

Univerza *v Ljubljani*  
Fakulteta *za farmacijo*



REBEKA KOŽELJ

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE TABLET S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM  
NA OSNOVI KSANTANA IN HITOSANA**

**FORMULATION AND EVALUATION OF PROLONGED RELEASE TABLETS  
BASED ON XANTHAN AND CHITOSAN**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

Iskrena zahvala mentorici doc. dr. Saši Baumgartner za strokovno pomoč, spodbudo in razumevanje ter za optimizem in zgled pri raziskovalnem delu.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, še posebej asist. Mateju Pavliju, mag. farm. za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju. Za lektoriranje se zahvaljujem mami Marjani Gmajner Korošec, prav tako hvala komisiji za pregled diplomske naloge.

Še posebno se zahvaljujem svojemu možu Mitji, ki brez izjem vedno verjame vame in me spodbuja. Hvala staršem, bratu in prijateljem.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Saše Baumgartner, mag. farm.

Ljubljana, december 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Andrej Umek, mag. farm.

# KAZALO

|                                                                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>POVZETEK.....</b>                                                                                                                  | <b>III</b> |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>                                                                                                          | <b>V</b>   |
| <b>1. UVOD .....</b>                                                                                                                  | <b>1</b>   |
| 1.1. PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PRIREJENIM SPROŠČANJEM .....                                                                     | 1          |
| 1.2. PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM.....                                                                     | 2          |
| 1.2.1. Dejavniki, ki vplivajo na oblikovanje peroralnih farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem .....                           | 3          |
| 1.2.2. Fiziologija gastrointestinalnega trakta .....                                                                                  | 3          |
| 1.3. HIDROFILNE OGRODNE TABLETE S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM.....                                                                        | 5          |
| 1.3.1. Princip izdelave in mehanizem nabrekanja hidrofilnih ogrodnih tablet .....                                                     | 5          |
| 1.3.2. Proces sproščanja učinkovine iz hidrofilnih ogrodnih tablet .....                                                              | 7          |
| 1.4. HIDROFILNI POLIMERI ZA IZDELAVO TABLET S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM .....                                                           | 7          |
| 1.4.1. Ksantan .....                                                                                                                  | 8          |
| 1.4.2. Hitosan .....                                                                                                                  | 11         |
| 1.4.3. Kompleksi med ksantanom in hitosanom .....                                                                                     | 13         |
| <b>2. NAMEN DELA .....</b>                                                                                                            | <b>15</b>  |
| <b>3. EKSPERIMENTALNO DELO .....</b>                                                                                                  | <b>16</b>  |
| 3.1. MATERIALI .....                                                                                                                  | 16         |
| 3.2. NAPRAVE .....                                                                                                                    | 18         |
| 3.3. POSTOPKI IN METODE .....                                                                                                         | 20         |
| 3.3.1. Izdelava tablet .....                                                                                                          | 20         |
| 3.3.1.1. Izdelava tablet z direktnim stiskanjem prahov .....                                                                          | 20         |
| 3.3.1.2. Izdelava tablet iz predhodno pripravljenih kompleksov med ksantanom in LV hitosanom ter iz liofiliziranega MV hitosana ..... | 21         |
| 3.3.2. Priprava liofiliziranih kompleksov med ksantanom in LV hitosanom ter priprava liofiliziranega MV hitosana .....                | 22         |
| 3.3.2.1. Priprava koloidnih raztopin polimerov .....                                                                                  | 22         |
| 3.3.2.2. Združevanje raztopin ksantana in LV hitosana z uporabo mešal .....                                                           | 23         |
| 3.3.2.3. Liofilizacija pripravljenih kompleksov in MV hitosana .....                                                                  | 24         |
| 3.3.3. Priprava medijev za vrednotenje sproščanja učinkovine iz tablet .....                                                          | 26         |
| 3.3.4. Določanje enakomernosti mase tablet .....                                                                                      | 27         |
| 3.3.5. Določanje enakomernosti vsebnosti učinkovine v tabletah .....                                                                  | 27         |
| 3.3.6. Določanje trdnosti tablet .....                                                                                                | 27         |

|                                                                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.7. Preskus sproščanja učinkovine iz tablet.....                                                                                               | 28        |
| 3.3.8. Izračun faktorja podobnosti za različne profile sproščanja učinkovine iz tablet .....                                                      | 34        |
| 3.3.9. Snemanje IR spektrov s tehniko oslabiljene popolne odbojnosti (ATR).....                                                                   | 35        |
| <b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>                                                                                                              | <b>36</b> |
| 4.1. VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET .....                                                                                                            | 36        |
| 4.1.1. Rezultati vrednotenja enakomernosti mase izdelanih tablet .....                                                                            | 36        |
| 4.1.2. Rezultati vrednotenja vsebnosti učinkovine v izdelanih tabletah .....                                                                      | 37        |
| 4.1.3. Rezultati vrednotenja trdnosti izdelanih tablet.....                                                                                       | 38        |
| 4.1.4. Rezultati vrednotenja velikosti tablet ter indeksa elastične relaksacije .....                                                             | 39        |
| 4.2. SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ OGRODNIH TABLET .....                                                                                               | 40        |
| 4.2.1. Sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi z uporabo BIODIS-a (Naprava 3) 41                                                        |           |
| 4.2.2. Sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi z uporabo naprave s košaricami<br>(Naprava 1) .....                                      | 44        |
| 4.2.3. Primerjava vpliva uporabljene naprave na sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni<br>vodi .....                                        | 47        |
| 4.2.4. Sproščanje učinkovine iz tablet v pufrih z uporabo BIODIS-a.....                                                                           | 49        |
| 4.2.5. Primerjava sproščanja učinkovine z uporabo BIODIS-a v prečiščeni vodi in pufrih z<br>različnimi pH-ji.....                                 | 53        |
| 4.2.6. Primerjava sproščanja učinkovine z uporabo BIODIS-a v prečiščeni vodi in pufrih z<br>različnimi pH-ji s povišano ionsko močjo .....        | 56        |
| 4.2.7. Sproščanje učinkovine iz tablet na osnovi kompleksov med ksantanom in LV<br>hitosanom v pufrih z različnimi pH-ji z uporabo BIODIS-a ..... | 58        |
| 4.2.8. Sproščanje učinkovine iz tablet na osnovi liofiliziranega MV hitosana v pufrih z<br>različnimi pH-ji z uporabo BIODIS-a.....               | 59        |
| 4.2.9. Vpliv predhodne kompleksacije polimerov in vrste hitosana na sproščanje učinkovine<br>iz tablet v pufrih.....                              | 60        |
| <b>5. SKLEPI .....</b>                                                                                                                            | <b>65</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                                                                                                                        | <b>66</b> |

## POVZETEK

Peroralne farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem predstavljajo bolnikom eno najbolj zelenih oblik terapije, saj je peroralna pot administracije enaka kot pri prehranjevanju. S temi oblikami dosežemo manjše število odmerjanj, s čimer se posledično zmanjšajo tudi nihanja plazemskih koncentracij učinkovine. Najpogosteje uporabljene peroralne farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem so hidrofilne ogrodne tablete, katerih osnova je nabrekli polimer. Pri našem delu smo za njihovo izdelavo izbrali ionogena polimera ksantan in hitosan, ki sta v farmaciji pogosto uporabljana.

Namen našega dela je bil izdelava in vrednotenje nekaterih farmacevtsko-tehnoloških parametrov tablet na osnovi ksantana in hitosana ter preučevanje sproščanja učinkovine iz izdelanih tablet. Kot modelno učinkovino smo izbrali pentoksifilin, ki je neionogena in v vodi dobro topna molekula. Ugotavljali smo, kako na sproščanje učinkovine vplivajo različna razmerja polimerov v tableti, različni mediji za sproščanje in njihova ionska moč ter kakšen je vpliv uporabe dveh različnih naprav za preučevanje sproščanja (naprave z recipročnimi cilindri in naprave s košaricami).

V ta namen smo z direktnim stiskanjem prahov najprej izdelali tablete iz vsakega posameznega polimera in učinkovine ter tablete iz zmesi ksantana in LV hitosana v masnih razmerjih 1:1, 3:1 in 1:3. Preskusili smo tudi, ali predhodna kompleksacija omenjenih polimerov predstavlja prednost v smislu neodvisnosti načina sproščanja v različnih medijih v primerjavi s profili sproščanja iz tablet, stisnjenih iz fizikalne zmesi prahov. Zato smo izdelali še tablete iz predhodno pripravljenih kompleksov med ksantanom in LV hitosanom. Nastanek kompleksov smo poskušali potrditi s tehniko oslabiljene popolne odbojnosti infrardeče absorpcijske spektroskopije.

Ugotovili smo, da je glede posnemanja fizioloških pogojev v gastrointestinalnem traktu boljša izbira naprave z recipročnimi cilindri namesto naprave s košaricami, glede medijev pa je odločilna izbira pufrov z naraščajočimi vrednostmi pH namesto prečiščene vode. Izkazalo se je, da LV hitosan pripomore k počasnejšemu sproščanju učinkovine pri nizkih vrednostih pH medija, medtem ko ksantan pri visokih. Kombinacija obeh polimerov deluje sinergistično v smislu neodvisnosti sproščanja od vrednosti pH medija. To je pomembna ugotovitev, saj je farmacevtska oblika vzdolž prebavnega trakta izpostavljena zelo različnim pH vrednostim.

Sproščanje učinkovine iz tablet, izdelanih iz predhodno pripravljenih kompleksov, se ni v tolikšni meri izrazilo v večji neodvisnosti sproščanja od pH ali ionov, da bi lahko upravičili smiselnost priprave kompleksov, ki je precej zahtevna in zamudna. Če bi želeli doseči podaljšano sproščanje učinkovine skozi še daljši časovni interval, bi bilo glede na rezultate smiselno namesto nizko viskoznega hitosana uporabiti srednje viskozni hitosan ter ponovno izdelati tablete iz zmesi s ksantanom s postopkom direktnega tabletiranja.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

|                 |                                                                           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|
| A .....         | absorbanca                                                                |
| ATR .....       | Attenuated Total reflection – tehnika oslabiljene popolne odbojnosti      |
| c .....         | koncentracija učinkovine v vzorcu                                         |
| DSC .....       | Differential Scanning Calorimetry – diferenčna dinamična kalorimetrija    |
| EMA .....       | European Medicines Agency – evropska agencija za zdravila                 |
| ER .....        | Indeks elastične relaksacije                                              |
| FDA .....       | Food and Drug Administration – ameriška agencija za prehrano in zdravila  |
| FO .....        | farmacevtska oblika                                                       |
| FS .....        | Formularium Slovenicum                                                    |
| $f_2$ .....     | faktor podobnosti                                                         |
| GIT .....       | gastrointestinalni trakt, prebavni trakt                                  |
| Hit .....       | hitosan                                                                   |
| IM .....        | ionska moč                                                                |
| IR .....        | Infrared absorption spectroscopy – infrardeča absorpcijska spektroskopija |
| k .....         | naklon umeritvene krivulje                                                |
| LV Hit .....    | Low – viscous hitosan (nizko viskozni hitosan)                            |
| MV Hit .....    | Middle - viscous hitosan (srednje viskozni hitosan)                       |
| PEC .....       | polielektrolitski kompleks                                                |
| PF .....        | pentoksifilin                                                             |
| Ph.Eur. ....    | Evropska farmakopeja                                                      |
| PV .....        | prečiščena voda                                                           |
| $R^2$ .....     | kvadrat Pearsonovega korelacijskega koeficienta                           |
| RSD .....       | relativni standardni odmik                                                |
| SD .....        | standardni odmik                                                          |
| $t_{1/2}$ ..... | biološki razpolovni čas                                                   |
| T .....         | temperatura                                                               |
| $T_g$ .....     | temperatura steklastega prehoda                                           |
| UV-VIS .....    | Ultraviolet-visible spectroscopy - ultravijolična-vidna spektroskopija    |
| UZ .....        | ultrazvok                                                                 |
| ZU .....        | zdravilna učinkovina                                                      |
| Xan .....       | ksantan                                                                   |

## 1. UVOD

### 1.1. PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PRIREJENIM SPROŠČANJEM

Sproščanje je izraz, ki opredeljuje prehajanje zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike, v katero je ta vgrajena. Peroralne farmacevtske oblike lahko tako razdelimo na:

1. **farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem** (immediate – release dosage forms): pri katerih se ZU takoj po prihodu v gastrointestinalni trakt sprosti iz FO;
2. **farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem** (modified – release dosage forms): se od predhodnih razlikujejo po hitrosti ali mestu sproščanja ZU, apliciranih po isti poti. Razdelimo jih lahko na:
  - **farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem** (extended – release dosage forms), ki omogočajo podaljšan čas sproščanja zdravilne učinkovine,
  - **farmacevtske oblike z zakasnelim sproščanjem** (delayed – release dosage forms), ki omogočajo začetek sproščanja zdravilne učinkovine po določenem času po zaužitju,
  - **farmacevtske oblike s pulzirajočim sproščanjem** (pulsative – release dosage forms), ki omogočajo sproščanje zdravilne učinkovine v določenih časovnih presledkih (1).

Formularium Slovenicum navaja, da moramo pri tabletah s prirejenim sproščanjem dokazati ustreznost sproščanja zdravilne učinkovine. Slednje dokažemo z enim od preskusov, opisanih v Evropski farmakopeji v poglavju Preskus sproščanja za trdne farmacevtske oblike (2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms) (1, 2).

Namen preverjanja ustreznosti sproščanja je dvojen, in sicer:

1. kontrola kakovosti FO že v razvojni fazi izdelave, pri prenosu v proizvodnjo in med proizvodnjo,
2. predvidevanje *in vivo* obnašanja FO po aplikaciji in napovedovanje plazemskih profilov (3).



## 1.2. PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM

Namen načrtovanja farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem je doseči vzdrževanje terapevtskih koncentracij zdravilne učinkovine v plazmi skozi daljše časovno obdobje. Za pacienta so takšne farmacevtske oblike bolj prijazne, saj z njimi zmanjšamo pogostost odmerjanja in tudi število potrebnih nočnih odmerjanj je manjše. Tako dosežena večja compliance lahko pomeni krajši čas oskrbe pacienta in stroškovno bolj učinkovito terapijo. S farmacevtskimi oblikami s podaljšanim sproščanjem dosežemo manjše nihanje plazemskih koncentracij učinkovine, kar je lahko pomembno z vidika zmanjšanja neželenih učinkov v primerih, ko so ti povezani z velikim nihanjem plazemskih koncentracij ZU. Prav tako pa lahko z načrtovanjem teh farmacevtskih oblik zmanjšamo količino ZU, ki je potrebna za zdravljenje nekega pacienta. To ima ugodne posledice tako glede obremenitve bolnika z manjšim odmerkom zdravila kot tudi s stroškovnega vidika.

Poleg prednosti pa se moramo zavedati tudi slabosti pri načrtovanju peroralnih FO s podaljšanim sproščanjem. Obstaja možnost sprostitev celotnega odmerka ZU naenkrat, kar lahko pomeni preseženo minimalno toksično koncentracijo ZU. Ovira se lahko pojavi pri ZU, ki se v velikem obsegu predsistemskega metabolizirajo. S prirejenim sproščanjem se namreč učinkovina počasneje dovaja in so tako encimi vedno znova na razpolago za njen metabolizem, s čimer se še poveča obseg predsistemskega metabolizma. Slabost peroralnih oblik s podaljšanim sproščanjem je tudi zmanjšana možnost individualnega odmerjanja, saj farmacevtskih oblik, s katerimi običajno dosežemo tovrstno sproščanje (kapsule, obložene tablete, plavajoče tablete ...), ne smemo lomiti. Z lomljenjem namreč uničimo princip doseganja prirejenega sproščanja in tako morajo proizvajalci pripraviti zdravilo z več različnimi odmerki. Slabost je tudi to, da je čas sproščanja ZU omejen na čas zadrževanja FO na mestu absorpcije. Na oblikovanje FO s podaljšanim sproščanjem pa seveda vplivajo tudi lastnosti ZU, ki nas lahko omejujejo, saj nekatere ZU niso primerne za vgradnjo v tovrstne FO:

- ZU z dolgim ali zelo kratkim razpolovnim časom ( $t_{1/2} > 8\text{h}$  in  $t_{1/2} < 2$ ),
- ZU, katerih absorpcija je zelo počasna ali vezana le na del GIT,
- ZU z zelo nizko topnostjo,
- ZU, pri katerih lahko pride do obsežnega predsistemskega metabolizma,
- ZU z ozkim terapevtskim oknom ... (3, 4)

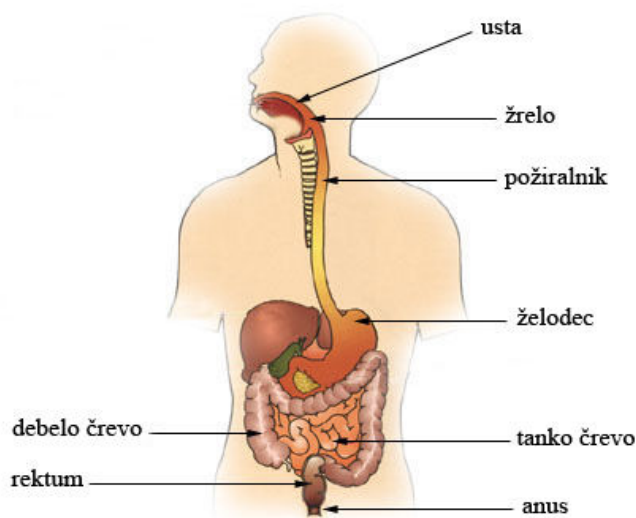
### 1.2.1. Dejavniki, ki vplivajo na oblikovanje peroralnih farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem

Pri načrtovanju peroralnih sistemov s podaljšanim sproščanjem se moramo zavedati številnih faktorjev, ki lahko imajo vpliv na izbiro dostavnega sistema. Poznati moramo :

- fiziologijo gastrointestinalnega trakta (gibljivost prebavnega trakta, praznjenje želodca, vezava na encime, pH vrednosti, bolezenska stanja ...),
- biološke dejavnike (absorpcija in metabolizem ZU, biološki razpolovni čas ...),
- Fizikalno-kemijske lastnosti ZU (velikost odmerka, topnost, ionizacija, porazdelitveni koeficient, kemijska stabilnost ...),
- lastnosti FO (čas razpada, hitrost nadzorovanega sproščanja, mehanizem sproščanja ZU iz FO ...) (4, 5).

### 1.2.2. Fiziologija gastrointestinalnega trakta

Peroralna aplikacija učinkovin je najbolj zaželena pot administracije iz več razlogov. Gre za najbolj naraven vnos snovi v človeško telo, saj tako poteka tudi prehranjevanje in je zato compliance pacientov največja. Hkrati je to tudi cenovno najugodnejše. Da pa lahko načrtujemo peroralne farmacevtske oblike, moramo dobro poznati fiziologijo GIT. Peroralno aplicirana farmacevtska oblika namreč potuje po prebavnem traktu skozi področja, kjer so različni pogoji ter prihaja v stik z različnimi biokemijskimi barierami. Anatomsko lahko razdelimo GIT na prevodni del (usta, žrelo, požiralnik, rektum, anus) ter na del, kjer potekata prebava in absorpcija (želodec, tanko in debelo črevo) (Slika 1).



Slika 1: Posamezni deli gastrointestinalnega trakta (6).

Prebavni trakt je z notranje strani obdan s plastjo mukoze, ki jo sestavljajo epitelij, lamina propria in muscularis mucosae, vendar pa se debelina mukoze razlikuje glede na del GIT.

V prevodnem delu GIT tvori mukoza več plasti, ki predstavljajo bariero za mnoge substance. V absorptivnem delu GIT pa je mukoza sestavljena le iz ene plasti. Ta ima pomembno vlogo pri absorpciji in sekreciji (7). Pogoji in nekateri fizikalni parametri v GIT so podani v Preglednici I.

**Preglednica I:** Parametri in fiziološki pogoji v različnih delih GIT (7).

| del GIT               | dolžina (cm)     | površina (cm <sup>2</sup> )                | volumen (ml)     | pH             | povprečen čas prehoda hrane ali FO |
|-----------------------|------------------|--------------------------------------------|------------------|----------------|------------------------------------|
| <b>celoten GIT</b>    | <b>530 - 870</b> | <b>približno <math>2 \cdot 10^6</math></b> |                  | <b>1,5-7</b>   | <b>do 38h</b>                      |
| <b>prazen želodec</b> | <b>25</b>        |                                            | <b>25-50</b>     | <b>1,4-2,1</b> | <b>0,5-1,5h</b>                    |
| <b>poln želodec</b>   |                  |                                            | <b>1000-1600</b> | <b>2-5</b>     | <b>2-6h</b>                        |
| <b>tanko črevo</b>    | <b>370-630</b>   | <b><math>7-20 \cdot 10^5</math></b>        |                  | <b>4,4-7,4</b> | <b>3-4h</b>                        |
| duodenum              | 20-30            | $1,1-2,8 \cdot 10^5$                       |                  | 4,9-6,4        | 3-10min                            |
| jejunum               | 150-260          | $2,7-7,5 \cdot 10^5$                       |                  | 4,4-6,4        | 0,5-2h                             |
| ileum                 | 200-350          | $3,6-10,5 \cdot 10^5$                      |                  | 6,5-7,4        | 0,5-2,5h                           |
| <b>debelo črevo</b>   | <b>150</b>       | <b><math>1,5 \cdot 10^4</math></b>         |                  | <b>5,5-7,4</b> | <b>do 27h</b>                      |

Mesto absorpcije večine ZU, ki jih vnesemo peroralno, je tanko črevo. Dobri pogoji za absorpcijo so sicer že v dvanajstniku (duodenumu), vendar je tukaj čas zadrževanja kratek. V želodcu obstaja možnost absorpcije kislih ZU, ki se dobro raztapljajo in prehajajo želodčno sluznico.

Zelo pomembno je, da vemo, koliko časa potrebuje farmacevtska oblika za prehod skozi želodec in koliko časa se zadrži na mestu absorpcije. Za trdne farmacevtske oblike velja, da je čas prehoda skozi želodec odvisen od faze MMC cikla, v kateri je želodec ob zaužitju FO, od velikosti FO ter volumna popite tekočine. Pri zaužitju na tešče je tako pričakovan srednji čas praznjenja za večino enoodmernih FO, ki ne razpadejo takoj po zaužitju 1 do 2h. Če FO zaužijemo po hranjenju, se ta čas podaljša predvidoma za nekaj ur, vendar literaturni podatki ne navajajo natančno opredeljenih vrednosti. Nadaljnji prehod FO skozi tanko črevo je konstanten in nanj ne vpliva način gibanja tankega črevesja, celokupno pa znaša 3 do 4h (3, 4).

### 1.3. HIDROFILNE OGRODNE TABLETE S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM

Glavni predstavniki peroralnih sistemov s podaljšanim sproščanjem so:

- ogrodni sistemi (hidrofobne in hidrofilne ogrodne tablete, pri katerih je ZU molekularno ali po delcih dispergirana v polimerni mreži),
- osmotski sistemi,
- sistemi z rezervoarji oziroma membransko nadzorovani sistemi.

Predstavljena razdelitev, ki se sicer najpogosteje uporablja, ni absolutna in edina, saj obstaja več kriterijev, po katerih bi lahko razdelili te sisteme. V literaturi smo zasledili še razdelitev peroralnih sistemov s podaljšanim sproščanjem glede na naravo (lipofilnost) pomožnih snovi. Predstavniki te razdelitve so inertni, lipidni in hidrofilni dostavni sistemi (5,8).

V diplomski nalogi smo proučevali hidrofilne ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem. Pri teh poznamo dva osnovna mehanizma, ki zagotavljata podaljšano sproščanje ZU:

- sproščanje, nadzorovano z difuzijo, za katerega je značilno, da je hitrost sproščanja učinkovine odvisna od hitrosti difuzije skozi inertno bariero;
- sproščanje, nadzorovano z raztapljanjem polimera (erozijo), kjer lahko manjšo hitrost sproščanja dosežemo tako, da dobro topno učinkovino vgradimo v nosilec, ki se počasi raztaplja.

Možna in predvsem pogosta je tudi kombinacija, kjer sproščanje nadzorujeta oba mehanizma. Ne smemo pa pozabiti, da učinkovine, ki so v vodi slabo topne, že same po sebi omogočajo upočasnjeno sproščanje (5, 9, 10 ).

#### 1.3.1. Princip izdelave in mehanizem nabrekanja hidrofilnih ogrodnih tablet

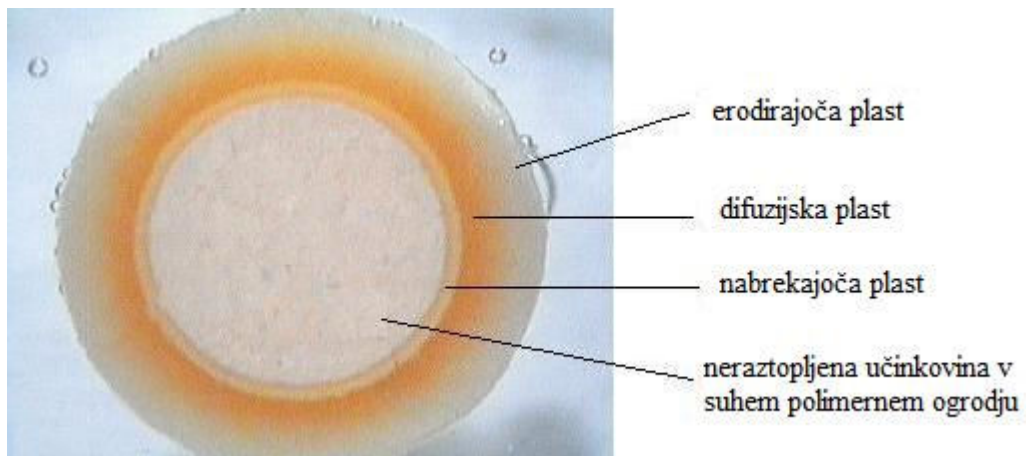
Najenostavnejša izdelava tablet je direktno stiskanje, kjer praškasto zmes ZU, hidrofilnega polimera in pomožnih snovi (polnilo, drsilo, pH modifikator sproščanja ...) homogeniziramo in stisnemo v tableto. V stiku z vodo ali telesnimi tekočinami hidrofilni polimer nabreka in tvori viskozno, hidratirano gelsko plast, ki nato kontrolira nadaljnjo

difuzijo vode v ogrodje in uravnava sproščanje ZU, hkrati pa tudi preprečuje razgradnjo ogrodja (5, 11).

