

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



KRISTINA KRZNARIĆ

**VPLIV ZAVIRALCEV PRECIPITACIJE NA TOPNOST
SLABO TOPNE IN DOBRO PERMEABILNE MODELNE
UČINKOVINE**

**INFLUENCE OF PRECIPITATION INHIBITORS ON
SOLUBILITY OF POORLY SOLUBLE AND WELL
PERMEABLE MODEL DRUG**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek d.d., Ljubljana na oddelku *In vitro in vivo* korelacije (IVIVC) pod vodstvom mentorja prof. dr. Albina Kristla, mag. farm in somentorice znan. sod. dr. Katje Berginc, mag.farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Albinu Kristlu, mag. farm in somentorici znan. sod. dr. Katji Berginc, mag.farm za strokovno pomoč, praktične nasvete in usmerjanje.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim sodelavcem na oddelku IVIVC za pomoč pri laboratorijskem delu.

Velika zahvala gre moji družini in fantu Željku za spodbudo in podporo tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Albina Kristla, mag. farm in somentorice znan. sod. dr. Katje Berginc, mag.farm.

Kristina Krznarić

VSEBINA

1.	UVOD	1
1.1.	BIOFARMACEVTSKI KLASIFIKACIJSKI SISTEM	1
1.2.	RAZLIČNI PRISTOPI K IZBOLJŠANJU TOPNOSTI	3
1.2.1.	ZMANJŠANJE VELIKOSTI DELCEV	3
1.2.2.	KRISTALNO INŽENIRSTVO	4
1.2.3.	TRDNE DISPERZIJE	4
1.2.4.	SAMOEMULGIRAJOČI SISTEMI	5
1.2.5.	CIKLODEKSTRINI.....	5
1.3.	SUPERSATURACIJA	6
1.3.1.	NASTANEK PRENASIČENEGA STANJA.....	6
1.3.2.	ZAVIRALCI OBARJANJA	8
1.3.3.	POLIMERNI ZAVIRALCI PRECIPITACIJE	8
1.4.	<i>IN VITRO</i> METODE DOLOČANJA IN VREDNOTENJA PRENASIČENEGA STANJA	10
1.5.	DIALIZA	11
2.	NAMEN DELA	13
3.	MATERIALI IN METODE.....	14
3.1.	APARATURE IN PRIBOR.....	14
3.2.	KEMIKALIJE	14
3.3.	PUFRI IN RAZTOPINE	15
3.4.	DIALIZA	17
3.4.1.	PREVERJANJE TOPNOSTI.....	17
3.4.2.	IZVEDBA DIALIZE.....	18
3.4.3.	PRIPRAVA VORCEV.....	19
3.4.4.	PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO	20
3.5.	TESTI RAZTAPLJANJA.....	21
3.5.1.	VZORČENJE.....	21
3.5.2.	FILTRACIJA VZORCEV.....	22
3.5.3.	REDČENJE VZORCEV	22
3.5.4.	ANALIZA VZORCEV	23
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	24
4.1.	DIALIZA	24

4.1.1.	ENAČBA UMERITVENE KRIVULJE	24
4.1.2.	DOLOČANJE TOPNOSTI.....	25
4.1.3.	DOLOČANJE USTREZNOSTI DIALIZNE MEMBRANE.....	26
4.1.4.	POSKUSI DIALIZE	27
4.2.	TESTI RAZTAPLJANJA.....	31
4.2.1.	TESTI RAZTAPLJANJA V 0,3% NaLS V Na-FOSFATNEM PUFERU S PH 5,7 IN 1,5% NaLS V VODI.....	31
4.2.2.	SPROŠČANJE V INTRALIPIDU	33
4.2.3.	VPLIV SESTAVE ZUNANJE FAZE NA TOPNOST UČINKOVINE.....	34
4.2.4.	VPLIV VELIKOSTI DELCEV POLIMERA NA TOPNOST UČINKOVINE	44
4.2.5.	VPLIV VELIKOSTI DELCEV TRDNE DISPERZIJE NA SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ ZDROBLJENIH TABLET	48
4.2.6.	VPLIV VELIKOSTI DELCEV TRDNE DISPERZIJE NA SPROŠČANJE UČINKOVINE	51
5.	ZAKLJUČEK	54
6.	LITERATURA	55

POVZETEK

Eno izmed večjih težav pri razvoju peroralnih farmacevtskih oblik predstavlja slaba topnost učinkovin. Obstaja veliko tehnoloških pristopov, ki jih uporabljamo za izboljšanje topnosti slabo topnih učinkovin. Eden izmed pristopov je uporaba dostavnih sistemov, ki omogočajo nastanek prenasičenja v gastrointestinalnem traktu. Vzdrževanje kratkotrajnega stanja prenasičenosti na mestu absorpcije naj bi bilo dovolj, da se poveča absorpcija učinkovin, zlasti, če je učinkovina zelo dobro permeabilna. V ta namen uporabljamo pomožne snovi, ki jim rečemo zaviralci precipitacije. V sklopu magistrske naloge smo vrednotili topnost in hitrost raztapljanja slabo topne modelne BCS II učinkovine v obliki trdne disperzije. Uporabili smo dve metodi, metodo ravnotežne dialize ter metodo raztapljanja v manjših volumnih. Osredotočili smo se na vpliv količine in velikosti delcev polimera, ki naj bi deloval kot zaviralec precipitacije, na raztapljanje in topnost učinkovine iz trdne disperzije. Dializa kot metoda za določanje sproščanja preučevane modelne učinkovine ni bila primerna. Koncentracije, ki smo jih določili v akceptorskem mediju, so bile zelo nizke ali učinkovina skozi dializno membrano sploh ni prehajala. V medijih, ki omogočajo *sink* pogoje ne moremo spremljati nastanek prenasičenega stanja in vpliv polimera na sproščanje učinkovine, saj se celotna količina učinkovine lahko raztopi. Kot bolj relevantni so se pokazali mediji, ki omogočajo *non-sink* pogoje, predvsem FaSSiF, kjer smo opazili, da, tako koncentracija kot velikost delcev polimera imata vpliv na topnost modelne učinkovine. Višje količine polimera v vzorcu in uporaba polimera z manjšo velikostjo delcev so omogočile višje koncentracije raztopljene učinkovine oz. počasnejše obarjanje učinkovine. Preverjali smo še vpliv velikosti delcev trdne disperzije na sproščanje modelne učinkovine in ugotovili, da sproščanje učinkovine iz trdnih disperzij ni odvisno samo od velikosti delcev, na sproščanje morda vpliva tudi morfologija.

Ključne besede: topnost, prenasičenje, zaviralci precipitacije, obarjanje, test raztapljanja

ABSTRACT

One of the biggest problems when it comes to developing oral dosage forms are poorly water-soluble drugs. Many technological approaches have been developed to improve the solubility of those drugs. One of the promising concepts is development of supersaturating drug delivery systems. Maintenance of the drug supersaturation on the site of the absorption is considered enough to improve drug absorption for well permeable drugs. Precipitation inhibitors are used for this purpose. The goal of this work was to study the solubility and dissolution rate of poorly soluble BCSII model drug in a form of solid dispersion with equilibrium dialysis and small volume dissolution tests. We wanted to establish how do the amount and particle size of applied polymer influence on solubility and dissolution rate of our model drug. Dialysis was not proved to be a successful method in our case. Concentrations of the model drug in acceptor medium were very low, in some cases model drug did not even pass through dialysis membrane. In medium that allows *sink* conditions, the generation of supersaturation and the influence of polymer on drug dissolution can't be observed, because *sink* conditions allow that all of the drug can be dissolved in the medium. Media that allow *non-sink* conditions have been proved as more relevant, in our case FaSSiF, where we noticed that amount and particle size of used polymer have influenced solubility of our model drug. Higher amounts and smaller particle size of used polymer enabled higher amounts of dissolved drug and slower precipitation. We also studied the influence of particle size of solid dispersions on model drug solubility. We noticed that particle size is not the only parameter influencing the model drug solubility, maybe the morphology of the particles is also important.

Key words: solubility, supersaturation, precipitation inhibitors, precipitation, dissolution test

SEZNAM OKRAJŠAV

BCS – biofarmacevtski klasifikacijski sistem (ang. Biopharmaceutics Classification System)

CMC – kritična micelarna koncentracija

Fab – faktor absorpcije

FaSSGF – simulirani želodčni sok na tešče (ang. fasted state simulated gastric fluid)

FaSSIF – simulirani črevesni sok na tešče (ang. fasted state simulated intestinal fluid)

FeSSIF – simulirani črevesni sok s hrano (ang. fed state simulated intestinal fluid)

GIT – gastrointestinalni trakt

HPMC – hidroksipropil metilceluloza

MHEC – metil hidroksietil celuloza

MWCO – mejna molekulska masa (ang. molecular weight cut-off)

NaLS – natrijev lauril sulfat

PEG – polietilenglikol

PPI – polimerni zaviralci precipitacije (ang. polymeric precipitation inhibitors)

PVDF – polivinildien difluorid

PVP – polivinil pirolidon

SDDS – dostavni sistemi, ki omogočajo nastanek prenasičenja (ang. supersaturating drug delivery systems)

SEDDS – samoemulgirajoči sistemi (ang. self-emulsification drug delivery systems)

SGF – simulirani želodčni sok (ang. simulated gastric fluid)

SIF – simulirani črevesni sok (ang. simulated intestinal fluid)

USP – Ameriška farmakopeja (ang. United States Pharmacopeia)

UZ kopel – ultrazvočna kopel

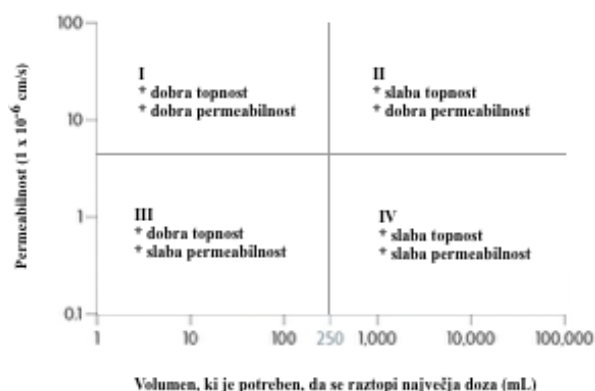
1. UVOD

Peroralna aplikacija zdravil je najbolj pogost in zaželen način doziranja zdravil zaradi enostavnosti in dobre compliance pacientov. Eno izmed večjih težav pri razvoju peroralnih farmacevtskih oblik predstavlja slaba topnost učinkovin (1). Topnost, hitrost raztapljanja in permeabilnost so odgovorni za hitrost in obseg absorpcije učinkovin in s tem za njihovo biološko uporabnost. Ker se število netopnih in slabo topnih učinkovin povečuje (skoraj 70 % novih učinkovin predstavljajo v vodi netopne učinkovine), predstavljajo te učinkovine velik izziv za raziskovalce (2). Predpogoj za absorpcijo učinkovine v gastrointestinalnem traktu, predstavljata procesa raztapljanja in topnosti. Proces raztapljanja učinkovine v poenostavljeni obliki opiše Noyes-Whitney-eva enačba (*enačba 1*), kjer je m masa raztopljene učinkovine, t čas, A površina delca učinkovine, ki je v stiku z medijem, D difuzijski koeficient, C_a koncentracija učinkovine na površini delca, C_b koncentracija raztopljene učinkovine v mediju in h debelina difuznega sloja (3).

$$\frac{dm}{dt} = \frac{AD}{h} (C_a - C_b) \quad \text{Enačba 1}$$

1.1. BIOFARMACEVTSKI KLASIFIKACIJSKI SISTEM

Biofarmaceutski klasifikacijski sistem (ang. Biopharmaceutics Classification System, BCS) predstavlja orodje pri razvoju peroralnih farmacevtskih oblik. Gre za znanstveno klasifikacijo zdravilnih učinkovin na podlagi vodotopnosti in permeabilnosti skozi biološke membrane (2). Predstavlja metodo, s katero lahko identificiramo situacije, ki dopuščajo uporabo *in vitro* testov raztapljanja za dokaz bioekvivalence brez uporabe kliničnih študij. Glede na pravilo BCS sistema učinkovine razvrstimo v štiri razrede (*slika 1*) (4).



Slika 1: Biofarmaceutski klasifikacijski sistem

a) BCS I

Razred I predstavljajo učinkovine, ki so dobro topne in dobro permeabilne. Take učinkovine se zelo dobro absorbirajo ($F_{ab} \geq 85\%$ ali 90%). Hitrost praznjenja želodca je tisti dejavnik, ki določa hitrost absorpcije učinkovin. Če pri *in vitro* testih raztapljanja opazimo, da se v manj kot 30 minutah raztopi vsaj 85 % učinkovine, lahko *in vivo* pričakujemo skoraj 100 % absorpcijo.

b) BCS II

Razred II predstavljajo učinkovine, ki so slabo topne in dobro permeabilne. Hitrost absorpcije pri teh učinkovinah je omejena s hitrostjo raztapljanja. Včasih tudi majhno povečanje hitrosti raztapljanja močno pripomore k izboljšani biološki uporabnosti.

c) BCS III

Razred III predstavljajo učinkovine, ki so dobro topne in slabo permeabilne. Omejujoč faktor za absorpcijo BCS III učinkovin predstavlja slaba permeabilnost. Strategije, ki jih uporabljamo za izboljšanje permeabilnosti, so odvisne od mehanizma transporta učinkovine. Transport iz lumna črevesja v krvni obtok lahko poteka transcelularno s prenašalci, transcelularno s pasivno difuzijo ali paracelularno.

d) BCS IV

Razred IV predstavljajo učinkovine, ki imajo slabo tako topnost kot permeabilnost in s tem na splošno slabo biološko uporabnost. Fiziološki faktorji kot so hitrost praznjenja želodca in čas prehoda skozi črevesje vplivajo na absorpcijo, zlasti pri BCS IV učinkovinah, kjer je hitrost absorpcije omejena zaradi slabe topnosti in zaradi slabe permeabilnosti. Zato pri teh učinkovinah opazimo veliko intersubjektivno in intrasubjektivno variabilnost. Podobni tehnološki pristopi, kot jih uporabljamo pri BCS II učinkovinah, se lahko uporabljajo za izboljšanje topnosti BCS IV učinkovin, čeprav je hitrost absorpcije lahko omejena s slabo permeabilnostjo tudi potem, ko se v gastrointestinalnem traktu učinkovina raztopi.

Za razdelitev učinkovin v pravi razred BCS sistema moramo definirati, kaj točno pomeni dobro topna in dobro permeabilna učinkovina. Velja, da je učinkovina dobro topna, kadar se največja jakost zdravila raztopi v < 250 mL vode v pH območju od 1 do 7,5. Učinkovina

je dobro permeabilna, kadar je obseg absorpcije > 90% na podlagi masne bilance ali v primerjavi z intravensko aplikacijo referenčne jakosti (4, 5).

1.2. RAZLIČNI PRISTOPI K IZBOLJŠANJU TOPNOSTI

Različni pristopi za izboljšanje vodotopnosti slabo topnih učinkovin vključujejo samoemulgirajoče dostavne sisteme, zmanjšanje velikosti delcev, uporabo sotopil, micelarno solubilizacijo, uporabo kompleksov z ciklohekstrini, trdne disperzije, nanosuspenzije in kokristale (slika 2). Odločitev o tem, kateri pristop bo uporabljen, v največji meri zavisi od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine ter načina njene uporabe in načina aplikacije (6).



Slika 2: Različni pristopi za izboljšanje topnosti slabo topnih učinkovin

1.2.1. ZMANJŠANJE VELIKOSTI DELCEV

Zmanjšanje velikosti delcev je eden izmed najstarejših pristopov k izboljšanju biološke uporabnosti, saj se z zmanjšanjem velikosti delcev poveča hitrost raztapljanja slabo topnih učinkovin. Ker se z zmanjšanjem velikosti delcev poveča specifična površina, to izboljša interakcije učinkovine s topilom, kar ima za posledico povečano hitrost raztapljanja (2). Čeprav je zmanjšanje velikosti delcev primarni način za povečanje hitrosti raztapljanja, spremembe v topnosti, debelini difuzijskega sloja in spremembe v obliki delcev lahko še

dodatno vplivajo na hitrost raztapljanja. Z zmanjšanjem velikosti delcev ne vplivamo na ravnotežno topnost učinkovine, saj na ta način ne spreminjamo lastnosti trdnih delcev. Različne tehnologije zmanjšanja velikosti delcev lahko opišemo kot "top-down" tehnologije, kjer manjši delci nastanejo s fragmentacijo večjih, ter "bottom-up" tehnologije, kjer delce manjših velikosti pridobimo z rekristalizacijo učinkovine iz prenasičenih raztopin (7, 8).

1.2.2. KRISTALNO INŽENIRSTVO

Učinkovine lahko obstajajo v obliki različnih polimorfov, kar pomeni, da se razlikujejo po razporeditvi molekul učinkovine v kristalni rešetki. Zaradi različne strukture so intermolekularne sile znotraj različnih polimorfov različne, kar pomeni, da nekateri polimorfi izkazujejo boljšo topnost kot drugi. Z izrazom "**crystal engineering**" opišemo pristope, s katerimi načrtno spreminjamo kristalno strukturo trdnih delcev na način, da ustvarjamo delce z željenimi lastnostmi. Z uporabo kontrolirane kristalizacije pridobivamo delce željenih velikosti in oblik. Na ta način pridobivamo različne polimorfe, amorfe ali kokristale. Ponavadi so učinkovine bolj topne, če se nahajajo v amorfni ali v metastabilni obliki kot če se nahajajo v obliki stabilnega kristala. Hitrost raztapljanja amorfne oblike je lahko nekajkrat večja v primerjavi s stabilnim kristalom in koncentracija raztopljene učinkovine, ki jo lahko dosežemo, je višja od topnosti stabilne oblike učinkovine - nastane t.i. prenasičena raztopina. Uporabo amorfne ali metastabilne oblike otežuje termodinamska nestabilnost takšnih oblik učinkovin, zato je potrebno z dodatnimi pristopi, kot je kombinacija s polimeri in tvorba trdnih disperzij, stabilizirati takšne farmacevtske oblike. Podobno kot pri polimorfih tudi po raztapljanju kokristalov nastane prenasičena raztopina, ki je termodinamsko nestabilna in čez čas pride do rekristalizacije v obliki stabilne kristalne oblike, ki je ponavadi tudi manj topna. Prednost kokristalov je večja stabilnost v trdnem stanju. Potencialno povečanje topnosti, ki ga omogočajo kokristali, je večje od tistega, ki ga omogoča večina polimorfov (8, 9).

1.2.3. TRDNE DISPERZIJE

Za trdne disperzije je značilno, da je učinkovina dispergirana v inertnem nosilcu. Učinkovina se v nosilcu lahko nahaja v različnih oblikah, lahko je popolnoma raztopljena v nosilcu ali suspendirana v kristalni ali amorfni obliki. Nosilec se prav tako lahko nahaja v amorfni ali kristalni obliki. Odvisno od tega, razlikujemo več vrst trdnih disperzij. Kadar imamo kristalno zmes učinkovine v nosilcu govorimo o evtektiku, če je učinkovina v

nosilcu raztopljena in obstaja kot homogena mešanica učinkovine in nosilca (molekularna disperzija) govorimo o trdni raztopini (8). Najpogosteje za namen izboljšanja topnosti uporabljamo amorfnе trdne disperzje. Trdne disperzije omogočajo povečano hitrost raztapljanja učinkovine na več načinov: preko zmanjšanja velikosti delcev, povečane solubilizacije ter preko stabilizacije učinkovine v obliki bolj topne amorfnе oblike. Z uporabo zelo vodotopnih nosilcev je omogočen hiter vstop medija v matriks trdnih disperzij ter izboljšano omočenje. Na začetku so se kot nosilci uporabljali nizkomolekularne, dobro vodotopne molekule, kot so urea, alifatske kratkoverižne karboksilne kisline in sladkorji. Danes so bolj pogosti nosilci polimeri (PVP, PEG, polimetakrilati in HPMC) ter površinsko aktivne snovi, ki omogočajo emulzifikacijo in solubilizacijo učinkovin. Stabilizacija trdnih disperzij lahko poteka preko različnih mehanizmov; zmanjšanje molekulske gibljivosti preko lokalno povečane viskoznosti, ustvarjanje intermolekularnih interakcij med polimerom in učinkovino, ter preko zaviranja nukleacije. Ti procesi omejujejo transformacijo učinkovine iz amorfnе v bolj stabilno kristalno obliko (10-12).

