda (mm):	10	29	35	33	29	35	27	25
V_002_hrana	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8
Začetni položaj (mm):	52	60	60	60	65	65	70	75
Amplituda (mm):	10	21	29	27	29	30	27	25

Ostale nastavitve parametrov so bile za oba programa enake in so prikazane v Tabeli III.

Tabela III: Nastavitve parametrov na napravi za posnemanje gibanja želodca pri izvedbi preskusov sproščanja, s katerima ponazorimo hitrost peristaltičnega vala.

Perioda (ms):	16000
Zakasnitev (%):	11

3.4 IZDELAVA SILIKONSKE VREČE

Silikonsko vrečo smo naredili iz 4 različnih komponent. Glavni del sestave predstavlja Dragon Skin® FX-Pro, ki je mehka, stabilna in visoko zmogljivostna silikonska guma sestavljena iz komponent A in B.

Komponenti A smo dodali tudi snov za zmanjševanje viskoznosti, ki nam je pri uporabi vreče omogočila, da je bila le-ta bolj fleksibilna. Komponenti B pa smo dodali površinsko aktivno snov (PAS) za zmanjšanje površinske napetosti. Velja



pravilo, da lahko dodamo sredstvo za zmanjšanje viskoznosti do 10 % skupne količine A in B komponent, PAS pa do 1,5 % količine komponente B. Vse 4 komponente smo združili in dobro premešali ter nanесли na model v obliki želodca. Takšno zmes smo pripravili petkrat in tako nanесли 5 plasti, da je bila narejena vreča debelejša in bolj kompaktna. Po nanosu prve in druge plasti smo na cevko in določena mesta na vreči nanесли tudi steklena vlakna, ki so omogočila, da je silikon po odstranitvi iz modela ohranil obliko želodca. Vsako novo plast smo nanесли eno uro po nanosu zadnje plasti. Po nanosu zadnje plasti pa smo pustili silikonske nanose sušiti vsaj 4 ure, nato pa smo vrečo odstranili iz modela.



Slika 13: Fotografija ročno izdelane silikonske vreče 8.

3.5 SESTAVA TESTNIH FORMULACIJ

Tabela IV: Sestava pomožnih snovi testnih formulacij.

Oznaka vzorca	Opis	Farmacevtska oblika
Vzorec A	Polnilo: škrob, MCC Vezivo: HPMC Razgrajevalo: natrijeva kroskarmeloza Drsilo: magnezijev stearat	Trda želatinska kapsula
Vzorec B	Polnilo: škrob Vezivo: HPMC Razgrajevalo: kros повідon Drsilo: magnezijev stearat	Trda želatinska kapsula
Vzorec C	Polnilo: škrob, MCC Vezivo: HPMC Razgrajevalo: kros повідon Drsilo: magnezijev stearat	Trda želatinska kapsula
Vzorec D	Polnilo: škrob Razgrajevalo: škrob Drsilo: magnezijev stearat	Trda želatinska kapsula
Vzorec E	Polnilo: škrob Vezivo: HPMC Razgrajevalo: škrob Drsilo: magnezijev stearat	Trda želatinska kapsula
Vzorec F	Polnilo: škrob Vezivo: HPMC Razgrajevalo: škrob Drsilo: magnezijev stearat	HMPC kapsula

Polnilo

Vzorec D = Vzorec E = Vzorec F > Vzorec A = Vzorec B = Vzorec C

Vezivo

Vzorec E = Vzorec F > Vzorec A = Vzorec B = Vzorec C > Vzorec D

Razgrajevalo

Vzorec A = Vzorec B = Vzorec C > Vzorec D = Vzorec E = Vzorec F

Voda

Vzorec E = Vzorec F > Vzorec A = Vzorec B = Vzorec C > Vzorec D

4. REZULTATI

V tabelah V, VI, VII, VIII, IX, X, XI in XII so prikazani rezultati preskusov sproščanja opravljenih na napravi za posnemanje želodčnega gibanja. V tabelah XII in XIV ter grafih 1 in 2 so prikazani rezultati preskusov sproščanja opravljenih na napravi z vesli (USP II).

Tabela V: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 6 (V6) v deionizirani vodi.

Vzorec A; Voda; V6 (n=5)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	19,0	44,1	58,5	66,4	76,5	/	95,1
STDEV	0	11,7	19,4	16,2	13,9	10,6	/	3,0
RSD [%]	0	61,6	43,9	27,7	20,9	13,9	/	3,1

Tabela VI: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 6 (V6) v 0,01 M HCl + NaCl.

Vzorec A; 0,01 M HCl + NaCl; V6 (n=5)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	19,2	55,3	72,7	86,7	94,0	/	100,1
STDEV	0	6,1	17,6	14,3	9,1	7,2	/	2,0
RSD [%]	0	31,9	31,9	19,7	10,4	7,6	/	2,0
Vzorec B; 0,01 M HCl + NaCl; V6 (n=5)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	17,0	48,8	66,9	80,8	87,6	/	98,3
STDEV	0	2,4	13,7	17,4	10,7	7,3	/	1,3
RSD [%]	0	13,9	28,1	26,0	13,3	8,3	/	1,3
Vzorec C; 0,01 M HCl + NaCl; V6 (n=5)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	21,5	72,5	88,7	94,4	95,9	/	98,8
STDEV	0	6,9	14,7	6,8	4,5	3,5	/	1,6
RSD [%]	0	31,9	20,3	7,6	4,8	3,7	/	1,6

Vzorec D; 0,01 M HCl + NaCl; V6 (n=5)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	15,4	47,8	63,4	74,9	81,1	/	95,7
STDEV	0	4,9	7,1	7,7	8,1	7,3	/	1,7
RSD [%]	0	32,1	14,8	12,2	10,9	9,1	/	1,8

Tabela VII: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 7 (V7) v deionizirani vodi.

Vzorec A; Voda; V7 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	4,6	59,6	81,4	88,2	94,2	99,4
STDEV	0	1,2	6,1	10,3	8,1	5,5	1,5
RSD [%]	0	25,5	10,3	12,6	9,2	5,8	1,5
Vzorec B; Voda; V7 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,4	55,2	78,4	90,1	95,0	100,1
STDEV	0	4,4	20,5	13,8	8,1	5,0	1,1
RSD [%]	0	59,6	37,1	17,6	9,0	5,3	1,1
Vzorec C; Voda; V7 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,2	62,8	82,0	89,9	93,2	98,1
STDEV	0	3,5	12,0	8,3	5,7	3,8	2,4
RSD [%]	0	42,8	19,2	10,1	6,4	4,1	2,4
Vzorec D; Voda; V7 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	4,8	49,4	71,3	79,4	83,8	96,2
STDEV	0	2,6	16,3	20,1	17,5	13,9	3,2
RSD [%]	0	53,5	32,9	28,1	22,1	16,6	3,3

Tabela VIII: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 7 (V7) v 0,01 M HCl + NaCl.

Vzorec A; 0,01 M HCl + NaCl; V7 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,6	58,3	83,4	89,6	93,2	98,9
STDEV	0	4,1	22,1	14,8	10,4	7,3	3,0
RSD [%]	0	62,4	37,9	17,7	11,6	7,8	3,0

Tabela IX: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v 0,01 M HCl + NaCl.

Vzorec E; 0,01 M HCl + NaCl; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,1	43,8	65,5	73,9	80,0	94,5
STDEV	0	2,5	7,8	15,4	16,9	13,0	1,5
RSD [%]	0	41,1	17,9	23,5	22,8	16,3	1,6
Vzorec F; 0,01 M HCl + NaCl; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	1,7	5,5	29,5	58,0	72,4	101,2
STDEV	0	0,5	3,5	2,7	14,9	14,3	3,1
RSD [%]	0	30,3	63,1	9,2	25,7	19,8	3,1

Tabela X: Preskusi sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v 0,01 M HCl + NaCl + HPMC.

Vzorec E; 0,01 M HCl + NaCl + HPMC; V8 (n=5)														
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	1,0	14,5	43,8	60,3	75,4	79,5	80,4	79,2	82,3	81,9	83,7	82,2	80,4
STDEV	0	0,1	13,0	24,8	21,6	15,6	7,0	5,9	5,5	1,4	0,3	0,0	0,7	3,2
RSD [%]	0	11,0	89,3	56,5	35,8	20,6	8,8	7,3	6,9	1,7	0,3	0,0	0,9	3,9

Tabela XI: Preskusi sproščanja vzorca E na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v različnih medijih.

Vzorec E; Voda; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,4	41,9	55,6	67,4	74	95,4
STDEV	0	3,8	4,4	8,7	6,1	6,1	0,7
RSD [%]	0	44,7	10,6	15,6	9,1	8,3	0,8
Vzorec E; 0,001M HCl + NaCl; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	10,5	46,2	59,7	73,6	80,9	95,7
STDEV	0	3,1	11,5	16,2	12,3	9,0	2,6
RSD [%]	0	29,7	24,9	27,1	16,8	11,1	2,8
Vzorec E; 0,1M HCl + NaCl; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,5	46,7	71,0	83,2	92,9	98,7
STDEV	0	3,0	10,6	9,1	6,0	4,1	1,6
RSD [%]	0	34,7	22,7	12,9	7,3	4,4	1,7
Vzorec E; SGF; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	11,0	44,8	61,8	72,7	79,5	96,1
STDEV	0	5,3	4,7	4,8	4,9	4,0	1,2
RSD [%]	0	48,2	10,4	7,7	6,7	5,1	1,3
Vzorec E; SGF + pepsin; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	14,7	46,5	62,5	71,3	77,5	95,8
STDEV	0	5,3	9,8	10,6	11,2	10,8	1,6
RSD [%]	0	35,8	21,1	16,9	15,6	13,9	1,7
Vzorec E; FaSSGF; V8 (n=5)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞

Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,7	37,2	51,2	63,5	71,3	91,8
STDEV	0	3,2	8,9	8,5	6,1	6,5	2,2
RSD [%]	0	36,2	24,0	16,6	9,6	9,1	2,4

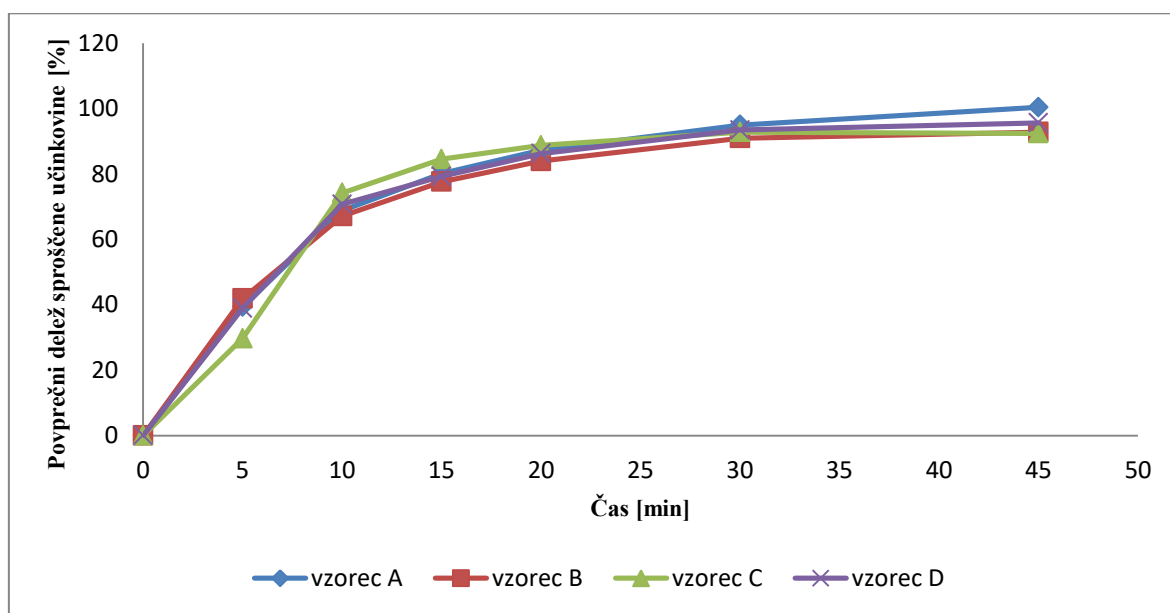
Tabela XII: Preskusi sproščanja vzorca E na napravi za posnemanje želodčnega gibanja s silikonsko vrečo 8 (V8) v mediju pH=5 z dodatkom steklenih kroglic in hrane.

