

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANI JAMNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANI JAMNIK

**OVREDNOTENJE RAZLIČNIH MEDIJEV ZA IZVEDBO PRESKUSA
SPROŠČANJA OGRODNE TABLETE NA NAPRAVI ZA POSNEMANJE
ČREVESNEGA GIBANJA**

**EVALUATION OF DIFFERENT MEDIA FOR IMPLEMENTATION OF
DISSOLUTION TESTING OF A MATRIX TABLET ON AN APPARATUS
SIMULATING THE MOVEMENT OF HUMAN INTESTINE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Na tem mestu bi se rad zahvalil doc. dr. Juriju Trontlju in dr. Urošu Klančarju za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Posebna zahvala gre Meliti Hribar za ves njen trud, potrpežljivost in koristne nasvete ter prijetno družbo tekom raziskovalnega dela.

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

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem, ki so poskrbeli za nepozabna študentska leta.

Nazadnje bi se iskreno zahvalil še svojim staršem, družini in puncu za nenehno podporo, spodbudo in zaupanje.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorja dr. Uroša Klančarja, mag. farm.

Jani Jamnik

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Član komisije: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV.....	V
1. UVOD	1
1.1. Preskus sproščanja	1
1.2. Pregled obstoječih testov in metod za preskus sproščanja.....	1
1.2.1. Konvencionalne farmakopejske metode	1
1.2.2. Alternativni preskusi sproščanja	3
1.2.3. Enostavni statični sistemi.....	4
1.2.4. Dinamični sestavljeni sistemi	6
1.2.5. Mediji za izvedbo preskusa sproščanja.....	9
1.3. Tanko črevo.....	9
1.3.1. Anatomske značilnosti	9
1.3.2. Fiziološki pogoji v tankem črevesu	10
1.3.3. Mehanika gibanja v tankem črevesu.....	11
1.3.4. Prehod FO skozi tanko črevo	13
1.4. Ogrodne tablete	13
1.4.1. Prednosti in slabosti ogrodnih tablet.....	13
1.4.2. Vrste ogrodnih tablet.....	13
1.4.3. Vplivi na sproščanje iz ogrodnih tablet.....	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE.....	18
3.1. Materiali	18
3.1.1. Farmacevtska oblika	18
3.1.2. Aparature.....	18
3.1.3. Kemikalije in standardi	18
3.1.4. Ostalo	19
3.2. Metode	19
3.2.1. Priprava medijev za preskuse sproščanja.....	19
3.2.2. Izvedba preskusa topnosti	20
3.2.3. Analitika vzorcev	20

3.2.4. Izvedba testa nabrekanja	21
3.3. Naprava za posnemanje črevesnega gibanja	22
3.3.1. Opis naprave	22
3.3.2. Izvedba preskusa sproščanja na napravi za posnemanje črevesnega gibanja	24
3.3.3. Pregled poskusov opravljenih v okviru magistrske naloge.....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. Preliminarni preskusi sproščanja	26
4.2. Preskusi sproščanja opravljeni s programom P12.....	28
4.3. Preskusi sproščanja opravljeni na napravi z vesli (USP II)	31
4.4. Ostali rezultati	33
4.4.1. Preskus topnosti	33
4.4.2. Preskus nabrekanja.....	33
5. RAZPRAVA	34
5.1. Farmakokinetična študija	34
5.2. Preskusi sproščanja opravljeni na napravi z vesli (USP II)	35
5.3. Preskus nabrekanja.....	35
5.4. Preliminarni preskusi sproščanja	37
5.4.1. Kalijev fosfatni pufer pH-6,8.....	37
5.4.2. Acetatni pufer pH-4,5	39
5.5. Optimizacija delovanja naprave za posnemanje črevesnega gibanja.....	40
5.6. Preskusi sproščanja opravljeni s programom P12.....	41
5.6.1. Umetni črevesni sok, ki posnema pogoje na tešče (FaSSIF)	41
5.6.2. Fosfatni pufer z dodatkom 0,2 M NaCl	42
5.6.3. Fosfatni pufer	43
5.7. Primerjava rezultatov	43
5.7.1. Vpliv ionske jakosti	43
5.7.2. Primerjava naprave za posnemanje črevesnega gibanja z aparaturo USP II	45
5.7.3. Primerjava razmerij povprečnih deležev sproščene učinkovine	46
5.7.4. Gibanje relativnih standardnih deviacij (RSD).....	48
6. SKLEP	50
7. LITERATURA	51

POVZETEK

Preskus sproščanja peroralnih farmacevtskih oblik se običajno izvaja bodisi za namene kontrole kakovosti, kjer preverjamo skladnost izdelka, bodisi za namene raziskav in razvoja, kjer si želimo poustvariti čim bolj biorelevantno okolje, ki nam omogoča visoko stopnjo *in vitro-in vivo* korelacije. V ta namen se poslužujemo uporabe kompleksnih *in vitro* modelov in metod, s katerimi lahko dosegamo visoko *in vivo* napovedno moč.

Glavni cilj magistrske naloge je bil opredeliti uporabnost novega *in vitro* modela, razvitega v podjetju Lek d.d. Ljubljana, ki posnema črevesno gibanje, za sproščanje trdnih peroralnih farmacevtskih oblik v črevesu. S tem namenom smo preskusili sproščanje učinkovine iz treh formulacij hidrofilnih ogrodnih tablet z različnimi kinetikami sproščanja (hitra, srednje hitra, počasna formulacija) in iz referenčnega zdravila. Pri ogrodni tableti je učinkovina porazdeljena v ogrodju, ki nam, v primerjavi z oblikami s takojšnjim učinkom, omogoča nadzorovano sproščanje skozi daljše časovno obdobje.

Ovrednotili smo pet različnih metod za izvedbo preskusa sproščanja. V acetatnem pufru pH-4,5 (program P03), kjer smo preverjali vpliv pH na sproščanje učinkovine, je le-to potekalo hitreje kot pri drugi primerljivi metodi (fosfatni pufer pH-6,8, program P04) zaradi večje topnosti oziroma hitrosti raztapljanja modelne učinkovine. V umetnem črevesnem soku, ki posnema pogoje na tešče (FaSSIF), smo dosegli najmanjša razlikovanja med formulacijami z različnimi kinetikami sproščanja in najmanjše ujemanje z *in vivo* opaženo kinetiko (razmerja med deleži sproščene učinkovine iz testnih formulacij in reference). Dodatek NaCl fosfatnemu pufru oziroma povišanje ionske jakosti je zaradi izsoljevanja upočasnilo sproščanje učinkovine v primerjavi s pufrom brez dodatka NaCl.

Pri vseh preskušanih medijih oziroma metodah smo z modelom uspeli doseči razlikovanja med formulacijami z različnimi kinetikami sproščanja. Kot najboljša za izbrano formulacijo se je izkazala metoda s kalijevim fosfatnim pufrom pH-6,8 in programom P12, saj smo na ta način dosegli največje ujemanje z *in vivo* opaženo kinetiko. Prav tako smo z metodo dosegli boljše ujemanje z *in vivo* razmerji kot s klasično napravo z vesli (USP II).

S predstavljenim primerom želimo prikazati uporabnost in fleksibilnost naprave oziroma novega *in vitro* modela, za katerega pričakujemo, da bo lahko uspešno simuliral sproščanje tudi drugih podobnih formulacij.

Ključne besede

preskus sproščanja, *in vitro* model, biorelevanten, ogrodna tableta, ionska jakost

ABSTRACT

Dissolution testing of oral dosage forms is usually performed either for quality control purposes testing the compliance of batches or for research and development purposes simulating a biorelevant environment that allows high degree of *in vitro-in vivo* correlation. For this purpose we use complex *in vitro* models and methods that reach a high level of *in vivo* prediction.

The main objective of this master's thesis has been to assess the efficacy of a new *in vitro* model developed at Lek d.d. Ljubljana simulating the movement of human intestine for evaluation of dissolution of oral dosage forms in human intestine. Therefore, we performed dissolution testing of three different hydrophilic matrix tablets with different release kinetics (fast, medium and slow release) and a reference product. In a matrix tablet the active ingredient is distributed in the matrix allowing for a controlled release over a longer time period compared to an immediate release form.

We evaluated five different methods for dissolution testing. Acetate buffer pH-4,5 (program P03) where we examined the influence of pH on the release of the active ingredient showed a faster release rate in comparison to the other equivalent method (phosphate buffer pH-6,8, program P04) due to its higher solubility in acidic environment. Fasted state simulated intestinal fluid showed the least discrimination between formulations with different release rates as well as the greatest discrepancy to *in vivo* observed kinetics (test formulations/reference ratios from *in vivo* study). Due to salting out, addition of NaCl to phosphate buffer (increase in ionic strength) reduced release rates as compared to a buffer without addition of NaCl.

The model was able to show discrimination between formulations with different release kinetics in all tested media. Owing to the greatest correlation with *in vivo* observed kinetics the method with phosphate buffer pH-6,8 and program P12 was established as the best formulation. Compared to the conventional USP II paddle method, the aforementioned method showed better correlation to observed *in vivo* ratios.

The presented case aims to show efficacy and flexibility of the method and the novel *in vitro* model which is expected to successfully simulate dissolution of other similar formulations.

Keywords

dissolution testing, *in vitro* model, biorelevant, matrix tablet, ionic strength

SEZNAM OKRAJŠAV

BCS – biofarmacevtska klasifikacija (ang. Biopharmaceutics Classification System)
EMA – Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency)
FaSSIF – umetni črevesni sok, ki posnema pogoje na tešče (ang. Fasted State Simulated Intestinal Fluid)
FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
FeSSIF – umetni črevesni sok, ki posnema pogoje po obroku (ang. Fed State Simulated Intestinal Fluid)
FIP – Mednarodna zveza farmacevtov (fr. Fédération Internationale Pharmaceutique)
FO – farmacevtska oblika
GIT – gastrointestinalni trakt
HPC – hidroksipropilceluloza
HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High-performance Liquid Chromatography)
HPMC – hidroksipropilmetilceluloza
IVIVC – *in vitro-in vivo* korelacija (ang. *In vitro-In vivo* Correlation)
MM – molekulska masa
MMC – migrirajoč motorični kompleks
Ph. Eur – Evropska farmakopeja (ang. European Pharmacopoeia)
QC – kontrola kakovosti (ang. Quality Control)
R&D – raziskave in razvoj (ang. Research and Development)
RSD – relativna standardna deviacija
SD – standardna deviacija
USP – Ameriška farmakopeja (ang. United States Pharmacopeia)
USP I – naprava s košarico
USP II – naprava z vesli
USP III – naprava z recipročnimi valji
USP IV – naprava s pretočno celico
UV – ultravijolična svetloba
VIS – vidna svetloba
ZU – zdravilna učinkovina

1. UVOD

1.1. Preskus sproščanja

Sproščanje učinkovine v fiziološkem okolju je začetni dogodek v procesu absorpcije le-te v primeru peroralnih farmacevtskih oblik (FO), saj zgolj raztopljena učinkovina prehaja fiziološke membrane. Proces oziroma hitrost sproščanja opisuje enačba, ki upošteva Noyes Whitney-evo enačbo in Fickov zakon difuzije:

$$DR = \frac{A \times D}{\delta} \times \left[\frac{C_s - X_d}{V} \right].$$

DR je hitrost sproščanja, A je površina, iz katere poteka sproščanje, D je difuzijski koeficient učinkovine, δ je debelina difuzijske plasti, C_s je topnost učinkovine, X_d je količina učinkovine v raztopini in V je volumen medija (raztopine) (1). Proces sproščanja je kritičen dejavnik v primeru slabo topnih učinkovin oziroma dobro permeabilnih učinkovin (razred I in II po biofarmacevtski klasifikaciji - BCS), saj preko topnosti in hitrosti raztapljanja neposredno vpliva na biološko uporabnost učinkovine ter posledično na njen učinek (2).

Preskus sproščanja peroralnih FO se običajno izvaja bodisi za namene kontrole kakovosti (QC), kjer preverjamo skladnost izdelka in proizvodnje (npr. skladnost serij), bodisi za namene raziskav in razvoja (R&D), kjer želimo poustvariti čim bolj biorelevantno okolje, ki nam omogoča visoko stopnjo *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVC). Pojem IVIVC predstavlja matematičen model, ki opisuje razmerje med *in vitro* lastnostjo FO (običajno profil sproščanja) in njenim *in vivo* odzivom (običajno plazemska koncentracija) (2, 3).

1.2. Pregled obstoječih testov in metod za preskus sproščanja

V primeru preskusov sproščanja za namene preverjanja QC si uspešno pomagamo z enostavnejšimi metodami, pri katerih si želimo, da omogočajo odkrivanje razlik med serijami. Kadar pa gre za razvoj FO, se poslužujemo kompleksnih metod, ki nam omogočajo bolj biorelevantno preskušanje (2, 3).

1.2.1. Konvencionalne farmakopejske metode

Ameriška farmakopeja (USP) navaja štiri različne naprave, ki so namenjene izvajanju preskusa sproščanja peroralnih FO. Naprava s košarico (USP I) in naprava z vesli (USP II) sta bili začetni in se nista bistveno spremenili že od leta 1970. Sta enostavni za uporabo, kar predstavlja prednost pri testiranju QC farmacevtskih izdelkov, njuna pomanjkljivost pa je slaba oziroma majhna podobnost *in vivo* pogojem. Napravi z recipročnimi valji (USP III) in naprava s

pretočno celico (USP IV) že omogočata lažje menjavanje medijev in posledično boljše simuliranje pogojev vzdolž gastrointestinalnega trakta (GIT) (3, 4).

Naprava s košarico (USP I) in naprava z vesli (USP II)

Naprava s košarico in naprava z vesli sta še vedno najpogostejše uporabljene zaradi svoje praktičnosti in robustnosti. USP I vsebuje košarico, v katero vstavimo FO, medtem ko je osnovni sestavni del USP II veslasto mešalo, FO pa je potopljena na dno posode. Košarica in veslo sta pritrjena na osrednjo os, ki se vrti in tako povzroča mešanje medija.

Volumen medija je med 500-1000 mL (največkrat 900 mL), da so zagotovljeni zelo razredčeni (»sink«) pogoji (hitrost raztapljanja je neodvisna od koncentracije že raztopljene učinkovine), vendar pa ti volumni niso *in vivo* relevantni, saj volumen tekočine v želodcu na tešče redko preseže 250 mL, šele po obroku pa se lahko približa 1 L. Na to moramo biti še posebej pozorni pri testiranju slabo topnih učinkovin, saj nas lahko visoki volumni pripeljejo do zaključka, da se učinkovina raztaplja precej bolje kot se v dejanskem fiziološkem okolju.

Hitrost mešanja je običajno 100 obratov/min pri USP I in 50 ali 75 obratov/min pri USP II. Hidrodinamika je problematična, saj ne posnema realnega fiziološkega vzorca gibanja tekočin, prav tako znatno variira znotraj posode za raztapljanje. Pride lahko do pojava efekta stožca, ko delci z dovolj visoko gostoto tvorijo gmoto na dnu posode, ki zavira mešanje in raztapljanje. Pojavu se lahko izognemo s povečano hitrostjo mešanja 75-100 obratov/min (USP II) ali z uporabo »peak vessel« posod.

Obe napravi sta primerni za vse peroralne FO s takojšnjim in kontroliranim sproščanjem. V primeru kapsul ali določenih vrst ogrodnih tablet uporabimo aparaturo s košarico, ki preprečuje lebdenje kapsule na površini medija, ali pa si pomagamo s posebno utežjo (ang. »sinker«), ki drži kapsulo v mediju (4, 5).

Naprava z recipročnimi valji (USP III)

Naprava vsebuje posodo v obliki valja z mrežico na spodnji (in opcijsko zgornji) strani, kamor je vstavljena FO. Valjasta posoda se vertikalno pomika v posodo z medijem, ki je postavljena v vodno kopel.

Pri metodi uporabimo do 250 mL medija, kar nam ne zagotavlja zelo razredčenih pogojev, vendar pa bolje posnema fiziološke razmere. Zelo razredčene pogoje oziroma večji volumen uporabljenega medija lahko dosežemo s pogostejšim menjavanjem posod z medijem, kar je pri tej aparaturi precej enostavno.

Hidrodinamika je zagotovljena z recipročnim pomikanjem valja v in iz posode (običajna frekvenca 10-25 /sek), tok tekočine pa lahko nadzorujemo s spreminjanjem velikosti por v mrežici, ki je na dnu valja. Pri tem moramo paziti, da pore niso prevelike, saj bi lahko v primeru uporabe pelet le-te uhajale iz cilindra in prenos v naslednji medij ne bi bil več mogoč. V primerjavi z USP I in USP II tukaj nimamo hidrodinamske mrtve cone, ampak moramo paziti, da se nerazpadla FO ne lepi na valj ali uhaja skozi njega.

Aparatura je primerna za širok nabor peroralnih FO, še posebej za oblike s prirejenim sproščanjem in gastrozistentne oblike, saj lahko z enostavnim menjavanjem medijev posnemamo razmere skozi različne dele GIT (4).

Naprava s pretočno celico (USP IV)

Sistem je sestavljen iz posode z medijem (postavljena v vodno kopel), črpalke in pretočne celice. Črpalka (standardni pretoki 4, 8, 16 mL/min) potiska medij skozi celico, ki je postavljena navpično in v kateri se nahaja FO. Pretočna celica ima dno v obliki narobe obrnjenega stožca in je napolnjena s steklenimi kroglicami, s katerimi zagotavljamo enakomeren in čim bolj laminaren tok. Na vrhu celice je filter, ki preprečuje uhajanje neraztopljenih delcev iz celice. Naprava lahko deluje kot odprt sistem, kjer skozi celico stalno dovajamo svež medij, ali kot zaprt sistem, kjer določen volumen medija kroži skozi celico.

Ker aparatura omogoča simulacijo različnih pogojev vzdolž GIT, je največkrat uporabljena za vrednotenje FO s prirejenim sproščanjem. Čeprav naprava omogoča hidrodinamsko gibanje precej podobno fiziološkemu, trenutno v farmakopeji še ni preparata, kjer bi bila USP IV predpisana kot prva izbira za preskus sproščanja (4).

1.2.2. Alternativni preskusi sproščanja

V času razvoja konvencionalnih preskusov sproščanja ni bilo toliko znanega o gastrointestinalni motiliteti, časih prehodov, mehanskih obremenitvah in hidrodinamskem gibanju tekočine, kot je sedaj. Z razvojem neinvazivnih diagnostičnih tehnik pa je bilo omogočeno proučevanje in boljše poznavanje naštetih parametrov. Prav tako je postalo očitno, da mehanika gibanja in z njo povezani dejavniki lahko bistveno vplivajo na kinetiko sproščanja in absorpcijo učinkovine. Še posebej je to pomembno pri FO s podaljšanim sproščanjem, ki prehajajo GIT v nerazpadli obliki in so zato izpostavljene ostrim pogojem vzdolž celotnega prebavnega trakta (4, 6).

Novejše alternativne metode za preskušanje sproščanja, ki upoštevajo rezultate raziskovanja fizioloških gastrointestinalnih pogojev, so bile razvite v zadnjih desetletjih. Medtem ko so statični sistemi enostavnejši in omogočajo proučevanje zgolj določenih *in vivo* pogojev, so

dinamični sestavljeni sistemi kompleksnejši in omogočajo vrednotenje tako mehanskih kot kemijskih funkcij GIT (4).

1.2.3. Enostavni statični sistemi

Naprava z vesli z dodatkom polistirenskih kroglic

V napravo z vesli so dodali kroglice iz polistirena, da bi ponazorili učinek mehanske obremenitve v GIT. Premer kroglic znaša 6,35 mm, gostota 1,05 g/cm³, z njihovim številom (500-4000) pa lahko reguliramo mehansko silo, ki ji je tableta izpostavljena. Prav tako je možno v posodo vstaviti kateter z manometrom, ki nam omogoča spremljanje mehanskih obremenitev preko merjenja tlaka (7).

Mehanska obremenitev s steklenimi kroglicami

Gre za modifikacijo preskusa sproščanja na napravi z vesli. Po eni uri testa vzamemo FO iz posode in jo izpostavimo mehanski obremenitvi. Prenesemo jo v 50 mL epruveto s 60 g steklenih kroglic (4 mm premera in 2,5 g/cm³ gostote) in z 2 mL vode. Epruveto zapremo, položimo na stranski rob in vodoravno stresamo 10 min na stresalniku. Po koncu stresanja vso vsebino epruvete vrnemo v posodo za raztapljanje in nadaljujemo s testom (8).

Naprava z vrtečo se čašo

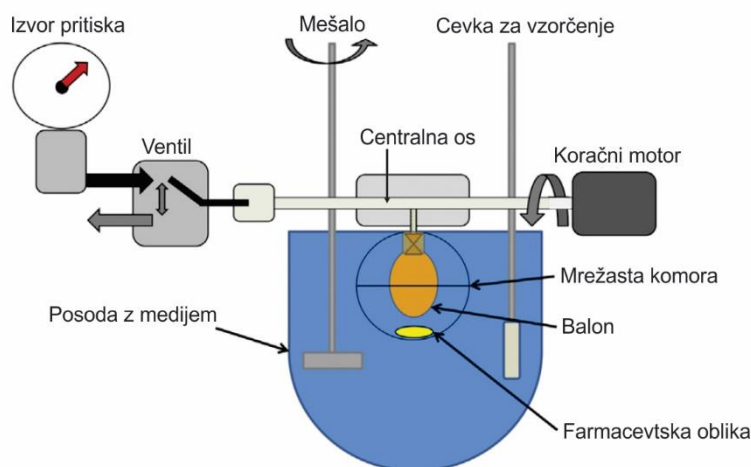
Na podlagi magnetno-resonančnega slikanja želodca in številnih simulacij tekočinske dinamike so določili strižne sile, ki delujejo na tableto, ko se skupaj s hrano giblje znotraj želodca. Ugotovili so visoko korelacijo med strižnimi silami, ki deluje na površino tablete in erozijo tablete. Zato so izdelali napravo, s katero se lahko dosežejo enake strižne sile na hidrofilne ogrodne tablete, kot so tiste, katerim je tableta izpostavljena *in vivo*.