1.2.4. SAMOEMULGIRAJOČI SISTEMI

Samoemulgirajoči sistemi (ang. self-emulsification drug delivery systems, "SEDDS") predstavljajo učinkovit pristop za povečanje biološke uporabnosti slabo topnih učinkovin, posebej, ko imamo opravka z zelo lipofilnimi učinkovinami. To so mešanice olj, površinsko aktivnih snovi, sotopil in solubilizirane učinkovine (13). Ko učinkovina v obliki SEDDS pride v gastrointestinalni trakt in se dispergira, se lahko obori. Pristopi, s katerimi želimo preprečiti obarjanje, bazirajo na povečanju solubilizacije. Tudi če bi omogočili popolno solubilizacijo v gastrointestinalnem traktu pa ne pomeni nujno, da bi s tem tudi izboljšali absorpcijo, saj je prehod učinkovine skozi črevesno membrano možen le za prosto učinkovino, ki se nahaja v ravnotežju s solubiliziranimi molekulami v micelih. Za razliko od standardnih SEDDS, ki poskušajo v celoti solubilizirati učinkovino, obstajajo tudi S-SEDDS (ang. supersaturable self-emulsification drug delivery systems), ki poskušajo ustvariti prenasičeno stanje v gastrointestinalnem traktu ter na tak način povečati absorpcijo učinkovine (14).

1.2.5. CIKLODEKSTRINI

Ciklodekstrini so oligosaharidi, velike molekule, za katere je značilno, da imajo hidrofobno notranjost in hidrofilno zunanost. Hidrofilna površina ciklodekstrinom daje dobro vodotopnost, hidrofobna notranjost pa predstavlja primerno mikrookolje za ustrezno veliko

lipofilno učinkovino. Ciklodekstrini so lahko različnih velikosti, odvisno od tega iz koliko monomernih enot so sestavljeni. Na podlagi tega razlikujemo α (6 monomernih enot), β (7 monomernih enot) in γ (8 monomernih enot) ciklodekstrine. Ciklodekstrine zelo pogosto uporabljamo v razvoju farmacevtskih oblik, saj povečujejo topnost, biološko uporabnost in stabilnost učinkovin, maskirajo barvo in vonj ter preprečijo gastrointestinalno in očesno iritacijo. Navidezno topnost slabo topnih učinkovin povečujejo tako, da tvorijo inkluzijske komplekse. Obstajajo različni načini priprave kompleksov učinkovina-ciklodekstrin, vsaka metoda pa lahko rezultira z nastankom različnega kompleksa (razlike v velikosti delcev, količini nastalega kompleksa ali stopnji amorfizacije končnega kompleksa). To pomeni, da je izbira metode ključnega pomena, kadar načrtujemo komplekse med učinkovino in ciklodekstrinom (2, 5, 9).

1.3. SUPERSATURACIJA

Z novimi spoznanji je vzdrževanje kratkotrajnega stanja prenasičenosti na mestu absorpcije lahko dovolj, da se poveča absorpcija učinkovin, zlasti, če je le-ta zelo dobro permeabilna (15).

Znotrajčrevesna koncentracija učinkovine ni nujno omejena z njeno topnostjo v gastrointestinalnem soku. Učinkovine se lahko nahajajo v raztopini v koncentracijah, ki so nad njihovo topnostjo, v t.i. stanju supersaturacije ali prenasičenja. Stopnjo prenasičenja (S) lahko opišemo kot razmerje med izmerjeno koncentracijo (C) in ravnotežno topnostno koncentracijo (C_s) učinkovine, v enakem mediju. Kadar je $S=1$ imamo nasičeno raztopino. Pri $S < 1$ govorimo o nenasičenih, pri $S > 1$ pa o prenasičenih raztopinah.

$$S = \frac{C}{C_s}$$

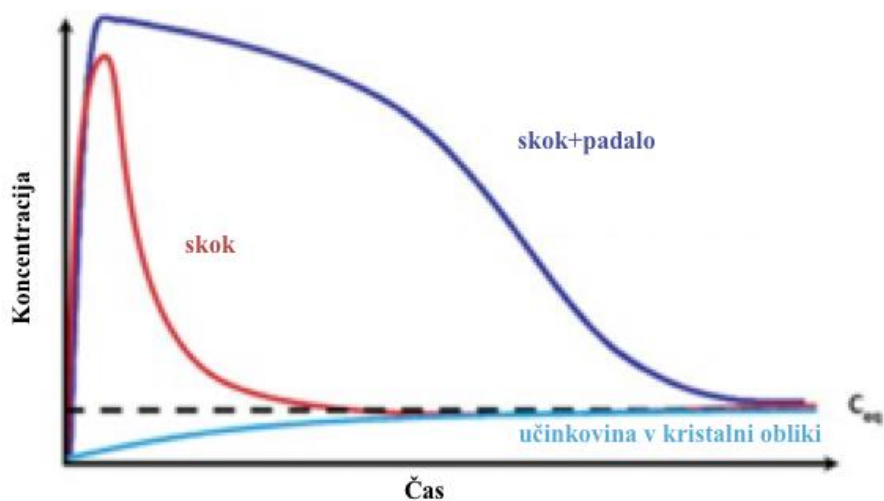
Nastanek prenasičenega stanja lahko pozitivno vpliva na povečanje biološke uporabnosti učinkovin, ki imajo slabo biološko uporabnost zaradi njihove slabe vodotopnosti. Učinkovina se v stanju prenasičenja nahaja v termodinamsko nestabilnem stanju in ima tendenco, da se vrne v ravnotežno stanje, tako da se obori (14).

1.3.1. NASTANEK PRENASIČENEGA STANJA

Prenasičeno stanje v GIT nastane zaradi hitre spremembe v topnostnih parametrih. Prenasičeno stanje lahko ustvarimo naravno pri prehodu šibkih baz iz želodčnega medija v tanko črevo z nevtralnimi okoljem ali induciramo z uporabo različnih formulacij, ki jim rečemo SDDS (supersaturating drug delivery systems) (16). Učinkovine, ki so kemijsko

šibke baze, so v kislem mediju ionizirane in zato veliko bolj topne kot v bolj bazičnem mediju tankega črevesja. Po prehodu v tanko črevo, se tvori prenasičeno stanje, ki mu lahko sledi obarjanje (15).

Če želimo, da nastanek prenasičenega stanja omogoči boljšo absorpcijo učinkovine, moramo poskrbeti, da prenasičeno stanje v gastrointestinalnem okolju nastane ter da učinkovina v prenasičenem stanju ostane dovolj časa, da lahko vpliva na absorpcijo (17). Obstaja več različnih formulacij, ki omogočajo nastanek prenasičenega stanja v črevesju. Ene že dostavimo v obliki raztopin (npr. sistemi s sotopili, formulacije z lipidi), drugi so trdni dostavni sistemi z visoko energijo, ki omogočajo hitro raztapljanje učinkovine in višjo navidezno topnost (npr. amorfne farmacevtske oblike, kristalinične soli, kokristali). Za nastanek termodinamsko nestabilnega stanja potrebujemo učinkovino v višji energijski obliki kot je kristalinični prah, najpogosteje amorfno obliko učinkovine. Začetnemu delu, ko po raztapljanju ali dispergiranju nastane prenasičeno stanje v črevesju rečemo **skok** (ang. spring). Učinkovina mora v obliki prenasičenega stanja ostati dovolj časa za izboljšanje biološke uporabnosti, kar lahko dosežemo z začasnim zaviranjem obarjanja z uporabo pomožnih snovi, ki preprečijo nukleacijo ali rast kristalov in jim pravimo zaviralci precipitacije. Temu delu, v katerem vzdržujemo stanje prenasičenja pravimo **padalo** (ang. parachute) (14, 18). Koncept generiranja in vzdrževanja prenasičenega stanja imenujemo "skok in padalo" (ang. spring and parachute) (slika 3). Tak sistem poskuša zagotoviti nastanek dovolj stabilne prenasičene raztopine v črevesju, da omogoči ustrezno absorpcijo, njegova uspešnost pa je odvisna od hitrosti obarjanja učinkovine iz prenasičene raztopine (19).



Slika 3: Koncept "skok in padalo"

1.3.2. ZAVIRALCI PRECIPITACIJE

V prenasičenih raztopinah koncentracija učinkovine preseže ravnotežno topnost. Višje koncentracije raztopljenih učinkovine v črevesju vodijo do povečane absorpcije, vendar se pri večjih koncentracijah učinkovina nahaja v termodinamsko nestabilnem stanju in ima tendenco do obarjanja preden se absorbira. Stopnja prenasičenja je vodilna sila za obarjanje, večje kot je prenasičenje, hitrejšo bo obarjanje. Pri oblikovanju formulacij, ki omogočajo nastanek prenasičenega stanja, je pomembno, da učinkovino vzdržujemo v prenasičenem stanju in vivo preden se učinkovina absorbira, tako, da preprečimo obarjanje. Za ta namen uporabljamo pomožne snovi, ki jim pravimo **zaviralci precipitacije**. Kot zaviralce precipitacije lahko uporabimo različne polimere, površinsko aktivne snovi, ciklodekstrine, sotpila itd. Najpogosteje kot zaviralce precipitacije uporabljamo polimere; celulozne derivate in vinilne polimere. Izbor polimera zavisi od učinkovine. Ponekod so za doseganje optimalnih učinkov zaviralcev precipitacije uporabljene mešanice polimerov (npr. mešanica PVP/HPMC se pokazala kot uspešna kombinacija pri zaviranju obarjanja karbamazepina ter pri povečanju stabilnosti nanosuspenzije, preko zaviranja rasti kristalov). Površinsko aktivne snovi omogočajo solubilizacijo učinkovine ter s tem zmanjšujejo raven prenasičenja. Površinsko aktivne snovi kot zaviralci precipitacije delujejo, kadar se nahajajo v koncentracijah blizu ali nad kritično micelarno koncentracijo (CMC), čeprav so nekatere površinsko aktivne snovi delovale kot zaviralci precipitacije celo pri koncentracijah pod njihovo CMC. Ciklodekstrini so zelo dobri solubilizatorji in se pogosto uporabljajo za izboljšanje biološke uporabnosti. S hidrofobni učinkovinami ustvarjajo komplekse in na ta način izboljšajo njihovo topnost in zmanjšajo stopnjo prenasičenja. Poleg tega, da povečajo topnost, tudi stabilizirajo prenasičene raztopine preko zaviranja nukleacije in oviranja rasti kristalov. Zaviranje obarjanja lahko dosežemo kinetično ali termodinamsko. Z uporabo površinsko aktivnih snovi, ciklodekstrinov ali sotpil večinoma dosežemo termodinamsko zaviranje, kar pomeni da povečamo topnost učinkovine in s tem zmanjšamo stopnjo prenasičenja. Pri kinetičnem zaviranju preprečujemo ali upočasnjujemo obarjanje učinkovine iz prenasičene raztopine. Tako vrsto zaviranja omogočajo polimeri (20).

1.3.3. POLIMERNI ZAVIRALCI PRECIPITACIJE

Najbolj pogosto kot zaviralce precipitacije uporabljamo polimerne zaviralce precipitacije (ang. polymeric precipitation inhibitors, PPIs). Razlog za njihovo učinkovitost kot zaviralci

precipitacije so interakcije med učinkovino in polimerom, ki delujejo tako, da se vmešajo v nukleacijo in rast kristalov preko interakcij z učinkovino ali s spreminjanjem lastnosti medija (20).

Vodikove vezi med molekulami učinkovine in polimera povečajo nukleacijsko aktivacijsko energijo in tako povzročijo zakasnitev nukleacije. Na splošno velja, da se vodikove vezi tvorijo med snovmi, ki imajo donorje in akceptorje vodikovih vezi v svoji strukturi. To pomeni, da se bodo vodikove vezi tvorile med učinkovino, ki ima veliko donorjev vodikovih vezi s polimerom, ki ima veliko akceptorjev vodikovih vezi, in obratno, med učinkovino, ki ima veliko akceptorjev vodikovih vezi s polimerom, ki ima veliko donorjev vodikovih vezi, ter na ta način omogočajo zaviranje obarjanja.

Poleg zaviranja nukleacije igra pomembno vlogo tudi povečana **hidrofobnost** pomožnih snovi. To je pokazala primerjava dveh serij hidroksipropil metil celuloze (HPMC), kjer se je kot bolj učinkovita pokazala HPMC, ki je vsebovala več metilnih skupin in je bila bolj hidrofobna. HPMC, metil hidroksietil celuloza (MHEC) in polivinil piroolidon (PVP) so polimeri, ki so uspešno zavirali rast kristalov na način, da so okoli novonastalih kristalov ustvarili zaščitni sloj. S povečanjem hidrofobnosti pomožnih snovi se velikost delcev kristalčkov zmanjšala, medtem ko hidrofilni polimeri niso zavirali rasti kristalov. Višja hidrofobnost polimera poveča adsorpcijo polimera na površino kristala, kar poveča zaviranje obarjanja. Vendar pa najbolj hidrofobni polimeri niso nujno najboljši in ne dajejo najboljših učinkov. V raziskavi, kjer so proučevali vpliv različno hidrofobnih polimerov na zaviranje rasti kristalov ritonavira, so se zmerno hidrofobni celulozni polimeri izkazali kot bolj učinkoviti od hidrofilnih ali zelo hidrofobnih polimerov. Hidrofilni polimeri bolj interagirajo z molekulami topila, zelo hidrofobni pa interagirajo z drugimi monomeri in tvorijo skupke. V obeh primerih pride do manjše adsorpcije na površino kristala in zmanjšanega zaviranja obarjanja.

Poleg hidrofobnosti polimerov je pomembna tudi **giblјivost verig** polimera. Rigidne strukture se lažje adsorbirajo na površino kristalov, fleksibilne pa raje tvorijo zanke, kar pomeni manjši kontakt s površino kristala.

Na adsorpcijo polimerov na površino kristala vpliva tudi **molekulska masa polimera** in **sterično oviranje**. Polimeri z višjo molekulske maso so učinkovitejši pri vzdrževanju prenasičenega stanja. Razlog naj bi bil v tem, da imajo polimeri z višjo molekulske maso

več funkcionalnih skupin, ki lahko interagirajo s površino kristala. Polimer z najvišjo molekulsko maso pa ni nujno najučinkovitejši, saj sterično oviranje omejuje dostop polimeru do površine kristala.

V določenih primerih imajo polimeri tudi vpliv na ravnotežno topnost. Kadar polimer poveča topnost učinkovine, se stopnja prenasičenja zmanjša, lahko tudi pod mejo nasičenja. V tem primeru bo obarjanje inhibirano, vendar s spremembo v termodinamiki sistema (spremenjena bo ravnotežna topnost) in ne s spremembo v hitrosti obarjanja. Eno izmed prvih študij, kjer so proučevali vpliv polimerov na obarjanje učinkovine, so izvedli Yamashita in sodelavci z uporabo slabo topne učinkovine takrolimus. Izdelali so trdne disperzije z uporabo treh različnih polimerov, PEG 6000, PVP in HPMC. Po raztapljanju trdnih disperzij so koncentracije v primerjavi z ravnotežno topnostjo bile tudi 25krat večje. Razlika med samimi polimeri je bila vidna še po 24 urah, ko je koncentracija takrolimusa padla s ~50 µg/mL na 6 µg/mL pri uporabi PEG 6000, na 30 µg/mL pri uporabi PVP, pri HPMC pa je bila skoraj nespremenjena. HPMC se je v tem primeru pokazala kot najbolj učinkovita, saj je preprečila obarjanje učinkovine in vzdrževala prenasičeno stanje (15).

1.4. IN VITRO METODE DOLOČANJA IN VREDNOTENJA PRENASIČENEGA STANJA

Poznamo različne *in vitro* pristope za vrednotenje prenasičenja, obarjanja in inhibicije obarjanja. Med seboj se razlikujejo v načinu induciranja prenasičenega stanja, metodah, s katerimi merimo nastalo prenasičeno stanje ali obarjanje in po eksperimentalnih pogojih. Najpogostejša metoda, ki jo uporabljamo za karakterizacijo takih farmacevtskih oblik, je test raztapljanja (21).

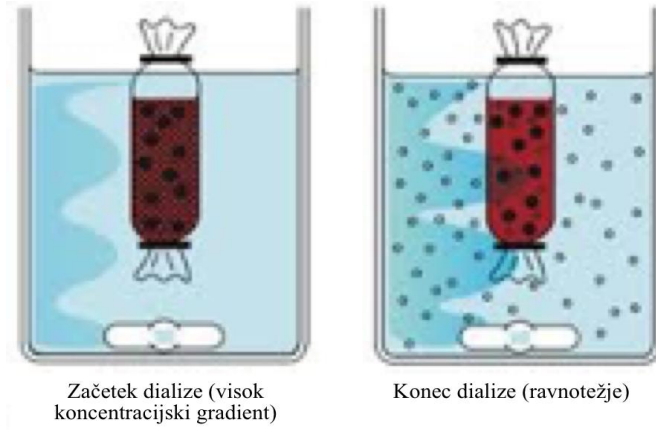
Teste raztapljanja ponavadi izvajamo v *sink* pogojih. Po Evropski farmakopeji so *sink* pogoji zagotovljeni takrat, ko je volumen medija za raztapljanje vsaj 3-10x večji od volumna nasičenja (22). Pri raztapljanju učinkovine in vivo najpogosteje ne dosegamo *sink* pogojev, posebej ko imamo opravka s slabo topnimi učinkovinami. Tako volumen kot tudi sestava uporabljenega medija imata pomemben vpliv na rezultate testov raztapljanja in so lahko kritičnega pomena, če želimo s testi raztapljanja napovedati, kako se bo učinkovina obnašala v gastrointestinalnem traktu (GIT) (23). *Sink* medij je neprimeren za proučevanje zaviranja obarjanja. Če želimo ovrednotiti supersaturacijo in spremljati tendenco učinkovine v prenasičenem stanju do obarjanja, moramo uporabiti *non-sink* pogoje. To so potrdili tudi številni poskusi, v katerih so *in vitro* testi raztapljanja v *non-sink* pogojih

boljše napovedali dejansko in vivo obnašanje učinkovine kot rezultati pridobljeni pri *sink* pogojih (3).

Enostavne vodne pufrne raztopine, ki jih ponavadi uporabljamo pri testih raztapljanja niso primeren medij za raztapljanje, če želimo napovedati obnašanje farmacevtske oblike v GIT. Ti mediji posnemajo samo pH vzdolž prebavil, ne pa tudi sestavo tekočine v GIT (npr. ionsko moč, površinsko aktivne snovi,...). Namesto njih uporabljamo biorelevantne medije, ki se bolj približajo pogojem v gastrointestinalnem traktu, kot so SGF (simulirani želodčni sok, ang. simulated gastric fluid), SIF (simulirani črevesni sok, ang. simulated intestinal fluid), FaSSGF (simulirani želodčni sok na tešče, ang. fasted state simulated gastric fluid) FaSSIF (simulirani črevesni sok na tešče, ang. fasted state simulated intestinal fluid), FeSSIF (simulirani črevesni sok s hrano, ang. fed state simulated intestinal fluid) (23, 25).