Vzorec E; pH=5 + Steklene kroglice (60); V8 (n=3)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	5,6	31,9	59,7	74,4	82,7	94,9
STDEV	0	4,0	8,2	5,9	4,7	4,7	3,3
RSD [%]	0	71,7	25,8	9,8	6,3	5,6	3,4
Vzorec E; pH=5 + Steklene kroglice (100); V8 (n=3)							
Čas [min]	0	5	10	15	20	25	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	3,5	47,4	79,4	87,4	90,1	95,1
STDEV	0	1,8	12,6	16,2	13,4	10,0	4,0
RSD [%]	0	50,2	26,7	20,4	15,3	11,1	4,2
Vzorec E; pH=5 + Hrana; V8 (n=3)							
Čas [min]	0	10	20	30	40	50	60
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	44,8	67,0	65,1	63,8	63,4	63,9
STDEV	0	7,3	1,6	1,4	1,4	1,5	1,9
RSD [%]	0	16,3	2,3	2,1	2,2	2,4	3,0

Tabela XIII: Preskusi sproščanja na napravi z vesli (USPII) v deionizirani vodi.

Vzorec A; Voda (n=3)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	39,4	68,8	80,1	87,2	94,9	100,4	/
STDEV	0	6,3	7,2	4,2	2,8	1,2	0,7	/
RSD [%]	0	15,9	10,4	5,2	3,3	1,2	0,7	/
Vzorec B; Voda (n=3)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞

Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	41,9	67,1	77,6	83,9	90,9	92,8	92,6
STDEV	0	1,3	9,0	6,5	1,7	1,6	0,8	1,0
RSD [%]	0	3,1	13,4	8,4	2,0	1,8	0,9	1,1
Vzorec C; Voda (n=3)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	29,7	74,2	84,5	88,7	92,8	92,4	93,1
STDEV	0	7,6	4,2	4,2	3,6	2,9	2,9	1,7
RSD [%]	0	25,6	5,6	5,0	4,1	3,1	3,1	1,8
Vzorec D; Voda (n=5)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	38,9	70,7	79,2	86,2	93,4	95,6	96,9
STDEV	0	12,9	9,6	7,1	5,9	4,6	4,1	3,5
RSD [%]	0	33,2	13,5	9,0	6,8	5,0	4,3	3,6

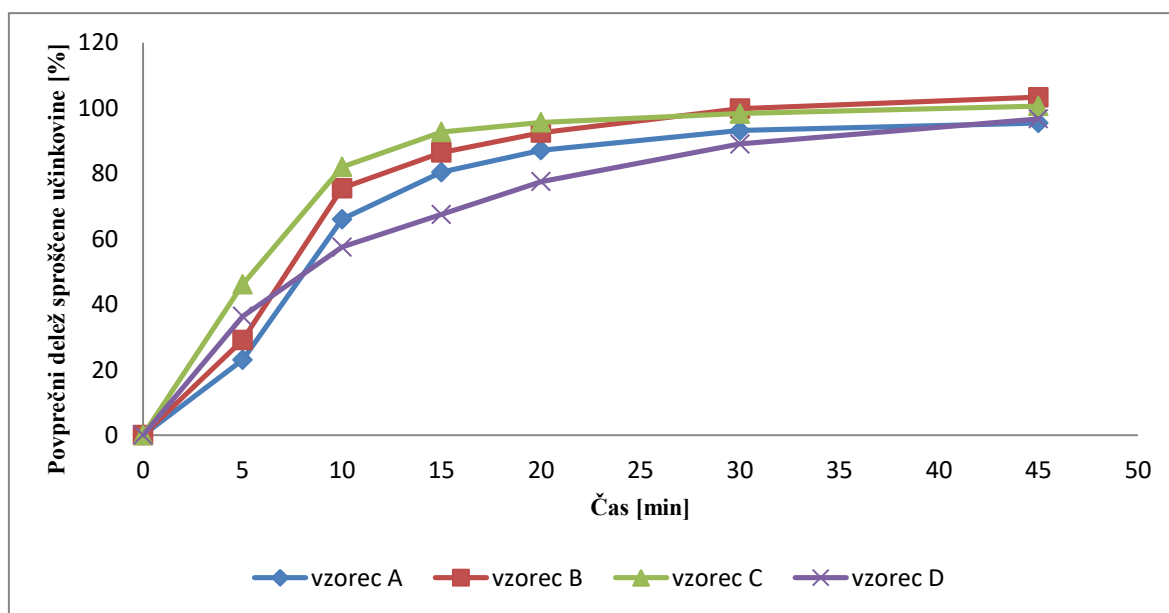


Graf 1: Profil sproščanja vzorca A, B, C in D v deionizirani vodi na napravi z vesli (USP II).

Tabela XIV: Preskusi sproščanja na napravi z vesli (USP II) v 0,01 M HCl + NaCl.

Vzorec A; 0,01 M HCl + NaCl (n=3)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	23,0	66,0	80,4	87,1	93,1	95,4	94,2

STDEV	0	2,9	7,4	4,3	1,7	0,9	1,7	0,7
RSD [%]	0	12,5	11,2	5,4	1,9	0,9	1,8	0,7
Vzorec B; 0,01 M HCl + NaCl (n=3)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	29,1	75,5	86,4	92,5	99,8	103,3	104,9
STDEV	0	8,1	11,4	8,7	6,9	4,6	3,6	2,9
RSD [%]	0	27,9	15,2	10,0	7,4	4,6	3,5	2,8
Vzorec C; 0,01 M HCl + NaCl (n=3)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	46,1	82,0	92,7	95,6	98,3	100,6	102,5
STDEV	0	6,3	12,8	12,2	10,7	7,4	4,2	1,2
RSD [%]	0	13,8	15,6	13,2	11,2	7,6	4,2	1,2
Vzorec D; 0,01 M HCl + NaCl (n=2)								
Čas [min]	0	5	10	15	20	30	45	∞
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	36,3	57,5	67,5	77,5	89,0	96,7	101,2
STDEV	0	1,9	9,1	10,7	10,7	9,2	4,6	0,0
RSD [%]	0	5,2	15,7	15,9	13,9	10,3	4,7	0,0



Graf 2: Profil sproščanja vzorca A, B, C in D v 0,01 M HCl + NaCl na napravi z vesli (USP II).

5. RAZPRAVA

Preskusili smo sproščanje modelne ZU iz petih različnih formulacij trdih želatinskih kapsul s takojšnjim sproščanjem, ki so se razlikovale glede na sestavo pomožnih snovi. Preskusili smo tudi sproščanje iste modelne ZU, vgrajene v hidroksipropil metil celulozne (HPMC) kapsule s takojšnjim sproščanjem. V razpravi smo formulacije nazivali kot testne formulacije.

Preskuse sproščanja smo izvedli na napravi za posnemanje želodčnega gibanja, ki omogoča približevanje relevantnim *in vivo* pogojem. Aparaturo so razvili raziskovalci oddelka *In vitro-in vivo* korelacije v podjetju Lek d.d. Ljubljana v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo Univerze v Ljubljani, prav tako so vse testne formulacije kapsul produkt razvoja podjetja Lek d.d. Ljubljana.

Na napravi za posnemanje želodčnega gibanja smo izvedli preskuse sproščanja z uporabo medijev različnih pH-jev in mehanskih dodatkov.

5.1 PRESKUSI SPROŠČANJA OPRAVLJENI NA NAPRAVI Z VESLI (USP II)

Na voljo so nam bili tudi rezultati preskusov sproščanja, ki so bili izvedeni na napravi z vesli (USP II) z deionizirano vodo in 0,01 M HCl z dodatkom 2g/L NaCl (pH=2). Eksperimente na aparaturi USP II so izvedli sodelavci oddelka *In vitro in vivo* korelacije za namene razvoja formulacij. Volumen medija je znašal 900 mL, hitrost mešanja je bila 50 obratov/min, za ohranjanje pozicije kapsule je bil uporabljen sinker, rezultati so prikazani v Tabelah XIV in XV, profili sproščanja pa na Grafih 1 in 2.

5.2 PRESKUSI SPROŠČANJA OPRAVLJENI NA NAPRAVI ZA POSNEMANJE ŽELODČNEGA GIBANJA

Pri izvajanju preskusov sproščanja smo želeli čim bolj posnemati *in vivo* pogoje v želodcu, zato smo kot medije izbrali puferne raztopine, ki zagotavljajo konstanten pH med eksperimentom, podobno kot v želodcu HCl kot močna kislina z visoko pufersko kapaciteto, ki se upira spremembi pH in tako preprečuje večje spremembe v pH-ju želodčne vsebine (6). Glede na to, da pH v želodcu znaša med 1-3 (10), smo s preskusi sproščanja pričeli v 0,01 M HCl z dodatkom 2 g/L NaCl (pH=2), katere uporabo za preskuse sproščanja priporočajo tudi evropski (EMA) in ameriški regulatorni organi

(FDA). Priprava je enostavna, medij pa je univerzalen za uporabo v številnih različnih metodah za preskušanje sproščanja.

