

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



URŠA HABIČ

**PROUČEVANJE VPLIVA Na-LAVRILSULFATA NA SPROŠČANJE
DOKSAZOSIN MESILATA**
**THE INFLUENCE OF Na-LAURYL SULFATE ON THE RELEASE OF
DOXAZOSIN MESYLATE**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner, mag. farm.

Zahvala

Mentorici, izr. prof. dr. Saši Baumgartne, mag. farm. se iskreno zahvaljujem za strokovno vodenje in pomoč pri diplomskem delu. Najlepše se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, še posebno Tatjani Hrovatič.

Posebno zahvala pa gre mojim staršem, starim staršem in fantu, ki brez izjem vedno verjamejo vame in me spodbujajo. Hvala, tudi kolegicam in prijateljicam, za vse lepe trenutke in podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Saše Baumgartner, mag. farm.

Urša Habič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK.....	5
OKRAJŠAVE (urejeno po abecedi).....	7
1. UVOD	8
1.1. Peroralne farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem	8
1.2. Hidrofilne ogrodne tablete	9
1.3. Kompleksnejši sistemi na osnovi hidrofilnih ogrodnih tablet.....	10
1.4. Karagenani	11
1.5. Doksazosin mesilat.....	14
1.6. Interakcije med ZU in ogrodnim polimerom	15
1.7. Preskusi raztapljanja.....	16
1.8. Pogoji v GIT.....	17
1.9. Posnemanje pogojev GIT pri poskusih sproščanja.....	18
2. NAMEN DELA	20
3. EKSPERIMENTALNO DELO.....	21
3.1. Materiali	21
3.1.1. Učinkovina in pomožne snovi.....	21
3.1.2. Reagenti za pripravo medijev za sproščanje	23
3.2. Naprave	23
3.3. Postopki in metode	24
3.3.1. Izdelava tablet	24
3.3.2. Enakomernost mase tablet.....	25
3.3.3. Enakomernost vsebnosti enodmernih farmacevtskih oblik.....	25
3.3.4. Trdnost tablet.....	25
3.3.5. Določanje površinske napetosti medijev za sproščanje.....	26
3.3.6. Izdelava umeritvenih premic za določanje koncentracije sproščene učinkovine	27
3.3.7. Priprava medijev za sproščanje	29
3.3.8. Sproščanje učinkovine iz tablet.....	29

4. REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1. Vrednotenje ogrodnih tablet.....	31
4.1.1. Enakomernost mase ogrodnih tablet	31
4.1.2. Enakomernost vsebnosti ZU v ogrodnih tabletah	32
4.1.3. Trdnost tablet.....	32
4.2. Določanje površinske napetosti z Wilhelmyjevo metodo	34
4.3. Sproščanje učinkovine iz ogrodnih tablet	37
4.3.1. Sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi.....	38
4.3.2. Sproščanje učinkovine iz tablet v fosfatnem pufru pH 7	44
4.3.3. Primerjava profilov sproščanja učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi in fosfatnem pufru pH 7	49
5. SKLEP.....	53
6. LITERATURA.....	55

POVZETEK

Uporaba farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem omogoča bolniku prijaznejše zdravljenje, z manjšim številom odmerjanj in posledično manjšim nihanjem plazemskih koncentracij učinkovine v telesu. Najpogosteje uporabljene med njimi so hidrofilne ogrodne tablete, katerih osnova je nabreklijiv polimer. Med takšne prištevamo tudi karagenane, ki sodijo med polisaharide anionskega značaja in se v vodnih raztopinah obnašajo kot polielektroliti. V svoji strukturi imajo različno število sulfatnih skupin na osnovnih disaharidnih enotah, na katere se vežejo nasprotno nabite molekule, kot na primer uporabljena modelna učinkovina, doksazosin mesilat (DM). Znano je, da karagenani z DM tvorijo kompleks in da se hitrost sproščanja učinkovine ujema s številom sulfatnih skupin na osnovnih disaharidnih enotah. Nižji kot je naboj na karagenanu, hitrejša je sproščanje.

Namen našega dela je bilo proučevanje vpliva površinsko aktivne snovi Na-lavrilsulfata (SDS) na sproščanje zdravilne učinkovine. S pomočjo SDS smo želeli posnemati približne fiziološke vrednosti površinske napetosti v GIT, ki so po literaturnih podatkih znašale v času po hranjenju $47 \pm 0,3$ mN/m in na tešče, $53 \pm 0,4$ mN/m. Površinsko napetost v medijih za sproščanje s SDS, smo določili s pomočjo tenziometra. Na podlagi zmanjševanja koncentracije SDS v vodnem mediju in fosfatnem pufru s pH 7 se nam je uspelo približati željenim vrednostim. Izdelali smo tablete iz karagenanov kapa, jota in lambda in modelne učinkovina DM ter jih ovrednotili po Ph. Eur. Sproščanje zdravilne učinkovine iz tablet smo spremljali 24 ur na napravi z vesli (naprava 2 po Ph. Eur.). Sproščanje učinkovine iz tablet je bilo pri fizioloških površinskih napetostih zelo počasno, v 24 urah se je sprostil največ 17 % zdravilne učinkovine, zato sproščanja nismo nadaljevali v biorelevantnih medijih, temveč smo začeli proučevati, katera koncentracija SDS bi bila dovolj visoka, da odtegne učinkovino iz kompleksa s karagenanom oziroma destabilizira kompleks med njima. SDS je namreč anionska površinsko aktivna snov, ki s karagenanom tekmuje za vezavno mesto z DM.

Ugotovili smo, da količina dodanega SDS mediju, vpliva na sproščanje DM. Z nižanjem količine dodanega SDS se signifikantno zmanjša tudi količina sproščene učinkovine.

Ugotovili smo, da mora biti koncentracija SDS veliko višja od kritične micelne koncentracije površinsko aktivne snovi, da odtegne DM iz kompleksa s karagenanom in tvori micel z učinkovino. Koncentracija SDS, ki je potrebna za cepitev kompleksa in sprostitvev celotne učinkovine, je nižja v fosfatnem pufru, in sicer med 1,25 in 1,5 g/l, medtem ko je v vodnem mediju 1,7 g/l.

Primerjali smo tudi sproščanja v vodnem mediju in fosfatnem pufru pH 7 brez dodatka SDS. V prvem primeru se je iz karagenana kapa sprostito okoli 36 % učinkovine, iz karagenana jota okoli 10 % in iz karagenana lambda okoli 30 % učinkovine. V fosfatnem pufru pH 7 pa se je iz karagenana kapa prav tako sprostito 36 % učinkovine, iz karagenana jota 29 % in iz karagenana lambda 26 % učinkovine. Največja razlika v sproščanju je opazna v primeru karagenana jota, saj so v fosfatnem pufru pH 7 prisotni različni ioni, ki so odgovorni za nastanek dvojne vijačnice, ki pospeši sproščanje učinkovine zaradi zmanjšanja interakcij med karagenanom jota in DM. Pri karagenanu kapa in lambda pa vpliv elektrolitov ni bil opazen. Nato smo primerjali sproščanje v obeh medijih ob dodatku SDS. Efekt elektrolitev je bil bolj opazen pri višjih koncentracijah SDS, še posebno 1,5 g/l, saj se je v fosfatnem pufru pH 7 sprostita celotna količina učinkovine iz vseh treh tipov karagenanov, medtem, ko se pri isti koncentraciji v vodnem mediju ni. Elektroliti tekmujejo z učinkovino za vezavna mesta na karagenanu in tako pospešijo sproščanje učinkovine. Hkrati pa tudi SDS tekmuje za vezavno mesto z DM. Na koncu smo ugotovili, da poleg SDS vpliva na sproščanje celotna sestava okoljnega medija ter, da je za popolno sprostitvev odmerka iz karagenana potrebna koncentracija SDS nad njegovo kritično micelno koncentracijo.

