

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



DORIS KUDER

**NAČRTOVANJE, IZDELAVA IN VREDNOTENJE TABLET
S CELEKOKSIBOM S PRIREJENIM SPROŠČANJEM**

**DESIGN, FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF
MODIFIED RELEASE CELECOXIB TABLETS**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner.

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Saši Baumgartner za mentorstvo in prijaznost, Andreju Dolencu in Mateju Pavliju za vso pomoč, svetovanje in vodenje, dr. Viljemu Pavliju za potrpežljivo svetovanje pri analizni metodi in Nuši Osterc za vztrajno vzorčenje.

Zahvaljujem se tudi staršem in Marku za potrpežljivost in podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner.

Doris Kuder

VSEBINA

VSEBINA	I
SEZNAM OKRAJŠAV	III
POVZETEK.....	IV
1. UVOD	1
1.1. CELEKOKSIB	1
1.1.1. Lastnosti celekoksiba	1
1.1.2. Mehanizem delovanja koksibov	2
1.1.3. Terapevtska uporaba celekoksiba	3
1.2. NANOSUSPENZIJE.....	4
1.2.1. Izdelava nanosuspenzij	4
1.2.2. Prednosti nanosuspenzij	6
1.2.3. Vrednotenje nanosuspenzij	8
1.3. PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PRIREJENIM SPROŠČANJEM	8
1.3.1. Slabo topne učinkovine v farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem	10
1.3.2. Hidrofilne ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem.....	11
1.3.2.1. Nabrekanje, sproščanje in erozija pri hidrofilnih ogrodnih tabletah	11
1.3.3. Polimeri za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem	12
1.3.3.1. Karagenani	12
1.3.3.2. Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)	14
1.4. PRESKUSI RAZTAPLJANJA	15
1.4.1. Pogoji v GIT.....	16
1.4.2. Preskusi sproščanja za slabo topne učinkovine	17
1.4.3. Test sproščanja z napravo BioDis.....	17
1.4.4. Test sproščanja v dvofaznem mediju.....	18
2. NAMEN DELA.....	20
3. EKSPERIMENTALNO DELO.....	21
3.1. MATERIALI	21
3.1.1. Učinkovina	21
3.1.2. Pomožne snovi za izdelavo nanosuspenzije celekoksiba	21
3.1.3. Pomožne snovi za izdelavo tablet.....	21
3.1.4. Reagenti za pripravo medijev za sproščanje.....	22
3.1.5. Reagenti za pripravo mobilne faze.....	22

3.1.6. Priprava medijev za sproščanje.....	23
3.1.7. Filtri.....	24
3.2. NAPRAVE.....	24
3.3. POSTOPKI IN METODE.....	25
3.3.1. Izdelava nanosuspenzije.....	25
3.3.2. Sušenje nanosuspenzije in vrednotenje.....	26
3.3.3. Izdelava tablet.....	26
3.3.4. Enakomernost mase tablet.....	27
3.3.5. Vsebnost učinkovine v tabletah.....	27
3.3.6. Trdnost tablet.....	28
3.3.7. Določanje nasičene topnosti.....	28
3.3.8. Filtriranje vzorcev.....	28
3.3.9. HPLC metoda.....	29
3.3.10. Izdelava umeritvenih premic za določanje koncentracije učinkovine.....	29
3.3.10.1. Umeritvena premica v pufrnih raztopinah.....	29
3.3.10.2. Umeritvena premica v oktanolnih raztopinah.....	30
3.3.11. Sproščanje učinkovine iz tablet.....	31
3.3.11.1. Test sproščanja z napravo BioDis.....	31
3.3.11.2. Test sproščanja v dvofaznem mediju.....	32
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1. IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANOSUSPENZIJ.....	34
4.2. NASIČENA TOPNOST MIKRONIZIRANEGA IN NANONIZIRANEGA CELEKOKSIBA.....	35
4.3. VPLIV FILTRIRANJA NA VZORCE S CELEKOKSIBOM.....	36
4.4. VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET.....	37
4.4.1. Enakomernost mase in vsebnosti.....	37
4.4.2. Trdnost tablet.....	39
4.5. SPROŠČANJE CELEKOKSIBA IZ OGRODNIH TABLET.....	40
4.5.1. BioDis.....	40
4.5.2. Sistem z dvofaznim medijem.....	44
4.5.2.1. Preliminaren poskus za ugotovitev ustreznosti sistema.....	44
4.5.2.2. Sproščanje iz tablet na osnovi HPMC/IOTA v razmerju 1:1.....	46
4.5.2.3. Primerjava sproščanja nanoniziranega/mikroniziranega celekoksiba iz ogrodnih tablet med napravo BioDis in modificirano napravo 2 z dvofaznim medijem.....	49
5. SKLEPI.....	52
6. LITERATURA.....	54

SEZNAM OKRAJŠAV

A.....	absorbanca
BCS.....	biofarmacevtski sistem klasifikacije zdravilnih učinkovin
c.....	koncentracija učinkovine v vzorcu
COX.....	ciklooksigenaza
ER.....	indeks elastične relaksacije
FO.....	farmacevtska oblika
HPMC.....	hidroksipropilmetilceluloza
IOTA.....	oznaka za iota karagenan pri podajanju sestave tablet
k.....	naklon umeritvene premice
M.....	mikroniziran celekoksib pri podajanju sestave tablet
N.....	nanoniziran celekoksib pri podajanju sestave tablet
NSAID.....	nesteroidna protivnetna zdravila
PG.....	prostaglandini
R ²	kvadrat Pearsonovega korelacijskega koeficienta
SDS.....	natrijev lavrilsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
T.....	temperatura
t _{1/2}	biološki razpolovni čas
VTH.....	visokotlačni homogenizator

POVZETEK

Celekoksib je selektivni zaviralec encima ciklooksigenaze-2, zato se uporablja kot protivnetna in protirevmatična učinkovina, v zadnjih letih pa ga uporabljajo tudi za zdravljenje družinske adenomatozne polipoze. Uvrščamo ga med učinkovine s slabo topnostjo in dobro permeabilnostjo (BCS 2 razred). Tehnološki izziv pri oblikovanju farmacevtskih oblik s temi učinkovinami je večinoma iskanje primerne načina za povečanje hitrosti raztapljanja ter posledično tudi biološke uporabnosti. Ena novejših in boljših možnosti za povečanje hitrosti raztapljanja in povečanje nasičene topnosti je zmanjšanje velikosti delcev z izdelavo nanosuspenzij učinkovine.

Celekoksib zaradi svoje slabe vodotopnosti že sam omogoča podaljšan čas raztapljanja, naš namen pa je bil z vgradnjo v hidrofilne ogrodne tablete s prirejenim sproščanjem narediti sproščanje še bolj predvidljivo in enakomerno po celotnem prebavnem traktu. Pogoj za to je bil, da celekoksibu predhodno povečamo hitrost raztapljanja oziroma topnost.

Tako smo z emulzijsko-difuzijsko metodo ter visokotlačno homogenizacijo izdelali nanosuspenzijo celekoksiba, ki smo jo s sušenjem z razprševanjem pretvorili v suhe nanodelce. Nanodelce učinkovine smo nato vgradili v tablete s prirejenim sproščanjem – hidrofilne ogrodne tablete. Za primerjavo smo izdelali enake tablete z neobdelano, mikronizirano, učinkovino. Kot tvorilce ogrodja hidrofilnih ogrodnih tablet smo uporabili karagenan iota, HPMC K4M ter kombinacijo obeh. Izdelane tablete smo ovrednotili v smislu enakomernosti mase, vsebnosti, trdnosti.

Za teste raztapljanja izdelanih tablet smo uporabili dva pristopa in sicer uporabo naprave 3 po Ph. Eu. 6th Ed. (BioDis) ter uporabo sistema z dvofaznim medijem, ki smo ga uporabili na napravah 1 in 2 po Ph. Eu. 6th Ed. ter modificirani napravi 2 (vesla s košaricami). S temi testi smo določili optimalno razmerje polimerov, ki je zagotavljalo, da se je 100 mg odmerek celekoksiba prirejeno sproščal 24 ur. Izkazalo se je, da je najustreznejša kombinacija iota karagenana in HPMC K4M v masnem razmerju 1:1. Ogrodne tablete le na osnovi karagenana so sproščanje celekoksiba zadrževale le 8 h, v primeru tablet na osnovi HPMC K4M pa se sproščanje tudi po 24 urah ni končalo.

V naslednji fazi smo ovrednotili vpliv velikosti delcev na hitrost sproščanja. Rezultati na napravi 3 so pokazali, da je bilo sproščanje v primeru nanoniziranega celekoksiba iz ogrodne tablete tudi do 20 % hitrejše kot v primeru mikroniziranega in je kontinuirano

potekalo do 24 ur. Nasprotno pa rezultati sproščanja z uporabo dvofaznega medija kažejo na majhne razlike v korist nanoniziranega celekoksiba. Ugotovili smo, da ima na rezultate pri dvofaznem mediju velik vpliv različna hidrodinamika mešanja, kot problem pa se je izkazala tudi slaba ponovljivost med vzorci.

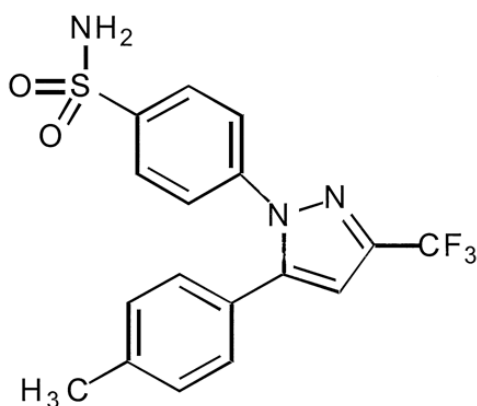
Zaključimo lahko, da nam je uspelo izdelati tablete s podaljšanim sproščanjem celekoksiba. Za določitev resnične prednosti nanodelcev, v smislu zvišanja biološke uporabnosti učinkovine, pa bi bilo dejansko potrebno izvesti *in-vivo* študije.

1. UVOD

1.1. Celekoksib

Celekoksib je na slovenskem tržišču trenutno dostopen pod zaščitenim imenom Celebrex[®] 100 mg in 200 mg trde kapsule ter pod imenom Onsenal[®] 200 mg in 400 mg trde kapsule. Celebrex[®] je uvrščen v farmakoterapevtsko skupino zdravil s protivnetnim in protirevmatičnim učinkom (M01A), Onsenal[®] pa med zdravila z delovanjem na novotvorbe (L01X) (1).

1.1.1. Lastnosti celekoksiba



Slika 1: Strukturna formula celekoksiba.

Celekoksib (slika 1) je derivat diaril substituiranega pirazola. V fizioloških pogojih je slabo topen ($pK_a \sim 11$) in dobro permeabilen ($\log P \sim 3,5$). Kot slabo vodotopno in dobro permeabilno učinkovino ga zato uvrščamo v drugi razred po BCS (US Biopharmaceutics Classification System). Po znanih podatkih je zelo stabilen, neobčutljiv na kislo, bazično okolje, oksidativni stres, UV in vidno svetlobo (2, 3).

Celekoksib se dobro absorbira in doseže najvišjo koncentracijo v plazmi po približno 2-3 urah. Absorbira se skozi celoten prebavni trakt (4). Po absorpciji se v 97 % veže na plazemske proteine, večinoma albumine in ima razpolovno dobo 10 do 12 ur. Pri dajanju raztopine se absorbira 64-88 % celekoksiba, medtem ko je absorpcija iz trdnih kapsul le

22-40 % (5). Jemanje s hrano (masten obrok) sicer upočasni prebavo za približno 1 uro, poveča pa se biološka uporabnost, AUC za 7-11 %, c_{\max} pa za 39-62 % (2).

Volumen distribucije je 2-3 l/kg, kar kaže na velik privzem v tkiva. Največ se ga najdemo v prebavnem traku, visoke koncentracije pa so izmerili tudi v jetrih, eritrocitih, nadledvični žlezi, solznicah in kostnem mozgu. Prehaja tudi hematoencefalno bariero, placento in se izloča v mleko (2).

1.1.2. Mehanizem delovanja koksibov

Pri vnetnem procesu v tkivu potekajo različne zapletene in medsebojno povezane biokemične reakcije, v katerih sodelujejo različne celice, encimi in mediatorji. Eni izmed encimov so ciklooksigenaze (COX), ki iz arahidonske kisline, ki se nahaja v celični membrani, v kaskadni reakciji povzročijo nastanek prostaglandinov (PG) (7). Ugotovili so, da obstajajo najmanj tri oblike tega encima: COX-1, COX-2 in COX-3. COX-1 je konstitutivni encim, ki je potreben za normalno fiziološko delovanje nekaterih tkiv in organov: želodca, črevesja, ledvic in trombocitov. COX-2 je inducibilni encim, ki ga v normalnih pogojih redko najdemo v tkivih, v manjših količinah je prisoten v možganih, ledvicah, prostati in maternici. COX-2 so tesno povezani tudi s tumorogenezo (7, 8, 9). Zvečana aktivnost COX-2 na vnetnih mestih poveča nastanek PG E2, ki:

- aktivira angiogenezo (poveča se izločanje določenih rastnih faktorjev)
- aktivira antiapoptozo (poveča se aktivnost bcl-2 in Akt gena)
- pospešuje rast tumorja (z aktivacijo nekaterih metaloproteinaz)
- zmanjša imunoprepoznavnost (zmanjša se izločanje citokinov in naravnih celic ubijalk) (10, 11).

COX-3 se pojavlja pretežno v centralnem živčnem sistemu, vendar njegova vloga še ni povsem znana (8).

Pri vnetju se koncentracija COX-1 poveča za 2- do 4-krat, medtem ko se koncentracija COX-2 poveča 10- do 20-krat. Iz navedenega sledi, da je pri vnetnih procesih smiselno selektivno inhibirati le COX-2 izoencim, saj se s tem izognemo največji skupini stranskih učinkov neselektivnih COX inhibitorjev: neželenim učinkom na prebavilih; perforacijam, ulkusom in krvavitvam (2, 6, 7).

1.1.3. Terapevtska uporaba celekoksiba

Koksibi, vključno s celekoksibom, se že dlje časa uporabljajo pri zdravljenju revmatoidnega artritisa, osteoartritisa in pooperativne bolečine. V zadnjih letih pa so se na podlagi odkrivanja novih mehanizmov in pozitivnih kliničnih raziskav začeli uporabljati tudi v onkologiji (7).

Do ideje o preprečevanju nekaterih oblik raka s koksibi so prišli na podlagi dognanj, da pri številnih celicah in živalskih modelih indukcija encima COX-2 in s tem nastajanja PG, predvsem PG E2, pospešuje celično rast, zavira apoptozo in poveča potovanje celic ter njihovo adhezijo. To naj bi bila po raziskavah ena ključnih faz pri srednje in dobro diferenciranih rakavih obolenjih, med katere spadajo rak debelega črevesa, prostate, pljuč in dojke ter pri jetrnih zasevkih (7).

Celekoksib uporabljajo tudi za zdravljenje genetske bolezni familiarne adenomatozne polipoze (FAP) (7, 9). Pri tej bolezni se lahko razvije v GIT več kot 1000 polipov, ki predstavljajo največji rizični dejavnik za nastanek raka na debelem črevesju. Pri nezdravljenih bolnikih se do starosti 40-50 let že skoraj v vseh primerih razvije rak. Ugotovili so, da se ob kirurški odstranitvi polipov in terapiji s celekoksibom po šestih mesecih z odmerkom 400 mg število polipov zmanjša za 28 % ter povprečna velikost polipa za 4,9 %. Pri odmerku 100 mg se v šestih mesecih število polipov zmanjša za 11,9 % in povprečna velikost polipa za 3 % (2).

Nadaljnje raziskovanje odpira tudi možnosti za uporabo celekoksiba pri zdravljenju raka na želodcu, požiralniku, debelem črevesju, jeziku, možganih, pljučih, trebušni slinavki, prsih in prostati. Ugotovili so namreč, da celekoksib ne deluje izključno po poti selektivne inhibicije COX-2, pač pa tudi po drugih, zaenkrat še neznanih mehanizmih (7, 10, 18), saj ostali COX-2 inhibitorji (npr. rofekoksib) ne kažejo primerljivih učinkov s celekoksibom (12).

1.2. Nanosuspenzije

Velik del novih učinkovin je slabo vodotopnih in posledično slabo biološko razpoložljivih, zato se njihov nadaljnji razvoj tu ustavi. Niti tradicionalne metode, kot so mikronizacija, uporaba sotopil, pospeševalci absorpcije niti novejša, kot so izdelava liposomov, emulzij, mikroemulzij, trdnih disperzij, kompleksov s ciklodekstrini, niso pripeljale do univerzalne rešitve za povečanje topnosti in s tem posledično biološke uporabnosti učinkovin. Korak naprej je bil storjen z odkritjem nanosuspenzij (13).

Nanos je grška beseda za palčka, izpeljanka nano pa predstavlja velikostni red 10^{-9} . Med nanodelce se v farmacevtski stroki štejejo delci z velikostjo pod $1\mu\text{m}$, težimo k velikostim pod 100 nm (14). Iz tega sledi definicija nanosuspenzije kot koloidne disperzije učinkovine nanometrskih velikosti, ki nastane z ustrežno metodo in je stabilizirana z ustreznim stabilizatorjem (13). Postopek zmanjševanja delcev na nanometrsko velikost lahko imenujemo tudi nanoniziranje in produkt nanonizirana učinkovina (po analogiji mikronizacija/mikronizirana učinkovina).