1.5. DIALIZA

Dializa je enostavna vendar učinkovita metoda za ločevanje dveh komponent, za proučevanje interakcij med molekulami in pri študijah vezave učinkovin na proteine. Pri dializi imamo dva med seboj ločena prostora z dializno membrano. Na eni strani membrane, ki ji rečemo tudi donorska stran, imamo znano koncentracijo učinkovine in medija. Na drugi strani, znani tudi kot akceptorska stran, imamo dializat, katerega po končani dializi uporabimo za analize (25). Na akceptorski strani je ponavadi volumen uporabljenega puфра dovolj velik, da omogoča *sink* pogoje in tako prepreči difuzijo učinkovine iz akceptorske strani nazaj v donorsko. Kadar imamo v akceptorskem in donorskem delu enak medij in je učinkovina v donorskem delu popolnoma raztopljena, dosegamo *sink* pogoje takrat, ko koncentracija učinkovine v akceptorskem delu ne presega 10% koncentracije učinkovine v donorskem delu (26). Membrana je polprepustna, kar pomeni, da je prepustna samo za določene velikosti molekul, ostale pa zadrži na eni strani membrane. Katere snovi bodo prehajale skozi in katere bo membrana zadržala, je odvisno od velikosti molekul ter od velikosti por izbrane membrane. Prehod skozi membrano poteka na osnovi koncentracijskega gradienta iz dela, kjer je koncentracija višja, v del, kjer je koncentracija nižja. Izmenjava snovi skozi membrano poteka dokler ni doseženo ravnotežje (*slika 4*) (27, 28).



Slika 4: Dializa. Prehod skozi membrano poteka na osnovi koncentracijskega gradienta iz dela, kjer je koncentracija višja, v del, kjer je koncentracija nižja. Izmenjava snovi skozi membrano poteka dokler ni doseženo ravnotežje.

2. NAMEN DELA

V magistrskem delu bomo vrednotili topnost in hitrost raztapljanja slabo topne modelne BCS II učinkovine. Modelno spojino bomo vrednotili v obliki trdne disperzije z metodo ravnotežne dialize ter metodo raztapljanja v manjših volumnih.

Delo bo osredotočeno na preverjanje vpliva količine in velikosti delcev polimera na raztapljanje in topnost učinkovine iz trdne disperzije. Polimer, ki ga bomo vrednotili, je znan po svoji sposobnosti, da preprečuje obarjanje in vzdržuje prenasičenje slabo topnih spojin. Za analizo vzorcev bomo uporabili spektrofotometrično metodo v primeru določanja sproščanja z dializo in HPLC analizo vzorcev v primeru, ko bomo izvajali teste raztapljanja.

Topnost in hitrost raztapljanja sta parametra, ki vplivata na absorpcijo učinkovine v pogojih *in vivo*. Že majhna sprememba v topnosti in hitrosti raztapljanja lahko močno vpliva na absorpcijo in posledično na biološko uporabnost učinkovine, zato ju je tudi smiselno vrednotiti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. APARATURE IN PRIBOR

Pri našem delu smo uporabljali naslednje aparature in pribor:

- ❖ dializna membrana Spectra/Por[®], Spectrum Laboratories, MWCO: 6-8 kD
- ❖ plastična zapirala, Spectrum Laboratories
- ❖ HPLC, Alliance Waters Corporation, ZDA
- ❖ Magnetno mešalo, IKA, C mag
- ❖ pH meter, Mettler Toledo, Švica
- ❖ Pipete Biohit m200, Sartorius, Nemčija
- ❖ Mikrotitrski čitalec Infinite M1000, Tecan in Infinite F200, Tecan
- ❖ Analitska tehtnica XPE105 Delta Range[®], Mettler Toledo, Švica
- ❖ Membranski filtri, Erweka, 1 µm, 0,2 µm, 0,45 µm
- ❖ Aparatura za raztapljanje, Erweka
- ❖ Brizge, BD EmeraldTM, BD Becton, Dickinson and Company, ZDA, 10 mL
- ❖ Centrifuga, Eppendorf MiniSpin[®], Eppendorf, Nemčija
- ❖ Steklene kroglice, Swarco, 1,55-1,85 mm
- ❖ Viale, Waters, ZDA
- ❖ Steklovina: čaše, bučke, merilni valji
- ❖ Kovinske žličke in spatule

3.2. KEMIKALIJE

Pri našem delu smo uporabljali naslednje kemikalije:

- ❖ acetonitril, CH₃CN, J.T.Baker, ZDA
- ❖ citronska kislina, C₆H₈O₇, Merck, Nemčija
- ❖ klorovodikova kislina, HCl, Titrisol[®], za pripravo raztopine 1 M HCl, Merck, Nemčija
- ❖ natrijev hidroksid, NaOH, Titrisol[®], za pripravo raztopine 1 M NaOH, Merck, Nemčija
- ❖ natrijev klorid, NaCl, Merck, Nemčija
- ❖ kalijev klorid, KCl, Merck, Nemčija
- ❖ natrijev dihidrogen fosfat, NaH₂PO₄, Merck, Nemčija
- ❖ dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, Na₂HPO₄·2H₂O, Merck, Nemčija

- ❖ kalcijev klorid dihidrat, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Nemčija
- ❖ natrijev lavril sulfat, NaLS, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, Merck, Nemčija
- ❖ natrijev tauroholat, $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NNaO}_7\text{S}$
- ❖ lecitin
- ❖ SIF prašek, Biorelevant
- ❖ polimer
- ❖ Intralipid, Sigma-Aldrich, ZDA

Vsi vzorci, ki smo jih uporabili pri našem delu, razen vzorca referenčnih tablet, so bili izdelani v podjetju Lek d.d.

3.3. PUFRI IN RAZTOPINE

4,4 M NaCl

Za pripravo 4,4 M NaCl smo v 0,5 L bučko zatehtali 128,58 g NaCl in do oznake dopolnili s prečiščeno vodo. Raztopino smo dobro premešali.

Na-fosfatni pufer pH 5,7

Za pripravo Na-fosfatnega pufru pH 5,7 smo natehtali 11 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ in ga raztopili v 1 L prečiščene vode. Pufru smo dodali toliko 1 M HCl, da smo dobili pH vrednost 5,7.

Fosfatni pufer pH 7,2

Za pripravo fosfatnega pufru pH 7,2 smo si pomagali s tabelo za pripravo McIlvain pufru pH 7,2, katerega pripravimo z mešanjem dveh raztopin. Za pripravo 1 L pufru smo zmešali 869,5 mL 0,2 M Na_2HPO_4 in 130,5 mL 0,1 M citronske kisline. Po pripravi pufru smo s pH-metrom preverili ustreznost pH.

Priprava medijev za dializo:

40 mM NaLS v vodi:

Za pripravo 40 mM NaLS v vodi smo natehtali 5,78 g NaLS in ga raztopili v 500 mL prečiščene vode.

40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2:

Za pripravo 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2 smo natehtali 5,78 g NaLS in ga raztopili v 500 mL fosfatnega pufra pH 7,2.

Priprava medijev za teste raztapljanja:

0,1 M HCl

Za pripravo 0,1 M HCl smo dali v 5,0 L bučo, ki je do polovice že napolnjena s prečiščeno vodo, 500 mL 1 M HCl in do oznake dopolnili s prečiščeno vodo ter raztopino dobro premešali.

0,3% NaLS v vodi

Za pripravo 0,3% NaLS v vodi smo natehtali 15 g NaLS. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo zatehto prenesli v 5,0 L prečiščene vode in raztopili.

0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7

Za pripravo 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7 smo natehtali 3 g NaLS. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo zatehto prenesli v 1,0 L Na-fosfatnega pufra pH 5,7 in raztopili.

1,5 % NaLS v vodi

Za pripravo 1,5 % NaLS v vodi smo natehtali 15 g NaLS. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo zatehto prenesli v 1,0 L prečiščene vode in raztopili.

FaSSiF pH 6,5

Za pripravo FaSSiF-a pH 6,5 smo natehtali 30,93 g NaCl in 17,19 g NaH₂PO₄ in ju raztopili v 5,0 L prečiščene vode. Med mešanjem smo umerili pH raztopine na vrednost pH=6,5 z raztopino 1M NaOH. V tako pripravljene raztopine smo raztopili 11,2 g SIF praška.

Karbonatni FaSSiF pH 6,5

Za pripravo karbonatnega FaSSiF-a pH 6,5 smo natehtali 20,0 g NaCl, 5,1 g KCl in 0,42 g CaCl₂ x 2H₂O in jih raztopili v 5,0 L 0,001M HCl. V pripravljene raztopine smo raztopili 8,25 g natrijevega tauroholata in 10 g lecitina. pH pripravljene raztopine smo uravnali z nasičeno raztopino NaHCO₃ v posodi, tik pred začetkom poskusa.

Za pripravo karbonatnega FaSSiFa smo pripravili še nasičeno raztopino NaHCO_3 . V čašo smo prenesli 1 žlico NaHCO_3 in dodali 100 mL prečiščene vode. Na magnetnem mešalu smo pustili mešati raztopino 30 minut. Pred začetkom poskusa v karbonatnem FaSSiF-u smo z brizgo odvzeli del nasičene raztopine NaHCO_3 in jo prefiltrirali skozi 0,45 μm filter. Želeli smo, da je pH karbonatnega FaSSiF-a v posodi med poskusom 6,5. Ker nismo mogli meriti pH medija v posodi, smo pred začetkom poskusa določili volumen nasičene raztopine NaHCO_3 , ki ga moramo dodati, da dosežemo vrednost pH 6,5. Tako smo tik pred začetkom poskusa, preden smo v medij dodali vzorec, v vsako posodo, ki je že vsebovala segret medij, dodali 15 mL 4,4 M NaCl in 570 μL nasičene raztopine NaHCO_3 .

3.4.DIALIZA

3.4.1. PREVERJANJE TOPNOSTI

Prva metoda, s katero smo določali sproščanje učinkovine je dializa. Najprej smo določali topnost proučevane učinkovine v izbranih pufrih.

PRIPRAVA VZORCA

Topnost proučevane učinkovine smo preverili v dveh medijih, 40 mM NaLS v vodi in 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2. Vzorce smo pripravili tako, da smo zatehtali natančno približno 50 mg učinkovine in zatehte kvantitativno prenesli v 25 mL bučke. V eni bučki smo učinkovino raztopili in do oznake dopolnili s 40 mM NaLS v vodi, v drugi bučki smo uporabili 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2. Pripravljene raztopine smo 30 min stresali v UZ kopeli in jih nato čez noč pustili mešati na magnetnem mešalu. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 30 minut pri 13400 rpm. Po centrifugiranju smo supernatant redčili z enakim medijem v katerem so bili vzorci raztopljeni. Redčenje vzorcev za posamezen medij je prikazano v preglednici I.

Preglednica I: Redčenje vzorcev v 40 mM NaLS v vodi in 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2.

Medij	$V_{\text{supernatanta}}$	V_{medija}	$F_{\text{redčenja}}$
40 mM NaLS v vodi	25 μL	975 μL	40
40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2	50 μL	950 μL	20

PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO

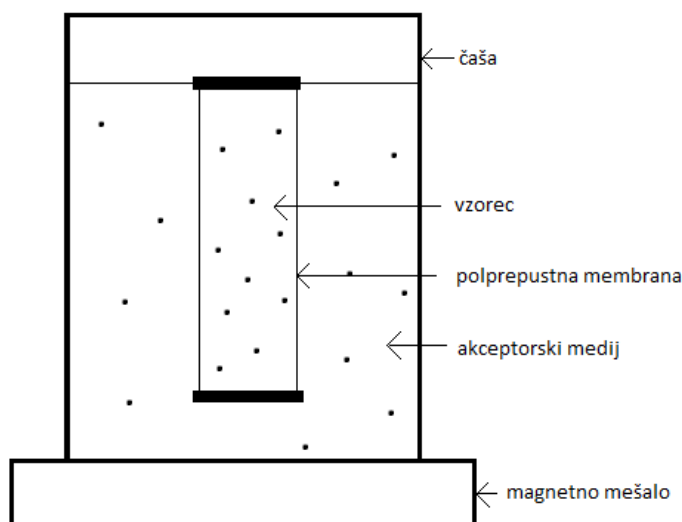
Za preverjanje topnosti smo pripravili tudi umeritveno krivuljo za vsak medij posebej. Za pripravo osnovne raztopine standarda smo zatehtali natančno približno 10 mg učinkovine in jo raztopili v 25 mL medija. Raztopine za umeritvene krivulje smo pripravili z redčenjem osnovnih raztopin 2x, 4x, 8x, 16x, 32x, 64x, 128x, 256x. Kot medij za redčenje smo uporabili enak medij kot smo ga uporabili za pripravo posamezne osnovne raztopine.

Umeritvene krivulje smo pripravili v dveh medijih. Prvi medij je 40 mM NaLS v vodi, drugi medij je 40 mM NaLS v fosfatnem pufri pH 7,2.

Pripravljene raztopine standardov in vzorcev smo prenesli na mikrotitrsko ploščo ter izmerili absorbance pri valovni dolžini 262 nm na mikrotitrskem čitalcu.

3.4.2. IZVEDBA DIALIZE

Poskus dialize smo postavili kot je prikazano na *sliki 5*.



Slika 5: Shema poskusa dialize.

Kot dializno membrano smo uporabili Spectra/Por membrano z MWCO 6-8 kD v obliki dializne vrečke. Membrano smo pred vsako uporabo namakali v vodi za 30 minut. Spodnji del dializne vrečke smo zaprli s posebnim tesnilom, ki je hkrati magnetno in nam omogoča, da se dializna vrečka vrti v dializnem mediju. V notranjost dializne vrečke smo dali vzorec ter membrano zaprli s podobnim tesnilom, le da to ni magnetno. Na magnetno

mešalo smo postavili 0,5 L čašo ter v njo dali predhodno segret dializni medij. V vseh poskusih smo kot dializni medij uporabili 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2 segret na 37 °C. V čašo z medijem smo postavili dializno membrano tako, da je zapiralo, ki je služilo hkrati kot magnetno mešalo, bilo na dnu. Na magnetnem mešalu smo poleg vrtenja vklopili še gretje, tako da smo lahko temperaturo dializnega medija vzdrževali na 37±0,5 °C, kar smo tudi preverjali s termometrom. V določenih časovnih intervalih smo jemali vzorce s pipeto. V vsaki časovni točki smo vzorčili 3x po 200 µL dializnega medija in ga prenesli na mikrotitrsko ploščo. Po končanem poskusu smo vzorcem izmerili absorbance na mikrotitrskem čitalcu pri valovni dolžini 262 nm.

Nekateri parametri so se od poskusa do poskusa razlikovali in so za posamezen poskus prikazani v *preglednici II*.

Preglednica II: Volumen akceptorskega medija, hitrost vrtenja dializne membrane in časovne točke pri posameznem poskusu.

	V _{akceptorskega medija}	Hitrost vrtenja	Časovne točke (min)
Poskus 1	400 mL	100 rpm	15, 30, 45, 60, 90, 120, 150
Poskus 2	450 mL	250 rpm	30, 60, 90, 120, 150, 180, 240
Poskus 3	450 mL	250 rpm	30, 60, 90, 120, 150, 180, 240
Poskus 4	300 mL	100 rpm	30, 60, 90, 120, 150, 180, 240

3.4.3. PRIPRAVA VORCEV

Dializo smo uporabili pri 4 poskusih. Pri vsakem poskusu smo paralelno testirali dva vzorca.

Poskus 1

V dializno vrečko smo prenesli 25 mL 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2. V eno dializno vrečko smo dali eno tableto, ki vsebuje 100 mg modelne učinkovine (vzorec A). Za drugi vzorec smo natehtali natančno približno 100 mg učinkovine in zatehto kvantitativno prenesli v dializno vrečko (vzorec B).

Poskus 2

Pri drugem poskusu smo vzorce pripravili v bučkah in jih potem prenesli v dializne vrečke. Za prvi vzorec smo natehtali natančno približno 10 mg učinkovine in zatehto kvantitativno prenesli v 25 mL bučko ter do oznake dopolnili s fosfatnim pufrom pH 7,2 (vzorec C). Za

drugi vzorec smo zatehtali natančno približno 10 mg učinkovine in 3 mg polimera. Zatehte smo kvantitativno prenesli v 25 mL bučke in do oznake dopolnili s fosfatnim pufrom pH 7,2 (vzorec D). V posamezne dializne vrečke smo nato prenesli 17 mL pripravljenih raztopin.

Poskus 3

Za pripravo prvega vzorca smo zatehtali natančno približno 10 mg učinkovine in jo kvantitativno prenesli v dializno vrečko ter dodali 17 mL fosfatnega pufru pH 7,2 (vzorec E). Za pripravo drugega vzorca smo najprej pripravili raztopino polimera. Zatehtali smo natančno približno 66 mg polimera, zatehto kvantitativno prenesli v 50 mL bučko, raztopili in dopolnili do oznake s fosfatnim pufrom pH 7,2. Po tem smo zatehtali natančno približno 10 mg učinkovine in jo kvantitativno prenesli v dializno vrečko ter dodali 17 mL pripravljene raztopine polimera (vzorec F).

Poskus 4

Prvi vzorec smo pripravili tako, da smo zatehtali natančno približno 27 mg trdne disperzije preiskovane učinkovine v polimeru in vzorec kvantitativno prenesli v dializno vrečko. V dializno vrečko smo dodali eno merico steklenih kroglic velikosti 1,55-1,85 mm (namen uporabe teh kroglic je pojasnjen na strani 28, poglavje 4.1.4.) in 17 mL fosfatnega pufru pH 7,2 (vzorec G). Za pripravo drugega vzorca smo najprej pripravili raztopino polimera. Zatehtali smo natančno približno 3 mg polimera, zatehto kvantitativno prenesli v 25 mL bučko, raztopili in dopolnili do oznake s fosfatnim pufrom pH 7,2. Po tem smo zatehtali natančno približno 27 mg trdne disperzije preiskovane učinkovine v polimeru in vzorec kvantitativno prenesli v dializno vrečko. V dializno vrečko smo dodali eno merico steklenih kroglic velikosti 1,55-1,85 mm in 17 mL pripravljene raztopine polimera (vzorec H).

3.4.4. PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO

Za vsak poskus dialize smo pripravili tudi umeritveno krivuljo. Za pripravo osnovne raztopine smo natehtali natančno približno 5 mg učinkovine, zatehto prenesli v 25 mL bučko in dopolnili do oznake ter raztopili s 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2. Iz osnovne raztopine smo pripravili raztopine za umeritveno krivuljo tako, da smo osnovno raztopino redčili 2x, 4x, 5x, 10x, 16x, 20x, 32x, 40x in 50x. Osnovno raztopino smo redčili s 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2.

3.5. TESTI RAZTAPLJANJA

Vse *in vitro* teste raztapljanja smo izvedli na istem aparatu za raztapljanje. Uporabljali smo aparat z veslastim mešalom (USP apparatus 2, ang. Paddle method).