OKRAJŠAVE (urejeno po abecedi)

CMC-kritična micelna koncentracija

DM-doksazosin mesilat

FO-farmaceutvska oblika

GIT-gastrointestinalni trakt

MMC- migracijski motorični kompleks

PE-polielektrolit

PAS-površinsko aktivna snov

SD-standardna deviacija

SDS-Na-lavril (dodecil) sulfat

$t_{1/2}$ -biološki razpolovni čas

USP-Ameriška farmakopeja

ZU-zdravilna učinkovina

κ -oznaka za karagenan kapa

ι -oznaka za karagenan jota

λ -oznaka za karagenan lambda

1. UVOD

1.1. Peroralne farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem

Peroralno odmerjanje zdravil je najpogostejše tako za konvencionalne farmacevtske oblike, kot tudi nove dostavne sisteme, predvsem zaradi večje sprejemljivosti s strani pacienta in enostavnega odmerjanja.

Kadar govorimo o farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem, pa z zmanjšano pogostostjo odmerjenja, zmanjšanimi odmerki zdravil, hkrati pa vzdrževanjem optimalne koncentracije zdravilne učinkovine v plazmi, zmanjšanjem možnosti za neželjene učinke zaradi manjših nihanj koncentracije ZU v plazmi, zagotovimo večjo complianco pacienta, hkrati pa krajši čas oskrbe pacienta in stroškovno bolj učinkovito terapijo (1).

Opozoriti moramo tudi na nekatere slabosti farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem. Obstaja možnost sprostitve celotnega odmerka ZU naenkrat, s čimer je lahko presežena maksimalna koncentracija ZU. Slabost peroralnih oblik s prirejenim sproščanjem je tudi zmanjšana možnost individualnega odmerjanja, saj farmacevtskih oblik, s katerimi dosežemo tovrstno sproščanje, ne smemo prilagajati z lomljenjem. Tako je v FO s prirejenim sproščanjem načeloma smiselno vgraditi učinkovine:

- s primernim razpolovnim časom ($2 \text{ h} < t_{1/2} < 8 \text{ h}$), saj tako zmanjšamo pogostost jemanja zdravil;
- s hitrostjo absorpcije, ki je večja od hitrosti sproščanja iz FO. To lahko dosežemo tudi z izborom ustreznih pomožnih snovi, kot so selektivni pospeševalci absorpcije;
- ki se ne metabolizirajo v svetlini prebavnega trakta ali v črevesnem tkivu in nimajo obsežnega predsistemskega metabolizma;
- z velikostjo odmerka največ do 1 g;
- s poznanim porazdelitvenim koeficintom (visok porazdelitveni koeficient nam pove, da je učinkovino dobro topna v lipidih in slabo topna v vodi, dobro pa tudi prehaja biološke membrane ter se dlje časa zadržuje v telesu);

- s spodnjo mejo topnosti 0,1 mg/ml, saj nam v nasprotnem primeru topnost učinkovine nadzira sproščanje (1).

Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanje razdelimo na:

Farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanje (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 (pulsativ-release dosage forms), ki sproščajo zdravilno učinkovino v določenih časovnih intervalih (2).

1.2. Hidrofilne ogrodne tablete

Ogrodna tableta je sistem za dostavo ZU, v katerem je ZU molekularno ali po delcih dispergirana v funkcionalni pomožni snovi, ki tvori ogrodje in s tem nadzoruje sproščanje iz FO. V primeru hidrofilnih ogrodnih tablet ogrodje tvori topni hidrofilni polimer, ki ob stiku z vodo na površini tablete nabreka in tvori viskozno gelsko plast. Od debeline gelske plasti in njegove strukture je odvisna hitrost sproščanja ZU (3).

Hidrogel tvori mreža, ki lahko absorbira velike količine vode. Pri vezavi vode prihaja do nabrekanja polimerne mreže, zmanjša se temperatura steklastega prehoda polimera in ta preide iz steklastega v elastično zmečano stanje, zaradi česar se poveča mobilnost polimernih verig. Na zunanem delu tablete, se začne tvoriti gel, skozi katerega se sprošča raztopljena ZU. Ko se verige polimera začno razpletati, se po določenem času posamično ali v skupkih ločijo od plasti gela okoli tablete. Ta proces imenujemo erozija ogrodnega polimera (4).

Nabrekanje in erozija gelske plasti ter difuzija vode proti notranjosti tablete potekajo sočasno, dokler ne erodira celotno hidrofilno ogrodje. Med vsem tem časom se hidrofilno ogrodje nenehno spreminja (4, 5).

V tableti se med sproščanjem, zaradi nešteti procesov, izoblikujejo različne fronte:

- Erozijska fronta tablete (meja med gelom in okoljnim medijom).
- Nabrekajoča fronta tablete (meja, kjer polimer prehaja iz steklastega v zmečano, elastično stanje-gel).
- Penetracijska fronta tablete (meja, med suhim polimerom in polimerom, ki je omočen, vendar je še vedno v steklastem stanju).
- Suho jedro (neomočen del tablete) (5, 6).

1.3. Kompleksnejši sistemi na osnovi hidrofilnih ogrodnih tablet

Kot smo že omenili, sta glavna mehanizma sproščanja ZU iz ogrodnih tablet raztapljanje in difuzija. V primeru hidrofilnih ogrodnih tablet nanju vplivamo z nabrekanjem in erozijo ogrodnih polimerov. Obstajajo pa tudi kompleksnejši sistemi, ki poleg nabrekanja in erozije izkoriščajo tudi intermolekularne interakcije med učinkovino in ogrodnim polimerom, ali pa med samimi ogrodnimi polimeri. Bistveno je, da te interakcije med snovmi omogočajo spreminjanje sproščanja ZU (7).