Napravo sestavlja čaša z medijem, v katerega je potopljena tableta, ki je togo pritrjena na trdo jekleno žico. Čaša je pritrjena na osrednji drog, ki ji omogoča vrtenje s hitrostjo 8-50 obratov na minuto, tako da se okoli tablete ustvarja kontroliran in predviden tok tekočine. S spreminjanjem viskoznosti medija in hitrosti vrtenja čaše lahko dosežemo strižne sile, ki so bolj *in vivo* relevantne v primerjavi z napravama USP I in USP II (9).

Naprava za simulacijo stresnih pogojev v GIT

Aparatura je sestavljena iz mrežaste okrogle komore, v katero je vstavljena FO (Slika 1). Komora je pritrjena na centralno rotirajočo se os, ki leži vodoravno nad posodo z medijem in z rotiranjem povzroča, da je komora enkrat potopljena v mediju, drugič pa v zraku. V komori se

nahaja balonček, ki ga napihnemo s pomočjo stisnjenega zraka ter tako ustvarimo obremenitev na tableto ali pa izpraznimo. V posodo za raztapljanje je vstavljeno mešalo in cevka za vzorčenje.



Slika 1: Shematski prikaz naprave za simulacijo stresnih pogojev GIT; prirejeno po (4)

Pri preskusu se izmenjujeta mirovna in stresna faza. V mirovni fazi je komora s tableto potopljena v medij za raztapljanje, centralna os se ne premika, premika se samo mešalo. Sledi stresna faza, ki je sestavljena iz 3 zaporednih napolnitev balona in 1 minute rotacije centralne osi s frekvenco 100 obratov/min. Stresna faza predstavlja prehod FO iz želodca v dvanajstnik ter prehod FO skozi ileocekalno zaklopko. Mirovna faza predstavlja transport skozi tanko črevo, rotacije centralne osi pa povzročijo, da tableta ni ves čas v stiku z medijem, kar se dogaja tudi v *in vivo* okolju. Naprava tako omogoča posnemanje ostrih pogojev pri prehodu FO skozi GIT in je še posebej primerna za oblike s podaljšanim sproščanjem (10).

Kombinacije naprave USP III in plastičnih kroglic

Gre za kombinacijo aparature z recipročnimi cilindri (USP III) in plastičnih kroglic, ki je bila razvita v podjetju Lek d.d. Ljubljana. V vsako posodo (cilinder) damo 8 g kroglic premera 8 mm in gostote $1,1 \text{ g/cm}^3$, tako da zavzemajo približno $\frac{1}{4}$ prostora v cilindru. Gostota kroglic, ki je podobna gostoti medija, omogoča njihovo ustrezno gibanje pri različnih hitrostih pomakanja in pogoste interakcije le-teh s FO. Hitrost pomakanja je nastavljena na 20-25 potopov/min, po 60-90 min pa hitrost za 10-15 minut povišamo na 40 potopov/min ter tako simuliramo obremenitve v času želodčnega praznjenja.

Naprava se je izkazala kot primerna za simulacijo mehanskih obremenitev v GIT, še posebej za ogrodne tablete, kjer je omogočila boljša razlikovanja različnih formulacij med sabo v primerjavi z napravama USP I in USP II ter dobro IVIVC (11, 12).

Pretočni sistem s steklenimi kroglicami

Tudi ta naprava je bila razvita v Sloveniji, natančneje na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Napravo predstavlja steklena čaša (150 mL), v katero vstavimo steklene kroglice in cilindričen magnet, ki omogoča mešanje vsebine na magnetnem mešalu. Volumen medija v čaši je 40 mL, peristaltična črpalka pa skrbi za dotok svežega medija in za črpanje medija z raztopljeno učinkovino iz čaše. Pretok je v obeh primerih enak (2 mL/min), tako da je zagotovljen konstanten volumen medija v čaši. Med mešanjem je trdna FO v kontaktu s slojem kroglic, ki tvori nekakšno gmoto pred magnetom, ki povzroča premikanje kroglic. Mehansko obremenitev, ki ji je podvržena FO in posnema ostre pogoje v GIT, lahko nadziramo s spreminjanjem jakosti mešanja (50-150 obratov/min) in števila kroglic (20-70 g) (13).

1.2.4. Dinamični sestavljeni sistemi

Model umetnega želodca in dvanajstnika

Aparatura je sestavljena iz dveh komor, od katerih prva predstavlja želodec in druga dvanajstnik. V vsaki komori je veslasto mešalo, sistem pa vsebuje 5 črpalk, ki skrbijo za transport tekočine. Prva črpalka v želodec dovaja vodo, druga svež želodčni medij, tretja črpa medij iz želodca v dvanajstnik, četrta dovaja svež črevesni medij v dvanajstnik in peta prazni dvanajstnik. Obe komori sta povezani z UV-VIS spektrofotometrom, ki omogoča sprotne merjenje koncentracije učinkovine.

Model predpostavlja, da je koncentracija učinkovine v dvanajstniku sorazmerna njeni biološki uporabnosti zaradi dejstva, da se večina absorpcije zgodi v dvanajstniku in jejunumu. Naprava nam omogoča spremljanje procesov raztapljanja, obarjanja, ponovne kristalizacije in ponovnega raztapljanja, zato je sistem primeren predvsem za učinkovine razreda BCS II in soli slabo topnih učinkovin, ki imajo tendenco do obarjanja pri prehodu iz želodca v tanko črevo zaradi spremembe pH (14, 15).

Dinamični model želodca

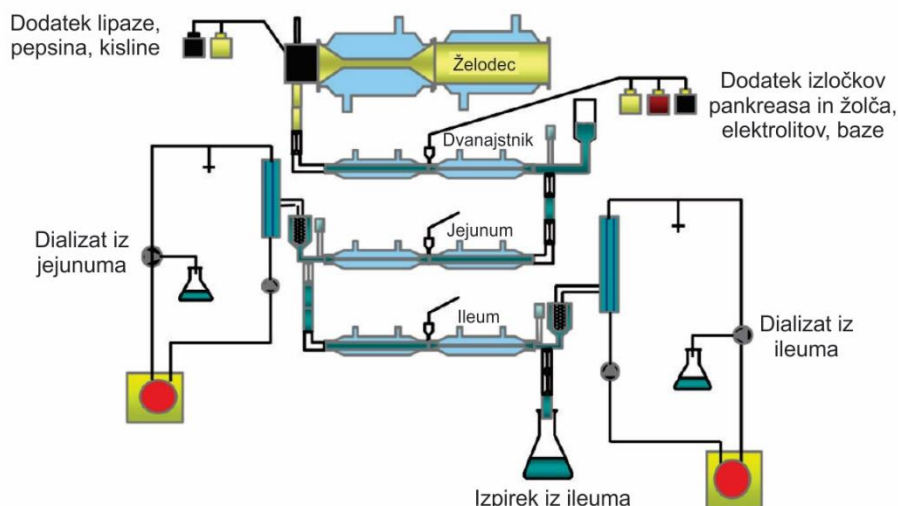
Sistem je sestavljen iz treh delov: glavni del (fundus), antrum in zaklopka. Glavni del je elastična membrana v obliki stožca in dovoljuje razteg do volumna 800 mL, odvisno od količine dodane hrane. Na vrhu stožca je nameščena zanka z luknjicami, skozi katere lahko dovajamo medij (želodčno kislino) in encime. Cel sistem se nahaja v vodni kopeli (37 °C), preko vode pa ustvarjamo pritisk, ki se preko elastične membrane prenese na vsebino želodca in omogoča njeno mešanje. pH elektrode nam omogočajo sprotne merjenje pH in njegovo regulacijo z

dodajanjem kislega želodčnega medija. Antrum je v obliki valja in vsebuje elastičen obroček, ki ga lahko premikamo skozi valj ter tako dosežemo mešanje in strižne obremenitve. Volumen valja oziroma antruma in premikanje vsebine reguliramo z batom, ki je vstavljen v valj, prav tako nam omogoča praznjenje želodca (vzorčenje), tako da iztisne vsebino skozi izhodno odprtino.

Dinamični model želodca nam omogoča vzpostavitev pogojev (mešanje, strižne obremenitve, peristaltika, čas zadrževanja v želodcu), ki naj bi bili blizu *in vivo* pogojem. Prav tako lahko v medij kontrolirano dodajamo encime in želodčni medij ter tako spreminjamo pH. Testiramo lahko pogoje s hrano različnih volumnov, viskoznosti ali kaloričnih vrednosti (16, 17).

Gastrointestinalni model TIM

TIM-1 je računalniško voden model zgornjega GIT, ki omogoča simulacijo fizioloških razmer v želodcu in tankem črevesu, kot so dinamika mešanja, praznjenje želodca, čas prehoda skozi črevo, pH, telesna temperatura ter sestava in aktivnost gastrointestinalnih izločkov. Sestavljen je iz 4 delov, ki predstavljajo želodec, dvanajstnik, jejunum in ileum (Slika 2). Vsak posamezen del sestoji iz dveh zaporednih steklenih komor, kamor sta vstavljeni elastični membrani, ki predstavljata steno GIT. V komorah okoli membrane je voda, s katero termostatiramo sistem, prav tako pa služi aplikaciji pritiska na elastične membrane, da poustvarimo peristaltične kontrakcije in posledično premešamo vsebino. Prehod vsebine reguliramo z odpiranjem in zapiranjem peristaltičnih zaklopk, ki se nahajajo med posameznimi deli sistema. Omogočeno je kontroliranje pH v predelu želodca in dvanajstnika ter dodajanje želodčnih encimov, elektrolitov, izločkov žolča in trebušne slinavke. Iz predela jejunuma in ileuma se neprekinjeno odstranjujejo majhne molekule in voda s sistemom dialize ali membranske filtracije, kar nam omogoča določanje biološke uporabnosti peroralnih FO. Sistemu je mogoče dodati TIM-2, ki simulira fiziološke pogoje debelega črevesa, tako da lahko FO testiramo vzdolž celotnega GIT. Model TIM-1 je bil največkrat uporabljen za preučevanje presnove hrane in biološke uporabnosti različnih hranil. Kljub temu večina študij, ki so bile narejene s FO, potrjuje dobro korelacijo z *in vivo* podatki. Testiramo lahko peroralne FO s takojšnjim sproščanjem, oblike s podaljšanim sproščanje, možno pa je tudi preučiti obnašanje učinkovin iz razreda BCS II. Vse te možnosti testiranja in modifikacij sistema dajejo modelu veliko prednosti v primerjavi s konvencionalnimi napravami (4, 18).



Slika 2: Shematski prikaz gastrointestinalnega TIM-1 modela; prirejeno po (19)

Inženirski (konstruiran) model želodca in tankega črevesa

Gre za najnovejši doprinos k dinamičnim sestavljenim *in vitro* testom. Računalniško voden model omogoča posnemanje fizioloških razmer v želodcu in tankem črevesu, kot so pH, časi prehodov, mešanje vsebine, gastrointestinalni izločki in pasivna absorpcija prebavnih produktov. Sistem je sestavljen iz 6 zaporednih prostorov: rezervoar za hrano, prostor s slino (hrana se pomeša s slino), želodec in trije deli tankega črevesa (dvanajstnik, jejunum, ileum). Peristaltične črpalke skrbijo za pomikanje vsebine vzdolž sistema, prav tako črpajo slino v prostor za mešanje hrane s slino, encime (pepsin, lipaza) in HCl v želodec, žolč, izločke trebušne slinavke in elektrolite v dvanajstnik ter NaHCO_3 v dele tankega črevesa. Omogočeno je reguliranje pH, jejunum in ileum pa sta opremljena z dializnim sistemom za pasivno absorpcijo vode in presnovnih produktov.

Želodec je sestavljen iz osrednje komore in 2 batov, ki vsak s svoje strani potiskata želodčno vsebino skozi tesno odprtino v komori ter jo izpostavljata mehanskim obremenitvam in hkrati mešata. V osrednji komori se nahaja vdolbina oziroma luknjica, skozi katero lahko prehajajo delci manjši od 2 mm in tekočina, medtem ko večji delci in ostala tekočina ostajajo v komori. 2 peristaltični črpalke poganjata želodčno vsebino proti tankemu črevesu, ena je odgovorna za tekočo fazo, druga za trdo fazo. Črpalke delujeta vsaka po svojem posebnem programu, ki sta bila zasnovana glede na *in vivo* podatke. Tudi vsi ostali parametri *in vitro* testa so regulirani tako, da čim bolj posnemajo realno fiziološko okolje.

Sistemu je priložena perforirana košarica, v katero vstavimo FO in je namenjena gastrerezistentnim oblikam in oblikam s prirejenim sproščanjem, saj le-te ne razpadejo v

želodcu in/ali so prevelike, da bi same prehajale med zaporednimi prostori. Košarico lahko predstavljamo iz enega prostora v drugega ali odstranimo v vsakem trenutku eksperimenta za namene analize (20).

1.2.5. Mediji za izvedbo preskusa sproščanja

Evropska farmakopeja (Ph. Eur.) ne predpisuje točne sestave medijev za izvedbo preskusa sproščanja trdnih FO, navedeni pa so priporočeni mediji, med katerimi najbolj optimalnega izberemo na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine (ZU) in pomožnih snovi ter glede na pogoje, ki jim bo FO izpostavljena po aplikaciji (21). Evropska agencija za zdravila (EMA) priporoča pufre s pH vrednostmi 1,2 (HCl z dodanim NaCl ali umetni želodčni sok), 4,5 (fosfatni ali acetatni pufer) in 6,8 fosfatni pufer ali umetni črevesni sok), ki posnemajo fiziološke medije v človeškem GIT (22). Podobna priporočila glede uporabe medijev za izvedbo preskusa sproščanja navaja tudi Ameriška farmakopeja (USP) (5).

Takšni mediji so rutinsko uporabljeni za namene preverjanja QC, saj so dobro poznani, široko uporabni ter enostavni za pripravo. V primeru, da želimo bolj *in vivo* relevantne pogoje, Mednarodna zveza farmacevtov (FIP) priporoča uporabo dveh biorelevantnih medijev: umetni črevesni sok, ki posnema pogoje na tešče (FaSSIF) in umetni črevesni sok, ki posnema pogoje po obroku (FeSSIF) (23).

1.3. Tanko črevo

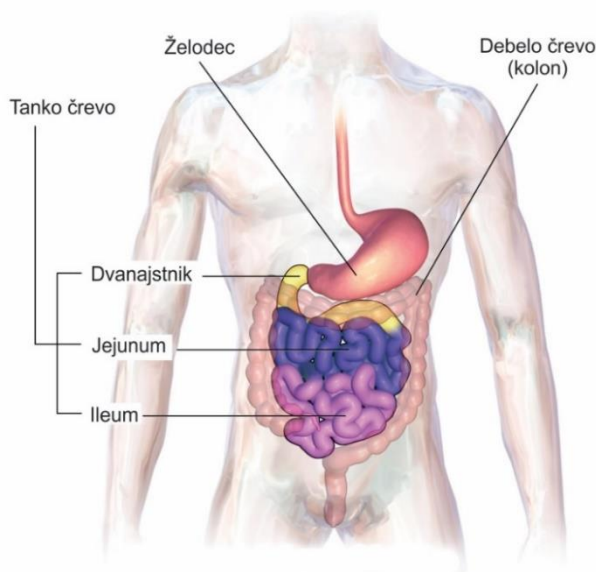
1.3.1. Anatomske značilnosti

Tanko črevo je 6-7 m dolga zvita cev, ki se začne za piloričnim sfinktrom in konča z ileocekalno zaklopko. Sestavljajo jo 3 strukturne enote: dvanajstnik, jejunum in ileum (Slika 3).

Dvanajstnik meri približno 25 cm v dolžino. Vanj se preko žolčnega izvodila izločajo žolčne kisline, preko izvodila trebušne slinavke pa encimi trebušne slinavke. Dvanajstniku sledita jejunum, dolžine okoli 2,5 m in ileum, dolžine okoli 3,6 m. Ileum se konča z ileocekalno zaklopko, kjer se spaja z debelim črevesom (24, 25). Premer tankega črevesa v povprečju znaša 3,5-6 cm v dvanajstniku, 2,5-4 cm v jejunumu in 2-3,8 cm v ileumu (26).

Absorpcija ZU redko poteka v želodcu, zaradi majhne površine za absorpcijo in kratkega časa zadrževanja. Povsem drugače je v tankem črevesu, ki je zato glavno mesto absorpcije učinkovin. Že sama dolžina tankega črevesa je razlog za veliko absorpcijsko površino, največjo razliko pa ustvarijo modifikacije v steni tankega črevesa, črevesne gube, črevesne resice in ščetkasti obronki, ki povečajo površino za približno 600-krat v primerjavi z votlo, plosko cevjo

enake dolžine in premera. Največja gostota teh modifikacij je v jejunumu, manj v ileumu, zato se v jejunumu izvrši večji del absorpcije. Skupna absorpcijska površina v tankem črevesu tako znaša okoli 200 m² (24, 27).



Slika 3: Anatomija tankega črevesa; prirejeno po (28)

1.3.2. Fiziološki pogoji v tankem črevesu

Vsebina v začetnem delu tankega črevesa je sestavljena iz himusa, ki pride iz želodca ter izločkov iz jeter, trebušne slinavke in stene črevesa. Trebušna slinavka izloča bikarbonat ter prebavne encime proteaze, amilaze in lipaze, medtem ko jetrni izločki vsebujejo žolčne soli, fosfolipide, bikarbonat, holesterol, žolčne pigmente in organske ostanke (27).

Volumen tekočine

Volumen tekočine v tankem črevesu je odvisen od tekočine, ki pride iz želodca, absorpcije skozi steno črevesa in časa prehoda črevesa (27), njen volumen na tešče pa v povprečju znaša okoli 100 mL. Po obroku se volumen tekočine zmanjša, saj se v tankem črevesu začne absorpcija nizkomolekularnih ogljikovih hidratov, ki za sabo potegnejo tudi vodo (3).

Tekočina v tankem črevesu ni homogeno razporejena na enem mestu, ampak tvori tekočinske žepke. Mudie in sodelavci so ugotovili, da je v tankem črevesu na tešče v povprečju 8 tekočinskih žepkov s povprečnim volumnom 4 mL, po vnosu 240 mL vode pa se njihovo število poveča na 16 s povprečnim volumnom 5 mL (29). Zato lahko sklepamo, da je FO v kontaktu z manjšim volumnom tekočine, kot je celoten volumen tekočine v črevesu, oziroma da FO sploh ni ves čas v kontaktu s tekočino (27). Po obroku se število žepkov poveča njihov volumen pa zmanjša, kar sovпада s trditvijo, da se volumen tekočine v črevesu po obroku zmanjša (30).

pH vrednosti

Povprečne pH vrednosti v tankem črevesu so prikazane v Tabeli 1. Številni faktorji, kot so stanje glede na obrok hrane (pred ali po obroku), čas v dnevu, volumen gastrointestinalnih izločkov ter velikost in vsebina obroka, vplivajo na pH v GIT, prav tako se le-ta spreminja vzdolž črevesa (27).

Tabela 1: pH vrednosti v tankem črevesu (3)

	Dvanajstnik	Jejunum	Ileum
pH vrednost na tešče	6,5	6,6-6,8	6,8-8,0
pH vrednost po obroku	okoli 5 *		

* Po obroku pH vrednosti počasi padajo zaradi dotekanja kisle želodčne vsebine in dosežejo vrednosti okoli 5 tri ure po obroku. Nato se vrednosti počasi vrnejo na prvotno raven (3).

1.3.3. Mehanika gibanja v tankem črevesu

Mišice tankega črevesa premešajo himus iz želodca z izločki žolča, trebušne slinavke in stene črevesa. Prav tako skrbijo za premikanje hrane vzdolž črevesa skozi ileocekalno zaklopko do debelega črevesa (24).

Gibanje tankega črevesa lahko razdelimo na segmentacijo, ki je odgovorna za mešanje črevesne vsebine ter peristaltično gibanje, ki skrbi za premikanje vsebine proti debelemu črevesu. Ta delitev je umetna in je namenjena zgolj lažjemu razumevanju, kajti realno sta oba vzorca gibanja vsaj do neke mere prisotna v vsakem trenutku (31).

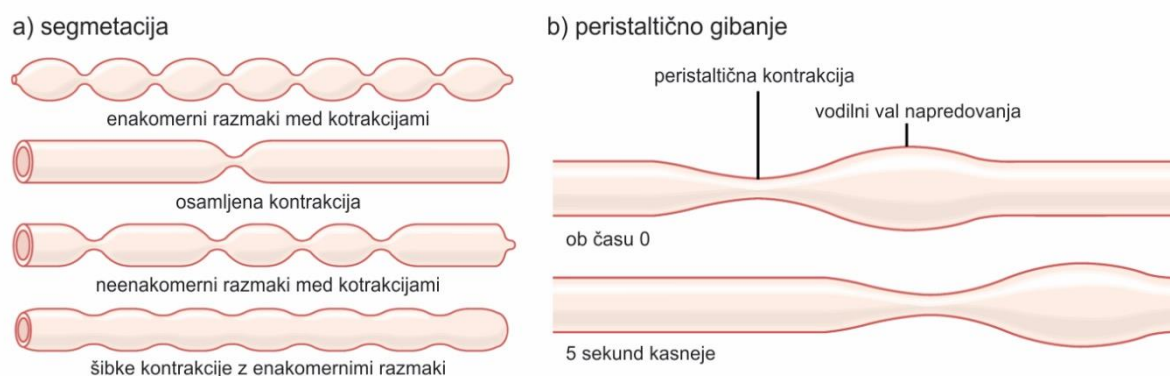
Segmentacija

Razteg stene tankega črevesa je stimulus za koncentrične kontrakcije na predelih vzdolž črevesa, ki povzročijo njeno segmentacijo (Slika 4a). Po relaksaciji prvega seta kontrakcij pride do novih kontrakcij na predelih, ki ležijo večinoma med prejšnjimi mesti kontrakcije, kar povzroči učinkovito mešanje himusa z izločki stene črevesa. Kontrakcije so pogostejše v dvanajstniku kot v ileumu, kar pripomore k premikanju vsebine vzdolž črevesa. Na ta način je omogočeno dovolj dolgo zadrževanje himusa v črevesu, da se dokonča prebava in izvrši absorpcija (24, 31).