1.2.1. Izdelava nanosuspenzij

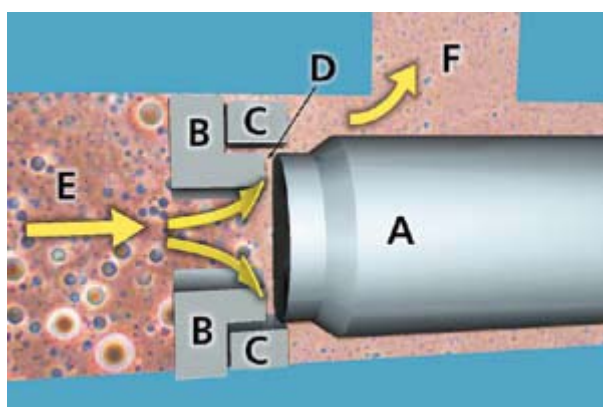
Pristop za pripravo nanosuspenzij v splošnem temelji na dveh izhodiščih: od spodaj navzgor (Bottom up, npr. nanoprecipitacija), ali od zgoraj navzdol (Top down, npr. moko mletje in visokotlačna homogenizacija). Druge možnosti vključujejo pripravo nanosuspenzij iz emulzij, mikroemulzij itd.

V nadaljevanju je podrobneje predstavljena emulzijsko - difuzijska metoda z uporabo visokotlačne homogenizacije (VTH). Pri tej metodi, ki je neke vrsta precipitacijska metoda, učinkovino raztopimo v organskem topilu, stabilizator pa v vodi. Organsko topilo (npr. etilacetat, aceton, butillaktat) se mora z vodo delno mešati. Raztopino učinkovine v organski fazi nato združimo z vodno fazo, ki vsebuje raztopljen stabilizator. Delež organske faze mora presegati njeno topnost v vodi, tako da na tej stopnji nastane emulzija topila (org. faza) v netopilu (vodi). Emulzijo nato homogeniziramo z rotor-stator homogenizatorjem ter visokotlačnim homogenizatorjem, da dosežemo čim manjšo velikost kapljic notranje faze. Ob dodatku še večje količine netopila (vode), povzročimo difuzijo notranje faze (org. faze) v vodno fazo. S tem se učinkovina izobori v obliki nanokristalov,

stabiliziranih z uporabljenimi stabilizatorji. Izbira topila in stabilizatorja sta ključna za uspešno izdelavo nanosuspenzije.

Stabilizatorji se vežejo na površino delcev in tako zagotovijo delcem sterično ali/in elektrostatsko bariero. Vrsta in količina stabilizatorja pomembno vplivata na fizikalno stabilnost ter *in-vivo* obnašanje nanosuspenzij. Fizikalno stabilnost lahko dosežemo z uporabo zmesi stabilizatorjev in/ali različnih razmerij med učinkovino in stabilizatorjem (med 1:20 in 20:1). Slednje je potrebno določiti za vsak primer posebej. Najpogosteje uporabljeni stabilizatorji so celulozni derivati, poloksameri, polisorbati, lecitini, povidoni ipd.

VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA



- A - ventil
- B - stator
- C - udarna plošča
- D - reža
- E - neobdelana disperzija
- F - produkt homogenizacije

Slika 2: Shematski prikaz visokotlačnega homogenizatorja (15).

Neobdelano disperzijo-emulzijo (E) potiskamo iz področja z velikim premerom pod visokim pritiskom skozi režo (D) - odprtino z zelo majhnim premerom (slika 2). S spreminjanjem položaja ventila (A) glede na stator (B) spreminjamo tlak, s katerim disperzijo potisnemo skozi režo in mimo udarne plošče (C). Zaradi hitrega zmanjšanja velikosti reže, se hitrost toka disperzije močno poveča in doseže tudi do 1000 km/h. V skladu z Bernulijevo enačbo se dinamični tlak poveča in statični zmanjša. Slednji se zniža pod tlak vrelišča vode pri sobni temperaturi, zato začne voda v reži vreti. Nastajajo mehurčki vodne pare, ki implodirajo, ko disperzija zapusti režo in pride v območje normalnega zračnega tlaka. Ta pojav imenujemo kavitacija. Sila kavitacije je dovolj velika, da zdrobi mikrodolge v nanodelce. Dodaten drobilni učinek nastopi zaradi visoke strižne napetosti v reži in zaradi trkov delcev (2, 15).

Na postopek homogenizacije lahko vplivamo z različnimi nastavitvami:

- izbran tlak; med tlakom in velikostjo delcev velja obratnosorazmernost;
- število homogenizacijskih ciklov; običajno ni dovolj samo en;
- modifikacija homogenizatorja; homogenizator ima lahko še en zaporedno postavljen ventil, ki ne vpliva na samo zmanjšanje velikosti delcev, omogoči pa bolj ozko porazdelitev velikosti delcev in prepreči združevanje novo nastalih kapljic. Ugotovljeno je, da je njegova učinkovitost največja, če je nastavljen na 10 % vrednosti tlaka glavnega ventila (15).

V nekaterih primerih je potrebno optimizirati tudi temperaturo, npr. glede na stabilnost učinkovine, viskoznost disperzije ipd (13, 15, 16).

Če želimo delce nanosuspenzije vključiti v trdno farmacevtsko obliko, moramo odstraniti disperzni medij. To je možno npr. s sušenjem iz zamrznjenega stanja (liofilizacijo), sušenjem z razprševanjem, peletiziranjem ali granuliranjem.

Ti suhi praški se nato lahko uporabljajo kot hitro redispergirajoči enodmerni liofilizati, lahko pa jih polnimo tudi v kapsule ali stiskamo v tablete.

1.2.2. Prednosti nanosuspenzij

Prednosti nanosuspenzij so:

- poveča se hitrost raztapljanja in nasičena topnost učinkovine. Hitrost raztapljanja opisuje Noyes Whitney –jev model (13):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(D \times A)}{h \times V} \times (C_s - C) \quad \text{/enačba 1/}$$

dm/dt.. hitrost raztapljanja [g/l/s]

D..... difuzijski koeficient [m²/s]

A..... površina delca [m²]

h..... difuzijska razdalja [m]

C_s..... nasičena topnost učinkovine [g/l]

C..... koncentracija učinkovine v mediju [g/l]

V volumen medija [m^3]

Iz modela je razvidno, da s povečanjem površine učinkovine povečamo hitrost raztapljanja.

Nasičena topnost se poveča v skladu z Ostwald – Freundlichovo enačbo (13, 17):

$$\log\left(\frac{C_s}{C_\infty}\right) = \frac{2\sigma V}{2.303RT\rho r} \quad \text{/enačba 2/}$$

C_s nasičena topnost (mol/l)

C_∞ topnost velikih delcev (mol/l)

σ površinska energija snovi (mJ/m^2)

V molarna prostornina snovi (m^3/mol)

Rplinska konstanta ($mJ/mol K$)

T absolutna temperatura (K)

ρgostota snovi (kg/l)

r polmer delcev (m).

Nasičena topnost se poveča zaradi zvišanja površinske energije snovi kot posledica zmanjšanja velikosti delcev;

- izboljša se biološka uporabnost;
- scale-up in industrijska proizvodnja nista zahtevni za nanosuspenzije izdelane z metodo mletja;
- dolgoročna fizikalna stabilnost zaradi odsotnosti Ostwaldove rasti, kadar imamo zelo ozko porazdelitev velikosti delcev. Ostwaldova rast je značilna za finodisperzne sisteme vendar široke distribucije velikosti in vodi v rast kristalov ter posledično nastajanje mikrodelcev. Okoli malih delcev v sistemu nastane področje z višjo nasičeno topnostjo kot okoli velikih, molekule posledično difundirajo od višjih koncentracij proti nižjim – proti velikim delcem. V okolici velikih delcev se preseže nasičena topnost, presežek kristalizira, veliki delci rastejo. Difuzija stran od majhnih delcev vodi v zmanjšanje nasičenosti okoli teh delcev, ki se posledično začno raztapljati, dokler povsem ne izginejo. Odsotnost Ostwaldove rasti pri nanosuspenzijah je posledica njihove bolj enakomerne porazdelitve velikosti delcev (5, 13).

- raznovrstnost uporabe: zaradi njihovih značilnosti so primerne za vgraditev v različne farmacevtske oblike: tablete, pelete, svečke, hidrogel in za različne načine aplikacije.
- možnost modifikacije površine učinkovine za doseg receptorsko specifične dostave (13).

1.2.3. Vrednotenje nanosuspenzij

Nanosuspenzije vrednotimo z naslednjimi parametri:

- povprečna velikost delcev in porazdelitev velikosti delcev: pomembni sta zaradi vpliva na nasičeno topnost, hitrost raztapljanja in biološko uporabnost. Določita se lahko z uporabo fotonske korelacijske spektroskopije, metodami laserske difrakcije, elektronskim števcem, elektronsko mikroskopijo ali/in mikroskopijo na atomsko silo;
- nasičena topnost in hitrost raztapljanja: najbolj vplivata na *in-vivo* delovanje; plazemske profile in koncentracije ter biološko uporabnost;
- kristalinično stanje in morfologija delcev: lahko ju določimo z rentgensko praškovno difrakcijo (XRD) in/ali diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC);
- naboj delcev: običajno ga določamo z zeta potencialom (13, 16).

1.3. PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PRIREJENIM SPROŠČANJEM

Peroralno odmerjanje zdravil je najpogostejše tako za konvencionalne farmacevtske oblike kot tudi za nove dostavne sisteme, predvsem zaradi večje sprejemljivosti za pacienta in enostavnega odmerjanja. Jemanje zdravil skozi usta je namreč enako naravni poti za vnos hrane.

Poleg tega, da je zdravilo kakovostno, učinkovito in varno, je pomembno tudi, da je bolniku prijazno. To lahko dosežemo z oblikovanjem farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem. S tem zmanjšamo pogostost odmerjanja (manj je nočnih odmerjanj), povečamo lahko učinkovitost zdravilne učinkovine z zadrževanjem oblike na mestu

delovanja, zmanjšamo odmerke in hkrati vzdržujemo optimalne koncentracije učinkovine v plazmi ter tako zmanjšamo možne neželene učinke (manjše nihanje koncentracije učinkovine v plazmi), povečamo complianco in tako skrajšamo čas oskrbe pacienta itd. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem lahko razdelimo na:

- farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem (sustained-release dosage forms), ki sproščajo zdravilno učinkovino skozi daljše časovno obdobje;
- farmacevtske oblike z zakasnelim sproščanjem (delayed-release dosage forms), ki imajo časovno zamaknjeno nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine;
- farmacevtske oblike s pulzirajočim sproščanjem (pulsative-release dosage forms), ki sproščajo zdravilno učinkovino v določenih časovnih intervalih (19).

Na delovanje takih sistemov vplivajo **biološki** in **fizikalno-kemijski dejavniki**. Prvi so odvisni od stanja organizma, razlike so lahko večje ali manjše med predstavniki iste vrste in so posledica patološkega izvora ali variabilnosti znotraj vrste. Mednje uvrščamo biološki razpolovni čas, absorpcijo, distribucijo in metabolizem.

Za fizikalno-kemijske dejavnike velja, da so različni tako za različne učinkovine kot za različne načine odmerjanja in jih lahko razdelimo glede na velikost odmerka, ionizacijo učinkovine, pKa, topnost, porazdelitveni koeficient in stabilnost. Zato lahko predpostavimo, da je v FO s prirejenim sproščanjem **načeloma** smiselno vgraditi učinkovine:

- s primernim razpolovnim časom ($2 \text{ uri} < t_{1/2} < 8 \text{ ur}$), saj tako zmanjšamo pogostost jemanja zdravil;
- s hitrostjo absorpcije, ki je večja od hitrost sproščanja iz FO. Slednje lahko dosežemo tudi z izborom ustreznih pomožnih snovi, kot so na primer pomožne snovi, ki hkrati omogočajo bioadhezijo in so selektivni pospeševalci absorpcije;
- ki se ne metabolizirajo v svetlini prebavnega trakta ali v črevesnem tkivu, kar lahko preprečimo tudi s sočasno vgradnjo zaviralcev teh encimov v FO;
- z velikostjo odmerka največ do 1 g;
- s spodnjo mejo topnosti 0,1 mg/ml, saj sicer sama topnost učinkovine nadzira sproščanje;
- s poznanim porazdelitvenim koeficientom (visok porazdelitveni koeficient nam pove, da je učinkovina dobro topna v lipidih in slabo v vodi ter da dobro prehaja biološke membrane in se dlje časa zadržuje v telesu, ker se kopiči v lipidnih membranah celic) (19).

Zavedati pa se moramo tudi nekaterih slabosti pri izdelavi farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem. Pri odmerjanju se lahko sprosti celoten odmerek naenkrat, pri počasni absorpciji se lahko pojavi zakasnen učinek, poveča se možnost večjega obsega predsistemskega metabolizma, sproščanja učinkovine ne moremo neomejeno podaljšati, saj je čas sproščanja učinkovine omejen s časom zadrževanja farmacevtske oblike na mestu absorpcije, zmanjšana pa je tudi možnost individualnega odmerjanja (19).

1.3.1. Slabo topne učinkovine v farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem

V farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem lahko od slabo topnih učinkovin vgrajujemo le tiste, ki po BCS klasifikaciji sodijo v II skupino (dobra permeabilnost), nikakor pa ne tistih, ki sodijo v IV skupino (slaba permeabilnost).

Kot smo že omenili, je pri slabo topnih učinkovinah potrebno upoštevati, da že same po sebi do neke mere omogočajo prirejeno sproščanje, ki je kontrolirano s hitrostjo raztapljanja. Njihova vgraditev v sisteme s podaljšanim sproščanjem je kljub temu smiselna, saj lahko z njo dosežemo:

- prirejeno sproščanje vedno na enak način
- višjo biološko uporabnost in višjo plazemsko koncentracijo z enakim odmerkom
- manjši vpliv hrane
- manjšo variabilnost med pacienti
- večjo complianco zaradi manj pogostega odmerjanja, pa tudi zaradi zmanjšanja števila stranskih učinkov.

Pri teh učinkovinah so izziv že sami testi raztapljanja, še težje namreč zagotovimo biološkim ustrezne pogoje, posledično so povezave z *in-vivo* obnašanjem FO lahko slabe (17, 20).

1.3.2. Hidrofilne ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem

Eno najpogostejših vrst tablet s podaljšanim sproščanjem predstavljajo hidrofilne ogrodne tablete. Po eni izmed definicij lahko ogrodni sistem definiramo kot sistem za dostavo učinkovine, v katerem je učinkovina dispergirana v polimerni mreži (22, 23).

Sproščanje učinkovine iz hidrofilne tablete je zapleten proces in največkrat ne gre le za en mehanizem, temveč za kombinacijo različnih. Na osnovi različnih mehanizmov, ki nadzirajo sproščanje, ločimo naslednje sisteme:

- **Difuzijsko nadzorovani sistemi**, kjer je sproščanje učinkovine odvisno od difuzije skozi inertno bariero;
- **Erozijsko nadzorovani sistemi**, kjer je sproščanje učinkovine odvisno od erozije polimernega ogrodja;
- **Kombinirani difuzijsko-erozijski**, kjer sproščanje učinkovine nadzorujeta oba mehanizma (21).

1.3.2.1. Nabrekanje, sproščanje in erozija pri hidrofilnih ogrodnih tabletah

V hidrofilnih ogrodnih tabletah je zdravilna učinkovina dispergirana v stisnjenem ogrodju hidrofilnega polimera, ki v se v vodi hidratira in nabreka. V stiku s tekočino se okoli suhega jedra tvori viskozna gelska plast, ki je posledica medsebojnih kemijskih in/ali fizikalnih povezav med polimernimi verigami in polimernimi verigami z vodo.

Hitrost in obseg nastanka gelske plasti vplivata na sproščanje učinkovine iz ogrodne tablete. Z višjo viskoznostjo gelske plasti je difuzija učinkovine skozi njo manjša, vendar pa je prav tako pomembno, kako hitro se ustrezna viskoznost lahko vzpostavi. Zato se lahko del učinkovine raztopi in difundira iz tablete še pred pojavom ustrezno viskozne gelske plasti.

Ko se viskozna gelska plast na površini tablete vzpostavi in so polimeri v le-tej dovolj hidratirani, prihaja do erozije tablete.

Erozija je proces odplavljanja polimernih verig s površine tablete; gre za razpletanje polimernih verig na površini ogrodne tablete, ko je polimerno ogrodje v celoti hidratirano

in relaksirano. V procesu erozije prevladujejo adhezijske sile med polimerom in vodo, ki olajšajo razpletanje in odcepljanje polimernih verig. Ponavadi tudi velja, da višja kot je viskoznost nastale gelske plasti, počasneje se polimer raztaplja in počasneje erodira.

Difuzija ZU skozi nastalo bariero in erozija zunanega dela tablete skupno vplivata na sproščanje ZU iz hidrofilnega ogrodja, vendar lahko en proces prevlada nad drugim, odvisno od lastnosti izbranega polimera in vgrajene učinkovine (22).

Na sproščanje učinkovin iz hidrofilnih ogrodnih tablet tako vpliva več procesov:

- močenje polimernega ogrodja s topilom
- nabrekanje polimera
- raztapljanje učinkovine v mediju
- difuzija učinkovine skozi hidratiran polimer
- erozija/raztapljanje polimera (4, 19, 21).

1.3.3. Polimeri za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem

Za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem je na voljo veliko polimerov: npr. polietilenoksidi velikih molekulskih mas, karboksimetilceluloza, hidroksipropilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) in drugi celulozni etri, hitosan, karagenani, alginati, ksantan gumi,... (21). V diplomski nalogi smo uporabili dva sistema, in sicer karagenan in HPMC.

1.3.3.1. Karagenani

Karagenani so hidrofilni, visokomolekularni, linearni heteropolisaharidi, ki jih ekstrahirajo iz rdečih morskih alg Rhodophyceae, posebno iz vrst Chondrus, Eucheuma in Gigartina. Za zagotavljanje kakovosti gojijo alge v nadzorovanih pogojih, zato je zagotovljena tudi homogenost naravnega materiala. Poznamo različne vrste karagenanov, v farmaciji pa se uporabljajo tri: kappa, lambda in iota.