Intermolekularne interakcije, ki jih izkoriščamo za prirejeno sproščanje ZU razdelimo na:

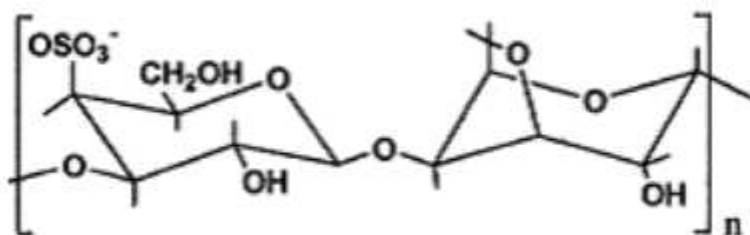
- **Elekrostatske oz ionske sile** prištevamo k fizikalnim silam, ker delujejo na večjih razdaljah kot denimo kovalentne sile. Prisotne so le v sistemih z nabitimi atomi ali molekulami.
- **Vodikove vezi** so privlačne interakcije med molekulo, ki vsebuje atom vodika vezan na elektronegativen atom, in močno elektronegativnim atomom. Energija vodikove vezi je v primerjavi z elektrostatskimi majhna, vendar ob tvorbi večjega števila vodikovih vezi pride do zelo močne skupne energije interakcij.

- **Van der Waalsove sile** so relativno šibke sile, ki se pojavijo med vsemi molekulami in so posledica trajnih in induciranih dipolov v molekulah.
- **Hidrofobni efekt** je tendenca hidrofobnih molekul ali hidrofobnih delov molekul, da se izogibajo kontaktu z vodo. Take molekule se združujejo v skupke, da je površina med vodo (polarnimi) in nepolarnimi molekulami čim manjša. Hidrofobni efekt je termodinamsko ugoden, saj se poveča entropija vodnih molekul na račun združevanja hidrofobnih molekul (8, 9).

1.4. Karagenani

Karagenani spadajo med naravne polisaharide anionskega značaja. Pridobivajo jih z ekstrakcijo iz celičnih sten rdečih alg razreda *Rhodophyceae*. Najbolj pomembne družine znotraj tega razreda so *Gigartinaceae*, *Hypneaceae*, *Phyllophoraceae* in *Solieriaceae* (10, 11).

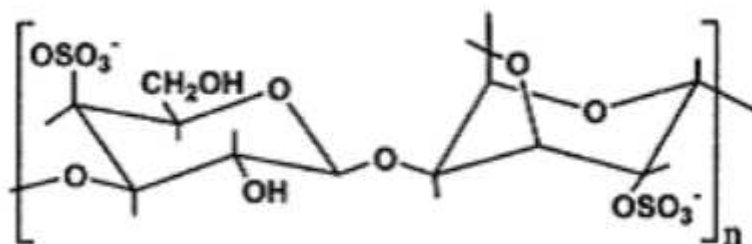
Komercialno najbolj uporabne so tri vrste karagenanov: κ (kapa), λ (lambda), ι (jota). Karagenani so linearni, visokomolekularni, anionski, delno sulfatirani galaktani. Sestavljeni so pretežno iz natrijevih, kalijevih, kalcijevih in magnezijevih soli sulfatnih estrov galaktoze in 3,6-anhidrogalaktoze. Sladkorne enote so povezane z menjajočimi se 1,3- α in 1,4- β glikozidnimi vezmi (10, 11).



Slika 1: Primarna struktura disaharidne enote κ -karagenana (12).

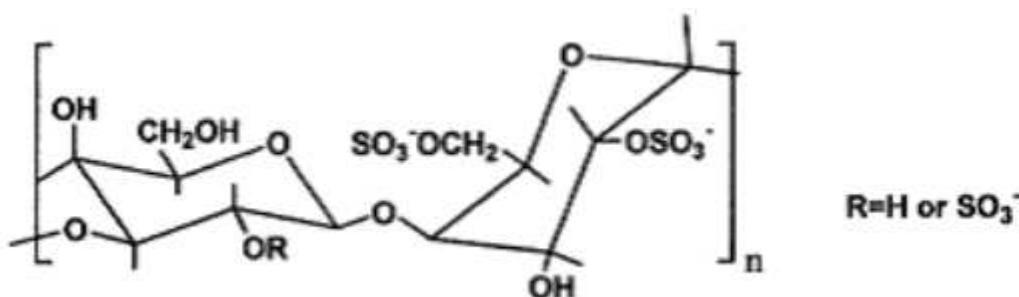
Karagenan kapa (slika 1) je kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze, enote so med seboj povezane z 1,3- α in 1,4- β glikozidno vezjo. Teoretično ima v strukturi

eno sulfatno skupino na dve monosaharidni enoti. V vodi ob zadostni koncentraciji tvori gel (11).



Slika 2: Primarna struktura disaharidne enote ι -karagenana (12).

Karagenan jota (slika 2) je kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze-2-sulfata, enote so med seboj povezane z 1,3- α in 1,4- β glikozidno vezjo. V strukturi ima teoretično eno sulfatno skupino na eno monosaharidno enoto. V vodnem mediju lahko tvori gel (11).



Slika 3: Primarna struktura disaharidne enote λ -karagenana (12).

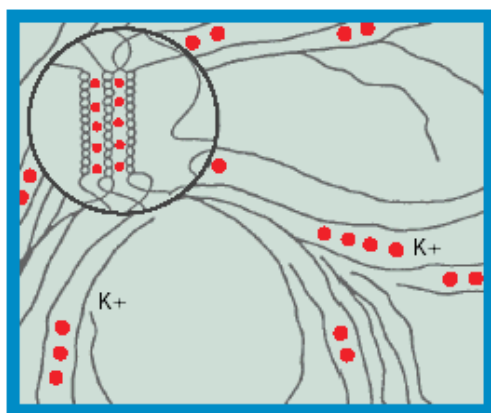
Karagenan lambda (slika 3) je kopolimer D-galaktoze-2-sulfata in D-galaktoze-2,6-disulfata, enote so med seboj povezane z 1,3- α in 1,4- β glikozidno vezjo. V strukturi ima teoretično tri sulfatne skupine na dve monosaharidni enoti. Tvori zelo viskozne strukture (11).

Vse prikazane strukture so idealizirane, saj so v realnih vzorcih prisotne tudi drugače substituirane regije. Kljub nadzorovanemu gojenju rdečih alg, produkt še vedno ni

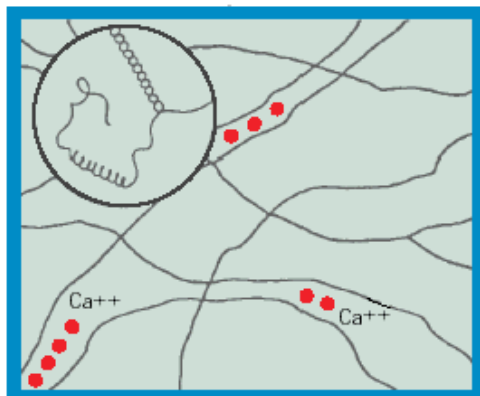
popolnoma homogene sestave, problematična pa je tudi ponovljivost lastnosti med serijami (12).

Nastanek gela iz κ - in ι -karagenana

Nastanek gela poteka v vodi ob zadostni koncentraciji karagenana, ki preide prek več različnih konformacij do ustrezne urejenosti. Nastanek gela iz κ -karagenana se začne z linearno verigo preko dvojne vijačnice do med seboj povezanih dvojnih vijačnic (slika 4). Pri ι -karagenanu gel nastane prav tako s povezovanjem linearnih verig, vendar naj bi se proces nastanka gela ustavil pri tvorbi dvojne vijačnice, do povezovanja dvojnih vijačnic, kot pri κ -karagenanu, naj ne bi prišlo (slika 5). Na nastanek dvojnih vijačnic pri κ - in ι -karagenanu, kot tudi na povezave dvojnih vijačnic pri κ -karagenanu vpliva prisotnost ionov. Na κ -karagenan najmočneje vplivajo K^+ ioni, saj se v njihovi prisotnosti tvori najmočnejši gel, medtem ko na nastanek gela pri ι -karagenanu najmočneje vplivajo Ca^{2+} ioni (13, 14).