Peristaltično gibanje

Razteg stene tankega črevesa povzroči kontrakcijo nekaj centimetrov pred stimulusom; kontrakcija nato potuje vzdolž črevesa ter tako povzroči premikanje himusa proti debelemu črevesu (Slika 4b). Peristaltičen val se premika s hitrostjo 0,5-2 cm/s (hitreje v jejunumu,

počasneje v ileumu) in običajno izzveni po 3 do 5 centimetrih (31) ter povzroči napredovanje himusa s hitrostjo 1-4 cm/min (Tabela 2).



Slika 4: Shematski prikaz segmetacijskega (levo) in peristaltičnega gibanja (desno); prirejeno po (31)

Migrirajoč motorični kompleks (MMC)

V črevesu (in želodcu) obstaja vzorec gibanja v stanju na tešče, imenovan migrirajoč motorični kompleks (MMC). MMC se začne, ko v krvi naraste koncentracija motilina, ki se v stanju na tešče sprošča v dvanajstniku. Gibanje poganja neprebavljeno hrano in odmrle enterocite proti distalnemu črevesu ter preprečuje prekomeren razrast bakterij v tankem črevesu. (24, 32).

MMC lahko razdelimo na 4 faze:

- faza I: obdobje mirovanja, v katerem kontrakcije niso prisotne, traja približno 60 minut;
- faza II: pojavljajo se občasne kontrakcije, ki postopoma postajajo bolj intenzivne; faza traja približno 40 minut;
- faza III: kratko obdobje intenzivnih kontrakcij, ki traja med 5-15 minut;
- faza IV: kratko prehodno obdobje med intenzivno fazo III in mirovno fazo I.

Faze MMC se pomikajo distalno od želodca proti terminalnemu ileumu in se ciklično ponavljajo približno vsaki 2 uri. Tako se na primer, ko faza III doseže konec ileuma, v želodcu že začne nov val faze III. Cikel se nemudoma prekine, ko v telo vnesemo obrok hrane (33).

Tabela 2: Hitrost napredovanja peristaltičnega vala, hitrost gibanja himusa, povprečni pretok in frekvenca kontrakcij v fazi III MMC v tankem črevesu (27)

	Jejunum	Ileum
Hitrost napredovanja peristaltičnega vala	0,5-2 cm/s (hitreje v jejunumu, počasneje v ileumu)	
Hitrost gibanja himusa	1-4 cm/min (hitreje v jejunumu, počasneje v ileumu)	
Povprečni pretok na tešče	0,73 mL/min	0,33 mL/min
Povprečni pretok po obroku	3,0 mL/min	2,35 mL/min
Frekvenca kontrakcij v fazi III MMC	8,5 /min	/

1.3.4. Prehod FO skozi tanko črevo

Sproščanje in absorpcija učinkovine sta v veliki meri odvisni od časa prehoda FO skozi tanko črevo. Čas prehoda skozi GIT je odvisen od dejavnikov, kot so hitrost praznjenja želodca, motiliteta in pretok, ter močno variira celo pri istem posamezniku (27, 34).

Čas prehoda tankega črevesa pa je v primerjavi s časom prehoda želodca razmeroma neobčutljiv na zunanje dejavnike in bolj konstanten. Večina literature navaja vrednosti 3-4 h, ne glede na FO in energijsko vrednost obroka. Režim odmerjanja FO bodisi na tešče bodisi skupaj s hrano ne vpliva na čas prehoda le-te skozi tanko črevo (3, 27).

1.4. Ogrodne tablete

Pri ogrodnih tabletah je ZU porazdeljena v ogrodju, ki ga tvori topna hidrofilna ali netopna lipofilna substanca (35, 36). Spadajo med peroralne FO s prirejenim sproščanjem in nam omogočajo nadzorovano sproščanje ZU skozi daljše časovno obdobje v primerjavi s FO s takojšnjim učinkom (37).

1.4.1. Prednosti in slabosti ogrodnih tablet

Zaradi podaljšanega sproščanja se zmanjša pogostost odmerjanja zdravila, izognemo se lahko nočnim odmerkom, posledično pa se poveča sodelovalnost oziroma compliance pacienta. Nadzorovano sproščanje nam omogoča konstantno koncentracijo ZU v krvi, zato se zmanjšajo nihanja le-te med odmerki in pojavnost z njimi povezanih neželenih učinkov (37).

Izdelava ogrodnih tablet je enostavna, temu primerno pa so nizki tudi stroški proizvodnje. Njihova prednost je v široki uporabnosti, prav tako lahko vanje vgradimo učinkovine z visoko molekulsko maso (MM). Z vgrajevanjem učinkovine povečamo njeno stabilnost, saj jo tako zaščitimo pred hidrolizo oziroma drugimi dejavniki v GIT, in izboljšamo biorazpoložljivost (36).

V primeru hidrofobnega ogrodja se mora ostanek ogrodja odstraniti po tem, ko se je učinkovina sprostila. Na hitrost sproščanja lahko vplivajo številni faktorji, kot so na primer hrana in časi prehodov različnih delov GIT. Ogrodni tablet ne smemo lomiti ali žvečiti (35, 36).

1.4.2. Vrste ogrodnih tablet

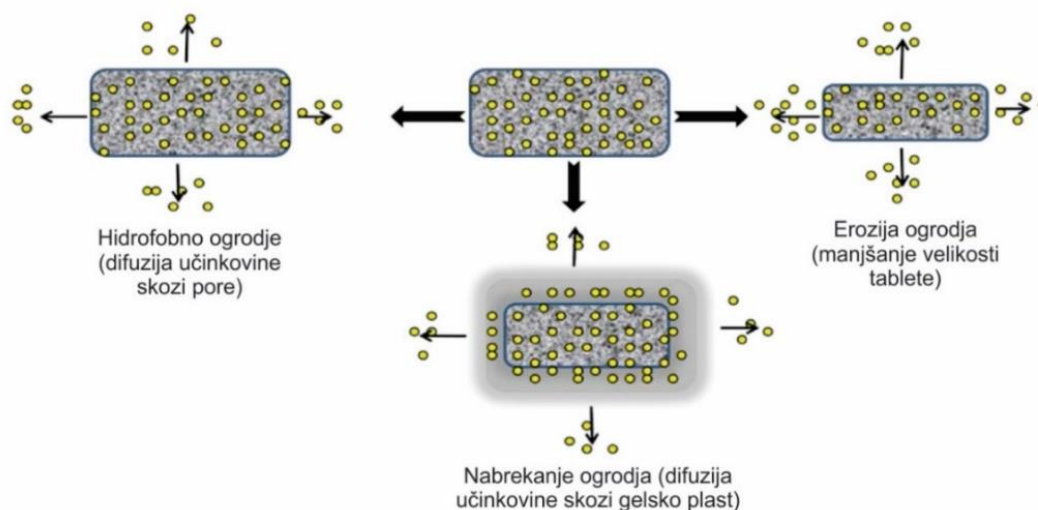
V grobem lahko ločimo 2 tipa ogrodnih tablet, odvisno od lastnosti materiala, ki ga uporabimo za izdelavo ogrodja (35).

Hidrofobno ogrodje

Glavna sestavina ogrodja je v vodi netopna in jo največkrat predstavljajo voski (npr. karnauba vosek) ali hidrofobni polimeri (npr. polietilen, celulozni derivati, akrilatni kopolimer). Takšna ogrodja so bolj primerna za dobro topne učinkovine. Sproščanje poteka z difuzijo raztopljene ZU skozi pore stisnjenih delcev polimera (Slika 5), zato je omejujoč dejavnik penetracija medija v ogrodje tablete. Z dodatkom hidrofilne substance (npr. laktoza ali hidrofilni polimer) lahko pospešimo oziroma prilagodimo sproščanje (35–38).

Hidrofilno ogrodje

Hidrofilni sistemi so zelo priljubljeni v farmacevtski industriji zaradi nizkih stroškov proizvodnje in širokih možnosti prilagajanja profilov sproščanja (35, 36). Največkrat so za ogrodje uporabljeni naslednji polimeri: hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), hidroksipropilceluloza (HPC), ksantanski gumi, poliakrilna kislina (karbopol) in alginati (37). Ko pride tableta v stik z vodnim medijem, začne le-ta prodirati v notranjost ogrodja, natančneje v prostore med verigami polimera, ki zato postanejo bolj fleksibilne. Tako pride do nastanka gelske plasti oziroma nabrekanja, kar omogoči, da se učinkovina raztopi in s pomočjo difuzije sprosti v okolico (Slika 5). Nabrekanje povzroči povečanje volumna tablete in s tem daljšo pot difuzije, na površini tablete pa prihaja do raztapljanja polimera oziroma erozije ogrodja, kar še posebej pripomore k sproščanju slabo topnih učinkovin (35).



Slika 5: Shematski prikaz različnih načinov sproščanje učinkovine iz ogrodnih tablet; prirejeno po (35)

1.4.3. Vplivi na sproščanje iz ogrodnih tablet

Dejavniki, ki vplivajo na kinetiko sproščanja iz ogrodnih tablet so prikazani v Tabeli 3.

Tabela 3: Povzetek glavnih dejavnikov, ki vplivajo na kinetiko sproščanja iz ogrodnih tablet

Polimer		Vir:
vrsta ali kombinacija polimera	Bolj hidrofilen polimer ob stiku z medijem bolj nabreka in povzroči hitrejše sproščanje. Vrsta in stopnja substitucije na stranskih verigah polimera določata hitrost hidratacije polimera in difuzijo učinkovine skozi ogrodje.	(38, 39)
viskoznost (MM)	Večja kot je viskoznost polimera (gelske plasti), počasnejše je sproščanje učinkovine.	(36, 38, 39)
koncentracija	Večja koncentracija polimera pomeni večjo viskoznost gelske plasti in posledično počasnejše sproščanje iz ogrodja.	(36, 39)
debelina difuzijske poti	Debelejša gelska plast pomeni daljšo pot difuzije in zato počasnejše sproščanje učinkovine iz FO.	(36, 37)
velikost delcev polimera	Manjši kot so delci, hitreje pride do nastanka gelske plasti in upočasnitve sproščanja. Kadar je v ogrodju velik delež polimera, velikost delcev nima znatnega vpliva na sproščanje.	(39)
Učinkovina		
topnost	Topnost učinkovine narekuje mehanizem sproščanja (dobro topne z difuzijo, slabše topne z erozijo ogrodja). Hitrost sproščanja pri slabše topnih učinkovinah je praviloma počasnejša.	(39)
MM (difuzijski koeficient)	Učinkovine z nižjo MM hitreje in lažje difundirajo skozi gelsko plast.	(39)
vsebnost	Večji delež učinkovine pospeši njeno sproščanje iz ogrodja (pri slabše topnih učinkovinah se sproščanje sprva upočasni, nato pa pospeši).	(36, 39)
Struktura tablete		
površina in volumen	Manjše kot so tablete, hitreje je sproščanje učinkovine, saj je večje razmerje med površino in volumnom.	(36, 38)
poroznost (tlak stiskanja)	Tablete narejene z velikimi hitrostmi tabletiranja imajo praviloma večjo poroznost in posledično hitreje sproščanje.	(38, 39)
pomožne snovi, polnila	Netopne pomožne snovi upočasni hitrost sproščanja; v primeru boljše topnih pride do hitrejšega sproščanja.	(39)
Medij		
pH	pH nima pomembnega vpliva na polimere celuloznega tipa. Drugače je v primeru, ko ogrodje vsebuje učinkovino, katere topnost je odvisna od pH.	(39)
ionska jakost	Prisotnost ionov upočasni sproščanje učinkovin iz celuloznih ogrodij zaradi počasnejše hidratacije polimera.	(39)
prisotnost surfaktantov	Večja površinska napetost pomeni slabšo hidratacijo.	(27)
temperatura	Višja temperatura povzroči hitreje izsoljevanje polimera in posledično počasnejše sproščanje učinkovin.	(39)
volumen	Pomemben predvsem v primerih, ko gre za slabše topne učinkovine.	(39)

2. NAMEN DELA

Glavni cilj magistrske naloge bo opredeliti uporabnost novega *in vitro* modela za sproščanje trdnih peroralnih FO v črevesu, ki je bil razvit s sodelovanjem podjetja Lek d.d. Ljubljana, oddlek *In vitro-in vivo* korelacije in Fakultete za strojništvo Univerze v Ljubljani. V ta namen bomo testirali referenčni izdelek originatorja (v nadaljevanju referenca) ter 3 različne nove testne formulacije hidrofilnih ogrodnih tablet z različno hitrostjo kinetike podaljšanega sproščanja, za katere imamo na voljo tudi *in vivo* farmakokinetične podatke. V predhodnih študijah s testnimi formulacijami je bilo ugotovljeno, da je kinetika sproščanja tisti proces, ki za našo modelno učinkovino z dobro topnostjo odločilno vpliva na kinetiko absorpcije *in vivo*. Z eksperimenti bomo pokazali, da je naprava za posnemanje črevesnega gibanja zmožna prikazati razlike v hitrosti sproščanja med različnimi formulacijami ter da imajo pridobljeni rezultati visoko napovedno moč *in vivo* sproščanja. To je še posebej pomembno v generični industriji, kjer si želimo kolikor se le da natančno predvideti obnašanje FO v *in vivo* okolju, saj lahko s tem vplivamo na zmanjšanje števila bioekvivalenčnih študij. Zato bomo pri preskusih sproščanja poskusili doseči čim boljše ujemanje z rezultati farmakokinetične študije v smislu razmerij med različnimi formulacijami in referenco.

V ta namen bomo z uporabo različnih medijev ovrednotiti njihov vpliv na sproščanje testnih formulacij. Pri preskusih sproščanja bomo uporabili sledeče medije:

- kalijev fosfatni pufer pH-6,8: najpogosteje uporabljen medij za izvajanje preskusov sproščanja,
- acetatni pufer pH-4,5: testiranje vpliva pH na sproščanje,
- FaSSIF: biorelevanten medij, ki posnema črevesne sokove na tešče; tako bomo poskušali doseči čim bolj *in vivo* relevantne pogoje v smislu kemijske sestave okolja, v katerem se nahaja tableta,
- kalijev fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl: testiranje vpliva ionske jakosti na sproščanje.

Prav tako bomo za primerjavo izvedli preskus sproščanja z nekaterimi mediji še na napravi z vesli (USP II). Profile sproščanja, ki jih bomo dobili, bomo med seboj primerjali in določili vpliv različnih dejavnikov na njihovo variabilnost.

Glede na to, da je aparatura za posnemanje črevesnega gibanja nov izum in na njej še ni bilo izvedenih veliko poskusov, bomo hkrati s testiranjem različnih medijev razvijali metodo, ki bo omogočala najbolj optimalno delovanje aparature v smislu tekočega delovanja brez prekinitev.

Istočasno bomo *in vitro* model razvijali tako, da bodo rezultati ponovljenih testiranj ob istih pogojih čim bolj ponovljivi. Prav tako bomo skušali ugotoviti, s katerimi pogoji dosežemo ustrezno napovedljiv in zaželen odziv modela.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Farmacevtska oblika

Preskušali smo sproščanje ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem. Na voljo smo imeli 3 različne formulacije, ki so bile razvite v podjetju Lek d.d., z različno hitrimi profili sproščanja: hitra, srednje hitra, počasna formulacija. Formulacije so se med seboj razlikovale glede na delež polimerov različnih viskoznosti, kar je bil razlog za njihove različne kinetike sproščanja. Prav tako smo za primerjavo preskusili sproščanje iz referenčnega zdravila.

ZU se uvršča v razred III po BCS klasifikaciji, kar pomeni, da je dobro topna v pH območju, ki je fiziološko relevantno. Njena topnost je višja v kislem okolju (40, 41).

3.1.2. Aparature

- Tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- Analitska tehnica, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- pH meter, Mettler Toledo, Greifensee, Švica
- UZ kadička, VWR, Radnor, Pensilvanija, ZDA
- Štoparica, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Nemčija
- Naprava z vesli (USP II), Pharma Test Apparatebau AG, Hainburg, Nemčija
- Pipete, Sartorius (Biohit), Göttingen, Nemčija
- HPLC sklopljen z UV sistemom, Waters, Milford, Massachusetts, USA
- Magnetno mešalo z grelcem, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- Stresalnik, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- Termometer, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, ZDA

3.1.3. Kemikalije in standardi

- KH_2PO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- NaH_2PO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Acetate Buffer pH 4.5 DILUT-IT™ (koncentrat za pripravo acetatnega pufra pH-4,5), J. T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, Pensilvanija, ZDA
- SIF Powder, Biorelevant.com, London, Velika Britanija
- NaCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- NaOH Titrisol 1 M, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

- CH₃CN, J. T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, Pensilvanija, ZDA
- MeOH, J. T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, Pensilvanija, ZDA
- Delovni standard učinkovine (p = 99,8 %)
- Pufri za kalibracijo pH metra, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Deionizirana voda

3.1.4. Ostalo

- Stokovina: čase, merilni valji, merilne bučke, stekleni čolnički, steklene palčke
- Plastične brizge, kapalke, čolnički
- Kovinske spatule, žličke
- Magnetna mešala
- Membranski filtri 0,45 µm

3.2. Metode

3.2.1. Priprava medijev za preskuse sproščanja

Kalijev fosfatni pufer pH-6,8 (0,05 M)

V 5 L plastično čašo smo nalili približno 4500 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Na plastičen čolniček smo natehtali 34,02 g KH₂PO₄ in ga kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je raztopil ves KH₂PO₄. V merilni valj smo odmerili 112 mL 1 M NaOH in ga kvantitativno prelili v čašo. pH smo po potrebi uravnali z dodatkom 1 M NaOH ali 1 M HCl na $6,8 \pm 0,05$. Raztopino smo kvantitativno prelili v 5 L merilno bučo ter jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

Acetatni pufer pH-4,5

Vsebinsko koncentrata za pripravo acetatnega pufra pH-4,5 (Acetate Buffer pH 4.5 DILUT-IT™) smo kvantitativno prenesli v 5 L merilno bučo ter dopolnili z deionizirano vodo do oznake. Raztopino smo premešali ter preverili pH.

Fasted State Simulated Intestinal Fluid

a) Priprava pufra pH-6,5:

V 1 L plastično čašo smo nalili približno 900 mL deionizirane vode, v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Na plastična čolnička smo ločeno natehtali 3,44 g

brezvodnega NaH_2PO_4 in 6,19 g NaCl ter ju kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da sta se NaH_2PO_4 in NaCl v celoti raztopila. V merilni valj smo odmerili 10,5 mL 1 M NaOH in ga kvantitativno prelili v čašo. pH smo po potrebi uravnali z dodatkom 1 M NaOH ali 1 M HCl na $6,5 \pm 0,05$. Raztopino smo kvantitativno prelili v 1 L merilno bučko ter jo z deionozirano vodo dopolnili do oznake.

b) Dodatek SIF praška:

V 1 L plastično čašo smo nalili približno 500 mL prej pripravljene raztopine (pufer pH-6,5), v čašo vstavili magnet ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Na plastičen čolniček smo natehtali 2,24 g SIF praška in ga kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je prašek popolnoma raztopil. Raztopino smo kvantitativno prelili v 1 L merilno bučko ter jo dopolnili do oznake s prej pripravljeno raztopino (pufer pH-6,5). Tako pripravljeno raztopino smo pred prvo uporabo pustili stati 2 uri, da je postala rahlo motna, šele nato smo jo uporabili.

Kalijev fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl

Najprej smo pripravili 5 L 0,05 M kalijevega fosfatnega pufera pH-6,8 po zgoraj opisanem postopku. Raztopino smo nato kvantitativno prelili v 5 L plastično čašo. Na plastičen čolniček smo natehtali 58,50 g NaCl in ga kvantitativno prenesli v čašo. Počakali smo, da se je raztopil ves NaCl.

3.2.2. Izvedba preskusa topnosti

Natančno smo natehtali približno enako količino delovnega standarda, kot je odmerek učinkovine v tableti in ga kvantitativno prenesli v 250 mL bučko ter dopolnili s 170 mL medija. V prvi bučki smo kot medij uporabili kalijev fosfatni pufer pH-6,8, v drugi pa kalijev fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl. Bučki smo fiksirali na vodoravni stresalnik in pričeli s testom. Prvih 60 min je znašala frekvenca stresanja 100 /min, nato smo jo povišali na 140 /min. Vzorčenje smo izvedli ob časovnih točkah 60, 120, 210 in 240 min, tako da smo ustavili stresanje ter s pomočjo plastične brizge in kanile iz vsake bučke vzeli 3 mL medija. Vzorec smo prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por $0,45 \mu\text{m}$ v stekleno vialo (prvi mL vzorca smo zavrgli, da smo nasitili filter). Po 4 urah smo s testom zaključili.