V suhem stanju je polimer v steklasti obliki, ZU v njem ni mobilna. Ko se polimer omoči, preide v zmečano stanje in ZU postane mobilna. Za ta prehod moramo preseči temperaturo steklastega prehoda polimera, ki pa se ob prisotnosti vode pri večini polimerov zniža pod eksperimentalno (oz. telesno) temperaturo (11).

Med nabrekanjem se znotraj tablete ustvarijo različna področja oz. plasti (Slika 2):

- v sredini tablete imamo neraztopljeno učinkovino v suhem polimernem ogrodju,
- nabrekajoča plast (v tej plasti polimer prehaja iz steklastega v elastično oz. zmečano stanje),
- difuzijska plast (področje, v katerem je ZU raztopljena in se s procesom difuzije pomika proti zunanosti gela),
- erodirajoča plast (je na površini tablete, ki je v stiku z medijem, tukaj se polimer raztaplja).



**Slika 2:** Plasti v nabrekajoči hidrofilni ogrodni tableti (12).

Na začetku nastaja na meji med polimerom in medijem (vodo) elastični hidrogel, znotraj katerega lahko ločimo nabrekajočo in erodirajočo plast, katerih deleža se s časom spreminjata. Nabrekajoča plast, ki opravlja nalogo bariere za vdor vode kot tudi za difuzijo ZU iz tablet, se veča na račun izginevanja steklastega polimera v sredici tablete in se tako širi v notranjost tablete. Ko je tableta v celoti omočena, njena steklasta sredica izgine in začne prevladovati erozijski proces, ki sicer poteka sočasno z nabrekanjem polimera že od samega začetka. Tako se začneta erozijska in difuzijska plast pomikati proti sredini tablete,

saj se na površini tablete polimerne verige odpletajo in prehajajo v obdajajoč medij, vse dokler celotna tableta ne razpade (8, 12).

### 1.3.2. Proces sproščanja učinkovine iz hidrofilnih ogrodnih tablet

Sproščanje ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet je pogojeno z več procesi:

- na začetku prevladuje močenje polimernega ogrodja s topilom, pri čemer se raztaplja tudi ZU (v primeru, da je vodotopna), ki je prisotna na površini tablet, zato lahko pride na začetku do nekoliko hitrejšega sproščanja ZU (t.i. »burst effect«);
- hidrofilni polimer se hidratira in tvori na površini tablete gelsko plast, ki predstavlja bariero za nadaljnji privzem vode in za sproščanje ZU;
- sledi faza ravnotežja, v kateri sta hitrosti vstopa vode v polimerno ogrodje in erozija polimernih verig podobni, zato je prisotno v tej fazi konstantno sproščanje ZU (debelina gelske plasti je v tej fazi konstantna);
- sproščanje v vodi topnih ZU je kontrolirano predvsem z difuzijo skozi gelsko plast, slabo topnih ZU pa bolj z erozijo oz. raztapljanjem polimera;
- v zadnji stopnji je prevladujoč proces erozija, zato se debelina gelske plasti začne tanjšati, vse dokler tableta popolnoma ne razpade.

Ti procesi ne potekajo nujno enako pri vseh polimerih. En proces lahko prevlada nad drugim, kar je odvisno od lastnosti izbranega polimera (5, 11, 13).

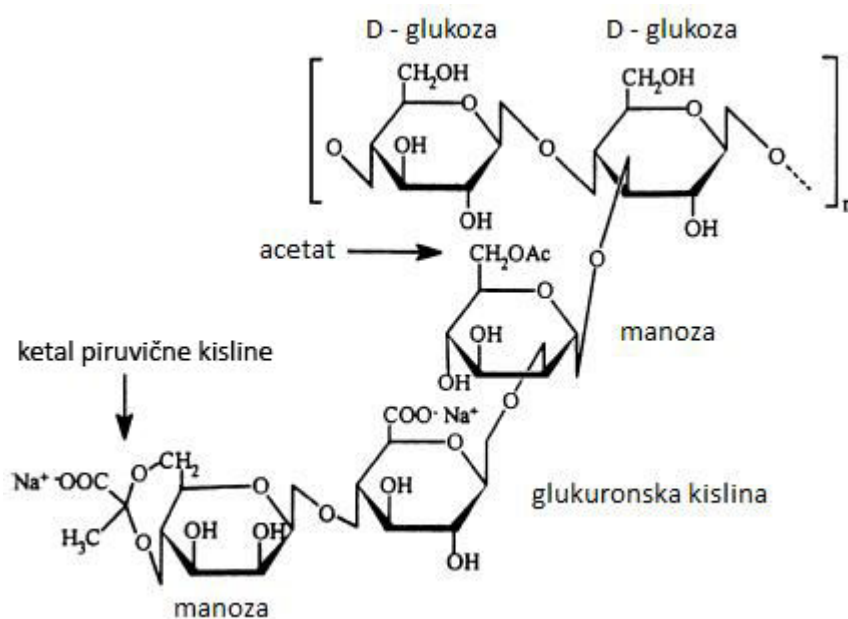
## 1.4. HIDROFILNI POLIMERI ZA IZDELAVO TABLET S PODALJŠANIM SPROŠČANJEM

Na voljo imamo veliko izbiro polimerov, ki jih lahko uporabimo pri izdelavi tablet s podaljšanim sproščanjem. Za pripravo hidrofilnih ogrodnih tablet se najpogosteje uporabljajo hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) in drugi celulozni etri, polietilenoksidni polimeri, ksantan, karbopol, alginati, hitosan in drugi (5, 11).

### 1.4.1. Ksantan

Ksantan (angleško Xanthan gum, okrajšano Xan) je visokomolekularni anionski polisaharid, ki ga ekstracelularno izloča gram negativna bakterija *Xanthomonas Campestris* z namenom, da jo ščiti pred visoko temperaturo in vplivom svetlobe. Omenjena bakterija uspeva pri aerobnih pogojih v mediju, ki vsebuje ogljikove hidrate. Ksantan pridobivajo tako, da ga izolirajo iz fermentacijske brozge ter prečistijo z obarjanjem s propanol-2-olom. Nato ga posušijo in zmeljejo. Bakterija *Xanthomonas Campestris* za človeka ni patogena, pač pa povzroča številne bolezni pri rastlinah (2, 14,15).

Kemijsko je ksantan heteropolisharid, sestavljen iz osnovnega skeleta, ki ga tvorijo molekule D-glukoze, povezane z  $\beta(1,4)$  vezmi (Slika 3). Vsaka druga molekula glukoze je substituirana s trisaharidno stransko verigo, ki jo sestavljata dve manози, med kateri je vrinjena molekula glukuronske kisline. Manoza, ki se pripenja na osnovno verigo, je običajno acetilirana na mestu 6, medtem ko je na terminalno manozo lahko preko mest 4 in 6 v obliki ketalu pripeta piruvična kislina. Obseg acetiliranih manoz ter manoz s pripetim ketalom piruvične kisline je odvisen od seva bakterije, iz katerega je ksantan izoliran, Evropska farmakopeja pa postavlja zahtevo po minimalni vsebnosti piruvičnih skupin 1,5% glede na suho substanco. Ksantan je dostopen v obliki natrijeve, kalijeve in kalcijeve soli.



Slika 3: Primarna struktura ksantana (17).

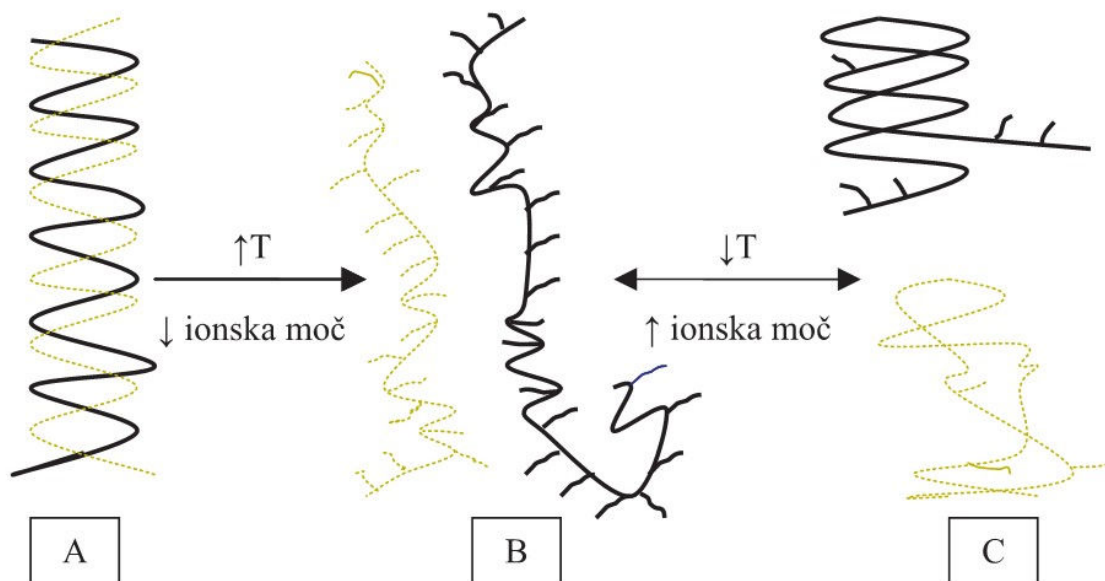
Po videzu je ksantan bel ali rahlo rumen prah, topen v vodi, pri čemer daje visokoviskozno raztopino, medtem ko je v organskih topilih praktično netopen (2, 16, 18).

Ksantan nastopa v več sekundarnih strukturah (Slika 4). Znanstveniki največkrat opisujejo dve in sicer urejeno in neurejeno. Urejena oblika ksantana je definirana kot petkrat zavita dvojna vijačnica (15). V tej obliki se molekula ksantana nahaja pri sobni temperaturi v trdnem stanju ali v mediju z visoko ionsko močjo. V mediju elektroliti nevtralizirajo negativne naboje na stranskih verigah, kjer so prisotne piruvatne skupine in glukuronska kislina. S tem se izničijo elektrostatski odboji med stranskimi skupinami, zato se te lahko prilegajo osnovni verigi preko vodikovih vezi. Molekule ksantana se posledično lahko ovijejo v dvojno vijačnico (14,19).

Pri povišani temperaturi ali znižani ionski moči prevladajo odbojne sile med negativno nabitimi stranskimi verigami, ki se sedaj odmaknejo stran od osnovne verige. Dvojna vijačnica se začne razpirati v posamezne polimerne verige. To obliko poimenujemo kot denaturirano obliko oziroma neurejeno. Prehod med urejeno in neurejeno obliko je ireverzibilen, potrjujejo pa ga raziskave s pomočjo masne spektroskopije. Te so dokazale, da je molekulska masa denaturiranega ksantana enaka ravno polovici molekulske mase ksantana v nativni konformaciji. Temperatura, pri kateri pride do prehoda iz dvojne v enojno vijačnico, je 80-130<sup>0</sup>C (14, 19).

Eksperimenti so pokazali, da nadaljnje ohlajanje ali povišanje ionske moči denaturirani raztopini polimera povzroči ponoven prehod molekule ksantana v obliko vijačnice, le da vijačnico sedaj tvori ena sama molekula ksantana. To obliko poimenujemo kot renaturirano konformacijo, prehod iz denaturirane v renaturirano obliko pa je reverzibilen. Renaturirana oblika ksantana je v primerjavi z nativno obliko bistveno manj popolna. Stran od osnovne strukture prosto segajo deli verig in zavoji, ki omogočajo večje intermolekularne interakcije, zato renaturirani ksantan tvori večje agregate kot nativni (20).





**Slika 4:** Sekundarna struktura ksantana: A - nativna (urejena) konformacija, B - denaturirana oblika, C - renaturirana oblika (14).

### Stabilnost ksantana

Ksantan v obliki prahu je stabilen, prav tako tudi v obliki vodne raztopine pri pH območju od 3-12. Največjo stabilnost po literaturnih podatkih pričakujemo pri pH 4-10 in temperaturi od 10 do 60°C. Ksantan je stabilen tudi ob prisotnosti encimov, soli, kislin in baz, le pri zelo alkalnih pogojih polivalentni kationi, kot je npr. kalcij, povzročijo obarjanje (16). Pri pH < 3 lahko ksantan izgubi piruvično in acetilno skupino in se zato nahaja v neionizirani kislinski obliki, v kateri ni več prisotnih odbojnih elektrostatskih sil med verigami. Nastane dvojna vijačnica, ki pa se zaradi drugačnih funkcionalnih skupin razlikuje od native oblike ksantana. Kadar v kislem okolju pod pH < 3 izvajamo sproščanje ZU iz ogrodne ksantanske tablete, je nastali gelski plašč tanjši in nastaja počasneje. Posledično je difuzijska pot učinkovine krajša, zato je sproščanje hitrejše (19, 21).

Ksantan je anionski polimer, zato ni vedno združljiv s kationskimi površinsko aktivnimi snovmi, polimeri in konzervansi. Znana je njegova inkompatibilnost z oksidirajočimi snovmi, nekaterimi filmskimi oblogami za tablete, natrijevo soljo karboksimetilceluloze ter nekaterimi učinkovinami, kot so amitriptalin, tamoksifen, verapamil ... (16).

### Varnost in uporaba ksantana

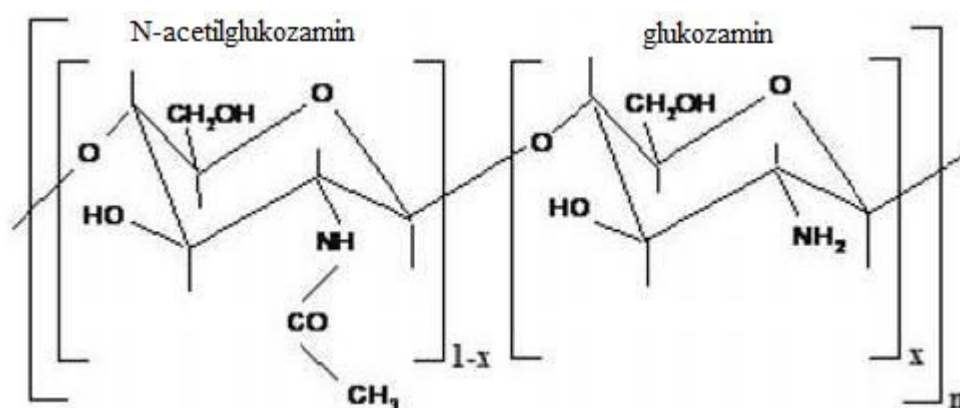
Ksantan velja za netoksično in neirritirajočo pomožno snov. Vrednost ADI (acceptable daily intake), to je količina pomožne snovi (običajno v mg/kg telesne teže), ki jo človek lahko zaužije na dan brez tveganja za stranske učinke, pa je po podatkih svetovne zdravstvene organizacije (WHO) ocenjena na več kot 10 mg/kg telesne mase (21). V prehrambeni industriji ksantan pogosto uporabljajo kot zgoščevalo, stabilizator, nizkokalorični nadomestek za maščobe. V pekovskih izdelkih dodatek ksantana zadržuje vlago in tako omogoča daljši čas, ko kruh ostane »svež«. V kozmetiki je najpomembnejša uporaba ksantana pri izdelavi zobnih past, saj pastam zagotavlja kompaktno strukturo, hkrati pa se pri mešanju z vodo hitro raztopi in se tako spere z zob. V farmacevtski industriji se uporablja kot zgoščevalo, stabilizator emulzij in sredstvo za izdelavo oblik s podaljšanim sproščanjem v peroralnih in dermalnih farmacevtskih oblikah (15, 22).

#### **1.4.2. Hitosan**

Hitosan (angleško Chitosan, okrajšano Hit) je biokompatibilen, biorazgradljiv kationski polimer, ki ga pridobivajo iz polisaharida hitina z delnim deacetiliranjem. Hitin kot drugi najbolj razširjen polisaharid v naravi najdemo v oklepih rakov, v kutikulah insektov in v celičnih stenah nekaterih gob. Pridobivajo ga tako, da najprej odstranijo proteine z uporabo alkalij, nato pa še s pomočjo kislin minerale, kot sta kalcijev karbonat in kalcijev fosfat. Hitin je v vodi slabo topen, z deacetilacijo v obsegu 50% ob prisotnosti baz in temperaturi 110<sup>0</sup>C pa postane topen v kislem vodnem mediju in takrat ga imenujemo hitosan. Sledi še več stopenj čiščenja in nevtralizacije. Pri postopku je potrebno zagotoviti popolno inaktivacijo ali odstranitev virusov in drugih mikrobov (2, 16, 23).

Kemijsko je hitosan kopolimer, sestavljen iz  $\beta(1-4)$  povezanih enot D-glukozamina in N-acetil-D-glukozamina (Slika5). Hitosan nima ene same kemijske entitete, pač pa je le-ta odvisna od stopnje deacetilacije. Na tržišču je tako mogoče dobiti različne vrste hitosana, ki se med seboj razlikujejo po molekularni masi (MM je od 10<sup>4</sup> do 10<sup>6</sup> g/mol), stopnji deacetilacije (40-98%) in viskoznosti. Hitosan je praktično netopen v 95% etanolu in drugih organskih topilih, prav tako v vseh nevtralnih in alkalnih raztopinah s pH vrednostjo nad 6,5. Topnost hitosana v kislem vodnem mediju je posledica zmožnosti protonacije amino skupin ponavljajočih se glukozaminskih enot in posledično tvorbe soli (npr. s

kloridi), ki so topne v vodi. Na topnost poleg stopnje deacetilacije (hitosan z nižjo stopnjo deacetilacije je topen tudi pri višjih vrednostih pH, z zviševanjem stopnje deacetilacije pa se nižja vrednost pH, pri kateri je še topen) pomembno vpliva tudi ionska moč, in sicer višja kot je, bolj je izražen efekt izsoljevanja hitosana. To lahko razložimo z dejstvom, da dodatek elektrolitov zmanjša odbojne sile, ki so sicer prisotne med deacetiliranimi enotami topne, »raztegnjene« konformacije hitosana. Ta torej ob prisotnosti elektrolitov preide v zvito konformacijo, ki se obori. Stopnja deacetilacije je zelo pomemben parameter pri vrednotenju hitosana in tudi Evropska farmakopeja med testi navaja določanje stopnje deacetilacije hitosana (2, 16, 24).



Slika 5: Primarna struktura hitosana; ( $n$  = število sladkornih enot polimera,  $x$  = stopnja deacetiliranja) (23).

### Stabilnost hitosana

Hitosan v obliki prahu je stabilen pri sobni temperaturi, vendar pa po sušenju izkazuje higroskopne lastnosti. Evropska farmakopeja navaja, da ga moramo shranjevati pri temperaturi od 2 do 80°C in zaščitene pred vlago in svetlobo. Za hitosan je znano, da je nekompatibilen z močno oksidirajočimi substancami (2, 18).

### Varnost in uporaba hitosana

Hitosan je eden redkih naravnih polisaharidov, ki je visoko bazičen. Je netoksičen, neiritirajoč, biorazgradljiv ter biokompatibilen tako z zdravo kot inficirano kožo. V farmaciji se uporablja kot pomožna snov pri izdelavi peroralnih in drugih farmacevtskih oblik. Znano je, da ima hitosan sposobnost pospeševanja absorpcije učinkovin, in sicer tako, da poveča permeabilnost različnih sluznic (nosne, bukalne, vaginalne, očne). Izkazuje tudi dobre bioadhezivne lastnosti, ki so posledica interakcij med pozitivno

nabitimiaminskimi skupinami polimera in negativno nabitimi skupinami na površini sluznic. To lastnost skušajo izkoristiti v razvoju dostavnih sistemov v obliki liposomov in nanodelcev tako za parenteralno uporabo kot tudi za aplikacijo na različne sluznice. Možna je uporaba hitosana v dostavnih sistemih za kolon, kjer izkoriščamo njegovo razgradnjo z bakterijskimi encimi, ki so prisotni v kolonu. Poleg omenjenega pa poročajo tudi o učinku hitosana na znižanje vrednosti holesterola in trigliceridov v krvi po peroralni aplikaciji, o možnosti imobilizacije encimov s pomočjo hitosana, o njegovih antioksidativnih in protimikrobnih lastnostih, o udeležbi pri pospeševanju celjenja ran ter razvoju dostavnih sistemov za vnos genov. V diplomski nalogi smo se osredotočili predvsem na njegovo vlogo pri zagotavljanju podaljšanega sproščanja ZU iz tablet na osnovi kombinacije s ksantanom (23, 25).

#### **1.4.3. Kompleksi med ksantanom in hitosanom**

Za podaljšano sproščanje ZU iz tablet, ki vsebujejo hidrofilne polimere, je bistveno geliranje polimera. Pri tem voda hidratira polimerne verige in v mediju prihaja do intermolekularnih interakcij ter tvorbe hidrogela. Tako ksantan kot hitosan lahko vsak zase tvorita ogrodne tablete. Obnašanje ogrodja v različnih medijih za sproščanje pa je odvisno od vrste medija in njegove ionske moči. Ksantan kot anionski polimer je pri nizkih pH vrednostih v neionizirani obliki, pri visokih pa v ionizirani obliki, kar ima odločilen vpliv na njegovo geliranje in posledično na zmožnost počasnejšega sproščanja ZU. Tako je pri višjih pH vrednostih zaradi ionizacije sposoben močnejšega geliranja. To je posledica prisotnih odbojnih elektrostatskih sil med negativno nabitimi stranskimi skupinami, ki zato segajo stran od osnovne ksantanske verige in preprečujejo, da bi nastala dvojna vijačnica. Ksantanske molekule so v takšnem stanju močno hidratirane, med seboj pa se povezujejo s šibkimi vodikovimi vezmi in zavzamejo največji volumen. Gelski plašč, ki se pri tem tvori je obsežen in predstavlja učinkovito bariero za sproščanje ZU. Pri nižjih pH vrednostih do tega pojava ne pride. Nastali gelski plašč je tanjši, kar ima za posledico hitrejše sproščanje ZU. Poleg pH medija pa ima velik vpliv na geliranje ksantana ionska moč. Ugotovili so, da visoka koncentracija elektrolitov prepreči geliranje. Razlog za to so nastale spremembe v njegovi konformaciji, kar je posledica dejstva, da elektroliti nevtralizirajo negativne naboje na stranskih verigah. Če povzamemo, da ksantan najbolj gelira in tako upočasni sproščanje ZU pri višjih vrednostih pH in nizki ionski moči, pa s hitosanom ni tako. Hitosan namreč

pri pH nad 6,5 ni topen v vodnem mediju, zato je možno intermolekularno geliranje le pri nižjih pH vrednostih in nizki ionski moči, saj je ugotovljeno, da se hitosan pri visoki ionski moči izobori (26).

Tvorba polielektrolitskih kompleksov med dvema nasprotno nabitima polimeroma je dobro poznana. S spreminjanjem kemijske strukture polimernih komponent, kot so molekulska masa, funkcionalne skupine, gostota naboja, razmerje hidrofilnosti in hidrofobnosti, kot tudi pogojev reakcije, kot so pH, ionska moč, koncentracija, razmerja polimerov in temperatura, lahko pridobimo različne polielektrolitske komplekse. Njihova potencialna področja uporabe so oblaganje, izdelava mikrokapsul, izdelava sistemov za nadzorovano sproščanje, izdelava implantantov za medicinsko uporabo, imobilizacija biološkega materiala ... (27, 28).

Glede na to, da sta ksantan in hitosan nasprotno nabita polimera, bi lahko sklepali, da pri njihovi kombinaciji prihaja do kompleksacije in tvorbe intermolekularnega hidrogela. Raziskave nekaterih avtorjev so pokazale, da se to zgodi pod specifičnimi pogoji, pri katerih sta oba polimera topna in ustrezno ionizirana. Obstoj interpolimernega kompleksa so tako dokazali pri tabletah, narejenih s procesom ekstruzije iz taline ter s postopkom združevanja raztopin posameznih polimerov. Avtorji člankov poročajo o prednostih polielektrolitskih kompleksov ksantana in hitosana v primerjavi z lastnostmi tablet, ki so jih pripravili iz vsakega posameznega polimera. Prednosti se nanašajo predvsem na neodvisnost profilov sproščanja ZU od pH in vrste medija iz takšnih sistemov. Rezultati namreč kažejo, da je sproščanje iz tablet vsakega posameznega polimera pH odvisno, medtem ko je v primeru polielektrolitskih kompleksov sproščanje pH neodvisno (26, 29, 30). Dimitriu s sodelavci v patentu, kjer opisuje pripravo polielektrolitskih kompleksov ksantana in hitosana s postopkom združevanja raztopin polimerov (29) navaja, da je za tvorbo PEC najugodnejši pH raztopine hitosana okoli 6,3. Z zniževanjem pH-ja se % kompleksacije manjša. Hidrogele so pripravili z združevanjem 0,65% raztopin ksantana in hitosana v razmerju 1:1. Nato so nastale hidrogele izolirali s pomočjo centrifugiranja pri 3000 obratih ter jih večkrat sprali s prečiščeno vodo. S tem so odstranili nekompleksiran ksantan in hitosan (29, 31). Opisan postopek nam je pri izdelavi diplomske naloge služil kot izhodišče za pripravo kompleksov, ki smo jih nato liofilizirali. Podatkov, ki bi potrdili nastanek interpolimernih kompleksov pri tabletah, narejenih z direktnim stiskanjem polimerov, v literaturi nismo zasledili.