Slika 4: Slika prikazuje nastanek dvojne vijačnice in povezovanje dvojne vijačnice karagenana kapa pod vplivom K^+ ionov (14).



Slika 5: Slika prikazuje nastanek dvojne vijačnice karagenana jota pod vplivom Ca^{2+} ionov (14).

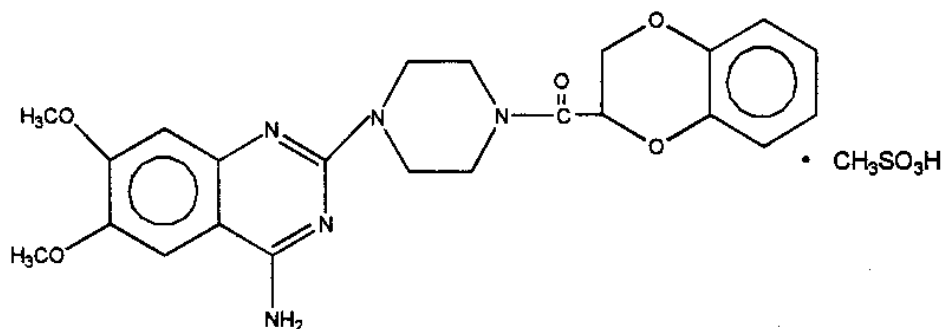
Uporaba

Karagenani se največ uporabljajo v prehrabeni in kozmetični industriji kot zgoščevala in sredstva za geliranje, kjer jih najdemo pod oznako E407. Tudi v farmaciji imajo karagenani svoje mesto kot pomožne snovi pri izdelavi različnih farmacevtskih oblik: suspenzij, gelov, svečk, kapljic za oči (13).

1.5. Doksazosin mesilat

Naša modelna učinkovina je v Sloveniji registrirana za zdravljenje hipertenzije in za zdravljenje benigne hiperplazije prostate. Učinkovina je dolgo delujoč kinazolinski antagonist postsinaptičnih α_1 -adrenergičnih receptorjev. Za zdravljenje hipertenzije se uporablja sama ali v kombinaciji z drugimi antihipertenzivi. Deluje tako, da zmanjša mišični tonus krvnih žil, zaradi česar pride do padca perifernega upora v žilah in krvnega tlaka. Z blokado postsinaptičnih α_1 -adrenergičnih receptorjev urinarnega trakta in prostate, pa pride do relaksacije gladkih mišic urinarnega trakta in prostate, izboljša pretok urina in splošne simptome draženja ter obstrukcije (14). V strukturi DM je pet dušikovih atomov, sol s sulfatom se najverjetneje tvori z enim od dušikov na kinazolinskem obroču (slika 6) (7). Učinkovina je šibka baza. Iz želodca se učinkovina ne absorbira, saj je pri nizkem pH

v protonirani obliki. Pri višjem pH pa neprotonirana oblika pasivno difundira skozi membrane. V vodnih raztopinah je DM pozitivno nabit (15).



Slika 6: Struktura doksazosin mesilata (15).

1.6. Interakcije med ZU in ogrodnim polimerom

Najpogostejše interakcije med ZU in ogrodnim polimerom, ki jih izkoriščamo za prirejeno sproščanje, so med kationsko oziroma anionsko nabito ZU in nasprotno nabitim polimerom. Zaradi nasprotnih nabojev med molekulami prihaja do privlačnih elektrostatskih sil. Poleg teh interakcij je zelo pomemben tudi hidrofobni efekt, ki skupaj z elektrostatskimi silami vpliva pri vezavi ZU na nabiti polimer oziroma polielektrolit. Tvorijo se micelom podobni agregati, ki povečajo stopnjo vezave ZU na polielektrolit. Predpogoj za to je določena stopnja amfifilnosti ZU. Te interakcije lahko bistveno vplivajo na sproščanje ZU, lahko pa na sproščanje vplivajo tudi posredno, zaradi vpliva na nabrekanje in erozijo. Pri vezavi polielektrolita z učinkovino lahko pride do spremembe v številu skupin na polielektrolitu, ki so na voljo za hidratacijo z vodo in spremenjenega premreževanja polimernih verig (7, 16).

Kompleks DM/karagenan

Karagenani se v vodni raztopini obnašajo kot polielektroliti. Monomerne enote PE se v polarnem mediju delno ali popolnoma ionizirajo. Učinkovina DM ima amfifilen značaj. V vodnem mediju pride do nastanka doksazosinijevega kationa, ki je pozitivno nabit in z negativno nabitim karagenanom pride do nastanka različnih interakcij. Prevladujejo močno privlačne interakcije, ki navadno vodijo do nastanka kompleksa med ZU in PE. Poleg ionskih interakcij igrajo pomembno vlogo tudi hidrofobne interakcije. Adsorpcija pozitivno nabite ZU na nasprotno nabit polisaharid pa je odvisna še od številnih drugih faktorjev, med katerimi so najpomembnejši tridimenzionalna ureditev polarnih in hidrofobnih segmentov, razdalja med naboji, gostota naboja in ionska moč raztopine (7).

1.7. Preskusi raztapljanja

Formularium Slovenicum navaja, da moramo pri tabletah s prirejenim sproščanjem dokazati ustreznost sproščanja zdravilne učinkovine. To dokažemo z enim od preskusov, opisanih v Evropski farmakopeji, poglavje Preskus sproščanja za trdne farmacevtske oblike (2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms). V ta namen uporabljamo naprave predpisane z Evropsko in Ameriško farmakopejo. V Ameriški farmakopeji 31 so opisane naslednje naprave: naprava 1 (s košaricami), naprava 2 (z vesli), naprava 3 (z recipročnimi cilindri- BioDis) in naprava 4 (pretočne celice), naprava 5 (vesla pod diskom), naprava 6 (rotirajoči cilinder), naprava 7 (disk), medtem ko Evropska farmakopeja predpisuje naprave 1, 2, 3 in 4 (2, 17).

Namen preverjanja ustreznosti sproščanja je:

- Kontrola kakovosti FO v razvojni fazi izdelave, pri prenosu le te v proizvodni proces in med samo proizvodnjo.
- Predvidevanje *in vivo* obnašanja FO in napovedovanje plazemskih koncentracij zdravilne učinkovine (18).

V razvojni fazi si želimo doseči takšne pogoje, da bi dobljen profil sproščanja učinkovine čim bolj napovedal *in vivo* obnašanje, zato pri proučevanju peroralnih oblik simuliramo tiste pogoje v GIT, ki so najbolj pomembni za sproščanje ZU iz posamezne FO (18, 19).