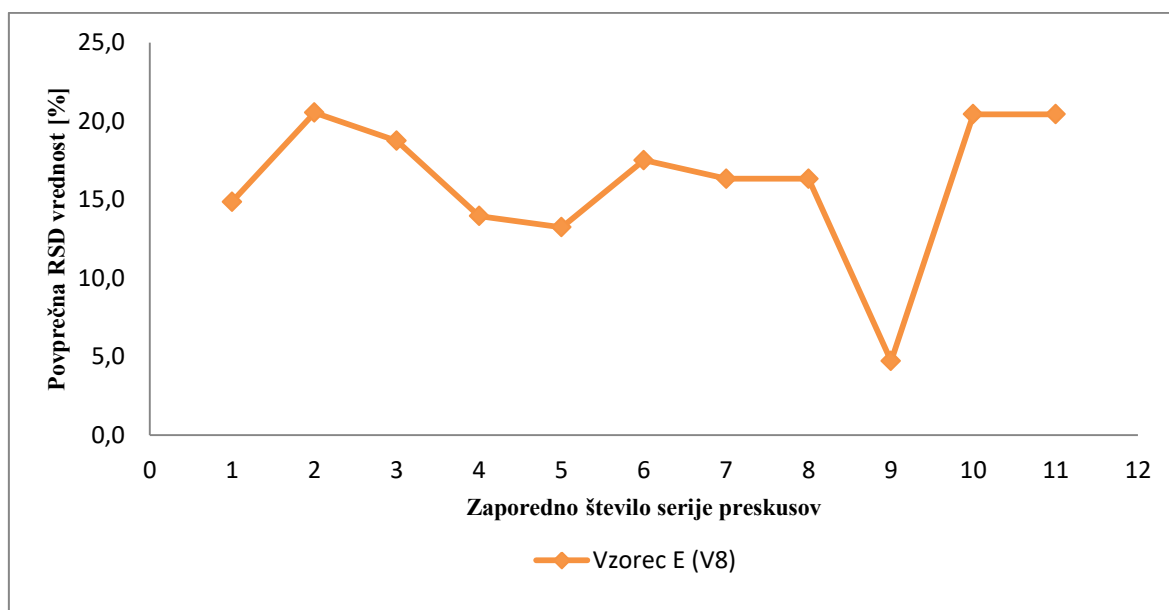
Povprečni volumen tekočine v želodcu na tešče znaša približno 45 mL (10) in če upoštevamo, da običajno trdne FO popijemo skupaj s kozarcem vode, pacient zdravilo zaužije s 240 mL vode (10). Zaradi navedenega dejstva smo v eksperimentih uporabili 250 mL raztopine oz. pufra. V primerjavi s konvencionalnimi metodami preskušanja sproščanja (USP I in USP II), kjer volumen medija največkrat znaša 900 mL, kar lahko vodi v slabšo interpretacijo rezultatov in napovedovanje *in vivo* sproščanja (10), je bil v našem primeru uporabljen volumen znatno manjši. Ker se modelna ZU vgrajena v FO s takojšnjim sproščanjem uvršča v razred BCS I, nismo pričakovali težav s topnostjo same ZU, saj se takšna ZU v celoti raztopi v želodcu. Za izvedbo preskusa sproščanja na naši napravi smo uporabili nastavitve, shranjene kot program V_002_hitra, za katerega so karakteristične zmerne amplitude zaslonk ter hitro potujoči valovi kontrakcij (42). V okviru prejšnjih raziskav (sicer z drugimi oblikami in ZU) se je prav ta program uporabljal najpogosteje, ker je dajal rezultate, ki so bili v skladu z opaženimi *in vivo* podatki (42).

Rezultati preskusov sproščanja so prikazani v Tabelah V, VI, VII, VIII, IX, X, XI in XII. Za vsako od testnih formulacij smo opravili v povprečju 6 ponovitev. Razlog za različno število ponovitev med testiranimi formulacijami je bil ta, da je bila naprava nov izum, na kateri je bilo pred tem opravljenih malo število preskusov, mi pa smo želeli dobiti čim bolj ponovljive rezultate. V času raziskovalnega dela se je obrabila fleksibilna vreča (V6) na mestu prehoda med vrečo in cevko, kjer ventil uravnava pretok medija. Cevka se je na tem mestu stanjšala in se kasneje začela trgati in puščati. Nadalje smo uporabili eno izmed že narejenih vreč (V7), ki je bila po obliki in velikosti zelo podobna prejšnji vreči, s tem, da je bila tanjša. Po nekaj opravljenih testih in primerjavah z prejšnjo vrečo, smo ugotovili, da nova vreča ne daje dovolj diskriminatornih rezultatov, saj ni dobro ločila med različnimi testnimi formulacijami, niti med različnimi mediji. Primorani smo bili narediti novo vrečo (V8), ki je bila po sestavi in količini materialov identična prvi uporabljeni vreči (V6).

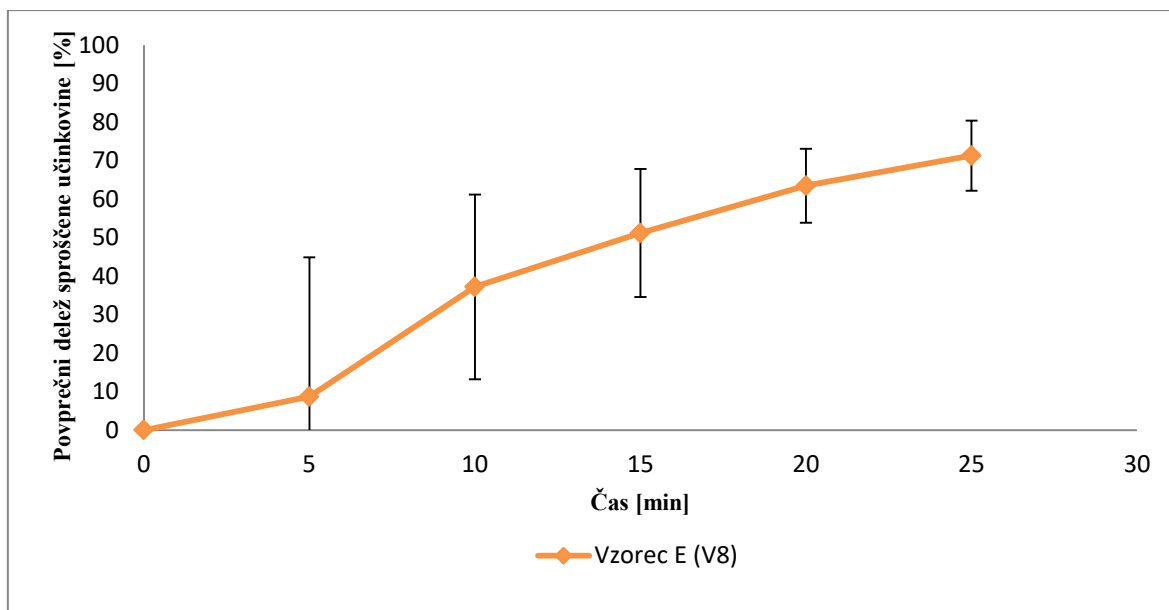
5.2.1 Gibanje relativnih standardnih deviacij (RSD)

Za vsako serijo preskusov smo izračunali povprečni delež sproščene ZU, standardno deviacijo (STDEV) in relativno standardno deviacijo (RSD) v vseh časovnih točkah. RSD vrednost se je v povprečju pri testnih formulacijah gibala med 10 - 38 %. V prvih časovnih točkah 5 in 10 min so bili RSD-ji najvišji, v časovni točki 5 min v povprečju 38 %, v

časovni točki 10 min v povprečju 29 %, nato pa so do časovne točke 25 min padli na 10 %. Na splošno je znano, da je sproščanje iz kapsul tudi v klasičnih aparatih za testiranje sproščanja v prvih časovnih točkah precej variabilno, ker se kapsule različno hitro odpirajo. Če pa je ZU dobro topna, se to še posebej močno pozna. V časovni točki 5 min je vzorec A dosegel RSD celo 45 %, v časovni točki 10 min pa je vzorec B dosegel RSD 33 %. Vzorec E smo testirali v različnih medijih. Najvišja RSD vrednost je bila v povprečju 21 % v 0,01 M HCl + NaCl, najnižja RSD vrednost pa je bila v povprečju 5 % v acetatnem pufru pH=5 z dodatkom hrane. Domnevamo, da je razlog za nekoliko višje vrednosti RSD-jev ta, da kapsula po vstavitvi v medij med 6. in 7. zaslonko takoj spremeni svoj položaj, dejansko plava na površini medija, ker ima manjšo gostoto. Drugi izmed razlogov pa bi lahko bil ta, da so testne formulacije vzete iz razvojne faze in zato niso bile zadosti ponovljive. Sicer pa so začetne povečane vrednosti RSD-jev bolj kot ne pričakovane, saj v začetku poteka razpad FO, penetracija topila, difuzija ZU in raztapljanje z različnimi hitrostmi. Celoten potek je odvisen od začetnega položaja in vzorca gibanja FO ter medija.



Graf 3: Primerjava povprečnih RSD vrednosti skozi serije preskusov pri eni izmed testnih formulacij (vzorec E z vrečo 8(V8)); serija 1 – voda, serija 2 - 0,01 M HCl + NaCl, serija 3 - 0,001 M HCl + NaCl, serija 4 - 0,1 M HCl + NaCl, serija 5 – SGF, serija 6 - SGF + pepsin, serija 7 – FaSSGF, serija 8 - 0,01 M HCl + NaCl + 1 % HMPC, serija 9 - pH=5 + hrana, serija 10 - pH=5 + kroglice (60), serija 11 - pH=5 + kroglice (100)

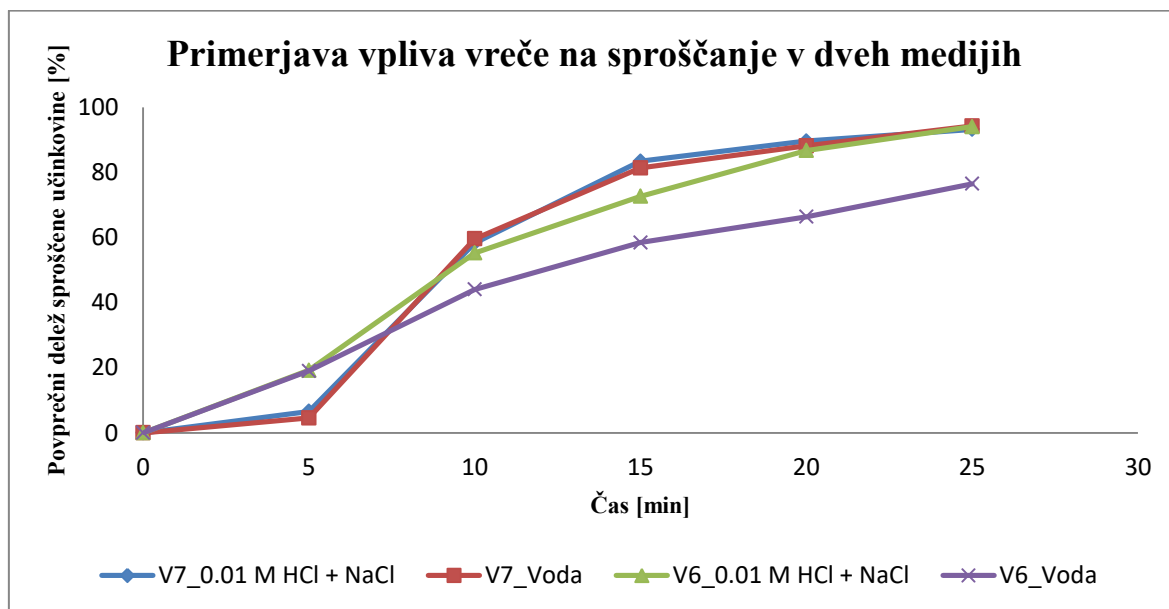


Graf 4: Povprečni delež sproščene učinkovine vzorca E v vreči 8 (V8) v enem izmed medijev. Intervali RSD vrednosti pri posamični časovni točki prikazujejo odvisnosti sipanja rezultatov glede na čas sproščanja.