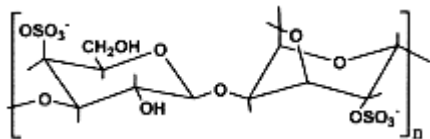
Karagenani se že dolgo uporabljajo v prehrabeni in kozmetični industriji kot zgoščevala, sredstva za geliranje in povečanje stabilnosti, kjer jih v izdelkih najdemo pod oznako

E407. Prav zaradi teh lastnosti in dokazane varnosti so jih začeli uporabljati tudi v farmacevtski industriji predvsem za doseganje podaljšanega sproščanja učinkovin. Drugače lahko rečemo, da je danes uporaba karagenanov v farmaciji zelo široka, in sicer v neparaneralnih farmacevtskih oblikah kot so suspenzije, dermalni geli, kapljice za oči, svečke ter tablete in kapsule (19, 21, 24).

Karagenani so sestavljeni iz kalijevih, natrijevih, kalcijevih, magnezijevih in amonijevih sulfatnih estrov galaktoze in 3,6-anhidrogalaktoze. Sladkorne enote so med seboj povezane z menjajočimi se 1,3- α in 1,4- β glikozidnimi vezmi. Posamezni karagenani se med seboj razlikujejo po številu in poziciji esterskih sulfatnih skupin, kar vpliva na njihove splošne lastnosti (19, 21, 24).

IOTA KARAGENAN

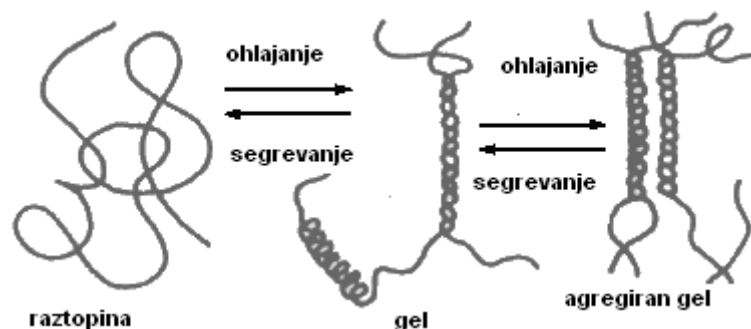
Iota (ι)-karagenan (slika 3) je kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze-2-sulfata, ki sta povezana z 1,3- α in 1,4- β vezmi. V vodi se ne raztaplja, temveč tvori gel. Pridobivamo ga iz *Eucheuma spinosum* ali *E. denticulatum*.



Slika 3: Primarna struktura ι -karagenana (24).

Prikazana struktura ponavljajočih se enot je idealizirana, saj so v praksi lahko prisotne tudi druge regije zaradi naravnega izvora karagenanov.

Če so izpolnjeni ustrezni pogoji, je za ι -karagenan v vodnih raztopinah značilen termoreverzibilen prehod »sol-gel« (slika 4).

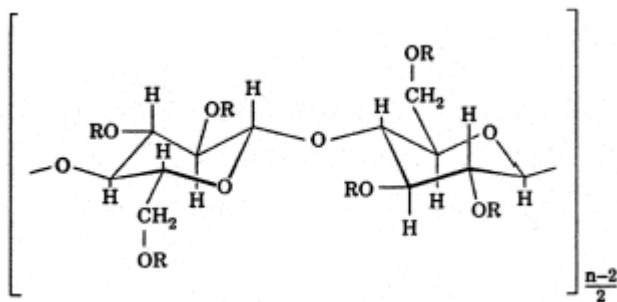


Slika 4: Mehanizem tvorbe gela pri karagenanih (24).

Obseg medsebojne povezave dvojnih vijačnic je pri ι -karagenanu manj izrazit, saj ima veliko sulfatnih skupin, zato je elektrostatski odboj med verigami velik. Nastali gel je v prisotnosti enovalentnih ionov šibek, ob dvovalentnih pa transparenten in rigiden.

1.3.3.2. Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)

HPMC je najpomembnejši hidrofilni polimer, ki se uporablja za pripravo tablet s podaljšanim sproščanjem. Kemijsko je HPMC delno O-metilirana in O-(2-hidroksipropilirana) celuloza (Slika 5). Na tržišču je prisotnih več vrst HPMC, ki se med sabo razlikujejo po viskoznosti in stopnji substitucije (DS). Fizikalno- kemijske lastnosti polimera so odvisne od vsebnosti metoksilnih in hidroksipropoksilnih skupin ter od molekulske mase polimera. USP razlikuje štiri različne vrste HPMC, ki jih razvršča glede na povprečno vsebnost obeh prisotnih skupin in jih označuje s štirimi številkami (npr. 1828). Prvi dve številki povesta, kakšna je povprečna vsebnost metoksilnih skupin v odstotkih, zadnji dve številki pa označujeta povprečno vsebnost hidroksipropoksilnih skupin, ki jih določijo po dveh urah sušenja na 105 °C. Razlikujemo jih tudi glede na viskoznost 2 % vodne raztopine polimera, pri 20 °C in glede na molsko maso, ki se giblje nekako med 10.000 in 1.500.000 g/mol (19, 21).



Slika 5: Strukturna formula HPMC; R je lahko H, CH₃ ali CH₃CH(OH)CH₂ (24).

HPMC je neionski polimer, zato je nabrekanje relativno neodvisno od pH vrednosti medija. HPMC visoke viskoznosti oz. z višjo molekulsko maso (npr. K4M, K15M) bolj nabreka, ker ima večjo zmožnost privzema vode kot tisti z nižjo viskoznostjo (npr. K100LV), ki hitreje erodira in omogoča hitrejše sproščanje učinkovine. Kadar imamo visoko vsebnost polimera v ogrodnih tabletah, to omogoča večji obseg nabrekanja in posledično zmanjša sproščanje učinkovine.

1.4. PRESKUSI RAZTAPLJANJA

Preskus raztapljanja, s katerim vrednotimo sproščanje učinkovine, je eden od pomembnih korakov pri razvoju farmacevtskih oblik. Služi nam za:

- napovedovanje vpliva same sestave tablete in procesnih spremenljivk na sproščanje učinkovin iz FO v fazi razvoja
- iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo na *in-vivo* obnašanje FO
- hkrati pa nam predstavlja analizno metodo za medprocesno ali končno kontrolo ustreznosti FO s specifikacijami (23).

Ker v preskusu opisujemo prehajanje učinkovine iz FO, ga imenujemo tudi preskus sproščanja. V razvojni fazi si želimo predvsem doseči takšne pogoje, da bo dobljen profil sproščanja učinkovine čim bolj napovedoval *in-vivo* obnašanje, zato pri preučevanju peroralnih oblik simuliramo tiste pogoje v GIT, ki so najbolj pomembni za sproščanje. V ta namen uporabljamo naprave predpisane z Evropsko in Ameriško farmakopejo. Najpogosteje uporabljamo napravo 1 (s košaricami), napravo 2 (z vesli), napravo 3 (z recipročnimi cilindri - BioDis) ali napravo 4 (pretočne celice).

1.4.1. Pogoji v GIT

Pri peroralnem zaužitju tableta v nekaj sekundah prispe v želodec. Ta deluje kot zbiralnik, ki vse zaužito (vključno s FO) kemijsko in mehansko predela. Celice želodčne sluznice izločajo HCl, kar v praznem želodcu ustvari pH med 1 in 3, ob prisotnosti hrane pa je pH med 5 in 6. V želodcu je tudi encim pepsin in površinsko aktivne snovi. Čas zadrževanja FO oblike v želodcu je dokaj variabilen, in traja od 30 minut do 5 ur v odvisnosti od posameznika, trenutne faze migracijskega motoričnega kompleksa želodca, količine in vrste hrane in velikosti FO.

Iz želodca preide FO v tanko črevo, kjer poteka največji del presnove in absorpcije hranljivih snovi, vode in elektrolitov iz prebavnega trakta. Celotna površina, skozi katero se absorbirajo snovi, meri v tankem črevesju približno 200 m². Tanko črevo razdelimo na tri dele: dvanajstnik, zgornje tanko črevo in spodnje tanko črevo. Vrednost pH narašča med temi odseki od 4,0-6,6 v dvanajstniku, 6,1-7,1 v zgornjem ter 7,1-7,9 v spodnjem tankem črevesju. Čas prehoda je bolj konstanten kot pri želodcu ter znaša med 3 in 4 ure. V tankem črevesju poteka tudi presnova hranljivih snovi z različnimi encimi (lipaze, amilaze, proteaze), vsebuje pa tudi mnogo površinsko aktivnih snovi (žolčne soli, holesterol, lecitin), ki izboljšajo stik lipofilnih snovi z vodnim medijem in tako omogočijo njihovo presnovo.

Po tankem črevesju preide hrana v debelo črevo, katerega glavna naloga je reabsorpcija vode, poleg katere se lahko absorbirajo tudi nekatere učinkovine. Vrednost pH pade na 5,5 zaradi nižjih maščobnih kislin, ki nastajajo pri bakterijski fermentaciji. Do konca debelega črevesja pH naraste na 7. V proksimalnem delu se vsebina še dovolj meša, da omogoča dobro absorpcijo vode in nekaterih ZU, vsebina v distalnem delu pa postane pregosta. Čas prehoda snovi je variabilen in lahko traja do 35 ur.

Pogojev, v katerih se učinkovina sprošča v GIT, ne moremo v celoti posnemati pri preskusih sproščanja *in-vitro*. Trudimo se upoštevati čim več pogojev:

- pri FO: fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine, kot so topnost in stabilnost, pomožne snovi in njihove lastnosti, velikost FO in razmerje med ZU in pomožnimi snovmi, tip FO, mehanizem sproščanja
- pri medijih za sproščanje: pH, viskoznost, sestavo puferskih raztopin, površinsko aktivne snovi, prisotnost kisika, simuliranje pogojev ob

prisotnosti hrane in na tešče, volumen medija, temperaturo, vzorčenje in filtriranje vzorcev

- pri izbiri aparature: vrsto in metodo, hidrodinamske pogoje, vzorčenje
- pri preskusih so zaželeni »sink« pogoji, ki jih lahko dosežemo z večjimi volumni medija, dodatkom emulgatorjev ali uporabo sotalil (24).

1.4.2. Preskusi sproščanja za slabo topne učinkovine

Pri slabo topnih a dobro permeabilnih učinkovinah (BCS 2) je raztapljanje omejujoči faktor absorpcije. Eden od problemov optimizacije preskusa sproščanja za tovrstne učinkovine je lahko zagotavljanje »sink« pogojev. »Sink« pogoji pri preskusih sproščanja pomenijo, da v mediju za sproščanje končna koncentracija učinkovine ne sme presegati ene tretjine nasičene topnosti učinkovine v tem mediju. S tem dosežemo, da raztapljanje ni omejeno s topnostjo (Ph. Eur. 6th Ed.).

Možnosti za povečanje topnosti učinkovine v mediju je več: uporaba večjih volumnov medija ali menjava medija, uporaba pretočnih celic, sotalil, površinsko aktivnih snovi, sprememba pH medija ali uporaba dvofaznih sistemov. Nobena od teh možnosti ni idealna, predvsem z vidika posnemanja fizioloških pogojev (29, 30).

1.4.3. Test sproščanja z napravo BioDis

Naprava 3 po Ph. Eur. 6th (slika 6) omogoča menjavo do šestih različnih medijev med sproščanjem, s čimer se lažje približamo pogojem v prebavnem traktu. V primerjavi z napravo 1 (s košaricami) ali napravo 2 (z vesli) ima več prednosti:

- simulira fiziološke prehode FO skozi GIT (medijem lahko uravnavamo pH, ionsko moč, viskoznost, dodajamo različne encime...);
- bolje simulira peristaltično gibanje zaradi drugačnega načina mešanja oz. potapljanja;
- je bolj robustna – hidrodinamika mešanja ni tako odvisna od točnosti položaja valjev, deformacije vesel, košaric;

- ni vpliva zračnih mehurčkov v mediju zaradi same oblike valjev in drugačnega načina mešanja (31).

BioDis[®] je zelo uporaben za preučevanje FO s prirejenim sproščanjem, vendar pa se ob uporabi učinkovin iz 2. razreda po BCS, kot je tudi celekoksib, še vedno srečamo s problemom topnosti. Z dodatkom površinsko aktivne snovi sicer povečamo topnost, vendar pa s tem lahko izgubimo fiziološke pogoje, pojavi se nezaželeno penjenje in zabrišejo se lahko vplivi same formulacije na sproščanje (32).



Slika 6: Naprava 3 po Ph. Eur. 6th (BioDis).

1.4.4. Test sproščanja v dvofaznem mediju

Običajno se pri testih sproščanja na katerikoli napravi za sproščanje uporablja enofazen medij. Navadno gre za pufer, ki lahko vsebuje različne dodatke. V primeru slabo topnih učinkovin pa za določevanje sproščanja učinkovin obstajajo tudi dvofazni mediji. Slednji se uporabljajo le na napravah 1 in 2.

Dvofazni medij je sestavljen iz pufrne in organske faze, ki se praktično ne mešata, topnost učinkovine v organski fazi pa je tako velika, da bi lahko zagotavljala »sink« pogoje.

Sistem z dvofaznim medijem ima pred enofaznim medijem torej dve večji prednosti. V primeru, da je porazdeljevanje ZU v organsko fazo hitrejše od sproščanja v pufno fazo, imamo lahko stalno zagotovljene »sink« pogoje. Druga večja prednost takih sistemov pa je sočasno posnemanje procesa sproščanja v GIT ter absorpcije ZU skozi črevesno steno.

Sistem z dvofaznim medijem je v literaturi najobširneje opisal Grundy s sodelavci (29). Za organsko fazo so raziskovalci izbrali kot najprimernejši oktanol, kar je smiselno zaradi njegovih fizikalno-kemijskih lastnosti:

- je praktično netopen v vodi (0,05 g/100 g vode);
- njegova specifična gostota je nižja od vodne (0,825 pri 20 °C), torej plava na vodi, kar omogoča enostavno vzorčenje;
- ni hlapen (temperatura vrelišča je pri 195 °C) in ne izpareva pri 37 °C.

Njegove lastnosti zagotavljajo, da se volumen organske faze med preskusom ne spreminja (29). Omenjeni raziskovalci so dvofazni medij uporabili za vrednotenje sproščanja FO s podaljšanim sproščanjem nifedipina. Pri tem so uporabili naprave 1, 2 in modificirano napravo 2 – kombinacijo vesla in košarice. Opazili so, da pri preskušani FO uporaba naprave 1 (košarice) verjetno ne zagotovi dovolj velikega mešanja in se posledično učinkovina ne porazdeljuje dovolj hitro v organsko fazo. Pri uporabi naprave 2 (vesel) je bila tableta preveč mobilna in je lahko prišla na medfazo ali celo v organsko fazo. Obstajala je tudi možnost, da se je prilepila na dno posode. V želji, da bi imeli sistem, ki zagotavlja dovolj intenzivno hidrodinamiko mešanja in hkrati drži tableto v pufni fazi, so izdelali kombinacijo košaric in vesel – modificirano napravo 2.

Ko so opravili *in-vivo* študijo, so za svojo FO s podaljšanim sproščanjem ugotovili, da *in-vitro* sproščanje ob uporabi modificirane naprave 2 z dvofaznim medijem dobro korelira z *in-vivo* podatki. V primeru z *in-vitro* podatki, pridobljenimi na napravah 1 in 2 z dvofaznim medijem pa je bila *in-vivo* korelacija slabša.

2. NAMEN DELA

Namen naše diplomske naloge bo izdelati ogrodne tablete iz hidroksipropilmetilceluloze, iota karagenana in z vgrajenimi 100 mg celekoksiba (mikroniziranega oz. nanoniziranega). Celekoksib se bo iz njih prirejeno sproščal 24 ur.

Z emulzijsko-difuzijsko metodo in sušenjem z razprševanjem bomo najprej izdelali nanodelce celekoksiba. Te bomo ovrednotili in vgradili v ogrodne tablete, za primerjavo pa bomo v njih vgradili tudi vhodni (mikronizirani) celekoksib.

Izdelane tablete bomo vrednotili po Ph. Eur. 6th Ed.. Določili bomo naslednje fizikalno-tehnološke parametre: enakomernost mase, trdnost in vsebnost zdravilne učinkovine. Proučevali bomo vpliv sestave ogrodja in velikosti delcev učinkovine na sproščanje učinkovine.

Sproščanje bomo 24 ur spremljali z napravo z recipročnimi cilindri (naprava 3 po Ph. Eur. 6th Ed. oz. BioDis) ter s HPLC sistemom določili koncentracije učinkovine po posameznih posodah.

Sproščanje bomo spremljali tudi z napravo s košaricami (naprava 1 po Ph. Eur. 6th Ed.), napravo z vesli (naprava 2 po Ph. Eur. 6th Ed.) ter modificirano napravo 2 (vesla s košarico). V teh primerih bomo uporabili dvofazni medij, sestavljen iz pufra pH=7, kjer se bo učinkovina raztapljala, in oktanol, kamor se bo raztopljen učinkovina porazdeljevala.

Vpliv uporabljenih pomožnih snovi in velikosti delcev na sproščanje učinkovine bomo ovrednotili s primerjavo profilov raztapljanja učinkovine iz tablet.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1. Materiali

3.1.1. Učinkovina

Uporabljena učinkovina je celekoksib. 90 % učinkovine je manjše od $45\mu\text{m}$ (Aarti Drugs Ltd., Tarapur, Indija).

3.1.2. Pomožne snovi za izdelavo nanosuspenzije celekoksiba

- Prečiščena voda
- Polivinilpirolidon K-30; $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$ (BASF, Nemčija)
- Natrijev lavrilsulfat; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ (Merck, Nemčija)
- Etilacetat; $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (Merck, Nemčija)

3.1.3. Pomožne snovi za izdelavo tablet

KARAGENAN: Iota (ι) karagenan

Kemijsko: kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze-2-sulfata, medsebojna povezava 1,3- β in 1,4- α vezmi.

Izgled: rjav prašek brez vonja in okusa

Lastnosti: topen v vroči vodi; natrijeve soli ι -karagenana so topne v mrzli in topli vodi, netopen v večini organskih topil, v večjih koncentracijah v vodi nabreka, raztopine izkazujejo tiksotropne lastnosti.