## 2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo izdelati in ovrednotiti tablete s podaljšanim sproščanjem na osnovi ksantana in hitosana ter njunih kombinacij.

Najprej bomo z metodo direktnega tabletiranja izdelali 400 mg tablete iz vsakega posameznega polimera in vgradili 100 mg učinkovine. Kot modelno neionogeno učinkovino bomo uporabili pentoksifilin, ki je v vodi dobro topen. Nato bomo izdelali 400 mg tablete iz zmesi ksantana in nizko viskoznega hitosana, ki bodo vsebovale 100 mg učinkovine. Tablete bomo pripravili v treh različnih masnih razmerjih polimerov 1:1, 1:3 in 3:1.

Izdelanim tabletam bomo določili nekatere farmacevtsko tehnološke parametre po Ph. Eur. 6<sup>th</sup> Ed., in sicer trdnost, enakomernost mase in enakomernost vsebnosti. Preskuse sproščanja pentoksifilina iz tablet bomo izvajali s pomočjo naprave z recipročnimi cilindri (Naprava 3, Ph. Eur. 6<sup>th</sup> Ed.), ki omogoča izvajanje preskusa sproščanja v različnih medijih. Nekaj preskusov bomo za primerjavo izvedli tudi na napravi s košaricami (Naprava 1, Ph. Eur. 6<sup>th</sup> Ed.). S spreminjanjem medijev za sproščanje bomo ugotavljali vpliv pH in ionske moči medija na sproščanje pentoksifilina ter na videz tablet.

Za primerjavo bomo iz obeh polimerov predhodno pripravili komplekse tako, da bomo polimera raztopili in ju združili z uporabo različnih vrst mešal. Komplekse bomo posušili z liofilizacijo, jim nato dodali učinkovino in jih na enak način stisnili v tablete. Dodatno bomo pripravili še tablete iz liofiliziranega srednje viskoznega hitosana in jih ovrednotili.

Zanimalo nas bo, ali predhodna kompleksacija ksantana in hitosana predstavlja prednost v smislu neodvisnosti načina sproščanja v različnih medijih v primerjavi s profili sproščanja iz tablet, stisnjenih iz fizikalne zmesi prahov.

### 3. EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1. MATERIALI

##### Izdelava tablet:

- Ksantan (Xanthan gum), molekulska masa:  $1 \cdot 10^6$  g/mol, videz: bel do rahlo rumen prašek, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija,
- LV hitosan (Chitosan low - viscous), viskoznost:  $< 200$  mPa·s, videz: bel fin prašek, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija,
- MV hitosan (Chitosan middle - viscous), viskoznost:  $200 - 400$  mPa·s, videz: beli in rumenkasti kosmiči, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija,
- Pentoksifilin (Pentoxifylline), molekulska masa: 278,3 g/mol, videz: bel prah, kontrolna številka: 14106043, Krka, tovarna zdravil d.d. Novo mesto, Novo mesto, Slovenija.

##### Reagenti za pripravo medijev za sproščanje:

- kalijev dihidrogenfosfat ( 99,5-100,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- natrijev hidroksid ( $\geq 99\%$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- klorovodikova kislina 37%, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- natrijev klorid, Lex, Portorož, Slovenija,
- natrijev klorid, ( 99,0 – 100,5% ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- prečiščena voda.

##### Reagenti za pripravo raztopin polimerov:

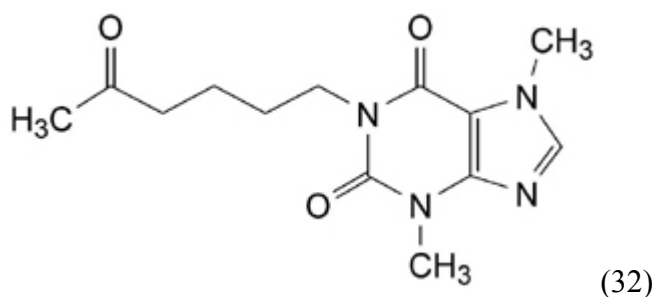
- očetna kislina ( 100% ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- prečiščena voda,
- natrijev hidroksid ( $\geq 99\%$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- klorovodikova kislina 37%, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija.

**PENTOKSIFILIN**

Mednarodno nelastniško ime (INN): pentoksifilin (pentoxifylline)

Kemijsko ime: 3,7-dimetil-1-(5-oksoheksil)-3,7-dihidro-1H-purin-2,6-dion.

Strukturna formula:



Po videzu je pentoksifilin bel kristaliničen prašek, ki je topen v vodi (topnost pri 25°C je 77 mg/ml, pri 37°C pa 191 mg/ml), dobro topen v diklorometanu in zmerno topen v etanolu. V UV območju ima dva absorpcijska maksimuma pri 208 nm in pri 273 nm (32, 33).

Farmakodinamične lastnosti:

- izboljšanje prekrvavitve tkiv zaradi zmanjšanja viskoznosti krvi,
- zmanjšanje agregacije eritrocitov in trombocitov,
- povečanje elastičnosti eritrocitov,
- zmanjšanje plazemske koncentracije fibrinogena,
- zmanjšanje adhezivnosti levkocitov na žilni endotelij ter njihove aktivacije.

Farmakokinetične lastnosti:

- po peroralnem zaužitju se hitro in skoraj popolnoma absorbira,
- zaradi intenzivne presnove pri prvem prehodu skozi jetra je biološka uporabnost le približno 19%,
- metabolizira se v jetrih in se v več kot 90% v obliki nekonjugiranih vodotopnih presnovkov izloči skozi ledvice.



### Neželeni učinki

Večina neželenih učinkov je odvisna od velikosti odmerka. Z njegovim zmanjšanjem dosežemo, da neželeni učinki oslabijo ali popolnoma izginejo. V farmakovigilančnih študijah poročajo o naslednjih neželenih učinkih:

- pri dajanju večjih odmerkov ali hitrem infundiranju pentoksifilin pogosto povzroči občutek vročine, prebavne težave, tiščanje v trebuhu, napihnjenost, slabost, bruhanje in drisko, motnje srčnega ritma;
- možne so preobčutljivostne reakcije v obliki kožnih izpuščajev, srbenja, koprivnice, rdečice;
- pojavijo se lahko omotičnost, glavobol, vznemirjenost, motnje spanca, v posameznih primerih pa tudi intrahepatična holestaza in zvečana aktivnost jetrnih transaminaz;
- zelo redke pa so motnje, kot so znižan krvni tlak, trombocitopenija, angina pectoris in krvavitve v kožo in sluznice.

### Terapevtske indikacije

- motnje arterijske prekrvavitve udov zaradi ateroskleroze ali sladkorne bolezni,
- trofične motnje (golenske razjede, gangrena),
- motnje možganskega krvnega obtoka,
- prekrvavitvene motnje očesa, povezane z degenerativnimi žilnimi spremembami (34, 35, 36).

## **3.2. NAPRAVE**

- avtomatska pipeta BIOHIT m5000 (500 - 5000 µl), Kemomed, Finska
- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- brizge (10ml) Novico S.p.A., Ascoli Piceno, Italija
- centrifuga Centric 322A, Tehnica, Železniki, Slovenija
- centrifugirke (50ml) TPP, certified ISO 9001, Švica
- digitalna tehtnica, Exacta 2200 EB, Tehnica, Železniki, Slovenija
- digitalna tehtnica, Sartorius BP310S, Göttingen, Nemčija
- filtri Full Flow<sup>TM</sup>, velikost por 10 µm, Varian, ZDA

- FT-IR spektrometer Nexus, Nicolet Instrument, ZDA; nastavek Smart DuraSamplIR, Nicolet Instrument, ZDA
- hidravlična tabletirka, SP 300, IMA Kilian, Köln, Nemčija
- Liofilizator CHRIST BETA 1-8K, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Nemčija
- magnetno mešalo, IKA RCT basic, IKA – WERKE, GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- magnetno mešalo, RO 15 power, IKA-WERKE, GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- magnetno mešalo, Rotamix 550 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija
- mešalo OMNI LabTeK Homogenizer, Omni International
- mešalo IKA labortechnik RW 20.n, Jenke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- mlinček za kavo SUPER JUNIOR “S” A505, Moulinex, Francija
- naprava za določanje trdnosti tablet, Vanderkamp<sup>®</sup>, VK 200 Tablet hardness tester, VanKel, New Jersey, ZDA
- naprava za preskušanje sproščanja BIO-DIS (Ph.Eur.6<sup>th</sup>Ed., Naprava 3), Varian, Inc., Cary NC, ZDA; avtomatski vzorčevalnik VK 8000, Varian, Cary NC, ZDA; toplotna črpalka VK 750 Heater/Circuator, Varian, Cary NC, ZDA; polipropilenske mrežice za cilindre 1,25/405 MICRON, Varian, Cary NC, ZDA
- naprava za preskušanje sproščanja z vrtečimi košaricami, (Ph.Eur.6<sup>th</sup>Ed., Naprava1) Dissolution Tester VK 7000, VanKel, New Jersey, ZDA; avtomatski vzorčevalnik VK 8000, VanKel, New Jersey, ZDA
- palični mešalnik, Bosch EasyMixx 600W CNHR7, Robert Bosch Hausgeräte GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Nemčija
- pomično merilo, MIB Messzeuge GmbH, Nemčija pH meter, MA234, Mettler Toledo, pH/Ion Analyzer, Schwerzenbach, Švica
- spektrofotometer UV-VIS, HP 8453, Hewlett – Packard GmbH, Waldbronn, Nemčija
- ultrazvočna kadička, Branson ultrasonic cleaner 1510, Branson Ultrasonics corporation, Danbury CT, ZDA
- ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija

### 3.3. POSTOPKI IN METODE

#### 3.3.1. Izdelava tablet

Izdelali smo tablete po dveh različnih postopkih:

- a) prahove polimerov, dobavljene s strani proizvajalca, smo pomešali z učinkovino in izdelali tablete z direktnim stiskanjem;
- b) predhodno pripravljene liofilizirane komplekse med ksantanom in LV hitosanom smo zmleli, pomešali z učinkovino in nato stisnili tablete. Eno serijo tablet pa smo izdelali tako, da smo zmleli liofiliziran MV hitosan, ga pomešali z učinkovino in stisnili tablete.

##### 3.3.1.1. Izdelava tablet z direktnim stiskanjem prahov

Izdelali smo različne serije 400 mg tablet, sestave, ki je navedena v Preglednici II. Terapevtski odmerek pentoksifilina v komercialno dostopnih zdravilih je sicer 400 mg, mi pa smo v tablete vgradili 100 mg učinkovine, saj gre le za modelno vodotopno učinkovino. Preden smo uspeli izdelati tablete, ki so po trdnosti ustrezale zahtevi 90-110N, smo izdelali sedem različnih vrst tablet. Spreminjali smo velikost posamezne zatehte, ker smo se odločali med izdelavo 300 mg in 400 mg tablet ter odločitvijo, ali je potreben dodatek magnezijevega stearata kot drsila. Ugotovili smo, da so vse serije tablet, pri katerih smo dodali magnezijev stearat v deležu 1%, premalo trdne. Enako se je izkazalo tudi za 300 mg tablete. Iz navedenega razloga so v spodnji preglednici primerne serije izdelanih tablet, ki smo jih uporabili za nadaljnje delo, oštevilčene kot serije 8A - E.

**Preglednica II:** Oznaka in sestava tablet, pripravljenih z direktnim stiskanjem prahov.

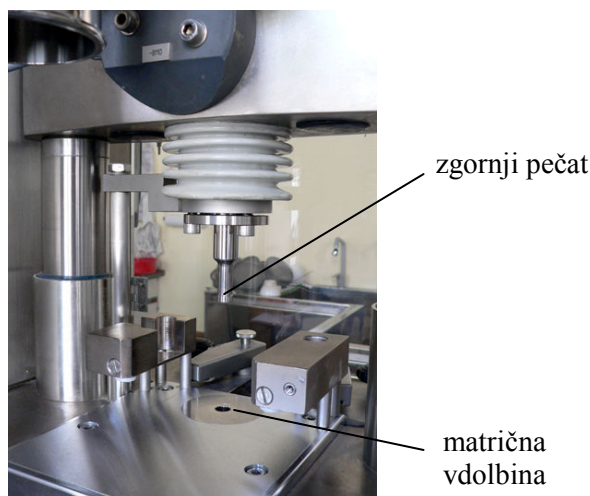
| oznaka tablet | masa PF (mg) | masa ksantana (mg) | masa LV hitosana (mg) |
|---------------|--------------|--------------------|-----------------------|
| <b>8A</b>     | 100          | 150                | 150                   |
| <b>8B</b>     | 100          | 225                | 75                    |
| <b>8C</b>     | 100          | 75                 | 225                   |
| <b>8D</b>     | 100          | 300                | 0                     |
| <b>8E</b>     | 100          | 0                  | 300                   |

Tablete smo izdelali ročno na tabletirki z metodo direktnega tabletiranja (Slika 6). Preračunane količine posameznih sestavin za 30 tablet vsake serije (12 g) smo zmešali v pateni po pravilu rastočih mas. Natehtali smo maso vsake posamezne tablete in jo ročno

vsuli v matrično vdolbino (Slika 7). Nato smo stisnili tablete in na začetku silo stiskanja prilagajali tako dolgo, da smo dobili želeno trdnost tablet med 90 in 110 N. Trdnost smo merili tako, kot je opisano v poglavju 3.3.6. Ker smo tablete izdelovali ročno in v majhnih serijah, smo njihovo trdnost v nadaljevanju spremljali preko parametrov stiskanja tablet. Spremljali smo vrednosti sile stiskanja tablet ter sile izmeta tablet, saj je preskus trdnosti tablet dezintegracijske narave in ga ne moremo izvesti na tabletah, ki bi jih uporabili v nadaljnjih eksperimentih. Preskus trdnosti tablet smo sicer izvedli še med samim tabletiranjem (vsakih 5 do 7 tablet) in na koncu.



**Slika 6:** Hidravlična tabletirka (SP 300, IMA Kilian, Nemčija).



**Slika 7:** Zgornji in spodnji pečat tabletirke.

### 3.3.1.2. Izdelava tablet iz predhodno pripravljenih kompleksov med ksantanom in LV hitosanom ter iz liofiliziranega MV hitosana

Izdelali smo tri serije 400 mg tablet, sestave, ki je navedena v Preglednici III. Odmerek pentoksifilina v vsaki tableti je 100 mg.

**Preglednica III:** Oznaka in sestava tablet, pripravljenih iz predhodno liofiliziranih kompleksov med ksantanom in LV hitosanom ter iz liofiliziranega MV hitosana.

| oznaka tablet | masa PF (mg) | masa liofiliziranega kompleksa (mg)   | metoda združevanja |
|---------------|--------------|---------------------------------------|--------------------|
| LIO1          | 100          | 300                                   | palični mešalnik   |
| LIO2          | 100          | 300                                   | mešalnik OMNI      |
| oznaka tablet | masa PF (mg) | masa liofiliziranega MV hitosana (mg) |                    |
| LIO3          | 100          | 300                                   |                    |

Liofilizirane komplekse oz. MV hitosan smo zmleli v prah z mlinčkom za kavo, nato pa dodali natehtano maso pentoksifilina in zmes homogenizirali. Poskusili smo tudi z mešanjem zmletih liofilizatov in PF v terilnici, vendar so pri tem nastajali večji skupki, zato smo to metodo združevanja z učinkovino opustili. Nato smo natehtali maso vsake posamezne tablete in jo vsako posebej stresli v matrično vdolbino tabletirke ter ročno stisnili tablete. Ker so bili prahovi zelo voluminozni, smo morali pri izdelavi posamezne tablete del mase ene tablete najprej rahlo stisniti. Tako je ponovno nastal v matrični vdolbini prostor, v katerega smo nato stresli še preostanek zatehte in dokončno stisniti tableto. Pri tem smo spremljali vrednosti sile stiskanja in izmeta tablete.

Prvo delno stiskanje je potekalo tako, da smo ročico tabletirke vrteli le tako dolgo, da je zgornji pečat prahove na spodnjem pečatu le potlačil in ne stisnil. Pri tem je bila sila stiskanja premajhna, da bi jo senzorji zaznali in bi se izpisala na zaslonu. Na ta način smo se izognili nastanku dvoplastnih tablet, ki bi sicer nastale z dvakratnim stiskanjem. Preskus trdnosti tablet smo izvedli le na nekaj tabletah (3-5), ker smo bili omejeni z maso pripravljenih liofilizatov. Postopek priprave liofiliziranih kompleksov je opisan v nadaljevanju.

### **3.3.2. Priprava liofiliziranih kompleksov med ksantanom in LV hitosanom ter priprava liofiliziranega MV hitosana**

Priprava kompleksov dveh polimerov ksantana in hitosana je potekala v več stopnjah. Del postopka smo povzeli po patentu št. 5,620,706: Insoluble hydrogels comprising xanthan and chitosan (29) in diplomski nalogi (37), določene stopnje pa smo prilagodili napravam in materialu, ki smo jih imeli na razpolago. Najprej smo pripravili koloidne raztopine omenjenih polimerov. Sledilo je združevanje raztopin polimerov s pomočjo dveh vrst mešal, nato centrifugiranje in spiranje nastalih kompleksov. Na koncu smo komplekse posušili s postopkom liofilizacije.

#### **3.3.2.1. Priprava koloidnih raztopin polimerov**

##### Priprava 0,65% raztopine LV hitosana:

6,5 g LV hitosana smo dispergirali v 300 ml 0,1M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  in 3 ure mešali na magnetnem mešalu. Raztopini smo nato z dodatkom 0,1M NaOH umerili pH na vrednost

5,5 ter z bidestilirano vodo dopolnili do končnega volumna 1000 ml. Končni pH raztopine je znašal 5,6.

Priprava 0,65% raztopine ksantana:

6,5 g ksantana smo med mešanjem na magnetnem mešalu dodali k 1000 ml bidestilirane vode in mešali 3 ure.

Priprava 0,65% raztopine MV hitosana:

6,5 g MV hitosana smo dodali k 300 ml 0,1M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  in 3 ure mešali na magnetnem mešalu. Nato smo raztopini dodali 700 ml bidestilirane vode ter z 1M NaOH začeli postopno dvigovati pH do vrednosti 11. Pri tem se je MV hitosan oboril, tako da smo dobili povsem belo oborino, ki smo jo prelili v centrifugirke. Centrifugirali smo 10 minut pri 3000 obratih. Supernatante smo oddekanirali in oborino sprali s prečiščeno vodo, da smo odstranili ocatno kislino. Ta ne sme biti prisotna pri sušenju z liofilizacijo zaradi korozivnega delovanja na sestavne dele liofilizatorja. Postopek smo ponovili trikrat.

### **3.3.2.2. Združevanje raztopin ksantana in LV hitosana z uporabo mešal**

Palični mešalnik z metlico Bosch EasyMixx:

1 litru 0,65% raztopine LV hitosana smo med mešanjem s paličnim mešalnikom postopoma dodali 1 liter 0,65% raztopine ksantana. Po končanem dodajanju smo mešali še 5 minut.

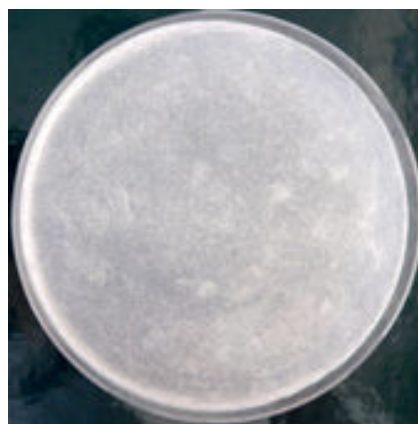
Mešalo OMNI LabTeK Homogenizer:

1 liter 0,65% raztopine LV hitosana smo mešali z mešalom OMNI pri 15000 obratih in začeli prilivati 0,65% raztopino ksantana. Zaradi zgostitve smo število obratov mešanja povečali na 17500. Ko smo prilili vso raztopino ksantana, smo nadaljevali z mešanjem še 5 minut pri 20000 obratih.

Po združitvi koloidnih raztopin ksantana in LV hitosana z omenjenima vrstama mešal smo pustili nastale komplekse stati 24 ur v hladilniku, da bi kompleksacija potekla do konca. Nato smo komplekse centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih. Supernatante smo oddekanirali in komplekse sprali s prečiščeno vodo, da smo odstranili nekompleksiran ksantan in hitosan ter ponovno centrifugirali. Postopek smo ponovili trikrat. Prečiščene komplekse smo nato prelili v steklene petrijevke, jih zamrznili in liofilizirali.



**Slika 8:** S paličnim mešalnikom združeni raztopini ksantana in LV hitosana.



**Slika 9:** Z mešalom OMNI združeni raztopini ksantana in LV hitosana.

### 3.3.2.3. Liofilizacija pripravljenih kompleksov in MV hitosana

Pripravljene komplekse in oborjeni MV hitosan smo za 12 ur zamrznili pri  $T = -18^{\circ}\text{C}$ . Zamrznjene vzorce smo posušili z metodo liofilizacije in tako pridobili suho snov, ki je predstavljala novo izhodno snov za izdelavo tablet.

Liofilizacija je postopek odstranjevanja topila (običajno vode) iz zamrznjenega vzorca s sublimacijo. Za izvedbo potrebujemo liofilizator ter zamrzovalnik, v katerem predhodno vzorce zamrznemo, možno pa je zamrzovanje vzorcev tudi v samem liofilizatorju. Parametri, ki jih moramo nastaviti, so temperatura polic, na katerih imamo vzorce ter tlak. Liofilizacijo moramo izvajati pod temperaturo tališča vzorca oziroma pri raztopinah pod temperaturo evtektične točke, da se vzorec ne tali. Pomembna je tudi debelina vzorca, ki naj ne bi presegala 10 mm, saj se spodnje plasti vzorca sušijo zelo dolgo.

Proces liofilizacije poteka v treh fazah (Slika 10):

1. FAZA ZAMRZOVANJA (pre-freezing)

Pri atmosferskem tlaku zamrznemo vzorce, pri čemer se voda spremeni v led, hkrati pa tako vzorec imobiliziramo, da ohrani svojo strukturo, velikost in obliko.

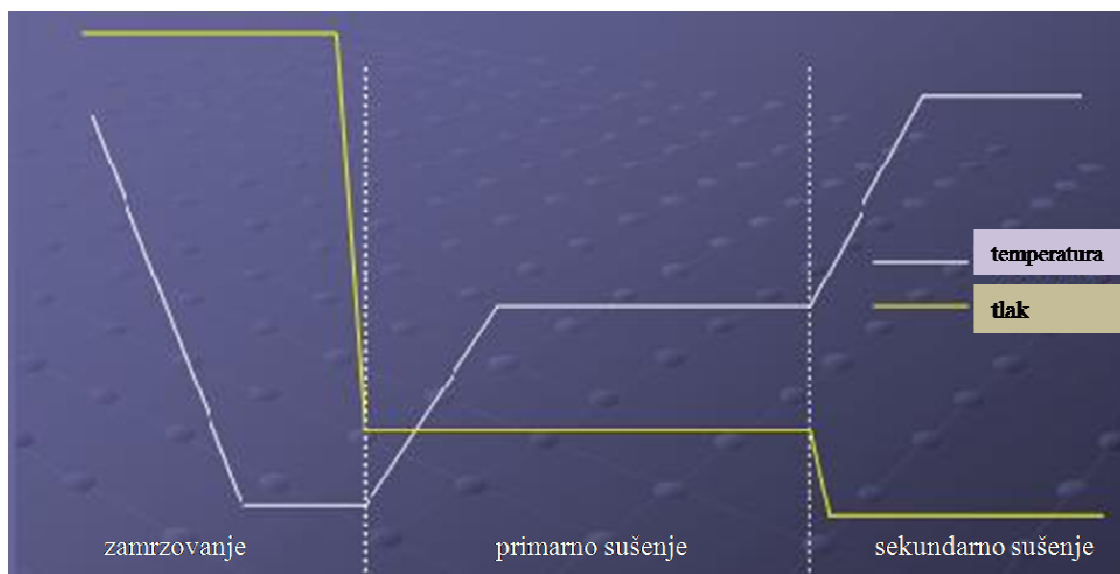
2. PRIMARNO SUŠENJE (main drying)

Pri zelo znižanem tlaku in naraščajoči temperaturi polic poteka sublimacija, pri čemer trdna snov (led) preide direktno v plinasto stanje (paro). V tej stopnji odstranimo 95% vsebnosti vode, in sicer nevezano vodo, vzorec pa se pri tem ne sme staliti, da se ohrani struktura, ki smo jo dosegli z zamrzovanjem (vzorec se

zaradi hladilnega efekta sublimacije ne tali, čeprav stoji na toplejši podlagi). To je najdaljša faza v procesu liofilizacije.

### 3. SEKUNDARNO SUŠENJE (final drying)

Tlak še dodatno znižamo, temperaturo pa dvignemo na 15-40°C, s čimer dosežemo desorpcijo vezane vode (kapilarno vodo, fizikalno adsorbirano vodo, vodo za nabrekanje ...). Sekundarno sušenje omogoča, da imamo na koncu v vzorcu prisotne le še 0,5% vode. Z liofilizacijo pa ne moremo odstraniti kristalizacijske vode ter kemijsko vezane vode (38, 39, 40).



**Slika 10:** Tri faze liofilizacije: zamrzovanje, primarno in sekundarno sušenje (41).

#### Naši eksperimentalni parametri:

- najprej smo določili evtektično točko kompleksa, pripravljenega iz raztopin 0,65% ksantana in 0,65% LV hitosana, ki je znašala -5°C;
- odločili smo se, da bomo liofilizacijo izvajali 10°C pod evtektično točko, torej pri -15°C, zato smo temperaturo polic nastavili na to vrednost;
- tlak primarnega sušenja je znašal okoli 0,65 milibarov, sekundarnega pa okoli 0,11 milibarov;
- čas liofiliziranja je znašal 18 – 22 ur.