1.8. Pogoji v GIT

Peroralno aplicirana farmacevtska oblika potuje po prebavnem traktu skozi področja, kjer so različni pogoji ter prihaja v stik z različnimi biološkimi barierami (preglednica 1). Anatomsko lahko razdelimo GIT na prevodni del (usta, žrelo, požiralnik, rektum, anus) in na del, kjer poteka prebava in absorbcija (želodec, tanko črevo, debelo črevo) (20).

Preglednica 1: Parametri in fiziološki pogoji v različnih delih GIT (20).

del GIT	dolžina (cm)	površina (cm ²)	volumen (ml)	pH	povprečen čas prehoda hrane ali FO
celoten GIT	530–870	2X10 ⁶		1,5-7	do 38 h
prazen želodec	25		25-50	1,4-2	0,5-1,5 h
poln želodec			1000-1600	2-5	2-6 h
tanko črevo	370-630	7-20X10 ⁵		4,4-7,4	3-4 h
dvanajstnik	20-30	1,1-2,8X10 ⁵		4,9-6,4	3-10 min
zg. tanko črevo	150-260	2,7-7,5X10 ⁵		4,4-6,4	0,5-2 h
sp. tanko črevo	200-350	3,6-10,5X10 ⁵		6,5-7,4	0,5-2,5 h
debelo črevo	150	1,5X10 ⁵		5,5-7,4	do 27 h

V želodcu obstaja možnost absorpcije kislih ZU, saj celice želodčne sluznice izločajo HCl, kar v praznem želodcu ustvari pH med 1 in 2, v prisotnosti hrane pa med 2 in 5. Literaturni podatki navajajo zelo različne vrednosti pH, tako na tešče, kot po hranjenju. V želodcu so prisotne tudi površinsko aktivne snovi in encim pepsin. Pomembno je, da vemo, da je čas prehoda skozi želodec variabilen. Pri zaužitju na tešče je tako pričakovan srednji čas praznenja za večino enoodmernih FO, ki ne razpadejo takoj po zaužitju, med 1 in 2 h. Čas prehoda skozi želodec je odvisen od faze cikla migracijskega motoričnega kompleksa. Izmenjujejo se štiri faze, od mirovanja do močnih kontrakcij, ki potiskajo vsebino skupaj s FO naprej. Po hranjenju pa se čas zadrževanja FO v želodcu lahko podaljša do 6 h, saj je hitrost izločanja odvisna od kalorične vrednosti vsebine, vrste hrane idr. Velike FO se ne morejo izločiti skupaj z delci hrane in ostajajo v želodcu do tretje faze MMC cikla, v kateri se izločajo ostanki večji od dveh milimetrov. Zadrževanje FO v želodcu močno vpliva na biološko uporabnost ZU (18, 20, 21).

Nadaljni prehod FO skozi tanko črevo je konstanten, čas prehoda pa znaša med 3 in 4 h. Dobri pogoji za absorpcijo so že v dvanajstniku, vendar je čas zadrževanja kratek. Vrednost pH narašča od dvanajstnika do spodnjega dela tankega črevesa in sicer od 4,5 do 7,5. V tankem črevesu poteka največji del presnove in absorpcije, saj so prisotni različni encimi (lipaze, amilaze, proteaze) in mnoge površinsko aktivne snovi (žolčne soli, holesterol, lecitin), ki izboljšajo stik lipofilnih snovi z vodnim medijem in tako omogočijo njihovo presnovo. Celotna površina sluznice v tankem črevesu znaša 200 m^2 (18, 20, 21).

1.9. Posnemanje pogojev GIT pri poskusih sproščanja

Vseh pogojev v GIT, v katerih se učinkovina sprošča in absorbira, ne moramo v celoti posnemati pri poskusih sproščanja *in vitro*.

Za uspešno načrtovanje sproščanja iz FO *in vivo*, moramo upoštevati različne dejavnike. Pri FO upoštevamo mehanizem sproščanja, tip FO, velikost FO, razmerje med ZU in pomožnimi snovmi, fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine in pomožnih snovi, kot so

topnost, stabilnost, ionizacija, pKa, porazdelitveni koeficient, in fiziološke dejavnike, kot so absorbcija (mesto in obseg), metabolizem in biološki razpolovni čas (18, 19).

Zelo pomembna je tudi izbira aparature. Upoštevamo vrsto naprave in metodo za izvajanje preskusa, vzorčenje ob ustreznih časovnih točkah in različne hidrodinamske pogoje (18, 19).

Pri medijih za sproščanje izbiramo medij z različnimi pH, pomembna je sestava pufrskih raztopin, vpliv površinsko aktivnih snovi, viskoznost, prisotnost kisika, simuliranje pogojev po hranjenju in na tešče, volumen medija, ustreznost temperatura (18, 19).

V prejšnjih diplomski nalogi (22) in doktorski disertaciji (7) so proučevali predvsem vpliv pH na profil sproščanja in možnost tvorbe kompleksov med DM in različnimi karagenani. Prav tako na podlagi prejšnjih nalog vemo, da prisotnost Na-lavrilsulfata vpliva na proces sproščanja, prepreči tvorbo kompleksa. Zato smo se v diplomski nalogi predvsem osredotočili na vpliv površinsko aktivne snovi, SDS. Med drugim smo se želeli približati vrednostim površinske napetosti medija po hranjenju in na tešče, katere navaja članek Dressman-ove in sodelavcev. V članku navajajo površinsko napetost v času po hranjenju $47 \pm 0,3$ mN/m, na tešče pa $53 \pm 0,4$ mN/m (23). Ker so površinsko aktivne snovi, ki so bolj fiziološko relevantne, zelo drage, smo namesto teh uporabili cenejši SDS.

2. NAMEN DELA

Namen naše diplomske naloge bo proučevati vpliv površinsko aktivne snovi na sproščanje zdravilne učinkovine, doksazosin mesilata. Kot PAS bomo namesto biorelevantnih snovi izbrali cenovno ugodnejši Na-lavrilsulfat (SDS).

Koncentracijo PAS bomo določili tako, da bomo s pomočjo tenziometra določali površinsko napetost in se skušali približati fiziološkim vrednostim, ki smo jih poiskali v literaturi. Uporabljali bomo medije z različnimi koncentracijami površinsko aktivne snovi.