Oznaka v nalogi: iota

Proizvajalec: FMC Biopolymer (ZDA)

HPMC: HIDROKSIPROPILMETILCELULOZA K4M

Kemijsko: celuloza, 2-hidroksipropilmetil eter

Izgled: bel ali kremno bel prašek brez vonja in okusa

Molekulska masa: 95000 g/mol

Oznaka v nalogi: HPMC K4M

Proizvajalec: Colorcon (ZDA)

Magnezijev stearat

Izgled: bel fin prašek

Uporaba: drsilo

Proizvajalec: Sigma Aldrich (ZDA)

3.1.4. Reagenti za pripravo medijev za sproščanje

- Prečiščena voda
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid; NaOH (Merck, Nemčija)
- Natrijev lavrilsulfat; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ (Merck, Nemčija)
- Klorovodikova kislina; HCl, 37 % (Merck, Nemčija)
- Oktanol; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$ (Merck, Nemčija)

3.1.5. Reagenti za pripravo mobilne faze

- Bidestilirana voda (aparatus PURELAB classic VF (ELGA, Velika Britanija) na Fakulteti za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Slovenija)
- Acetonitril; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ (Merck, Nemčija)

3.1.6. Priprava medijev za sproščanje

Klorovodikova kislina (0,085 M) pH=1,2

V 1000 ml bučko smo natočili 900 ml prečiščene vode in v digestoriju dodali 21 ml 37 % HCl. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Klorovodikova kislina (0,085 M) pH=1,2 + SDS

900 ml klorovodikove kisline (0,085 M) pH=1,2 smo prelili v litrsko bučko ter ob rahlem segrevanju in mešanju z magnetnim mešalom dodali 5 g SDS dopolnili s klorovodikovo kislino (0,085 M) pH=1,2 do oznake.

Fosfatni pufer pH=4,5

15,60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ smo natehtali v 1000 ml bučko in dodali 980 ml prečiščene vode in z 1M NaOH uravnali pH na $4,5 \pm 0,05$. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

Fosfatni pufer pH=4,5 + SDS

900 ml fosfatnega pufra pH=4,5 smo prelili v litrsko čašo ter ob rahlem segrevanju in mešanju z magnetnim mešalom dodali 5 g SDS ter dopolnili s fosfatnim pufrom pH=4,5 do oznake.

Fosfatni pufer pH=7,0

1,17 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ smo natehtali v 1000 ml bučko in dodali 980 ml prečiščene vode in z 1M NaOH uravnali pH na $7,0 \pm 0,05$. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

Fosfatni pufer pH=7,0+SDS

900 ml fosfatnega pufra pH=7,0 smo prelili v litrsko čašo ter ob rahlem segrevanju in mešanju z magnetnim mešalom dodali 5 g SDS in ter dopolnili s fosfatnim pufrom pH=7,0 do oznake.

Dvofazni sistem: Oktanol, nasičen s fosfatnim pufrom pH=7,0, in fosfatni pufer pH=7,0, nasičen z oktanolom

Fosfatni pufer pH=7,0 smo pripravili po prej navedenem postopku. Nato smo v litrsko steklenico nalili enkrat 900 ml pufra in 100 ml oktanola, drugič pa 900 ml oktanola in 100 ml pufra. Steklenice smo mešali pri hitrosti 35 obratov/minuto s planetarnim mešalom Bioengineering Inversina 15 min. Nato smo jih pustili v kopeli pri 37 °C najmanj 30 min ter 5 min v ultrazvočni kadički, da smo odstranili zračne mehurčke. Faze smo nato ločili in jih uporabili za pripravo dvofaznega sistema.

3.1.7. Filtri

Testirali smo štiri vrste filtrov:

- Minisart[®] SRP 25 0,2 µm [politetra-fluoroetilen (PTFE) membrana, hidrofoben]
- Minisart[®] NML 28 0,2 µm [celulozno – acetatna membrana, hidrofilen, sterilen]
- DURAPORE[®] Membrane filters 25 0,1 µm [polivinil flouridna (PVDE) membrana, hidrofilen]
- Millex-GN 13 0.20 µm [najlon, hidrofilen]

3.2. Naprave

- precizna tehtnica: AG 245 , Mettler Toledo (Švica)
- naprava za merjenje pH raztopin: pH METER, Mettler Toledo MA235 (Švica)
- rotor – stator homogenizator: Ultra-Turrax[®] T25 Basic, IKA[®] (Nemčija)
- visokotlačni homogenizator: APV-2000 Lab Series Homogenisers (Nemčija)
- centrifuga: Sorvall RC5C (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- naprava za določanje velikosti delcev z lasersko difrakcijo: Malvern Mastersizer S (Anglija)
- naprava za sušenje: Mini Spray Dryer B-290 Büchi (Švica)
- tabletirka na udarec: Kilian SP 300 01-SP3 (Nemčija)
- naprava za merjenje trdnosti tablet: Vanderkamp[®] VK 2000, Tablet hardness tester (ZDA)

- naprava 1 s košaricami in naprava 2 z vesli za spremljanje sproščanja: VANKEL VK 7000 (ZDA)
- naprava 3 za spremljanje sproščanja: BIO – DIS III (ZDA)
- avtomatski vzorčevalnik: VK 8000 Avto Sempler, Varian Inc (ZDA)
- spektrofotometer: Hewlett Packard, HP 8453, UV-Visible spectroscopy system (Nemčija)
- kromatografski sistem: HPLC Agilent 1100 Series (ZDA)
- planetarno mešalo: Bioengineering Inversina (Švica)
- elektronski mikroskop: SUPRA 35VP (Nemčija)
- naprava za mešanje: Labnet VX100 Vortex Mixer (ZDA)

3.3. Postopki in metode

3.3.1. Izdelava nanosuspenzije

Nanosuspenzijo celekoksiba smo izdelali z emulzijsko-difuzijsko metodo z uporabo visokotlačnega homogenizatorja (33, 34).

800 mg celekoksiba smo raztopili v 10 ml etilacetata ter raztopino emulgirali v 50 ml vodne raztopine zmesi stabilizatorjev (0,8 % PVP K-30 in 0,8 % SDS). Prvo stopnjo emulgiranja smo izvedli z rotor-stator homogenizatorjem (2 min, 10.000 obr./min; Ultra-Turrax[®] T25). Emulzijo smo nato prenesli v visokotlačni homogenizator (APV Lab Series Homogenisers) in 3 minute homogenizirali pri tlaku 600/60 barov (glavni/pomožni ventil), dodali 150 ml vode in nadaljevali s homogeniziranjem pri istih pogojih nadaljnjih 15 min. Da smo zagotovili enakomerno kroženje celotne suspenzije, smo produkt zbirali v čašo ter ga vračali v zbirnik VTH.

Velikost delcev nanosuspenzije smo določili z metodo laserske difrakcije (Mastersizer S, Malvern), ki podaja velikosti (μm), pod katerimi je 10, 50 oz. 90 % delcev ($D(v, 0.1)$, $D(v, 0.5)$ in $D(v, 0.9)$). Nanosuspenzijo smo nato 15 min centrifugirali pri 15000 obratih (Sorvall RC5C) ob kontrolirani temperaturi (4-25 °C) ter odstranili supernatant. Usedlino smo nato redispergirali v približno 5 ml prečiščene vode z mešanjem ter uporabo ultrazvočne kadičke (UZ).

3.3.2. Sušenje nanosuspenzije in vrednotenje

Pripravljeni nanosuspenziji smo nato odstranili disperzni medij (vodo) s sušilnikom z razprševanjem (Mini Spray Dryer B-290, Büchi) pri temperaturi 160 °C, 100 % pretoku vročega zraka (približno 22 m³/h) ter 15% dovajanjem disperzije (~ 5 ml/min).

Osušene nanodelce celekoksiba smo redispergirali v vodi in izmerili njihovo velikost delcev. Nanodelcem smo določili tudi dejansko vsebnost celekoksiba. Zatehtali smo 30,2 mg nanoniziranega celekosiba v steklen čolniček in ga kvantitativno prenesli v 250 ml bučko. Kot topilo smo uporabili mobilno fazo. Mešali smo najmanj 12 ur in nato odvzeli vzorec za HPLC. Iz dobljene površine smo po enačbi umeritvene premice izračunali dejansko koncentracijo – 118,54 mg/l. Izračunano razmerje $((118,54 \text{ mg/l})/(120,8 \text{ mg/l}) * 100 = 98,13 \%)$ smo upoštevali pri računanju vsebnosti v tabletah z nanonizirano učinkovino.

3.3.3. Izdelava tablet

Z direktnim tabletiranjem smo s tabletirko na udarec (Killian) ročno stisnili tablete z različnimi kombinacijami polimerov (HPMC K4M, ι -karagenan) ter celekoksiba dveh velikostnih razredov (mikroniziran in nanoniziran). Odmerek celekoksiba (100 mg) smo izbrali glede na najnižji terapevtski odmerek. Prahove smo združevali po pravilu rastočih mas, zmes dobro homogenizirali in raztehtali tabletno maso na zelene mase tablet. Za izboljšanje pretočnih lastnosti ter zmanjšanje trenja med tabletami in matrično vdolbino smo vsem zmesem dodali 1% magnezijevega stearata. Izdelali smo tablete z maso 400 mg. Zatehtano maso smo ročno stresli v matrično vdolbino in stisnili tablete z obliko okroglih nizkih valjev ter ravnimi osnovnimi površinami. Tablete so imele premer 10 mm ter višino 3,61 do 4,55 mm. Silo stiskanja smo prilagodili tako, da smo stisnili tablete želene trdnosti (80 N). Tablete so bile na pogled gladke, konsistentne in nekrušljive, zato smo to trdnost ovrednotili kot za primerno.

Vsem serijam tablet smo poleg trdnosti določili tudi enakomernost mase, dimenzije (premer, debelina), hitrost sproščanja učinkovine iz tablet, nekaterim serijam tablet pa tudi vsebnost. Sestava tablet in oznake so predstavljene v preglednici I.

Preglednica I: Sestava tablet s hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC), iota karagenanom (IOTA), kombinacijo HPMC/IOTA v razmerju 1:1 (50/50) in celekoksibom; M-mikronizirani in N-nanonizirani delci. Masa tablet je 400 mg. Vse tablete vsebujejo 1 % Mg stearata.

Oznaka tablet	Mikroniziran celekoksib (mg)	Nanoniziran celekoksib (mg)	iota karagenan (mg)	HPMC K4M (mg)
M-IOTA	100	-	300	-
N-IOTA	-	100	300	-
M-HPMC	100	-	-	300
N-HPMC	-	100	-	300
M-50/50	100	-	150	150
N-50/50	-	100	150	150

3.3.4. Enakomernost mase tablet

Preskus na enakomernost mase enoodmernih farmacevtskih oblik (Ph. Eur. 6th Ed.) smo opravili na dvajsetih tabletah, ki smo jih stehali, izračunali povprečno maso in odstopanja od povprečja. Kriterij za ustreznost tablet težjih od 250 mg po Ph. Eur. 6th Ed. je, da lahko največ dve tableti odstopata od povprečne mase za več kot 5 %, nobena pa ne sme odstopati več kot 10 %.

3.3.5. Vsebnost učinkovine v tabletah

Vsebnosti učinkovine v tabletah smo določili samo določenim serijam tablet. Vsebnost smo določali vsaj trem tabletam iz posamezne serije. V terilnici smo strli tableto, jo kvantitativno prenesli v 250 ml bučko ter raztopili v 10 ml metanola. Bučko smo nato do oznake dopolnili z mobilno fazo, ki smo jo uporabljali za HPLC ter na magnetnem mešalu pustili mešati minimalno 12 h. Nato smo odvzeli 1 ml vzorca, ga redčili 1/10 in analizirali z metodo HPLC. Tako smo določili koncentracijo oz. maso učinkovine.

3.3.6. Trdnost tablet

Trdnost tablet smo določili s pomočjo naprave za merjenje trdnosti (Vanderkamp®, VK 200, ZDA). Tableto smo z ravno ploskvijo položili med mirujoči in gibljivi del naprave. Pri merjenju gibljivi del potisne tableto ob mirujoči del. Trdnost tablete pomeni najmanjšo silo, izraženo v Newton-ih, ki je potrebna, da tableta počí ali se poškoduje. Zaradi omejenega števila enot smo določili trdnost samo trem enotam in ne dvajsetim, kot jih predpisuje Ph. Eur. 6th Ed. Rezultat smo podali z naslednjimi parametri: maksimalna, minimalna in povprečna trdnost ter standardna deviacija trdnosti tablet.

3.3.7. Določanje nasičene topnosti

Določili smo nasičeno topnost mikroniziranega in nanoniziranega celekoksiba v različnih medijih. V 50 ml medija smo dodali presežek celekoksiba, dopolnili z medijem in na magnetnem mešalu mešali najmanj 12 ur. Neraztopljeno učinkovino smo odstranili s centrifugiranjem pri 4000 obratih/minuto 15 minut ter določili koncentracijo celekoksiba z metodo HPLC. Kot medij smo uporabili pufre s pH=1,2, pH= 4,5, pH=7,0 brez ali z dodatkom 0,5 ali 1 % SDS.

3.3.8. Filtriranje vzorcev

Za določanje primernosti filtrov za filtriranje različnih vzorcev s celekoksibom smo preskusili filtre izdelane iz različnih materialov: Minisart® SRP 25 0,2 µm [politetrafluoroetilen (PTFE) membrana], Minisart® NML 28 0,2 µm [celulozno – acetatna membrana], DURAPORE® Membrane filters 25 0,1 µm [polivinil flouridna (PVDE) membrana] in Millex-GN 13 0.20 µm [najlon].

Filtrirali smo vzorce z znano količino celekoksiba ter določili koncentracijo filtrata po filtriranju različne količine medija. Najprej smo prefiltrirali 2 ml vzorca in tretji mililiter zbrali v vialo za analizo. Nato smo prefiltrirali skozi isti filter še 1 ml vzorca, ga zavrgli, in ponovno zbrali 1 mililiter za analizo. Koncentracijo celekoksiba smo določili z uporabo sistema HPLC. Kot rezultat smo podali odstotek učinkovine, ki se veže oz. ostane na filtru.

3.3.9. HPLC metoda

Koncentracijo celekoksiba v vzorcih smo določili z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) HP Agilent 1100. Uporabljali smo dve koloni in sicer kolono 1 - Nucleosil C18 (250 mm×4.0 mm 5 µm Hypersil ODS, Thermo, USA) in kolono 2 - Nucleosil C18 (150 mm×4,6 mm 5 µm, Thermo, USA). Mobilno fazo smo pripravili iz acetonitrila in vode v razmerju 60:40 (v/v), konstantni pretok med analizo je bil 1 ml/min pri 35 °C. Injicirali smo 50 µl vzorca, detekcija je potekala pri 238 nm. Linearni odziv med površino pika in koncentracijo celekoksiba je bil med 0,05 mg/l in 100 mg/l.

3.3.10. Izdelava umeritvenih premic za določanje koncentracije učinkovine

3.3.10.1. Umeritvena premica v pufrnih raztopinah

Koncentracijo celekoksiba v pufrnih raztopinah smo določili s HPLC metodo, zato smo naredili umeritveno premico z raztopinami celekoksiba znanih koncentracij, ki smo jih pripravili z redčenjem osnovne raztopine. Za pripravo osnovne raztopine smo v 200 ml bučko natančno zatehtali 20,7 mg celekoksiba in dopolnili bučko do oznake z mobilno fazo. Ko se je učinkovina raztopila, smo raztopino ustrezno redčili in tako pripravili ustrezen interval koncentracij (do najnižje). Kot topilo za redčenje smo uporabili mobilno fazo. Redčitve so bile (ml/ml),:

- 50/100 (c = 103,50 mg/l) iz osnovne raztopine.
- 25/100 (c = 51,75 mg/l) iz osnovne raztopine.
- 25/100 (c = 26,04 mg/l) iz 103,50 mg/l.
- 10/100 (c = 10,35 mg/l) iz 103,50 mg/l.
- 5/100 (c = 5,18 mg/l) iz 103,50 mg/l.
- 10/50 (c = 1,04 mg/l) iz 5,18 mg/l.
- 5/50 (c = 0,52 mg/l) iz 5,18 mg/l.

Iz površin pri retencijskem času celekoksiba (kolona 1: $t_R = 7,34$ min; kolona 2: $t_R = 4,99$ min) smo izračunali umeritveno premico (*enačba 6*). Ustreznost umeritvene premice smo med nadaljnjim delom večkrat preverili z injiciranjem raztopine celekoksiba znane

koncentracije. Determinacijski koeficient premice je bil v vseh primerih 1, medtem ko se je enačba premice minimalno spremenila. Kljub temu smo vedno uporabili zadnjo določeno umeritveno premico.

$$y = kx - A$$

/enačba 6/

y..... površina pod pikom celekoksiba

x..... koncentracija celekoksiba [mg/l]

k..... naklon umeritvene premice [l/mg]

A..... presečišče premice in y osi na grafu umeritvene krivulje

Determinacijski koeficient (R^2) = 1

Naklon umeritvene premice (k) = 142,52 l/mg

Presečišče premice in y osi na grafu umeritvene krivulje (A) = 14,058

Z uporabo mobilne faze kot medija smo naredili enotno umeritveno premico za vse uporabljene pufre pri testih sproščanja. Mobilno fazo smo izbrali zaradi dobre topnosti celekoksiba v njej. Ustreznost umeritvene krivulje pa smo preverili z injiciranjem znane koncentracije celekoksiba v pufru s 0,5 % SDS.