5.3 PRIMERJAVA REZULTATOV

5.3.1 Vpliv silikonske vreče

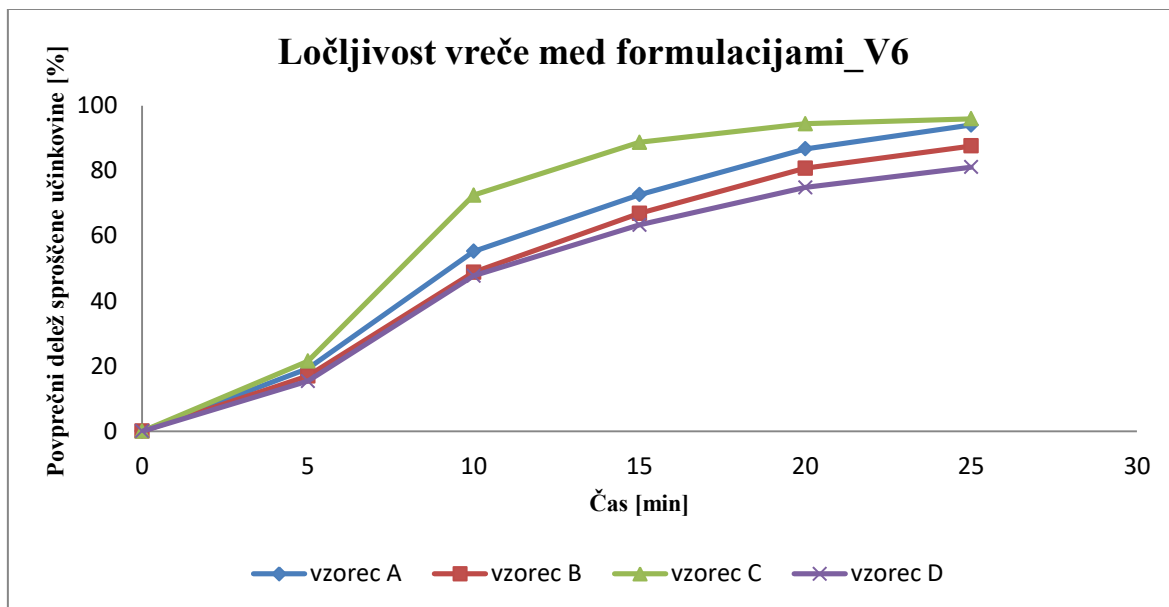
V prvi tretjini raziskovalnega dela se je silikonska vreča V6 obrabila na mestu, kjer jo je stiskal ventil, ki uravnava pretok oz. praznjenje želodca. Vreča se je na tem mestu stanjšala in natrgala ter začela puščati. Za nadaljnje teste smo uporabili vrečo 7, ki je bila po obliki in velikosti skoraj popolnoma podobna vreči 6, le da je bila tanjša. Po nekaj narejenih testih smo naredili primerjavo z rezultati, ki nam jih je dala vreča 6. Glede na rezultate iz Grafa 3 in glede na literaturne podatke, je raztapljanje FO odvisno od medija nad $\text{pH}=6,8$. Raztapljanje je počasnejše in podaljšano. Vreča 6 nam je dala ustrezne rezultate, medtem ko vreča 7 ni ločila med različnima medijema, tako da sta profila sproščanja v 0,01 M HCl + NaCl in v deionizirani vodi skoraj identična (Graf 5).



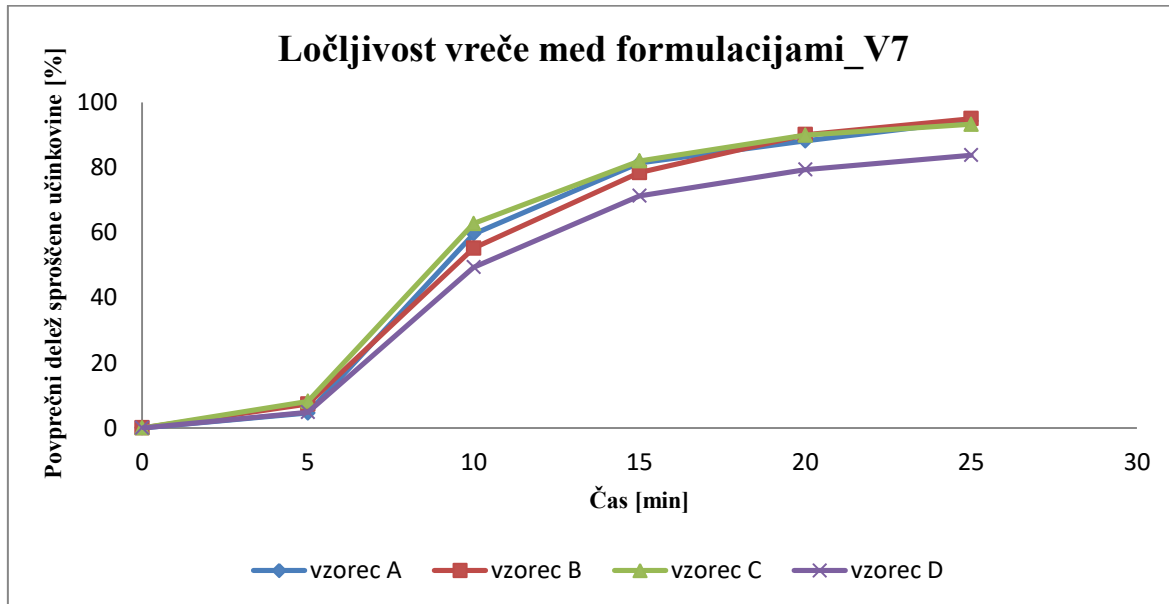
Graf 5: Primerjava vpliva vreče na sproščanje v dveh medijih.

Pogledali smo tudi kako dobro ena in druga vreča ločita med različnimi testnimi formulacijami. Iz Grafa 6 je razvidno, da vreča 6 loči dobro med različnimi testnimi formulacijami, medtem ko je iz Grafa 7 razvidno, da vreča 7 ne loči tako dobro med različnimi testnimi formulacijami, kot vreča 6. Za zaključek, katera vreča daje bolj ustrezne ali realnejše rezultate, imamo premalo podatkov, saj bi se morali za to bolj poglobiti v raziskovanje razlik in narediti več testov oziroma bi morali primerjati rezultate z *in vivo* rezultati študij. Kljub temu, pa na podlagi rezultatov, ki jih lahko razberemo iz

Grafov 6 in 7 v nadaljevanju, vidimo, da je bila vreča 6 bolj diskriminatorsna kot vreča 7, kar se nam je zdelo ustrežnejše za nadaljnja testiranja. Ker pa seveda vreča 6 ni bila primerna več za uporabo, smo poskusili narediti repliko te vreče, to je bila vreča 8.



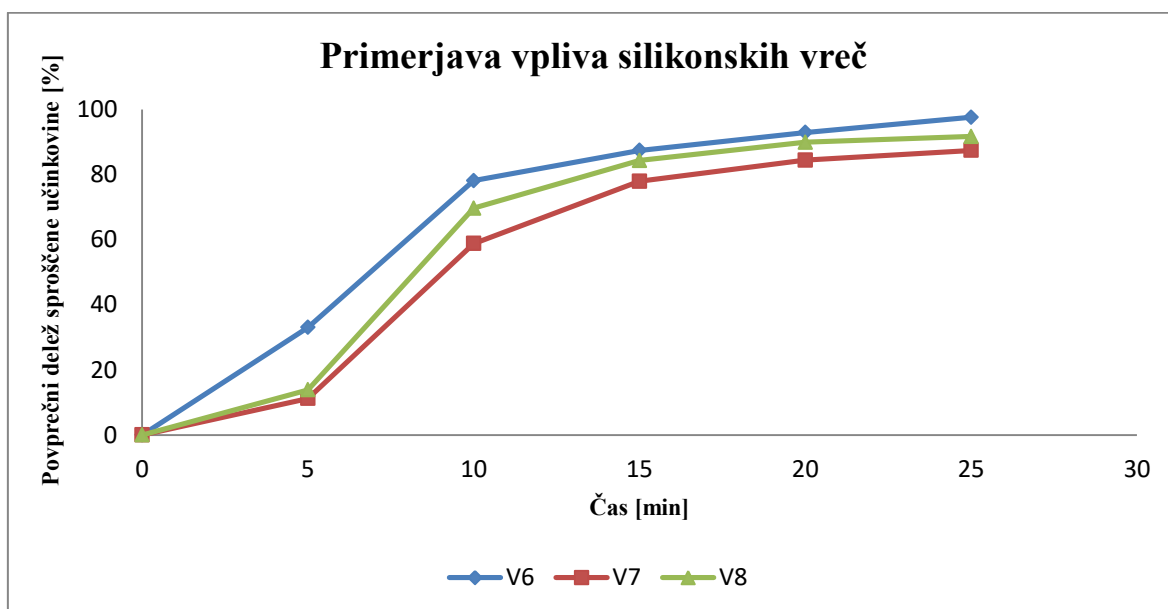
Graf 6: Ločljivost vreče 6 med različnimi testnimi formulacijami.



Graf 7: Ločljivost vreče 7 med različnimi testnimi formulacijami.

Vreča 8 naj bi bila po sestavi, obliki in velikosti replika vreče 6, vendar kljub temu končni izdelek ni bil povsem enak, saj se je izkazalo, da je bila vreča 8 nekoliko tanjša. Tukaj lahko opazimo, da ima ročna izdelava vreče zaradi nanašanja več plasti zelo velik vpliv na

končni izdelek, ne glede na enako količino uporabljenih komponent in oblike modela. Na Grafu 8 lahko vidimo primerjavo profilov sproščanja istega vzorca z uporabo različnih vreč. Vzrok za razliko v profilih sproščanja je vpliv človeškega faktorja, torej ročna izdelava vreče. Ko bo metoda naprave za želodčno gibanje v prihodnosti optimizirana in dovršena, bo morala biti silikonska vreča industrijske izdelave, saj bo le tako po obrabljenosti lahko vsaka naslednja vreča identična in bo dajala enake profile sproščanja. Zaenkrat pa lahko zagotovimo natančnost na tak način, da v času določenega projekta in raziskovanja uporabljamo vedno samo eno vrečo. Čeprav vreča 8 ni dala enakih rezultatov kot vreča 6, smo se odločili, da bomo v nadaljnjih testiranjih še vseeno raje uporabili vrečo 8 kot vrečo 7, saj slednja, kot je prikazano na prejšnjih grafih, ne loči dobro med različnimi mediji, niti med različnimi testnimi formulacijami.



Graf 8: Primerjava vpliva silikonskih vreč na profil sproščanja formulacije referenčnega zdravila.

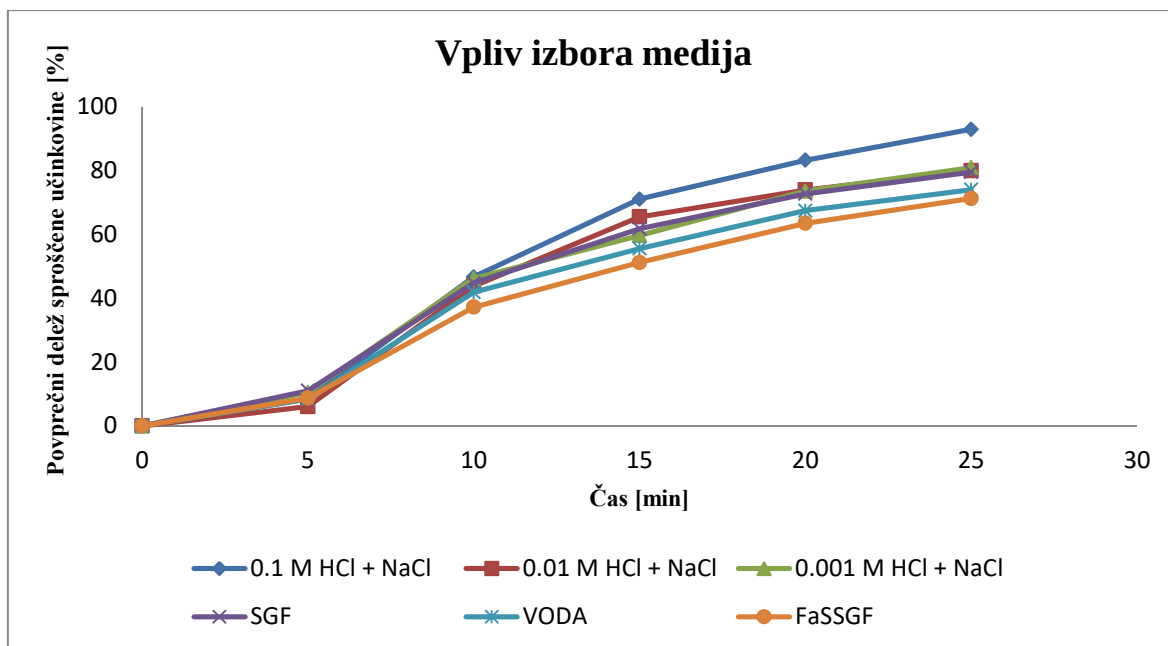
V sklopu optimizacije silikonske vreče smo analizirali tudi sproščanje testnih formulacij z različnimi lastnostmi (Graf 6). Med seboj so se razlikovale po sestavi in količini pomožnih snovi. Najhitrejšo sproščanje izkazuje vzorec C, za njim pa vzorec A. Oba vzorca imata enako količino in kombinacijo polnila, enak tip in količino veziva, enako količino razgrajevala ter intragranularno in ekstragranularno enako razporejeno količino razgrajevala. Razlikujeta se le v tipu razgrajevala, ki ima očitno odločilni vpliv na hitrost sproščanja. Sledi jima vzorec B, ki ima za razliko od vzorca A in C samo en tip polnila, je pa količina polnila enaka količini v vzorcih A in C. Vsebuje pa enak tip in količino veziva,