Po končani liofilizaciji smo vzorce do nadaljevanja dela (stiskanja tablet) hranili v eksikatorju.



### 3.3.3. Priprava medijev za vrednotenje sproščanja učinkovine iz tablet

Za vrednotenje sproščanja PF iz tablet smo uporabili prečiščeno vodo ter medije, ki so priporočeni v Ph.Eur 6<sup>th</sup> Ed. za testiranje sproščanja ZU iz trdnih farmacevtskih oblik. Vse izbrane medije smo pripravili tudi s povišano ionsko močjo, in sicer tako, da smo jim dodali 11,688 g NaCl na 1l medija, s čimer smo ionsko moč povečali za 0,2M.

#### Prečiščena voda z dodatkom NaCl

V 1l prečiščene vode smo raztopili 11,688 g NaCl. ( $c_{\text{NaCl}} = 0,2 \text{ mol/l}$ )

#### Medij s klorovodikovo kislino pH 1,2

V 1000 ml bučko smo natehtali 11,69 g NaCl, dodali 750 ml prečiščene vode, odpipetirali in dodali preračunan volumen 7,046 ml 37% HCl ter dopolnili s prečiščeno vodo do 1000 ml. Umerjanje pH vrednosti ni bilo potrebno. ( $c_{\text{NaCl}} = 0,2 \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,085 \text{ mol/l}$ )

#### Medij s klorovodikovo kislino pH 1,2 z dodatkom NaCl

V 1000 ml bučko smo natehtali 23,387 g NaCl, dodali 750 ml prečiščene vode, odpipetirali in dodali preračunan volumen 7,046 ml 37% HCl ter dopolnili s prečiščeno vodo do 1000 ml. Umerjanje pH vrednosti ni bilo potrebno. ( $c_{\text{NaCl}} = 0,4 \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,085 \text{ mol/l}$ )

#### Fosfatni pufer pH 4,5

V 1000 ml bučko smo natehtali 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in dodali 750 ml prečiščene vode. Kadar je bilo potrebno, smo z 1M NaOH ali 1M HCl umerili pH na vrednost  $4,5 \pm 0,05$ , nato pa bučko dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. ( $c_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 0,1 \text{ mol/l}$ )

#### Fosfatni pufer pH 4,5 z dodatkom NaCl

V 1000 ml bučko smo natehtali 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 11,688 g NaCl ter dodali 750 ml prečiščene vode. Kadar je bilo potrebno, smo z 1M NaOH ali 1M HCl umerili pH na vrednost  $4,5 \pm 0,05$ , nato pa bučko dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. ( $c_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 0,1 \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0,2 \text{ mol/l}$ )

#### Fosfatni pufer pH 7,0

V 1000 ml bučko smo natehtali 1,164 g NaOH, 6,8045 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in dodali 900 ml prečiščene vode. Če je bilo potrebno, smo z 1M NaOH ali 1M HCl uravnali pH na vrednost  $7,0 \pm 0,05$  ter dodali prečiščeno vodo do oznake. ( $c_{\text{NaOH}} = 0,029 \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 0,05 \text{ mol/l}$ )

#### Fosfatni pufer pH 7,0 z dodatkom NaCl

V 1000 ml bučko smo natehtali 1,164 g NaOH, 6,8045 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 11,688 g NaCl ter dodali 900 ml prečiščene vode. Če je bilo potrebno, smo z 1M NaOH ali 1M HCl uravnali pH na vrednost  $7,0 \pm 0,05$  ter dodali prečiščeno vodo do oznake. ( $c_{\text{NaOH}} = 0,029 \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 0,05 \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0,2 \text{ mol/l}$ )

### **3.3.4. Določanje enakomernosti mase tablet**

Enakomernost mase smo določili vsem izdelanim serijam tablet po predpisu iz Ph.Eur 6<sup>th</sup> Ed. Stehtali smo dvajset tablet (oziroma pri tabletah iz Preglednice III zaradi omejene količine izhodnih snovi le desetim do petnajstim tabletam), izračunali povprečno maso in RSD. Ph.Eur 6<sup>th</sup> Ed. predpisuje, da lahko največ dve masi tablet odstopata od povprečja med 5 in 10 %, nobena pa ne sme odstopati za več kot 10 %, kadar je povprečna masa tablet v vsaki seriji 250 mg ali več.

### **3.3.5. Določanje enakomernosti vsebnosti učinkovine v tabletah**

Enakomernost vsebnosti učinkovine smo določali vsem izdelanim serijam tablet. Preskus smo izvedli tako, da smo v terilnici strli tableto in jo raztopili v 10 ml metanola. Vsebino smo nato kvantitativno prenesli v čašo in dodali 490 ml prečiščene vode. Na magnetnem mešalu smo raztopino mešali vsaj 12h, nato smo odvzeli vzorce po 5 ml in jim izmerili absorbanco ter izračunali koncentracijo učinkovine. Vsebnost smo določali trem tabletam iz posamezne serije.

### **3.3.6. Določanje trdnosti tablet**

Trdnost tablet smo ugotavljali z napravo za določanje trdnosti (Vanderkamp®, VK 200, ZDA). Pri tem testu leži tableta med mirujočim in gibljivim delom naprave. Pri merjenju gibljivi del potisne tableto ob mirujoči del in pri tem meri silo do trenutka, ko tableta počí. Pri serijah tablet iz preglednice III smo zaradi omejenega števila tablet določili trdnost le petim tabletam in ne desetim, kot predpisuje Ph. Eur. 6<sup>th</sup> Ed. Rezultate smo podali v skladu s predpisom Ph. Eur. 6<sup>th</sup> Ed. s povprečno, minimalno in maksimalno vrednostjo trdnosti, izraženo v newtonih (N).

### 3.3.7. Preskus sproščanja učinkovine iz tablet

Izraza raztapljanje in sproščanje nista sinonima, vendar se njuna uporaba v slovenskem izrazoslovju nedosledno uporablja in tudi prevod angleške besede »dissolution« ni eksakten in se glasi »raztopitev, razkroj, razpust« (42).

Pojem raztapljanje se nanaša le na zdravilno učinkovino, medtem ko pojem sproščanje zajame celoten proces, ki se odvije po dajanju peroralne farmacevtske oblike. Le pri farmacevtski obliki, ki razpade takoj in tako omogoči, da je celoten odmerek zdravilne učinkovine v trenutku na razpolago za raztapljanje in nadaljnjo absorpcijo, lahko celoten proces opišemo kot raztapljanje. Pri farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem pa to ne drži, saj se mora ZU v farmacevtski obliki, v katero je vgrajena, najprej raztopiti in jo šele nato zapusti, zato v tem primeru govorimo o sproščanju (3).

Evropska farmakopeja v poglavju 2.9.3. Preskušanje sproščanja za trdne farmacevtske oblike (Dissolution test for solid dosage forms) navaja 4 različne naprave, s katerimi lahko izvajamo preskus:

- Naprava 1 : Naprava s košaricami,
- Naprava 2: Naprava z vesli,
- Naprava 3: Naprava z recipročnimi cilindri,
- Naprava 4: Naprava s pretočno celico.

Predpisane so tudi posamezne mere sestavnih delov naprav in drugi parametri. Temperatura, pri kateri izvajamo test sproščanja, je pri vseh napravah predpisana  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (2).

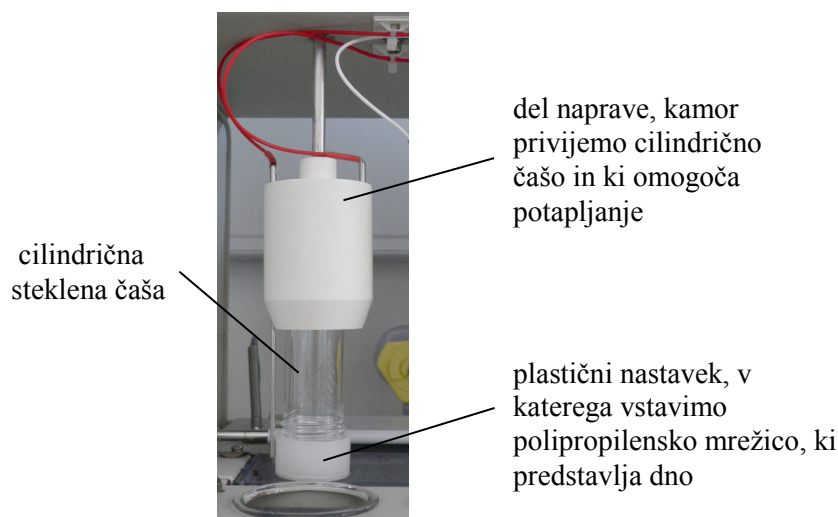
#### **Spremljanje sproščanja z napravo z recipročnimi cilindri BIODIS (Ph.Eur.6.0, Naprava 3)**

Naprava (Slika 11) je sestavljena iz seta sedmih cilindričnih steklenih čaš (Slika 12), ki jim na spodnjem delu privijemo plastičen nastavek, v katerega vstavimo polipropilensko mrežico z ustrezno velikostjo por. Mrežica predstavlja ravno dno, hkrati pa omogoča pretok medija v cilindre. Osnova preskusa je gibanje recipročnih cilindrov v navpični smeri znotraj čaš z mediji z nastavljeno hitrostjo potapljanja, ki je izražena s številom potopov na minuto (dpm). Naprava omogoča, da se ob določenih časovnih točkah celotna vrsta recipročnih cilindrov dvigne in premakne v naslednjo vrsto s čašami, v katerih je

drug ali enak medij. Omenjene čaše so potopljene v vodno kopel, ki zagotavlja konstantnost temperature medija v čašah. Naprava je povezana z avtomatskim vzorčevalnikom.



**Slika 11:** Sestavni deli naprave z recipročnimi cilindri BIODIS (Naprava 3, Ph.Eur. 6.0).



**Slika 12:** Recipročni cilinder pri Napravi 3

Naprava BIODIS se lahko uporablja za preskušanje sproščanja tako farmacevtskih oblik s takojšnjim sproščanjem kot tudi farmacevtskih oblik s podaljšanim in zakasnelim sproščanjem. Njena prednost pred napravama 1 in 2 je, da omogoča izvajanje preskusa v več (največ šestih) različnih medijih v sklopu enega preskusa in tako omogoča boljše posnemanje fizikalno kemijskih pogojev v prebavnem traktu. Poleg omenjenega pa naprava omogoča tudi simulacijo mehanskih sil v GIT s potapljanjem recipročnih cilindrov z nastavljivo hitrostjo.

Tekom GIT se sestava prebavnih sokov spreminja. V Preglednici IV so tako v prvem in drugem stolpcu za lažjo primerjavo zbrani podatki o sestavi in pH vrednosti prebavnih sokov v GIT ter podatki o času zadrževanja FO v posameznem delu prebavnega trakta. Ostali štirje stolpci prikazujejo podatke o vzorčenjih in medijih, ki smo jih uporabili pri preskusu sproščanja z napravo BIO-DIS. Z izbranimi mediji smo se skušali čim bolj približati fiziološkemu pogojem v GIT.

Prvi dve uri smo sproščanje iz treh tablet vsake serije (tablete 1-3) izvajali v mediju s HCl s pH 1,2, drugih treh tablet iste serije pa v enakem mediju z dodanim NaCl (tablete 4-6). Ta medij po pH vrednosti ustreza mediju v želodcu, ne vsebuje pa pepsina in drugih encimov, ki so dejansko prisotni v želodčnem soku. Naslednje pol ure smo sproščanje izvajali v fosfatnem pufru pH 4,5 oz. fosfatnem pufru pH 4,5 z dodanim NaCl, kar ustreza pH vrednosti medija v duodenumu. Ostali čas do dopolnjenih 24h smo za sproščanje uporabili fosfatni pufer pH 7,0 oz. fosfatni pufer pH 7,0 z dodanim NaCl, z namenom simulacije pogojev v tankem in nato debelem črevesu. Povišano ionsko moč smo v vseh primerih dosegli z dodatkom NaCl, in sicer z namenom ugotavljanja vpliva ionov na sproščanje PF. Za NaCl smo se odločili iz razloga, ker v vodnem mediju popolnoma ionizira in je poleg tega najbolj zastopana sol v naši prehrani. Za dvig ionske moči za vrednost 0,2M pa smo se odločili, ker je to realno ob prehranjevanju možno. Literaturni podatki sicer navajajo, da se ionska moč medija v prebavnem traktu giblje med 0,010M in 0,166M, po hranjenju pa ionska moč medija lahko tudi naraste. Glede na to, da je zaradi različne sestave uporabljenih pufrov ionska moč vsakega pufra drugačna, smo se odločili, da vsem medijem dvignemo ionsko moč za enako vrednost in ne na isto vrednost ter s tem lažje primerjamo vpliv dviga ionske moči na profil sproščanja ZU.

#### Naši eksperimentalni parametri:

- celoten čas izvajanja posameznega preskusa sproščanja: 24 ur,
- temperatura medija:  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ,
- volumen medija v posamezni čaši: 250 ml,
- velikost por polipropilenske mrežice: 450 $\mu\text{m}$ ,
- volumen vsakokratnega vzorčenja: 5ml,
- hitrost potapljanja cilindrov: 10 potopitev na minuto,
- časovne točke vzorčenja in mediji: prečiščena voda ter mediji, ki so prikazani v Preglednici IV.

Vzorčili smo avtomatsko s pomočjo vzorčevalnika in brez filtrov, ker bi se ti zaradi raztopljenih polimerov v medijih zamašili. Odvzetega medija nismo nadomeščali, saj je potekalo vzorčenje iz iste čaše največ dvakrat. Pri tem je bila izguba medija največ 5 ml in tudi 245 ml medija še vedno zagotavlja sink pogoje za raztapljanje učinkovine. Vzorce smo nato ročno filtrirali skozi filtre Ful Flow z velikostjo por 10  $\mu\text{m}$  in jih ustrezno redčili. Koncentracijo sproščene učinkovine smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 274nm in računanjem z uporabo računalniškega programa UV-Visible ChemStation Software HP 8453 na osnovi predhodno izdelanih umeritvenih premic. Za merjenje smo uporabili kiveto (1,0 cm) iz kvarčnega stekla.

**Preglednica IV:** Pogoji za izvajanje preskusa sproščanja z napravo BIODIS (dpm = 10, T = 37°C, Vvz = 5ml), časovne točke za odvzem vzorcev ter primerjava s fiziološkimi pogoji v GIT (sestava medijev, pH in čas prehoda FO skozi posamezne dele GIT) (3, 7).

| del GIT, pH in čas prehoda FO                              | sestava medijev v GIT                                                                                              | vrsta v napravi BIODIS | čas vzorčenja | medij za tablete 1-3                                 | medij za tablete 4-6                                                |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>prazen želodec</b><br><br>pH 1,4 - 2,1<br>čas: 0,5-1,5h | HCl<br>pepsin<br>mukus<br>gastrin<br>intrinzični faktor                                                            | 1                      | 0,5h          | medij s HCl<br>pH 1,2<br><br>$\mu = 0,29\text{M}$    | medij s HCl<br>pH 1,2<br>+ 0,2M NaCl<br><br>$\mu = 0,49\text{M}$    |
|                                                            |                                                                                                                    | 2                      | 1h            |                                                      |                                                                     |
|                                                            |                                                                                                                    |                        | 2h            |                                                      |                                                                     |
| <b>duodenum</b><br><br>pH 4,9 - 6,4<br>čas: 3-10 min       | H <sub>2</sub> O<br>žolč (pH 7,8-8,6)<br>sekreti pankreasa (encimi: amilaza, lipaza, tripsin, ...)<br>drugi encimi | 3                      | 2,5h          | fosfatni pufer<br>pH 4,5<br><br>$\mu = 0,10\text{M}$ | fosfatni pufer<br>pH 4,5<br>+ 0,2M NaCl<br><br>$\mu = 0,30\text{M}$ |
| <b>jejunum in ileum</b><br><br>pH 4,4 - 7,4<br>čas: 3-4h   | mukus<br>proteaze<br>absorpcija vode                                                                               | 4                      | 3h            | fosfatni pufer<br>pH 7,0<br><br>$\mu = 0,08\text{M}$ | fosfatni pufer<br>pH 7,0 + 0,2M NaCl<br><br>$\mu = 0,28\text{M}$    |
|                                                            |                                                                                                                    |                        | 5h            |                                                      |                                                                     |
| <b>kolon</b><br><br>pH 5,5 - 7,4<br>čas: do 27h            | mukus, manj proteolitičnih encimov in več drugih encimov, ki jih izločajo mikroorganizmi                           | 5                      | 7h            |                                                      |                                                                     |
|                                                            |                                                                                                                    |                        | 9h            |                                                      |                                                                     |
|                                                            |                                                                                                                    | 6                      | 16h           |                                                      |                                                                     |
|                                                            |                                                                                                                    |                        | 24h           |                                                      |                                                                     |

**Spremljanje sproščanja z napravo s košaricami (Ph.Eur.6.0, Naprava 1)**

Preskuse sproščanja na Napravi 1 smo izvajali 24 ur pri temperaturi  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  in hitrosti vrtenja košaric 100 obratov na minuto. Sočasno smo izvajali preskus sproščanja v šestih posodah z 900 ml medija za šest tablet iste serije. Kot medij smo uporabili pri treh tabletah prečiščeno vodo, pri drugih treh tabletah pa prečiščeno vodo, ki smo ji dvignili ionsko moč za 0,2M z dodatkom ustrezne količine NaCl. Vzorčili smo po 10 ml s pomočjo avtomatskega vzorčevalnika in skozi filtre Ful Flow z velikostjo por  $10\mu\text{m}$ . Odvzetega medija nismo nadomeščali, saj so bili sink pogoji še vedno zagotovljeni.

Časovni intervali vzorčenja so bili: 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 in 24 ur. Koncentracijo sproščene učinkovine smo določali spektrofotometrično na enak način kot pri preskusu sproščanja z napravo BIO-DIS.

**Priprava raztopin za izdelavo umeritvenih premic:**Medij: prečiščena voda

Natehta pentoksifilina: 22,2 mg

Osnovna raztopina: 22,2 mg učinkovine/100 ml ( $c = 0,798 \text{ mmol/l}$ )

Redčitve osnovne raztopine: 1/200, 1/100, 1/50, 5/200, 2/50, 15/200, 15/100, 10/50

Medij: prečiščena voda + NaCl (11,688g na 1l medija)

Natehta pentoksifilina: 24,0 mg

Osnovna raztopina: 24,0 mg učinkovine/100 ml ( $c = 0,862 \text{ mmol/l}$ )

Redčitve osnovne raztopine: 1/200, 1/100, 1/50, 5/200, 15/200, 15/100

Medij: klorovodikova kislina pH 1,2

Natehta pentoksifilina: 22,37 mg

Osnovna raztopina: 22,37 mg učinkovine/100 ml ( $c = 0,804 \text{ mmol/l}$ )

Redčitve osnovne raztopine: 1/200, 1/100, 5/200, 2/50, 15/200, 15/100, 10/50

Medij: fosfatni pufer pH 4,5

Natehta pentoksifilina: 22,57 mg

Osnovna raztopina: 22,57 mg učinkovine/100 ml ( $c = 0,811 \text{ mmol/l}$ )

Redčitve osnovne raztopine: 1/200, 1/100, 5/200, 2/50, 15/200, 15/100, 10/50

Medij: fosfatni pufer pH 7,0

Natehta pentoksifilina: 22,48 mg

Osnovna raztopina: 22,48 mg učinkovine/100 ml ( $c = 0,808 \text{ mmol/l}$ )

Redčitve osnovne raztopine: 1/200, 1/100, 5/200, 2/50, 15/200, 15/100, 10/50

Umeritvene premice smo izdelali v vseh uporabljenih medijih. Ker smo pri prečiščeni vodi dokazali, da se umeritveni premici brez dodanega NaCl in z dodanim NaCl ne razlikujeta, smo pri pufrih izdelali umeritvene premice le v mediju brez NaCl. Ko smo združili podatke umeritvenih premic v vseh treh pufrih (medij s HCl pH 1,2; fosfatni pufer pH 4,5 in fosfatni pufer pH 7,0) na isto premico, smo dobili prav tako zelo dobro ujemanje ( $R^2 = 0,99979$ ), kar nam pove, da medij nima pomembnega vpliva na absorbanco učinkovine.

**Preglednica V:** Izračunani nakloni umeritvenih premic za različne medije in determinacijski koeficienti

| medij                          | k (mg/ml) | R <sup>2</sup> |
|--------------------------------|-----------|----------------|
| prečiščena voda                | 0,029077  | 0,99986        |
| prečiščena voda z dodanim NaCl | 0,029053  | 0,99977        |
| medij s HCl pH 1,2             | 0,029280  | 0,99988        |
| fosfatni pufer pH 4,5          | 0,028432  | 0,99997        |
| fosfatni pufer pH 7,0          | 0,028699  | 0,99998        |

### Določanje koncentracije pentoksifilina iz umeritvenih premic:

$$c = k \cdot A$$

/enačba 1/

$c$  ..... koncentracija PF [mg/ml]

$k$  ..... naklon umeritvene premice [mg/ml]

$A$  ..... absorbanca [/]

Koncentracijo pentoksifilina v vzorcu smo izračunali s programom UV-VIS ChemStation Software 8453 HP na osnovi *enačbe 1*. Deleže sproščene učinkovine ob določenih časovnih točkah pa smo izračunali s pomočjo urejevalnika tabel Excel.



**3.3.8. Izračun faktorja podobnosti za različne profile sproščanja učinkovine iz tablet**

Faktor podobnosti ( $f_2$ ) je bil sprejet s strani FDA (Food and Drug Administration) in na EMEA (The European Medicines Agency) kot kriterij za ugotavljanje podobnosti dveh in vitro profilov sproščanja ZU. Izračunamo ga po spodnji *enačbi 2*.

Dva profila sproščanja označimo za podobna, če je vrednost faktorja  $f_2$  znotraj intervala 50-100, pri čemer vrednost faktorja  $f_2 = 100$  pomeni, da gre za popolnoma identična profila sproščanja, zmanjševanje vrednosti  $f_2$  pa sovпада z naraščanjem različnosti profilov (43,44).

$$f_2 = 50 \cdot \log \left( \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right) \quad / \text{enačba 2/}$$

$f_2$  ..... faktor podobnosti

$n$  ..... število časovnih točk

$R(t)$  ..... % sproščene ZU referenčnega vzorca (oziroma prvega vzorca)

$T(t)$  ..... % sproščene ZU testnega vzorca (oziroma drugega vzorca)

Izračunali smo faktorje podobnosti za vse kombinacije profilov sproščanja in jih primerjali, vendar rezultatov zaradi nepreglednosti nismo navajali v tabelah. Posamezne trditve in opažanja smo na osnovi vrednosti faktorja podobnosti lahko podkrepili in kjer je bilo smiselno, tudi navedli rezultate teh izračunov.

### 3.3.9. Snemanje IR spektrov s tehniko oslabiljene popolne odbojnosti (ATR)

Tehnika oslabiljene popolne odbojnosti (ATR – Attenuated Total Reflection) spada med refleksijske tehnike infrardeče absorpcijske spektroskopije. Infrardeče območje spektra elektromagnetnega valovanja vsebuje radiacijo z valovnim številom od 12800 do  $10\text{ cm}^{-1}$ . IR spekter lahko razdelimo na bližnji (near), srednji (mid) in daljni (far), od katerih se največ uporablja srednji IR ( $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ). V njem namreč opazujemo absorpcijske trakove, ki ustrezajo karakterističnim nihanjem funkcionalnih skupin. IR spektroskopijo uporabljamo na področju kvalitativne in kvantitativne analize. Najpomembnejša je identifikacija organskih spojin, saj so spektri kompleksni in uporabni za primerjanje, ker ima vsaka organska spojina svoj značilen »fingerprint«.

Princip tehnike oslabiljene popolne odbojnosti je, da s pomočjo zrcalne optike vodimo žarek spektrometra na površino, kjer se žarki odbijajo in jih naprej vodimo na detektor. Prednost te tehnike je, da ni potrebno, da so površine ravne in gladke. Uporabna je za netopne spojine, tanke površinske sloje na odbojnih površinah, za praške, polimere, snemanje spektrov transparentnih slojev na odbojnih površinah.

IR spekter, pridobljen z ATR tehniko, je zelo podoben spektru, ki ga dobimo z navadno IR spektroskopijo. Položaj absorpcijskega traku v IR spektru opredelimo z valovno dolžino  $\lambda(\mu\text{m})$  absorbirane svetlobe ali pa z valovnim številom  $\nu(\text{cm}^{-1})$ , ki je obratnosorazmerna vrednost valovne dolžine. Zaradi direktne sorazmernosti valovnega števila s frekvenco absorbiranega sevanja se slednje pogosteje uporablja (45, 46).

#### Naši pogoji merjenja

Vzorci smo analizirali s tehniko oslabiljene popolne odbojnosti v srednjem IR območju, za kar smo uporabili Smart DuraSamplIR nastavek. Posamezen vzorec smo natresli na nekaj kvadratnih milimetrov velik diamantni kristal in ga s posebnim vijakom pritiskali na površino. Na ta način smo zagotovili enakomeren in ponovljiv tlak vzorca na kristal. Posamezen IR spekter je predstavljal povprečje 32 ponovitev snemanja. Spektre smo posneli za liofilizirane komplekse, ki smo jih pripravili z združevanjem raztopin ksantana in LV hitosana z uporabo dveh različnih vrst mešal. Za primerjavo smo posneli še spektre samega ksantana in hitosana ter njune fizikalne zmesi.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET

Izdelali smo več vrst tablet, ki so se med seboj razlikovale tako po sestavi kot tudi po končni masi. Za nadaljnja preskušanja smo izbrali le tablete serij 8A-E ter tablete serij LIO1-3, ker v primeru vseh ostalih nismo dobili ustrezno trdnih tablet. Količinska sestava izbranih tablet je podana v preglednicah II in III v poglavju 3.3.1. Te tablete smo nato ovrednotili z nekaterimi farmacevtsko-tehnološkimi metodami, opisanimi v Evropski farmakopeji. Vrednotili smo enakomernost mase enoodmernih farmacevtskih oblik, trdnost tablet ter enakomernost vsebnosti učinkovine. Vrednotili smo tudi velikost tablet in vsaki seriji določili indeks elastične relaksacije po tabletiranju.