3.3.10.2. Umeritvena premica v oktanolnih raztopinah

Koncentracijo celekoksiba v oktanolu smo določili UV-VIS spektrofotometrično. Standarde znanih koncentracij smo pripravili z redčenjem osnovne raztopine. Kot topilo za osnovno raztopino in redčenje smo uporabili s pufrom nasičen oktanol. Natančno smo zatehtali 26,4 mg celekoksiba v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z nasičenim oktanolom. Ko se je učinkovina raztopila, smo to raztopino redčili 1/10 in tako dobili raztopino s koncentracijo 52,8 mg/l. To raztopino smo uporabili za osnovno raztopino pri ustreznih redčitvah. Redčitve so bile (ml/ml),:

- 8/10 (c = 42,24 mg/l)
- 10/20 (c = 26,40 mg/l)
- 2/10 (c = 10,56 mg/l)
- 1/10 (c = 5,28 mg/l)

- 0,5/20 (c = 1,32 mg/l)

Pripravljenim raztopinam smo pri valovni dolžini 238 nm izmerili absorbanco in izračunali umeritveno premico (*enačba 7*).

$$c = k_{uv} \times A$$

/enačba 7/

c..... koncentracija celekoksiba [mg/ml]

A..... absorbanca [/]

k_{uv} naklon umeritvene premice [mg/ml]

Determinacijski koeficient (R^2) = 0,999

Naklon umeritvene premice (k_{uv}) = 0,0228 mg/ml

3.3.11. Sproščanje učinkovine iz tablet

3.3.11.1. Test sproščanja z napravo BioDis

Sproščanje celekoksiba iz pripravljenih serij tablet smo določali na napravi 3 po Ph. Eur. 6th (slika 6). Ta naprava omogoča med sproščanjem menjavo do šestih različnih medijev, s čimer se lažje približamo pogojem v prebavnem traktu. Teste sproščanja učinkovine smo izvedli po dveh različnih programih (preglednica II), tako da se je učinkovina iz tablete sproščala dve uri pri pH 1,2 nato pol ure pri pH 4,5 in nazadnje v pH 7,0 21,5 ur. Pogoji so bili sledeči: volumen medija je bil šestkrat po 250 ml za eno paralelko; temperatura medijev je bila 37 °C; recipročni cilinder se je potapljal s hitrostjo 10 potopov na minuto. Vzorce je odzema avtomatski vzorčevalnik, volumen vzorcev je bil po 2 ml, časi vzorčenja so predstavljeni v preglednici II. Volumna odvzetega vzorca nismo nadomeščali, zato smo pri računanju upoštevali izgubo volumna.

Preglednica II: Predstavitev uporabljenih programov za BioDis s podanimi časi vzorčenja glede na različne posode z različnimi pH-ji.

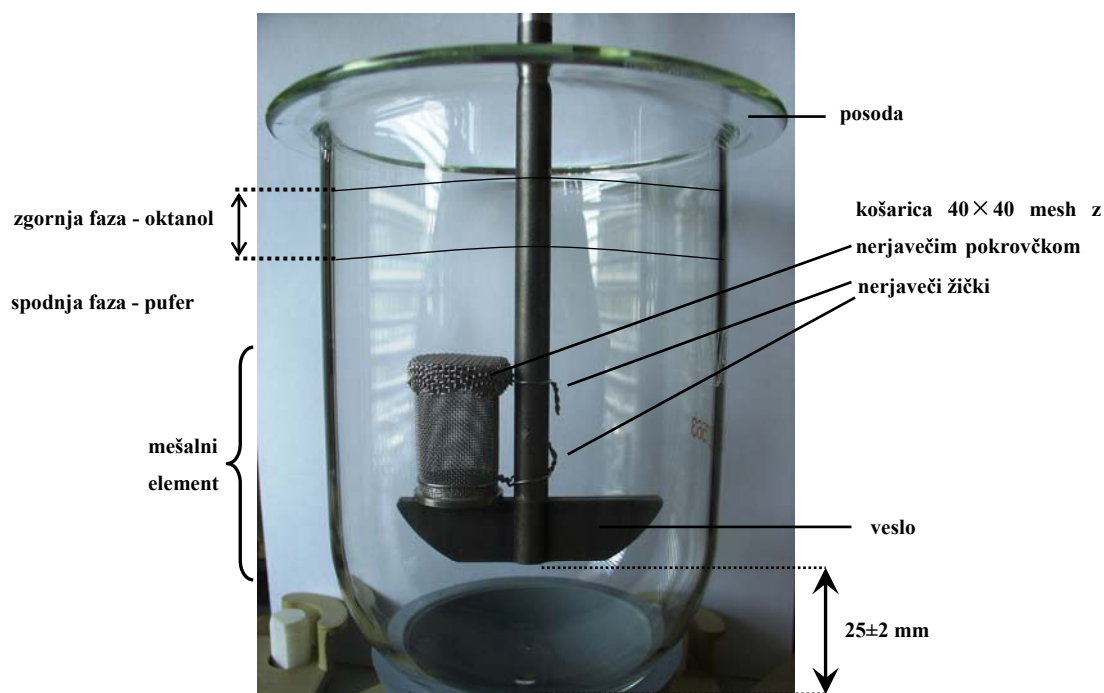
posoda	pH medija (0,5%SDS)	Program I. (časi odvzema vzorca)	Program II. (časi odvzema vzorca)
1	1,2	30 min	30 min, 1 h
2	1,2	1 h, 2 h	2 h
3	4,5	2,5 h	2,5 h
4	7,0	3 h, 5h	3 h, 4 h
5	7,0	7 h, 9 h	5 h, 6 h
6	7,0	16 h, 24 h	7 h, 10 h

Ker smo v primeru testa sproščanja z napravo BioDis koncentracijo učinkovine vrednotili s pomočjo HPLC sistema, smo zato predhodno odvzetim vzorcem dodali 8 ml čistega medija z ustreznim pH in 0,5 % SDS, jih dobro premešali na vorteks mešalu in filtrirali skozi 0,20 μm filter (Minisart[®] SRP 25 0,2 μm). Redčenje in filtriranje je bilo nujno, saj mora biti vzorec, ki ga injiciramo na HPLC kolono, čist in brez delcev, pri odvzemu iz posod za sproščanje pa vzorci niso bili filtrirani. Koncentracijo učinkovine (mg/l) v odvzetih vzorcih smo določili s posebej razvito HPLC metodo (3.3.9) in računanjem na osnovi umeritvene premice. Za študije sproščanja smo vedno vzeli tri enake tablete.

3.3.11.2. Test sproščanja v dvofaznem mediju

Za test sproščanja v dvofaznem mediju smo uporabili naprave 1 (košarica) in 2 (vesla) po Ph. Eur. 6th ter modificirano napravo 2 - vesla z dodatno pritrjenimi košaricami. V primeru modificirane naprave 2 smo košarico z dvema nerjavečima žičkama pritrjili na držalo vesla ter jo na vrhu pokrili z nerjavečo mrežico (slika 7). Košarica je bila klasična 40 MESH.

Preskuse sproščanja na omenjenih napravah smo izvajali v dvofaznem mediju s 675 ml pufra s pH=7, ki je bil nasičen z oktanolom, ter 225 ml oktanela, nasičenega s pufrom pH=7. Nasičene raztopine smo uporabili zato, da smo zagotovili enake pogoje v vseh preskusih ter preprečili sicer majhno spremembo razmerij volumnov obeh faz v postopku nasičevanja. Tableto smo potopili v pufrno fazo, dodali s pufrom nasičen oktanol, počakali, da se plasti ločita, in šele nato začeli z vrtenjem (testom sproščanja).



Slika 7: Modificirana naprava 2 za sproščanje v dvofaznem mediju z uporabo kombinacije vesla in košarice. Košarica je z dvema nerjavečim žičkama pritrjena na veslo in pokrita z nerjavečim pokrovčkom. Celoten mešalni element je od dna posode odmaknjen za 25 ± 2 mm.

Ob določenih časovnih intervalih smo z avtomatsko pipeto ročno odvzeli 0,5 ml vzorca iz oktanolne faze. Test smo izvajali 24 h in vzorčili v naslednjih časovnih točkah: 30 min, 1h, 2h, 3h, 5h, 7h, 9h, 22h in 24h. Volumna odvzetega vzorca nismo nadomeščali, zato smo pri računanju upoštevali izgubo volumna. Kljub zmanjšanju volumna oktanola je bilo tega še vedno dovolj, da so bili v organski fazi vzpostavljeni »sink« pogoji, saj je topnost celekoksiba v oktanolu 7,870 mg/ml (10). Koncentracijo učinkovine v odvzetih vzorcih smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 238 nm in računanjem na osnovi umeritvene premice. Absorbance vzorcev smo pomerili s kiveto iz kvarčnega stekla volumna 1 ml in potjo žarka 1,0 cm. Študije sproščanja smo izvedli v treh paralelkih. Temperatura medija je bila $37 \pm 0,5$ °C, hitrost mešanja 100 rpm.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANOSUSPENZIJ

Nanosuspenzijo celekoksiba smo izdelali z emulzijsko-difuzijsko metodo z uporabo visokotlačnega homogenizatorja opisano v eksperimentalnem delu (3.3.1.). Nanosuspenzijo smo ultracentrifugirali, da so se nanodelci učinkovine posedli. Nato smo pozorno odstranili supernatant, v katerem je raztopljen presežek pomožnih snovi (PVP in SDS), ki smo jih uporabili za uspešno izdelavo nanosuspenzije. Po odstranitvi supernatanta smo usedlino delcev redispergirali v manjši količini prečiščene vode. Disperzijo smo pretvorili v suho stanje s sušenjem z razprševanjem. Izkoristek celotnega postopka izdelave nanodelcev celekoksiba je bil 75 %. Nanonizirane delce učinkovine smo nato uporabili pri izdelavi hidrofilnih ogrodnih tablet in jih primerjali s tabletami, ki so vsebovale učinkovino mikrometrskih velikosti.

Tako mikronizirani učinkovini, izdelani nanosuspenziji pred sušenjem kot tudi suhim nanodelcem celekoksiba smo z metodo laserske difrakcije določili velikost delcev. Iz preglednice III je razvidno, da je 80 % delcev mikronizirane učinkovine velikostnega razreda od 3,14 do 45,69 μm . V primeru izdelane nanosuspenzije je 80 % delcev v območju med 0,15 do 0,96 μm , medtem ko se je pri suhih nanodelcih celekoksiba velikost rahlo povečala (med 0,18 in 1,67 μm). Slednje je najverjetneje posledica izgube najmanjših delcev med ultracentrifugiranjem ter sušenjem z razprševanjem. Ti delci namreč sedimentirajo najpočasneje, pri sušenju pa jih tok zraka lahko odnese iz zbirnika suhih delcev.

Preglednica III: Velikost delcev izvorne učinkovine celekoksiba (mikrodelci), izdelane nanosuspenzije in redispergiranih suhih nanodelcev. Velikost delcev smo določili z lasersko difrakcijo. Vrednosti D (v, 0.1), D (v, 0.5) in D(v, 0.9) nam podajo velikost, pod katero je 10, 50 oz. 90 % delcev.

Velikost delcev (μm)	D (v, 0.1)	D (v, 0.5)	D (v, 0.9)
Mikroniziran celekoksib	3,14	11,26	45,60
Nanosuspenzija celekoksiba	0,14	0,32	0,94
Nanoniziran celekoksib	0,18	0,41	1,67

4.2. NASIČENA TOPNOST MIKRONIZIRANEGA IN NANONIZIRANEGA CELEKOKSIBA

Pomembna lastnost delcev v nanometrskem področju je tudi večja nasičena topnost, ki lahko vpliva na povečano hitrost raztapljanja ter večjo biološko uporabnost. Topnost se bistveno prične večati delcem z zmanjševanjem premera pod 500 nm (13). Zato smo določili nasičene topnosti nanoniziranega celekoksiba ter jih primerjali s topnostjo mikroniziranih delcev (preglednica IV). Topnosti smo določili v medijih z različnimi pH vrednostmi in koncentracijo SDS.

Preglednica IV: Nasičene topnosti nanoniziranega in mikroniziranega celekoksiba v medijih z različnimi pH-ji in različno koncentracijo površinsko aktivne snovi (SDS).

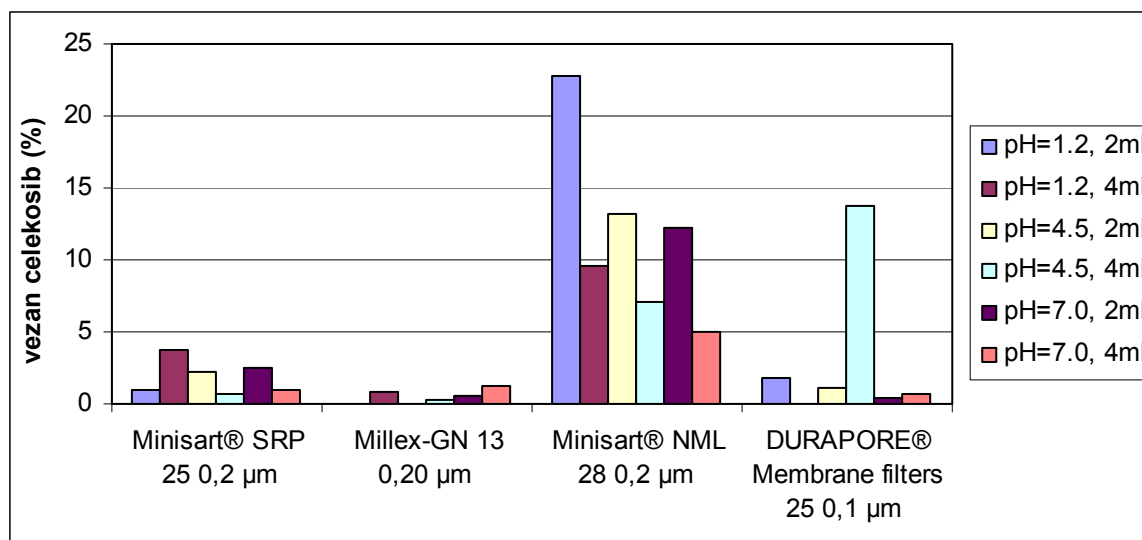
	Mikroniziran celekoksib			Nanoniziran celekoksib		
	c (mg/l)			c (mg/l)		
	pH=1,2	pH=4,5	pH=7,0	pH=1,2	pH=4,5	pH=7,0
0 % SDS	-*	-*	-*	2,65	2,19	4,86
0,5 % SDS	122,84	174,26	180,50	138,80	191,05	197,24
1 % SDS	236,84	282,03	300,23	248,90	291,54	301,73

* nismo uspeli določiti

Zaradi slabega močenja mikroniziranega celekoksiba nasičene topnosti v pufrih brez SDS nismo mogli določiti, saj se učinkovina tudi po 12-urnem mešanju ni omočila in se supernatant po centrifugiranju ni zbistril. Kljub temu lahko iz rezultatov vidimo, da je nasičena topnost celekoksiba z delci v nanometrskem področju večja v vseh primerih, ne glede na pH in koncentracijo SDS. Opazili smo, da se topnosti povečajo za približno 10 %. K povečanju tako najverjetneje prispevajo najmanjši delci nanosuspenzije (10 % jih je manjših kot 150 nm; preglednica III). Opazili pa smo tudi, da se z večanjem količine površinsko aktivne snovi ter pH-ja razlika v topnosti zelo zmanjša oz. je skoraj ista, še posebej je to razvidno v primeru 1% SDS in pH=7.

4.3. VPLIV FILTRIRANJA NA VZORCE S CELEKOKSIBOM

Vzorce po testu sproščanja smo pred analizo filtrirali in tako odstranili v vzorcu neraztopljene snovi (delce učinkovine ali pomožnih snovi), ki bi lahko vplivale na rezultat. Na ta način tudi zaščitimo in podaljšamo življenjsko dobo kromatografske kolone. Pri filtriranju raztopin moramo biti posebno pozorni na možnost vezave učinkovine na materiale, iz katerih so filtri izdelani. Odstotek vezave učinkovine na različne preskušane filtre je predstavljen na sliki 9.



Slika 9: Vpliv filtriranja v medijih z 0,5 % SDS. V legendi je naveden pH medija in količina filtriranega vzorca, ki smo ga prefiltrirali skozi filter, preden smo vzeli vzorec. Testirali smo štiri različne filtre (navedeni na abcisi). Koncentracija celekoksiba v medijih je bila $2 \pm 0,2$ mg/l.

Ugotovili smo, da sta najprimernejša filtra Minisart® SRP 25 0,2 µm in Millex-GN 13 0,20 µm, vendar smo se odločili za cenovno ugodnejšega Minisart® SRP 25 0,2 µm. Izbrani filter smo ovrednotili še pri nasičenih topnostih in pri koncentracijah, ki jih dosežemo pri preskusu sproščanja. V nobenem primeru se ni na filtre vezalo več kot 4 % učinkovine (pri preskusu sproščanja le do 0,8 %).

4.4. VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET

Stisnili smo več serij tablet z različno distribucijo velikosti delcev učinkovine in različnimi pomožnimi snovmi (preglednica I). Tablete smo tudi farmakopejsko ovrednotili, saj morajo ustrezati točno določenim predpisom, ki zagotavljajo, da je zdravilo kakovostno, varno in učinkovito.

Izdelanim tabletam smo najprej določili velikost. S kljunastim merilom smo jim določili premer in debelino. Premer 400 mg tablet je bil $10,0 \pm 0,05$ mm, debelina tablet je predstavljena v preglednici V.

Preglednica V: Debeline tablet (m = 400 mg) iz hidroksipropilmetilceluloze (HPMC), iota karagenana (IOTA), kombinacije HPMC/IOTA v razmerju 1:1 (50/50) in celekoksiba; M-mikroniziran in N-nanoniziran celekoksib (n=20).

Serija tablet	Debelina (mm)			SD (mm)	RSD (%)
	Največja	Najmanjša	Povprečna		
M-IOTA	3,49	3,48	3,48	0,005	0,15
N-IOTA	3,61	3,58	3,60	0,015	0,42
M-HPMC	4,41	4,40	4,40	0,005	0,11
N-HPMC	4,55	4,50	4,53	0,024	0,53
M-50/50	4,00	3,96	3,97	0,018	0,44
N-50/50	4,06	4,03	4,05	0,011	0,26

4.4.1. Enakomernost mase in vsebnosti

Za vsako serijo tablet smo izvedli preskus enakomernosti mase po Ph. Eur. 6th Ed. (preglednica VI). Tabletiranje smo izvajali ročno, saj smo imeli omejene količine zdravilne učinkovine, še posebej nanonizirane. Priprava nanoniziranega celekoksiba, ki bi zadostoval za pripravo zadostne količine zmesi za avtomatsko tabletiranje, bi bila predvsem časovno neizvedljiva.