Izdelali bomo hidrofilne ogrodne tablete iz κ -, ι -, in λ -karagenanov in modelne ZU doksazosin mesilata. Določili jim bomo nekatere fizikalno-tehnološke parametre po Ph. Eur. 6th Ed., in sicer enakomernost mase, enakomernost vsebnosti zdravilne učinkovine in trdnost. Preskuse sproščanja doksazosin mesilata iz tablet bomo spremljali 24 ur na napravi z vesli (naprava 2 po Ph. Eur. 6th Ed.). Količino sproščene učinkovine bomo določali spektrofotometrično. Ugotovili bomo, kolikšna koncentracija SDS v mediju zadošča za preprečevanje tvorbe kompleksa med DM in karagenanom, oziroma omogoča popolno sproščanje DM iz polielektroliektrolita karagenana.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1. Materiali

3.1.1. Učinkovina in pomožne snovi

Doksazosin mesilat

Kemijsko ime: 1-(4-amino-6,7-dimetoksikinazolin-2-il)-4-[(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-il)karbonil]-piperazinijev metilsulfonid (slika 6)

Molska masa: 547,6 g/mol

Odmereki: 1 mg, 2 mg, 4 mg, 8 mg, 16 mg

pKa: 6,93 pri 25°C

Izgled: bel prašek brez vonja

Uporaba: antagonist α_1 adrenergičnih receptorjev in se uporablja kot antihipertenziv

Dobavitelj: Krka d.d., Novo mesto

Karagenani:

Kapa (κ); (GELCARIN GP-911 NF; št: 90305060)

Kemijsko ime: kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6.anhidro-D-galaktoze, enote so medseboj povezane z 1,3- α in 1,4- β vezmi (slika 1)

Molska masa: 400000 do 600000 g/mol

Izgled: rjav prašek brez vonja in okusa

Uporaba: v prehrambeni in kozmetični industriji, danes se vse več uporablja v farmacevtski industriji pri izdelavi farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem (14)

Proizvajalec: FMC Biopolymer (ZDA)

Jota (ι); (GELCARIN GP-370NF; št: 50443050)

Kemijsko ime: kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze-2-sulfata, enote so medseboj povezane z 1,3- α in 1,4- β vezmi (slika 2)

Molska masa: 400000 do 600000 g/mol

Izgled: rjav prašek brez vonja in okusa

Uporaba: zgoščevalec v prehrambeni in kozmetični industriji, danes se vse več uporablja v farmacevtski industriji pri izdelavi farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem (14)

Proizvajalec: FMC Biopolymer (ZDA)

Lambda (λ); (VISCARIN GP 209NF; št: 40620160)

Kemijsko ime: kopolimer D-galaktoze-2-sulfat in D-galaktoze-2,6-disulfat, enote so med seboj povezane z 1,3- α in 1,4- β glikozidno vezjo (slika 3)

Molska masa: 400000 do 800000 g/mol

Izgled: rjav prašek brez vonja in okusa

Uporaba: v prehrambeni in kozmetični industriji, danes se vse več uporablja v farmacevtski industriji pri izdelavi farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem (14)

Proizvajalec: FMC Biopolymer (ZDA)

Magnezijev stearat

Formula: $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-)_2\text{Mg}^{2+}$

Izgled: bel, fin prašek, ima blag vonj

Uporaba: drsilo

Proizvajalec: Sigma Aldrich (ZDA)

Na-lavrilsulfat

Formula: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$

Izgled: bel, fin prašek, močno draži sluznico

Uporaba: površinsko aktivna snov

Proizvajalec: Merck (Nemčija)

3.1.2. Reagenti za pripravo medijev za sproščanje

Prečiščena voda

Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, (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)

3.2. Naprave

pH meter, Mettler Toledo MA235 (Švica)

precizna tehtnica, AG 245, Mettler Toledo (Švica)

digitalna tehtnica, Exacta 2200 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija

ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija

tabletirka na udarec, Kilian SP 300 01-SP3 (Nemčija)

merilec trdnosti tablet Vanderkamp®, VK 2000, Tablet hardness tester (ZDA)

spektrofotometer Hewlett Packard, HP 8453, UV-Visible spectroscopy system (Nemčija)

naprava za spremljanje sproščanja z vesli (USP 2) VANKEL VK 7000 (ZDA)

avtomatski vzorčevalnik VK 8000 Avto Sempler, Varian Inc (ZDA)

brizga BD Discardit™ II, 10 ml, Bectan, Dickinson and Company, USA

celulozni acetatni filter, velikost po 0,45 µm, Sartorius Stedium Biotech GmbH, Nemčija

tenziometer, Krüss K12 Mk6, Krüss GmbH Germany

3.3. Postopki in metode

3.3.1. Izdelava tablet

Tablete smo izdelali z metodo direktnega tabletiranja. Tablete z maso 300 mg so vsebovale 8 mg doksazosina (9,70 mg doksazosin mesilata), 287,3 mg različnih hidrofilnih ogrodnih polimerov (κ -, ι -, λ -karagenanov) in 3,0 mg Mg stearata (preglednica 2).

Tablete smo izdelali tako, da smo zmešali prahove po pravilu rastočih mas v pateni, Mg stearat smo dodali na koncu. Homogenost smo dosegli s 15-minutnim mešanjem mase za tabletiranje. Celotno maso smo nato ročno raztehtali na 300 mg ter vsako maso posebej stresli v matrično vdolbino na tabletirki ($2r = 10$ mm). Tabletirali smo na tabletirki na udarec. S prilagajanjem zgornjega pečata tabletirke smo prilagodili silo stiskanja, da smo dobili željeno trdnost tablet. Ciljana trdnost tablet je bila 50 N, saj so karagenani relativno slabo stisljivi (22).

Preglednica 2: Sestava tablet, masa tablete je 300 mg.

Oznaka tablet	DM (mg)	κ -karag. (mg)	λ -karag. (mg)	ι -karag. (mg)	Mg stear. (mg)
Kapa	9,7	287,3			3,0
Lambda	9,7		287,3		3,0
Jota	9,7			287,3	3,0

3.3.2. Enakomernost mase tablet

Preskus enakomernosti mase smo izvajali po predpisu, kot ga določa 6. Evropska farmakopeja (Ph. Eur. 6th Ed.) v poglavju 2.9.5. Uniformity of mass of single dose preparation. Stehtali smo 20 tablet. Pri tabletah, težjih od 250 mg, lahko največ masi dveh tablet odstopata od povprečja za več kot 5 %, masa nobene tablete pa ne sme odstopati od povprečja za več kot 10 %. Kot rezultat smo podali povprečno maso tablet, minimalno in maksimalno maso ter standardno deviacijo.

3.3.3. Enakomernost vsebnosti enodmernih farmacevtskih oblik

Preskus enakomernost vsebnosti enodmernih farmacevtskih oblik opisuje 6. Evropska farmakopeja v poglavju 2.9.6. Uniformity of content of single dose preparation. Izvedli smo ga na manjšem številu tablet kot je predpisano. Naše serije so bile številčno omejene, zato smo vsebnost določili le trem tabletam ene serije in ne desetim, kot je predpisano. Vsebnost smo določili tako, da smo tableto dali v 500 ml prečiščene vode, ki smo ji dodali 5 g SDS. Vsebinsko smo na magnetnem mešalu mešali 24 ur in nato filtrirali. Z merjenjem absorbance smo določili vsebnost DM. Kot rezultat smo podali povprečno vsebnost učinkovine v tableti, ter standardno deviacijo.