#### 4.1.1. Rezultati vrednotenja enakomernosti mase izdelanih tablet

Preskus enakomernosti mase po Ph. Eur. 6<sup>th</sup> Ed. (2.9.5. UNIFORMITY OF MASS OF SINGLE DOSE PREPARATION) predpisuje, da lahko največ dve tableti odstopata od povprečne mase med 5 in 10 %. Nobena masa tablete ne sme odstopati za več kot 10 %, kadar je povprečna masa tablet v vsaki seriji 250 mg ali več. Rezultati so zbrani v preglednici VI.

**Preglednica VI:** Rezultati enakomernosti mase za posamezne serije tablet (natančne sestave tablet so podane v preglednicah II in III) (n=20, razen v primeru tablet LIO1,2,3).

| oznaka tablet in sestava      | najmanjša masa (mg) | največja masa (mg) | povprečna masa (mg) | SD (mg) | RSD (%) |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|---------|
| 8A / Xan:LVHit = 1:1          | 400,3               | 403,6              | 402,07              | 0,90    | 0,22    |
| 8B / Xan:LVHit = 2:1          | 401,0               | 405,6              | 403,24              | 1,35    | 0,33    |
| 8C / Xan:LVHit = 1:2          | 400,4               | 406,7              | 403,86              | 1,52    | 0,44    |
| 8D / Xan                      | 398,9               | 402,1              | 400,59              | 0,95    | 0,24    |
| 8E / LV Hit                   | 398,6               | 404,2              | 401,26              | 1,45    | 0,36    |
| LIO1 / Xan:LVHit = 1:1 (n=12) | 396,8               | 403                | 400,05              | 1,74    | 0,43    |
| LIO2 / Xan:LVHit = 1:1 (n=15) | 399,2               | 404,9              | 401,06              | 1,65    | 0,41    |
| LIO3 / MV Hit (n=10)          | 398,5               | 402,2              | 399,94              | 1,07    | 0,27    |

Iz tabele je razvidno, da vse izdelane serije tablet ustrezajo preskusu enakomernosti mase, saj nobena ne odstopa od predpisanega odstotka. Pri tabletah, pripravljenih iz liofiliziranih materialov (preglednica IV), smo test izvedli na manjšem številu tablet, ker smo bili omejeni z izhodno količino liofilizata.

Pri interpretaciji rezultatov preskusa enakomernosti mase moramo upoštevati, da ti rezultati ne dajejo nobenega podatka o pretočnih lastnostih prahov, ki bi omogočale enakomerno polnjenje matrične vdolbine pri avtomatskem tabletiranju, saj smo za vsako posamezno tableto ročno natehtali zmes prahov in jo stresli v matrično vdolbino ter stisnili tableto.

#### 4.1.2. Rezultati vrednotenja vsebnosti učinkovine v izdelanih tabletah

Vsem izdelanim serijam tablet smo določili vsebnost pentoksifilina. Ph. Eur. 6<sup>th</sup> Ed. v poglavju 2.9.6. UNIFORMITY OF CONTENT OF SINGLE DOSE PREPARATION predpisuje, da test izvajamo na 10 tabletah, meje ustrezne vsebnosti pa postavlja med 85% in 115% povprečne vsebnosti učinkovine v tableti. Ker smo izdelali zelo majhne serije tablet ročno, smo lahko določili vsebnost največ trem tabletam, ki so ostale po izvedenem preskusu trdnosti. Zato ne moremo z gotovostjo trditi, da vse tablete ustrezajo preskusu na enakomernost vsebnosti. Kljub temu smo z rezultati vsebnosti dobili okvirno potrditev, da tablete vsebujejo ustrezno količino pentoksifilina (Preglednica VII). Rezultate vsebnosti smo uporabili za normalizacijo rezultatov sproščanja.

**Preglednica VII:** Rezultati povprečne mase oziroma vsebnosti pentoksifilina v izdelanih serijah tablet (n=3).

| oznaka tablet in sestava | teoretična masa PF v tableti [mg] | povprečna masa PF v tableti [mg] (n=3) | SD [mg] | povprečna vsebnost [%] (n=3) |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|---------|------------------------------|
| 8A / Xan:LVHit = 1:1     | 100,0                             | 104,18                                 | 0,69    | 104,18                       |
| 8B / Xan:LVHit = 2:1     | 100,0                             | 106,41                                 | 0,17    | 106,41                       |
| 8C / Xan:LVHit = 1:2     | 100,0                             | 103,22                                 | 0,25    | 103,22                       |
| 8D / Xan                 | 100,0                             | 109,45                                 | 0,96    | 109,45                       |
| 8E / LV Hit              | 100,0                             | 99,16                                  | 0,34    | 99,16                        |
| LIO1 / Xan:LVHit = 1:1   | 100,0                             | 100,84                                 | 0,47    | 100,84                       |
| LIO2 / Xan:LVHit = 1:1   | 100,0                             | 97,38                                  | 0,92    | 97,38                        |
| LIO3 / MV Hit            | 100,0                             | 94,68                                  | 0,10    | 94,68                        |

**4.1.3. Rezultati vrednotenja trdnosti izdelanih tablet**

Naš cilj je bil izdelati tablete, katerih trdnost bi bila znotraj intervala 90-110 N. Za večino serij tablet smo ciljno vrednost tudi dosegli (Preglednica VIII), le pri dveh serijah tablet trdnost nekoliko odstopa navzdol. In sicer pri seriji 8D ter pri seriji LIO3.

**Preglednica VIII:** Rezultati trdnosti izdelanih serij tablet ter povprečna sila stiskanja (n=10, razen v primeru tablet LIO1,2,3).

| oznaka tablet in sestava     | trdnost [N] |          |           | SD [N] | sila stiskanja [kN] |
|------------------------------|-------------|----------|-----------|--------|---------------------|
|                              | najmanjša   | največja | povprečna |        |                     |
| 8A / Xan:LVHit = 1:1         | 99,9        | 106,8    | 103,72    | 1,87   | 33,9                |
| 8B / Xan:LVHit = 2:1         | 96,8        | 107,2    | 104,24    | 5,70   | 33,5                |
| 8C / Xan:LVHit = 1:2         | 95,8        | 108,9    | 103,68    | 5,39   | 22,0                |
| 8D / Xan                     | 72,0        | 81,3     | 75,69     | 3,20   | 20,9                |
| 8E / LV Hit                  | 85,3        | 104      | 91,64     | 6,62   | 20,7                |
| LIO1 / Xan:LVHit = 1:1 (n=5) | 68,4        | 105,5    | 89,94     | 14,09  | 28,7                |
| LIO2 / Xan:LVHit = 1:1 (n=5) | 82          | 108      | 90,66     | 10,64  | 28,2                |
| LIO3 / MV Hit (n=3)          | 57,6        | 95,8     | 71,4      | 21,19  | 28,3                |

Razloge za odstopanje omenjenih serij lahko iščemo v različni stisljivosti in kompaktilnosti prahov. Stisljivost pomeni sposobnost zmanjšanja volumna pri določenem tlaku stiskanja. Dobro stisljivim materialom se volumen zelo zmanjša pri relativno nizkih silah stiskanja. V primeru tablet 8D gre prav za to. Material smo na minimalni volumen, ki ga določa najmanjša možna razdalja med zgornjim in spodnjim pečatom tabletirke, stisnili že z zelo nizko silo (Preglednici VIII in IX). Silo bi seveda lahko še povečali in material stisnili na še manjši volumen, vendar bi pri tem lahko poškodovali pečate. Z zmanjšanjem volumna teh tablet bi bilo število povezav med delci večje, kar bi se izrazilo tudi v večji trdnosti tablet. Trdnost tablet pa namreč kaže na to, kako so prahovi kompaktilni oz. sposobni tvoriti povezave za nastanek tablete.

Za tablete LIO3 lahko torej rečemo, da gre za relativno slabo kompaktilen material, saj tudi pri višji sili stiskanja trdnost tablet ni ustrezno velika.

**4.1.4. Rezultati vrednotenja velikosti tablet ter indeksa elastične relaksacije**

Tabletam smo 24 ur po izdelavi s kljunastim merilom izmerili debelino in premer. Iz podatkov povprečne debeline tablet vsake posamezne serije ter podatka o najmanjšem razmiku med spodnjim in zgornjim pečatom med stiskanjem tablete smo s pomočjo *enačbe 3* izračunali indeks elastične relaksacije tablet.

$$ER = [(H_1 - H_0) / H_0] \cdot 100 \quad \text{/enačba 3/}$$

$ER$  ..... indeks elastične relaksacije

$H_1$  ..... povprečna debelina tablet znotraj posamezne serije, izmerjena 24 ur po izdelavi tablet

$H_0$  ..... najmanjši razmik med zgornjim in spodnjim pečatom med potekom stiskanja tablet

Indeks elastične relaksacije nam pove, za koliko % se bo debelina tablet spremenila (povečala) po določenem času mirovanja zaradi elastične relaksacije snovi. Rezultati so predstavljeni v Preglednici IX.

**Preglednica IX:** Sila stiskanja, minimalna razdalja med zgornjim in spodnjim pečatom, premer in debelina posameznih serij tablet ter rezultati izračuna indeksa elastične relaksacije tablet (n=10).

| Oznaka tablet in sestava | sila stiskanja [kN] | razdalja med pečatoma [mm] | premer tablet [mm] | debelina tablet po 24h [mm] | ER [%] |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------|
| 8A / Xan:LVHit = 1:1     | 33,9                | 1,0                        | 12,08-12,12        | 2,78                        | 178,1  |
| 8B / Xan:LVHit = 2:1     | 33,5                | 1,0                        | 12,04-12,09        | 2,73                        | 173,4  |
| 8C / Xan:LVHit = 1:2     | 22,0                | 1,5                        | 21,07-12,10        | 2,87                        | 91,6   |
| 8D / Xan                 | 20,9                | 1,0                        | 12,05-12,12        | 2,68                        | 168,4  |
| 8E / LV Hit              | 20,7                | 1,2                        | 12,06-12,11        | 2,89                        | 141,2  |
| LIO1 / Xan:LVHit = 1:1   | 28,7                | 1,0                        | 12,05-12,09        | 3,01                        | 200,6  |
| LIO2 / Xan:LVHit = 1:1   | 28,2                | 1,1                        | 12,06-12,12        | 3,12                        | 183,6  |
| LIO3 / MV Hit            | 28,3                | 1,0                        | 12,06-12,09        | 2,94                        | 194,4  |

Indekse elastične relaksacije različnih serij tablet lahko med seboj primerjamo le, če so tablete stisnjene pri isti sili, vendar pa je bil naš osnovni kriterij trdnost tablet znotraj intervala 90-110 N, zato smo silo stiskanja morali prilagajati. Iz preglednice IX je razvidno, da imata seriji tablet, ki vsebujeta večji delež LV hitosana (seriji tablet 8C in 8E), najmanjši indeks elastične relaksacije. To nam pove, da gre za dobro kompaktilen material. Če primerjamo seriji 8A,B z liofiliziranimi serijami LIO1,2,3 vidimo, da je pri podobnih silah stiskanja in enakih razmikih med pečatoma indeks elastične relaksacije liofiliziranih serij višji. Iz navedenega lahko sklepamo, da so prahovi liofiliziranih kompleksov ter MV hitosana slabše kompaktilni kot zmesi prahov ksantana in LV hitosana. To potrjuje tudi podatek o manjši trdnosti tablet, pripravljenih iz liofilizatorov.

## 4.2. SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ OGRODNIH TABLET

S preskusi sproščanja smo želeli preučiti vpliv različne sestave ogrodnih tablet na sproščanje ZU. S spreminjanjem sestave medijev in njihove ionske moči pa smo želeli čimbolj posnemati pogoje v gastrointestinalnem traktu. Za primerjavo smo preskuse sproščanja izvedli tudi v prečiščeni vodi, da smo lahko ovrednotili vpliv pH medija na sproščanje pentoksifilina iz tablet. Zanimalo nas je tudi, kako na profile sproščanja ZU vpliva aparatura, ki jo izberemo za testiranje, zato smo poleg uporabe BIODIS-a (Naprava 3) izvedli nekaj preskusov na napravi s košaricami (Naprava 1).

Tablete smo izdelali iz osnovnih polimerov ksantana in hitosana ter nato še iz kombinacije obeh polimerov. Spreminjali smo njuna deleža v tabletah v razmerjih 1:1, 1:2, in 2:1.

Za ksantan in hitosan je znano, da v vodnem mediju pri določenem pH-ju vsak zase gelirata in tako omogočata, da se ZU počasneje sprošča iz farmacevtske oblike. Pod pogoji, pri katerih se ksantan nahaja v obliki polianiona, hitosan pa v obliki polikationa, je možna tvorba polielektrolitskih kompleksov (PEC) preko ionskih interakcij. Na to kompleksacijo vpliva več dejavnikov, kot so molekulska masa, fleksibilnost in funkcionalne skupine polimerov, pH, T, ionska moč, koncentracija ter razmerja med polimeri. Nastali PEC lahko ob stiku z vodo gelirajo, kar prav tako kot pri vsakem posameznem polimeru omogoči podaljšano sproščanje ZU (47).

Ker je bila predhodno že narejena diplomska naloga (37), kjer so pripravili polimerne komplekse med ksantanom in hitosanom ter preučevali vpliv različnih faktorjev na

kompleksacijo, nato pa komplekse ovrednotili, smo želeli nadaljevati delo tudi v smislu priprave tablet iz predhodno pripravljenih kompleksov po že razviti metodi. Ti so nam služili kot nova pomožna snov za izdelavo tablet, iz katerih smo proučevali sproščanje pod enakimi pogoji kot iz prej omenjenih tablet.

Kot modelno učinkovino smo izbrali pentoksifilin, ki je majhna, neionogena in v vodi dobro topna molekula.

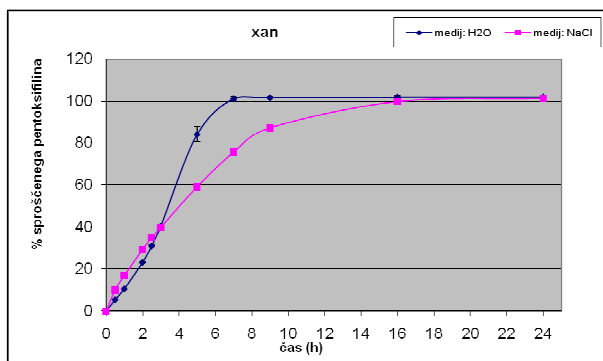
#### **4.2.1. Sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi z uporabo BIODIS-a (Naprava 3)**

Pri vseh preskusih sproščanja, ki smo jih izvedli v prečiščeni vodi, so tablete po 24-ih urah popolnoma razpadle. Iz Slike 13 je razvidno, da se PF iz tablet ksantana sprošča upočasnjeno. V vodi se PF sprosti v 7-ih urah, v mediju z NaCl pa je vsa ZU sproščena v 16-ih urah. V prvih treh urah so razlike v hitrosti sproščanja minimalne, sproščanje je celo nekoliko hitreje v PV z NaCl.

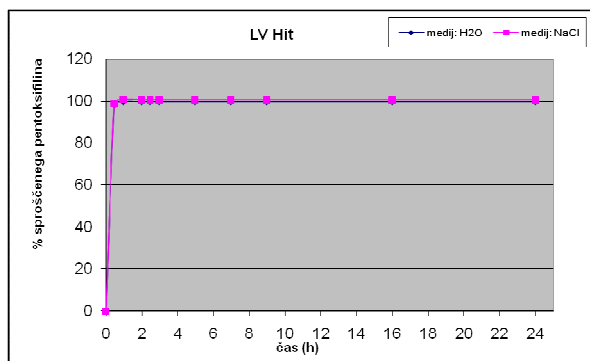
Razloga za počasnejše sproščanje v PV z NaCl bi lahko našli v literaturnem podatku, da dodatek ionov učvrsti gelsko strukturo nabrekliga ksantana, saj elektroliti nevtralizirajo negativne naboje na stranskih verigah ksantana, da se te prilegajo osnovni verigi. Osnovne verige ksantanskih molekul se nato lahko bolj približajo druga drugi in tvorijo čvrstejši gel (48). Razlog, zakaj sproščanje ni že od samega začetka počasnejše v PV z dodanim NaCl, je ta, da je za nastanek gelske strukture, ki zadržuje sproščanje ZU, potreben določen čas, in pa tudi opažanje, da so tablete v PV brez ionov nabrekli hitreje in v večji meri.

Povsem drugačno je sproščanje ZU iz tablet LV hitosana (Slika 14). Sam LV hitosan v prečiščeni vodi z ioni kot tudi brez njih ne upočasni sproščanja, saj se je vsa učinkovina sprostila že po 30-ih minutah. Rezultat nas ni presenetil, saj hitosan kot kationski polimer gelira le pri nizkih vrednostih pH, ko je protoniran. Voda ima relativno visok pH (okoli 6-7), ki torej LV hitosanu prepreči, da bi geliral in upočasnil sproščanje ZU.



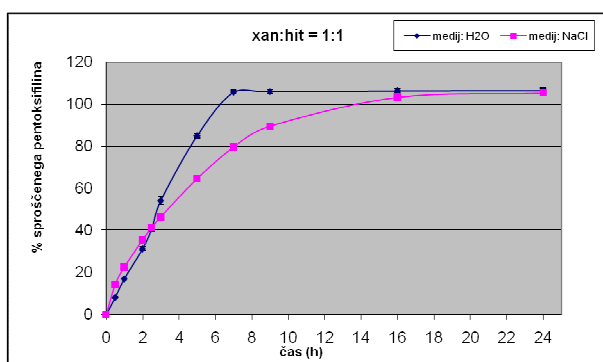


**Slika 13:** Profila sproščanja PF iz tablet 8D (s ksantanom) v prečiščeni vodi in prečiščeni vodi z NaCl z uporabo Naprave 3.

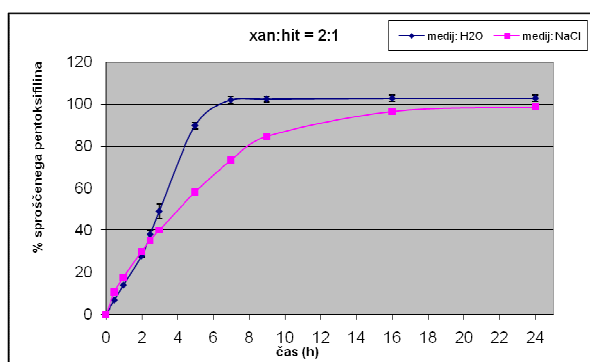


**Slika 14:** Profila sproščanja PF iz tablet 8E (z LV hitosanom) v prečiščeni vodi in prečiščeni vodi z NaCl z uporabo Naprave 3.

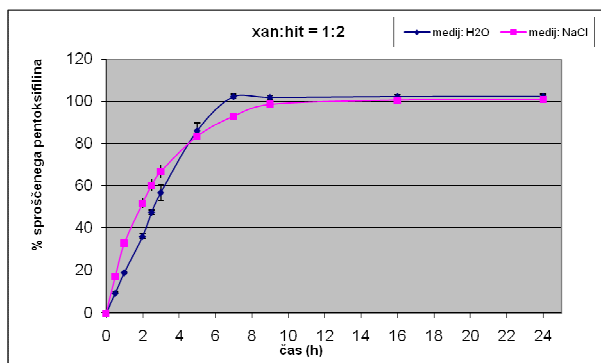
Pri tabletah, izdelanih iz kombinacije obeh polimerov, se prav tako kot iz tablet samega ksantana ZU sprošča počasneje v prečiščeni vodi z NaCl, kakor v prečiščeni vodi brez NaCl (Slike 15, 16, 17). Večji, kot je delež LV hitosana v teh tabletah, bolj sta si profila sproščanja v PV z ioni in brez njih podobna (Slika 17). ZU se iz tablet 8A in B (Slika 15 in 16) v PV sprosti v 7-ih urah, v PV z NaCl pa pri okoli 16-ih urah, kar je enak rezultat, kot smo ga dobili pri sproščanju iz tablet samega ksantana (Slika 13). Iz tablet 8C (Slika 17) se ZU v prečiščeni vodi z NaCl sprosti že v 9-ih urah, kar je bistveno hitreje kakor v primeru ostalih dveh tablet (8A in 8B), ki prav tako vsebujejo kombinacijo obeh polimerov.



**Slika 15:** Profila sproščanja PF iz tablet 8A (Xan:LV Hit = 1:1) v prečiščeni vodi in prečiščeni vodi z NaCl z uporabo Naprave 3.



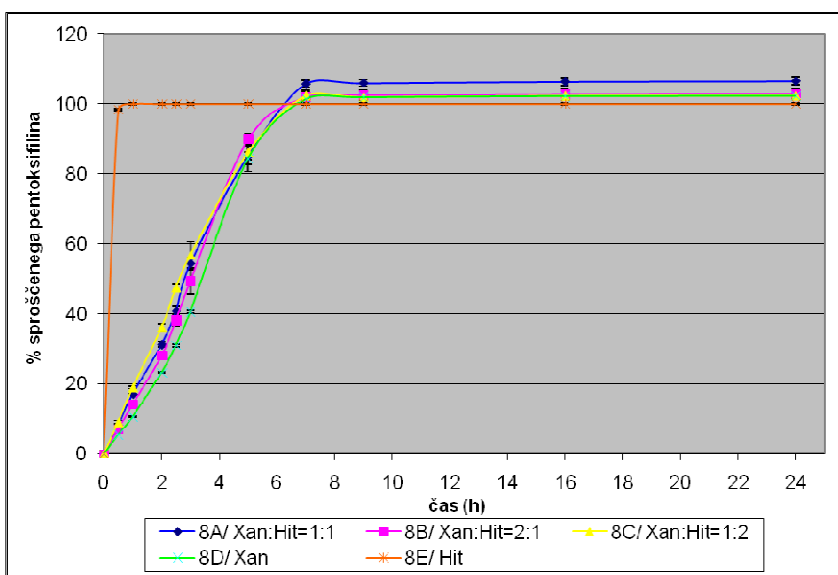
**Slika 16:** Profila sproščanja PF iz tablet 8B (Xan:LV Hit = 2:1) v prečiščeni vodi in prečiščeni vodi z NaCl z uporabo Naprave 3.



**Slika 17:** Profila sproščanja PF iz tablet 8C ( Xan:LV Hit = 1:2) v prečiščeni vodi in prečiščeni vodi z NaCl z uporabo Naprave 3.

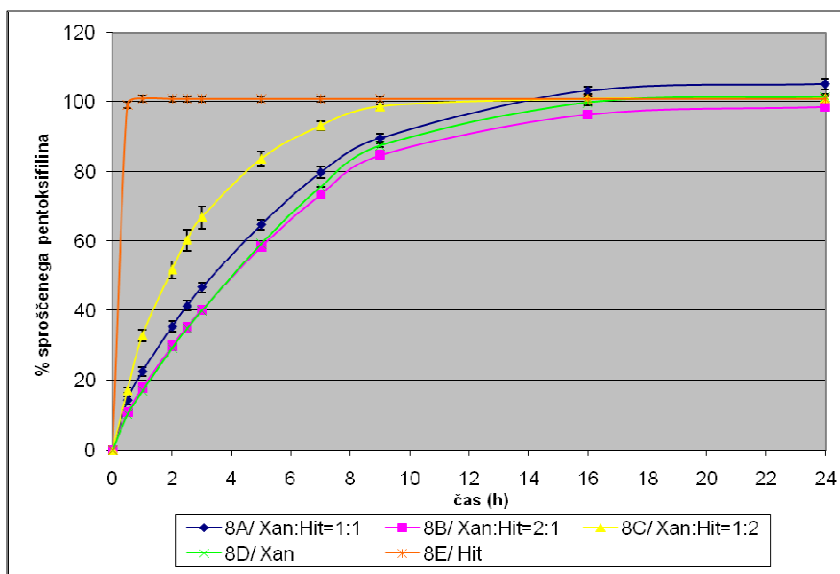
Zaključimo lahko, da je za podaljšano sproščanje PF v prečiščeni vodi odgovoren ksantan in ne LV hitosan. Sproščanje ZU je v PV z NaCl bistveno počasnejše kakor v PV brez ionov le v primeru, ko je delež ksantana 50 % ali več glede na celokupni delež polimerov v tableti.

S Slike 18, kjer so zbrani vsi profili sproščanja ZU v prečiščeni vodi, vidimo, da so si profili tablet, ki vsebujejo ksantan (8A,B,C,D), zelo podobni ( $f_2 > 50$ ). Sproščanje PF je podaljšano do 7 ur. Tako tablete 8B s 75 % deležem ksantana glede na celokupni delež polimerov v tableti, kot tudi tablete 8C z 25 % deležem ksantana so podobno upočasnile sproščanje ZU. Na podlagi tega rezultata lahko trdimo, da preskušana tri razmerja med ksantanom in LV hitosanom v tabletah pri sproščanju v PV niso odločilna, saj kombinacije tako z manjšim kot z večjim deležem ksantana enako učinkovito upočasnijo sproščanje.



**Slika 18:** Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,B,C,D,E v prečiščeni vodi z uporabo Naprave 3 (n=3).

Profile sproščanja ZU iz tablet v prečiščeni vodi z dodanim NaCl prikazuje Slika 19. Odstopanje je opazno pri profilih tablet 8E in 8C, kjer je sproščanje ZU hitrejše. Gre za tablete iz samega LV hitosana ali iz kombinacije polimerov Xan:LV Hit = 1:2, torej z največjim deležem LV hitosana, ki povzroči nekoliko hitrejše sproščanje PF. Vsa učinkovina se v tem primeru sprosti v 9-ih urah. Pri ostalih kombinacijah je čas sproščanja podaljšan do 16 ur.