Preglednica VI: Masa tablet iz hidroksipropilmetilceluloze (HPMC), iota karagenana (IOTA), kombinacije HPMC/IOTA v razmerju 1:1 (50/50) in celekoksiba; M-mikroniziran in N-nanoniziran celekoksib (n=20).

Serijska številka tablet	Najmanjša masa (mg)	Največja masa (mg)	Povprečna masa (mg)	SD (mg)	RSD (%)
M-IOTA	398	402	399	1,41	0,35
N-IOTA	398	400	399	0,96	0,24
M-HPMC	398	401	399	1,27	0,32
N-HPMC	400	402	401	0,89	0,22
M-50/50	397	402	400	1,60	0,40
N-50/50	398	403	400	1,73	0,43

Iz preglednice VI je razvidno, da vse serije tablet ustrezajo testu na enakomernost mase, saj nobena tableta ne odstopa od povprečne mase za več kot dovoljuje evropska farmakopeja (največ dve tableti lahko odstopata od povprečne mase za več kot 5 %, nobena pa ne sme odstopati več kot 10 %). Zavedati pa se moramo, da smo fizikalno zmes zatehtali za vsako tableto posebej, jo ročno prenesli v matrično vdolbino ter ročno stisnili. V primeru avtomatskega tabletiranja bi morali zmesem zagotoviti dobre pretočne lastnosti (določiti npr. pretočni čas, nasipni kot), če bi hoteli, da bi izdelane tablete ustrezale preskusu enakomernosti mase in vsebnosti.

Ph. Eur. 6th Ed. predpisuje interval vsebnosti učinkovine za enoodmerne FO, ki je med 85 % in 115 % teoretične mase učinkovine v tableti. Predpis sicer zahteva preskušanje desetih tablet, vendar smo določili vsebnost učinkovine le v treh tabletah posamezne serije (preglednica VII).

Preglednica VII: Vsebnost tablet ($m = 400$ mg) iz hidroksipropilmetilceluloze (HPMC), iota karagenana (IOTA), kombinacije HPMC/IOTA v razmerju 1:1 (50/50) in celekoksiba; M-mikroniziran in N-nanoniziran celekoksib ($n=3$).

Serijska tableta	Deklarirana vsebnost (mg)	Povprečna vsebnost (mg)	Povprečna vsebnost (%)
M-IOTA	100	100,55 ± 1,45	100,55 ± 1,45
N-IOTA	100	98,64 ± 1,18	98,64 ± 1,18
M-HPMC	100	100,15 ± 1,23	100,15 ± 1,23
N-HPMC	100	99,07 ± 0,98	99,07 ± 0,98
M-50/50	100	101,27 ± 1,66	101,27 ± 1,66
N-50/50	100	99,34 ± 1,25	99,34 ± 1,25

Iz dobljenih rezultatov smo dobili okvirno potrditev, da tablete vsebujejo predpisano količino učinkovine.

4.4.2. Trdnost tablet

Ph. Eur. 6th Ed. predpisuje preskus trdnosti, ki smo ga izvedli za vse izdelane serije tablet na napravi za določanje trdnosti Vanderkamp, VK 200. Rezultati so predstavljeni v preglednici VIII.

Pri 400 mg tabletah smo kot ciljno in primerno trdnost določili 80 N. Za tablete z enakim razmerjem polimerov smo želeli doseči približno enako trdnost, saj je le-ta lahko posredni pokazatelj poroznosti in gostote tablete, in tako lahko vpliva na hitrost razpada tablete in hkrati na profil sproščanja učinkovine.

Pri vseh serijah smo dosegli želeno trdnost tablet, tablete so bile tudi na pogled gladke in nekrušljive. V vseh primerih smo opazili razmeroma veliko razliko v sili stiskanja tablet med zmesmi z mikronizirano ter nanonizirano ZU. Zmes z mikronizirano učinkovino smo za doseg enake trdnosti morali stisniti z veliko višjo silo stiskanja. Zaradi majhnih delcev nanoniziranega celekoksiba pride do velikega povečanja površine zato je vrjetnost adhezije zelo povečana in več je privlačnih sil, pride do lepšega razporejanja delcev v tableti.

Preglednica VIII: Trdnosti tablet ($m = 400$ mg) iz hidroksipropilmetilceluloze (HPMC), iota karagenana (IOTA), kombinacije HPMC/IOTA v razmerju 1:1 (50/50) in celekoksiba; M-mikroniziran in N-nanoniziran celekoksib ($n=3$).

Serija tablet	Trdnost (N)			SD (N)	RSD (%)	Sila stiskanja (kN)
	največja	najmanjša	povprečna			
M-IOTA	71,0	60,3	65,1	5,42	8,33	26,7
N-IOTA	85,1	75,6	80,6	4,76	5,91	12,9
M-HPMC	75,2	73,7	74,5	0,76	1,02	12,7
N-HPMC	90,6	82,6	87,2	4,12	4,73	7,8
M-50/50	86,8	83,3	84,7	1,83	2,16	12,5
N-50/50	89,1	85,8	87,7	1,71	1,95	9,0

Opazili smo tudi, da trdnost niha znotraj ene serije tablet in med njimi. Delno bi lahko to razložili s tem, da smo tablete stiskali ročno s tabletirko na udarec. Pri neenakomernem vrtenju kolesa za ročno stiskanje lahko pride do neenakomerne sile stiskanja in posledično do neenakomerne trdnosti tablet.

4.5. SPROŠČANJE CELEKOKSIBA IZ OGRODNIH TABLET

4.5.1. BioDis

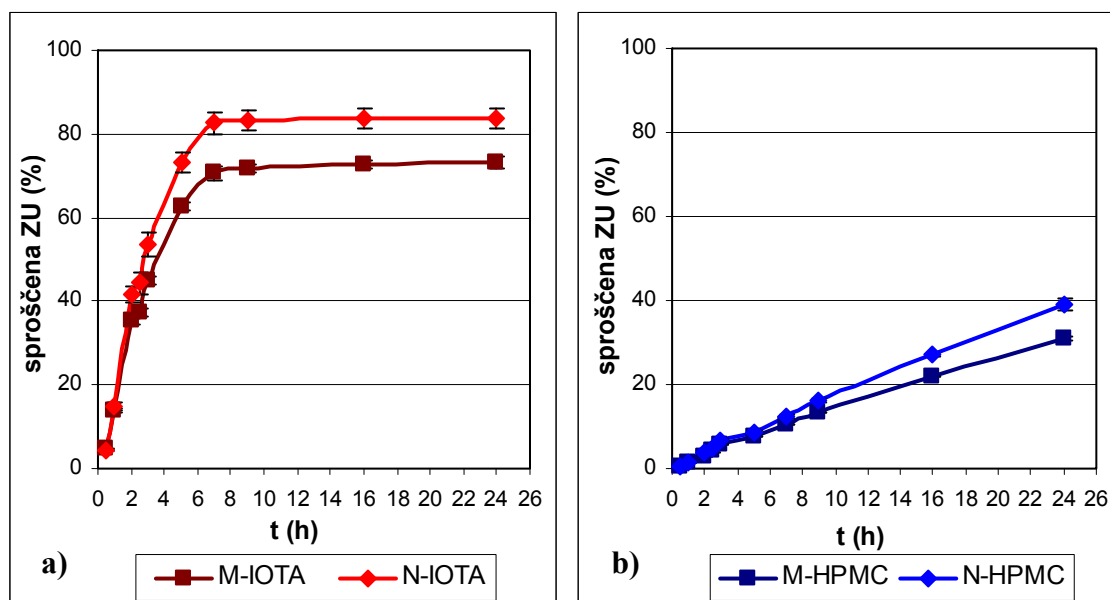
Ker smo želeli, da sproščanje učinkovine iz hidrofilnih ogrodnih tablet ni preveč omejeno s topnostjo učinkovine v mediju, smo se poskusili približati »sink« pogojem. Omeniti pa velja, da se pogostokrat za študije sproščanja slabo topnih učinkovin uporabljajo tudi »non sink« pogoji, saj ti dostikrat bolj korelirajo s pogoji *in-vivo*.

»Sink« pogojem smo se v naši študiji bolj približali z uporabo 1 % napram 0,5 % SDS-u (preglednica III). Kljub vsemu pa smo se za nadaljnje teste raztapljanja na BioDis-u raje odločili za medije z 0,5 % SDS. Uporaba medijev z 1 % SDS bi namreč lahko zelo povečala topnost in na ta način tudi hitrost raztapljanja mikroniziranega celekoksiba ter tako zbrisala dejanske razlike zaradi velikosti delcev glede na nanoniziran celekoksib. To smo namreč določili pri predhodnih testih sproščanja na napravi 1 (ne prikazujemo), saj

smo z 1 % SDS povsem zbrisali razlike v sproščanju med mikronizirano in nanonizirano učinkovino.

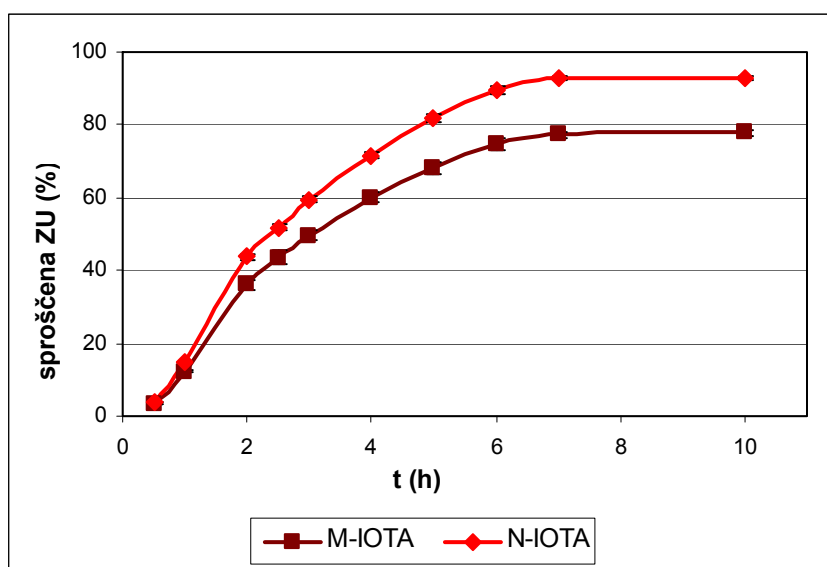
Slika 10 predstavlja profil sproščanja celekoksiba iz tablet, ki poleg učinkovine vsebujejo le en polimer. Ugotovili smo, da tableta z iota-karagenanom nadzoruje sproščanje celekoksiba do približno devet ur, ko tableta popolnoma razpade. Zaradi majhnega volumna posodic in dokaj hitre erozije (razpadanja) tablete je v nekaterih posodah prišlo do presežka učinkovine, presežena je bila nasičena topnost, kar smo dokazali po koncu preskusa. Posledica tega je bila, da se v 24 urah navidezno ni sprostila vsa učinkovina. Da je sproščanje le navidezno nepopolno, smo potrdili z določitvijo vsebnosti (preglednica VII).

V primeru raztapljanja tablet s HPMC se je v 24 urah sprostilo komaj 30 do 40 % učinkovine, tablete so bile tudi po koncu testa sproščanja še cele z dokaj koherentno strukturo. V tem primeru se v nobeni od posod ni sprostilo toliko učinkovine, da bi dosegli nasičeno topnost; ustreznost odmerka smo preverili z določitvijo vsebnosti. Tako v primeru tablet s karagenanom kot s HPMC pa smo določili večjo hitrost in obseg raztapljanja (do 15 %) za tablete, ki so vsebovale nanonizirano učinkovino.



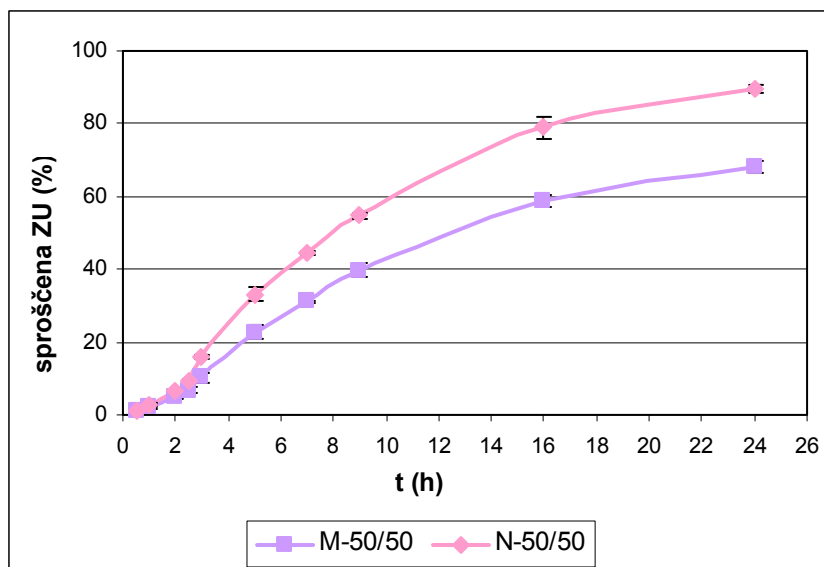
Slika 10: Profil sproščanja mikroniziranega (M) in nanoniziranega (N) celekoksiba iz tablet z a) iota-karagenanom (IOTA) in b) hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC) na BioDis-u.

Ker je v primeru karagenana kot tvorilca ogrodja tablete med testom sproščanja prišlo do presežka učinkovine (presežena nasičena topnost), smo poskus s temi ogrodnimi tabletami ponovili z drugim programom testa sproščanja (Program II – poglavje 3.3.10.1), kjer smo tablete preko vseh posod pomaknili v času 10-ih ur in na ta način omogočili časovno bolj enakomerno porazdelitev učinkovine po posodah (slika 11). Tudi v tem primeru rezultati kažejo na hitrejše sproščanje učinkovine iz tablet z nanoniziranim celekoksibom. Prav tako smo ugotovili, da je del učinkovine ob zadnjem času odvzema vzorca še vedno neraztopljen (kar smo dokazali po koncu preskusa z dodatkom SDS v posodice in ponovnim vzorčenjem), zato rezultati ne kažejo 100 % sprostitve učinkovine kljub temu, da so tablete popolnoma razpadle.



Slika 11: Profil sproščanja mikroniziranega (M) in nanoniziranega (N) celekoksiba iz tablet ($m=400$ mg) z iota-karagenanom (IOTA) po programu II na BioDis-u.

Na osnovi rezultatov testiranja tablet s samo enim polimerom smo se odločili tudi za izdelavo tablet, katerih ogrodje tvorita polimera v razmerju 1:1 (slika 12). Tableta s karagenanom je namreč razpadla po 9-ih urah in ne omogoča sproščanja učinkovine skozi 24 ur, medtem ko tableta zgolj iz HPMC po 24 urah še vedno vsebuje 60 do 70 % učinkovine.



Slika 12: Profil sproščanja mikroniziranega (M) in nanoniziranega (N) celekoksiba iz tablet z razmerjem polimerov HPMC in iota-karagenana 50:50 (50/50) na BioDis-u.

S slike 12 je razvidno, da kombinacija karagenana iota in HPMC K4M v razmerju 1:1 omogoča podaljšano sproščanje nanoniziranega celekoksiba skozi 24h, pri čemer tableta popolnoma erodira – razpade. Sproščanje je ponovno hitrejše v primeru nanoniziranega celekoksiba, ko se sprosti bistveno več (približno 20 %) celekoksiba.

Ker so oboje tablete (nanoniziran/mikroniziran celekoksib) v 24 urah popolnoma razpadle, bi pričakovali, da bodo rezultati kazali na to, da se je sprostil 100 % celekoksiba. Seštevek mas celekoksiba, ki smo jih določili po posameznih posodicah iz koncentracij, je pokazal, da se je iz tablet z mikronizirano učinkovino sprostil 68 % celekoksiba, iz tablet z nanonizirano pa 89 %. Pri tabletah z mikronizirano učinkovino je v posodicah ostala usedlina (neraztopljena učinkovina), medtem ko v primeru tablet z nanonizirano učinkovino v veliko manjši meri, kar nam ponovno kaže na to, da je bila v nekaterih medijih presežena nasičena topnost.

Z razlikami v profilih sproščanja nanoniziranega in mikroniziranega celekoksiba na BioDis-u smo dokazali, da ima manjša velikost delcev pomemben vpliv na hitrost raztapljanja učinkovine (sproščanje se pospeši v primeru vgrajene nanosuspenzije celekoksiba) tudi v sistemih z nadzorovanim sproščanjem.

Presenetljivo pa so bili profili vseh, po polimerih enakih sestavah, preskušanih tablet do 2. ure praktično identični, ne glede na to, ali je bil vgrajen nanoniziran ali mikroniziran

celekoksib. To pripisujemo enakemu začetnemu močenju in raztapljanju obeh v prisotnosti površinsko aktivne snovi (SDS), ki je bilo manj omejeno z difuzno bariero gelskega sloja, ki se je v tem času še vzpostavljala.

4.5.2. Sistem z dvofaznim medijem

Za testiranje sproščanja celekoksiba iz ogrodnih tablet z namenom poskušanja posnemanja obnašanja *in-vivo* ter prikaza razlik med formulacijami, smo preskusili tudi sistem z dvofaznim medijem fosfatni pufer pH=7/oktanol. Tovrstni dvofazni medij simulira sproščanje in sočasno prehajanje (absorpcijo) učinkovine. Sproščena učinkovina v pufru se porazdeljuje v organsko fazo in na ta način se do določene mere lahko zagotavljajo tudi »sink« pogoji. Seveda ob predpostavki, da je porazdeljevanje učinkovine hitrejše od sproščanja.