3.2.3. Analitika vzorcev

Odvzete vzorce smo 5-krat redčili s testiranim medijem (300 μL vzorca + 1200 μL medija). Razredčenim vzorcem smo nato določili vsebnost s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) sklopljene z UV spektrofotometrom. V programski vmesnik aparature smo

vnesli pogoje testa sproščanja, program pa nam je nato s pomočjo enačbe za izračun količine sproščene učinkovine in vnesenega odmerka učinkovine sam izračunal delež sproščene učinkovine v posameznih časovnih točkah.

Kromatografski pogoji analize

Mobilna faza: vodni del: fosfatni pufer pH-4,0
 organski modifikator: acetonitril
Kolona: nepolarna C18
Pretok: 1,5 mL/min (76% polarne faze in 24% organskega modifikatorja)
Volumen injiciranja: 10 µL
Valovna dolžina: med 240 in 260 nm

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

$$A_N = k \times [M - (N - 1)(T - R)] + \sum_{i=1}^{N-1} C_{i(avg)} T$$

A_N = celokupna količina sproščene učinkovine do N-tega vzorčenja

k = koncentracija trenutnega injiciranja

M = začetni volumen medija

N = zaporedno število vzorčenja

T = volumen vzorčenja

R = volumen nadomeščanja

$C_{i(avg)}$ = povprečna koncentracija i-tega vzorčenja

Priprava standardov

Natančno smo natehtali približno predpisano količino delovnega standarda učinkovine in ga kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko s pomočjo 5 mL metanola. Bučko smo postavili v ultrazvočno kadičko za približno 3 minute, da se je učinkovina v celoti raztopila. Nato smo z medijem za preskušanje sproščanja dopolnili bučko do oznake ter premešali. Bučko smo še enkrat postavili za približno 3 minute v ultrazvočno kadičko.

5 mL tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v 50 mL merilno bučko, dopolnili do oznake z medijem za raztapljanje ter premešali (10-kratno redčenje). Standardno raztopino smo pripravljali v 2 paralelah za potrditev ustreznosti standarda.

3.2.4. Izvedba testa nabrekanja

V 25 mL steklene čaše (razporeditev medijev in formulacij po čašah je prikazana v Tabeli 4) smo z merilnim valjem odmerili 20 mL acetatnega pufra pH-4,5 (vrstica 1), 20 mL kalijevega

fosfatnega pufru pH-6,8 (vrstica 2) in 20 mL kalijevega fosfatnega pufru z dodatkom 0,2 M NaCl (vrstica 3). Skupno smo z medijem napolnili 12 čaš, po 4 čaše so vsebovale isti medij. Nato smo v čaše spustili testne formulacije in referenco – počasno formulacijo v čaše z oznako A, srednje hitro formulacijo v čaše z oznako B, hitro formulacijo v čaše z oznako C in referenco v čaše z oznako D – ter sprožili štoparico. Opazovali smo nabrekanje tablet, ob časovnih točkah 0, 30, 60, 120, 150, 240, 300 in 360 min smo stanje fotografirali.

Tabela 4: Razporeditev medijev in formulacij po čašah pri izvedbi testa nabrekanja

Medij	Počasna formulacija	Srednje hitra formulacija	Hitra formulacija	Referenca
Acetatni pufer pH-4,5	1A	1B	1C	1D
Fosfatni pufer pH-6,8	2A	2B	2C	2D
Fosfatni pufer pH-6,8 + 0,2 M NaCl	3A	3B	3C	3D

3.3. Naprava za posnemanje črevesnega gibanja

3.3.1. Opis naprave

Napravo sestavljata 2 enaki silikonski fleksibilni vreči, ki sta nameščeni na skupno platformo (Slika 6). Vse skupaj je postavljeno v komoro, ki omogoča termostatisiranje na željeno temperaturo. Na vsaki fleksibilni vreči so nameščene 4 zaslonke – mehanizmi, ki omogočajo izvajanje kontrakcij. Naprava je računalniško krmiljena, vsa gibanja je možno prilagajati oziroma programirati.



Slika 6: Fotografija naprave za posnemanje gibanja tankega črevesa

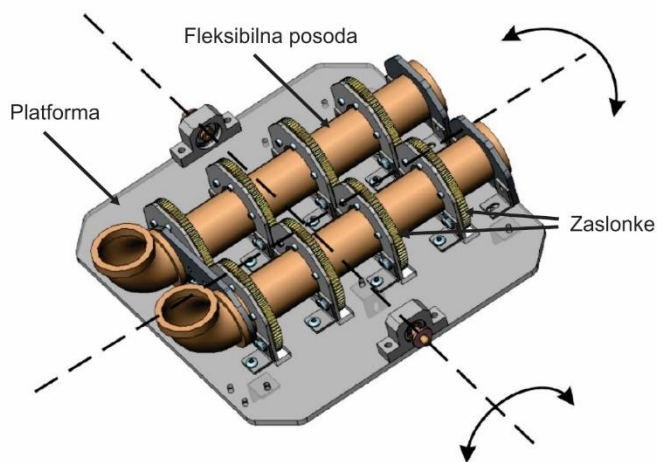
Fleksibilna vreča

Geometrija vreče je razmeroma enostavna, saj gre za cevasto obliko s premerom 3-4 cm in dolžine 24 cm. Izdelana je iz silikonske gume, za katero sklepamo, da izkazuje podobne mehanske lastnosti, kot jih opazimo v steni človeškega tankega črevesa. Vreča je dovolj fleksibilna, da omogoča aplikacijo mehanskih kontrakcij preko zapiranja zaslonk, a hkrati dovolj toga, da se vrne v svojo primarno obliko, ko kontrakcije pojenjajo. Materialu je ob izdelavi fleksibilne vreče dodan tudi aditiv za zmanjšanje površinske energije, da je stena vreče bolj gladka, kar preprečuje lepljenje tablet na steno vreče.

Poskus lahko simultano izvajamo z dvema fleksibilnima vrečama (ali samo z eno). Med izvajanjem poskusa je vreča na desnem koncu zaprta s plastičnim zamaškom, na levem koncu pa je vstavljeno plastično koleno in dodan podaljšek kolena, kar preprečuje iztekanje medija, saj je odprtina dvignjena nad nivo gladine medija. Odprtina nam tudi omogoča enostavno vzorčenje s pomočjo plastične brizge in kanile, ko naprava miruje v položaju za vzorčenje.

Zaslonke in platforma

Za izvedbo krožnih kontrakcij oziroma aplikacijo mehanskih obremenitev preko fleksibilne vreče na našo FO so odgovorne mehanske zaslonke, ki omogočajo zvezno spreminjanje velikosti premera odprtine. Na vsaki fleksibilni vreči se nahajajo 4 zaslonke (skupno 8), ki so enakomerno razporejene vzdolž posamezne vreče in pritrjene na aluminijasto ploščo (v nadaljevanju platforma) (Slika 7). Vsako posamezno zaslonko preko polževega gonila odpira in zapira svoj koračni motor. Z zakasnitvijo začetka gibanja vsake naslednje zaslonke lahko ustvarimo sinusni vzorec gibanja kontrakcij, ki posnema bodisi segmentacijsko gibanje bodisi peristaltične kontrakcije v tankem črevesu človeka.



Slika 7: Shematski prikaz platforme s fleksibilno vrečo in zaslonkami; s prekinjeno črto sta označeni osi, okoli katerih se giblje platforma; prirejeno po (42)

Platforma je aluminijasta plošča, na katero so pritrjeni fleksibilni vreči, zaslonke in motorji zaslonk ter je gibljivo vpeta na ogrodje. Takšno vpetje ji omogoča gibanje okoli dveh medsebojno pravokotnih osi, ki ležita v vodoravni ravnini, za kot $\pm 30^\circ$, za kar skrbita 2 koračna motorja. Z nastavitvami gibanja platforme lahko prilagajamo gibanje tekočine z namenom čim boljšega mešanja medija. Stiskanje zaslonk oziroma fleksibilne vreče nam skupaj z gibanjem platforme omogoča, da dosežemo fizični kontakt tablete s steno vreče in jo na ta način mehansko obremenimo ter izpostavimo dinamičnim pogojem pretakanja medija.

Ogrodje in komora

Ogrodje je skupek aluminijastih profilov, kamor je gibljivo vpeta platforma. Ogrodje je nadalje s pomočjo izvlečnih vodil montirano v notranjost komore, kar omogoča lažje rokovanje s samo napravo in enostavno vzorčenje. Komora omogoča vzdrževanje želenih pogojev eksperimenta – termostatisiranje na 37°C – in je proizvod podjetja Kambič laboratorijska oprema d.o.o.

Programska oprema

Motorji in stikala so povezani z ohišjem s krmilniki, le-to pa nadalje preko USB povezave na osebni računalnik. Za ustrezno delovanje naprave skrbi namenska programska oprema za osebni računalnik, ki uporabniku omogoča krmiljenje in nadzor. Glavni parametri, ki jih lahko spreminjamo, so amplitude zaslonk, perioda in zakasnitev, s čimer določamo kontrakcije le-teh, prav tako lahko spreminjamo tudi amplitudo, periodo in zakasnitev platforme. Programska oprema nam torej omogoča razvoj lastnih sekvenc premikov z namenom zagotavljanja razmer, ki so čim bolj podobne tistim v človeškem telesu.

3.3.2. Izvedba preskusa sproščanja na napravi za posnemanje črevesnega gibanja

Najprej smo vklopili napravo in platformo namestili v začetno lego. Vsako od fleksibilnih vreč smo obdali z eno plastjo plastične folije, ki ju je varovala pred poškodbami, do katerih bi lahko prišlo zaradi trenja med zaslonkami in stenama silikonskih vreč, ki bi nastajalo pri zapiranju zaslonk in bi vodilo do rezanja le-teh. Tako zaščiteni vreči smo namestili na platformo, vklopili komoro in termostatisiranje nastavili na $37,3^\circ\text{C}$. Medij za preskus sproščanja smo predhodno segreli na magnetnem mešalu na temperaturo $41,0\text{--}41,5^\circ\text{C}$. Z merilnim valjem smo odmerili 170 mL medija ter ga prenesli v vsako od fleksibilnih vreč. Vklopili smo gibanje platforme (brez stiskanja zaslonk) ter počakali približno 5 minut, da sta se izenačili temperaturi medija in vreče. Temperaturo medija smo preverili s termometrom, da je znašala $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, nato smo lahko pričeli s preskusom. V vreči smo vstavili zelena vzorca ter zagnali zelen program.

Vzorčenje smo izvajali vsakih 60 minut (60, 120, 180, 240, 300, 360 min), tako da smo ustavili gibanje platforme in zaslonk ter s pomočjo plastične brizge in kanile odvzeli iz vsake vreče 3 mL medija. Odvzet medij smo nadomestili s svežim ter nadaljevali s preskusom (gibanjem). Vzorec smo prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 μm v stekleno vialo (prvi mL vzorca smo zavrgli, da smo nasitili filter). Po 6 urah smo s preskusom zaključili.

3.3.3. Pregled poskusov opravljenih v okviru magistrske naloge

V okviru magistrske naloge smo na napravi za posnemanje črevesnega gibanja opravili 5 serij eksperimentov (4 različni mediji, fosfatni pufer pH-6,8 smo preskusili z dvema različnima metodama), ki so povzete v Tabeli 5. Za vsako serijo eksperimentov je bilo v povprečju izvedenih 20 preskusov sproščanja na 3 različnih testnih formulacijah in referenci, skupno pa smo izvedli 97 preskusov sproščanja.

Tabela 5: Pregled preskusov sproščanja opravljenih na napravi za posnemanje črevesnega gibanja

Medij	Volumen medija	Program	Fleksibilna vreča
Kalijev fosfatni pufer pH-6,8	140 mL	P04	Širša (d = 41 mm)
Acetatni pufer pH-4,5	170 mL	P03	Širša (d = 41 mm)
FaSSIF	170 mL	P12	Ožja (d = 33 mm)
Kalijev fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl	170 mL	P12	Ožja (d = 33 mm)
Kalijev fosfatni pufer pH-6,8	170 mL	P12	Ožja (d = 33 mm)

Za izvedbo preskusov sproščanja smo uporabili 3 različne nastavitve gibanja zaslonk in platforme – programa P04, P03 in P12. Primerjava programov in bistvene razlike med njimi so vidne v Tabeli 6.

Tabela 6: Primerjava programov uporabljenih za izvajanje preskusov sproščanja in pregled bistvenih razlik med njimi

Program	Amplituda zaslonk	Gibanje zaslonk	Amplituda platforme	Gibanje platforme
P04	Zmerna (20 mm)	Počasi potujoči valovi kontrakcij (1,8 cm/s)	Zmerna (20°)	Fazni zamik x-osi glede na z-os = 1,0 s
P03	Zmerna (20 mm)	Počasi potujoči valovi kontrakcij (1,8 cm/s)	Zmerna (20°)	Fazni zamik x-osi glede na z-os = 2,0 s
P12	Povišana (26 mm *)	Hitro potujoči valovi kontrakcij (6,0 cm/s)	Povišana (23°)	Fazni zamik z-osi glede na x-os = 3,3 s

* Dejanska amplituda zaslonk je znašala 21 mm, ampak smo zaradi ožjih fleksibilnih vreč spremenili tudi začetni položaj zaslonk s 45 na 40 mm, tako da je imela zaslonka v stisnjenem položaju 6 mm manjši premer (19 mm namesto 25 mm pri programih P04 in P03), kakršen bi bil tudi ob amplitudi 26 mm in začetnem položaju 45 mm.

4. REZULTATI

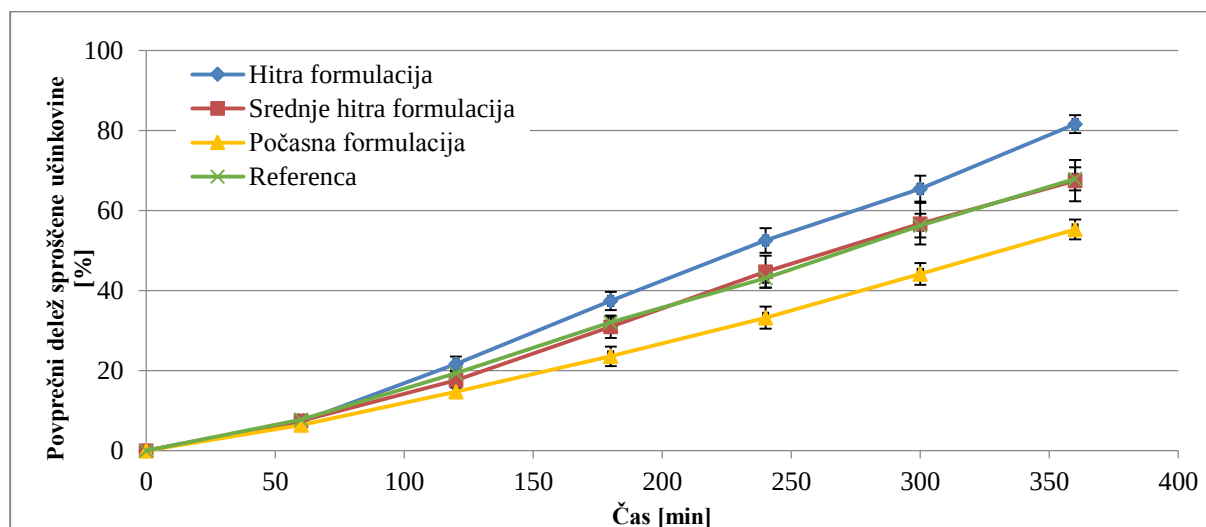
V Tabelah 7 in 8 so prikazani rezultati preliminarnih preskusov sproščanja opravljenih na napravi za posnemanje črevesnega gibanja, v Tabelah 9-11 pa rezultati preskusov sproščanja opravljenih s programom P12 na napravi za posnemanje črevesnega gibanja.

V Tabelah 12 in 13 so prikazani rezultati preskusov sproščanja opravljenih na napravi z vesli.

4.1. Preliminarni preskusi sproščanja

Tabela 7: Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 s programom P04

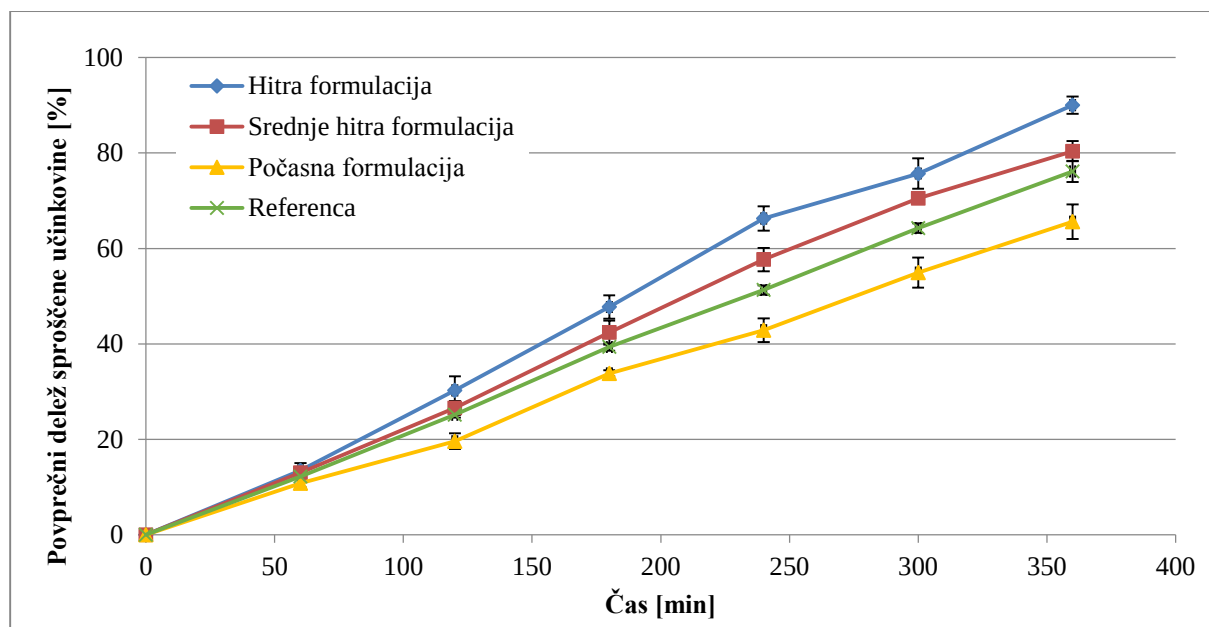
Hitra formulacija (n = 5)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,3	21,7	37,4	52,5	65,5	81,6
SD	0	2,6	4,0	5,1	6,9	7,2	5,0
RSD [%]	0	36,3	18,5	13,7	13,2	11,0	6,1
Srednje hitra formulacija (n = 5)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,4	17,6	31,0	44,7	56,7	67,5
SD	0	1,9	3,7	6,3	8,9	11,6	11,5
RSD [%]	0	25,5	20,7	20,2	20,0	20,5	17,0
Počasna formulacija (n = 4)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,4	14,7	23,6	33,2	44,2	55,3
SD	0	1,0	2,1	4,9	5,6	5,4	5,0
RSD [%]	0	15,8	14,0	20,7	16,8	12,3	9,0
Referenca (n = 5)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,8	19,4	32,1	43,1	56,2	67,9
SD	0	0,6	1,6	3,3	5,5	6,7	6,4
RSD [%]	0	7,4	8,3	10,3	12,8	11,9	9,5



Graf 1: Profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 s programom P04

Tabela 8: Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v acetatnem pufru pH-4,5 s programom P03

Hitra formulacija (n = 3)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	13,5	30,3	47,7	66,3	75,7	90,0
SD	0	2,7	5,1	4,2	4,4	5,5	3,1
RSD [%]	0	19,7	16,8	8,8	6,7	7,3	3,5
Srednje hitra formulacija (n = 3)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	13,0	26,6	42,4	57,7	70,5	80,4
SD	0	1,7	2,6	4,4	4,2	2,1	3,7
RSD [%]	0	12,8	9,8	10,4	7,3	2,9	4,6
Počasna formulacija (n = 4)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	10,8	19,6	33,8	42,9	55,0	65,6
SD	0	1,8	3,3	1,3	4,9	6,4	7,2
RSD [%]	0	16,2	16,6	3,7	11,5	11,6	11,0
Referenca (n = 4)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	12,2	25,2	39,4	51,3	64,3	76,2
SD	0	0,9	1,1	1,3	1,7	1,7	3,8
RSD [%]	0	7,5	4,2	3,3	3,2	2,7	5,0

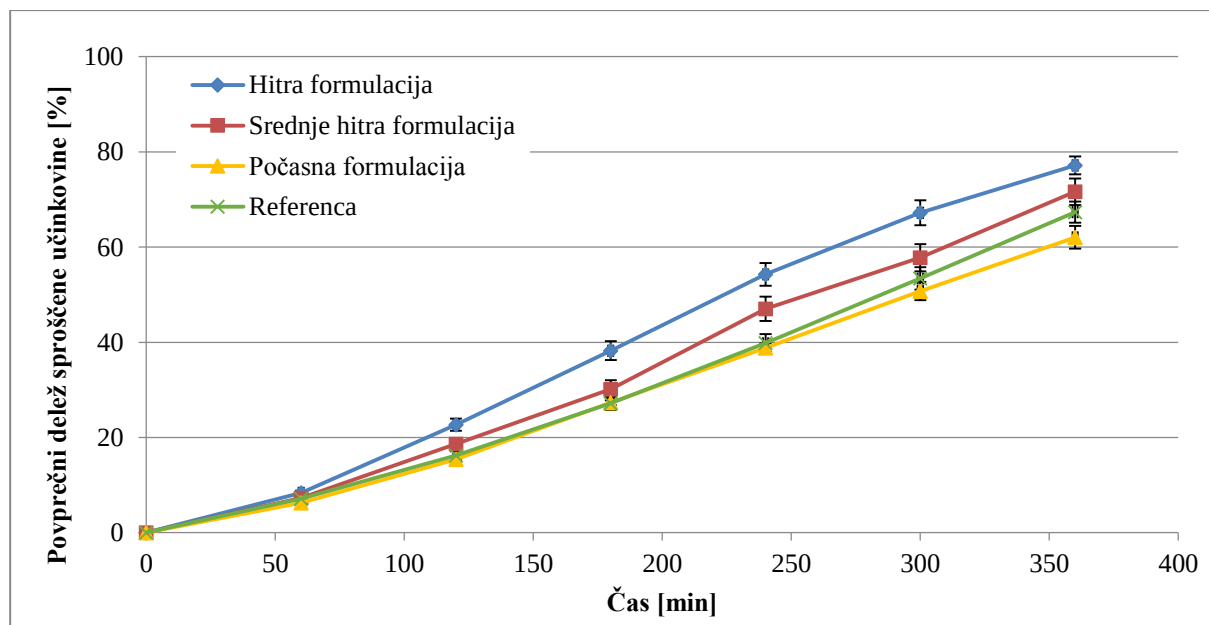


Graf 2: Profili sproščanja v acetatnem pufru pH-4,5 s programom P03

4.2. Preskusi sproščanja opravljene s programom P12

Tabela 9: Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v mediju FaSSiF s programom P12