**Slika 19:** Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,B,C,D,E v prečiščeni vodi z dodatkom NaCl z uporabo Naprave 3 (n=3).

Iz povedanega lahko sklepamo, da je v prečiščeni vodi z dodatkom NaCl delež ksantana v tabletah pomemben in odločilen, če želimo doseči podaljšano sproščanje vsaj do 16 ur. Delež ksantana mora biti vsaj 50 % glede na celokupno vsebnost polimerov v tableti. Navedeno lahko sicer trdimo le za preskušana razmerja polimerov, torej za deleža ksantana od 50 do 75 % glede na celokupni delež obeh polimerov v tableti.

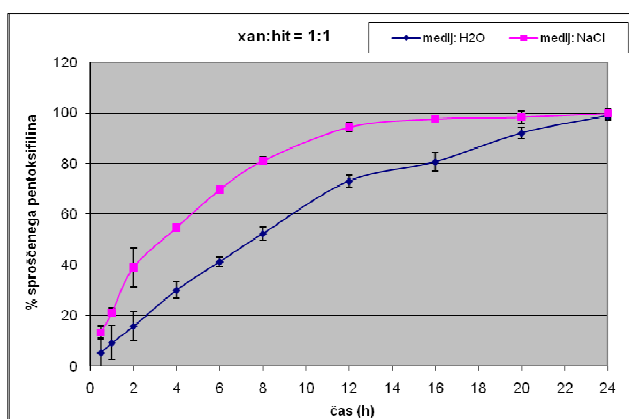
#### 4.2.2. Sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi z uporabo naprave s košaricami (Naprava 1)

Nekaj preskusov sproščanja smo opravili tudi na napravi s košaricami, ki ustreza predpisu Ph.Eur. 6<sup>th</sup> Ed. (Naprava 1). Preskuse smo izvedli z namenom, da bi lahko primerjali vpliv spremenjenih hidrodinamskih pogojev na sproščanje učinkovine iz tablet. Pri napravi s košaricami je namreč tableta izpostavljena dosti manjšim mehanskim obremenitvam kot

pri preskusu sproščanja s pomočjo naprave z recipročnimi cilindri. Ker so preskuse sproščanja PF iz tablet ksantana izvedli z Napravo 1 že v prejšnjih diplomskih nalogah (21, 49), smo pri našem delu preskuse izvedli v manjšem obsegu na serijah tablet 8A, 8B in 8C, ki vsebujejo kombinacijo obeh polimerov (ksantana in hitosana). Preskuse smo izvedli v prečiščeni vodi ter v prečiščeni vodi, ki smo ji dvignili ionsko moč za 0,2M z dodatkom NaCl.

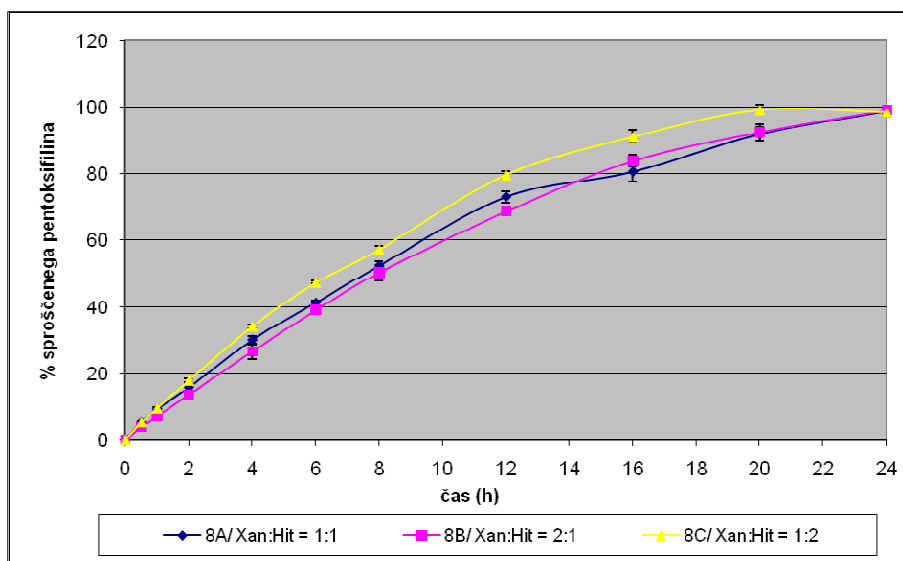
Pri vseh preskusih sproščanja, ki smo jih izvedli v prečiščeni vodi, so tablete po 24-ih urah popolnoma razpadle. Pri preskusih sproščanja v prečiščeni vodi s povišano ionsko močjo so po koncu preskusa v košaricah pri serijah 8A in 8B (delež ksantana  $\geq$  hitosana) ostale majhne, čvrste tablete.

Kot vidimo s Slike 20, se je PF v prečiščeni vodi s povišano ionsko močjo sprostil hitreje kot v sami PV, kar je povsem nasprotno kot pri preskusih sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri (Slika 15). Možne vzroke za takšen rezultat bomo predstavili v nadaljevanju. Sproščanje v PV s povišano ionsko močjo je bilo glede na PV hitrejše tudi v primerih tablet 8B in 8C, zato teh dveh grafov ne prikazujemo.



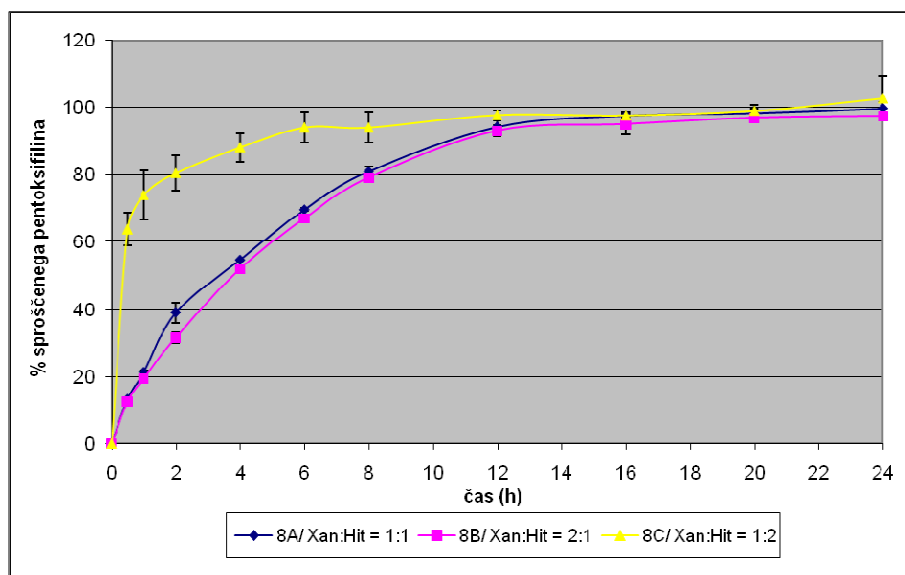
**Slika 20:** Profila sproščanja PF iz tablet 8A ( Xan:LV Hit = 1:1) v prečiščeni vodi in prečiščeni vodi z NaCl z uporabo Naprave 1.

Na Slikah 21 in 22 je predstavljena primerjava profilov sproščanja za vse tri serije tablet v PV ter PV z dodanimi ioni. Opazimo lahko, da med profili v PV ni signifikantnih razlik glede na različne deleže (1:1, 2:1 in 1:2) ksantana in hitosana v tabletah (Slika 21).



Slika 21: Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,B,C v prečiščeni vodi z uporabo Naprave 1 (n=3).

V prečiščeni vodi s povišano ionsko močjo odstopa profil sproščanja PF iz tablet 8C (Xan:LV Hit = 1:2), kjer se v prve pol ure sprosti kar 64 % ZU, ostanek do 100 % pa v nadaljnjih 6-ih urah (Slika 22).



Slika 22: Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,B,C v prečiščeni vodi z dodatkom NaCl z uporabo Naprave 1 (n=3).

V primeru tablet, kjer je v prebitku hitosan (8C), je sproščanje v PV z dodanimi ioni bistveno hitrejše v primerjavi z ostalima dvema formulacijama, ki vsebujeta večji delež ksantana. To ponovno kaže, da je ksantan tisti polimer, ki je odgovoren za upočasnjeno sproščanje v prečiščeni vodi s povišano ionsko močjo. V PV brez dodanih ionov tega nismo opazili.

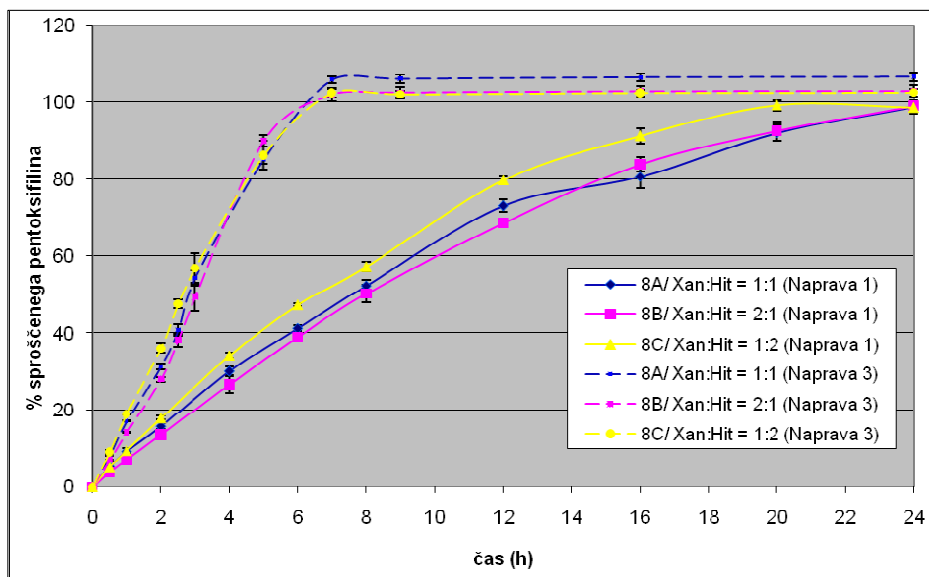
#### **4.2.3. Primerjava vpliva uporabljene naprave na sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi**

Primerjali smo, kako spremenjeni hidrodinamski pogoji pri izvajanju preskusa z Napravo 3 glede na Napravo 1 vplivajo na nastanek gelskega plašča in s tem na sproščanje PF iz tablet v prečiščeni vodi. Pri Napravi 1 je nastajajoč gelski plašč tablete mehansko manj obremenjen, saj nanj z vrtenjem košarice v mediju delujejo sile laminarnega gibanja tekočine, ki precej manj poškodujejo gelski plašč v primerjavi s silami turbulentnega gibanja pri Napravi 3.

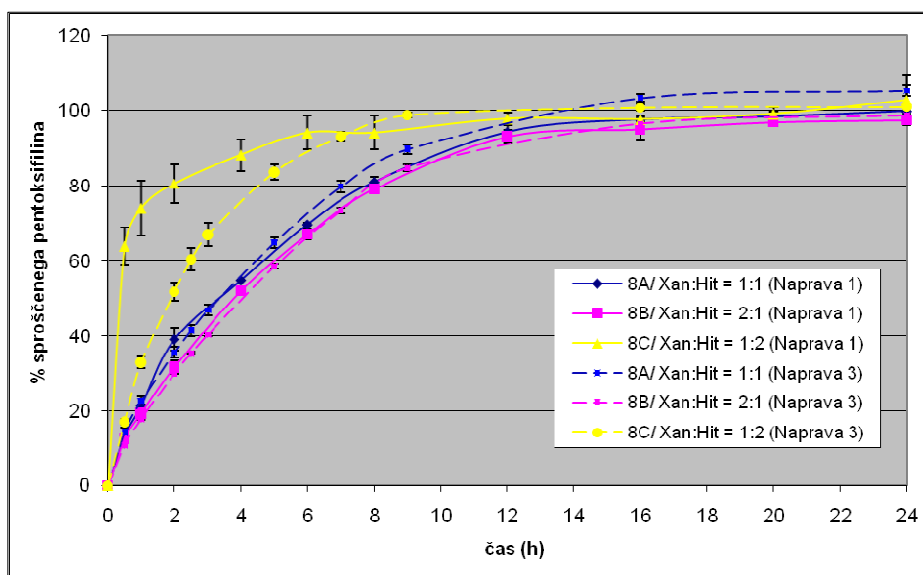
Po koncu vseh preskusov, izvedenih v prečiščeni vodi z NaCl, smo ne glede na uporabljeno napravo opazili čvrste tablete tudi po 24-ih urah. To nezmotljivo kaže, da prisotnost NaCl vpliva na strukturo polimerov, predvsem ksantana, in omogoča tvorbo čvrstega gelskega plašča, ki povzroči počasnejše razpadanje tablete, ne pomeni pa nujno počasnejšega sproščanja ZU (Sliki 23, 24).

Pri uporabi Naprave 1 je tako sproščanje v PV z ioni hitrejše kakor v PV brez ionov, torej nastanek čvrstjšega gelskega plašča v PV z ioni ne prispeva k počasnejšemu sproščanju ZU. Menimo, da je razlog temu nastanek čvrstega, vendar tanjšega gelskega plašča. Če je gelski plašč tanek, majhne molekule ZU hitreje difundirajo zaradi krajše difuzijske poti. Možno je tudi, da so pore v bolj čvrstem gelu večje in toge, kar prav tako olajša difuzijo majhnih ZU.

Pri Napravi 3 je zaradi velikih mehanskih obremenitev zelo pomembna čvrstost gelskega plašča. V primeru sproščanja v prečiščeni vodi nastaja šibkejši gel, ki se zlahka odplavlja. Večja in hitrejša erozija ogrođa tablete zato pospeši sproščanje ZU, prav tako pa je difuzijska pot ZU zaradi odplavljajočega se gelskega sloja krajša. Nastanek močnejše in rigidnejše gelske strukture v prečiščeni vodi z ioni pa preprečuje odplavljanje polimera v medij (manjša erozija), zaradi česar ostaja difuzijska pot učinkovine daljša in je posledično sproščanje bolj upočasnjeno.



**Slika 23:** Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,B in C v prečiščeni vodi z uporabo Naprave 1 in Naprave 3



**Slika 24:** Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,B in C v prečiščeni vodi s povišano ionsko močjo z uporabo Naprave 1 in Naprave 3.

Če primerjamo Sliki 23 in 24, vidimo, da so razlike med uporabljenima napravama manjše v primeru, ko uporabimo za sproščanje PV z dodanimi ioni. Profili sproščanja iz tablet 8A in 8B (Slika 24) so si namreč zelo podobni ( $f_2 > 50$ ). Odstopata profila sproščanja iz tablet 8C, ki vsebujejo manjši delež ksantana in večji delež hitosana.

Iz navedenega lahko vidimo, da ioni vplivajo predvsem na povezovanje ksantanskih verig in ne toliko na hitosan, zato v primeru manjšega deleža ksantana v tableti ne nastane dovolj debel in čvrst gelski plašč, ki bi uspel bolj izrazito podaljšati sproščanje ZU.

Na osnovi primerjave preskusov sproščanja na obeh napravah vidimo, da z uporabo različnih naprav dobimo povsem drugačne profile sproščanja, zlasti takrat, ko je medij prečiščena voda. Ker z Napravo 3 bolje posnemamo pogoje v GIT in ker je z uporabo te naprave lažje spreminjati pH medija, smo se odločili, da v nadaljevanju uporabimo le Napravo 3.

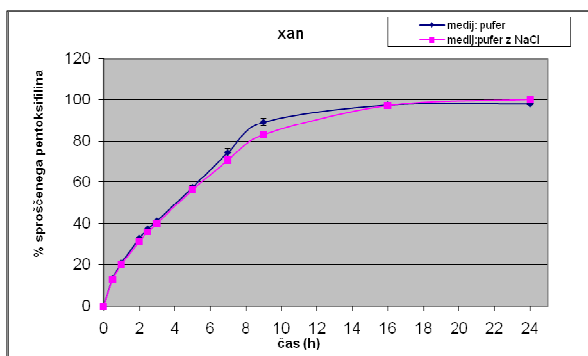
#### **4.2.4. Sproščanje učinkovine iz tablet v pufrih z uporabo BIODIS-a**

Po izvedenih preskusih sproščanja v prečiščeni vodi smo se odločili, da izvedemo preskuse še v medijih, ki bolj posnemajo fiziološke pogoje in so opisani v Ph.Eur. 6<sup>th</sup> Ed. Pogoji preskusov so predstavljeni v Preglednici IV.

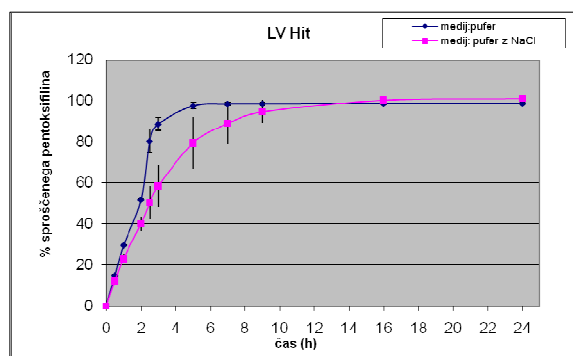
Sproščanje učinkovine iz ksantanskih tablet (Slika 25) je v pufrih z dodanimi ioni malenkostno počasnejše kot v samih pufrih, vendar je razlika nesignifikantna, če upoštevamo faktor podobnosti ( $f_2 = 79$ ). V obeh primerih je sproščanje ZU končano v 18-ih urah.

Drugače je pri tabletah iz samega LV hitosana (Slika 26), kjer je vsa ZU sproščena v pufrih že v 5-ih urah, medtem ko se sproščanje v pufrih z dodanim NaCl podaljša do 12 ur. Res je, da moramo rezultate sproščanja PF iz tablet LV hitosana v pufrih z dodanim NaCl oceniti s previdnostjo, saj smo dobili med paralelami velika odstopanja. Razlog za velika odstopanja je po vsej verjetnosti ta, da so se nekatere tablete kljub vedno enakemu postopku vstavljanja v stekleni cilinder med preskusom sproščanja prilepile na mrežico cilindra, druge pa so se v cilindru prosto gibale. To pomeni, da niso bile izpostavljene povsem identičnim hidrodinamskim pogojem. Tablete, ki so se prilepile na mrežico, so razpadle kasneje kot tablete, ki so v mediju plavale. Po koncu preskusa so bile tablete z LV hitosanom na videz razpokane in zveržene, podobne mivki in ne gelu. To nas niti ni presenetilo, saj je znano, da hitosan gelira pri nizkih vrednostih pH, katerim je bil tekom našega preskusa izpostavljen le prvi 2 uri.



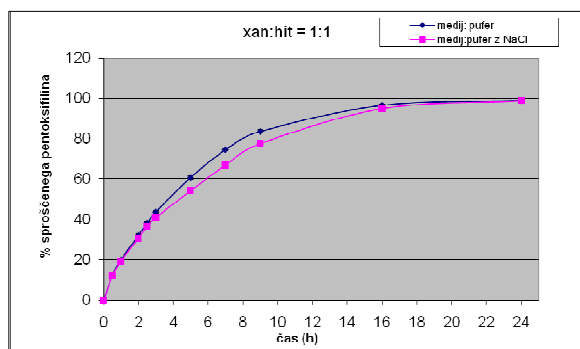


**Slika 25:** Profila sproščanja PF iz tablet 8D (s ksantanom) v pufrih in pufrih z NaCl.

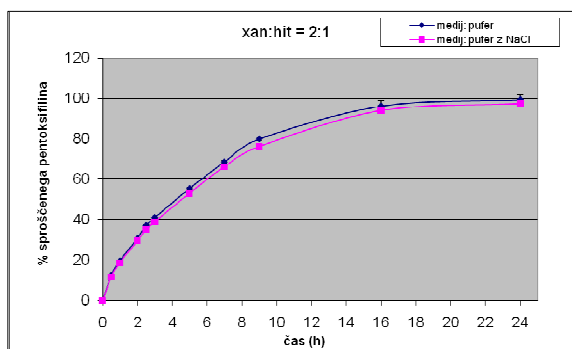


**Slika 26:** Profila sproščanja PF iz tablet 8E (z LV hitosanom) v pufrih in pufrih z NaCl.

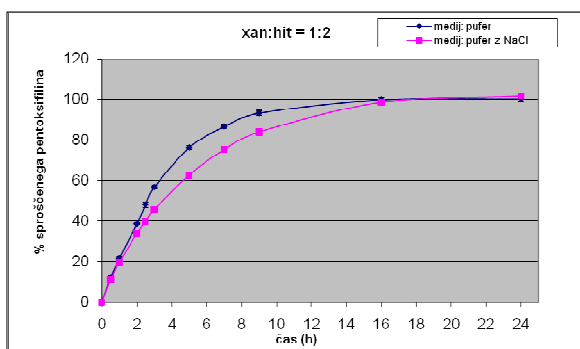
Prav tako kot pri tabletah iz samega ksantana se tudi pri tabletah s kombinacijo obeh polimerov (Slike 27-29) profila sproščanje v pufrih z dodanimi ioni in brez njih ne razlikujeta signifikantno ( $f_2 > 50$ ). To je zanimivo, saj so bile tablete v mediju z višjo ionsko močjo na koncu preskusa dosti bolj čvrste in trdne v primerjavi s tabletami po sproščanju v medijih brez NaCl. Gre torej za dovolj robustne tablete, kjer dodani ioni nimajo velikega vpliva na sproščanje učinkovine. Slednje je dober znak z vidika spreminjajoče se ionske moči v prebavnem traktu, ki je odvisna tudi od vsebine zaužite hrane.



**Slika 27:** Profila sproščanja PF iz tablet 8A (Xan:LV Hit = 1:1) v pufrih in pufrih z NaCl.



**Slika 28:** Profila sproščanja PF iz tablet 8B (Xan:LV Hit = 2:1) v pufrih in pufrih z NaCl.

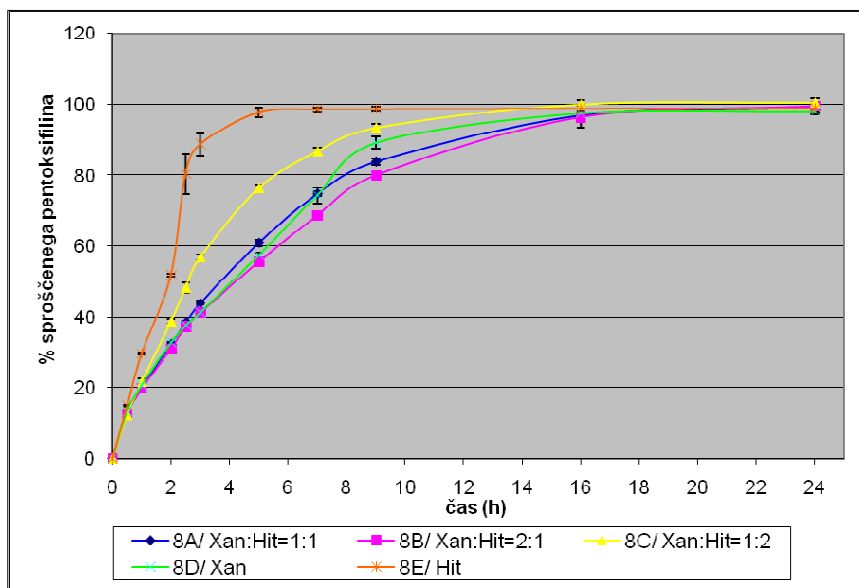


**Slika 29:** Profila sproščanja PF iz tablet 8C (Xan:LV Hit = 1:2) v pufrih in pufrih z NaCl.

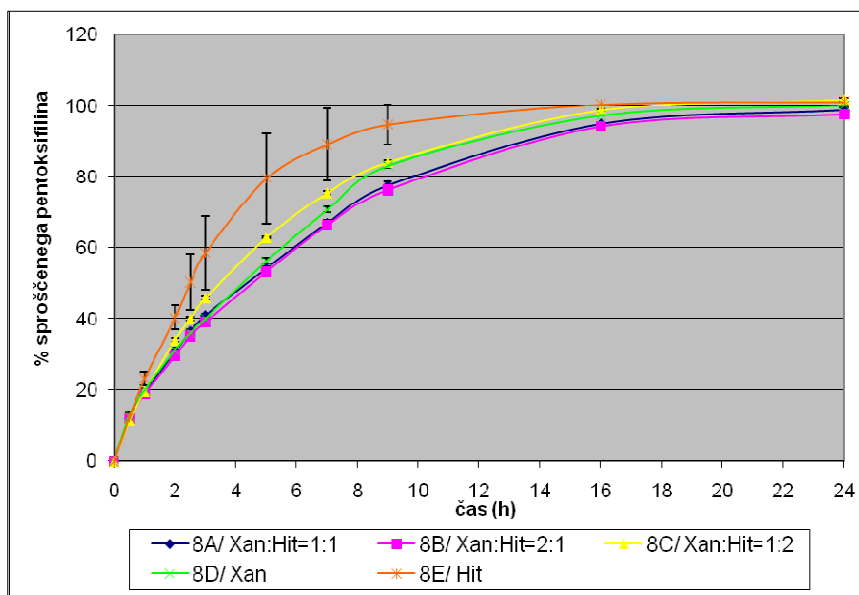
Sliki 30 in 31, na katerih so zbrani rezultati preskusa sproščanja vseh petih serij tablet, jasno prikazujeta odstopanje profila sproščanja LV hitosana tako v pufrih brez dodanih ionov kot z njimi. Sam LV hitosan bistveno manj zadrži sproščanje, kot če je v kombinaciji s ksantanom. Če smo pozorni, opazimo na profilu sproščanja LV hitosana (Slika 30), da se krivulja do časa 30 minut v pufru brez NaCl prilega ostalim krivuljam, nato pa se sproščanje v primerjavi z ostalimi profili pospeši. V časovni točki 2 ur se naklon ponovno močno spremeni. Sproščanje učinkovine je tako od 2 do 2,5 ur še hitrejše. Nato sledi zopet sprememba naklona krivulje v smeri počasnejšega sproščanja do časa 5 ur, ko se sprostí vsa učinkovina.