Pred začetkom poskusa smo z merilnim valjem odmerili 250 mL pripravljenega medija za raztapljanje in ga prenesli v posode za raztapljanje. Ko smo kot medij za raztapljanje uporabili Intralipid je volumen medija bil 100 mL. Kot medij za raztapljanje smo v testih raztapljanja uporabili 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufri pH 5,7, 1,5% NaLS v vodi, Intralipid, 0,1 M HCl, 0,3% NaLS v vodi, FaSSiF in karbonatni FaSSiF. Ko smo uporabljali medije, ki vsebujejo NaLS ter pri uporabi FaSSiFa in karbonatnega FaSSiFa, smo bili pazljivi pri prelivanju, ker se medij rahlo peni. Medij smo v posodah pustili toliko časa, da je temperatura v posodah dosegla $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, kar je trajalo približno 30 minut. Temperaturo smo preverjali s termometrom. Ko je bila temperatura v posodah ustrezna, smo v vsako posodo dali vzorec in takoj začeli s poskusom. Vzorec smo natehtali tik pred začetkom poskusa. Pri poskusih, ki smo jih izvajali v 0,1 M HCl, 0,3% NaLS v vodi, FaSSiF-u in karbonatnem FaSSiF-u, je vzorec bil v obliki trdne disperzije in masa vzorca je bila 160 mg. V primeru, ko smo kot medij za raztapljanje uporabili 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufri s pH 5,7, 1,5% NaLS v vodi in Intralipid, je vzorec bil v obliki tablete. Pred začetkom poskusa smo tablete tudi stehali in je masa tablet bila približno 600 mg. Nastavili smo tudi hitrost vrtenja mešal na 100 ali 150 obratov na minuto. Vzorce smo v posode dajali s 5-sekundnim zamikom, da smo jih lažje vzorčili. Vsak vzorec smo testirali v dveh paralelkah. Trajanje poskusa je bilo odvisno od uporabljenega medija. Poskus smo v 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufri pH 5,7 in 1,5% NaLS v vodi izvajali tri ure, v Intralipidu dve uri in v 0,1 M HCl, 0,3% NaLS v vodi, FaSSiF-u in karbonatnem FaSSiF-u eno uro.

3.5.1. VZORČENJE

Vzorce smo v določenih časovnih točkah vzorčili ročno z brizgo na katero smo nastavili kanulo. Vzorčili smo z mesta, ki se nahaja na sredini med zgornjim delom veslastega mešala in površino medija v posodi. Vsakič smo vzorčili po 10 mL in po vzorčenju nismo vračali svežega medija v posodo. Pri testih raztapljanja, kjer smo kot medij za raztapljanje uporabili 0,1 M HCl, 0,3% NaLS v vodi, FaSSiF in karbonatni FaSSiF, smo vzorčili v treh časovnih točkah (5, 15, 60 min), pri testih, kjer smo kot medij za raztapljanje uporabili 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufri pH 5,7 in 1,5% NaLS v vodi smo vzorčili v devetih

časovnih točkah (5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min). Pri testu, kjer smo kot medij za raztapljanje uporabili Intralipid smo vzorčili v šestih časovnih točkah (5, 10, 30, 60, 90, 120 min).

3.5.2. FILTRACIJA VZORCEV

Po vzorčenju smo odvzeti vzorec filtrirali. Že pri samem vzorčenju smo na konec kanule nastavili 1 μm filter in tako preprečili, da bi povzorčili večje delce. Potem, ko smo odvzeli vzorec, smo ga dodatno prefiltrirali skozi PVDF filter. Filtracija vzorcev je v našem primeru bila pomemben korak. S filtracijo smo ločili neraztopljeni in raztopljeni del učinkovine in preprečili, da bi se neraztopljen del učinkovine naknadno raztopil v viali po redčenju. Na ta način smo ohranili zanesljive podatke o koncentraciji učinkovine v posodi. Kadar smo kot medij uporabili Intralipid, smo uporabili PVDF filter z velikostjo por 0,45 μm , pri vseh ostalih poskusih smo uporabili 0,2 μm PVDF filter. Skozi filter smo spustili in zavrgli ~ 7 mL vzorca, preostali filtrat smo redčili in uporabili za določanje koncentracije raztopljene učinkovine.

3.5.3. REDČENJE VZORCEV

Vzorce smo takoj po filtraciji redčili, da preprečimo morebitno obarjanje učinkovine zaradi majhne topnosti. Redčili smo z mobilno fazo v različnih razmerjih, odvisno od tega v katerem mediju smo izvajali test raztapljanja. Redčenje vzorcev v posameznih medijih je prikazano v preglednici III.

Preglednica III: Redčenje vzorcev pri testih raztapljanja v različnih medijih.

Medij	V _{vzorca}	V _{mobilne faze}	Faktor redčenja
0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7	150 μL	1350 μL	10x
1,5% NaLS v vodi	150 μL	1350 μL	10x
FaSSiF	500 μL	1000 μL	3x
Karbonatni FaSSiF	500 μL	1000 μL	3x
0,3% NaLS v vodi	250 μL	1000 μL	5x
0,1 M HCl	750 μL	750 μL	2x

Pri vzorcih v Intralipidu smo vzorce najprej redčili z acetonitrilom (500 μ L vzorca + 500 μ L acetonitrila). Redčene vzorce smo centrifugirali 30 minut pri 13400 rpm. Po centrifugiranju smo odpipetirali 100 μ L supernatanta ter ga redčili s 1150 μ L mobilne faze.

3.5.4. ANALIZA VZORCEV

Vzorce, ki smo jih dobili pri testih raztapljanja, smo po filtriranju in ustreznem redčenju analizirali s HPLC sistemom.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. DIALIZA

4.1.1. ENAČBA UMERITVENE KRIVULJE

Pri poskusih dialize smo pripravili umeritvene krivulje. Raztopinam znanih koncentracij smo pomerili absorbance pri 262 nm na mikrotitrskem čitalcu. Pri vsakem poskusu smo pomerili absorbanco slepe raztopine in smo to vrednost upoštevali ter odšteli od izmerjenih absorbanc standardnih raztopin. V preglednicah IV in V so prikazane izmerjene absorbance za standardne raztopine znanih koncentracij, kjer smo že upoštevali absorbanco slepe raztopine.

Preglednica IV: Absorbance standardnih raztopin za umeritvene krivulje pri določanju topnosti v 40 mM NaLS v vodi in 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2. Pri absorbancah je že upoštevana vrednost slepe raztopine.

40 mM NaLS v vodi		40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2	
C (mg/mL)	absorbanca	C (mg/mL)	absorbanca
0,00157	-0,0839	0,001567	0,09143
0,00314	0,22477	0,003134	0,2631
0,006281	0,12775	0,006268	0,25834
0,012561	0,25801	0,012535	0,21557
0,025123	0,44952	0,02507	0,46567
0,050245	0,80063	0,05014	1,19059
0,10049	1,75533	0,10028	2,19689
0,20098	3,46733	0,20056	3,53869

Preglednica V: Absorbance raztopin za umeritvene krivulje pri poskusih 2, 3 in 4. Pri absorbancah je že upoštevana vrednost slepe raztopine.

Poskus 2		Poskus 3		Poskus 4	
C (mg/mL)	absorbanca	C (mg/mL)	absorbanca	C (mg/mL)	absorbanca
0,1004	1,926855	0,1056	2,110017	0,1	1,983567
0,0502	1,040955	0,0528	1,081017	0,05	1,031867
0,04016	0,829255	0,04224	0,903517	0,04	0,854177
0,02008	0,439555	0,02112	0,458067	0,02	0,432017
0,01255	0,226995	0,0132	0,238507	0,0125	0,292017
0,01004	0,285275	0,01056	0,299877	0,01	0,228957
0,006275	0,151835	0,0066	0,155017	0,00625	0,152717
0,00502	0,123595	0,00528	0,129917	0,005	0,129087
0,004016	0,112505	0,004224	0,111157	0,004	0,106457

Na podlagi izmerjenih absorbanca smo s pomočjo linearne regresije v programu Excell določili enačbe umeritvenih krivulj (*preglednica VI*). Pri določanju enačbe umeritvenih premic smo upoštevali nizke absorbance, ki smo jih izmerili pri vzorcih, in smo upoštevali samo točke, ki so se nahajale v koncentracijskem območju, v katerem smo pričakovali, da se bodo nahajale koncentracije vzorcev.

Preglednica VI: Enačbe umeritvenih krivulj.

Določanje topnosti v 40 mM NaLS v vodi	$A=17,069c + 0,0119$	$R^2=0,995$
Določanje topnosti v 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2	$A=22,828c - 0,0559$	$R^2=0,9939$
Poskus 2	$A=29,877c - 0,021$	$R^2=0,9756$
Poskus 3	$A=30,626c - 0,0302$	$R^2=0,9784$
Poskus 4	$A=21,458c - 0,0198$	$R^2=0,9978$

4.1.2. DOLOČANJE TOPNOSTI

Topnost modelne učinkovine smo določali v dveh medijih, 40 mM NaLS v vodi in 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2. S pomočjo umeritvenih krivulj (*preglednica VI*), ki smo jih pripravili za oba medija in izmerjenih absorbanca vzorčnih raztopin smo s pomočjo *enačbe 2* določili koncentracijo učinkovine v obeh medijih.

$$c = \frac{A - l}{k} \times F \quad \text{Enačba 2}$$

c...koncentracija vzorca

A...izmerjena absorbanca

l...odsek na y osi

k...naklon premice

F...faktor redčenja

Večjo topnost modelne učinkovine smo določili v 40 mM NaLS v vodi, kjer se je raztopilo 1,873 mg/mL učinkovine. V 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2 smo določili manjšo topnost učinkovine, raztopilo se je 1,365 mg/mL učinkovine. V nobenem mediju se učinkovina ni raztopila popolnoma. Za nadaljne poskuse smo kot akceptorski medij

uporabili 40 mM NaLS v fosfatnem pufru pH 7,2, zato ker smo v njemu določili slabšo topnost in nas je zanimalo, če jo lahko povečamo z dodatkom polimera k učinkovini in ustvarjanjem prenasičene raztopine.

4.1.3. DOLOČANJE USTREZNOSTI DIALIZNE MEMBRANE

Sproščanje modelne učinkovine poteka iz notranjosti dializne vrečke. Raztopljena učinkovina nato prehaja skozi polprepustno membrano v akceptorski medij, kjer jo vzorčimo. Ker smo preko količine učinkovine v akceptorskem mediju želeli spremljati, kaj se z učinkovino dogaja v donorskem mediju, je zelo pomembno, da učinkovina lahko prehaja skozi dializno membrano v akceptorski medij neomejeno. Če prehod učinkovine skozi dializno membrano ni omejen, potem hitrost naraščanja učinkovine v akceptorskem mediju ponazarja hitrost sproščanja učinkovine iz farmacevtske oblike. V poskusu 1 smo določali ustreznost izbrane dializne membrane. V vseh poskusih dialize smo kot dializno membrano uporabljali Spectra/Por membrano z MWCO 6-8 kD. Velikost por ponazarja MWCO (ang. molecular weight cut-off) vrednost, ki predstavlja najnižjo molekulske maso topljenca, ki jo bo določena membrana zadržala v 90% obsegu in ne bo difundirala skozi membrano. Pri izbiri membrane se priporoča, da izberemo takšno membrano, da ima MWCO vrednost za polovico manjšo od molekulske mase snovi, ki jo želimo z dializno membrano zadržati in vsaj 20x večjo od molekulske mase snovi, za katero želimo, da difundira skozi membrano. Želeli smo preveriti, če je velikost por pri naši membrani omejujoč faktor, ali so pore dovolj velike, da omogočajo neomejeno difuzijo raztopljene učinkovine skozi dializno membrano. Primerjali smo dva vzorca. Vzorec B predstavlja modelno učinkovino v praškasti obliki, v vzorcu A se učinkovina nahaja v obliki tablete. Tableta potrebuje določen čas, da razpade in, da se učinkovina lahko raztopi, tako da pričakujemo v isti časovni točki višje koncentracije pri vzorcu, kjer se učinkovina nahaja v praškasti obliki, skladno s tem tudi višje absorbance. Izmerjene absorbance pri poskusu določanja ustreznosti membrane so prikazane v *preglednici VII*. Iz dobljenih podatkov smo določili še razmerje $A_{\text{vzorecB}}/A_{\text{vzorecA}}$. Sklepali smo, da prehajanje učinkovine skozi dializno membrano ni omejeno z velikostjo por, če je razmerje absorbanc $A_{\text{vzorecB}}/A_{\text{vzorecA}}$ višje od 1.

Preglednica VII: Določanje ustreznosti dializne membrane. Izmerjene absorbance za vzorca A in B in njihovo razmerje. Pri absorbancah je že upoštevana vrednost slepe raztopine.

čas (min)	15	30	45	60	90	120	150
A_{vzorecA}	0,00115	0,00709	0,00647	0,00221	0,01112	0,01725	0,01784
A_{vzorecB}	0,01115	0,023	0,04441	0,01094	0,01823	0,15801	0,0151
$A_{\text{vzorecB}}/A_{\text{vzorecA}}$	9,70	3,24	6,86	4,95	1,64	9,16	0,85

4.1.4. POSKUSI DIALIZE

V preglednicah VIII-X so prikazani rezultati poskusov dialize.

Preglednica VIII: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije v poskusu 2 za vzorca C in D.

čas (min)	vzorec C			vzorec D		
	Absorbanca	Povprečna A- Aslepe	koncentracija	Absorbanca	Povprečna A- Aslepe	Koncentracija
30	0,16554	5,06x10 ⁻²	2,40 x10 ⁻³	0,12382	2,04 x10 ⁻²	1,39 x10 ⁻³
	0,18178			0,13812		
	0,15929			0,15408		
60	0,12585	2,07x10 ⁻²	1,40 x10 ⁻³	0,12223	2,05 x10 ⁻²	1,39 x10 ⁻³
	0,13763			0,1451		
	0,15345			0,14901		
90	0,13715	2,25 x10 ⁻²	1,46 x10 ⁻³	0,12748	1,77 x10 ⁻²	1,30 x10 ⁻³
	0,13258			0,13576		
	0,1526			0,14474		
120	0,11956	2,80 x10 ⁻²	1,64 x10 ⁻³	0,12569	2,02 x10 ⁻²	1,38 x10 ⁻³
	0,1492			0,13575		
	0,16995			0,15402		
150	0,12401	1,69 x10 ⁻²	1,27 x10 ⁻³	0,12445	1,88 x10 ⁻²	1,33 x10 ⁻³
	0,1369			0,14338		
	0,14448			0,14337		
180	0,13423	1,59 x10 ⁻²	1,24 x10 ⁻³	0,13154	1,78 x10 ⁻²	1,30 x10 ⁻³
	0,13107			0,13246		
	0,13726			0,14407		
210	0,12136	1,59 x10 ⁻²	1,24 x10 ⁻³	0,123	1,90 x10 ⁻²	1,34 x10 ⁻³
	0,13151			0,13358		
	0,14943			0,15512		

Preglednica IX: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije v poskusu 3 za vzorca E in F.

čas (min)	vzorec E			vzorec F		
	Absorbanca	Povprečna A- Aslepe	koncentracija	Absorbanca	Povprečna A- Aslepe	Koncentracija
30	0,11386	1,27x10 ⁻²	1,40x10 ⁻³	0,11566	1,16x10 ⁻²	1,36x10 ⁻³
	0,12338			0,12206		
	0,1392			0,13546		
60	0,11481	1,40x10 ⁻²	1,44x10 ⁻³	0,11609	1,31x10 ⁻²	1,41x10 ⁻³
	0,12125			0,12152		
	0,14423			0,1399		
90	0,1131	1,23x10 ⁻²	1,39x10 ⁻³	0,11386	1,22x10 ⁻²	1,38x10 ⁻³
	0,12377			0,12378		
	0,13851			0,13735		
120	0,11082	9,04x10 ⁻³	1,28x10 ⁻³	0,11688	1,18x10 ⁻²	1,37x10 ⁻³
	0,11925			0,1255		
	0,1354			0,13135		
150	0,11267	1,05x10 ⁻²	1,33x10 ⁻³	0,11423	9,40x10 ⁻³	1,29x10 ⁻³
	0,1187			0,1212		
	0,13843			0,13112		
180	0,11088	8,44x10 ⁻³	1,26x10 ⁻³	0,11102	7,07x10 ⁻³	1,22x10 ⁻³
	0,1193			0,12054		
	0,13349			0,12801		
210	0,11261	8,02x10 ⁻³	1,25x10 ⁻³	0,11369	6,95x10 ⁻³	1,21x10 ⁻³
	0,11977			0,12001		
	0,13004			0,12549		

Preglednica X: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije v poskusu 4 za vzorca G in H.

čas (min)	vzorec G			vzorec H		
	Absorbanca	Povprečna A- Aslepe	Koncentracija	Absorbanca	Povprečna A- Aslepe	koncentracija
30	0,11128	1,19x10 ⁻²	-3,69 x10 ⁻⁴	0,11182	1,14x10 ⁻²	-3,92 x10 ⁻⁴
	0,11936			0,11945		
	0,13403			0,13192		
60	0,11502	1,50x10 ⁻²	-2,25 x10 ⁻⁴	0,11154	1,30x10 ⁻²	-3,18 x10 ⁻⁴
	0,11824			0,11837		
	0,14068			0,138		

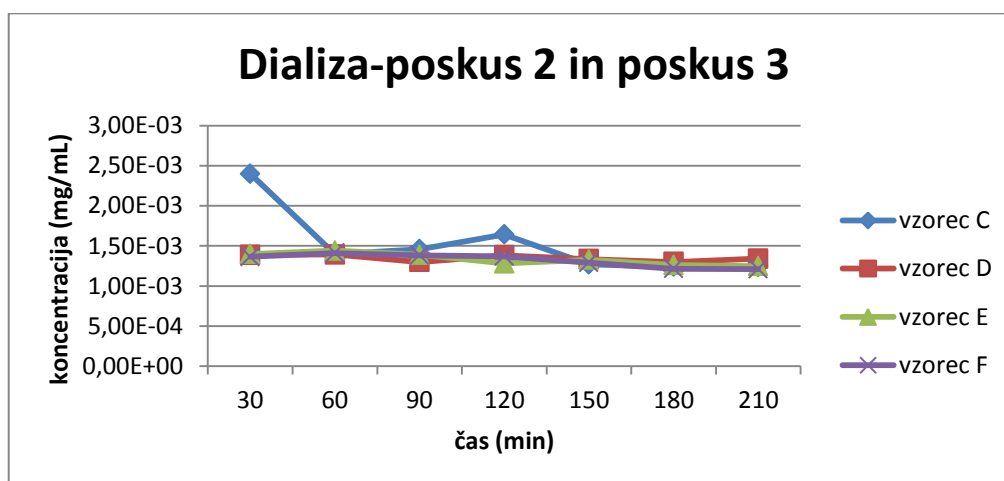
90	0,11333	1,45x10 ⁻²	-2,47 x10 ⁻⁴	0,11133	1,24x10 ⁻²	-3,45 x10 ⁻⁴
	0,1209			0,12093		
	0,1383			0,13397		
120	0,11025	1,19x10 ⁻²	-3,68 x10 ⁻⁴	0,11251	1,10x10 ⁻²	-4,12 x10 ⁻⁴
	0,11785			0,12086		
	0,13661			0,12851		
150	0,1143	1,37x10 ⁻²	-2,86 x10 ⁻⁴	0,11238	1,13x10 ⁻²	-4,00 x10 ⁻⁴
	0,11628			0,11998		
	0,13945			0,13032		
180	0,11338	1,30x10 ⁻²	-3,20 x10 ⁻⁴	0,11057	1,09x10 ⁻²	-4,18 x10 ⁻⁴
	0,12066			0,121		
	0,1338			0,12993		
210	0,12482	1,76x10 ⁻²	-1,02 x10 ⁻⁴	0,14464	2,56x10 ⁻²	2,68 x10 ⁻⁴
	0,12446			0,13404		
	0,13256			0,12698		

Sproščanje modelne učinkovine smo najprej določali z uporabo ravnotežne dialize. Dializa je kot *in vitro* metoda za določanje sproščanja pogosto uporabljena metoda, zlasti pri farmacevtskih oblikah z velikostjo delcev v nano območju. Čeprav v našem primeru nimamo tako majhnih velikosti delcev, smo se za dializo odločili zaradi njene enostavnosti in hitrosti, predvsem pa zato, ker majhni volumni znotraj dializne vrečke omogočajo, da se polimer, ki omogoča zaviranje obarjanja, nahaja v bližini proučevane modelne učinkovine. Z majhnim volumnom medija in z uporabo pufru brez dodanega NaLS smo želeli omogočiti, da znotraj dializne vrečke nastane prenasičeno stanje. V primerjavi z majhnim volumnom donorskega medija, ki je v našem primeru bil 17 mL, je volumen akceptorskega medija veliko večji, 450 mL. Z namenom vzpostavitve *sink* pogojev na akceptorski strani dializne membrane in preprečitve obarjanja učinkovine po prehajanju skozi dializno membrano smo uporabili večji volumen akceptorskega medija. Iz enakega razloga smo v fosfatni pufer, ki smo ga uporabili kot akceptorski medij, dodali površinsko aktivno snov NaLS. Prav tako, večji volumen akceptorskega medija omogoča večji koncentracijski gradient za prehod molekul učinkovine skozi dializno membrano.