prav tako pa tudi razgrajevala. Najpočasnejše sproščanje izkazuje vzorec D, saj vsebuje manj razgrajevala, poleg tega pa je le-to vgrajeno samo ekstragranularno, ne pa tudi intragranularno. Vzorec vsebuje največjo količino polnila, ne vsebuje pa veziva. Zaključimo lahko, da naša naprava smiselno razporedi vzorce z različnimi lastnostmi glede na hitrost sproščanja in po pričakovanju glede na tehnologijo izdelave. Rezultate sproščanja za testne formulacije od A-D na napravi za posnemanje želodčnega gibanja lahko primerjamo tudi z rezultati sproščanja pridobljenimi z USP II napravo. Naprava za posnemanje želodčnega gibanja na začetku izkazuje počasnejše profile sproščanja (Graf 6) v primerjavi z USP II napravo (Graf 2). Nekje pri 20 min je povprečni delež sproščene ZU približno enak za posamezno testno formulacijo pri eni in drugi napravi. Profili sproščanja testnih formulacij so razporejeni podobno pri obeh napravah, razen pri vrstnem redu vzorcev A in B, ki je obraten. V primerjavi z vzorcem C ima vzorec A, kot že omenjeno, enako količino in kombinacijo polnila, enak tip in količino veziva, intragranularno in ekstragranularno enako razporejeno količino razgrajevala, vendar pa drugačen tip razgrajevala. Vzorec B ima samo en tip polnila, je pa količina polnila enaka količini v vzorcih A in C. Vsebuje tudi enak tip in količino veziva kot vzorca A in C. Enaka je tudi količina in razporeditev razgrajevala, tip pa je enak tipu v vzorcu C. Težko natančno napovemo, katera naprava bolj realno loči profile sproščanja glede na testno formulacijo, saj bi za to potrebovali tudi rezultate *in vivo* študij. Lahko pa iz profilov sproščanja sklepamo, da USP II naprava omogoča večjo diskriminatornost med vzorci.

5.3.2 Vpliv izbora medija

Pri izvajanju testov z eno izmed testnih formulacij (vzorec E) v medijih z različnim pH-jem smo želeli ugotoviti, ali pH medija vpliva na razpadnost FO in raztapljanje ZU. Po literaturnih podatkih trde želatinske kapsule hitro razpadejo in se hitro raztopijo ter tako dosežejo preko 85 % sproščene ZU po 30 min v mediju s pH od 1,2 – 6,8 (33). Mediji s pH nad 6,8 pa niso ustrezni za raztapljanje trdih želatinskih kapsul, saj je raztapljanje ovojnice bolj variabilno in podaljšano (34). Naša preučevana ZU je sicer dobro topna v medijih s pH od 1 - 10, lahko pa sprememba pH medija vseeno vpliva na hitrost raztapljanja ZU. Ne glede na to pa so profili sproščanja na Grafu 9 odvisni predvsem od vpliva FO. Iz Grafa 9 je razvidno, da SGF (pH=1,2), 0,01 M HCl + NaCl (pH=2), in 0,001 M HCl + NaCl (pH=3) ne povzročijo bistvene razlike v razpadnosti FO in raztapljanju ZU. Pospešene profile lahko opazimo v primeru 0,1 M HCl + NaCl (pH=1), saj ima res zelo nizek pH

očitno večji vpliv na raztapljanje naše ZU. Sproščanje v deionizirani vodi je pričakovano manjše in počasnejše, saj gre za nevtralen pH, kar je znano tudi po literaturnih podatkih (34), da so rezultati bolj variabilni, profili sproščanja pa počasnejši. Profil sproščanja testne formulacije v FaSSGF mediju (pH=1,6) je nepričakovano najbolj počasen. Pričakovali bi, da bo njegov profil sproščanja bolj podoben sproščanju v SGF (pH=1,2), 0,01 M HCl + NaCl (pH=2) in 0,001 M HCl + NaCl (pH=3) in seveda hitrejši od tistega v vodi. Vzrok tej razliki bi lahko bili dodatki v SIF prašku, to sta natrijev tauroholat ali lecitin. Po raziskovanju strokovne literature smo ugotovili, da omenjeni sestavini praška naj ne bi vplivali na trdo želatinsko kapsulo. Ne vemo pa zagotovo, kako vplivata na samo ZU, saj ni bilo mogoče zaslediti konkretnih raziskav, ki bi se nanašale nanjo (36). Kljub temu pa smo po dodatni razpravi ugotovili, da bi na sproščanje lahko vplival lecitin, saj je površinsko aktivna snov z izraženimi emulgatorskimi lastnostmi. V vodnih raztopinah lahko tvori micelle, odvisno od temperature sistema in hidratacije molekule (36). Notranjost micela tvorijo lipofilni repi, zunanost pa hidrofilne glave (37). V strukturo micela se lahko ujame ZU in na tak način se v omenjenem mediju upočasni profil sproščanja. To se lahko v večji meri zgodi v primeru ZU, ki spada v BCS II ali IV klasifikacijo, saj imajo take ZU slabo topnost, kar je posledica izraženih lipofilnih lastnosti. Ta pojav pa je možen tudi v primeru naše ZU, ki sicer spada v BSC I klasifikacijo. Kljub temu, da ZU ni slabo topna, je pa dobro permeabilna in ima zato deloma izražene tudi lipofilne lastnosti, zaradi katerih je možno, da se je ujela v strukturo micela, posledično pa se je profil sproščanja upočasnil. Vendar pa je to zgolj hipoteza in bi jo morali preveriti z »recovery« metodo na tak način, da bi pri redčenju vzorcev uporabili kot medij metanol, ki bi razbil morebitne micelle, v katere se lahko ujame ZU.

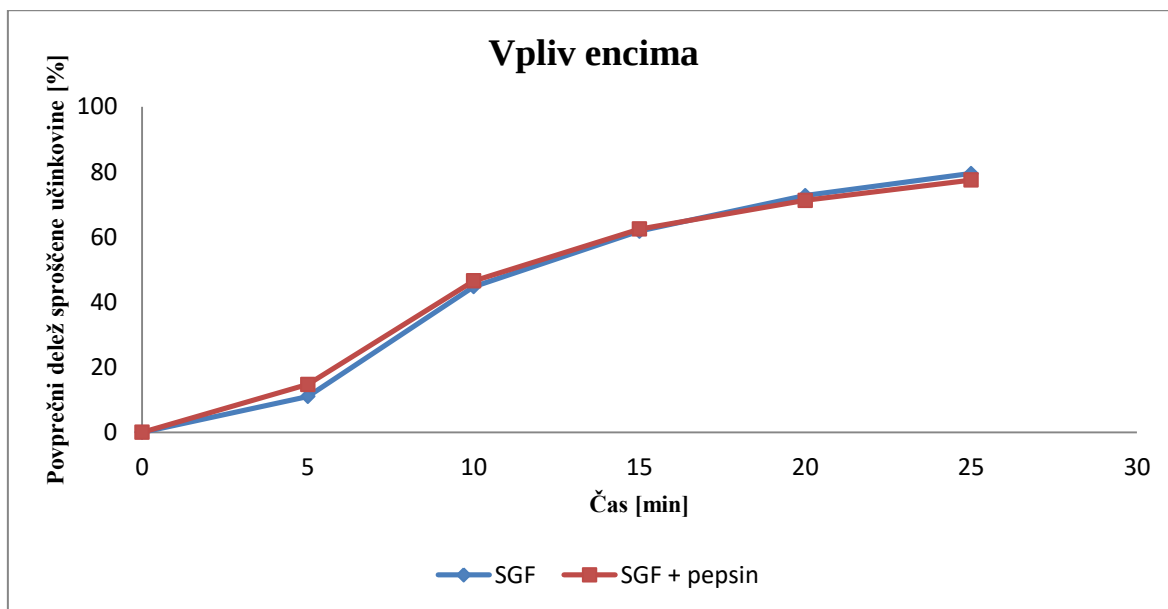


Graf 9: Vpliv pH medija na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

5.3.3 Vpliv encima

V umetni želodčni sok (SGF) smo dodali encim pepsin, ki ga *in vivo* izločajo posebne žleze v steni želodca v obliki prekursorja, pepsinogena (38). Na ta način smo želeli ugotoviti vpliv dodatka encima na profil sproščanja. Iz Grafa 10 je razvidno, da pepsin ne vpliva na profil sproščanja. Po pregledu strokovne literature smo ugotovili, da dodatek pepsina izboljša profil sproščanja v primeru pojava »crosslinking« trdih želatinskih kapsul (28). »Crosslinking« pomeni premreževanje želatinskih molekul, pri čemer se tvorijo močne kemijske vezi med vodikovimi in ionskimi vezmi znotraj želatinske verige, kar posledično spremeni *in vitro* in pa tudi *in vivo* raztapljanje trdih želatinskih kapsul. Premreževanje povzroči tvorbo pelikla na notranji ali znanji površini ovojnice želatinske kapsule. Pelikel je tanka v vodi netopna membrana, ki prepreči, da bi se kapsula v vodnem mediju odprla in da bi se iz notranjosti sprostila vsebina (39). Omenjen pojav lahko povzroči reakcija želatine z aldehidi ali stresni pogoji shranjevanja (visoka temperatura, visoka vlažnost, pretirana izpostavljenost svetlobi). Raziskovalci so že dolgo časa nazaj poročali, da dodatek pepsina v želodčni medij izboljša raztapljanje slabo topnih kapsul (29). Dodatek pepsina prekine določene peptidne vezi znotraj želatinske molekule in tako omogoči sprostitev vsebine iz kapsule (40). Ne glede na to, ali pride do premreževanja znotraj želatinskih kapsul ali ne, ga v *in vitro* testiranjih sproščanja ponavadi dodamo v medij in se tako čim bolj približamo pogojem *in vivo* (28). Ameriška farmakopeja (USP)

priporoča dodatek pepsina, kadar se kot medij uporabi voda ali medij s pH pod 6,8 (39). Glede na literaturne podatke in naše rezultate, lahko sklepamo, da v primeru naših trdih želatinskih kapsul ni prišlo do premreževanja znotraj želatinskih molekul, saj dodatek pepsina ni vplival na profil sproščanja.