3.3.4. Trdnost tablet

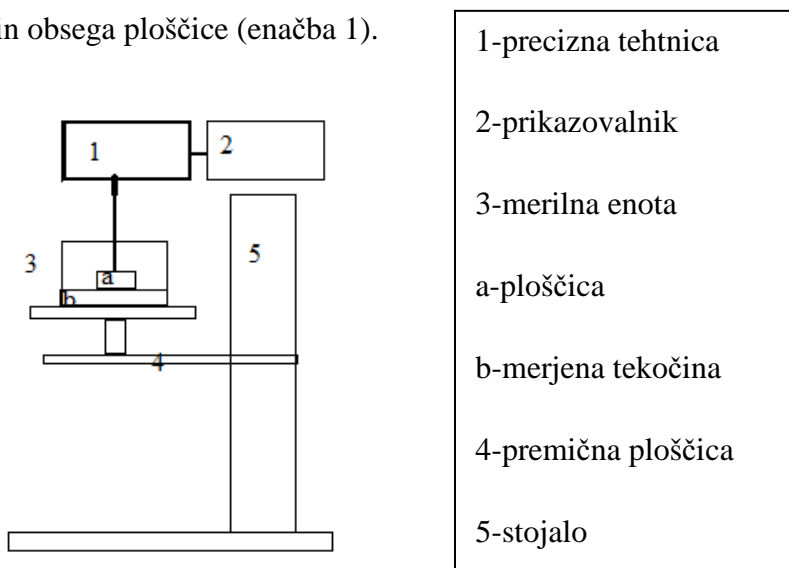
Preskus trdnosti tablet smo izvedli po predpisu navedenem 6. Evropski farmakopeji, v poglavju 2.9.8. Resistance to crushing of tablets. Postopek smo izvedli tako, da smo tableto položili na mirujoči del naprave za merjenje trdnosti. Gibljivi del potiska tableto ob mirujoči del tako dolgo, dokler tableta ne počne. Trdnost pomeni najmanjšo silo, ki je potrebna, da se tableta poškoduje ali počne. Sila je izražena v newtonih. Iz vsake serije smo preverili trdnost vsaki peti tableti in tako preverjali, da se pogoji tabletiranja vmes niso spremenili. Kot rezultat smo podali povprečno vrednost trdnosti, minimalno in maksimalno vrednost trdnosti in standardno deviacijo.

3.3.5. Določanje površinske napetosti medijev za sproščanje

Površinsko napetost smo na podlagi članka Hernáinz-a in sodelovcev (24), v katerem proučujejo vpliv temperature in pH-vrednosti raztopine na površinsko napetost, določili tako, da smo ob zmanjševanju koncentracije površinsko aktivne snovi medijem merili površinsko napetost. Tako smo določili koncentracije SDS, ki so v danem mediju izkazovale vrednosti površinske napetosti podobne tistim na tešče ali po hranjenju.

3.3.5.1. Wilhelmyjeva metoda določanja površinske napetosti s ploščico

Metodo smo izvajali na tenziometru Krüss k12. Metoda temelji na merjenju sile pri vleku telesa (ploščice) iz tekočine (slika 7). Za merjenje uporabimo navpično postavljeno pravokotno ploščico z znanimi dimenzijami. Površinsko napetost izračunamo kot kvocient sile in obsega ploščice (enačba 1).



Slika 7: Shema Wilhelmyjeve naprave (25).

$$\gamma = \frac{F}{o}$$

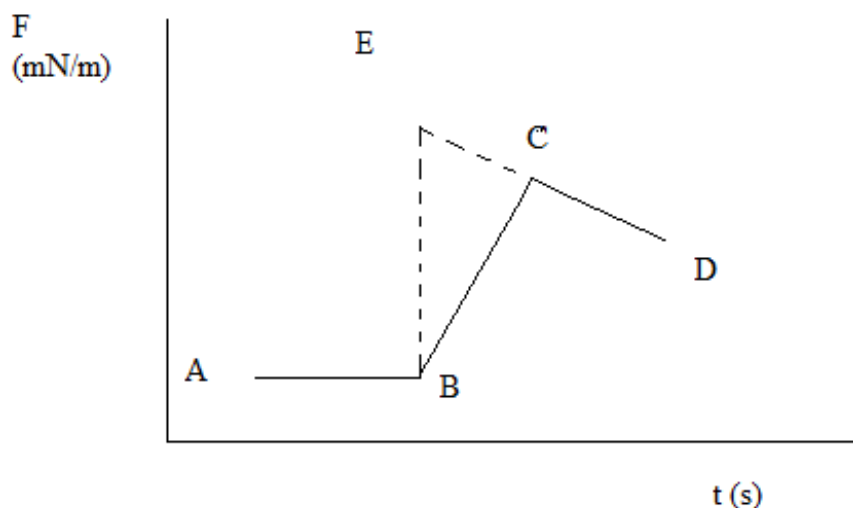
/enačba 1/

γ – površinska napetost tekočine (mN/m)

F – izmerjena sila (mN)

o – obseg ploščice ($o = 2 * l + 2 * b$)

Potek merjenja sile pri uporabi Wilhemyjeve naprave poteka po diagramu na sliki 8. Daljica AB na diagramu predstavlja odziv merilnika pred stikom tekočine z vzorcem. V točki B pride do stika, med ploščico in tekočino. Daljica BC predstavlja potapljanje ploščice v tekočino. Daljica CD je funkcija vsote konstantne sile, ki vleče ploščico navzdol. Ekstrapolacija te daljice na pravokotnico daljice AB nam da silo, ko je ploščica ravno v višini daljice gladine tekočine. Pri vleku ploščice iz tekočine moramo dobiti daljico, ki se prekriva z daljico CE. V nasprotnem primeru bi pomenilo, da močenje ni bilo popolno in meritev bi bila napačna.



Slika 8: Diagram poteka merjenja sile pri uporabi Wilhemyjeve naprave (25).

Pripravili smo medije z različnimi koncentracijama SDS. Temperaturo medija smo naravnali na 37 °C in določili površinsko napetost po zgoraj opisanem postopku. Vsako meritev smo trikrat ponovili. Kot rezultat smo podali povprečno vrednost površinske napetosti tekočine in standardno deviacijo.

3.3.6. Izdelava umeritvenih premic za določanje koncentracije sproščene učinkovine

Količino sproščene učinkovine smo spremljali v različnih medijih, z UV-VIS spektrofotometrijo, zato smo umeritvene premice pripravili za vsak medij posebej. Za posamezni medij smo pripravili dve osnovni raztopini doksazosin mesilata s koncentracijo

24,18 ± 0,5 mg na 100 ml. Natehte smo kvantitativno prenesli v 100 ml bučko in dopolnili z metanolom do oznake. Bučko smo za nekaj minut postavili v ultrazvočno kadičko, da se je vsa učinkovina raztopila. Osnovno raztopino smo ustrezno redčili, da smo dobili absorbance med 0,1 in 1,2, tako da so bile standardne redčitve učinkovine enakomerno razporejene v območju, kjer je spektrofotometer dajal najbolj zanesljive rezultate. Absorbance pripravljenih raztopin smo merili pri valovni dolžini 249 nm, saj ima pri tej valovni dolžini DM najvišjo absorbanco. V programu UV Visible ChemStation Software 8453 HP smo izračunali umeritveno premico, ki smo jo potrebovali za določanje sproščene učinkovine v različnih medijih, ter kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

Koncentracijo učinkovine smo določili na podlagi naslednje enačbe (enačba 2):

$$c = k * A \quad \text{/enačba 2/}$$

c-koncentracija ZU (mg/ml)

A-absorbanca

k-naklon umeritvene premice (mg/ml)

Kot topilo za redčenje smo uporabili:

Prečiščeno vodo

Raztopino SDS v prečiščeni vodi: 5; 2,5; 1,9; 1,7; 1,5; 1,25; 0,625; 0,07 (g SDS/1 l).