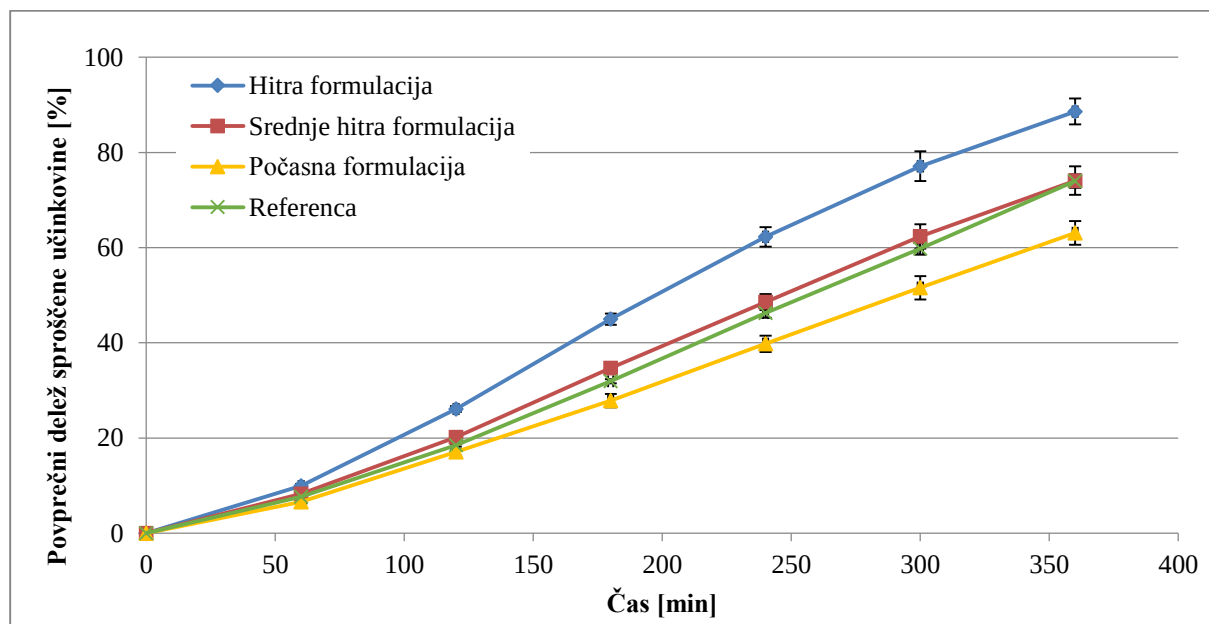
Hitra formulacija (n = 6)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,4	22,7	38,2	54,3	67,2	77,2
SD	0	1,2	3,1	4,9	5,9	6,4	4,6
RSD [%]	0	13,8	13,8	12,7	10,8	9,6	6,0
Srednje hitra formulacija (n = 5)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,3	18,6	30,2	47,0	57,8	71,6
SD	0	1,3	2,0	4,1	5,7	6,4	6,2
RSD [%]	0	18,2	10,8	13,6	12,2	11,1	8,7
Počasna formulacija (n = 5)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,3	15,4	27,3	38,9	50,8	62,1
SD	0	0,7	1,1	1,2	2,0	4,3	5,3
RSD [%]	0	11,2	7,0	4,3	5,2	8,4	8,5
Referenca (n = 6)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,2	16,2	27,2	39,8	53,4	67,3
SD	0	0,9	2,2	3,5	4,6	5,7	5,5
RSD [%]	0	12,0	13,5	12,7	11,6	10,7	8,2



Graf 3: Profili sproščanja v mediju FaSSiF s programom P12

Tabela 10: Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl s programom P12

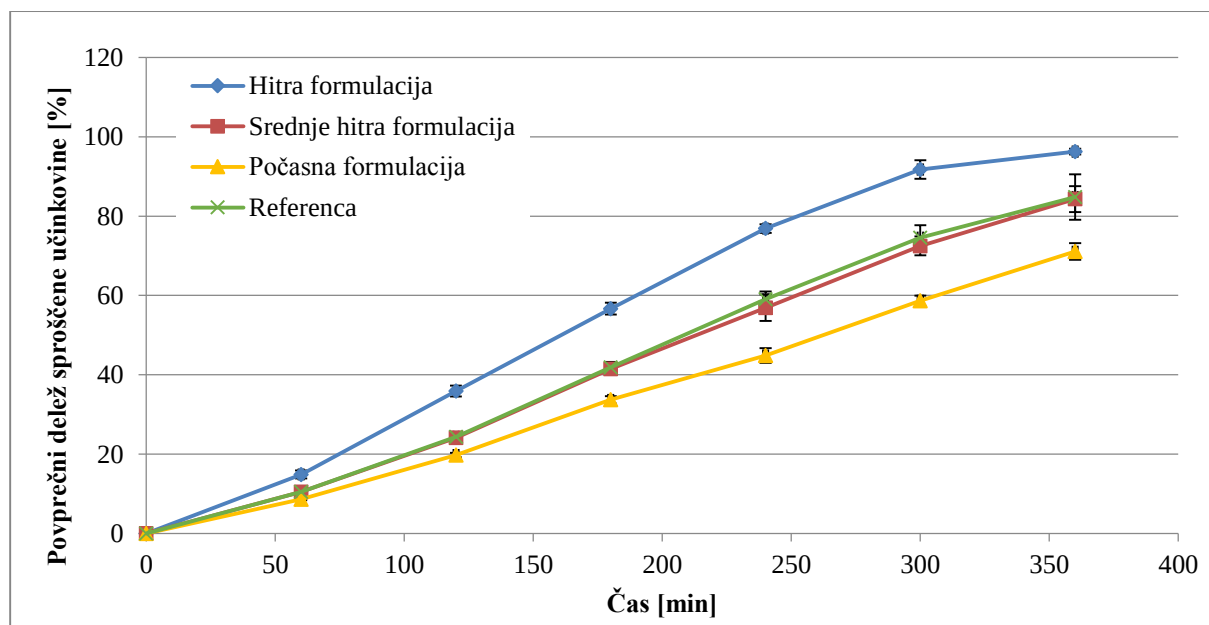
Hitra formulacija (n = 6)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	9,9	26,1	45,0	62,3	77,1	88,6
SD	0	1,1	1,5	2,9	5,0	7,6	6,7
RSD [%]	0	10,6	5,7	6,4	8,0	9,9	7,5
Srednje hitra formulacija (n = 5)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,3	20,2	34,7	48,6	62,3	74,1
SD	0	0,9	1,3	1,9	3,8	5,7	6,7
RSD [%]	0	10,4	6,3	5,6	7,8	9,2	9,1
Počasna formulacija (n = 4)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	6,6	17,1	27,8	39,8	51,6	63,1
SD	0	0,9	1,4	2,8	3,4	4,9	5,0
RSD [%]	0	12,9	8,0	10,1	8,6	9,5	7,8
Referenca (n = 5)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,7	18,5	31,9	46,3	59,8	74,0
SD	0	0,3	0,7	0,9	2,3	2,9	3,1
RSD [%]	0	4,1	3,6	3,0	4,9	4,8	4,3



Graf 4: Profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl s programom P12

Tabela 11: Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 s programom P12

Hitra formulacija (n = 4)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	14,9	35,9	56,7	76,9	91,8	96,3
SD	0	1,9	2,8	3,0	2,2	4,6	1,5
RSD [%]	0	13,1	7,7	5,4	2,9	5,1	1,5
Srednje hitra formulacija (n = 7)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	10,5	24,1	41,5	56,9	72,5	84,3
SD	0	1,7	2,6	3,2	8,9	6,3	8,6
RSD [%]	0	16,3	10,7	7,7	15,6	8,6	10,2
Počasna formulacija (n = 7)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	8,6	19,8	33,7	44,9	58,7	71,1
SD	0	0,6	1,5	2,4	4,9	3,4	5,5
RSD [%]	0	6,7	7,4	7,0	11,0	5,9	7,8
Referenca (n = 4)							
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	10,5	24,4	41,9	59,0	74,6	84,8
SD	0	1,4	1,8	2,7	3,9	6,2	11,4
RSD [%]	0	13,1	7,4	6,6	6,6	8,4	13,5

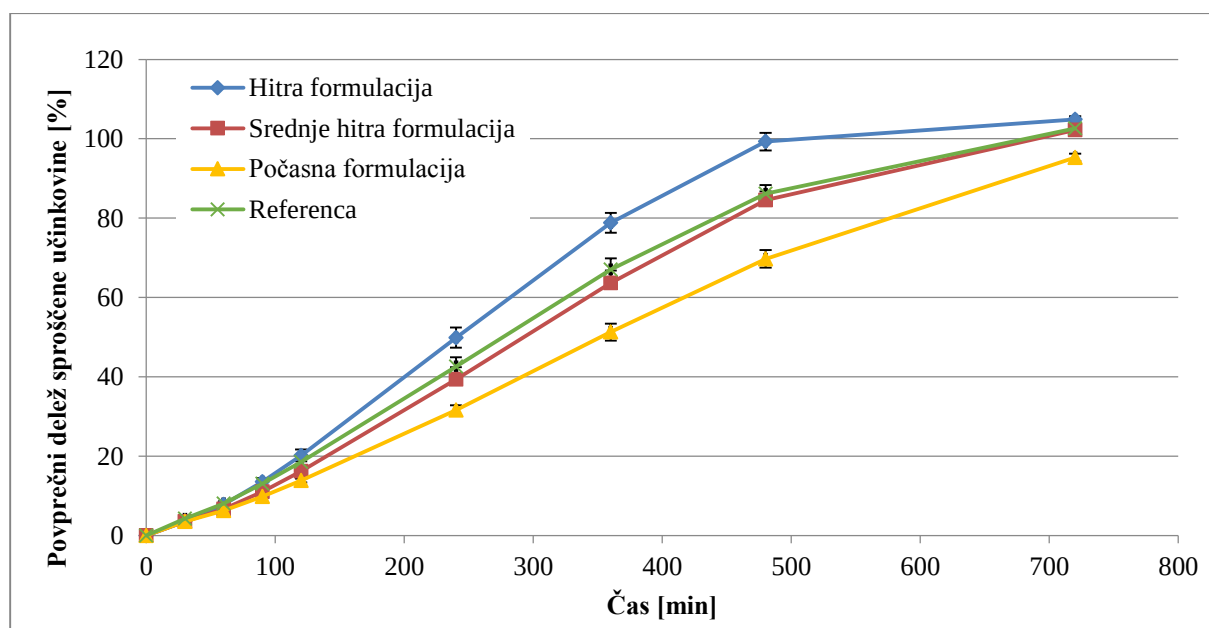


Graf 5: Profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 s programom P12

4.3. Preskusi sproščanja opravljani na napravi z vesli (USP II)

Tabela 12: Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 na aparaturi USP II pri 50 obratih/min (n = 4)

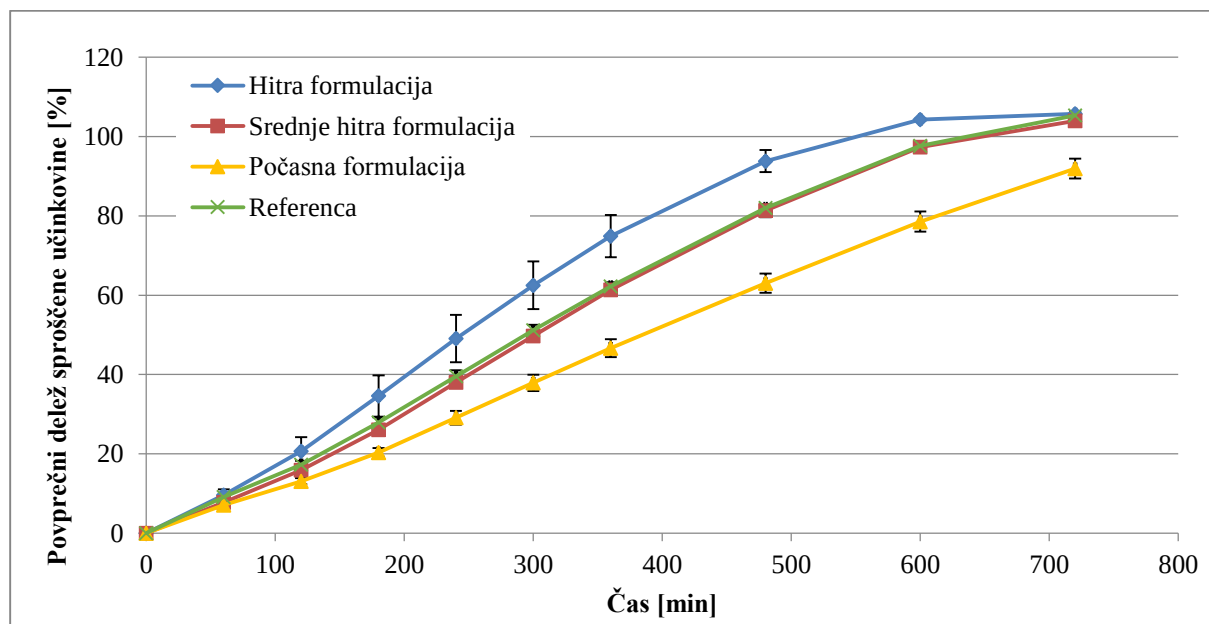
Hitra formulacija									
Čas [min]	0	30	60	90	120	240	360	480	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	3,6	7,8	13,5	20,2	49,9	78,8	99,3	104,9
SD	0	0,3	1,3	2,0	3,0	5,0	5,0	4,4	1,6
RSD [%]	0	8,8	16,5	14,7	14,9	10,1	6,4	4,4	1,6
Srednje hitra formulacija									
Čas [min]	0	30	60	90	120	240	360	480	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	3,5	6,7	11,0	16,2	39,3	63,6	84,5	102,2
SD	0	0,4	1,2	2,2	3,0	6,2	6,4	4,5	0,6
RSD [%]	0	12,5	18,4	19,9	18,8	15,8	10,0	5,3	0,6
Počasna formulacija									
Čas [min]	0	30	60	90	120	240	360	480	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	3,5	6,3	9,8	13,9	31,6	51,3	69,7	95,3
SD	0	0,2	0,5	0,7	1,0	2,4	4,3	4,4	1,9
RSD [%]	0	6,3	7,8	7,6	7,2	7,5	8,3	6,3	2,0
Referenca									
Čas [min]	0	30	60	90	120	240	360	480	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	4,2	8,1	13,0	18,5	42,6	67,1	86,1	102,7
SD	0	0,5	1,0	1,6	2,4	4,7	5,7	4,5	1,3
RSD [%]	0	11,2	12,8	12,6	12,7	11,0	8,4	5,2	1,2



Graf 6: Profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 na aparaturi USP II pri 50 obratih/min

Tabela 13: Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl na aparaturi USP II pri 50 obratih/min (n = 3)

Hitra formulacija										
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360	480	600	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	9,6	20,7	34,6	49,1	62,5	74,9	93,8	104,3	105,7
SD	0	2,6	6,1	9,0	10,4	10,4	9,2	4,8	0,4	0,4
RSD [%]	0	26,7	29,6	26,1	21,2	16,7	12,3	5,1	0,4	0,3
Srednje hitra formulacija										
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360	480	600	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,8	15,9	26,1	38,0	49,7	61,4	81,3	97,3	103,9
SD	0	0,3	0,9	1,6	2,0	2,2	2,4	2,9	2,3	0,4
RSD [%]	0	3,9	5,7	6,2	5,1	4,4	3,9	3,6	2,4	0,4
Počasna formulacija										
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360	480	600	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	7,1	13,1	20,4	29,1	37,9	46,7	63,0	78,5	91,9
SD	0	0,6	1,3	1,9	3,0	3,5	3,9	4,2	4,4	4,3
RSD [%]	0	7,7	9,9	9,4	10,2	9,3	8,3	6,7	5,6	4,7
Referenca										
Čas [min]	0	60	120	180	240	300	360	480	600	720
Povprečni delež sproščene učinkovine [%]	0	9,1	17,3	27,9	39,5	51,2	62,2	82,0	97,6	105,3
SD	0	0,9	1,6	2,2	2,7	2,4	1,7	0,8	1,1	2,0
RSD [%]	0	9,5	9,2	8,0	6,9	4,6	2,8	1,0	1,1	1,9



Graf 7: Profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl na aparaturi USP II pri 50 obratih/min

4.4. Ostali rezultati

4.4.1. Preskus topnosti

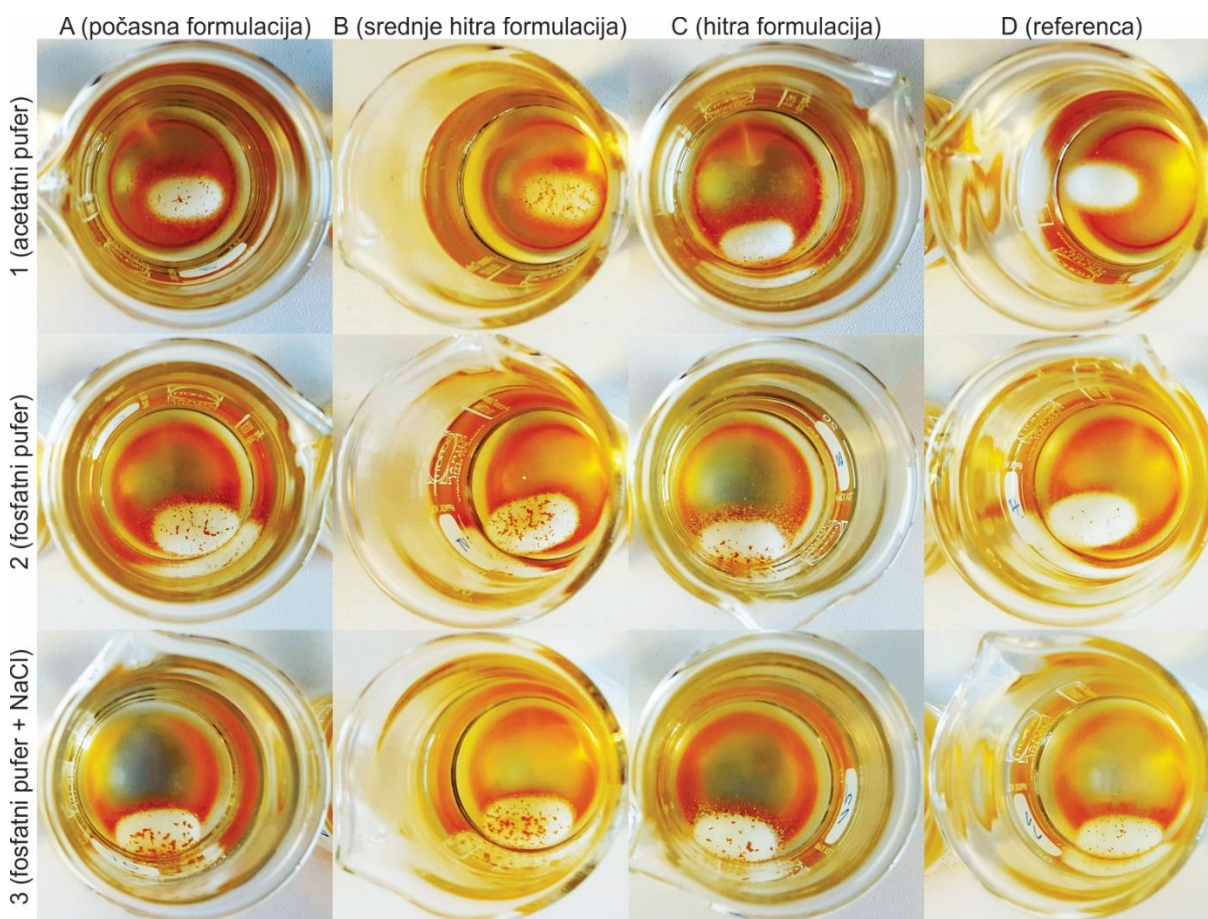
Rezultati preskusa topnosti so prikazani v Tabeli 14.

Tabela 14: Rezultati preskusa topnosti učinkovine; 1. bučka – kalijev fosfatni pufer pH-6,8, 2. bučka – kalijev fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl

Čas [min]	0	60	120	210	240
Delež raztopljene učinkovine v 1. bučki [%]	0	53,8	98,4	97,7	97,2
Delež raztopljene učinkovine v 2. bučki [%]	0	53,8	97,4	97,8	97,5

4.4.2. Preskus nabrekanja

Fotografije oziroma rezultati preskusa nabrekanja so vidni na Sliki 8.