Spremembe v naklonu krivulje lahko razložimo sledeče. Kadar je hitosan samostojno v tableti, pri nizkem pH tvori gel. Zato je v prvih 30-ih minutah sproščanje upočasnjeno. Nato se sproščanje kljub nizkemu pH-ju hitro pospeši. Eden od razlogov za to sta verjetno sama struktura ter manjša molekulska masa, zaradi katerih LV hitosan tvori manj viskozni gelski sloj, ki ne upočasni dovolj sproščanja učinkovine. Ob zamenjavi medija pH 1,2 s fosfatnim pufrom pH 4,5 pri času 2 ur, se sproščanje še dodatno pospeši. Razlog je v manjšem geliranju hitosana v mediju z višjim pH. Zakaj se sproščanje učinkovine ob nadaljevanju preskusa v fosfatnem pufru pH 7,0 upočasni, ne vemo zagotovo. Predvidevamo, da se hitosan zaradi dviga pH vrednosti nad točko njegove topnosti obori. To bi lahko pomenilo, da se struktura prej nastalega gela spremeni tako, da preostala učinkovina težje prehaja v medij.

Ostali profili sproščanja ZU so si precej podobni, predvsem profila serij tablet 8A (Xan: LV Hit = 1:1) in 8B (Xan:LV Hit = 2:1), ki sta praktično identična v obeh medijih, čeprav gre za drugačno sestavo tablet. Na tej osnovi lahko trdimo, da smo izdelali robustne tablete. Če je v tableti razmerje med ksantanom in LV hitosanom od 1:1 do 2:1, se to praktično ne odraža na sproščanju. To pomeni, da majhne razlike v zatehti ksantana nimajo bistvenega vpliva na profil sproščanja, v kolikor je vsebnost ksantana večja od vsebnosti hitosana. Slednje je koristno tudi z industrijskega vidika. Profil 8C, ki na videz odstopa med profili 8A-D, po izračunih faktorja podobnosti dejansko signifikantno odstopa le v primerjavi s profilom sproščanja iz tablet 8B ( $f_2 = 46,41$ ).



**Slika 30:** Primerjava profilov sproščanja pentoksifilina iz tablet 8A,B,C,D,E v pufrih (n=3).



**Slika 31:** Primerjava profilov sproščanja pentoksifilina iz tablet 8A,B,C,D,E v pufrih z dodatkom NaCl (n=3).

Po končanem preskusu sproščanja so se tablete po videzu med seboj zelo razlikovale. Pri tabletah, ki so vsebovale kombinacijo obeh polimerov ksantana in hitosana, smo dobili na koncu nabrekle tablete pravih oblik, od katerih so bile najbolj čvrste tablete 8A s sestavo Xan:LV Hit = 1:1, najmanj pa tablete 8B, ki so imele več ksantana kot hitosana. Popolnoma brez oblike so bile po koncu preskusa tablete s samim ksantanom, kjer je ostalo na mrežici cilindra zelo malo skoraj prosojnega gela. Ugotovili smo, da po videzu tablet ne moremo oceniti, katere tablete so bolj primerne in katere bolj podaljšajo sproščanje

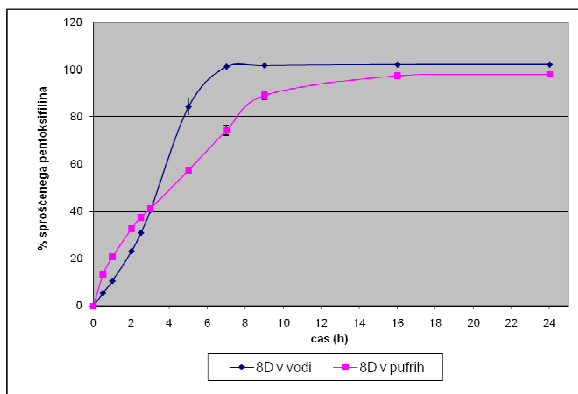
učinkovine. Samo z opazovanjem tablet bi lahko sklepali popolnoma napačno, saj bolj ohranjena ogrodja ne zagotavljajo vedno tudi bolj upočasnjene sproščanja.

Zaključimo lahko tudi, da je ksantan tisti polimer, ki najbolj pripomore k upočasnitvi sproščanja ZU, najoptimalnejša pa je kombinacija z LV hitosanom, vendar v razmerju, ko je ksantan v večinskem deležu ali pa vsaj v razmerju 1:1.

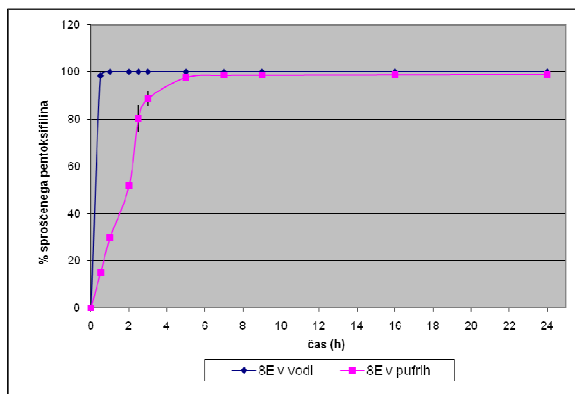
#### **4.2.5. Primerjava sproščanja učinkovine z uporabo BIODIS-a v prečiščeni vodi in pufrih z različnimi pH-ji**

Zanimalo nas je, kako pH vrednost različnih pufrov vpliva na sproščanje PF v primerjavi s prečiščeno vodo. S tem namenom smo med seboj primerjali rezultate sproščanja učinkovine iz vseh izdelanih formulacij 8A-E v prečiščeni vodi z rezultati, kjer smo namesto PV uporabili tri različne vrste pufrov, s katerimi smo simulirali spreminjanje pH vrednosti medija v prebavnem traktu (Preglednica IV v poglavju 3.3.3.).

Iz tablet 8D (Slika 32), ki so le iz ksantana, je do 3 ur sproščanje hitrejše v pufrih kot v PV, nato pa se trend obrne. Pri točki 3 ur se tako krivulji profilov sproščanja v pufrih in PV sekata. Počasnejše sproščanje v prečiščeni vodi do 3 ur v primerjavi s pufri je posledica lastnosti ksantana, ki pri nizkih pH vrednostih manj nabreka. Močnejše nabrekanje ksantana se začne šele pri višjih vrednostih pH, kar se zgodi ravno v časovni točki vzorčenja pri 3 ur, ko se zaradi menjave medija med eksperimentom pH dvigne na 7,0. V prečiščeni vodi, katere pH je med 6 in 7, ksantan takoj nabreka (gelira), zato v začetku bolj zadrži sproščanje kot v mediju s pH 1,2. Po premisleku bi logično sklepali, da bi se moralo počasnejše sproščanje v vodi nadaljevati, saj je ksantan geliral in tako že v začetku omogočil nastanek gelskega plašča, ki predstavlja oviro za prehod ZU iz tablete in tako počasnejše sproščanje. Vendar pa rezultati kažejo, da temu ni tako. Upoštevati moramo namreč še dejavnik mehanske obremenitve tablete med preskusom. Večje nabrekanje ksantana v vodi sicer povzroči nastanek debelejšega gelskega plašča, ki pa je zelo šibke strukture. Polimer na površini erodira, ker se polimerne verige odpletajo in prehajajo v medij, s tem pa se omogoči olajšano izplavljanje ZU iz razrahljane strukture. Sproščanje je posledično hitrejše.



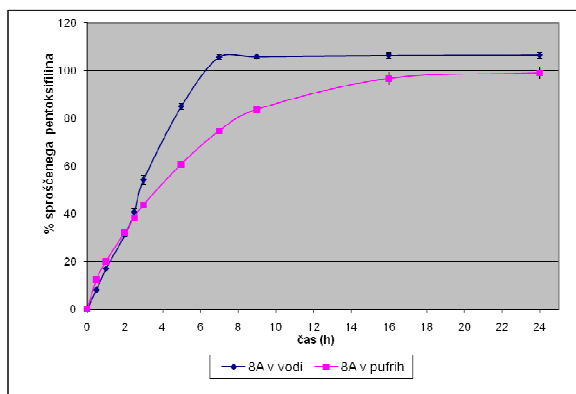
**Slika 32:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi in pufrih za serijo 8D (Xan).



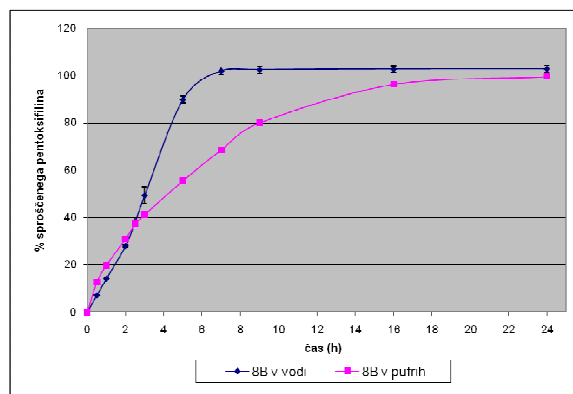
**Slika 33:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi in pufrih za serijo 8E (LV Hit).

Nekoliko bolj pričakovani so profili sproščanja ZU iz tablet 8E iz samega LV hitosana (Slika 33). Krivulja sproščanja ZU v prečiščeni vodi nezmotljivo kaže, da hitosan v vodi pri pH 6 ne nabreka, zato ne zadrži sproščanja. Drugače pa je s profilom sproščanja v pufrih, kjer sta lepo razvidna dva preloma na krivulji, ki sovpadata s spremembo pH vrednosti medijev. Glede na krivuljo v PV je tukaj sproščanje do 2 ur kar za polovico počasnejše (pri 2 urah se sprosti 50 % ZU v pufru, medtem ko v PV že 100 %), čeprav je sicer še vedno relativno hitro. Pri pH 1,2 pride do geliranja molekul hitosana. Ob zamenjavi medija pri 2 urah, ko se tablete prestavijo iz medija s pH vrednostjo 1,2 v medij s pH vrednostjo 4,5, nam delež sproščene ZU v pol ure poskoči na 80 % (dvig za 30 %). Na podlagi tega rezultata sklepamo, da se je nadaljnja tvorba gela ustavila, struktura pa se je razrahljala. Ko so tablete v pufru s pH 7,0, se sproščanje spet nekoliko upočasni. Možna je razlaga s pomočjo literaturnih podatkov, da hitosan nad pH vrednostjo 6,5 ni topen in se izobori (16, 24). V primeru LV hitosana lahko torej potrdimo, da gre pri sproščanju v pufrih za pH odvisno sproščanje.

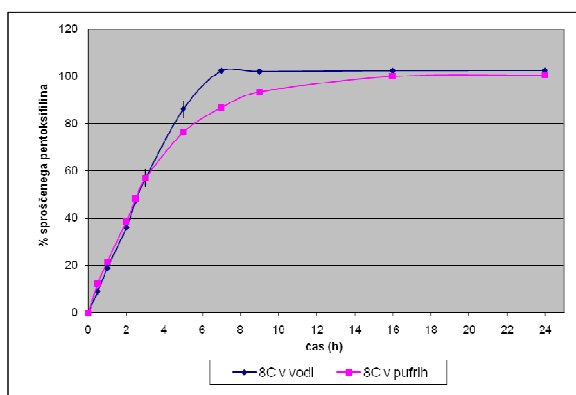
Pri tabletah 8A (Slika 34) in 8B (Slika 35) je sproščanje PF iz tablet signifikantno počasnejše v pufrih, kjer se okoli 97 % ZU sprosti v 16-ih urah. V prečiščeni vodi je vsa ZU sproščena že pri 7-ih urah. Slika 36, ki prikazuje primerjalno sproščanje PF iz formulacije 8C, kaže, da se profil sproščanja ZU v pufrih le malo razlikuje od profila sproščanja v PV. To potrjuje tudi faktor podobnosti, ki znaša 58, torej lahko trdimo, da gre za podobna profila.



**Slika 34:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi in pufrih za serijo 8A (Xan:LV Hit = 1:1).



**Slika 35:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi in pufrih za serijo 8B (Xan:LV Hit = 2:1).



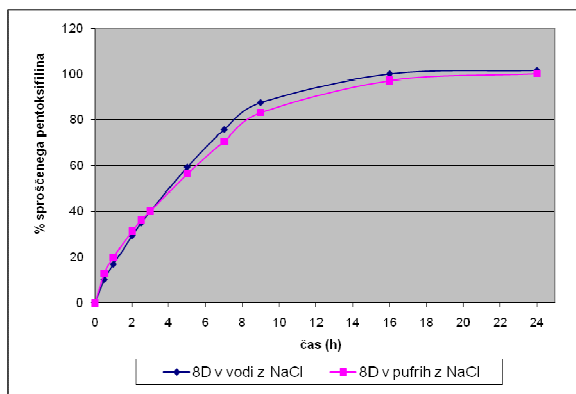
**Slika 36:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi in pufrih za serijo 8C (Xan:LV Hit = 1:2).

Zaključimo lahko, da so tablete, ki vsebujejo oba polimera, kar se tiče neodvisnosti sproščanja ZU od pH vrednosti medija (v GIT) najboljše (Slika 34-36). Posamezna profila sproščanja PF iz tablet samega ksantana in samega hitosana sta namreč od pH odvisna, na kar kažejo spremenjeni nakloni krivulj ob spremembi pH vrednosti medija (Slika 32, 33). Kombinacija obeh polimerov v tableti nakazuje na možen sinergizem v smislu, da hitosan pripomore k počasnejšemu sproščanju pri nizkem pH, ksantan pa pri visokem pH, zato je rezultat pH neodvisno sproščanje. Do pH vrednosti 4,5 namreč gelira hitosan, potem pa to vlogo pri višjem pH-ju prevzame ksantan. Pri tem moramo poudariti, da mora biti delež ksantana v tableti glede na hitosan večji, saj je tableta tudi sicer daljši čas izpostavljena višjemu pH-ju, pri katerem se izraža učinek ksantana in ne hitosana.

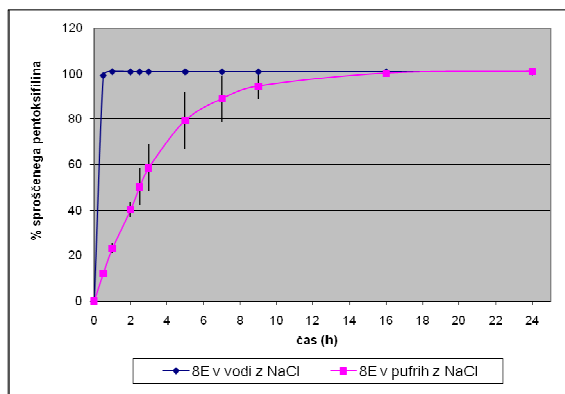
Sproščanje v prečiščeni vodi zagotovo ni primerna izbira za napovedovanje rezultatov *in vivo*, saj voda kot medij ne posnema dejanskih pogojev v GIT. Iz profilov sproščanja učinkovine v PV ne moremo sklepati, kaj se bo dogajalo s tabletami pri sproščanju v medijih z različnimi pH-ji.

#### 4.2.6. Primerjava sproščanja učinkovine z uporabo BIODIS-a v prečiščeni vodi in pufrih z različnimi pH-ji s povišano ionsko močjo

Na enak način smo primerjali rezultate sproščanja učinkovine v prečiščeni vodi in pufrih, ki smo jim dvignili ionsko moč z NaCl za 0,2M (Slike 37-41).



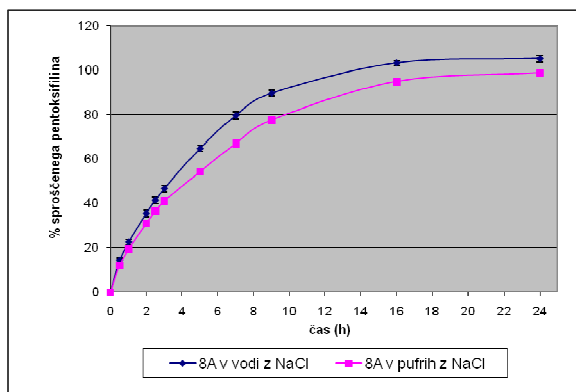
**Slika 37:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi z NaCl in pufrih z NaCl za serijo 8D (Xan).



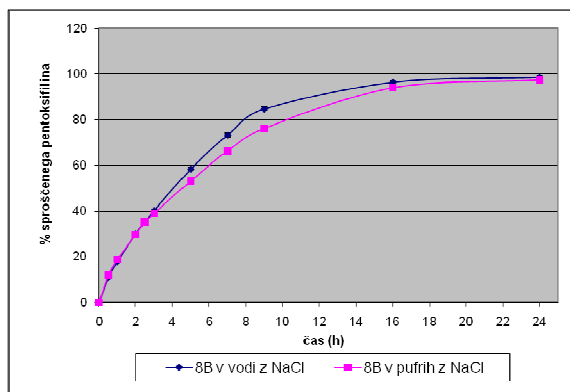
**Slika 38:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi z NaCl in pufrih z NaCl za serijo 8E (LV Hit).

Za lažje razumevanje vpliva posameznega polimera v tabletah s kombinacijo obeh polimerov si najprej pogledimo profile sproščanja PF iz tablet 8D (Xan) in 8E (LV Hit). Pri tabletah iz ksantana (Slika 37) vidimo, da se profila sproščanja v prečiščeni vodi in pufrih s povišano ionsko močjo ne razlikujeta ( $f_2 = 76$ ), kar je popolnoma nasprotno rezultatu, ki smo ga dobili, ko smo primerjali izbrane tablete v PV in pufrih brez NaCl (Slika 32). Tako smo prišli do pomembne ugotovitve, da na sam ksantan pri povišani ionski moči medijev pH nima vpliva. V mediju s povišano ionsko močjo ksantan omogoča torej od pH neodvisno sproščanje.

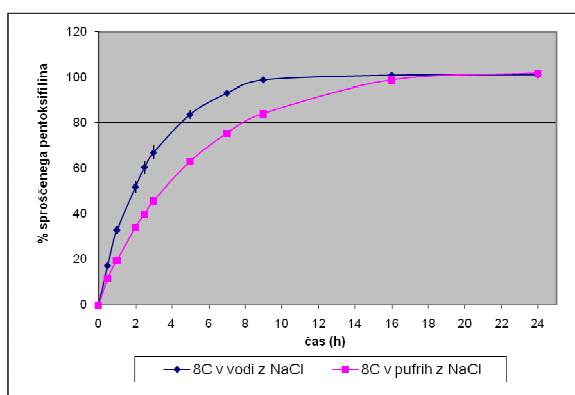
Slednje za profil sproščanja iz tablet samega LV hitosana ne drži (Slika 38). Sproščanje iz tablet 8E v pufrih z NaCl je podaljšano do 16-ih ur, medtem ko je v PV z NaCl že po 30-ih minutah sproščena vsa učinkovina. Sproščanje pentoksifilina iz tablet LV hitosana je torej tudi v mediju s povišano ionsko močjo pH odvisno.



**Slika 39:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi z NaCl in pufrih z NaCl za serijo 8A (Xan:LV Hit = 1:1).



**Slika 40:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi z NaCl in pufrih z NaCl za serijo 8B (Xan:LV Hit = 2:1).



**Slika 41:** Primerjava profilov sproščanja PF v prečiščeni vodi z NaCl in pufrih z NaCl za serijo 8C (Xan:LV Hit = 1:2).

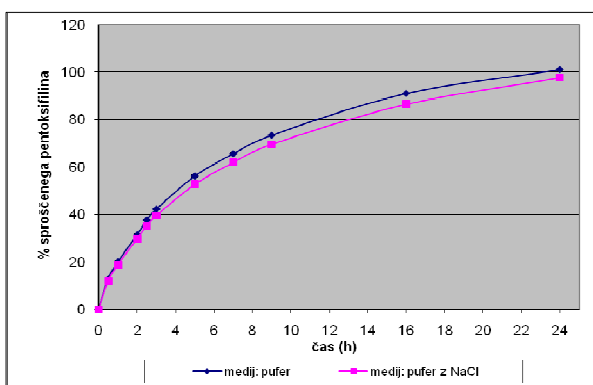
Iz slik 39-41 vidimo, da večji kot je v tableti delež ksantana, bolj podobna sta si profila v medijih s povišano ionsko močjo. To je povsem razumljivo, če pogledamo rezultate tablet s samim ksantanom (Slika 37). Večji kot je delež ksantana v tableti, manj je sproščanje v medijih s povišano ionsko močjo odvisno od pH vrednosti. Razlika med profiloma je tako največja na Sliki 41, kjer predstavlja večji delež v tableti LV hitosan. Nasprotno lahko trdimo, da večji kot je delež hitosana v tableti, bolj je hitrost sproščanja PF odvisna od pH vrednosti medija s povišano ionsko močjo.



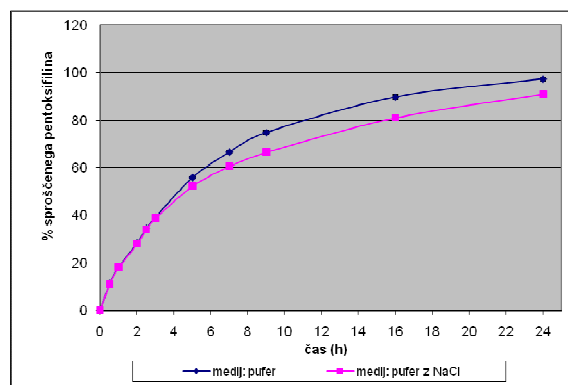
#### 4.2.7. Sproščanje učinkovine iz tablet na osnovi kompleksov med ksantanom in LV hitosanom v pufrih z različnimi pH-ji z uporabo BIODIS-a

Zanimalo nas je, ali predhodno pripravljene kompleksi med ksantanom in LV hitosanom predstavljajo prednost v smislu neodvisnosti načina sproščanja v različnih medijih glede na direktno stisnjene prahove izbranih polimerov. Priprava kompleksov je natančno opisana v poglavju 3.3.2.

Za združevanje raztopin polimerov v razmerju Xan: Hit = 1:1 smo se odločili, ker smo v literaturi zasledili, da je to razmerje za tvorbo PEC najoptimalnejše. Slednje so potrdili tudi v predhodni diplomski nalogi, kjer so ugotovili tudi to, da so izkoristki pri pripravi kompleksov med omenjenima polimeroma z uporabo različnih mešal med 50 in 65 % (37).



**Slika 42:** Profil sproščanja PF iz tablet LIO 1 (lioofilizat kompleksa Xan:LV Hit = 1:1, pripravljen s paličnim mešalnikom).



**Slika 43:** Profil sproščanja PF iz tablet LIO 2 (lioofilizat kompleksa Xan:LV Hit = 1:1, pripravljen z mešalnikom OMNI).

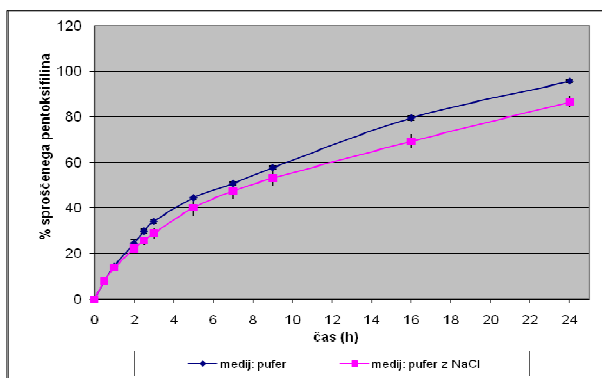
Iz slik 42 in 43 je razvidno, da med profiloma sproščanja ZU iz tablet LIO1 in LIO2 primerjalno v pufrih brez in z dodanim NaCl, ni signifikantne razlike ( $f_2$  za LIO1 = 75,  $f_2$  za LIO2 = 65). To je enak rezultat, kot smo ga dobili pri sproščanju učinkovine iz direktno stisnjenih tablet serije 8A (Slika 27). Gre torej za dovolj robustne tablete, kjer dodani ioni nimajo velikega vpliva na sproščanje učinkovine.

Pri tabletah LIO2 se po 24-ih urah ni sprostil vseh 100 % učinkovine. Pri izvajanju preskusa v pufrih se je sprostil približno 97 % učinkovine, v pufrih z dodanimi ioni pa le 91 % (Slika 43). To nas ni presenetilo, saj smo dobili pri pripravi kompleksov s pomočjo mešalnika OMNI dosti bolj trdne komplekse kakor z uporabo paličnega mešalnika. Tudi sam videz tablet LIO2 po zaključku testiranja sovпада z rezultati, saj smo dobili pri sproščanju v pufrih s povišano ionsko močjo bolj kompaktne tablete. Te so ostale v sredini

nabrekliga polimernega kompleksa neomočene, kar kaže, da je struktura kompleksa tako čvrsta, da medij v 24-ih urah ni uspel prodreti skozi celotno tableto. Pri rezultatih se to kaže v nižjem % sproščene ZU.

#### 4.2.8. Sproščanje učinkovine iz tablet na osnovi liofiliziranega MV hitosana v pufrih z različnimi pH-ji z uporabo BIODIS-a

Preskus sproščanja smo izvedli še za tablete iz liofiliziranega MV hitosana, da bi lahko ovrednotili vpliv različne vrste hitosana na sproščanje PF. V literaturi smo namreč zasledili podatek, da je sposobnost hitosana za zagotavljanje podaljšanega sproščanje učinkovine odvisna tudi od njegove molekulske mase (26). Tablet, izdelanih iz LV hitosana, ne moremo povsem brez zadržkov primerjati s tabletami iz MV hitosana. Tablete z LV hitosanom smo pripravili z direktnim tabletiranjem prahov, torej v stanju, kot jih prejmemo od proizvajalca. Direktno stiskanje MV hitosana pa je bilo nemogoče zaradi oblike izhodnega materiala. Slednji je bil namreč v obliki kosmičev, ki jih tudi z različnimi metodami drobljenja nismo uspeli pretvoriti v prašek, primeren za tabletiranje. Zato smo MV hitosan raztapljali, liofilizirali, nato zmleli in šele potem tabletirali. Podroben postopek priprave tablet je opisan v poglavju 3.3.