Graf 10: Vpliv encima na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

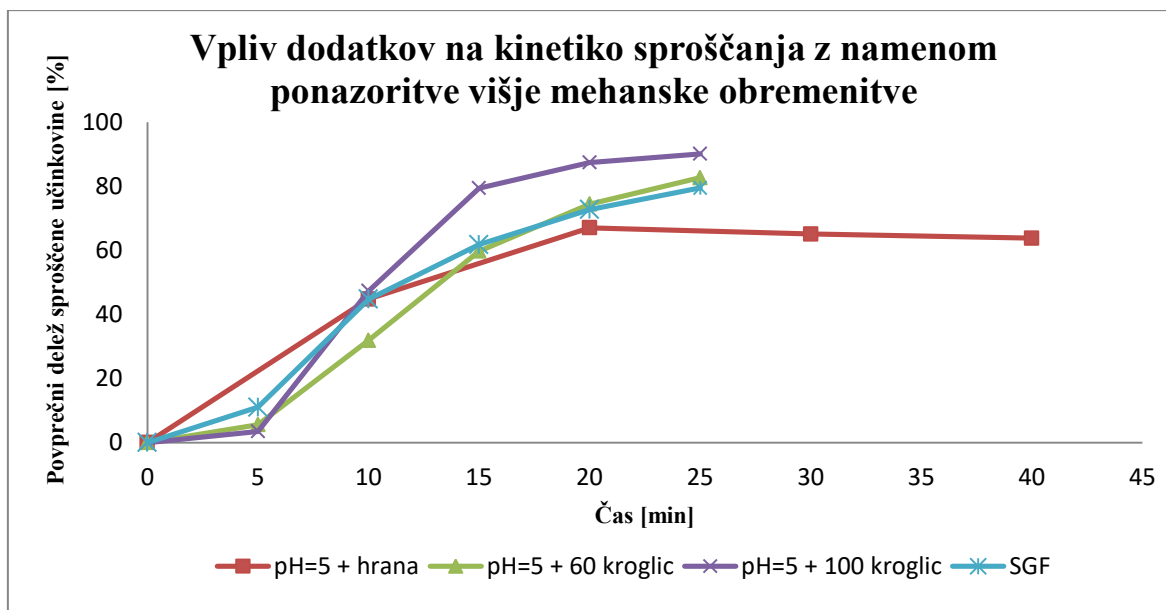
5.3.4 Vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske obremenitve

Po navodilih testiranega zdravila je protokol jemanja zdravila 3 krat na dan po 3 kapsule naenkrat skupaj s hrano. Glede na priporočeno jemanje zdravila smo se odločili, da bomo testirali sproščanje ZU v želodcu skupaj z realno hrano in se tako poskušali čim bolj približati biorelevantnim pogojem. Ker se po zaužitju hrane pH želodčnega soka pri zdravih ljudeh poviša na 4,5 do 5,8, smo kot medij pripravili acetatni pufer pH=5 (1). Za vsak test smo uporabili 125 g skuhanih testenin. Na Grafu 11 lahko vidimo, da se je do časovne točke 10 min sprostila že skoraj polovica ZU, kar je skoraj enaka količina kot v medijih, ki oponašajo pogoje na tešče. Tukaj lahko še enkrat potrdimo, da pH medija ne vpliva na profil



Slika 14: Fotografija posneta po koncu testa pri katerem smo v medij pH=5 dodali testenine.

sproščanja. Smo pa pričakovali, da bo skupaj s hrano profil sproščanja počasnejši, saj takšne navedbe najdemo tudi v strokovni literaturi (3). Dokazano je bilo, da vnos hrane vodi v številne spremembe želodčnih pogojev v zvezi z mehanskimi, encimskimi in fizikalno kemijskimi vidiki. Trdne FO v želodcu po obroku podležejo podobnim pogojem kot hrana, poleg tega pa želodčno okolje vpliva na obnašanje raztapljanja (3). Abrahamsson in sodelavci so 2004 poročali, da lahko hrana znatno zakasni razpad zdravila (npr. tablete) v želodcu z tvorbo filma okoli tablete, ki nastane zaradi sestavin zdravila kot tudi sestave hrane (1). Sarosiek in sodelavci, ki so izvajali testiranje s kapsulo SmartPill[®], poročajo, da je čas zadrževanja v želodcu v takšnih pogojih lahko več kot 6 ur (3). Prav tako se tudi vzorec motilitete želodca razlikuje v stanju na tešče in v stanju po vnosu hrane (1). Obroki, zaradi svojega volumna, kemijskih in fizikalnih lastnosti vplivajo na amplitudo kontrakcij, dolžino oz. razdaljo širjenja in na trajanje želodčne peristaltike. Večji obroki spodbudijo močne fazne kontrakcije, ki povzročijo destruktivne mehanske sile, ki delujejo v stanju po obroku s silo 1,89 N, v stanju na tešče pa s silo 1,50 N (1, 2). V primeru vodne vsebine so kontrakcije globoke, v primeru zelo viskozne vsebine pa plitve. Pri zaužitju tekočega obroka z nekaj kalorijami se lahko želodec izprazni po nekaj kontrakcijah. V nasprotju pa visoko kaloričen in težje prebavljiv obrok vodi do globoke in podaljšane relaksacije proksimalnega dela želodca in (tonusno) zaprtje antruma, pilorusa in dvanajstnika. Zaradi tega lahko preteče tudi do nekaj ur med zaužitjem in dejanskim efluksom delcev ali himusa (2). Tako je praznjenje želodca oz. pretok himusa iz želodca v dvanajstnik po obroku hrane vsaj na začetku zakasnen in upočasnen. Ob prihodu peristaltičnega vala se pilorus skrči, sfinkter zoža, himus pa je takrat potisnjen nazaj v želodec, kar imenujemo retropulzacija. Retropulzacija zmanjša delce hrane v mehko konsistenco v obliki suspenzije. Delci < 1 do 2 mm prehajajo v dvanajstnik, medtem ko se neprebavljeni delci večji od 2 mm zadržijo v želodcu in se izpraznijo iz želodca v naslednjih III. fazah MMC-ja (1).



Graf 11: Vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske obremenitve na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

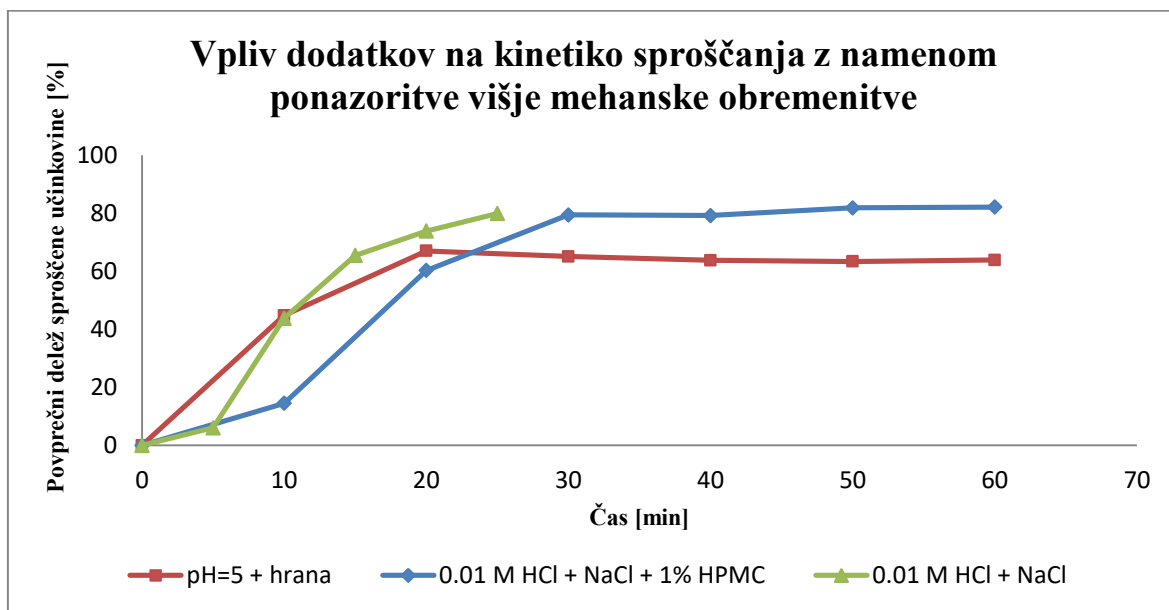
Glede na literaturne podatke bi morali za bolj ustrezne rezultate, ki bi dejansko oponašali stanje po obroku *in vivo*, spremeniti nastavitve programa želodčnega simulatorja. Morali bi povečati amplitudo kontrakcij, saj so v stanju po obroku le-te močnejše ter spremeniti periodo kontrakcij, saj se spremeni tudi trajanje in razdalja širjenja peristaltičnega vala. Prav tako bi morali zakasnit in upočasniti pretok, saj se pilorus ne odpre, dokler hrana skupaj z zdravilom ne razpade na dovolj majhne delce in tako se lahko hrana skupaj z zdravilom v želodcu zadrži tudi do nekaj ur. Za racionalni razvoj novih FO moramo ravno zato zelo dobro poznati lastnosti želodčnega delovanja v stanju po obroku, saj le-te določajo proces raztapljanja trdne FO in njihovo BU. V našem primeru nismo spreminjali nastavitve programa zaradi primerjalnega vidika, saj smo želeli opraviti vse preskuse v enakih pogojih in znotraj tega opaziti razlike. Na Grafu 11 lahko tudi opazimo, da od 20. min naprej povprečni delež sproščene ZU začne padati. Razmišljali smo, da bi lahko temu bil vzrok vezava ZU na škrob iz testenin. Vendar pa v strokovni literaturi nismo zasledili podatkov o možni reakciji škroba z našo ZU. Eden izmed možnih vplivov je tudi zmanjšana difuzija zaradi prisotnosti hrane.

Kot nadomestilo za uporabo hrane v *in vitro* testiranjih sproščanja smo želeli uporabiti steklene kroglice ($\varnothing=1$ cm) v mediju pH=5. Pri uporabi 60 kroglic vidimo, da je do časovne točke 10 min za 13 % manjši delež sproščene ZU kot v primeru testa s hrano ali SGF-jem, ki oponaša stanje na tešče. Do te točke bi lahko rekli, da teh 60 kroglic dejansko

bolj oponaša vpliv hrane *in vivo*, saj je brez spremembe nastavitve programa profil sproščanja počasnejši. Že od časovne točke 15 min pa tudi ta medij daje podobne rezultate kot medij s hrano in SGF. V primeru uporabe 100 kroglic je profil sproščanja do časovne točke 10 min podoben kot v primeru medija s hrano in SGF, od te časovne točke naprej pa se povprečni delež sproščene ZU zelo poveča in je skoraj za približno 20 % višji od vseh ostalih testiranih medijev. To se verjetno kaže kot velika mehanska obremenitev FO, zaradi velikega števila steklenih kroglic. Četudi s steklenimi kroglicami ne moremo natančno ponazoriti stanja po obroku, že zaradi tega, ker smo uporabili enak program kot za testiranje sproščanja na tešče, ima dodatek 100 kroglic vpliv na sproščanje, s čimer tak test ponuja dodatne možnosti raziskovanja mehanskih vplivov na FO. Profil sproščanja ni zakasnen in upočasnen, kot je dejansko po obroku, saj bi za to morali namesto SGF medija, ki simulira stanje na tešče, za bolj ustrezno primerjavo vpliva steklenih kroglic, izvesti še testiranje v mediju s pH=5 brez dodatkov, vendar pa sam medij s pH=5 brez dodatkov ni *in vivo* relevanten. Ne glede na vse, kot že omenjeno, je vgrajena ZU v testnih formulacijah dobro topna v širokem pH območju, zato sam medij s pH=5 ne bi pokazal bistveno drugačnega profila sproščanja, kot ga pokaže SGF medij.