Slika 8: Fotografije (rezultati) preskusa nabrekanja po 360 min; 1. vrstica - acetatni pufer pH-4,5, 2. vrstica - fosfatni pufer pH-6,8, 3. vrstica - fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl, stolpec A - počasna formulacija, stolpec B - srednje hitra formulacija, stolpec C – hitra formulacija, stolpec D – referenca; fotografije smo računalniško obdelali (izrezali, povišali kontrast in pojačali sence), da so razlike med mediji in formulacijami bolj vidne

5. RAZPRAVA

Preskusili smo sproščanje modelne učinkovine iz treh različnih formulacij ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem, ki se razlikujejo glede hitrosti kinetike sproščanja učinkovine (hitra formulacija, srednje hitra formulacija in počasna formulacija); v razpravi smo jih med drugim nazivali testne formulacije. Sočasno smo testirali tudi referenčno zdravilo, katerega profil sproščanja želimo posnemati z našo srednje hitro formulacijo.

Preskuse sproščanja smo izvedli na napravi za posnemanje črevesnega gibanja, ki omogoča približevanje relevantnim *in vivo* pogojem (v razpravi smo jo med drugim nazivali naša naprava). Aparaturo so razvili raziskovalci oddelka *In vitro-in vivo* korelacije v podjetju Lek d.d. Ljubljana v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo Univerze v Ljubljani, prav tako so vse 3 testne formulacije ogrodnih tablet produkt razvoja podjetja Lek d.d. Ljubljana.

Na napravi za posnemanje črevesnega gibanja smo izvedli preskuse sproščanja z uporabo naslednjih medijev: kalijev fosfatni pufer pH-6,8, acetatni pufer pH-4,5, FaSSIF in kalijev fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl. Za primerjavo so nam bili na voljo rezultati preskusov sproščanja, ki so bili izvedeni na napravi z vesli (USP II) s kalijevim fosfatnim pufrom pH-6,8 in kalijevim fosfatnim pufrom pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl ter rezultati *in vivo* farmakokinetične študije, katerim se bomo poskušali približati z rezultati *in vitro* preskusov sproščanja.

Izvedli smo tudi preskus topnosti z delovnim standardom modelne učinkovine z namenom potrditve, da se le-ta v celoti raztopi v majhnem volumnu medija (170 mL), ki smo ga uporabili pri preskusih sproščanja. S tem smo želeli pokazati, da dosegamo zelo razredčene (»sink«) pogoje (uporabljen volumen je vsaj 3-krat večji od volumna nasičene raztopine). Prav tako smo opazovali nabrekanje vseh formulacij v različnih medijih (acetatni pufer, fosfatni pufer in fosfatni pufer z dodatkom NaCl) z namenom, da bi okvirno videli, kako sam proces poteka pri različnih formulacijah in kakšne so razlike pri nabrekanju v različnih medijih.

5.1. Farmakokinetična študija

Referenca in vse tri testne formulacije so bile testirane v farmakokinetični študiji. Vzorec za vsako testno formulacijo je znašal 33 ljudi oziroma 34 ljudi za referenco, študija pa je bila izvedena v stanju na tešče. Iz maksimalnih plazemskih koncentracij (c_{max}) so bila izračunana razmerja med testnimi formulacijami in referenco (Tabela 15).

Tabela 15: Razmerja maksimalnih plazemskih koncentracij (C_{max}) testnih formulacij in referenčnega zdravila

	Hitra formulacija/ referenca	Srednje hitra formulacija/ referenca	Počasna formulacija/ referenca
Razmerje C_{max}	139,7 %	91,4 %	63,5 %

Vidimo lahko, da je C_{max} srednje hitre formulacije malenkost nižji kot referenca – idealno z vidika želene primerjave bi bilo, če bi dobili rezultat 100 %. Vrednost C_{max} hitre formulacije je približno 40 % višja od vrednosti reference, počasne formulacije pa približno 40 % nižja od reference. Tem razmerjem, ki so bila pridobljena v *in vivo* študiji, smo se poskušali približati z rezultati *in vitro* preskusov sproščanja na naši napravi.

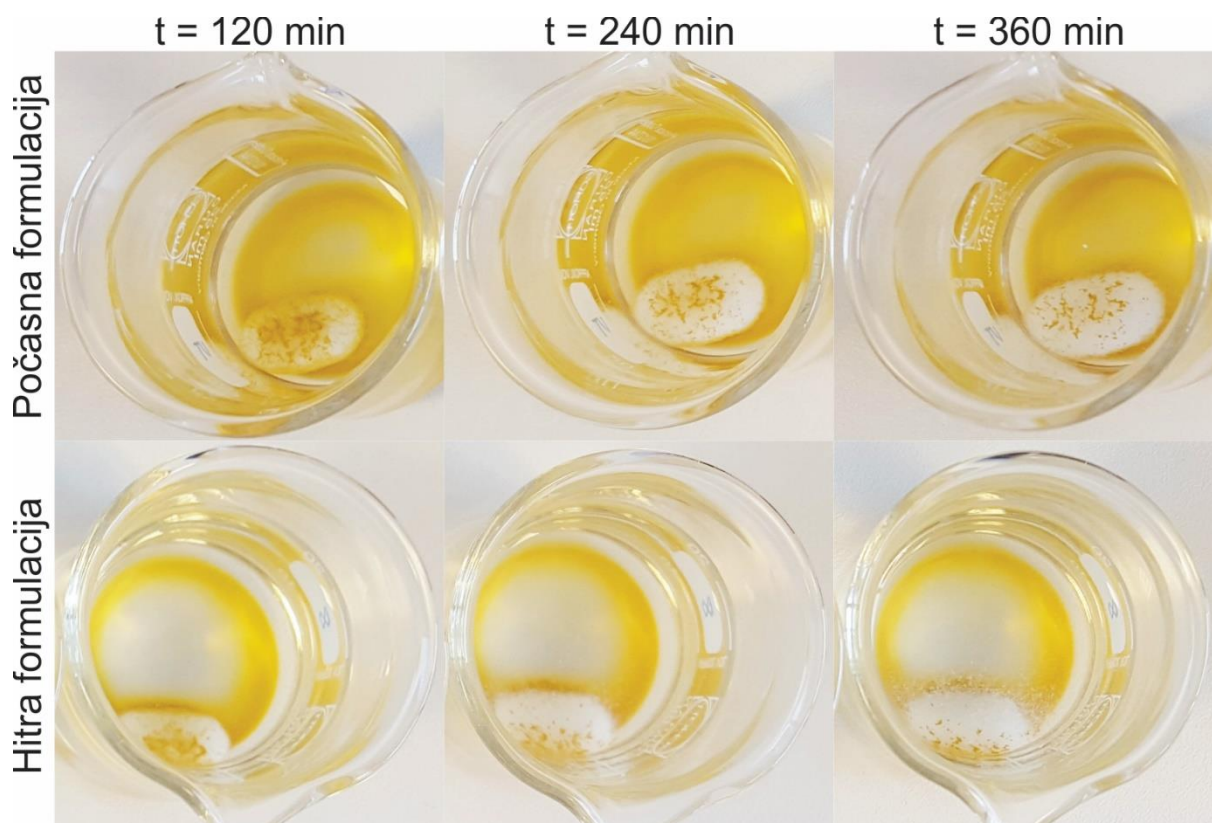
5.2. Preskusi sproščanja opravljeni na napravi z vesli (USP II)

Za primerjavo so nam bili na voljo rezultati preskusov sproščanja, ki so bili izvedeni na napravi z vesli (USP II) s kalijevim fosfatnim pufrom pH-6,8 in kalijevim fosfatnim pufrom pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl. Eksperimente na aparaturi USP II so izvedli sodelavci oddelka *In vitro-in vivo* korelacije za namene razvoja formulacij. Volumen medija je znašal 900 mL, hitrost mešanja je bila 50 obratov/min, rezultati so prikazani v Tabelah 12 in 13, profili sproščanja pa na Grafih 6 in 7.

5.3. Preskus nabrekanja

Končno stanje (v časovni točki 360 min) tablet je prikazano na Sliki 8, kjer so zbrane fotografije vseh testnih formulacij in reference v vseh preskušanih medijih (acetatni pufer, fosfatni pufer in fosfatni pufer z dodatkom NaCl).

Če primerjamo nabrekanje počasne in hitre formulacije skozi različne časovne točke v fosfatnem pufru (Slika 9), lahko opazimo, da je počasna formulacija nabrekala počasneje, ampak konstantno skozi ves čas. Volumen tablete se je ves čas večal, gelska plast je bila kompaktnejša kot pri hitri formulaciji. Pri hitri formulaciji smo opazili hitro nabrekanje na začetku, nato se je volumen tablete začel manjšati, pri 240 min smo že lahko opazili začetek erozije polimera, ki je bila še izraziteje vidna pri 360 min. Vzrok za različno kinetiko nabrekanja je v različnih viskoznostih polimerov, ki so bili uporabljeni za izdelavo formulacij. Počasna formulacija je tako vsebovala kombinacijo polimerov z večjo viskoznostjo, medtem ko je hitra formulacija vsebovala kombinacijo polimerov z nižjo viskoznostjo. Polimer visoke viskoznosti namreč nabreka počasneje v primerjavi s polimerom nizke viskoznosti, ki nabrekne hitro in kar kasneje vodi do erozije polimera s površine ogrinja (36).



Slika 9: Fotografije nabrekanja počasne (zgoraj) in hitre formulacije (spodaj) v kalijevev fosfatnem pufru pH-6,8 ob različnih časovnih točkah (120, 240, 360 min)

Pri nabrekanju v acetatnem pufru (Slika 8, vrstica 1), lahko opazimo gelsko plast, ki je transparentna in dobro ločena od suhega jedra, medtem ko v ostalih dveh medijih (fosfatni pufer in fosfatni pufer z dodatkom 0,2 M NaCl) ta meja ni izrazita. Sklepali smo, da je vzrok za to boljša topnost modelne učinkovine v kislem pH acetatnega pufru (41), zaradi česar v ogrodju polimera nastajajo pore, ki pospešijo hidratacijo suhega jedra in posledično povzročijo hitrejše nabrekanje oziroma sproščanje učinkovine.

Če primerjamo nabrekanje v fosfatnem pufru (Slika 8, vrstica 2) in v fosfatnem z pufru z dodatkom NaCl (Slika 8, vrstica 3), lahko pri formulacijah v fosfatnem pufru opazimo večji delež erodiranega ogrodja, razlika pa je še posebej opazna pri hitrih formulacijah. Ogrodja formulacij v fosfatnem pufru z dodatkom NaCl so boljše ohranila svojo primarno obliko, ostanek polimernega ogrodja pa je bil kompaktnejši. Manjši delež erozije pri večji ionski jakosti sta dokazala tudi Kavanagh in Corrigan za HPMC ogrodne tablete (43). Gre za pojav izsoljevanja, ko ioni tekmujejo za vodo, ki je na voljo za hidratacijo, oziroma vežejo molekule le-te. Tako polimer nabreka počasneje, do erozije pa pride kasneje.

5.4. Preliminarni preskusi sproščanja

5.4.1. Kalijev fosfatni pufer pH-6,8

Pri izvajanju preskusov sproščanja smo želeli čim bolj posnemati *in vivo* pogoje v začetnem delu tankega črevesa, zato smo kot medije izbrali pufrske raztopine, ki zagotavljajo konstanten pH med eksperimentom, podobno kot v tankem črevesu bikarbonatni pufer preprečuje večje spremembe v pH črevesne vsebine. Glede na to, da pH v jejunumu znaša med 6,6-6,8 (3), smo s preskusi sproščanja pričeli v fosfatnem pufru, katerega uporabo za preskuse sproščanja pri pH-6,8 priporočajo tudi evropski (EMA) in ameriški regulatorni organi (FDA) (5, 22). Priprava je enostavna, medij pa je univerzalen za uporabo v številnih različnih metodah za preskušanje sproščanja.

Ker znaša povprečni volumen tekočine v tankem črevesu na tešče dobrih 100 mL, smo za prvo serijo eksperimentov uporabili 140 mL kalijevega fosfatnega pufra pH-6,8. V primerjavi s konvencionalnimi metodami preskušanja sproščanja (USP I in USP II), kjer volumen medija največkrat znaša 900 mL, je bil uporabljen volumen znatno nižji. Ker se modelna učinkovina uvršča v razred BCS III, nismo pričakovali težav s topnostjo same učinkovine, kar smo kasneje tudi dokazali z izvedbo preskusa topnosti, kjer se je po 120 min raztopilo 98,4 % učinkovine v 170 mL kalijevega fosfatnega pufra pH-6,8 (Tabela 14). Za izvajanje preskusa sproščanja na naši napravi smo uporabili nastavitve, shranjene kot program P04, za katerega so karakteristične zmerne amplitude zaslonk (20 mm) in platforme (20°) ter počasi potujoči valovi kontrakcij (1,8 cm/s) (Tabela 6). Gibanje zaslonk je bilo podobno napredovanju peristaltičnega vala z leve strani proti desni, prav tako je bila hitrost širjenja vala kontrakcij (1,8 cm/s) primerljiva z literaturnimi vrednostmi (0,5-2 cm/s) (31).

Rezultati preskusov sproščanja so prikazani v Tabeli 7 profili sproščanja pa na Grafu 1. Z vsako od testnih formulacij in referenco smo opravili 4-5 ponovitev. Razlog za različno število ponovitev med testiranimi formulacijami je bil ta, da je bila naprava nov izum, na kateri je bilo pred tem opravljenih malo število preskusov, zato smo se od začetka srečevali z nekaterimi izzivi in hkrati razvijali čim bolj optimalen protokol izvedbe preskusa. Občasno se nam je zgodilo, da je med izvedbo eksperimenta počila ena od fleksibilnih vreč (naprava omogoča hkratno izvajanje preskusov v 2 paralelah), pri čemer je vsebina začela počasi iztekati, zato smo bili primorani nadaljevati eksperiment zgolj z eno paralelo. Vzrok za počeno vrečo je bilo trenje, ki je nastajalo med delovanjem zaslonk, ko so le-te krčile in drgnile ob silikonsko

fleksibilno vrečo. Po več izvedenih poskusih (vsak je trajal 6 ur) so nastale majhne razpoke v vreči, kjer je nato začel medij iztekati.

Izračunali smo povprečni delež sproščene učinkovine, standardno deviacijo (SD) in relativno standardno deviacijo (RSD) v vseh časovnih točkah. Prav tako smo iz povprečnih deležev sproščene učinkovine izračunali razmerja med testnimi formulacijami in referenco (Tabela 16), da smo lahko primerjali rezultate *in vitro* preskusa sproščanja z rezultati *in vivo* farmakokinetične študije. Razmerja smo izračunali v časovni točki, kjer se je sprostilo med 50-70 % učinkovine, saj so tam vidne največje razlike med profili sproščanja formulacij z različno hitrostjo kinetike sproščanja; v tem primeru torej pri 300 min.

Tabela 16: Razmerja povprečnih deležev sproščene učinkovine iz testnih formulacij in povprečnega deleža sproščene učinkovine iz referenčnega zdravila v časovni točki 300 min v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 s programom P04

	Hitra formulacija/ referenca	Srednje hitra formulacija/ referenca	Počasna formulacija/ referenca
Razmerje v časovni točki 300 min	116,4 %	100,9 %	78,5 %

RSD vrednost je bila pri prvi seriji eksperimentov precej visoka, v povprečju se je pri testnih formulacijah gibala med 15-20 %. V časovni točki 60 min je RSD dosegel celo 36,3 % pri hitri formulaciji in 25,5 % pri srednje hitri formulaciji. Vzrok temu je bil nizek delež sproščene učinkovine v začetnih točkah, posledično pa se je povečala relativna vrednost SD, ki smo jo izračunali po formuli: $RSD = SD / X_{povp} * 100 \%$. Najnižje vrednosti RSD lahko opazimo pri referenci, gibljejo se okoli 10 %, saj gre za končno formulacijo, ki je že na trgu, medtem ko so bile testne formulacije vzete iz razvojne faze.

Če pogledamo profile sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru (Graf 1), lahko že od 2. časovne točke dalje (120 min) opazimo razlike v hitrosti sproščanja med formulacijami. Profila sproščanja srednje hitre formulacije in reference se skoraj prekrivata, kar potrjuje tudi razmerje med njima v časovni točki 300 min, ki znaša 100,9 %. Profila hitre formulacije in počasne formulacije sta ves čas dobro ločena od srednje hitre formulacije in reference, v časovni točki 300 min je hitra formulacija 16,4 % hitrejša od reference, počasna formulacija pa 21,5 % počasnejša od reference. Če razmerja primerjamo s podatki iz *in vivo* študije, so predvsem razlike med hitro in srednje hitro formulacijo oziroma referenco ter počasno in srednje hitro formulacijo oziroma referenco še vedno manjše, kot bi si želeli.

5.4.2. Acetatni pufer pH-4,5

Z uporabo acetatnega pufera pH-4,5 smo želeli preveriti vpliv kislega medija na sproščanje učinkovine iz testiranih formulacij, kateremu je izpostavljena peroralna FO ob prehodu skozi želodec, predvsem pa ob vstopu v dvanajstnik. Volumen medija v preskusih sproščanja smo povečali na 170 mL, da bi zmanjšali RSD vrednosti, saj bi, v kolikor prihaja do napak pri vzorčenju in redčenju vzorca, večji volumen uporabljenega medija posledično pomenil manjšo relativno vrednost napake (SD).

Za drugo serijo preskusov smo uporabili druge nastavitve programa, ki določajo gibanje naprave med poskusom. P03, ki smo ga uporabili za eksperimente v acetatnem pufru, se od programa P04, ki pa smo ga uporabili za serijo eksperimentov v fosfatnem pufru, bistveno ne razlikuje; skrajne lege zaslonk in platforme so ostale enake (Tabela 6), nekoliko smo zgolj spremenili vzorec gibanja platforme (zakasnitev v gibanju osi), posledično pa so se gotovo nekoliko spremenili hidrodinamski pogoji v fleksibilni vreči.

Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v acetatnem pufru so prikazani v Tabeli 8. RSD vrednosti smo uspeli precej znižati, kar lahko pripišemo večjemu volumnu uporabljenega medija. Pri testnih formulacijah se povprečne RSD vrednosti gibljejo okoli 10 %, najvišje vrednosti (19,7 % pri hitri formulaciji in 16,2 % pri počasni formulaciji) spet opazimo v prvi časovni točki (60 min). Tudi v tem primeru so RSD vrednosti reference precej nižje kot pri testnih formulacijah.

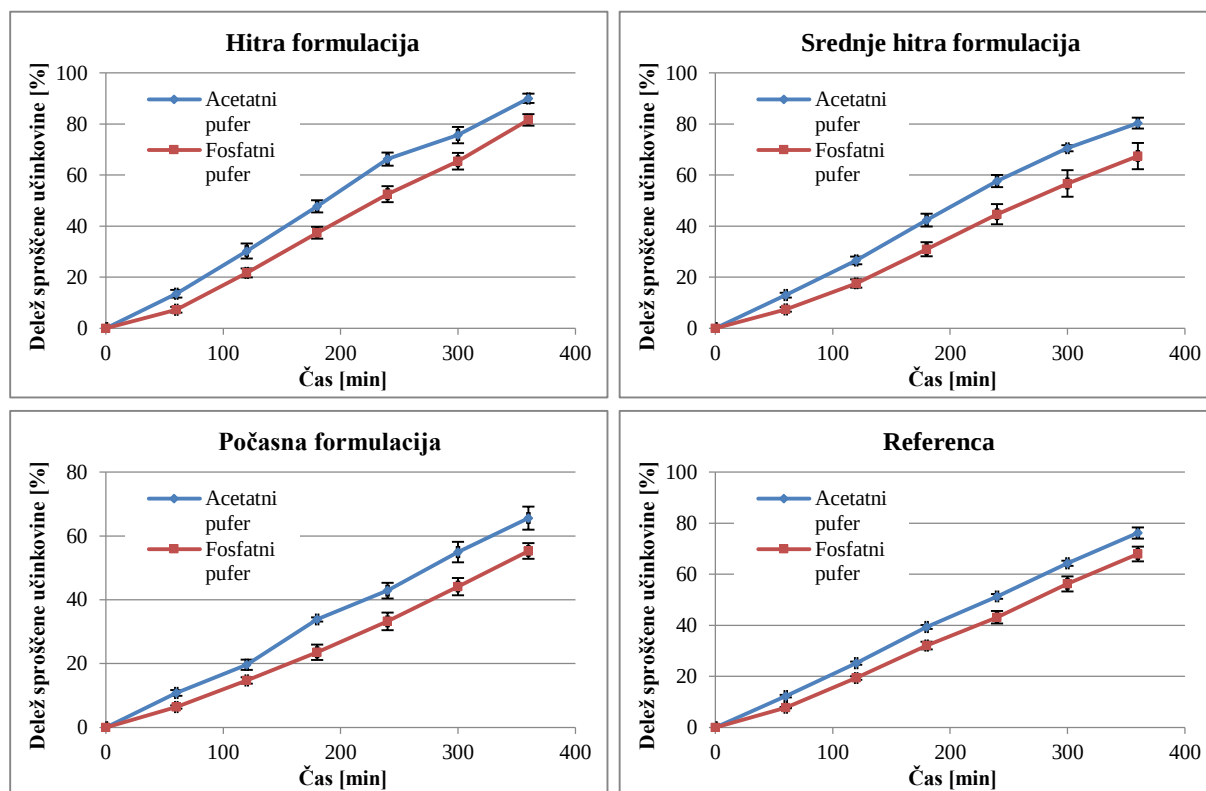
Tabela 17: Razmerja povprečnih deležev sproščene učinkovine iz testnih formulacij in povprečnega deleža sproščene učinkovine iz referenčnega zdravila v časovni točki 300 min v acetatnem pufru pH-4,5 s programom P03

	Hitra formulacija/ referenca	Srednje hitra formulacija/ referenca	Počasna formulacija/ referenca
Razmerje v časovni točki 300 min	117,8 %	109,7 %	85,5 %

Profili sproščanja so prikazani na Grafu 2. Kot že pri preskusih sproščanja v fosfatnem pufru lahko tudi tukaj vidimo, da so vse testne formulacije dobro ločene med seboj. Vendar pa se profil srednje hitre formulacije ne prekriva povsem s profilom reference, ampak je ves čas malo nad njim, kar potrjuje tudi razmerje povprečnih deležev sproščene učinkovine v časovni točki 300 min, ki znaša 109,7 % (Tabela 17).