Zanimalo nas je, kakšen vpliv ima dodatek polimera na topnost modelne učinkovine. Polimer, ki smo ga uporabili, naj bi zaviral obarjanje učinkovine iz prenasičene raztopine in tako omogočil, da učinkovina v prenasičenem stanju ostane dalj časa. V poskusih dialize smo zato vzporedno testirali dva vzorca, ki sta se razlikovala le po tem, da je bil v enem

vzorcu polimer prisoten, v drugem pa ne. V poskusu 2 vpliv polimera na izboljšanje topnosti učinkovine ni viden. Kot je razvidno iz *slike 6* so koncentracije pri obeh vzorcih v poskusu 2 približno enake v vsaki časovni točki. V 30. in 120. minuti smo opazili povišane koncentracije učinkovine pri vzorcu C, za katere predvidevamo, da so posledica laboratorijske napake.

Za naslednji poskus smo pri vzorcu, ki vsebuje polimer, koncentracijo le-tega povečali. Predvidevali smo, da bodo višje koncentracije polimera omogočile višje koncentracije raztopljene učinkovine znotraj dializne vrečke in bo zaradi večjega koncentracijskega gradienta tudi hitrejše prehajanje učinkovine skozi dializno membrano. S *slike 6* je razvidno, da so tudi v poskusu 3 koncentracije pri obeh vzorcih približno enake. Če primerjamo vzorca D in F, ki smo jih uporabili v poskusih 2 in 3 in se razlikujeta samo po količini polimera, lahko vidimo, da večja koncentracija polimera ni imela vpliva na povečanje koncentracije učinkovine v akceptorskem mediju.



Slika 6: Profili sproščanja učinkovine za vzorce C, D, E in F v poskusih dialize 2 in 3.

Kljub temu, da pri prejšnjih poskusih nismo dobili željenih rezultatov, nas je zanimalo ali bo na topnost in s tem na višje koncentracije učinkovine vplivalo, če se učinkovina nahaja v obliki trdne disperzije, glede na to, da trdna disperzija omogoča večjo topnost učinkovine. Učinkovina se v obliki trdne disperzije nahaja pri vzorcih G in H. Pri prejšnjih poskusih nismo opazili razlike med vzorcem, ki vsebuje polimer in vzorcem, ki ga ne vsebuje. Ker smo želeli povečati diskriminatornost, smo pri poskusu 4 zmanjšali hitrost vrtenja z 250 rpm na 100 rpm. Zmanjšanje hitrosti vrtenja lahko privede do tega, da se vzorec znotraj dializne vrečke ne meša. Da bi to preprečili, smo v dializno vrečko dodali

steklene kroglice. V poskusu 4 učinkovina sploh ni prehajala skozi dializno membrano, kar lahko vidimo iz *preglednice X*, saj so koncentracije pri poskusu 4 negativne. Razlog za to je lahko manjša hitrost vrtenja v primerjavi s prejšnjimi poskusi. Pri 100 rpm se je vzorec znotraj dializne vrečke posedel na dno skupaj s kroglicami, kar kaže na slabo mešanje donorske raztopine.

Pri poskusih dialize nismo dobili željenih rezultatov. Kot je razvidno iz *preglednic VIII-X*, so koncentracije, ki smo jih določili v akceptorskem mediju zelo nizke pri vseh poskusih dialize. Eden izmed možnih razlogov, zakaj so koncentracije tako nizke je, da mešanje vzorca znotraj dializne vrečke ni bilo ustrezno. Možen razlog je tudi vezava učinkovine na samo dializno membrano.

Ker se dializa kot metoda za določanje sproščanja naše modelne učinkovine ni pokazala kot uspešna, smo za določanje sproščanja uporabili teste raztapljanja v manjših volumnih.

4.2. TESTI RAZTAPLJANJA

4.2.1. TESTI RAZTAPLJANJA V 0,3% NaLS V Na-FOSFATNEM PUFRU S PH 5,7 IN 1,5% NaLS V VODI

V *preglednicah XI* in *XII* so zbrani rezultati testov raztapljanja modelne učinkovine iz tablet v 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7 in 1,5% NaLS v vodi.

Preglednica XI: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7 pri 150 rpm iz tablet. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

Čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
	P1	P2	povprečje		
5	9,1	8,3	8,7	0,6	6,5
10	22,8	23,0	22,9	0,1	0,6
20	46,1	45,1	45,6	0,7	1,6
30	58,1	56,7	57,4	1,0	1,7
45	80,5	72,6	76,6	5,6	7,3
60	85,3	83,3	84,3	1,4	1,7
90	98,5	95,3	96,9	2,3	2,3
120	97,4	94,3	95,9	2,2	2,3
180	103,4	100,0	101,7	2,4	2,4

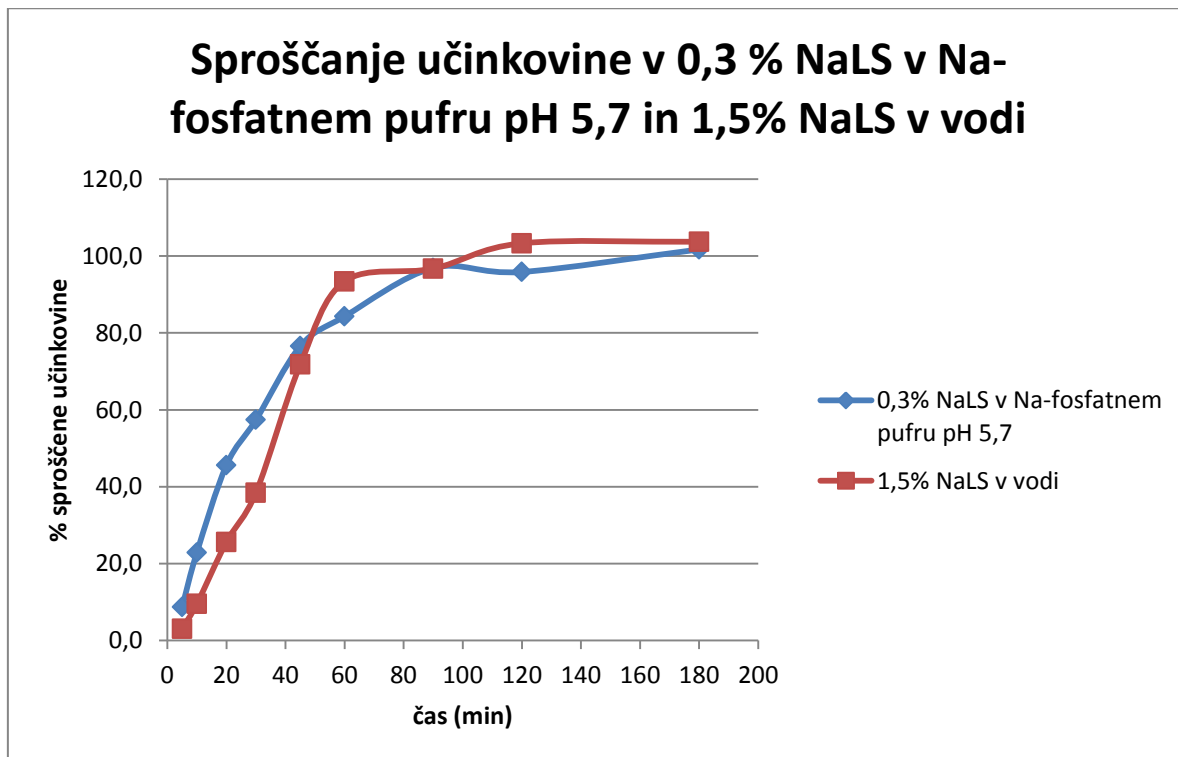
Preglednica XIII: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 1,5% NaLS v vodi pri 150 rpm iz tablet. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

Čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
	P1	P2	povprečje		
5	3,3	2,8	3,1	0,4	11,6
10	9,8	9,3	9,6	0,4	3,7
20	29,1	22,2	25,7	4,9	19,0
30	40,2	36,7	38,5	2,5	6,4
45	73,2	70,4	71,8	2,0	2,8
60	96,8	90,0	93,4	4,8	5,1
90	95,4	98,0	96,7	1,8	1,9
120	102,4	104,2	103,3	1,3	1,2
180	103,5	103,9	103,7	0,3	0,3

Določali smo sproščanje modelne učinkovine iz tablet v 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7 in 1,5% NaLS v vodi. Teste raztapljanja ponavadi izvajamo v *sink* pogojih, kar pomeni, da je volumen uporabljenega medija dovolj velik, da omogoči, da se celotna količina učinkovine sprosti iz farmacevtske oblike in raztopi v mediju ter, da že raztopljena učinkovina v mediju ne vpliva na nadaljnje sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike. Na začetku poskusa je sproščanje učinkovine potekalo hitrejše v 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7. Na *sliki 7* vidimo, da se je že po približno 60 minutah v obeh medijih sprostila celotna količina učinkovine in je v raztopljeni obliki ostala do konca poskusa.

Uporabili smo slabo topno učinkovino, ki jo glede na BCS klasifikacijo uvrstimo v drugi razred. Eden izmed načinov za izboljšanje topnosti slabo topnih učinkovin, ki smo ga uporabili tudi v našem primeru, je uporaba farmacevtske oblike, ki omogoča nastanek prenasičenega stanja v GIT. V medijih, ki omogočajo *sink* pogoje, ne moremo proučevati zmožnost uporabljenе oblike, da tvori prenasičeno stanje, saj volumen medija, ki ga uporabimo, omogoča, da nasičena raztopina ne nastane in, da se lahko raztopi celotna količina učinkovine. S testi raztapljanja smo želeli čim bolj natančno napovedati, kako se bo učinkovina obnašala v pogojih in vivo, zato smo za proučevanje nastanka in vzdrževanja prenasičenega stanja uporabili medije, ki omogočajo *non-sink* pogoje. Prav tako smo uporabili bolj biorelevantne medije od klasičnih pufrov, ki posnemajo samo pH

vzdolž GIT, saj poleg pH na topnost in hitrost raztapljanja učinkovine vpliva tudi sestava medija.



Slika 7: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz tablet v 0,3% NaLS v Na-fosfatnem pufru pH 5,7 in 1,5% NaLS v vodi pri 150 rpm.

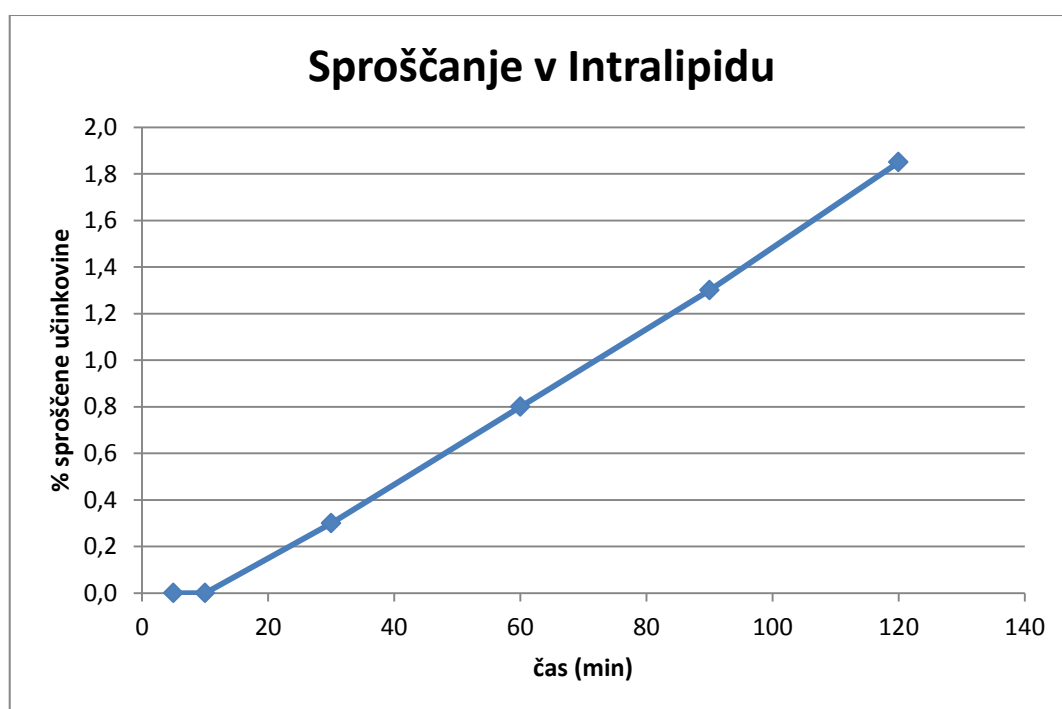
4.2.2. SPROŠČANJE V INTRALIPIDU

V preglednici XIII so prikazani rezultati testa raztapljanja modelne učinkovine iz tablet X v Intralipidu.

Preglednica XIII: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v Intralipidu pri 150 rpm iz tablet. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

Čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
	P1	P2	povprečje		
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0
60	0,8	0,8	0,8	0,0	0,0
90	1,3	1,3	1,3	0,0	0,0
120	1,8	1,9	1,9	0,1	3,8

Kot eden izmed bolj biorelevantnih medijev smo uporabili Intralipid. Intralipid je 20% emulzija olja v vodi, sestavljena iz 20% sojinega olja, 1,2% fosfolipidov iz jajčnih rumenjakov in 2,25% glicerina, ostalo je voda. Zaradi svoje sestave Intralipid simulira pogoje v GIT po obroku. Kot je razvidno s *slike 8*, je sproščanje učinkovine v Intralipidu potekalo počasi. V dveh urah se je iz trdne disperzije sprostilo manj kot 2% učinkovine. Iz tega razloga Intralipid nismo uporabili kot medij za raztapljanje v nadaljnjih poskusih.



Slika 8: Povprečni profil sproščanja učinkovine iz tablet v Intralipidu pri 150 rpm.

4.2.3. VPLIV SESTAVE ZUNANJE FAZE NA TOPNOST UČINKOVINE

V *preglednicah XIV-XVII* so zbrani rezultati testov raztapljanja učinkovine iz trdne disperzije v FaSSiF-u, 0,3% NaLS v vodi, karbonatnem FaSSiF-u, 0,1M HCl pri 100 rpm.

Preglednica XIV: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v FaSSiF-u pri 100 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

Vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
PTD1	5	25,4	26,1	25,75	0,5	2,1
	15	33,4	32,2	32,8	0,9	2,7
	60	35,1	32,6	33,85	1,8	5,2
PTD2	5	29,3	27,6	28,5	1,1	4
	15	35,2	33,6	34,4	1,1	3,3
	60	34,1	33,9	34	0,2	0,5
PTD3	5	26,3	27,8	27	1,1	4
	15	33,2	33,7	33,4	0,3	1
	60	33,8	34	33,9	0,1	0,4
PTD4	5	26,2	25,3	25,7	0,6	2,3
	15	35,2	33,9	34,5	0,9	2,6
	60	29	28,1	28,6	0,7	2,5
PTD5	5	27,3	27,5	27,4	0,1	0,3
	15	34	31,3	32,6	1,9	6
	60	29	28,8	28,9	0,1	0,5
PTD6	5	26,9	28	27,5	0,8	2,8
	15	35,2	34,8	35	0,2	0,7
	60	28,3	28,3	28,3	0	0,1
PTD7	5	31,1	30,3	30,7	0,6	1,9
	15	35,4	34,1	34,7	0,9	2,7
	60	25,4	24,7	25,1	0,5	2,1
PTD8	5	31,4	32,1	31,7	0,5	1,6
	15	35,8	36,2	36	0,2	0,7
	60	24,3	25	24,7	0,5	2
PTD9	5	30,5	30	30,2	0,4	1,2
	15	35,4	34,6	35	0,6	1,8
	60	26	25,8	25,9	0,2	0,8
PTD10	5	30,7	26,6	28,7	2,9	10
	15	35,7	32,9	34,3	2	5,9
	60	20,5	20,1	20,3	0,3	1,5
PTD11	5	30,5	30	30,3	0,3	1,1
	15	34,4	34,3	34,3	0,1	0,3
	60	19,8	20,3	20	0,3	1,5
PTD12	5	27,9	28,7	28,3	0,6	2
	15	33,4	32,7	33,1	0,5	1,6
	60	19,9	19,9	19,9	0	0,2

Preglednica XV: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 0,3% NaLS v vodi pri 100 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
PTD1	5	5,1	5,4	5,3	0,2	3,8
	15	7,4	7,5	7,5	0,1	0,7
	60	12,6	13	12,8	0,3	2,5
PTD2	5	5,1	4,3	4,7	0,6	12,1
	15	7,9	6,5	7,2	1	14,3
	60	14,2	12	13,1	1,6	12
PTD3	5	4,5	5,6	5	0,8	15,1
	15	6,9	8	7,5	0,8	10,8
	60	11,6	17,2	14,4	4	27,4
PTD4	5	1,7	1,3	1,5	0,3	19,4
	15	3,6	2,7	3,2	0,7	21,6
	60	12,5	9,1	10,8	2,4	21,8
PTD5	5	1,7	1,6	1,7	0,1	3,9
	15	3,2	3	3,1	0,1	4,4
	60	11,4	10,4	10,9	0,7	6,4
PTD6	5	1,7	1,2	1,5	0,4	27,5
	15	2,9	2,4	2,7	0,4	13,4
	60	9,2	9	9,1	0,1	1,2
PTD7	5	2,9	1,8	2,4	0,7	31,4
	15	5,2	3,5	4,3	1,2	26,8
	60	13,7	11,2	12,5	1,8	14
PTD8	5	1,9	3,2	2,5	0,9	35,8
	15	4,1	5,4	4,7	0,9	19,7
	60	13,6	13,1	13,4	0,4	2,9
PTD9	5	1,5	1,8	1,7	0,2	11,3
	15	2,6	3,2	2,9	0,4	14,2
	60	9,4	12,2	10,8	1,9	17,7
PTD10	5	3,3	2,7	3	0,5	15,3
	15	5,7	4,7	5,2	0,7	14,3
	60	15,9	13,6	14,8	1,6	11
PTD11	5	3,4	3,2	3,3	0,1	3,9
	15	5,9	5,5	5,7	0,3	4,7
	60	15,6	14,5	15,1	0,7	4,9
PTD12	5	1,8	2,3	2,1	0,3	15
	15	2,9	3,9	3,4	0,7	20,5
	60	10,9	10,2	10,6	0,5	4,9

Preglednica XVI: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v karbonatnem FaSSiF-u pri 100 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

Vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
PTD1	5	1,1	1	1	0	2,7
	15	2,1	2,1	2,1	0	0,3
	60	10,9	11,9	11,4	0,7	6,3
PTD2	5	1,3	1,1	1,2	0,1	9,4
	15	3,2	2,7	3	0,3	10,4
	60	17,3	15	16,1	1,6	10
PTD3	5	1,2	1,3	1,2	0	3
	15	2,9	3,2	3	0,3	8,5
	60	15,6	18,4	17	2	11,7
PTD4	5	1,3	1,2	1,2	0,1	4,9
	15	2,9	2,7	2,8	0,2	7,3
	60	15,9	12,5	14,2	2,4	16,9
PTD5	5	1,2	1,3	1,2	0	2,5
	15	2,9	2,9	2,9	0	1,7
	60	15,4	16,7	16	0,9	5,7
PTD6	5	1,2	1,4	1,3	0,1	9,3
	15	2,8	3,3	3	0,3	10,6
	60	14,4	17,3	15,9	2	12,7
PTD7	5	1,6	1,5	1,5	0	2,5
	15	3,3	3,2	3,3	0,1	3,4
	60	19,7	17,5	18,6	1,6	8,5
PTD8	5	1,6	105	1,6	0	1
	15	3,7	3,7	3,7	0	0,1
	60	21,3	22,1	21,7	0,5	2,5
PTD9	5	1,4	1,4	1,4	0	0,1
	15	3,3	3,4	3,4	0,1	2,7
	60	19,5	23	21,3	2,5	11,7
PTD10	5	1,2	0,9	1,1	0,2	19,7
	15	2,7	2,2	2,5	0,4	16,1
	60	16	13,6	14,8	1,7	11,5
PTD11	5	1,1	1,3	1,2	0,2	14,5
	15	2,6	3,1	2,8	0,4	13
	60	17	19,8	18,4	2	10,6
PTD12	5	1,4	1,3	1,3	0,1	3,8
	15	3,1	2,9	3	0,1	3,6
	60	18,9	20,3	19,6	1	5,1

Preglednica XVII: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 0,1 M HCl pri 100 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

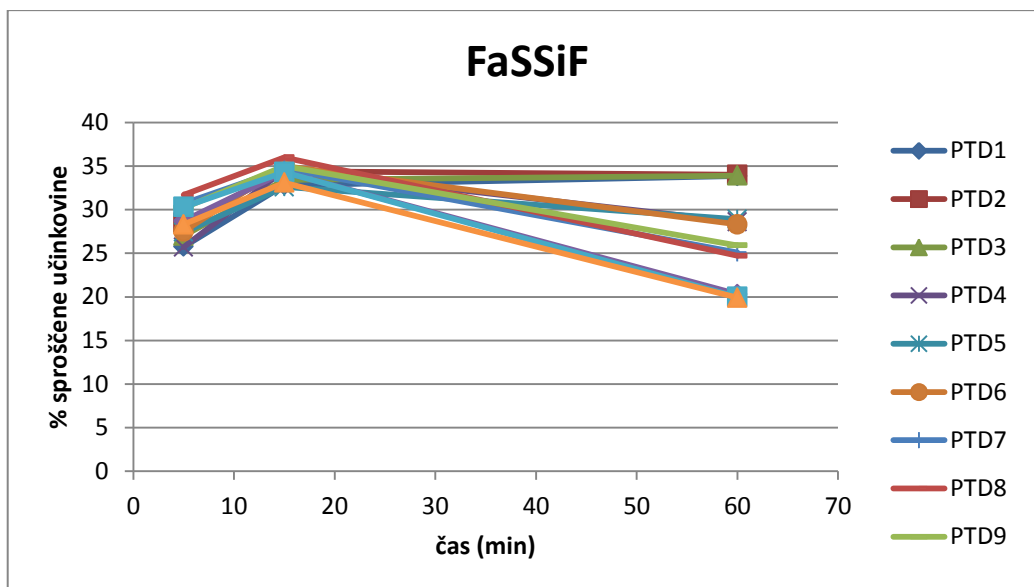
Vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
PTD1	5	2	2	2	0	0,3
	15	2,9	2,7	2,8	0,2	5,3
	60	5,9	5,8	5,9	0,1	1,7
PTD2	5	2,1	2,1	2,1	0	1,2
	15	3,1	3	3	0,1	2,1
	60	6,1	6	6,1	0	0,7
PTD3	5	2,1	2	2,1	0,1	3,4
	15	3	3	3	0	0,4
	60	6,1	6,2	6,2	0,1	1,4
PTD4	5	1,8	1,8	1,8	0	2,3
	15	3,2	2,9	3,1	0,2	7
	60	6,1	6,2	6,1	0,1	1,6
PTD5	5	1,8	1,7	1,7	0,1	3,5
	15	2,9	2,8	2,8	0,1	2,9
	60	5,9	5,8	5,9	0	0,5
PTD6	5	1,7	1,7	1,7	0	0,1
	15	2,8	2,8	2,8	0	0,3
	60	5,9	5,6	5,8	0,2	3,2
PTD7	5	2	1,9	1,9	0,1	4,5
	15	3,2	3,2	3,2	0	1,4
	60	6,9	6,8	6,8	0,1	1,3
PTD8	5	1,9	1,9	1,9	0,1	3,3
	15	3,3	3,1	3,2	0,1	4,3
	60	7	6,8	6,9	0,1	2
PTD9	5	1,7	1,8	1,8	0,1	4,3
	15	2,9	3,2	3,1	0,2	6
	60	6,4	6,9	6,7	0,3	4,4
PTD10	5	1,9	1,8	1,8	0,1	6,1
	15	3,2	3	3,1	0,2	5,2
	60	6,9	6,5	6,7	0,3	4
PTD11	5	1,8	1,7	1,8	0,1	3
	15	3	3,3	3,2	0,2	5,2
	60	6,5	6,4	6,5	0	0,7
PTD12	5	1,7	1,8	1,7	0,1	5,3
	15	2,8	3,2	3	0,3	10,2
	60	6,3	6,8	6,5	0,3	5,3

Določali smo sproščanje učinkovine iz trdnih disperzij. Zanimalo nas je, kako spremembe v sestavi zunanje faze vzorcev vplivajo na topnost in hitrost raztapljanja učinkovine. Zunanjo fazo predstavljajo vse pomožne snovi, ki poleg trdne disperzije sestavljajo proučevane vzorce. V ta namen smo uporabili vzorce PTD1-PTD12. Uporabljeni vzorci so fizikalna zmes trdne disperzije modelne učinkovine v polimeru in zunanje faze. Sestava vzorcev PTD1-PTD12 je prikazana v preglednici XVIII.

Preglednica XVIII: Sestava vzorcev PTD1-PTD12.

	Trdna disperzija (mg)	Zunanja faza	
		Polimer 1 (mg)	Polimer 2 (mg)
PTD1	400	30	60
PTD2	400	30	70
PTD3	400	30	80
PTD4	400	20	60
PTD5	400	20	70
PTD6	400	20	80
PTD7	400	15	60
PTD8	400	15	70
PTD9	400	15	80
PTD10	400	0	60
PTD11	400	0	70
PTD12	400	0	80

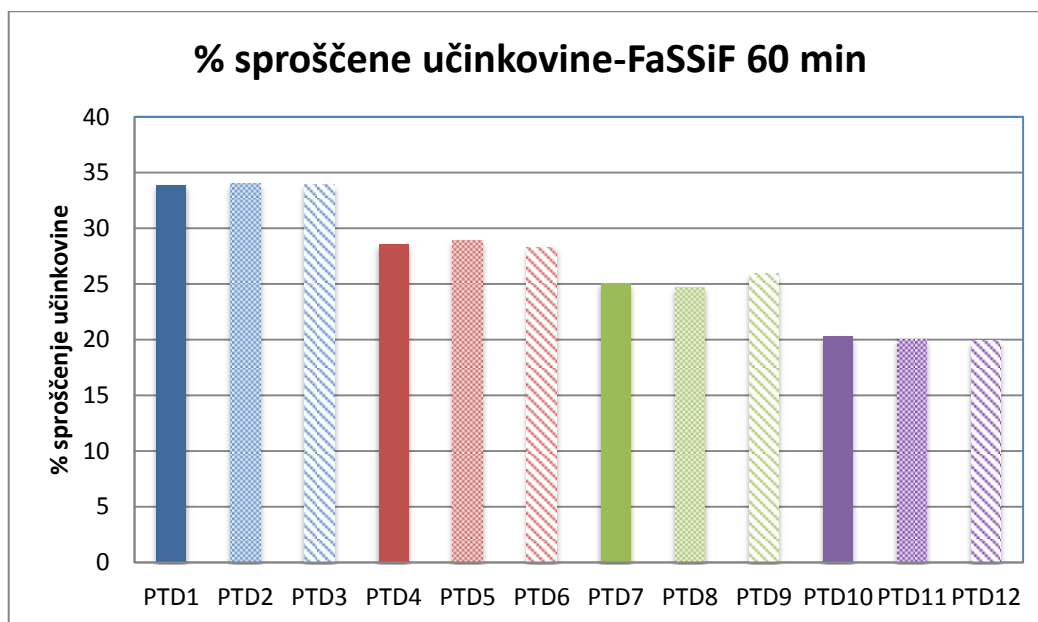
Iz preglednice XVIII je razvidno, da se vzorci med seboj razlikujejo samo po sestavi zunanje faze. Količina uporabljene trdne disperzije je pri vseh vzorcih enaka, razlikujejo se le v količini uporabljenih polimerov v zunanji fazi. Zunanjo fazo sestavljata dva polimera, polimer 1 in polimer 2. Iz literature je znano, da oba polimera lahko vplivata na zaviranje obarjanja učinkovine iz prenasičene raztopine, ter na ta način lahko vzdržujeta povišano koncentracijo učinkovine. Vpliv sestave zunanje faze na sproščanje učinkovine iz trdne disperzije smo določali s testi raztapljanja v FaSSiF-u, karbonatnem FaSSiF-u, 0,1 M HCl in 0,3% NaLS v vodi. Uporabljeni mediji omogočajo t.i. *non-sink* pogoje, kar bolj realno opiše dejanske pogoje v katerih poteka raztapljanje učinkovine v GIT.



Slika 9: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v FaSSiF-u pri 100 rpm.

Vpliv sestave zunanje faze na sproščanje modelne učinkovine je najbolj viden pri FaSSiF-u. FaSSiF je biorelevanten medij, ki s svojo sestavo simulira pogoje na tešče v tankem črevesju. Razlike med vzorci so opazne samo v 60. minuti, po 5. oz 15. minuti med vzorci ni opazne razlike. Že po 5 minutah se je iz trdnih disperzij sprostil 25-30% učinkovine. Na *sliki 9* so prikazani povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v FaSSiF-u. Iz oblike profilov vidimo, da koncentracije učinkovine naraščajo do 15. minute. Po tem nastane prenasočena raztopina in učinkovina se začne obarjati. Hitrost obarjanja učinkovine se pri vzorcih razlikuje. Pri 60 minuti je največji delež sproščene učinkovine opažen pri vzorcih PTD1, PTD2 in PTD3, kar predstavlja vzorce, ki vsebujejo največje količine polimera 1. Na *sliki 10* lahko vidimo, da je za vzdrževanje koncentracij raztopljenе učinkovine poleg prisotnosti polimera pomembna tudi njegova koncentracija, saj se paralelno z zmanjšanjem koncentracije polimera 1 v vzorcu zmanjšuje tudi delež sproščene učinkovine, ker se poveča hitrost obarjanja. Najmanjši delež sproščene učinkovine po 60 minutah smo določili pri vzorcih, ki ne vsebujejo polimera 1 (PTD10, PTD11, PTD12). Med vzorci, ki imajo enako količino polimera 1 in se med seboj razlikujejo v količini polimera 2 (na *sliki 10* označeni z isto barvo) ni opaznih razlik, kar pomeni, da polimer 2 ne vpliva na povečanje topnosti proučevane učinkovine v FaSSiF-u in je za povečano topnost in vzdrževanje koncentracije učinkovine odgovoren polimer 1. Višje koncentracije polimera 1 v vzorcu zagotavljajo višjo topnost učinkovine. Predvidevamo, da polimer 1 deluje kot polimerni zaviralec obarjanja. Preko interakcij z

modelno učinkovino upočasni njeno obarjanje in tako omogoči boljšo topnost in višje koncentracije učinkovine.

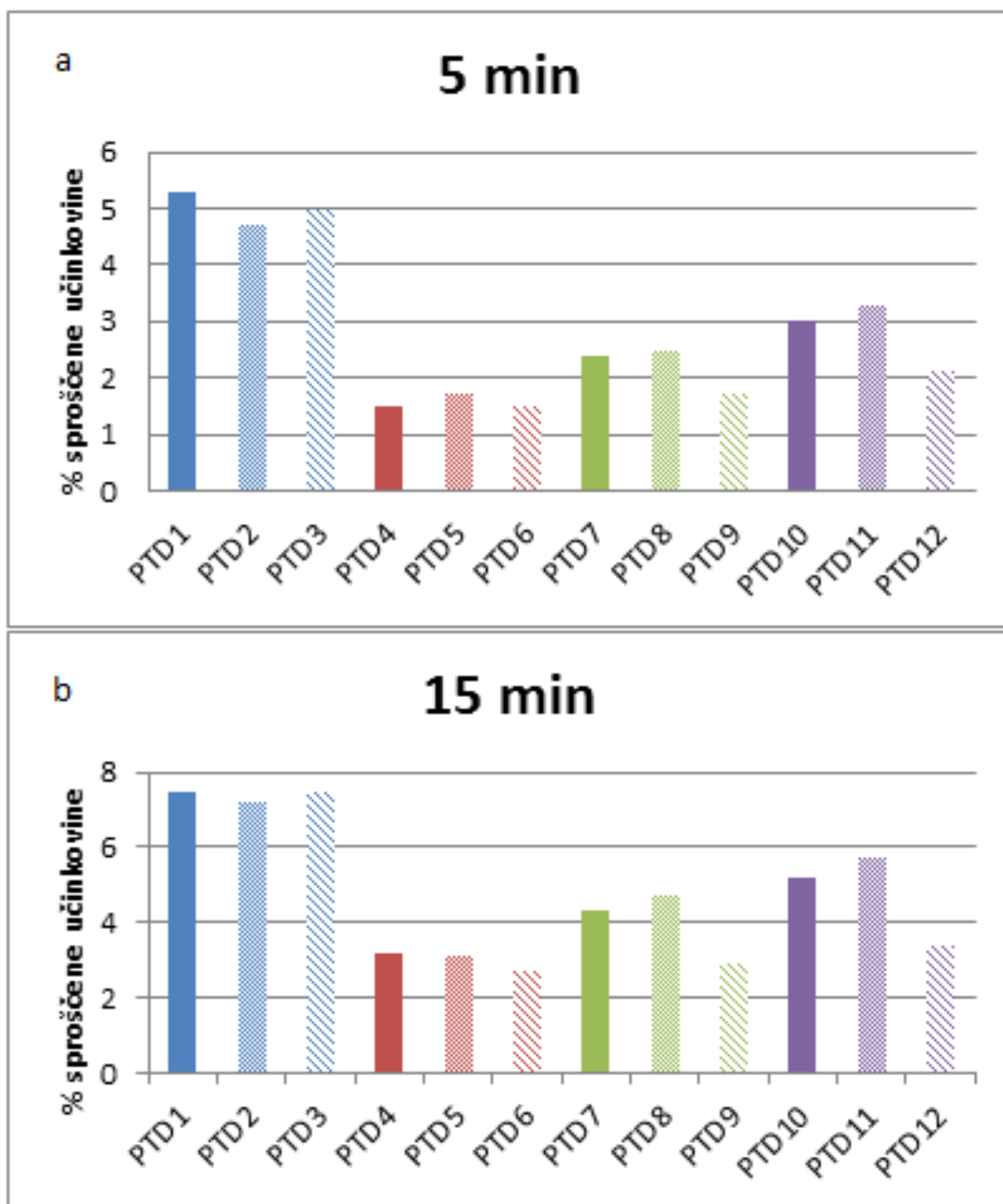


Slika 10: Odstotek sproščene učinkovine v FaSSiF-u iz trdne disperzije v 60. minuti pri vzorcih PTD1-PTD12.

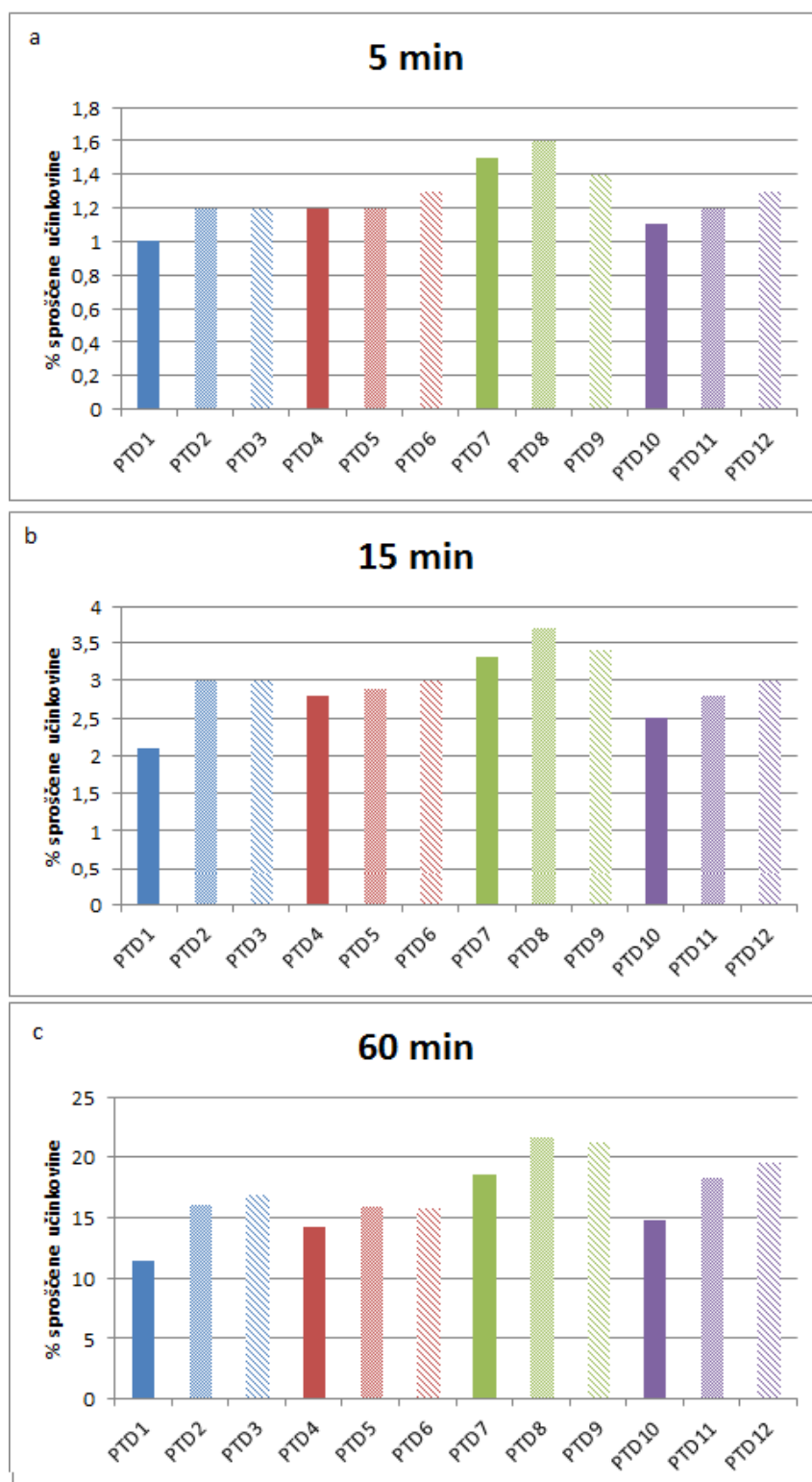
V 0,3% NaLS v vodi je prav tako viden vpliv sestave na sproščanje učinkovine iz trdne disperzije. Razlike med vzorci so opazne v 5. in 15. minuti (*slika 11*). Višje koncentracije raztopljene učinkovine smo opazili pri vzorcih, ki vsebujejo 30 mg polimera 1 in pri vzorcih, ki polimera 1 ne vsebujejo. Vpliv na sproščanje učinkovine ni linearen, kot smo ga opazili pri FaSSiF-u, modeliranje podatkov v programu Modde je pokazalo, da je vpliv v obliki kvadratne funkcije.

Sestava vzorcev ne vpliva na sproščanje modelne učinkovine v 0,1 M HCl, vendar ima polimer pomembno vlogo tudi v tem mediju. Pri pH 1 uporabljeni polimer preprečuje raztapljanje modelne učinkovine, ker pri tako nizki pH vrednosti ni topen. V 0,1 M HCl je delež sproščene učinkovine majhen, v eni uri se sprostil manj kot 7 % učinkovine.