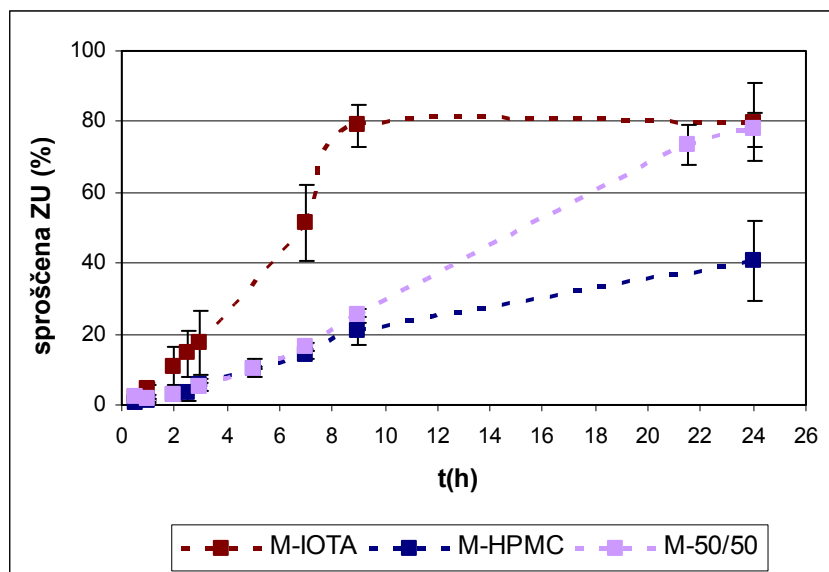
Pri dvofaznem mediju uporaba površinsko aktivnih snovi ni potrebna, po drugi strani pa tudi ni želena, saj lahko vodna in organska faza v takem primeru tvorita emulzijo.

Modificirana naprava 2 naj bi bila po literaturnih podatkih (29) najbolj ustrezna za posnemanje pogojev *in-vivo* pri uporabi dvofaznega medija fosfatni pufer pH=7/oktanol za FO s podaljšanim sproščanjem.

4.5.2.1. Preliminaren poskus za ugotovitev ustreznosti sistema

Za preliminarno oceno ustreznosti dvofaznega medija in pogojev meritev, smo na modificirani napravi 2 izvedli sproščanje iz tablet na osnovi mikroniziranega celekoksiba. Ocenili smo, da uporaba same naprave 1 ne bi zagotovila zadostnega mešanja medija, kar bi posledično vodilo do sedimentiranja učinkovine na dno posode. Ob uporabi naprave 2 pa bi lahko tableta zaradi hidrodinamike mešanja prišla na medfazno površino, kar pa tudi ni zaželeno.

V tej fazi nas je zanimalo le, če je sistem diskriminatoren med različnimi uporabljenimi sestavami polimerov ogrodnih tablet. Tako smo preverili sproščanje iz tablet na osnovi karagenana iota, HPMC K4M in kombinacije obeh v razmerju 1:1 (slika 13).



Slika 13: Profil sproščanja mikroniziranega celekoksiba (M) iz tablet z hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC), karagenanom iota (IOTA) in kombinacije HPMC/IOTA v ramerju 1:1 (50/50) z modificirano napravo 2 (vesla s košarico) v dvofaznem mediju.

Vidimo, da se je mikroniziran celekoksib najhitreje sproščal in porazdeljeval v primeru čistega iota karagenana, najpočasneje pa v primeru čistega HPMC K4M, kjer tableta tudi po 24 h ni razpadla. V primeru sproščanja iz tablet kombinacije karagenana iote in HPMC K4M je bilo sproščanje nadzorovano znotraj 24 h, tableta je v tem času razpadla.

Opazili smo tudi, da se po določenem času sistem nasiti, saj učinkovina očitno ne prehaja več v oktanolno fazo, zato je porazdeljevanje v primeru karagenana iote in kombinacije obeh polimerov nepopolno (v oktanolno fazo preide do 80 % učinkovine). Sklepali smo, da v spodnji fazi pride do prenasičenja in posledično obarjanja/adheriranja celekoksiba, ki se nato praktično ne raztoplja več. Dodatno dejstvo namreč je, da oktanolna faza s celekoksibom ni bila nasičena, saj je celekoksib v oktanolu zelo dobro topen, volumen uporabljenega oktanela pa je zagotavljal popolno raztopitev vsaj 15-kratnega odmerka. Prav tako uporabljeni polimeri, ki so počasi erodirali iz ogrodnih tablet, na porazdeljevanje in na morebitne interakcije, zaradi svoje relativno dobre hidrofilnosti, ne bi smeli vplivati.

Potencialno uporabo modificirane naprave 2 z dvofaznim medijem smo ocenili kot ustrezno. Zaradi nekoliko nepričakovanega porazdeljevanja učinkovine (porazdelilo se je do 80%) smo v nadaljevanju sočasno z vplivom velikosti delcev želeli preveriti tudi vpliv

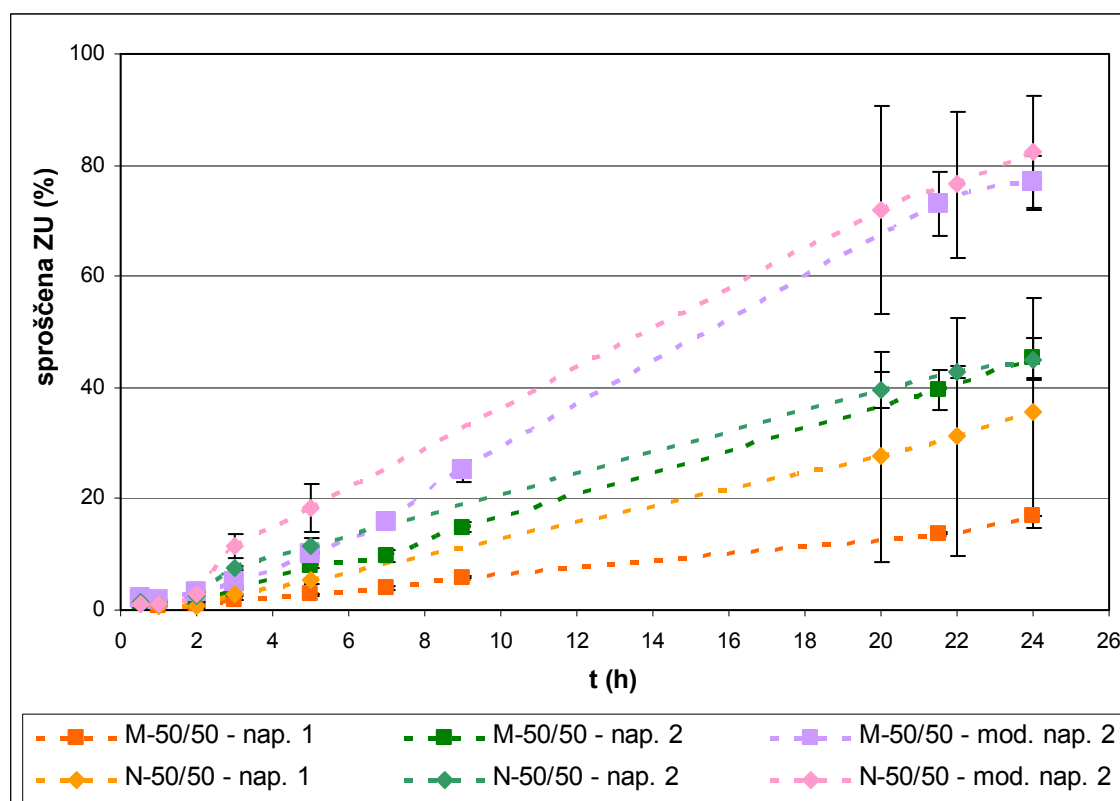
drugačne hidrodinamike (naprava 1, naprava 2) na obnašanje ogrodnih tablet. S tem smo želeli nekoliko zmanjšati intenzivnost hidrodinamike, zaradi česar bi bilo sproščanje učinkovine iz ogrodja lahko nekoliko počasnejše. S tem bi lahko zmanjšali hitrost nasičenja pufrne faze, kar bi lahko vodilo do manjšega obarjanja/adheriranja učinkovine in posledično do bolj sprotnega porazdeljevanja v oktanolno fazo. Na ta način bi pri nadaljnjem delu verjetno še lažje dokazali možne razlike med nanonizirano in mikronizirano učinkovino.

Ker smo želeli določiti morebitne razlike med nanoniziranim in mikroniziranim celekoksibom pri sproščanju iz ogrodnih tablet znotraj 24 h, smo za nadaljnje študije izbrali ogrodne tablete na osnovi kombinacije obeh polimerov v razmerju 1:1.

4.5.2.2. Sproščanje iz tablet na osnovi HPMC/IOTA v razmerju 1:1

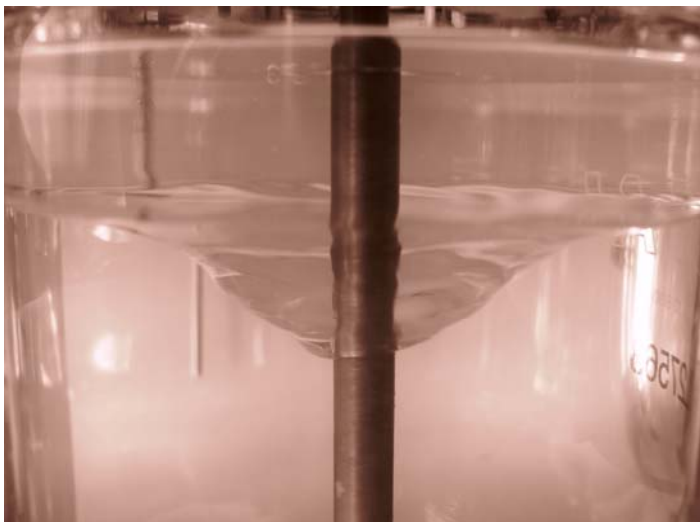
Iz rezultatov sproščanja nanoniziranega/mikroniziranega celekoksiba iz tablet na osnovi iota karagenana in HPMC K4M v razmerju 1:1 (slika 14) vidimo, da so bili rezultati nasprotni pričakovanim.

Pričakovali smo, da bomo z zmanjšano intenziteto hidrodinamike in posledično manjšo možnostjo doseganja nasičene topnosti (naprava 1, 2) dosegli še bolj sprotno porazdeljevanje v oktanolno fazo, s čimer bi naj še lažje opazili razlike med nanonizirano in mikronizirano učinkovino. Kot vidimo iz rezultatov (slika 14) temu ni tako. Z zmanjšanjem intenzitete hidrodinamike se je zmanjšala tudi porazdelitev celekoksiba v oktanolno fazo. Prvotno smo sklepali, da različna hidrodinamika bistveno vpliva tako na hitrost sproščanja učinkovine iz ogrodne tablete kot nato na porazdeljevanje učinkovine v organsko fazo. Ker pa smo pri vizualnem opazovanju obnašanja tablet ugotovili, da ne glede na uporabljeno napravo za sproščanje tablete popolnoma razpadejo – erodirajo ob približno enakem času (23 h), to pomeni, da različna hidrodinamika na proces sproščanja celekoksiba iz ogrodne tablete nima velikega vpliva, izredno pomembna pa je pri porazdeljevanju celekoksiba iz pufrne v organsko fazo.



Slika 14: Profil sproščanja mikroniziranega (M) in nanoniziranega (N) celekoksiba iz tablet z razmerjem polimerov (HPMC in iota-karagenan) 50:50 (50/50) v dvofaznem mediju (pufer pH=7,0/oktanol) z uporabo treh naprav (naprava 1 (nap. 1), naprava 2 (nap. 2) in modificirana naprava 2 (mod. nap. 2)).

Tako smo največjo hitrost porazdeljevanja sproščenega celekoksiba iz pufrne v organsko fazo določili pri tabletah, ki smo jih testirali z uporabo modificirane naprave 2 (kombinacije vesel in košaric), manjšo hitrost porazdeljevanj smo določili pri raztapljanju tablet z napravo 2 (vesla), najpočasneje pa je učinkovina prehajala v oktanolno fazo v primeru naprave 1 (košarice) (slika 14). Ta porazdeljevanja so v skladu z različno hidrodinamiko mešanja pri istih obratih na vseh treh napravah. Pri natančnejšem opazovanju smo opazili, da intenziteta mešanja posredno vpliva tudi na ukrivitev oziroma površino medfaze pufr/oktanola (slika 15). Na ta način se je pri bolj intenzivni hidrodinamiki povečala površina, preko katere je raztopljen celekoksib lahko prehajal iz pufrnega v organski medij in posledično je bil obseg porazdeljevanja večji.



Slika 15: : Ukrivljanje medfazne površine (pufer/oktanol) pri mešanju na napravi 2 (veslo) z hitrostjo 100 rpm v dvofaznem mediju.

Del sproščene učinkovine, ki ni prešel v oktanol, se je zaradi presežene nasičene topnosti oboril/adheriral in v oktanolno fazo v času testa sproščanja (24 h) ni prehajal. Posledično prehajanje učinkovine ni bilo 100 %. Možnost, da bi se oborjena/adherirana učinkovina nazaj raztapljala je bila zmanjšana, saj so se verjetno tvorili večji aglomerati oz. kristali, katerih poroznost je bila slaba.

Rezultati (slika 14) kažejo, da je bil prehod učinkovine v oktanolno fazo v vseh treh primerih (naprava 1 in 2 po Ph. Eu. 6th Ed.) najhitrejši za tablete z nanoniziranim celekoksibom. Tako se je v primeru kombinacije karagenana iote in HPMC K4M v razmerju 1:1 ob uporabi modificirane naprave 2 v 24 h v oktanolno fazo porazdelilo 82 % sproščene učinkovine.

Glede na rezultate bi torej lahko sklepali, da je sproščanje nanoniziranega celekoksiba nekoliko hitrejše. Vendar pa je potrebno upoštevati, da so bila pri preučevanju sproščanja in porazdeljevanja nanodelcev celekoksiba v dvofaznem sistemu prisotna tudi večja odstopanja med tabletami iste serije – velika standardna deviacija (slika 14). Ker so deviacije velike, je dejansko možno, da razlik med nanoniziranim in mikroniziranim celekoksibom ni oziroma so res minimalne. To pa seveda ni v skladu z našimi rezultati z BioDis-a (poglavje 4.5.1).

Možen razlog za majhne razlike v dobljenem profilu sproščanja iz tablet z mikroniziranim in nanoniziranim celekoksibom je, da je v obeh primerih hitro prišlo do nasičenja pufrne

faze dvofaznega medija (nasičena topnost celekoksiba v z oktanolom nasičenem pufrom je 2 mg/l), zaradi česar je bilo porazdeljevanje podobno. Prav tako je možno, da bi razlike zabrisali majhni, neraztopljeni delci, ki bi se z erozijo sproščali iz tablet z mikroniziranim celekoksibom. Ti bi se ob stiku z oktanolno fazo relativno dobro močili in prehajali v oktanol, kar bi posledično zmanjšalo razlike med tabletami z nanoniziranim/mikroniziranim celekoksibom.

Vzrok za večja odstopanja znotraj serij z nanoniziranim celekoksibom pa je verjetno v tem, da smo po naših poskusih ugotovili, da so bila določena mešala, s katerimi smo izvajali teste sproščanja ogrodnih tablet z nanoniziranim celekoksibom, netočno centrirana, kar je vplivalo na hidrodinamiko. Hkrati pa je tudi možno, da so se pri sproščanju na površini tablet tvorili zračni mehurčki, ki so vplivali na rezultate sproščanja.

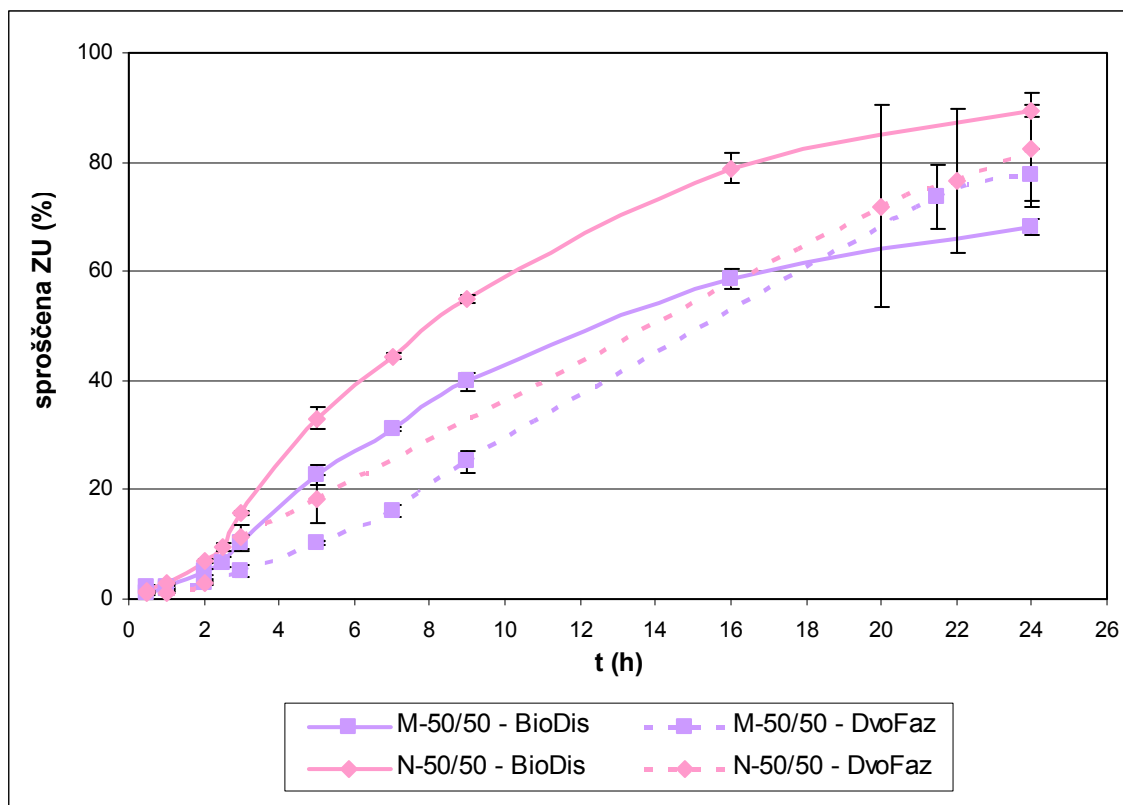
4.5.2.3. Primerjava sproščanja nanoniziranega/mikroniziranega celekoksiba iz ogrodnih tablet med napravo BioDis in modificirano napravo 2 z dvofaznim medijem

Iz rezultatov (slika 16) je razvidno, da je sproščanje na BioDis-u, kljub v nekaterih medijih doseženi nasičeni topnosti, hitrejše tako v primeru nanoniziranega kot mikroniziranega celekoksiba. Vrednosti sproščene celekoksiba bi bile tako lahko še nekoliko višje.