**Slika 44:** Profila sproščanja PF iz tablet LIO 3 (liofilizat MV hitosana) v pufrih in pufrih z NaCl.

Iz tablet z MV hitosanom se je po 24-ih urah sprostil najmanjši delež ZU od vseh do tedaj preskušanih tablet. V pufrih, ki jim nismo dvigovali ionske moči, se je po 24-ih urah sprostilo 95,5 % učinkovine, v pufrih z dvignjeno ionsko močjo pa le 86 % (Slika 44). Po videzu so bile tablete po končanem preskusu sproščanja zelo nabrekle in čvrste. V prerezu

je bil v notranjosti viden neomočen polimer, okoli njega pa prozorna plast gela, ki je bila v obeh primerih enako debela. Količina neomočenega polimera je bila v primeru medija s povišano ionsko močjo skoraj dvakrat večja. Dodani ioni kljub tem opažanjem niso signifikantno spremenili profila sproščanja PF iz tablet, pripravljenih iz MV hitosana ( $f_2=69,52$ ). Trdimo lahko, da imamo v primeru tablet iz liofiliziranega MV hitosana od ionov neodvisno sproščanje učinkovine.

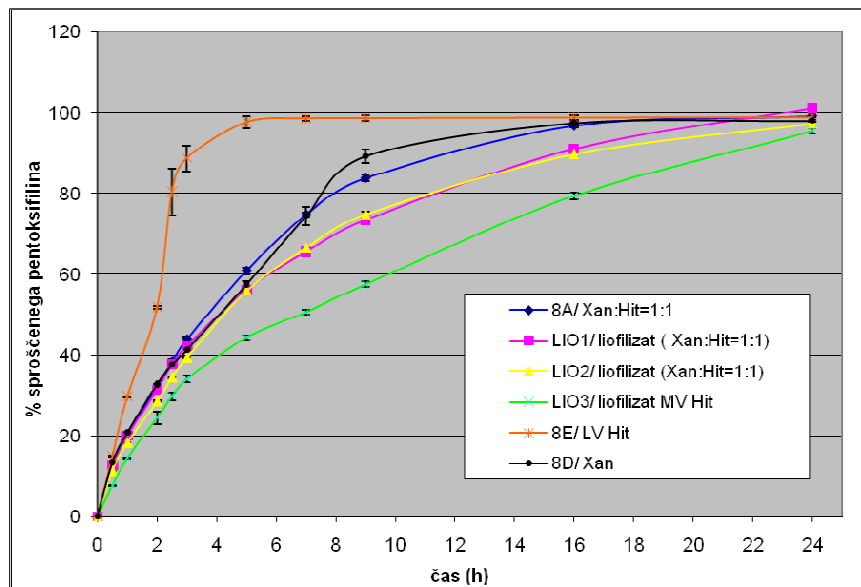
Razlog zakaj MV hitosan v pufrih uspe bolj podaljšati sproščanje ZU v primerjavi z LV hitosanom, je verjetno v njegovi molekularni masi. Čeprav na embalaži dobavljenih vrst hitosana, ki smo jih imeli na razpolago za izdelavo tablet, nismo našli podatka o molekularni masi, temveč le podatek o viskoznosti, sklepamo, da ima manj viskozen hitosan tudi manjšo molekularno maso. Predvidevamo, da hitosan z višjo molekularno maso (MV hitosan) tvori kompaktnejšo gelsko strukturo, ki uspe bolj zadržati učinkovino v svojem ogrodju in tako počasneje sprošča učinkovino.

#### **4.2.9. Vpliv predhodne kompleksacije polimerov in vrste hitosana na sproščanje učinkovine iz tablet v pufrih**

Da bi ugotovili, kakšen vpliv ima predhodna kompleksacija ksantana in hitosana na sproščanje PF, smo primerjali rezultate treh vrst tablet, pri katerih sta polimera v razmerju 1:1. Na grafe smo dodali še rezultate sproščanja iz tablet posameznih polimerov: ksantana, LV hitosana in MV hitosana (Slika 45, 46).

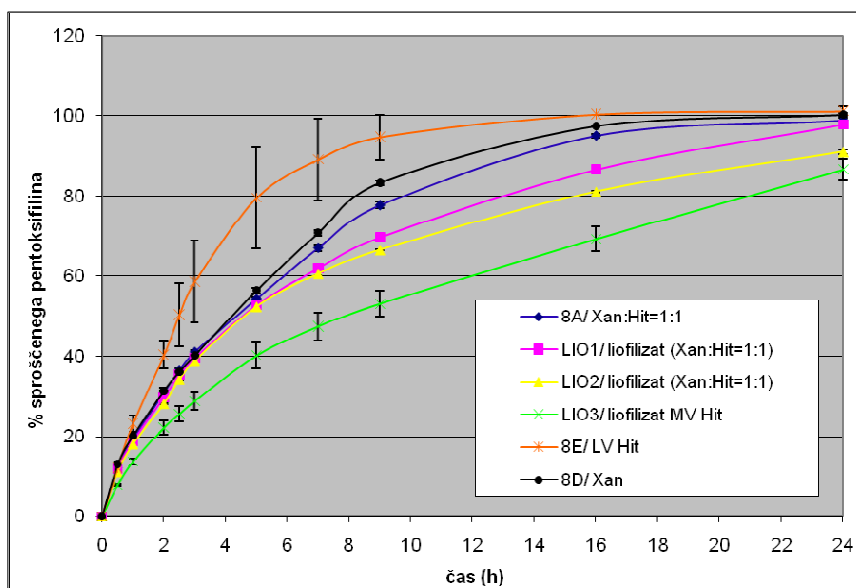
Profil sproščanja PF iz tablet, pripravljenih z direktnim stiskanjem prahov (8A), se v pufrih (Slika 45) ne razlikuje signifikantno od profilov sproščanja iz kompleksov LIO1 in LIO2 ( $f_2=64$ ). Da lahko rezultate med seboj primerjamo, potrjuje tudi dejstvo, da nekoliko bolj podaljšano sproščanje iz liofiliziranih serij ni posledica večje trdnosti teh tablet. Preskus trdnosti nam je namreč pokazal, da so tablete 8A (trdnost 104N) povsem primerljive s tabletami LIO1 (trdnost 99N) in LIO2 (trdnost 91N). Na podlagi omenjenih rezultatov lahko trdimo, da se predhodna priprava kompleksov ne odraža v bistveno drugačnih lastnostih sproščanja učinkovine iz ogrodnih tablet. Sproščanje se namreč ne upočasni bistveno v primerjavi s tabletami, stisnjenimi iz zmesi prahov. Dodaten argument proti predhodni kompleksaciji polimerov je tudi ta, da zahteva izvedbo v več korakih. Polimera je potrebno raztapljati, združiti, izolirati komplekse in jih liofilizirati, medtem ko je

direktno tabletiranje izhodnih prahov polimerov iz tehnološkega vidika zelo enostavno in ne zahteva nobene predpriprave, razen mešanja prahov z ZU. Menimo, da je iz industrijskega vidika priprava kompleksov prekomplikirana in preveč zamudna.



**Slika 45:** Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,D,E ter LIO1,2,3 v pufrih.

Če primerjamo med seboj profila sproščanja LIO3 (lifiliziran MV hitosan) in 8E (LV hitosan) s Slike 45, vidimo očitno razliko. MV hitosan podaljša sproščanje v pufrih do 24 ur, medtem ko se pri LV hitosanu 98 % ZU sprosti v 5-ih urah. Iz tega razloga profilov sproščanja iz tablet na osnovi kombinacije ksantana in MV hitosana ne moremo napovedati. Menimo, da bi bila sicer zamenjava LV hitosana z MV hitosanom smiselna, saj lahko pričakujemo, da bi se sproščanje še bistveno bolj podaljšalo. Ob tem je treba imeti v mislih cilj, kako dolgo želimo, da se podaljša sproščanje ZU. Ne smemo pa pozabiti na tehnološko oviro, saj je MV hitosan dobavljiv v obliki kosmičev, ki so zelo trdni in elektrostatični ter ne omogočajo enakomerne porazdelitve s praškastim ksantanom in ZU. Iz omenjenega razloga bi bila po vsej verjetnosti potrebna lifilizacija raztopin MV hitosana.



**Slika 46:** Primerjava profilov sproščanja PF iz tablet 8A,D,E ter LIO1,2,3 v pufrih z NaCl.

Če primerjamo sliki 45 in 46, vidimo, da je sproščanje v pufrih z NaCl (Slika 46) še nekoliko bolj upočasnjeno in da so razlike med direktno stisnjenimi prahovi (8A) ter ljofiliziranimi kompleksi (predvsem LIO2) večje ( $f_2 < 50$ ).

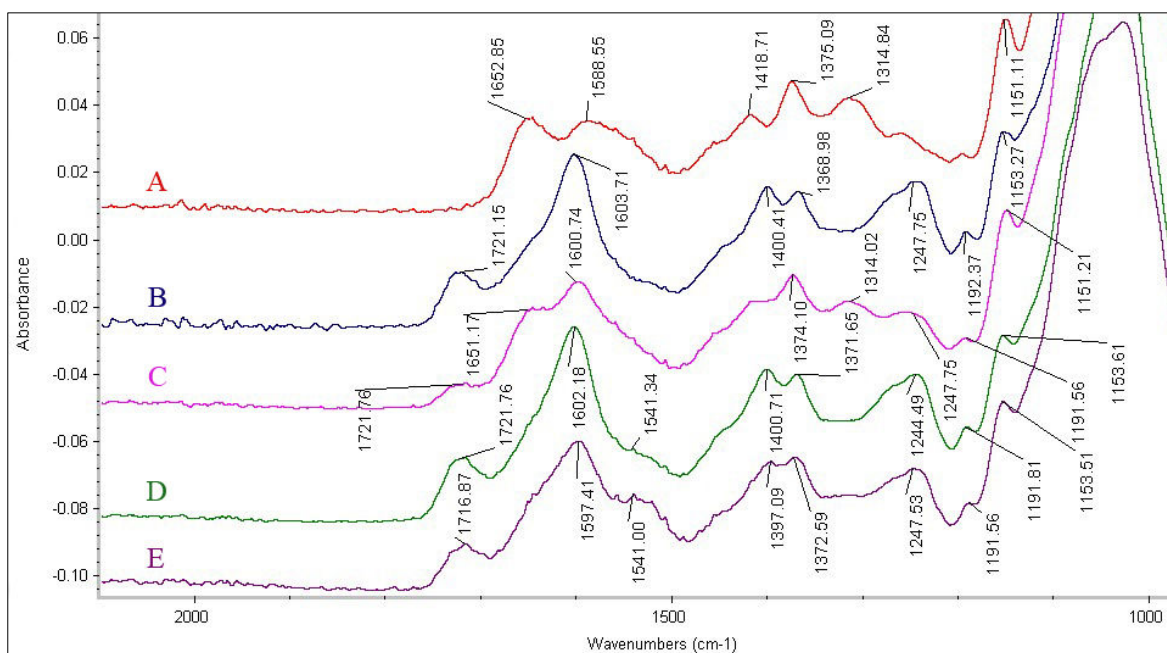
Glede na rezultate sproščanja v pufrih s povišano ionsko močjo lahko sklepamo, da je kompleksacija med ksantanom in hitosanom uspela, saj smo dobili signifikantno različne profile sproščanja v primerjavi s tabletami, stisnjenimi iz fizikalne zmesi polimerov. Da lahko nastanek kompleksov dokaj gotovo potrdimo, nam kažejo tudi rezultati opravljenih meritev z infrardečo absorpcijsko spektroskopijo (Slika 47).

IR spektre smo posneli s tehniko oslABLJENE popolne odbojnosti (ATR) za posamezna polimera ksantan in hitosan, njuno fizikalno zmes ter ljofilizirane komplekse LIO1 in LIO2. S tem smo želeli potrditi, da so v ljofilizatih LIO1 in 2 kompleksi med ksantanom in hitosanom dejansko nastali. Pogoji snemanja spektrov so opisani v poglavju 3.3.2.4.

Preko položaja absorpcijskih trakov v IR spektru lahko identificiramo posamezne funkcionalne skupine, saj so molekulska nihanja lokalizirana na funkcionalne skupine. Vsaka spojina ima svoj IR spekter in kakršnakoli interakcija med spojinami lahko spremeni nihanja vezi. To lahko opazimo kot premik določenih vrhov (absorpcijskih trakov) v spektru (46).

Pri tvorbi kompleksa med ksantanom in hitosanom bi lahko prišlo do interakcij med aminskimi skupinami hitosana ter karboksilnimi skupinami ksantana. Pričakujemo, da se

bodo signali, ki ustrezajo nihanju v teh dveh funkcionalnih skupinah, premaknili glede na položaj v spektrih posameznih polimerov.



**Slika 47:** ATR IR spektri: A - LV hitosan; B - ksantan; C – fizikalna zmes Xan:Hit = 1:1; D – LIO1 (lioofiliziran kompleks, pripravljen s paličnim mešalnikom); E – LIO2 (lioofiliziran kompleks, pripravljen z mešalnikom OMNI).

Iz IR spektrov (Slika 47) so razvidni karakteristični absorpcijski trakovi hitosana in ksantana. Spekter hitosana (Slika 47A) ima značilen signal N-C vezi pri  $1652\text{ cm}^{-1}$ , ki pripada amino skupini, pri  $1588\text{ cm}^{-1}$  pa vidimo signal, ki ustreza nihanju CO-NH vezi amidne skupine. V spektru ksantana (Slika 47B) vidimo pri  $1721\text{ cm}^{-1}$  signal, ki ustreza nihanju C=O vezi estrske skupine, signal pri okoli  $1600\text{ cm}^{-1}$  pa ustreza nihanju vezi v karboksilni skupini.

V primeru fizikalne zmesi ksantana in hitosana v razmerju 1:1 (Slika 47C) je vidna večina karakterističnih signalov posameznih polimerov, zato sklepamo, da med polimeroma ni prišlo do kompleksacije. Spremembe v spektrih so se pojavile pri liofiliziranih kompleksih (Slika 47D,E). Opazimo lahko, da ni več prisotnega signala pri  $1652\text{ cm}^{-1}$ , ki je pripadal amino skupini, poleg tega pa se pojavi še rama pri  $1541\text{ cm}^{-1}$ , ki je predvsem izrazita v primeru kompleksa LIO2 (Slika 47E). Omenjeni spremembi nakazujeta, da je po vsej verjetnosti prišlo med ksantanom in hitosanom do nastanka kompleksa. Signal pri  $1721\text{ cm}^{-1}$ , ki pripada nihanju vezi v estrski skupini pri ksantanu, se pojavlja tudi pri fizikalni

zmesi, kakor tudi pri kompleksih LIO1 in LIO2. To kaže na ugotovitev, da kompleksacija ne vpliva na estrsko skupino, prisotno v ksantanu (26, 31).

Na podlagi zgornjih ugotovitev lahko dokaj gotovo trdimo, da je bila kompleksacija med ksantanom in hitosanom v liofilizatih LIO1 in LIO2 uspešna, saj so se pojavile spremembe v absorpcijskih trakovih IR spektrov. Najbolj očitne spremembe v spektrih liofiliziranih kompleksov smo opazili pri kompleksih, pripravljenih z združevanjem raztopin polimerov s pomočjo mešalnika OMNI (LIO2). Iz tega razloga lahko trdimo, da je priprava kompleksov s pomočjo mešalnika OMNI boljša od priprave kompleksov s pomočjo paličnega mešalnika.

Ker je priprava kompleksov precej zapletena, menimo, da kljub signifikantnim razlikam med profiloma sproščanja ZU iz tablet 8A in LIO2 predhodna kompleksacija ksantana in LV hitosana ni smiselna. Če bi želeli sproščanje bolj podaljšati, bi glede na rezultate, ki smo jih dobili pri proučevanju sproščanja iz tablet na osnovi različnih vrst hitosana, morali namesto LV hitosana uporabiti MV hitosan. Potrebno pa bi bilo najti ustrezen in ekonomičen način priprave delcev MV hitosana, ki bi bili primerni za direktno tabletiranje. Menimo, da bi bilo na podlagi teh izhodišč smiselno nadaljevati z raziskovalnim delom in pripraviti tablete z direktnim stiskanjem prahov na osnovi kombinacij s ksantanom, nato pa ponoviti preskuse sproščanja v različnih medijih.

## 5. SKLEPI

V diplomski nalogi smo proučevali peroralne ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem, ki smo jih izdelali na osnovi različnih kombinacij ksantana in hitosana ter iz vsakega posameznega polimera. Kot modelno učinkovino smo vključili pentoksifilin. Preskuse sproščanja učinkovine iz tablet smo izvajali v različnih medijih in s pomočjo dveh različnih naprav za preskušanje sproščanja, ker smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv pH medija, prisotnosti ionov v mediju in različnih hidrodinamskih pogojev na sproščanje pentoksifilina iz tablet.

Če strnemo ugotovitve, do katerih smo prišli tekom raziskovalnega dela, lahko zaključimo, da je za ugotavljanje optimalne sestave tablet na osnovi ksantana in hitosana, ki bi bile čim bolj neodvisne od pH vrednosti medija in prisotnosti ionov, potrebno pri testiranju čimbolje posnemati fiziološke pogoje. V ta namen je dosti boljša izbira naprave z recipročnimi cilindri namesto naprave s košaricami. Glede medijev je odločilna izbira pufov namesto prečiščene vode. Kako hitro bo sproščanje iz tablet, pa nikakor ne moremo oceniti le iz videza tablet. Iz ogrodič tablet, ki so bila po koncu 24-urnega sproščanja še vedno dokaj čvrsta, se je namreč lahko učinkovina sprostila že v 5-ih urah.

Ugotovili smo, da LV hitosan pripomore k počasnejšemu sproščanju pri nizkih vrednostih pH, medtem ko je ksantan odgovoren za upočasnjeno sproščanje pri visokem pH-ju. Kombinacija obeh polimerov deluje sinergistično glede neodvisnosti sproščanja od vrednosti pH, kar je pomembna ugotovitev, saj se pH vrednost vzdolž GIT spreminja. Predhodna kompleksacija ksantana in LV hitosana ni v tolikšni meri povečala neodvisnosti sproščanja od pH-ja, da bi bila smiselna, zlasti ne v industrijskem merilu. Če bi želeli doseči še bolj podaljšano sproščanje PF, bi bilo glede na rezultate smiselno izvesti zamenjavo LV hitosana z MV hitosanom in ponovno pripraviti tablete z direktnim stiskanjem prahov.



## 6. LITERATURA

- (1) Formularium Slovenicum 2.0, Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 2.0, Ministrstvo za zdravje, Agencija republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, 2005; 77: 104-106.
- (2) European Pharmacopoeia 6th Edition, EDQM, Strasbourg, 2007: 266-279, 3233-3234, 1490-1491, 2635-2637.
- (3) Zapiski predavanj pri predmetu Biofarmacija s farmakokinetiko, prof. dr. Marija Bogataj.
- (4) Baumgartner S. Vpliv gibanja prebavnega trakta na potovanje farmacevtskih oblik in absorpcijo učinkovin. Farm Vestn 2003; 54: 573-581.
- (5) Aulton M.E. Aulton's Pharmaceutics, The design and manufacture of medicines, 3rd Ed, 2007: 488-493.
- (6) <http://www.wikipwdia.org/wiki/prebavila>
- (7) Kokate A, Marasanapalle VP, Jasti BR, Li X. Physiological and Biochemical Barriers to Drug Delivery. In: Li X, Jasti BR. Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. McGraw-Hill, 2006: 41-52.
- (8) Baumgartner S. Proučevanje ogrodne strukture tablet celuloznih etrov med procesom nabrekanja, Doktorsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2001.
- (9) Liu P, Ju T, Qiu Y. Diffusion-Controlled Drug Delivery Systems. In: Li X, Jasti BR. Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. McGraw-Hill, 2006: 107-137.
- (10) Wang Z, Shmeis RA. Dissolution Controlled Drug Delivery Systems. In: Li X, Jasti BR. Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. McGraw-Hill, 2006: 139-172.
- (11) Jamzad S, Tutunji L. Fassihi R: Analysis of macromolecular changes and drug release from hydrophilic matrix system. Int J Pharm, 2005; 292: 75-85.
- (12) Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behavior, mechanisms and optimal performance, PSTT 2000; 3: 189-204.
- (13) Dipasree SR, Bhagwan RD. Comperative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC and study of drug release from their matrices. Eur J Pharm Sci 2002; 16: 193-199.

- (14) Rozman B, Baumgartner S, Gašperlin M. Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemih. *Farm Vestn* 2005; 56: 110.
- (15) Katzbauer B. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability* 1998; 59: 81-84.
- (16) Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller P.J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 4th Ed., 2003: 132-135, 691-693.
- (17) Hamcerencu M, Popa M. New unsaturated derivatives of Xanthan gum: Synthesis and characterization. *J Polymer* 2007; 48: 1921-1929.
- (18) Talukdar MM, Kinget R. Swelling and drug release behavior of xanthan gum matrix tablets. *Int J Pharm* 1995; 120: 63-72.
- (19) Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* 2000; 18: 549-579.
- (20) Born K, Langerdorff V, Boulenguer P. Xanthan. In: *Polysaccharides I Polysaccharides from prokaryotes*. Ed. Vandemene EJ, De Baets S, Steinbuechel A. Weinheim: Wiley – VSH Verlag, 2002: 259-290.
- (21) Sovinc N. Prednosti sinergizma med ksantanom in semensko sluzjo rožičevca za izdelavo tablet s podaljšanim sproščanjem. *Diplomska naloga*, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.
- (22) Magnin D, Lefebvre J, Chornet E, Dumitriu S. Physicochemical and structural characterization of polyionic matrix of interest in biotechnology, in pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydr Poly* 2004; 55: 437-453.
- (23) Kerec KM. Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm Vestn* 2006; 57: 287-291.
- (24) Illum L. Review: Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharm Res* 1998; 15: 1326-1331.
- (25) Prashanth H, Tharanathan RN. Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends in Food Science & Technology* 2007; 18: 117-131.
- (26) Fukuda M, Peppas NA, McGinity JW. Properties of sustained release hot-melt extruded tablets containing chitosan and xanthan gum. *Int J Pharm* 2006; 310: 90-100.
- (27) Dimitriu S, Chornet E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Adv Drug Delivery Rev* 1998; 31: 223-246.

- (28) Takakashi M, Iijima M, Kimura K, Hatakeyama T, Hatakeyama H. Thermal and viscoelastic properties of xanthan gum / chitosan complexes in aqueous solutions. *J of Thermal Analysis and Calorimetry* 2006; 85: 669-674.
- (29) Dumitriu et al. Polyionic insoluble hydrogels comprising xanthan and chitosan. United States Patent, Patent Number 5,620,706, Date of Patent 15.4. 1997.
- (30) Martinez-Ruvalcaba A, Chornet E, Rodrigue D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan / xanthan hydrogels. *Carbohydr Poly* 2006; 67: 586-595.
- (31) Dumitriu S, Magny P, Montane D et al. Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: their properties as supports for enzyme immobilization. *J of Bioactive and Compatible Polymers* 1994; 9: 184-209.
- (32) The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 13th Ed., Merck & Co., Inc., New Jersey, 2001: 1280.
- (33) El-Gazayerly ON. Release of Pentoxifylline from Xanthan Gum Matrix Tablets. *Drug Dev Ind Pharm* 2003; 29(2): 241-246.
- (34) SmPC: TRENTAL 400 mg filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem, imetnik dovoljenja za promet – Aventis Pharma d.o.o., Jarška cesta 10a, Ljubljana, Slovenija, datum zadnje revizije besedila 26.04.2002 (vir: <http://www.zdravila.net>).
- (35) Navodilo za uporabo: Pentilin 400 mg filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem, Pentilin 600 mg filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem, imetnik dovoljenja za promet – Krka, tovarna zdravil d.d. Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 8501 Novo mesto, Slovenija, navodilo je bilo odobreno 7.12.2007 (vir: <http://www.zdravila.net>).
- (36) Pentoxifylline. MedMaster Patient Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, MedlinePlus Health Topics (vir: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/)).
- (37) Medved M. Priprava polimernih kompleksov med ksantanom in hitosanom, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2007.
- (38) Ahlin GP. Navodila za delo in čiščenje instrumenta Liofilizator BETA 1-8K, Fakulteta za Farmacijo, Katedra za farmacevtsko tehnologijo, šifra dokumenta: 1/2000, 8.7.2000.
- (39) [http://en.wikipedia.org/wiki/Freeze\\_drying](http://en.wikipedia.org/wiki/Freeze_drying)
- (40) Zapiski predavanj pri predmetu Farmacevtska tehnologija I, doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, 2004.
- (41) <http://www.freezedryinginfo.com/Process.html>

- (42) Grad, Škerl, Vitorovič. Veliki angleško-slovenski slovar, elektronska izdaja, verzija 1.0, DZS d.d. Založništvo literature, 1997.
- (43) <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/140198en.pdf>
- (44) P. Costa. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing, Int J Pharm 2001; 220: 77-83.
- (45) Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis, 6<sup>th</sup> Ed., Thomson Brooks/Cole, 2007; 469-472.
- (46) Kmetec V, Urleb U, Kikelj D et al. Vaje iz instrumentalne farmacevtske analize, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2003; 25-29.
- (47) Pavli M, Vrečer F, Baumgartner S. Interpolimerna kompleksacija, Farm Vestn 2008; 59: 121-127.
- (48) Hrovat P. Vpliv reoloških lastnosti gelske plasti na sproščanje pentoksifilina iz ogrodnih tablet iz ksantana in semenske sluzi rožičevca, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005.
- (49) Strahovnik N. Vrednotenje vpliva ionske moči in pH medija na sproščanje pentoksifilina iz tablet ksantana, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005.