Želeli smo ugotoviti tudi, ali lahko kot nadomestek hrane pri *in vitro* testiranju sproščanja uporabimo medij s povečano viskoznostjo. Glede na rezultate iz Grafa 12 je razvidno, da povečana viskoznost medija nima enakega vpliva na testno formulacijo kot hrana. Do časovne točke 10 min je povprečni delež sproščene ZU zelo nizek v primerjavi s tistim skupaj s hrano, komaj 14,5 %. To bi lahko bila posledica omejene difuzije ZU iz FO zaradi povečane viskoznosti medija, ki je znašala 150 cP. Vzrok pa bi lahko bila tudi vezava ZU na HMPC, vendar sklepamo, da je za to manjša verjetnost, saj se HPMC uporablja tudi kot pomožna snov v testnih formulacijah in naj bi bila zato inertna. Nekje med časovno točko 20 in 30 min se povprečni delež sproščene ZU celo poveča od tistega skupaj s hrano in je skoraj za 20 % višji. Po pregledu strokovne literature o vplivu viskoznosti želodčnega medija na profil sproščanja, smo odkrili, da povečana viskoznost medija le malo vpliva na praznjenje želodca. Marciani in sodelavci so dokazali, se stopnje praznjenja želodca razlikujejo le za faktor 1,3, tudi če se viskoznost testnih obrokov hrane razlikuje za faktor 1000 (1). Poročali so tudi, da visoko viskozni obrok ni popolnoma razredčen niti po 72. min. Viskoznost je zanimiva lastnost tudi zaradi dejstva, da je obratno sorazmerna z difuznostjo, ki nadalje vpliva na želodčno prebavo hranil ter raztapljanje FO in ZU, kar

potrjuje našo domnevo, zakaj je profil sproščanja do časovne točke 10 min upočasnen. Poleg tega viskoznost in reološke lastnosti himusa vplivajo na želodčno mešanje in pogoje pretoka v stanju po zaužitju obroka, kar posledično vpliva tudi na motiliteto želodca (3). Ne glede na vse, bi morali tudi v tem primeru spremeniti nastavitve programa želodčnega simulatorja ter pretok, amplitudo in periodo kontrakcij prilagoditi obnašanju želodca v stanju po obroku.

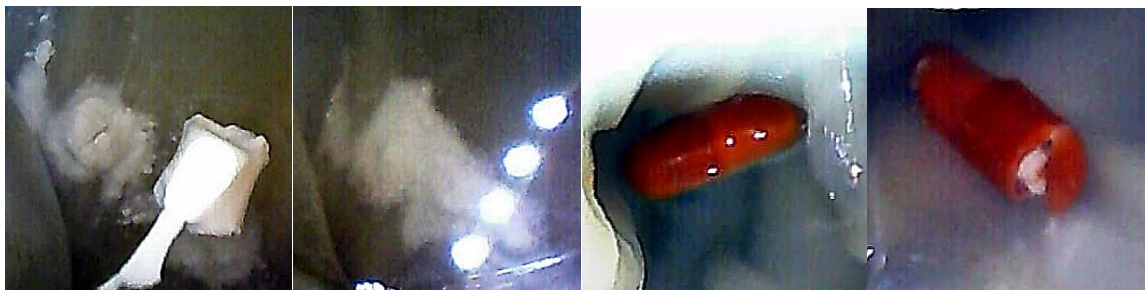


Graf 12: Vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske obremenitve na profil sproščanja ene izmed testnih formulacij (vzorec E).

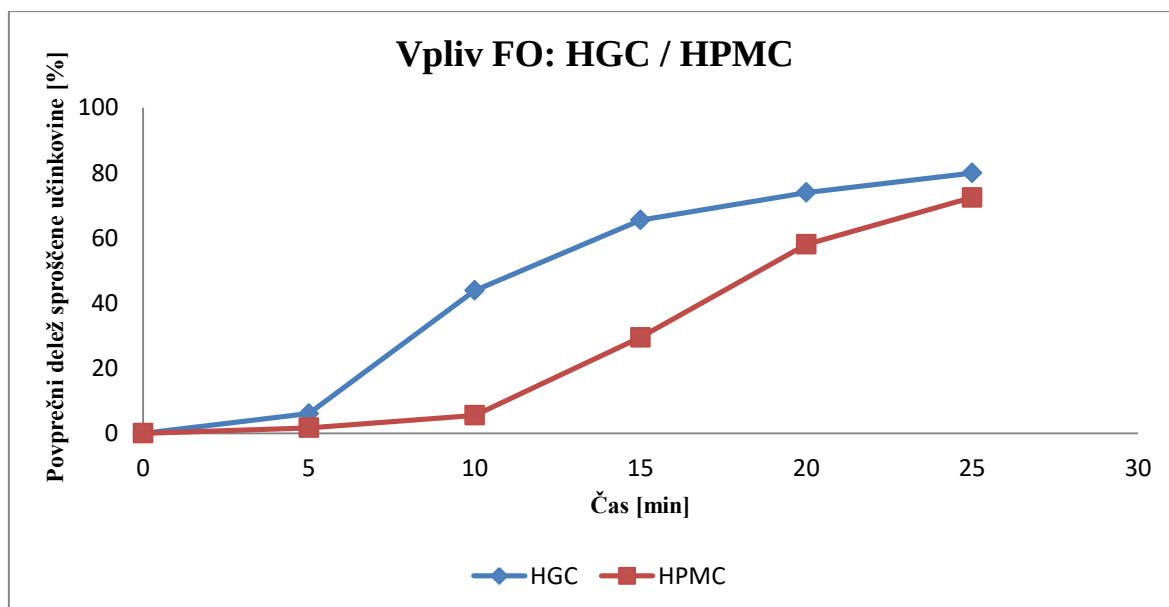
Za konec pa smo primerjali tudi vpliv viskoznosti medija brez in z dodatkom 1 % HPMC na povprečni delež sproščene ZU. Na Grafu 12 lahko vidimo primerjavo obeh medijev z eno izmed testnih formulacij. Profil sproščanja testne formulacije v mediju brez dodatka HPMC-ja je drugačen v primerjavi z medijem z dodatkom 1 % HPMC-ja. Največja razlika je v časovni točki 10 min, kjer je razlika v deležu sproščene ZU skoraj 30 %. Od časovne točke 10 min naprej se profil sproščanja v mediju z dodatkom 1 % HPMC-ja začne približevati profilu sproščanja v mediju brez dodatka HPMC-ja, v časovni točki 25 min pa se skoraj popolnoma ujameta. Tukaj lahko vidimo, da povečana viskoznost medija v začetnih časovnih točkah močno upočasni profil sproščanja, kar je posledica omejene difuzije ZU iz FO. 25 min po začetku testa pa sta deleža sproščene ZU skoraj enaka in vpliv razlike v viskoznosti medijev ni več opazen.

5.3.5 Vpliv farmacevtske oblike

S primerjavo na Grafu 13 smo želeli ugotoviti vpliv tipa kapsule na profil sproščanja. Načeloma so bile vse naše testne formulacije vgrajene v trde želatinske kapsule (v nadaljevanju HGC kapsule). Za primerjavo smo eno izmed testnih formulacij vgradili v HPMC kapsulo. Med samo izvedbo preskusov smo s kamero opazovali razpadanje obeh FO. HGC kapsule so ponavadi razpadle nekje med 3. in 5. min, medtem ko so HPMC kapsule za razpad potrebovale več časa in so razpadle nekje do 10. min. Tudi v strokovni literaturi navajajo, da se začetni razpad ovojnice pri HGC kapsulah zgodi v 1,5 - 3 min, pri HPMC kapsulah pa v 4,5 min (35). HGC formulacije razpadejo približno dvakrat hitreje kot HPMC formulacije (33).



Slika 15: Razlike med razpadanjem HGC in HPMC kapsul. Levo je prikazan razpad HGC kapsule v 4. in 8. minuti, desno je prikazan razpad HPMC kapsule v 4. in 8. minuti.



Graf 13: Vpliv FO (HGC / HPMC) na profil sproščanja testnih formulacij (vzorec E in F).

Pri HGC kapsulah ovojnica enakomerno razpade in se začne raztapljati, medtem ko se sproščanje vsebine iz HPMC kapsul zgodi na prelomih najšibkejših točk ovojnice brez popolnega razpadanja ovojnice (33). HGC kapsule tako hitro razpadejo in se raztopijo ter v 30 min dosežejo preko 85 % sproščene ZU v različnih medijih od pH 1,2 – 6,8; medtem ko HPMC kapsule izkazujejo zakasnjeno sproščanje, je pa njihovo raztapljanje prav tako neodvisno od pH-ja medija (33). Vseeno pa sta Donauer in Löbenberg predlagala, da acetatni pufer ni ustrezen za testiranje *in vitro* raztapljanja HPMC kapsul, ker lahko prisotnost ionov ovira hitro raztapljanje ovojnice ter priporočata, da se kot medij uporablja demineralizirana voda (33). Eden izmed drugih strokovnih virov pa pravi, da je raztapljanje HPMC kapsule odvisno od pH-ja in ionske moči medija (41). Čeprav HGC kapsule izkazujejo hitrejši čas raztapljanja v prvih 10 - 30. min v primerjavi s HPMC kapsulami, ta razlika nima znatnega vpliva na BU vgrajene ZU (35). Glede na podatke iz strokovnih virov smo z uporabo naprave za posnemanje želodčnega gibanja in s pridobljenima profiloma sproščanja uspeli pokazati razliko v razpadnosti različnega tipa kapsul.

6. SKLEP

Z napravo za posnemanje želodčnega gibanja smo na testnih formulacijah s takojšnjim sproščanjem preskušali vplive različnih pogojev na kinetiko sproščanja. Uporabili smo različne formulacije trdih kapsul. Z eksperimenti smo želeli pokazati odzivnost *in vitro* modela s ciljem doseganja razlik, za katere smatramo, da se v podobni meri izrazijo tudi *in vivo*. Spremembe, ki smo jih uporabili za ovrednotenje, so vključevale sestavo medija (pH, dodatek hrane, steklenih kroglic, encima, povečanje viskoznosti medija) in silikonske vreče.

Pokazali smo, da je odziv naprave zelo odvisen od vrste uporabljene vreče. Čeprav so vse tri preskušene silikonske vreče skoraj identične sestave, velikosti in oblike, izkazujejo različne profile sproščanja, kar je posledica razlik v lastnostih vreče. To pomeni, da je treba nameniti izboru in stanju vreče veliko pozornosti pri zagotavljanju kontroliranih pogojev delovanja modela v prihodnjem raziskovalnem delu. Pokazali smo tudi, da so določene vreče bolj diskriminatorne od drugih pri primerjavi sproščanja različnih testnih formulacij. V sklopu optimizacije silikonske vreče smo analizirali tudi sproščanje testnih formulacij z različno sestavo in količino pomožnih snovi. Zaključimo lahko, da naprava smiselno razporedi vzorce z različnimi lastnostmi glede na hitrost sproščanja. Rezultate sproščanja na napravi za posnemanje želodčnega gibanja smo primerjali tudi z rezultati sproščanja pridobljenimi z USP II napravo, kjer smo opazili podobno razporejene profile sproščanja, razen dveh vzorcev, ki sta zamenjala vrstni red. Ker (še) nimamo *in vivo* profilov, na tem mestu težko zaključimo, katera naprava je dala bolj *in vivo* relevantne rezultate.