Opazimo pa lahko tudi sledeče: profili sproščanja so si tako v primeru nanoniziranega kot mikroniziranega celekoksiba po obliki precej podobni, ne glede na uporabljeno napravo. Razlike so le v obsegu sproščanja oziroma sproščanja/porazdeljevanja. Rezultati obeh naprav kažejo na to, da so vsi profili znotraj 20 – 30 % intervala v 24 h obdobju.

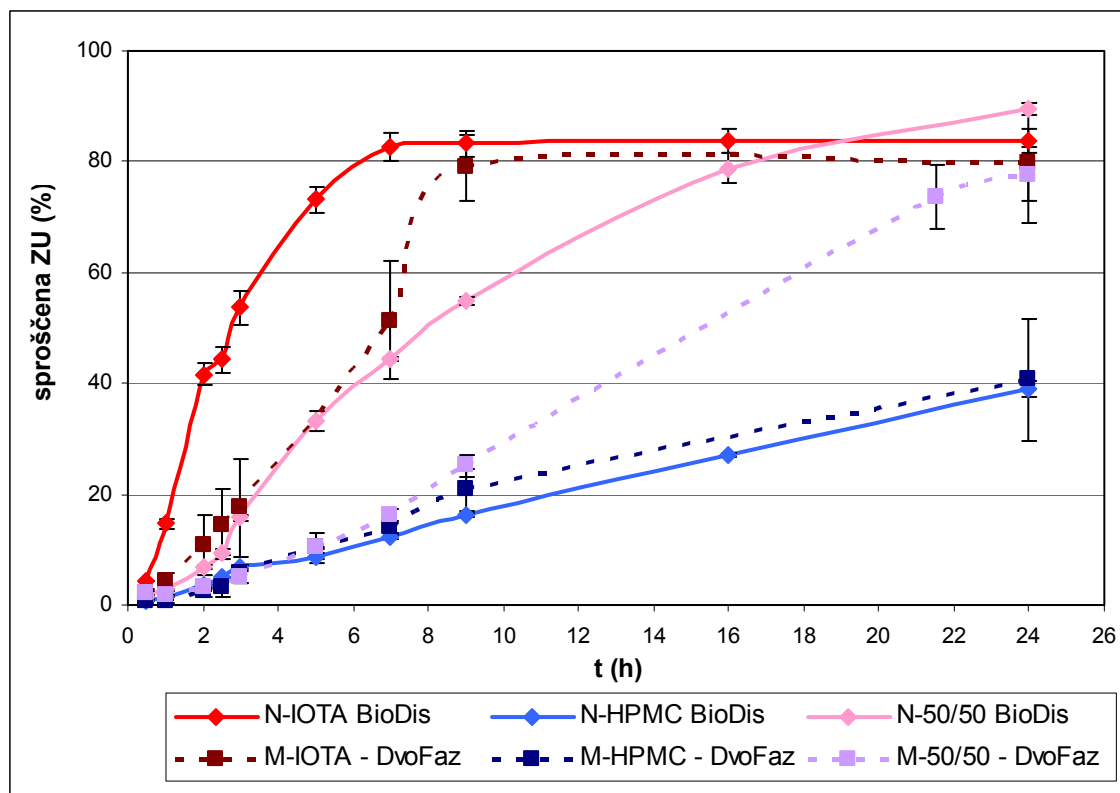
Na BioDis-u so razlike med sproščanjem nanoniziranega in mikroniziranega celekoksiba iz ogrodnih tablet na osnovi karagena iota in HPMC K4M v razmerju 1:1 (50/50) precejšnje – 20%.

Razlike med nanoniziranim in mikroniziranim celekoksibom so pri modificirani napravi 2 z dvofaznim medijem opazne, vendar jih zaradi večje standardne deviacije ne moremo opredeliti kot signifikantne.



Slika 16: Profil sproščanja mikroniziranega (M) in nanoniziranega (N) celekoksiba iz tablet z razmerjem polimerov (HPMC in iota-karagenan) 1:1 (50/50) z uporabo BioDis-a (BioDis - polna črta) in modificirane naprave 2 z dvofaznim medijem (DvoFaz - črtkana črta).

Ob upoštevanju teh ugotovitev in ob primerjavi rezultatov sproščanja različnih sestav ogrodnih tablet (slika 17), lahko tudi predvidevamo, kakšni bi bili rezultati za nanoniziran celekoksib na modificirani napravi 2 z uporabo dvofaznega medija, če bi namesto kombinacije iota karagenana in HPMC K4M uporabili čist iota karagenana ali pa HPMC K4M. Profil sproščanja bi bil po vsej verjetnosti podoben profilu sproščanja mikroniziranega celekoksiba na modificirani napravi 2, nikakor pa ne bi bil profil hitrejši od sproščanja nanoniziranega celekoksiba na BioDis-u.



Slika 17: Profil sproščanja mikroniziranega (M) in nanoniziranega (N) celekoksiba iz tablet z hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC), karagenanom iota (IOTA) in kombinacijo HPMC in karagenana iota z razmerjem 1:1 (50/50) z uporabo BioDis-a (BioDis - polna črta) in modificirane naprave 2 v dvofaznem mediju (DvoFaz - črtkana črta).

Glede ugotavljanja razlik med nanoniziranim/mikroniziranim celekoksibom bi torej lahko dejali, da so razlike najbolj izražene na BioDis-u. Pri tem moramo opomniti, da smo pri slednjem uporabili tudi površinsko aktivno snov – SDS, ki bi se ji načeloma raje izognili, vendar pa so tudi s slednjo že mnogokrat dokazali dobro korelacijo z *in-vivo* obnašanjem. Po drugi strani pa velja še enkrat omeniti, da tudi modificirana naprava 2 z dvofaznim medijem ni vedno uporabna.

Skupno obema napravama je, da je oblika profila sproščanja oziroma sproščanja/porazdeljevanja podobna, variira le obseg sproščanja.

Dejanske razlike med ogrodnimi tabletami z nanoniziranim oziroma mikroniziranim celekoksibom ter katera izmed obeh metod sproščanja daje boljšo napovedljivost *in-vivo*, bi lahko dokazali le s pravimi *in-vivo* študijami.

5. SKLEPI

- Iz mikrodolcev celekoksiba smo z emulzijsko-difuzijsko metodo z uporabo visokotlačnega homogenizatorja uspeli izdelati nanosuspenzijo, kjer je bilo 80 % delcev v območju med 0,15 do 0,96 μm .
- Nanosuspenzijo smo posušili s sušenjem z razprševanjem in dobili suhe nanodelce celekoksiba, katerih velikost se je rahlo povečala (med 0,18 in 1,67 μm) glede na delce v nanosuspenziji.
- Z zmanjšanjem velikosti delcev celekoksiba do nanodelcev smo povečali nasičeno topnost.
- Iz nanoniziranega in mikroniziranega celekoksiba smo uspeli izdelati ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem na osnovi karagenana iota in HPMC K4M ter kombinacije obeh.
- Izdelane tablete so izkazovale ustrezno trdnost, enakomernost mase in vsebnosti.
- Ogrodne tablete s prirejenim sproščanjem na osnovi HPMC zagotavljajo podaljšano sproščanje več kot 24 ur, medtem ko uporaba samega iota-karagenana nadzoruje sproščanje 8 ur.
- S kombinacijo obeh polimerov v razmerju 1:1 smo zagotovili podaljšano sproščanje 100 mg odmerka celekoksiba znotraj 24 ur.
- Rezultati sproščanj nanoniziranega in mikroniziranega celekoksiba iz ogrodnih tablet na osnovi kombinacije karagenana iota in HPMC K4M v razmerju 1:1 na BioDis-u, kažejo, da so razlike v sproščanju kar velike – učinkovina se sprošča iz tablet z nanoniziranim celekoksibom tudi do 20 % hitreje.
- BioDis simulira pH in hidrodinamiko gibanja prebavnega trakta, za večjo topnost učinkovine v mediju pa smo uporabili površinsko aktivno snov – natrijev lavril sulfat, ki včasih lahko spremeni odraz dejanskega stanja »*in-vivo*«.
- Modificirana naprava 2 z dvofaznim medijem, ki je sočasno s sproščanjem omogočala porazdeljevanje učinkovine v organsko fazo, je razlike med nanoniziranimi in mikroniziranim celekoksibom precej zakrila – nesignifikantno hitrejšo sproščanje iz ogrodnih tablet z nanoniziranim celekoksibom.
- Razlike bi lahko zmanjšali manjši, neraztopljeni mikronizirani delci celekoksiba, sproščeni z erozijo iz tablet, ki se relativno dobro močijo na medfazi in posledično dobro

prehajajo v oktanol. Velik problem pri modificirani napravi 2 z dvofaznim medijem je predstavljala slaba ponovljivost med rezultatih.

- Hidrodinamika mešanja je pri uporabi dvofaznega medija tako za tablete z nanoniziranim kot mikroniziranim celekoksibom odločujoča – bistveno vpliva na prehod učinkovine v oktanol, v našem primeru pa zelo malo na samo sproščanje.
- Večja kot je bila intenziteta mešanja, boljše je bilo prehajanje celekoksiba v oktanol (modificirana naprava 2 > naprava 2 > naprava 1).
- Skupno BioDis-u in modificirani napravi 2 z dvofaznim medijem je, da je oblika profila sproščanja oziroma sproščanja/porazdeljevanja celekoksiba podobna, variira le obseg sproščanja.
- Ugotovili smo, da so razlike v sproščanju nanoniziranega in mikroniziranega celekoksiba iz FO s prirejenim sproščanjem odvisne od uporabljenega sistema za spremljanje sproščanja. Dejanske razlike ter smiselnost vgradnje nanoniziranega celekoksiba v ogrodne tablete pa bi pokazale šele »*in-vivo*« študije.

6. LITERATURA

- 1 Pečar-Čad S: Register zdravil republike Slovenije, Ljubljana: Ministrstvo za zdravstvo: Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke: Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Ljubljana, 2008.
- 2 Scientific discussion on Onsenal (EMA 2005) (dostopno na elektronskem naslovu: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/onsenal/onsenal.htm> maja 2009).
- 3 He X, Barone R M, Marsac J P, Sperry D C: Development of rapidly dispersing tablet of a poorly wettable compound – formulation DOE and mechanistic study of effect of formulation excipients on wetting of celecoxib. *Int J Pharm* 2008; 353: 176-186.
- 4 Paulson K. S, Vaughn B. M, Jessen M S, Lawal Y, Gresk J. C, Yan B, Mazias J. T, Cook S. C, Karim A: Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption. *Int J Pharmacology an experimental therapeutics* 2001; 297.
- 5 Rao S C G, Satish Kumar M, Mathivanan N, Bhanoji Rao M E: Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticulate drug delivery systems. *Pharmazie* 2004; 59: 5-9.
- 6 SmPC (Povzetek glavnih značilnosti zdravila) za Celebrex® 100 mg in 200 mg trde kapsule in ONSENAL® 200 mg in 400 mg trde kapsule
- 7 Kos-Golja M: Uporaba COX-2 selektivnih nesteroidnih antirevmatikov pri rakavih bolnikih. *Onkologija* 2003; 7.
- 8 Pečar S: Inhibitorji ciklooksigenaze-2 kot antirevmatiki. *Farm Vestn* 2004; 55: 119-123.
- 9 Krčevski-Škvarč N, Rozman-Marčič J, Ivanuša M: Nekateri novejši pogledi na nesteroidne antirevmatike. *Zrav Vestn* 2001; 70: 405-13.
- 10 Than J. M, Henley S J, Patrono C: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues. *J National Cancer Institute* 2002; 94; 2: 252-261.

- 11 Grösch S, Jürgen Maier T, Schiffmann S, Geisslinger G: Cyclooxygenase-2 (COX-2) – independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J National Cancer Institute* 2006; 98;11: 736-747.
- 12 Maier J. T, Tausch L, Hoernig M, Coste O, Schmidt R, Angioni C, Metzner J, Groesch S, Pergola C, Steinhilber D, Werz O, Geisslinger G: Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology* 2008; 76: 862-872.
- 13 Patravale V B, Abhijit A, Kulkarni R M: Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 827-840.
- 14 Van Eerdenbrug B, Van den Mooter G, Augustijns P: Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm* 2008; 364: 64-75.
- 15 APV Lab Series Homogenisers propagandni material iz uradne strani (marec 2009).
- 16 Rabinow B: Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 785-796.
- 17 Sasson Y, Levy-Ruso G, Toledano O, Ishaaya O: Nanosuspensions: Emerging Novel Agrochemical Formulations. (dostopno na elektronskem naslovu: http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783540469049-c1.pdf?SGWID=0-0-45-338989-p173695304 maja 2009).
- 18 Chandran S, Ravi P, N.Saha R: Development and in-vitro evaluation of oral controlled release formulations of celecoxib using optimization techniques. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 505-514.
- 19 Špajzer K: Izdelava in vrednotenje tablet s podaljšanim sproščanjem na osnovi kombinacij karagenanov in HPMC. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008.
- 20 Hite M, Tumer S, Federici C: Part 1: Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs. *PMPS Summer*, pp38-40, 2003.
- 21 Podgrajšek M: Izdelava in vrednotenje tablet s podaljšanim sproščanjem na osnovi karagenanov in primerjava s tabletami iz HPMC. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
- 22 Vergote G J, Vervaet C, Van Driessche I, Hoste S, De Smedt S, Demeester J, Jain R A, Ruddy S, Remon J P: An oral controlled release matrix pellet formulation containing nanocrystalline ketoprofen. *Int J Pharm* 2001; 219: 81-87

- 23 Aulton E M: Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines.3, izdaja, Churchill Livingstone, 2007.
- 24 <http://www.fmcbiopolymer.com/PopularProducts/FMCCarrageenan/Introduction/tabid/804/Default.aspx> (dostop februar 2008).
- 25 Hariharan M, Wheatley TA, Price JC: Controlled-release tablet matrices from carrageenans: compression and dissolution studies. Pharm Development and Technology 1997; 2: 383-393.
- 26 Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 48: 139-157.
- 27 Božič V: Vpliv karagenanov na sproščanje kationske učinkovine iz ogrodnih tablet. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008.
- 28 B. Dressman Jennifer, Reppas C: In vitro- in vivo correlations for lipophilic, poorly water- soluble drugs. E J Pharm Sci 2000; 11; Supp. 2: S73-S80.
- 29 Grundy S. J, Anderson E. K, Rogers A. J, Foster T. R: Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. Description of a two-phase in vitro dissolution test. J Contr Release 1997; 48: 1-8.
- 30 Hoa N T, Kinget R: Design and evaluation of two-phase partition-dissolution method and its use in evaluating artemisini tablets. J Pharm Sci 1996; 85.
- 31 Borst I, Ugwu S, Beckett A H: New and extended applications for USP Drug Release Apparatus 3. Dissolution Technologies; 1997: Feb:13-18.
- 32 Shah P. V, Noory A, Noory C, McCullough B, Clarke S, Everett R, Naviasky H, Srinivasan B N, Fortman D, P Skelly J: In vitro dissolution study of sparingly water-soluble drug dosage forms. Int J Pharm 1995; 125: 99-106.
- 33 Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Planinšek O: Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. Int J Pharm 2009, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.038. (v tiskanju)
- 34 Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J: Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. Int J Pharm 2006; 312: 179-186.
- 35 Hite M, Turner S, Federici C: Oral Delivery of poorly Soluble Drugs, Part 2 (dostopno na elektronskem naslovu: http://www.scolr.com/lit/PMPS_2003_2.pdf; maj 2009)

- 36 Domicic A: Extended release pharmaceutical composition of celecoxib. Patent Cooperation Treaty, International Publication Number WO 2006/056770 A1, International Publication Date Jun. 1, 2006.
- 37 Seedher N, Bhatia S: Solubility Enhancement of Cox-2 Inhibitors Using Various Solvent Systems. AAPS Pharm Sci Tech 2003; 4.
- 38 Colombo P, Bettini R, Santi P, De Ascentiis A, Peppas NA: Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. J Contr Release 1996; 39: 231-237.
- 39 Heng D, J. Cutler D, Chan HK, Yun J, A.Raper J: What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles. Pharmaceutical Research; 2008; 25.
- 40 Brown K. C, Chokshi P. H, Nicherson B, Reed A. R, Rohrs R. B, Shah A. P: Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. Pharmaceutical Technology 2004: December: 56-65.
- 41 Haupt S, Zioni T, Gati I, Kleinstern J, Rubinstein A: Luminal delivery and dosing considerations of local celecoxib administration to colorectal cancer. E J Pharm Sci 2006; 28: 204-211.
- 42 Siewert M, Dressman J, Brown C, Shah V: FIP/AAPS Guidelines for Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. Dissolution Technologies; 2003: Feb:6-15.
- 43 Pillay V, Fassihi R: Unconventional Dissolution Methodologies. J Pharm Sci 1999; 88 (9): 843-851.
- 44 Rowe C R, Sheskey J P, Owen C S: Handbook of pharmaceutical excipients, fifth edition, American Pharmacist Association, Velika Britanija, 2006.