Eksperimentalni rezultati pridobljeni v karbonatnem FaSSiF-u ne korelirajo s sestavo vzorcev (*slika 12*). Koncentracija modelne učinkovine ni bila višje, če je v zunanji fazi bila prisotna večja količina polimera 1.



Slika 11: Odstotek sproščene učinkovine v 0,3% NaLS v vodi iz trdne disperzije v a) 5. minuti in b) 15. minuti pri vzorcih PTD1-PTD12.



Slika 12: Odstotek sproščene učinkovine v karbonatnem FaSSiF-u iz trdne disperzije v a) 5. minuti, b) 15. minuti in c) 60. minuti pri vzorcih PTD1-PTD12.

4.2.4. VPLIV VELIKOSTI DELCEV POLIMERA NA TOPNOST UČINKOVINE

V preglednicah XIX in XX so zbrani rezultati testov raztapljanja učinkovine iz trdne disperzije v 0,3% NaLS v vodi in FaSSiF-u, pri 150 rpm.

Preglednica XIX: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 0,3 NaLS v vodi pri 150 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

Vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
PTD1	5	4,7	3,5	4,1	0,9	21,7
	15	10,8	8,7	9,8	1,4	14,8
	60	33,9	29,4	31,6	3,2	10,1
PTD2	5	6	5,8	5,9	0,1	2,2
	15	12,6	12,1	12,3	0,4	3,3
	60	35,2	33,4	34,3	1,3	3,7
PTD3	5	4,5	4,2	4,3	0,2	4,9
	15	10,7	10,1	10,4	0,4	4,2
	60	33,3	33	33,1	0,2	0,7
PTD13	5	5,2	3,8	4,5	1	21,6
	15	12,7	10,5	11,6	1,5	13,1
	60	46,9	35,1	41	8,4	20,4
PTD14	5	4,8	2,3	3,6	1,8	49
	15	10,3	6,5	8,4	2,7	32,3
	60	29,5	25,5	27,5	2,8	10,3
PTD15	5	2,5	3,7	3,1	0,8	27,3
	15	6,8	9,1	8	1,6	20,2
	60	27,2	32,2	29,7	3,5	11,9

Preglednica XX: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v FaSSiF-u pri 150 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
PTD1	5	31,3	30,6	30,9	0,5	1,5
	15	43,2	42,9	43,1	0,2	0,4
	60	53,1	34,9	44	12,9	29,2
PTD2	5	31,2	31,6	31,4	0,3	0,8
	15	42,1	44,8	43,5	1,9	4,4
	60	36,4	32,3	34,3	2,9	8,3
PTD3	5	32	31,9	32	0	0,1

	15	44,7	48,1	46,4	2,4	5,3
	60	36	36,2	36,1	0,2	0,5
PTD13	5	31,4	30,9	31,2	0,4	1,2
	15	39,7	45,5	42,6	4,1	9,7
	60	24,1	24,3	24,2	0,1	0,4
PTD14	5	28,1	26,7	27,4	1	3,8
	15	40,2	40,2	40,2	0	0,1
	60	23,8	24,4	24,4	0,4	1,7
PTD15	5	29,1	29,8	29,5	0,5	1,8
	15	38,1	36,3	37,2	1,3	3,5
	60	27,2	22,7	24,9	3,2	13

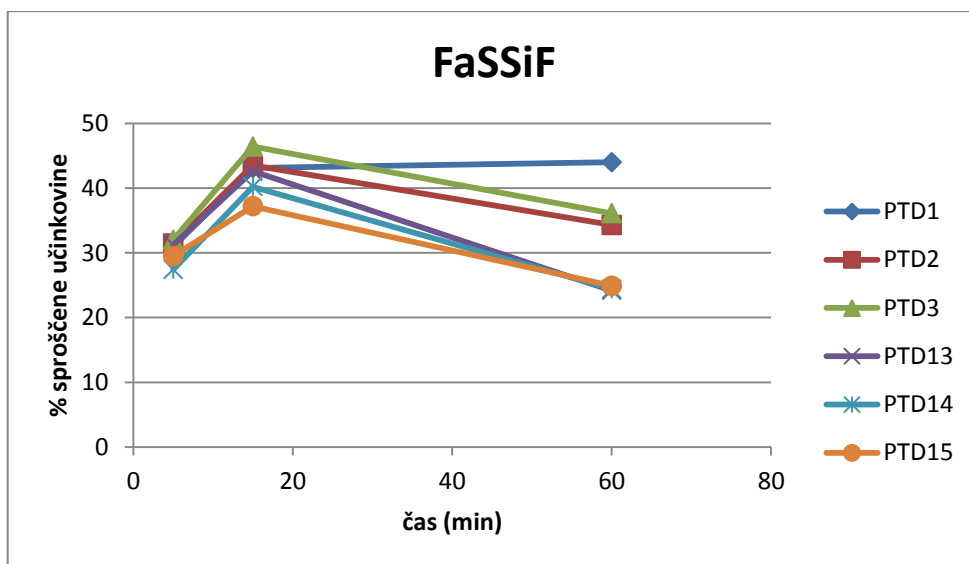
Preverjali smo vpliv velikosti delcev polimera 1 na topnost modelne učinkovine iz trdne disperzije. Poskus smo izvajali pri 150 rpm. Uporabili smo vzorce, ki vsebujejo 30 mg polimera 1 v zunanji fazi, saj smo pri njih ugotovili največji vpliv na topnost modelne učinkovine v predhodnih poskusih. Sestava vzorcev, ki smo jih uporabili, je prikazana v *preglednici XXI*. Uporabljeni vzorci so fizikalna zmes trdne disperzije modelne učinkovine v polimeru in zunanje faze. Vzorci PTD1-3 se od vzorcev PTD13-15 razlikujejo le v velikosti delcev polimera 1. Vzorci PTD13-15 vsebujejo polimer 1 z velikostjo delcev, ki je 20x večja od velikosti delcev polimera 1 v vzorcih PTD1-3.

Preglednica XXI: Sestava vzorcev PTD1-PTD3 in PTD13-15. Velikost delcev polimera 1 v vzorcih PTD13-15 je 20x večja od velikosti delcev polimera 1 v vzorcih PTD1-PTD3.

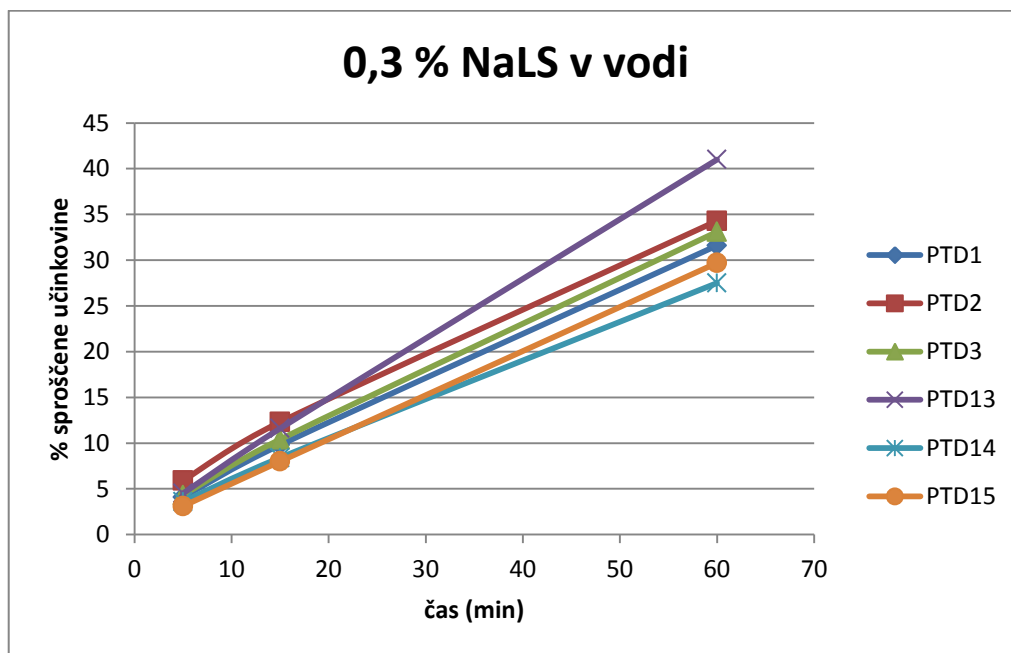
	Trdna disperzija (mg)	Zunanja faza	
		Polimer 1 (mg)	Polimer 2 (mg)
PTD1	400	30	60
PTD2	400	30	70
PTD3	400	30	80
PTD13	400	30	60
PTD14	400	30	70
PTD15	400	30	80

Pri določanju vpliva sestave zunanje faze na topnost modelne učinkovine smo opazili vpliv samo v FaSSiF-u in 0,3% NaLS v vodi, tako da smo ta dva medija uporabili za določanje vpliva velikosti delcev polimera. V FaSSiF-u je velikost delcev polimera imela vpliv na sproščanje učinkovine iz trdne disperzije. Razliko med vzorci lahko vidimo na *sliki 13* v

60. minuti, kjer je delež sproščene učinkovine iz vzorcev PTD1-3 večji kot pri vzorcih PTD13-15. Pri vzorcih, ki so vsebovali polimer 1 z manjšimi delci, vidimo, da je obarjanje učinkovine potekalo počasneje. Na *sliki 14* so prikazani povprečni profili sproščanja v 0,3% NaLS v vodi. V tem mediju razlike med vzorci in vpliv velikosti delcev polimera 1 nismo opazili. Hitrost sproščanja učinkovine ni bila večja, če smo uporabili polimer 1 z manjšimi delci.

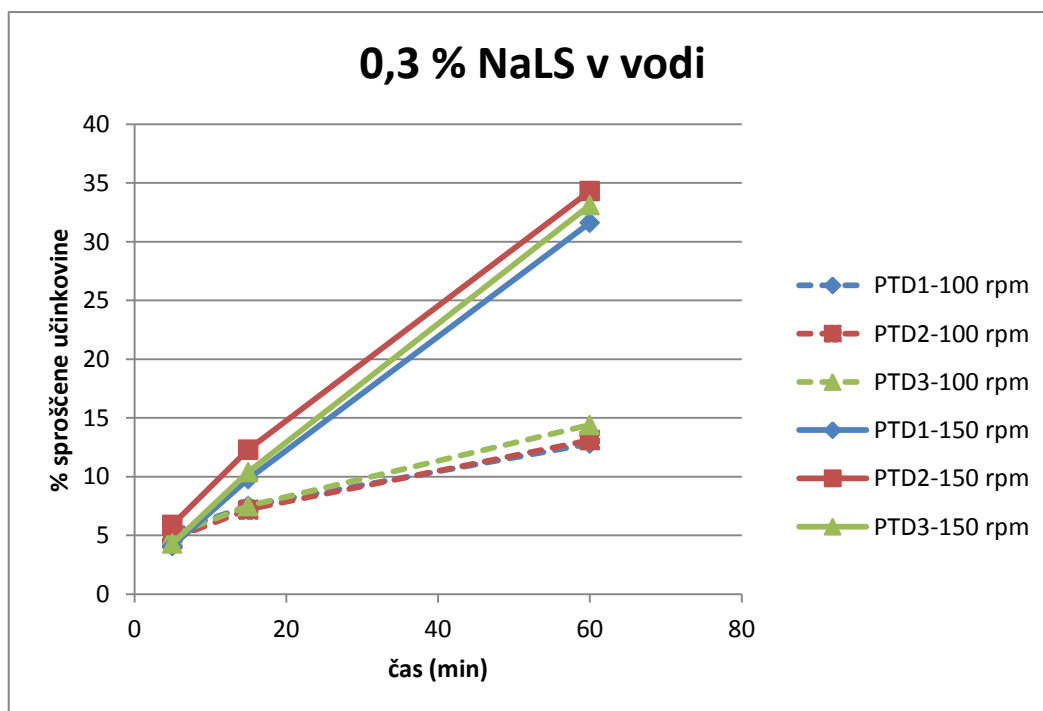


Slika 13: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v FaSSiF-u pri 100 rpm.

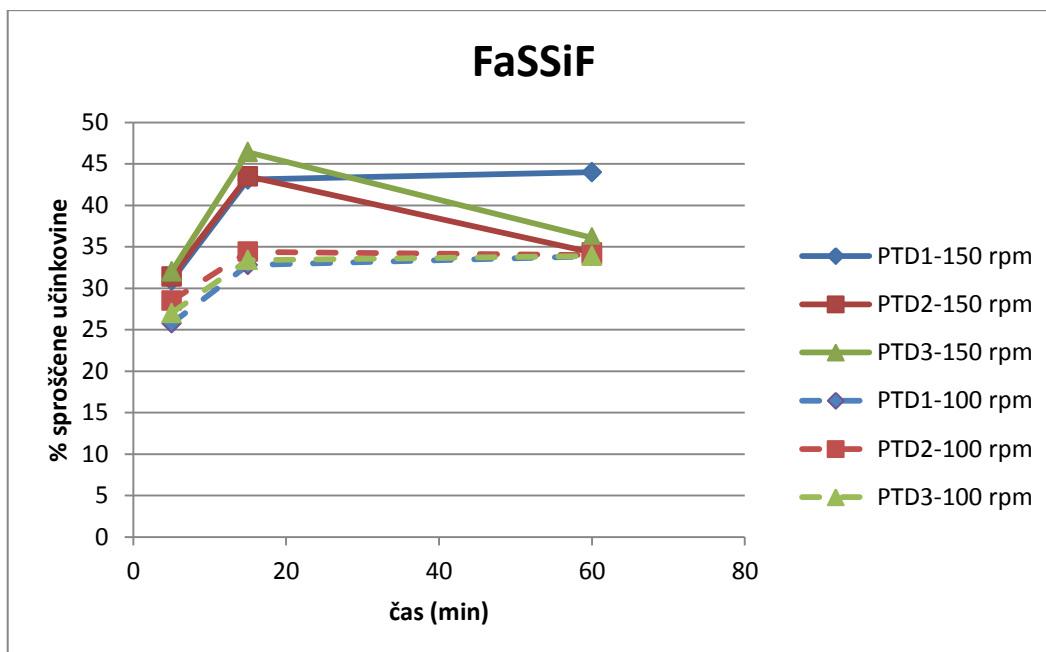


Slika 14: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v 0,3 % NaLS v vodi pri 100 rpm.

Primerjali smo rezultate, ki smo jih dobili za vzorce PTD1, PTD2 in PTD3 v FaSSiF-u in 0,3% NaLS v vodi, pri 100 in 150 rpm. Hitrost vrtenja smo pri testu raztapljanja povečali zato, ker smo pri poskusih, ki smo jih izvedli pri 100 rpm opazili, da se na dnu posode zbirajo delci v obliki stožca. Gre za t.i. "cone effect". Zaradi počasne hitrosti mešanja se razpadla farmacevtska oblika posode na dno posode. V takem primeru medij ne pride v stik z delci, ki se nahajajo znotraj nastalega stožca in je sproščanje učinkovine manj učinkovito. Ko smo povečali hitrost vrtenja, smo opazili hitrejše sproščanje učinkovine v obeh medijih. V 0,3% NaLS v vodi (*slika 15*) je vpliv nastalega stožca na zmanjšano sproščanje učinkovine lepo viden. Ko smo povečali hitrost vrtenja, smo opazili, da se je v 60. minuti sprostil 20% več učinkovine. V FaSSiF-u smo opazili razliko pri vzorcih v 15. minuti. Delež sproščene učinkovine, ki smo ga določili v 5. in 60. minuti, je bil približno enak pri 150 rpm in pri 100 rpm. S *slike 16* je razvidno, da je sproščanje učinkovine pri 150 rpm hitrejše in prenasičeno stanje nastane prej. Prav tako lahko vidimo, da je prenasičeno stanje gonilna sila za obarjanje učinkovine. Pri 15 minuti so višje koncentracije raztopljene učinkovine pri 150 rpm omogočile hitrejše obarjanje učinkovine.



Slika 15: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v 0,3% NaLS v vodi pri 100 rpm in 150 rpm.



Slika 16: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v FaSSiF-u pri 100 rpm in 150 rpm.

4.2.5. VPLIV VELIKOSTI DELCEV TRDNE DISPERZIJE NA SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ ZDROBLJENIH TABLET

V preglednicah XXII in XXIII so zbrani rezultati testov raztapljanja učinkovine iz zdrobljenih tablet v 0,3% NaLS v vodi in FaSSiF-u, pri 150 rpm.

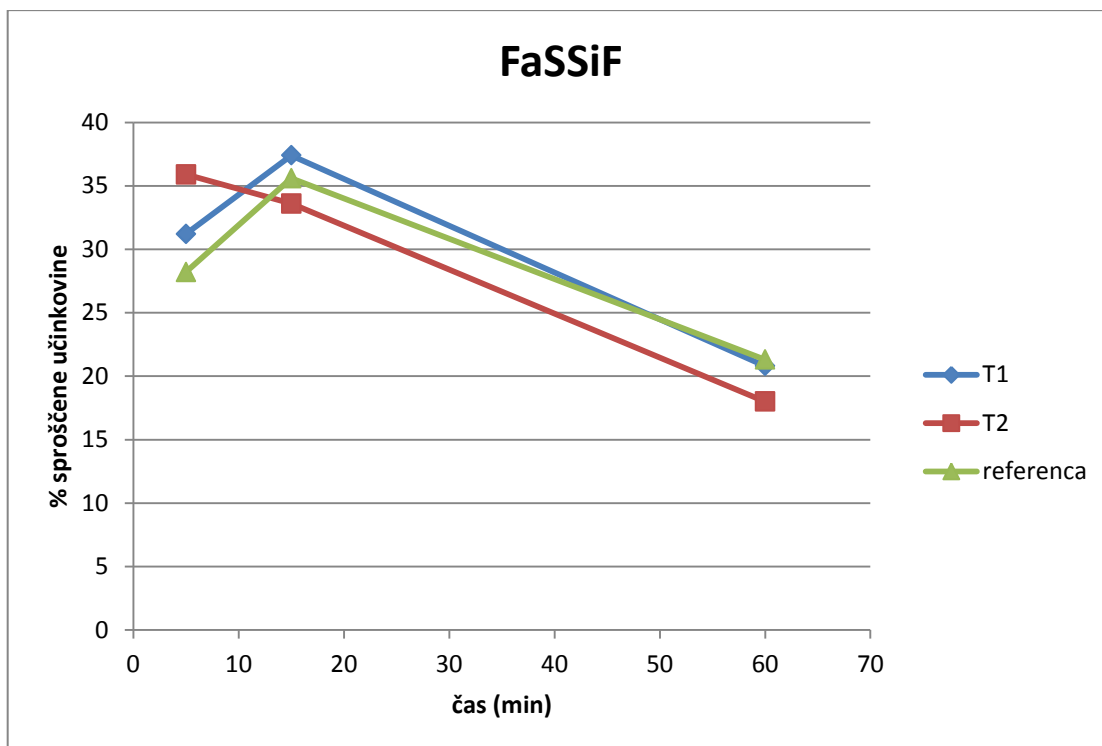
Preglednica XXII: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 0,3 NaLS v vodi pri 150 rpm iz zdrobljenih tablet. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
T1	5	6,4	3,8	5,1	1,9	37
	15	12,7	9,7	11,2	2,1	19,1
	60	35,1	33,7	34,4	1	2,9
T2	5	5,3	6,5	5,9	0,8	14,2
	15	11,9	13,7	12,8	1,3	10
	60	35,1	38,4	36,7	2,4	6,5
referenca	5	8,6	8,8	8,7	0,1	1,5
	15	16,7	16,5	16,6	0,2	1,1
	60	42,4	39,6	41	2	4,8