Primerjali smo profile sproščanja v acetatnem pufru s profili sproščanja v fosfatnem pufru (Graf 8). Profili, ki smo jih pridobili v acetatnem pufru, se pri vseh testnih formulacijah in referenci nahajajo višje, kar kaže na to, da se učinkovina hitreje sprošča v kislem mediju (pH-4,5). V časovni točki 300 min je absolutni porast deleža sproščene učinkovine pri hitri formulaciji 10,2

%, pri srednje hitri formulaciji 13,8 %, pri počasni formulaciji 10,8 % in pri referenci 8,1 %. Glede na to, da je sama topnost ogrodja naše formulacije neodvisna od pH, smo sklepali, da je bila za hitrejše sproščanje odgovorna boljša topnost učinkovine v kislem mediju (41).



Graf 8: Primerjava profilov sproščanja v acetatnem pufru pH-4,5 s profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8

5.5. Optimizacija delovanja naprave za posnemanje črevesnega gibanja

Občasno pokanje fleksibilnih vreč smo preprečili, tako da smo silikonsko vrečo pred eksperimentom ovili s slojem tanke folije, ki je zmanjšala trenje med silikonsko vrečo in zaslonkami. Rešitev se je izkazala za zelo uporabno, saj se je življenjska doba fleksibilne vreče občutno podaljšala.

Naslednji izziv pri sami optimizaciji aparature in razvoju metode je predstavljal visok tlak, ki se je pojavljal v neprodušno zaprti fleksibilni vreči, ko se zaslonke pričeale z delovanjem oziroma stiskanjem. Od začetka smo težavo reševali z odzračevanjem, tako da smo odprli zamašek na levi strani vreče in iz nje izpustili odvečni zrak. Vendar pa rešitev ni bila optimalna, saj se je nato ob zaprtju vreče v stisnjenem položaju v njej pojavil podtlak, ki je preprečeval, da bi se le-ta ob prenehanju kontrakcij s strani zaslonk vrnila v svojo začetno nedeformirano obliko. Na koncu se je kot najboljša rešitev izkazal odprt sistem; na levem koncu fleksibilne vreče smo v plastično koleno vstavili dodaten kos plastične cevi brez zamaška, katere odprtina

je segala nad nivo gladine medija (Slika 6), s čimer smo preprečili možnost iztekanja vsebine. Tako smo omogočili prosto prehajanje zraka tekom poskusa in posledično izenačevanje tlaka v fleksibilni vreči z atmosferskim.

Prav tako smo pred naslednjimi serijami eksperimentov zamenjali različico fleksibilne vreče. Ker je bil premer vreče ($d = 41$ mm) le malenkost manjši od odprtine zaslonk ($d = 45$ mm), se le-ta ob prenehanju kontrakcij s strani zaslonk ni povsem izravnala in se ni vrnila v svojo izhodiščno lego. Poleg tega je stena silikonske vreče ob kontrakcijah zaslonk tvorila veliko gubo (gmoto materiala), ki je predstavljala preveliko breme, da bi se zaslonke bolj zaprle in je posledično onemogočala doseganje večjih mehanskih obremenitev na tableto. Zato smo za nadaljnje poskuse izdelali vrečo s premerom 33 mm, kar je še vedno sovpadalo s povprečnim premerom začetnega dela tankega črevesa pri človeku. Fleksibilna vreča ožjega premera nam je v nadaljnjih preskušanjih omogočala višje amplitude zaslonk (večje kontrakcije) in posledično aplikacijo večje mehanske obremenitve na FO.

5.6. Preskusi sproščanja opravljeni s programom P12

Optimizacija delovanja naprave nam je omogočila, da smo lahko zaslonke ob kontrakcijah bolj zaprli, saj pri odprtem sistemu delovanja več ni prihajalo do visokih tlakov v fleksibilni vreči, prav tako pa je ožja vreča predstavljala manjši upor pri zapiranju zaslonk. Tako smo za nastavitve programa P12 izbrali bolj ostre pogoje v primerjavi s programoma P04 in P03; skrajna lega zaslonk je bila 6 mm bolj zaprta kot pri programih P04 in P03 (Tabela 6). Tudi amplituda nagibov platforme pri programu P12 je znašala 3 stopinje več od tiste pri programih P04 in P03. Hitrost širjenja vala kontrakcij (zapiranje zaslonk) je bila višja (6,0 cm/s) v primerjavi s programoma P04 in P03 (1,8 cm/s).

5.6.1. Umetni črevesni sok, ki posnema pogoje na tešče (FaSSIF)

Ker je bil naš cilj približati se rezultatom pridobljenim v farmakokinetični študiji, smo za enega od medijev uporabili umetni črevesni sok, ki posnema pogoje na tešče (FaSSIF), saj je bila tudi sama študija opravljena po protokolu na tešče.

Tabela 18: Sestava medija FaSSIF (44)

Sestavina	Koncentracija [mM]
natrijev tauroholat	3,0
lecitin	0,75
NaH_2PO_4	28,4
NaOH	8,7
NaCl	105,9

Rezultati preskusov sproščanja opravljenih v acetatnem pufru so prikazani v Tabeli 9, profili sproščanja pa na Grafu 3. V mediju FaSSIF smo opazili počasnejše sproščanje kot v drugih dveh medijih (fosfatni pufer in fosfatni pufer z dodatkom NaCl), ki sta bila testirana z enakim programom P12. V primerjavi z medijem fosfatni pufer z dodatkom NaCl se je tako delež sproščene učinkovine pri hitri formulaciji zmanjšal absolutno za 9,9 %, pri srednje hitri formulaciji za 4,5 %, pri referenci za 6,4 %, pri počasni formulaciji pa se je delež sproščene učinkovine zmanjšal absolutno zgolj za 0,8 %. Zaradi tega se je zmanjšala razlika v profilih sproščanja med formulacijami, razmerje hitra formulacija/počasna formulacija v časovni točki 300 min je bilo 132,2 %, medtem ko je to razmerje v fosfatnem pufru (P12) znašalo 156,4 % in v fosfatnem pufru z dodatkom NaCl 149,4 %. Prav tako se je profil počasne formulacije posledično zelo približal profilu reference, razmerje v časovni 300 min pa je znašalo visokih 95,1 % (Tabela 19).

Tabela 19: Razmerja povprečnih deležev sproščene učinkovine iz testnih formulacij in povprečnega deleža sproščene učinkovine iz referenčnega zdravila v časovni točki 300 min v mediju FaSSIF programom P12

	Hitra formulacija/ referenca	Srednje hitra formulacija/ referenca	Počasna formulacija/ referenca
Razmerje v časovni točki 300 min	125,9 %	108,2 %	95,1 %

FaSSIF tako daje dobre rezultate zgolj za hitro formulacijo, saj je znašalo razmerje povprečnih deležev sproščene učinkovine iz hitre formulacije in reference 125,9 %, medtem ko za vrednotenje ostalih dveh testnih formulacij v našem primeru ni bil najbolj primeren. Razlog za premik profilov sproščanja je verjetno v sami sestavi medija (Tabela 18), ki med drugim vsebuje natrijev tauroholat (žolčna sol) in lecitin (fosfolipid), ki pospešita hidratacijo polimera in solubilizacijo učinkovine. Zaradi različne sestave testnih formulacij glede na delež polimerov različnih viskoznosti je bil vpliv medija FaSSIF (povečana hidrationska sposobnost) največji na počasno formulacijo, medtem ko je na ostale formulacije vplival v manjši meri, zato so se posledično zmanjšale razlike med profili sproščanja testnih formulacij, še posebej med hitro in počasno formulacijo.

5.6.2. Fosfatni pufer z dodatkom 0,2 M NaCl

Ker smo želeli preveriti, kako na sproščanje učinkovine vpliva zgolj ionska jakost, smo fosfatnemu pufru pH-6,8 dodali NaCl. Asare-Addo in sodelavci so medijem različnih pH vrednosti dodali ali 0,2 M NaCl ali 0,4 M NaCl ter tako preskušali vpliv ionske jakosti na sproščanje učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet (45). Tako smo se tudi mi odločili, da testiramo

dodatek 0,2 M NaCl. V članku so ugotovili, da povišanje ionske jakosti medija različno vpliva na HPMC ogrodne tablete. V primeru, ko je bila kot modelna učinkovina uporabljen diltiazem, se je pri višji ionski jakosti sproščanje upočasnilo, saj dodatek soli zmanjša topnost diltiazema zaradi njegovega kationskega značaja, medtem ko se je pri hidroklorotiazidu pri višji ionski jakosti sproščanje pospešilo, zaradi povečane erozije polimera.

Izračunali smo ionske jakosti pred in po dodatku NaCl v fosfatni pufer (Tabela 20). Rezultati pridobljeni v fosfatnem pufru z dodatkom 0,2 M NaCl so prikazani v Tabeli 10, profili sproščanja pa na Grafu 4.

Tabela 20: Ionske jakosti pred in po dodatku 0,2 M NaCl v fosfatni pufer

Medij	Ionska jakost [mM]
Fosfatni pufer (0,05 M K ₃ PO ₄)	96,6
Dodatek NaCl (0,2 M NaCl)	200
Fosfatni pufer z dodatkom NaCl (0,05 M K ₃ PO ₄ + 0,2 M NaCl)	296,6

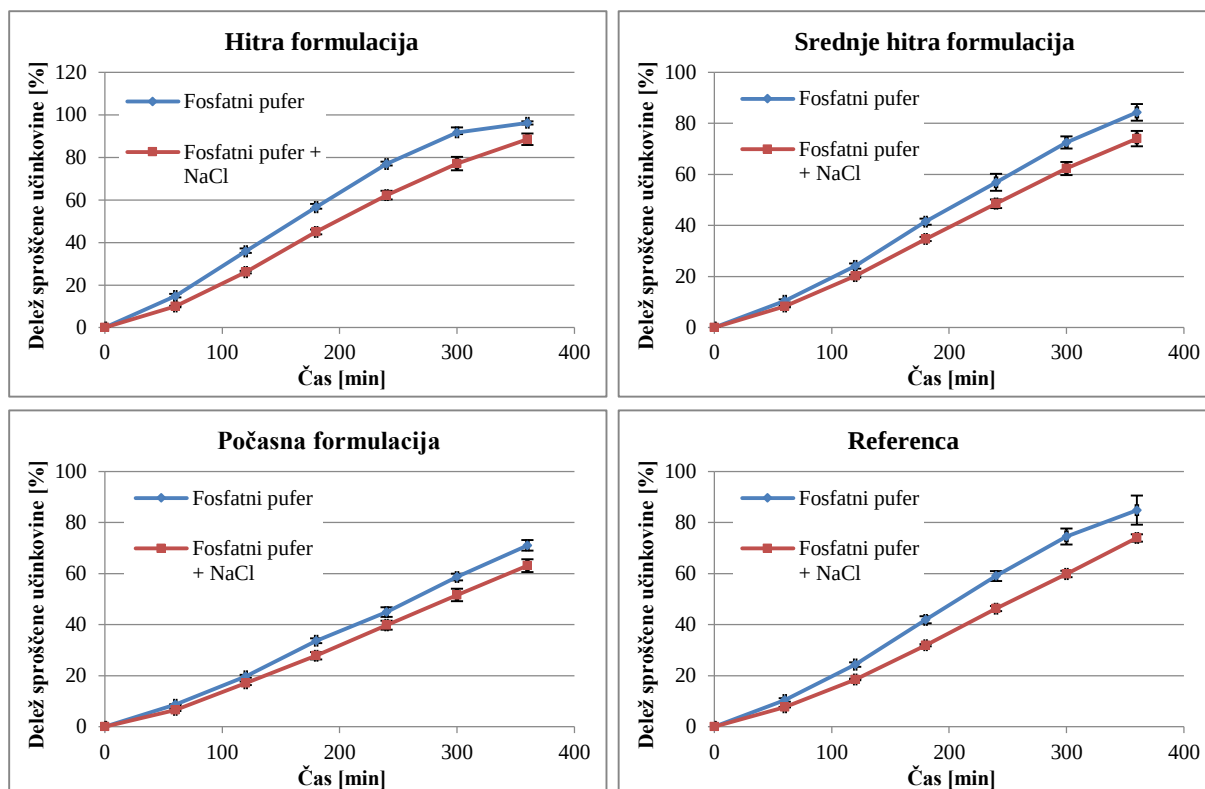
5.6.3. Fosfatni pufer

Ker smo od prve serije poskusov naredili precej sprememb na sami napravi (optimizacija naprave, zamenjava fleksibilne vreče) in na sami izvedbi eksperimenta (volumen medija, program) smo serijo eksperimentov opravljenih v fosfatnem pufru pH-6,8 ponovili še enkrat s programom P12. Rezultati pridobljeni v fosfatnem pufru so prikazani v Tabeli 11, profili sproščanja pa na Grafu 5.

5.7. Primerjava rezultatov

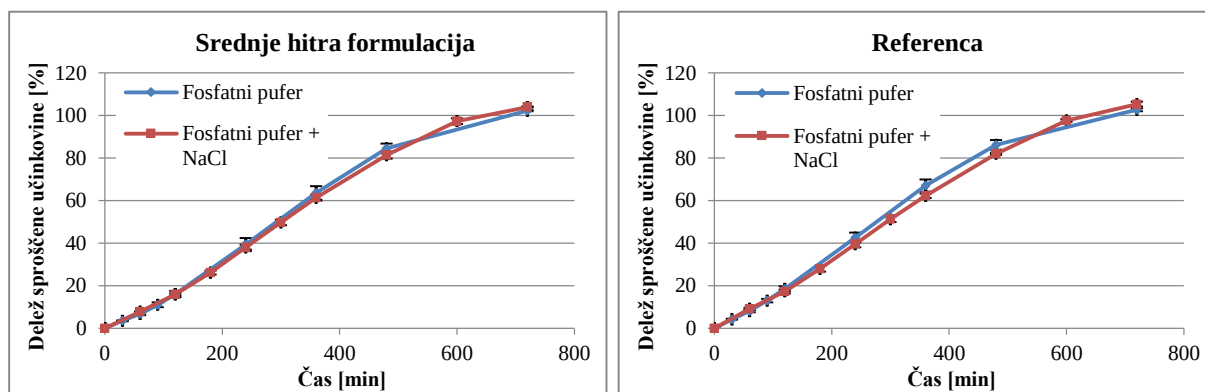
5.7.1. Vpliv ionske jakosti

Primerjali smo profile sproščanja v fosfatnem pufru s profili sproščanja v fosfatnem pufru z dodatkom 0,2 M NaCl (Graf 9). Sprva smo domnevali, da višja ionska jakost oziroma dodatek NaCl pospeši sproščanje, ko smo številke na hitro primerjali z rezultati pridobljenimi v mediju FaSSIF in rezultati preliminarne poskusov v kalijevem fosfatnem pufru. Vendar pa se je domneva kasneje izkazala za napačno, ko smo eksperimente v fosfatnem pufru še enkrat ponovili s programom P12 in pod enakimi pogoji kot pri seriji z dodatkom NaCl. Dejansko se hitrost sproščanja upočasni, kar lahko vidimo na Grafu 9, kjer profili sproščanja pridobljeni v fosfatnem pufru z dodatkom NaCl ležijo nižje od tistih pridobljenih v fosfatnem pufru brez dodatka. Odstotek sproščene učinkovine v časovni točki 300 min je za okoli 15 % nižji pri pufru z dodatkom NaCl (relativno glede na fosfatni pufer brez dodatka NaCl). Pri referenci relativni odstotek znižanja preseže 20 %.



Graf 9: Primerjava profilov sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 s profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl (P12)

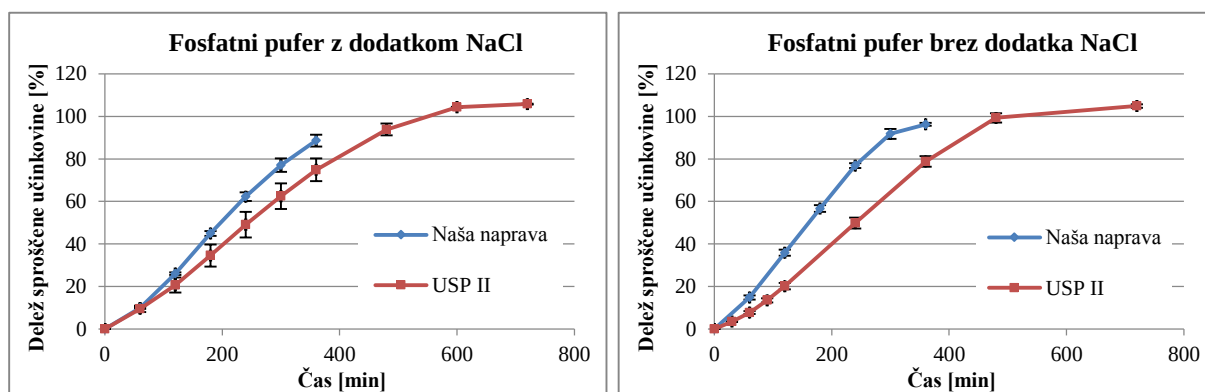
Na voljo smo imeli tudi rezultate preskusov sproščanja opravljenih na napravi z vesli (USP II). Če smo primerjali profile sproščanja v fosfatnem pufru brez dodatka NaCl s profili sproščanja v fosfatnem pufru z dodatkom NaCl (Graf 10), smo opazili, da med njimi ni bistvene razlike.



Graf 10: Primerjava profilov sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 s profili sproščanja v kalijevem fosfatnem pufru pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl (USP II, 50 obratov/min)

Zakaj torej naša naprava prikaže razliko zaradi dodatka NaCl in spremembe ionske jakosti, medtem ko aparatura USP II te razlike ne prikaže? Če primerjamo profile sproščanja hitre formulacije pridobljene z napravo za posnemanje črevesnega gibanja s profili sproščanja na aparaturi USP II (Graf 11), lahko vidimo, da poteka sproščanje učinkovine precej hitreje na

napravi za posnemanje črevesnega gibanja, torej je naša naprava sposobna ustvariti večje mehanske obremenitve in drugačne (bolj ostre) hidrodinamske pogoje kot pa aparatura USP II pri 50 obratih/min. Prav tako smo po koncu eksperimenta (360 min) na naši napravi opazili razliko med ostanki ogrodja tablete, ko smo izvajali preskus v fosfatnem pufru ali v fosfatnem pufru z dodatkom NaCl. V primeru pufra z dodatkom NaCl je ogrodje po koncu poskusa v večji meri ohranilo svojo primarno (bikonveksno) obliko v primerjavi z ogrođjem v fosfatnem pufru brez dodatka NaCl, kjer je bil ostanek ogrodja manjši in bolj deformiran, v okolici je bilo mogoče videti več delcev erodiranega polimera. Večji delež erozije v primeru pufra brez dodatka NaCl smo opazili tudi pri izvedbi preskusa nabrekanja (Slika 8). Naša opažanja potrjuje tudi članek Kavanagha in Corrigan, ki pri mediju z višjo ionsko jakostjo (v našem primeru dodatek NaCl) navaja manjši delež erozije polimera pri HPMC ogrođnih tabletah, saj zaradi pojava izsoljevanja, ko ioni tekmujejo za vodo, ki je na voljo za hidratacijo, vežejo molekule le-te; tako polimer nabreka počasneje, do erozije pa pride kasneje (43). Iz vsega zgoraj naštetega lahko sklepamo, da je naša naprava ustvarila večjo mehansko obremenitev, za katero je bila bolj dovzetna formulacija v mediju brez dodatka NaCl (fosfatni pufer), zaradi česar je prišlo do hitrejšega sproščanja na račun večjega deleža erozije tablete.