Uspeli pa smo dokazati, da se z izborom medijev da z novim modelom značilno vplivati na potek sproščanja, kjer smo z novo napravo dobili smiselno razporeditev profilov sproščanja glede na pH medija. Pokazali smo tudi, da ni prišlo do pojava »crosslinking-a« trdih želatinskih kapsul, saj dodatek encima pepsina ni vplival na profil sproščanja. Sicer pa je bil glavni namen testiranja z encimi ta, da smo dokazali, da naprava za posnemanje želodčnega gibanja že brez dodatka encimov v medij dobro razgradi kapsulo.

Pri testiranju vpliva dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve višje mehanske sile nismo uspeli pridobiti pričakovanih rezultatov. Ob dodatku hrane v silikonsko vrečo skupaj z medijem in FO ni prišlo do zakasnjene profila sproščanja, kot

je to splošno znano, če zdravilo vzamemo skupaj s hrano. Za bolj ustrezne rezultate, ki bi dejansko oponašali stanje po obroku *in vivo*, bi morali spremeniti nastavitve programa želodčnega simulatorja. Morali bi povečati amplitudo kontrakcij, saj so v stanju po obroku le-te močnejše ter spremeniti periodo kontrakcij, saj se spremeni tudi trajanje in razdalja širjenja peristaltičnega vala. Prav tako bi morali zakasniti in upočasniti pretok, saj se pilorus ne odpre, dokler hrana skupaj z zdravilom ne razpade na dovolj majhne delce in tako se lahko hrana skupaj z zdravilom v želodcu zadržuje tudi do nekaj ur. Pokazali smo, da z uporabo steklenih kroglic kot nadomestilo za uporabo hrane ne moremo natančno ponazoriti stanja po obroku, že zaradi tega, ker smo uporabili enak program kot za testiranje sproščanja na tešče. Ima pa dodatek 100 kroglic vpliv na sproščanje, s čimer tak test ponuja dodatne možnosti raziskovanja mehanskih vplivov na FO. Prav tako smo pokazali, da povečana viskoznost medija nima enakega vpliva na testno formulacijo kot hrana, kar je bilo mogoče zaslediti tudi v strokovni literaturi, ki navaja, da povečana viskoznost medija le malo vpliva na praznjenje želodca. Vsekakor pa povečana viskoznost medija zakasni profil sproščanja v primerjavi z medijem z nižjo viskoznostjo, kar je posledica omejene difuzije ZU iz FO. Zaključimo lahko, da je z našo napravo možno raziskovati vpliv dodatkov na kinetiko sproščanja z namenom ponazoritve mehanske obremenitve FO, ki kaže na zelo dobro izhodišče za nadaljnje raziskave v tej smeri. S prilagoditvijo programa (amplituda in perioda kontrakcij) bi se lahko v prihodnosti približali *in vivo* rezultatom vpliva hrane, povečane viskoznosti medija ali kakršne koli druge mehanske obremenitve na FO v želodcu.

Na koncu pa smo uspeli pokazati, da z uporabo naprave za posnemanje želodčnega gibanja lahko prikažemo razliko v razpadnosti različnega tipa kapsul. Potrdili smo, da trde želatinske kapsule razpadejo enkrat hitreje kot HPMC kapsule ter, da ovojnica trdih želatinskih kapsul razpade enakomerno, medtem ko se sproščanje vsebine iz HPMC kapsul zgodi na prelomih najšibkejših točk ovojnice brez popolnega razpada ovojnice. Poleg tega pa smo potrdili, da imajo trde želatinske kapsule hitrejši profil sproščanja v začetnih časovnih točkah v primerjavi s HPMC kapsulami, ki kažejo zakasnen profil sproščanja.

7. VIRI

1. F. Kong, R.P. Singh. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *J Food Sci.* 2008; 73 (5): 67-80.
2. Schulze K. Imaging and modelling of digestion in the stomach and the duodenum. *Neurogastroenterol Motil.* 2006; 18(3): 172–183.
3. Koziolk M, Garbacz G, Neumann M, Weitschies W. Simulating the postprandial stomach: Physiological considerations for dissolution and release testing. *Mol. Pharmaceutics.* 2013; 10: 1610-1622.
4. Ferrua MJ, Singh RP. Modeling the fluid dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. *J Food Sci.* 2010;75(7):R151–62.
5. Guyton AC, Hall JE. Propulsion and Mixing of Food in the Alimentary Tract. In: *Textbook of Medical Physiology.* 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p. 781–90.
6. Mudie DM, Amidon GL, Amidon GE. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. *Mol Pharm.* 2010; 7(5): 1388–1405.
7. Krese A, Mrhar A, Bogataj M. Vpliv motilitete želodca na prehod farmacevtskih oblik. *Farm. vestn.* 2016; 67: 242-247.
8. Bogataj M, Mrhar A, Kerec Kos M, Trontelj J, Volk T, Pišlar M. Biofarmacija s farmakokinetiko. Učbenik za študente 4. letnika Enovitega magistrskega študija farmacije in študente 1. letnika Magistrskega študija industrijske farmacije. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013; 31-38.
9. Pal A, Indireskumar K, Schwizer W, Abrahamsson B, Fried M, Brasseur JG. Gastric flow and mixing studied using computer simulation. *Proc Biol Sci.* 2004; 271(1557): 2587–2594.
10. Koziolk M, Grimm M, Becker D, Iordanov V, Zou H, Shimizu J, et al. Investigation of pH and Temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the Intellicap(®) System. *J Pharm Sci.* 2014; 104: 2855–2863.

11. Gastrointestinal Motility, Ehrlein HJ, Schemann M [Internet]. [citirano 05. Marec 2017]. Dostopno: humanbiology.wzw.tum.de/motvid01/tutorial.pdf
12. Kostewicza ES, Abrahamsson B, Brewster M, et al. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* 2014; 57: 342-366.
13. Krishna R, Yu L. Biopharmaceutics applications in drug development. New York: Springer; 2008: str. 396.
14. Aoki S, Ando H, Tatsuishi K, Uesugi K, Ozawa H: Determination of the mechanical impact force in the in vitro dissolution test and evaluation of the correlation between in vivo and in vitro release. *Int J Pharm.* 1993; 95(1–3): 67–75.
15. Sako K, Sawada T, Nakashima H, Yokohama S, Sonobe T: Influence of water soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2002; 81(1–2): 165–72.
16. Abrahamsson B, Pal A, Sjöberg M, Carlsson M, Laurell E, Brasseur JG: A Novel in Vitro and Numerical Analysis of Shear-Induced Drug Release from Extended-Release Tablets in the Fed Stomach. *Pharm Res.* 2005; 22(8): 1215–26.
17. Garbacz G, Wedemeyer R-S, Nagel S, Giessmann T, Mönnikes H, Wilson CG, et al.: Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 70(2): 421–8.
18. Klančar U, Markun B, Baumgartner S, Legen I: A Novel Beads-Based Dissolution Method for the In Vitro Evaluation of Extended Release HPMC Matrix Tablets and the Correlation with the In Vivo Data. *AAPS J.* 2012; 15(1): 267–77.
19. Klančar U, Markun B, Legen I: Development of physiologically relevant dissolution methods for evaluation of hydrophilic matrix tablets using new dissolution apparatus. *Farm Vestn.* 2014; 65(Special Issue): 37–9.
20. Bogataj M, Cof G, Mrhar A: Development of a Glass-Bead Device for Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* 2015; 22(3): 18–24.

21. Carino SR, Sperry DC, Hawley M: Relative bioavailability of three different solid forms of PNU-141659 as determined with the artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci.* 2010; 99(9): 3923–30.
22. Vardakou M, Mercuri A, Barker SA, Craig DQM, Faulks RM, Wickham MSJ: Achieving Antral Grinding Forces in Biorelevant In Vitro Models: Comparing the USP Dissolution Apparatus II and the Dynamic Gastric Model with Human In Vivo Data. *AAPS PharmSciTech.* 2011; 12(2): 620–6.
23. Wickham MJS, Faulks RM, Mann J, Mandalari G: The Design, Operation, and Application of a Dynamic Gastric Model. *Dissolution Technol.* 2012; 19(3): 15–22.
24. Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Jos H.J. Huis in't Veld: A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Altern Lab Anim ATLA.* 1995; 23(2): 197–209.
25. Kong, F., & Singh, R. P. (2010). A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *J Food Sci.* 2010; 75(9): E627–35.
26. Guerra A, Denis S, le Goff O, Sicardi V, François O, Yao A-F, et al.: Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113(6): 1325–35.
27. Aulton M. E. *Pharmaceutics. The science of dosage form design.* Churchill Livingstone. Second edition. Chapter 29: 449-460.
28. S. Stegemann. *Hard gelatin capsules today and tomorrow.* Capsugel Bornem. 2nd edition 2002. 1-23.
29. S. Singh, K.V.R. Rao, K. Venugopal, R. Manikandan. Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations. A review of the problem, test methods, and solutions. *Pharmaceutical Technology.* April 2002: 37-58.
30. Hribar M, Bogataj M, Klančar U. The importance of developing the alternative methods for testing the drug dissolution from extended release formulations. *Farm Vestn.* 2016; 67: 235–241.

31. Legen I, Bevc A, Berglez S et al. Apparatus for simulating the function of human stomach and/or human intestine. Patent WO 2015086769 A1, 2015.
32. Diaci J, Kuščer L, Pavlovič U, Jenko M, Finkšt T, Klep D, idr. Umetni želodec, razvoj in realizacija prototipa (interno gradivo) Ljubljana: Fakulteta za strojništvo; 2011.
33. Glube N, Von Moos L, Duchateau G. Capsule shell material impacts the in vitro disintegration and dissolution behavior of a green tea extract. *Results in Pharma Sciences*. 2013; 3: 1-6.
34. Chiwele I, Jones BE, Podczcek F. The shell dissolution of various empty hard capsules. *Chem. Pharm. Bull.* 2000; 48(7): 951-956.
35. Al-Tabakha MM, Arida AI, Fafelelbom KMS, Sadek B, Saeed DA, Jarad RAA & Jawadi J. Influence of capsule shell composition on the performance indicators of hypromellose capsule in comparison to hard gelatin capsules. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015; 41(10): 1726-1737.
36. Shinoda K, Kaneko T. Characteristic properties of lecithin as a surfactant. *J Dispers Sci Technol.* 2007; 9(5-6): 555-559.
37. Menger FM. On the structure of micelles. *Accounts of chemical research.* 1979; 12 (4): 111-117.
38. Ito K, Inoue M, Noda T, Kuwano K, Takeda H, Kasugai T, Sugiura H. Clinical study on gastric secretion with special reference to pepsin secretion. *Gastroenterol Jpn.* 1978; 13(1): 13-20.
39. Marques MRC. Enzymes in the dissolution testing of gelatin capsules. *AAPS PharmSciTech.* 2014; 15(6): 1410-1416.
40. Pennings FH, Kwee LS, Vromans H. Influence of enzymes and surfactants on the disintegration behavior of cross-linked hard gelatin capsules during dissolution. *Drug Dev Ind Pharm.* 2006; 32: 33-37.
41. Stegemann S, Vishwanath S, Kumar R, et. others. Comparative human in-vivo study of an immediate release tablet over-encapsulated by gelatin and hydroxypropyl methyl

cellulose capsules – impact of dissolution rate on bioequivalence. Am Pharmaceut Rev. 2015.

42. Omerzu P. Optimizacija pogojev v novem modelu za sproščanje v želodcu in primerjava rezultatov izbranih oblik z in vivo podatki ter testom z napravo II po ameriški farmakopeji. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2016.