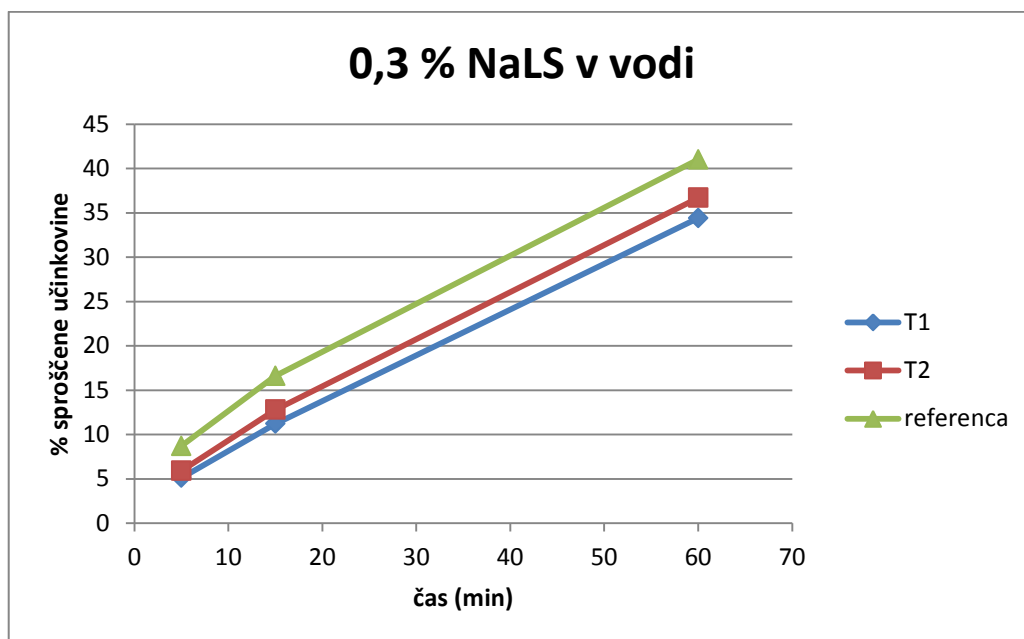
Preglednica XXIII: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v FaSSiF-u pri 150 rpm iz zdrobljenih tablet. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
T1	5	30,7	31,8	31,2	0,8	2,5
	15	38,6	36,2	37,4	1,7	4,6
	60	20,9	20,6	20,8	0,2	1,1
T2	5	35,5	36,4	35,9	0,7	1,9
	15	33,2	33,9	33,6	0,5	1,4
	60	18,7	17,2	18	1,1	6
referenca	5	28,3	28,2	28,2	0,1	0,4
	15	35,5	35,6	35,6	0,1	0,2
	60	21,5	21,1	21,3	0,3	1,4

Pred testom raztapljanja smo tablete zdrobili v terilnici. Vrednotili smo dva vzorca tablet, ter ju primerjali z vzorcem referenčnih tablet. Proučevani vzorci imajo enako kvantitativno in kvalitativno sestavo kot patentna prijava originatorja. Izdelani so na enak način, razlikujejo se le v velikosti delcev trdne disperzije. Velikost delcev v referenčnem vzorcu je 330 µm, vzorec T1 vsebuje trdno disperzijo z velikostjo delcev 330 µm in vzorec T2 vsebuje trdno disperzijo z velikostjo delcev 298 µm. V FaSSiF-u je vpliv velikosti delcev trdne disperzije viden v 5. minuti (*slika 17*). Najhitrejše sproščanje opazimo pri vzorcu T2, ki vsebuje manjše delce. Kasneje ta vpliv ni viden, saj je delež sproščene učinkovine višji pri vzorcih, ki vsebujejo večje delce. Pri referenčnem vzorcu in vzorcu T1 najvišje koncentracije opazimo šele pri 15. minuti. Pri vzorcu T2 zaradi manjših delcev hitreje pride do višjih koncentracij in do prenasičenja, posledično tudi do hitrejšega obarjanja učinkovine, tako da predvidevamo, da je to razlog za nižji delež sproščene učinkovine iz tablet, ki vsebujejo trdno disperzijo z manjšimi delci. V 0,3 % NaLS v vodi so razlike med vzorci minimalne. Sproščanje učinkovine je potekalo najhitreje pri referenčnem vzorcu. Čeprav ima vzorec T1 delce enake velikosti kot referenca, smo pri njem opazili počasnejše sproščanje. Na *sliki 18* lahko vidimo majhno razliko med vzorcema T1 in T2, sproščanje učinkovine je pri vzorcu z manjšo velikostjo delcev potekalo malenkost hitreje.



Slika 17: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz zdrobljenih tablet v FaSSiF-u pri 150 rpm.



Slika 18: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz zdrobljenih tablet v 0,3% NaLS v vodi pri 150 rpm.

4.2.6. VPLIV VELIKOSTI DELCEV TRDNE DISPERZIJE NA SPROŠČANJE UČINKOVINE

V preglednicah XIV in XV so zbrani rezultati testov raztapljanja učinkovine iz trdnih disperzij v 0,3% NaLS v vodi, pri 100 in 150 obratih na minuto.

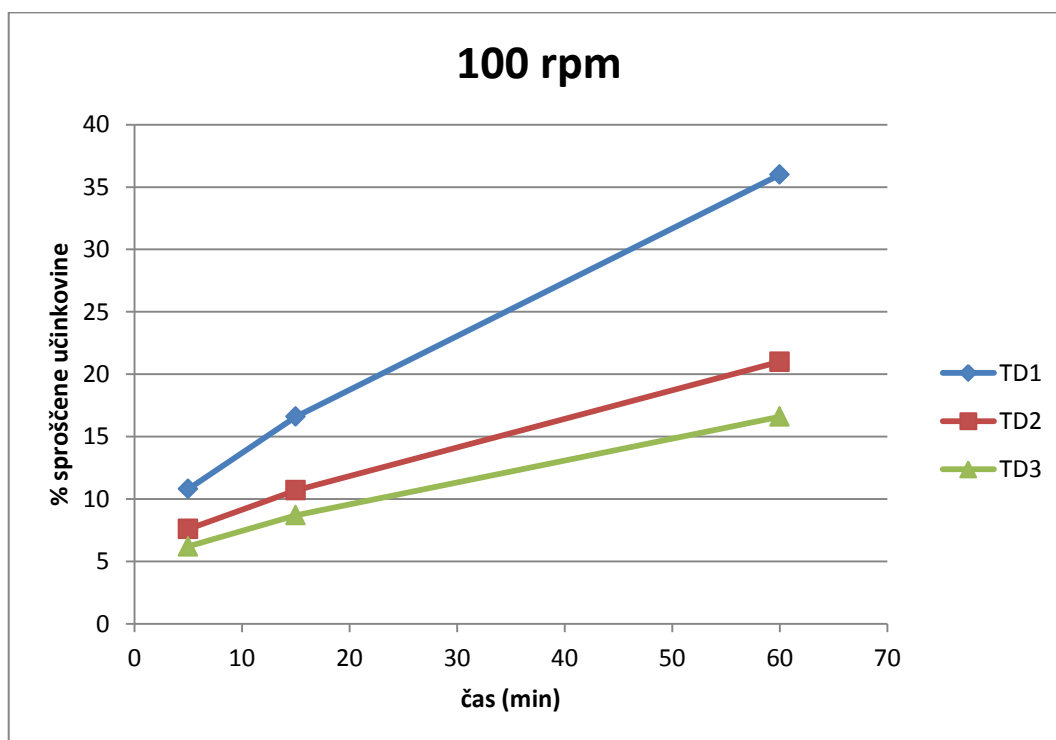
Preglednica XIV: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 0,3% NaLS v vodi pri 100 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
TD1	5	11,2	10,4	10,8	0,5	4,8
	15	17,3	15,9	16,6	1	6,1
	60	36,6	35,3	36	0,9	2,6
TD2	5	7,1	8,2	7,6	0,7	9,7
	15	9,5	11,9	10,7	1,6	15,3
	60	19,7	22,3	21	1,8	8,6
TD3	5	6,2	6,1	6,2	0,1	1,1
	15	8,9	8,5	8,7	0,3	3,9
	60	16,6	16,6	16,6	0	0

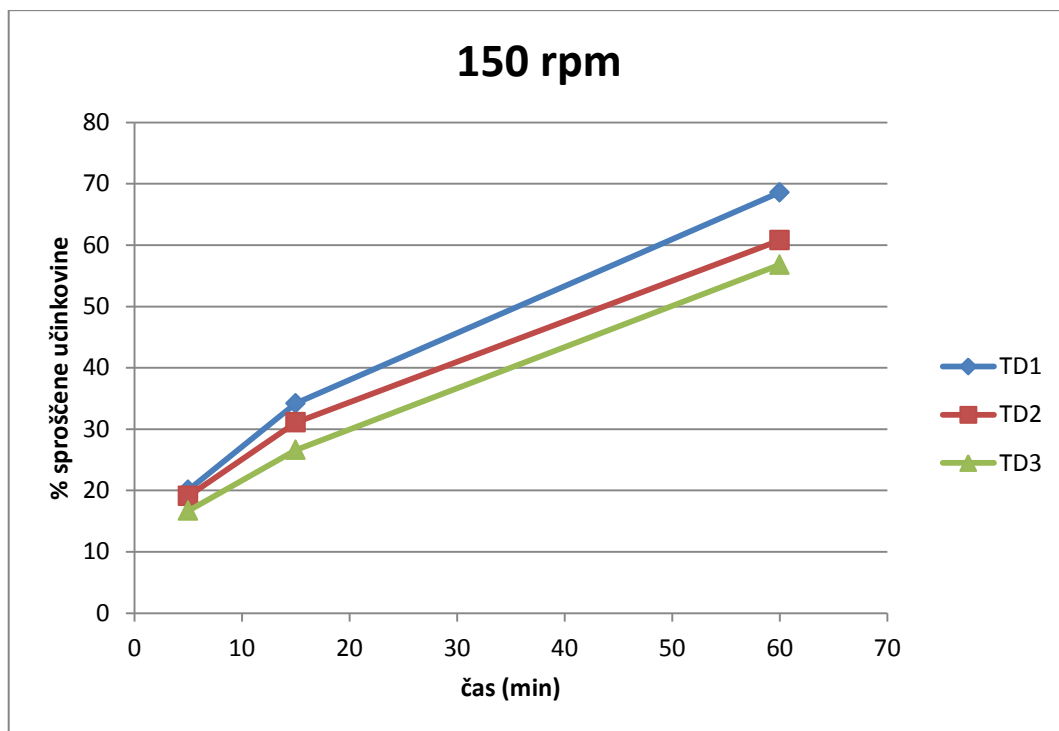
Preglednica XV: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa v 0,3% NaLS v vodi pri 150 rpm iz trdnih disperzij. Poleg deleža sproščene učinkovine za posamezne paralelke (P1, P2) so prikazani še povprečje, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD)

vzorec	čas (min)	% sproščene učinkovine			SD	RSD
		P1	P2	povprečje		
TD1	5	18,3	22	20,1	2,6	13
	15	30,1	38,4	34,2	5,9	17,2
	60	60,6	76,5	68,6	11,2	16,3
TD2	5	22,5	15,6	19,1	4,9	25,8
	15	37	25,1	31,1	8,4	27,1
	60	70,5	51,1	60,8	13,7	22,5
TD3	5	17,3	16,1	16,7	0,9	5,3
	15	27,9	25,3	26,6	1,8	6,8
	60	57,1	56,5	56,8	0,4	0,7

Iz poskusa s tabletami nismo ugotovili smiselne korelacije med odstotkom sproščene učinkovine in velikostjo delcev trdne disperzije, zato smo spremljali sproščanje učinkovine iz trdnih disperzij brez zunanje faze. S tem smo izločili vpliv polimera v zunanji fazi na topnost preučevane učinkovine in edina razlika med vzorci je velikost delcev trdne disperzije. Primerjali smo tri vzorce z velikostjo delcev 260,5 μm (TD1), 347,5 μm (TD2) in 291,5 μm (TD3). Poskuse smo izvajali v 0,3 % NaLS v vodi pri dveh različnih hitrostih mešanja, 100 rpm in 150 rpm. Največji delež sproščene učinkovine smo opazili pri vzorcu z najmanjšimi delci (TD1). Vzorca TD2 in TD3 se nista razvrstila po pričakovanjih. Večji delež sproščene učinkovine smo opazili pri vzorcu TD2, ki vsebuje delce večjih velikosti kot vzorec TD3. Predvidevamo, da sproščanje učinkovine iz trdne disperzije ni odvisno samo od velikosti delcev. Pri obeh hitrostih so se vzorci razporedili enako, vendar so razlike med vzorci bolj opazne pri nižji hitrosti vrtenja (*slika 19*).



Slika 19: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v 0,3% NaLS v vodi pri 100 rpm.



Slika 19: Povprečni profili sproščanja učinkovine iz trdne disperzije v 0,3% NaLS v vodi pri 150 rpm.

5. ZAKLJUČEK

V magistrskem delu smo vrednotili topnost in hitrost raztapljanja slabo topne modelne učinkovine, ki se glede na BCS klasifikacijo uvršča v drugi razred.

Dializa se kot metoda za določanje sproščanja preučevane modelne učinkovine ni pokazala kot uspešna. Koncentracije modelne učinkovine, ki smo jih določili v akceptorskem mediju so bile zelo nizke, v primeru trdne disperzije pa učinkovina sploh ni prehajala skozi dializno membrano.

Sestava zunanje faze v trdni disperziji je vplivala na sproščanje modelne učinkovine v FaSSiF-u. Višja količina polimera v vzorcu je zagotovila višje koncentracije raztopljene učinkovine. V 0,3 % NaLS je kvadrat količine polimera v pripravku koreliral s koncentracijo raztopljene učinkovine. Sestava zunanje faze ni imela pomembnega vpliva na koncentracijo raztopljene učinkovine v 0,1 M HCl in v karbonatnem FaSSiF-u.

Velikost delcev polimera je pomembna za vzdrževanje prenasočene koncentracije in zaviranje obarjanja učinkovine v FaSSiF-u. Pri vzorcih, ki vsebujejo polimer z manjšo velikostjo delcev je obarjanje učinkovine potekalo počasneje. V 0,3% NaLS vpliv velikosti delcev na sproščanje učinkovine nismo opazili.

Vpliv velikosti delcev trdne disperzije na sproščanje modelne učinkovine iz zdrobljenih tablet je viden le v prvi časovni točki v FaSSiFu, kjer je sproščanje učinkovine hitrejše iz tablet, ki vsebujejo trdno disperzijo z delci manjših velikosti, kasneje pa ta vpliv ni viden. V 0,3% NaLS so razlike med vzorci minimalne. Ker nismo ugotovili smiselne korelacije med odstotkom sproščene učinkovine in velikostjo delcev trdne disperzije, ki vstopa v tablete, smo spremljali še sproščanje učinkovine iz trdnih disperzij z različno velikostjo delcev, ki ne vsebujejo zunanje faze,. Ugotovili smo, da so razlike med vzorci večje pri nižjih hitrostih vrtenja in, da sproščanje učinkovine iz trdnih disperzij ni odvisno samo od velikosti delcev, na sproščanje morda vpliva tudi morfologija.

6. LITERATURA

1. Krishnaiah YSR: Pharmaceutical Technologies for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs, *Journal of Bioequivalence&Bioavailability*, 2010: 028-036.
2. Khadkaa P., Roa J., Kima H., Kima I., Kima J. T., Kima H., Choa J. M., Yunb G., Lee J.: Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014; 9 (6): 304–316
3. Dajun D. Sun, Ping I. Lee: Haste makes waste: The interplay between dissolution and precipitation of supersaturating formulations, *The AAPS Journal*, 2015; 17 (6): 1317-1326
4. Milind P. Wagh, Jatin S. Patel: Biopharmaceutical classification system: Scientific basis for biowaiver extensions, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2010; 2 (1)
5. Yohei Kawabataa, b, Koichi Wadab, Manabu Nakatanib, Shizuo Yamadaa, Satomi Onoue: Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011; 420 (1): 1-10
6. Baghel S., Cathcart H., O'Reilly: Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016; 105 (9): 2527–2544
7. S. Maleki Dizaj, Zh. Vazifehasl, S. Salatin, Kh. Adibkia, Y. Javadzadeh: Nanosizing of drugs: Effect on dissolution rate, *Res Pharm Sci*, 2015; 10(2): 95–108.
8. Hywel D. Williams, Natalie L. Trevaskis, Susan A. Charman, Ravi M. Shanker, William N. Charman, Colin W. Pouton, and Christopher J. H. Porter: Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development, *Pharmacol Rev* 2013; 65: 315–499
9. Ketan T. Savjani, Anuradha K. Gajjar, Jignasa K. Savjani: Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques, *ISRN Pharm*, 2012; 2012: 195727.

10. Surampalli Gurunatha, Sabbani Pradeep Kumara, Nanjwade K. Basavarajb, Paragouda A. Patil: Amorphous solid dispersion method for improving oral bioavailability of poorly water-soluble drugs, *Journal of Pharmacy Research*, 2013; 6 (4): 476–480
11. Teófilo Vasconcelos, Bruno Sarmiento, Paulo Costa: Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs, *Drug Discovery Today*, *Drug Discovery Today*, 2007, 12 (23–24): 1068–1075
12. Yanbin Huang, Wei-Guo Dai: Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2014, 4 (1): 18–25
13. Colin W Pouton: Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and ‘self-microemulsifying’ drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000, 11 (2): S93–S98
14. Brouwers J., Brewster M. E., Augustijns P.: Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability?, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009; 98: 2549–2572
15. Dallas B. Warren, Hassan Benameur, Christopher J.H. Porter & Colin W. Pouton: Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility, *Journal of Drug Targeting* 2010; 18 (10): 704-731
16. Jan Bevernage, Joachim Brouwers, Pieter Annaert, Patrick Augustijns: Drug precipitation–permeation interplay: Supersaturation in an absorptive environment, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012; 82 (2): 424–428
17. Ping Gao, Yi Shi, Characterization of Supersaturatable Formulations for Improved Absorption of Poorly Soluble Drugs, *The AAPS Journal*, 2012; 14 (4): 703-713
18. Pei T. Mah, Leena Peltonen, Dunja Novakovic, Thomas Rades, Clare J. Strachan, Timo Laaksonen: The effect of surfactants on the dissolution behavior of amorphous formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016; 103: 13–22
19. Augustijns P, Brewster ME: Supersaturating drug delivery systems: fast is not necessarily good enough, *J Pharm Sci*. 2012; 101(1):7-9
20. Sen Xua, Wei-Guo Dai: Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013; 453 (1): 36–43

21. Jan Bevernagea, Joachim Brouwersa, Marcus E. Brewsterb, Patrick Augustijns: Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013; 453 (1): 25–35
22. European Pharmacopoeia, 6th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg, 2007
23. Chong-Hui Gu, Rajesh B. Gandhi, Lee K. Tay, Simon Zhou, Krishnaswamy Raghavan: Importance of using physiologically relevant volume of dissolution medium to correlate the oral exposure of formulations of BMS-480188 mesylate, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004; 269 (1): 195–202
24. Sandra Klein: The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug, *AAPS J*, 2010; 12(3): 397–406
25. Kerstin J. Frank, Ulrich Westedt, Karin M. Rosenblatt, Peter Hölig , Jörg Rosenberg, Markus Mägerlein , Martin Brandl, Gert Fricker: Impact of FaSSiF on the solubility and dissolution-/permeation rate of a poorly water-soluble compound, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012; 47: 16–20
26. Y. Zambito, E. Pedreschi, G. Di Colo: Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?—A case study, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012; 434 (1–2): 28–34
27. Gabriel Moreno-Bautista, Kam C. Tam: Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011; 389 (1–3): 299–303
28. Susan D'Souza: A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms, *Advances in Pharmaceutics*, 2014; 304757: 1-12
29. Guide to equilibrium dialysis, 1999, The Nest Group, Inc.