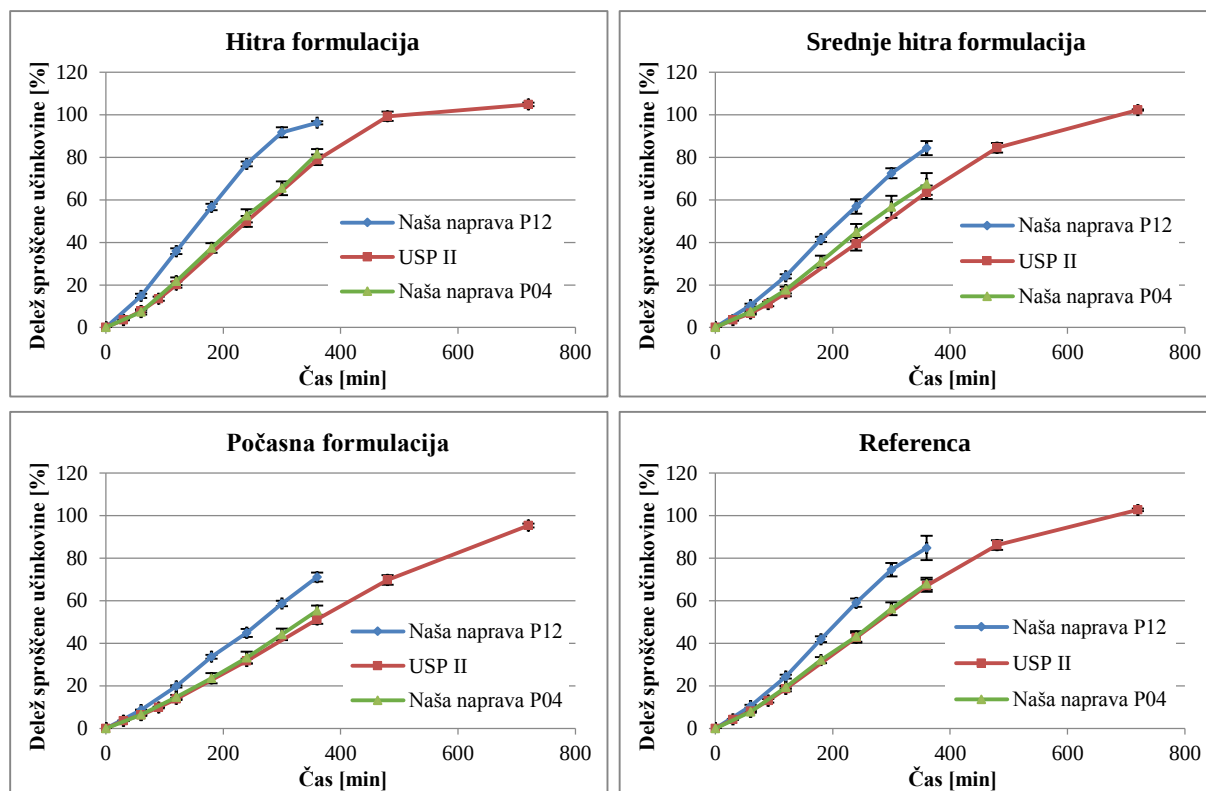


Graf 11: Primerjava profilov sproščanja hitre formulacije pridobljenih z napravo za posnemanje črevesnega gibanja (naša naprava) in z aparaturo USP II v fosfatnem pufru z dodatkom NaCl (levo) in brez dodatka NaCl (desno)

5.7.2. Primerjava naprave za posnemanje črevesnega gibanja z aparaturo USP II

Med seboj smo primerjali vse preskuse sproščanja opravljene v fosfatnem pufru pH-6,8 (Graf 12). Kot lahko vidimo, se profili sproščanja pridobljeni na naši napravi s programom P04 skoraj povsem prekrivajo s profili sproščanja pridobljenimi z aparaturo USP II, kar kaže na to da je programom P04 na naši napravi ekvivalenten preskusu pri 50 obratih/min na aparaturi USP II za testirane formulacije. Profili sproščanja pridobljeni na naši napravi s programom P12 ležijo precej višje od profilov pridobljenih z aparaturo USP II, zato lahko sklepamo, da smo s

programom P12 dosegli precej bolj ostre hidrodinamske pogoje ter večje strižne sile in mehanske obremenitve kot s programom P04 in aparaturo USP II. Da program P12 ustvarja agresivnejše pogoje od programa P04, smo predvideli že prej, saj smo za program P12 izbrali precej višje amplitude zaslonk in platforme kot pri programu P04.



Graf 12: Primerjava profilov sproščanja v fosfatnem pufru pH-6,8 pridobljenih z napravo za posnemanje črevesnega gibanja (naša naprava) s programoma P04 in P12 ter z aparaturo USP II

5.7.3. Primerjava razmerij povprečnih deležev sproščene učinkovine

Izračunali smo razmerja med povprečnimi deleži sproščene učinkovine iz testnih formulacij in povprečnim deležem sproščene učinkovine iz reference (Tabela 21). Na vrhu tabele so razmerja maksimalnih plazemskih koncentracij testnih formulacij in referenčnega zdravila (*in vivo* študija), katerim smo se želeli približati z razmerji pridobljenimi v preskusih sproščanja na naši napravi. Časovno točko, v kateri smo izračunali razmerja, smo si izbrali tam, kjer se je znotraj ene serije poskusov pri največ formulacijah sprostilo med 50-70 % učinkovine.

Tabela 21: Razmerja med povprečnimi deleži sproščene učinkovine iz testnih formulacij in povprečnim deležem sproščene učinkovine iz referenčnega zdravila v različnih časovnih točkah [%]; HF – hitra formulacija, SHF – srednje hitra formulacija, PF – počasna formulacija

	HF/REF	SHF/REF	PF/REF
<i>In vivo študija:</i>			
Razmerje C_{max} *	139,7	91,4	63,5
<i>In vitro</i> preskusi na naši napravi:			
Fosfatni pufer P03 (300 min)	116,4	100,9	78,5
Absolutno odstopanje	23,3	9,5	15,0
Acetatni pufer P04 (300 min)	117,8	109,7	85,5
Absolutno odstopanje	21,9	18,3	22,0
FaSSIF P12 (300 min)	125,9	108,2	95,1
Absolutno odstopanje	13,8	16,8	31,6
Fosfatni pufer + NaCl P12 (300 min)	128,9	104,2	86,2
Absolutno odstopanje	10,8	12,8	22,7
Fosfatni pufer P12 (240 min)	130,3	96,4	76,1
Absolutno odstopanje	9,4	5,0	12,6
<i>In vitro</i> preskusi na aparaturi USP II:			
USP II: Fosfatni pufer + NaCl (360 min)	120,4	98,7	75,1
Absolutno odstopanje	19,3	7,3	11,6
USP II: Fosfatni pufer (360 min)	117,4	94,8	76,5
Absolutno odstopanje	22,3	3,4	13,0

* Razmerja maksimalnih plazemskih koncentracij testnih formulacij in referenčnega zdravila

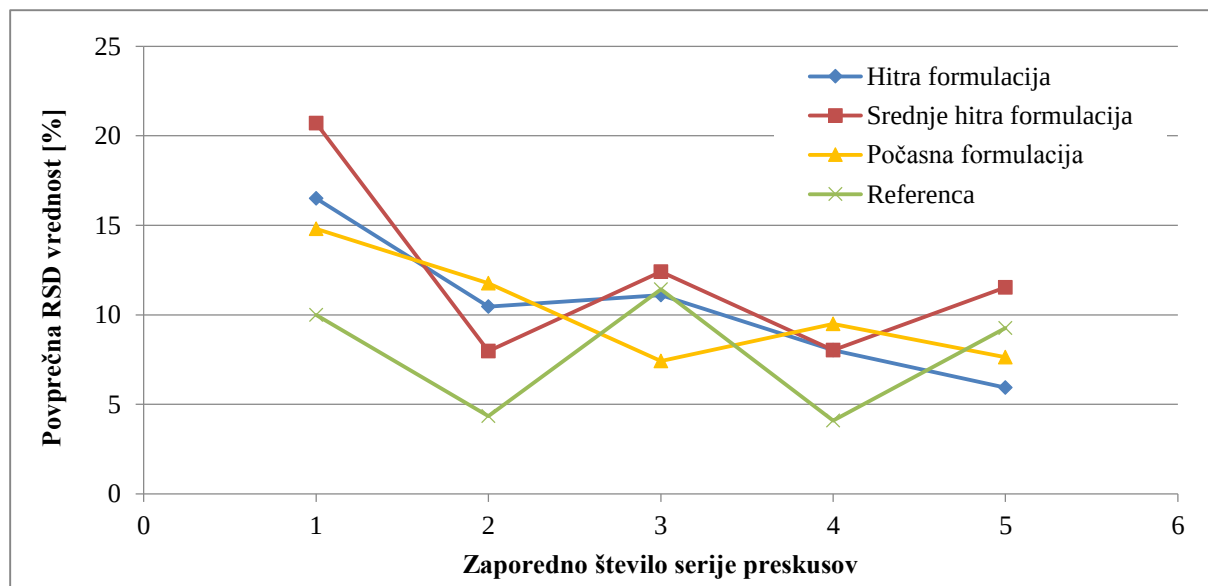
In vivo razmerja počasne formulacije 63,5 % z *in vitro* testi realno nismo mogli doseči, saj se modelna učinkovina v fizioloških pogojih po absorpciji s pomočjo efluksa odstranjuje iz enterocitov nazaj v lumen črevesa. Ker je transport nasitljiv, ima to največjo težo pri počasni formulaciji, ko je sproščanje učinkovine najpočasnejše, absorpcija pa je zaradi efluksa še počasnejša kot v primeru hitrejših formulacij. Če primerjamo razmerja hitra formulacija/referenca, smo se želeni vrednosti 139,7 % najbolj približali z uporabo fosfatnega pufera in programa P12, ko je razmerje znašalo 130,3 %. Sledi fosfatni pufer z dodatkom NaCl (128,9 %) in FaSSIF (125,9 %); pri obeh medijih smo uporabili program P12. *In vivo* razmerju srednje hitra formulacija/referenca 91,4 % smo se najbolj približali z uporabo fosfatnega pufera in programa P12 (96,4 %); to je tudi edina metoda, ki je na naši napravi prikazala počasnejše sproščanje srednje hitre formulacije glede na referenco (razmerje manjše od 100 %). Pri počasni

formulaciji smo se želeni vrednosti 63,5 % ponovno najbolj približali z uporabo fosfatnega pufru in programa P12 (76,1 %). Sledi fosfatni pufer in P03 (78,5 %) ter nato acetatni pufer (85,5 %).

Če torej povzamemo, smo najboljše rezultate in razmerja dosegli z uporabo fosfatnega pufru pH-6,8, še posebej v kombinaciji s programom P12, saj smo se z metodo najbolj približali *in vivo* razmerjem pri prav vseh testnih formulacijah. Prav tako daje metoda boljše rezultate za našo formulacijo kot aparatura USP II, saj je sposobna boljše pokazati razlike med testnimi formulacijami in se bolj približa *in vivo* razmerjem.

5.7.4. Gibanje relativnih standardnih deviacij (RSD)

Za vsako serijo preskusov v drugem mediju smo izračunali povprečno RSD vrednost vsake formulacije ter jih primerjali med seboj. Kot lahko vidimo na Grafu 13, so povprečne RSD vrednosti testnih formulacij znašale med 15-25 % pri prvi seriji eksperimentov, kasneje smo dosegali vrednosti med 7-13% pri serijah 2 in 3, medtem ko smo pri serijah 4 in 5 uspeli doseči vrednosti pod 10 %. Najnižje RSD vrednosti smo dosegli v 4. seriji preskusov, ko smo kot medij uporabili kalijev fosfatni pufer pH-6,8 z dodatkom 0,2 M NaCl (vse testne formulacije imajo RSD vrednost pod 10 %, medtem ko je vrednost pri referenci celo pod 5 %). Vzrok za to lahko najdemo v dodatku NaCl, ki povzroči enakomernejše nabrekanje in manjši delež erozije polimera v primerjavi z ostalimi mediji ter tako prispeva k boljši ponovljivosti.



Graf 13: Primerjava povprečnih RSD vrednosti skozi serije preskusov pri vseh testnih formulacijah in referenci; serija 1 – kalijev fosfatni pufer pH-6,8 P04, serija 2 – acetatni pufer pH-4,5, serija 3 – FaSSIF, serija 4 – kalijev fosfatni pufer pH-6,8 + 0,2 M NaCl, serija 5 – kalijev fosfatni pufer pH-6,8 P12

Rečemo lahko, da smo med našim eksperimentalnim delom uspeli signifikantno znižati RSD vrednosti, za kar lahko vzrok pripišemo optimizirani metodi izvedbe preskusa sproščanja (večji volumen medija, natančen protokol izvedbe preskusa) in izboljšavam, ki smo jih opravili na napravi za posnemanje črevesnega gibanja.

6. SKLEP

Z napravo za posnemanje črevesnega gibanja (*in vitro* model) smo na več izbranih formulacijah s prirejenim sproščanjem z različnimi hitrostmi sproščanja preskušali vplive različnih pogojev na kinetiko sproščanja modelne učinkovine. Uporabili smo različne formulacije hidrofilnih ogrodnih tablet z modelno učinkovino, za katere smo že imeli *in vivo* podatke o kinetiki sproščanja iz farmakokinetične študije. Z eksperimenti smo želeli pokazati odzivnost *in vitro* modela s ciljem doseganja *in vivo* opaženih razlik v kinetiki sproščanja.

Spremembe, ki smo jih uporabili za ovrednotenje, so vključevale sestavo medija (pH, ionska jakost, dodatek surfaktantov) in dinamiko gibanja vsebine lumna fleksibilne vreče. Prišli smo do naslednjih ugotovitev: nižji pH pospeši sproščanje, kar je v skladu z večjo topnostjo oziroma hitrostjo raztapljanja modelne učinkovine; višja ionska jakost upočasni sproščanje, tako da upočasni nabrekanje in zmanjša raztapljanje polimera, ker zmanjša solvatni plašček polimernih verig; to smo potrdili tudi s fotografijami nabrekanja tablet (gelskih plasti).

Pri vseh preskušanih medijih oziroma metodah smo z modelom uspeli doseči razlikovanja med formulacijami z različnimi kinetikami sproščanja. Kot najboljša za izbrano formulacijo se je izkazala metoda s kalijevim fosfatnim pufrom pH-6,8 in programom P12, saj smo na ta način dosegli največje ujemanje z *in vivo* opaženo kinetiko (razmerja med deleži sproščene učinkovine iz testnih formulacij in reference). Prav tako smo z metodo dosegli boljše ujemanje z *in vivo* razmerji kot s klasičnim USP II preskusom sproščanja.

Pomemben rezultat našega dela je tudi optimizacija delovanja naprave, s čimer smo dosegli večjo ponovljivost (RSD vrednosti smo zmanjšali iz 15-20 % v povprečju na vrednosti pod 10 %) in manj neželenega ustavljanja oziroma napak. Kot najpomembnejše spremembe lahko navedemo večji volumen medija za sproščanje, natančen protokol izvedbe preskusa in izboljšave na aparaturi.

S predstavljenim primerom želimo prikazati uporabnost in fleksibilnost naprave oziroma novega *in vitro* modela, za katerega pričakujemo, da bo lahko uspešno simuliral sproščanje tudi drugih podobnih formulacij. Glede na dobljene rezultate, ki so v dobri povezavi z izidom farmakokinetične študije, lahko z nadaljnjo optimizacijo modela dosežemo visoko *in vivo* napovedno moč.

7. LITERATURA

1. Klein S: The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. *AAPS J.* 2010; 12(3): 397–406.
2. Lee SL, Raw AS, Yu L: Dissolution Testing. In: Krishna R, Yu L, editors. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development.* Springer US; 2008. p. 47–74.
3. Culen M, Rezacova A, Jampilek J, Dohnal J: Designing a dynamic dissolution method: A review of instrumental options and corresponding physiology of stomach and small intestine. *J Pharm Sci.* 2013; 102(9): 2995–3017.
4. Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, et al.: In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* 2014; 57: 342–66.
5. Dissolution. In: United States Pharmacopeia. 32nd ed. United States Pharmacopoeial Convention; 2009.
6. Garbacz G, Klein S, Weitschies W: A biorelevant dissolution stress test device – background and experiences. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010; 7(11): 1251–61.
7. Aoki S, Ando H, Tatsuishi K, Uesugi K, Ozawa H: Determination of the mechanical impact force in the in vitro dissolution test and evaluation of the correlation between in vivo and in vitro release. *Int J Pharm.* 1993; 95(1–3): 67–75.
8. Sako K, Sawada T, Nakashima H, Yokohama S, Sonobe T: Influence of water soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2002; 81(1–2): 165–72.
9. Abrahamsson B, Pal A, Sjöberg M, Carlsson M, Laurell E, Brasseur JG: A Novel in Vitro and Numerical Analysis of Shear-Induced Drug Release from Extended-Release Tablets in the Fed Stomach. *Pharm Res.* 2005; 22(8): 1215–26.
10. Garbacz G, Wedemeyer R-S, Nagel S, Giessmann T, Mönnikes H, Wilson CG, et al.: Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 70(2): 421–8.
11. Klančar U, Markun B, Baumgartner S, Legen I: A Novel Beads-Based Dissolution Method for the In Vitro Evaluation of Extended Release HPMC Matrix Tablets and the Correlation with the In Vivo Data. *AAPS J.* 2012; 15(1): 267–77.

12. Klančar U, Markun B, Legen I: Development of physiologically relevant dissolution methods for evaluation of hydrophilic matrix tablets using new dissolution apparatus. *Farm Vestn.* 2014; 65(Special Issue): 37–9.
13. Bogataj M, Cof G, Mrhar A: Development of a Glass-Bead Device for Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* 2015; 22(3): 18–24.
14. Carino SR, Sperry DC, Hawley M: Relative bioavailability estimation of carbamazepine crystal forms using an artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci.* 2006; 95(1): 116–25.
15. Carino SR, Sperry DC, Hawley M: Relative bioavailability of three different solid forms of PNU-141659 as determined with the artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci.* 2010; 99(9): 3923–30.
16. Vardakou M, Mercuri A, Barker SA, Craig DQM, Faulks RM, Wickham MSJ: Achieving Antral Grinding Forces in Biorelevant In Vitro Models: Comparing the USP Dissolution Apparatus II and the Dynamic Gastric Model with Human In Vivo Data. *AAPS PharmSciTech.* 2011; 12(2): 620–6.
17. Wickham MJS, Faulks RM, Mann J, Mandalari G: The Design, Operation, and Application of a Dynamic Gastric Model. *Dissolution Technol.* 2012; 19(3): 15–22.
18. Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Jos H.J. Huis in't Veld: A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Altern Lab Anim ATLA.* 1995; 23(2): 197–209.
19. McAllister M: Dynamic Dissolution: A Step Closer to Predictive Dissolution Testing? *Mol Pharm.* 2010; 7(5): 1374–87.
20. Guerra A, Denis S, le Goff O, Sicardi V, François O, Yao A-F, et al.: Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113(6): 1325–35.
21. Recommendations on dissolution testing. In: *European Pharmacopoeia*. 8th ed. Council of Europe; 2014.
22. Guideline on the investigation of bioequivalence. *European Medicines Agency*; 2010.
23. Azarmi S, Roa W, Löbenberg R: Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *Int J Pharm.* 2007; 328(1): 12–21.
24. Marieb EN, Hoehn K: *Human Anatomy & Physiology*. 9th ed. Boston: Pearson; 2012. 1264 p.

25. Dvanajstnik: <https://sl.wikipedia.org/w/index.php?title=Dvanajstnik&oldid=3871341>
(dostopano dne: 2. 11. 2015)
26. Digestive system. Ann ICRPICRP Publ. 1975; 23: 122–73.
27. Mudie DM, Amidon GL, Amidon GE: Physiological Parameters for Oral Delivery and in Vitro Testing. Mol Pharm. 2010; 7(5): 1388–405.
28. Small intestine:
https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Small_intestine&oldid=699834357
(dostopano dne: 20. 1. 2016)
29. Mudie DM, Murray K, Hoad CL, Pritchard SE, Garnett MC, Amidon GL, et al.: Quantification of Gastrointestinal Liquid Volumes and Distribution Following a 240 mL Dose of Water in the Fasted State. Mol Pharm. 2014; 11(9): 3039–47.
30. Schiller C, Fröhlich C-P, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N, et al.: Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. Aliment Pharmacol Ther. 2005; 22(10): 971–9.
31. Hall JE: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Pa: Saunders; 2010. 1120 p.
32. Hasler WL: Small Intestinal Motility. In: Johnson LR, editor. Physiology of the Gastrointestinal Tract. 4th ed. Burlington: Academic Press; 2006. p. 935–64.
33. Wilding IR, Coupe AJ, Davis SS: The role of γ -scintigraphy in oral drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2001; 46(1–3): 103–24.
34. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW: Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. Int J Pharm. 2008; 364(2): 213–26.
35. Nokhodchi A, Raja S, Patel P, Asare-Addo K: The role of oral controlled release matrix tablets in drug delivery systems. BioImpacts BI. 2012; 2(4): 175–87.
36. Patel H, Panchal DR, Patel U, Brahmbhatt T, Suthar M: Matrix Type Drug Delivery System: A Review. JPSBR. 2011; 1(3): 143–51.
37. Modi K, Modi M, Mishra D, Mittal P, Sorathiya U, Shelat P: Oral Controlled Release Drug Delivery System: An Overview. Int Res J Pharm. 2013; 4(3): 70–6.
38. Larsson A, Abrahmsén-Alami S, Juppo A: Oral Extended-Release Formulations. In: Pharmaceutical Sciences Encyclopedia. John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. 1191–222.
39. Klančar U: Razvoj fiziološko relevantnih metod preskusa raztapljanja hidrofilnih ogrodnih tablet z uporabo farmakopejskih naprav ter njihovih modifikacij (doktorska disertacija). 2013.

40. Lebar A: Pregled literaturnih podatkov o kemijskih, kemijsko-fizikalnih in bio-fizikalnih lastnostih substance (interno gradivo). Lek d.d.; 2014.
41. Markun B: Bioequivalence Risk Assessment (interno gradivo). Lek d.d.; 2014.
42. Diaci J: Aparat, ki simulira gibanje črevesa človeka (interno gradivo). Fakulteta za Strojništvo, Univerza v Ljubljani; 2013.
43. Kavanagh N, Corrigan OI: Swelling and erosion properties of hydroxypropylmethylcellulose (Hypromellose) matrices—influence of agitation rate and dissolution medium composition. *Int J Pharm.* 2004; 279(1–2): 141–52.
43. FaSSIF, FeSSIF & FaSSGF Powder - Fasted and Fed State Simulated Intestinal and Stomach Fluids: <http://biorelevant.com/fassif-fessif-fassgf-powder/establish-in-vitro-in-vivo-correlations-ivivcs/> (dostopano dne 28. 3. 2016)
45. Asare-Addo K, Conway BR, Larhrib H, Levina M, Rajabi-Siahboomi AR, Tetteh J, et al.: The effect of pH and ionic strength of dissolution media on in-vitro release of two model drugs of different solubilities from HPMC matrices. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 111: 384–91.