Fosfatni pufer pH 7

Raztopino SDS v fosfatnem pufu pH 7: 5; 2,5; 1,9; 1,5; 1,25; 0,9; 0,625; 0,04 (g SDS/1 l).

Redčitve so bile (ml/ml):

6,0/100 ($c_{DM} = 0,012$ mg/ml)

5,0/100 ($c_{DM} = 0,01$ mg/ml)

3,0/100 ($c_{DM} = 0,006$ mg/ml)

1,0/100 ($c_{DM} = 0,002$ mg/ml)

1,0/200 ($c_{DM} = 0,001$ mg/ml)

1,0/500 ($c_{DM} = 0,0004$ mg/ml)

3.3.7. Priprava medijev za sproščanje

Fosfatni pufer pH 7

1,35 g NaH_2PO_4 smo natehtali v 1000 ml bučko in dopolnili z 980 ml prečiščene vode in z 1 M 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 + SDS

1,35 g NaH_2PO_4 smo natehtali v 1000 ml bučko in dopolnili z 980 ml prečiščene vode in z 1 M NaOH uravnali pH na $7,0 \pm 0,05$. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH. 900 ml tega pufra smo prelili v litrsko čašo, ter v digestoriju dodali 40 mg SDS, kar je skladno z željeno površinsko napetostjo, ki smo jo želeli doseči, in 100 ml prečiščene vode. Količino SDS smo prilagajali, glede na željene površinske napetosti, ki smo jih želeli preskušati.

3.3.8. Sproščanje učinkovine iz tablet

Preskuse sproščanja smo izvajali na napravi 2 po USP. Gre za napravo z veslastim mešalom (Paddle Apparatus). Volumen medija za sproščanje je bil vedno 900 ml. Sproščanje smo izvajali pri konstantni temperaturi (37 °C) in konstantni hitrosti vrtenja mešal ($\text{rpm} = 50$). Z avtomatskim vzorčevalnikom smo odvzemali 10 ml vzorce. Časovne točke jemanja vzorcev so bile naslednje: 30 min, 1 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 5 h, 7 h, 9 h, 16 h, 24 h. Vzorce smo filtrirali skozi filter velikosti $0,45$ μm . Pri izračunu koncentracije sproščene učinkovine smo upoštevali zmanjšanje volumna medija zaradi odvzetih vzorcev (enačba 3).

$$V_n = V_0 - (n * V_{vz})$$

/enačba 3/

V_n -dejanski volumen medija po vzorčenju (ml)

V_0 -začetni volumen medija (ml)

n-število vzorcev

V_{vz} -volumen odvzetega vzorca (ml)

Iz umeritvenih premic smo izračunali koncentracije sproščene DM ob določenem času. Z upoštevanjem dejanskega volumna medija po vzorčenju ter koncentracije sproščene učinkovine smo izračunali maso sproščene DM, ki smo ga odvzeli s posameznimi odvzemi vzorcev (enačba 4).

$$m_n = c_n * V_n + \sum_{n=1}^n c_n * V_{vz}$$

/enačba 4/

m_n -masa raztopljenega DM v mediju ob n-tem vzorcu (mg)

c_n -koncentracija DM v mediju ob n-tem vzorcu (mg/ml)

Iz dejanske mase raztopljenega DM in teoretične mase DM v tableti smo izračunali delež sproščene DM (enačba 5).

$$X_n = m_n / m_0 * 100$$

/enačba 5/

X_n -delež sproščene DM ob n-tem jemanju vzorca (%)

m_0 -teoretična masa DM v tableti (mg)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Vrednotenje ogrodnih tablet

4.1.1. Enakomernost mase ogrodnih tablet

Izdelali smo različne serije 300 mg tablet. Vsem serijam tablet, ki smo jih stisnili, smo določili enakomernost mase po Ph. Eur. 6th Ed. v poglavju 2.9.5. Uniformity of mass of single dose preparation. Ta zahteva, da posamično stehtamo 20 tablet vsake serije, od katere lahko največ dve tableti odstopata od povprečja za 5 %, nobena tableta pa ne sme odstopati za več kot 10 %. Rezultati so navedeni v preglednici (preglednica 3).

Preglednica 3: Rezultati preskusa enakomernosti mase izdelanih tablet (n = 20).

Oznaka tablet	Najmanjša masa (mg)	Največja masa (mg)	Povprečna masa (mg)	SD (mg)	RSD (%)
Kapa					
Seriya 1	297,31	307,01	300,92	2,61	0,87
Seriya 2	295,78	307,01	299,93	2,50	0,83
Seriya 3	294,62	304,33	299,03	3,39	1,13
Seriya 4	292,11	304,32	298,30	3,96	1,33
Lambda					
Seriya 1	298,58	307,27	301,38	2,06	0,68
Seriya 2	297,37	307,06	301,31	2,14	0,71
Seriya 3	297,36	304,20	301,35	2,38	0,79
Seriya 4	286,58	308,68	295,76	4,91	1,66
Jota					
Seriya 1	297,31	308,67	301,03	2,93	0,97
Seriya 2	294,35	306,33	301,16	2,85	0,95
Seriya 3	293,0	305,06	300,64	3,46	1,15
Seriya 4	296,5	305,98	301,29	3,16	1,05

Iz preglednice 3 je razvidno, da vse serije tablet ustrezajo testu enakomernosti mase, saj nobena tableta ne odstopa od povprečne mase za več kot dovoljuje evropska farmakopeja.

4.1.2. Enakomernost vsebnosti ZU v ogrodnih tabletah

Ph. Eur. 6th Ed. v poglavju 2.9.6. Uniformity of content of single dose preparation predpisuje interval vsebnosti učinkovine za enoodmerne FO med 85 % in 115 % teoretične mase učinkovine v tableti. Predpis zahteva preskušanje 10 tablet. Ker pa smo tabletirali ročno in izdelali zelo majhne serije tablet smo mi določili vsebnost le trem tabletam ene serije (preglednica 4).

Preglednica 4: Rezultati preskusa enakomernost vsebnosti ZU v ogrodnih tabletah (n = 3).

Oznaka tablet	Deklarirana vsebnost učinkovine v tableti (mg)	Eksperimentalno določena vsebnost učinkovine v tableti (mg)	SD (mg)	Povprečna vsebnost (%)
Kapa	9,7	9,89	0,054	101,9
Lambda	9,7	9,84	0,35	101,5
Jota	9,7	9,78	0,09	100,8

Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da tablete vsebujejo predpisano količino učinkovine. Vse tablete vsebujejo približno enako količino ZU, kar omogoči njihovo relativno primerjavo. Ker vsebnosti nismo primerjali za vsako serijo tablet posebej, smo delež sproščene učinkovine iz tablet računali kar na teoretično vsebnost.

4.1.3. Trdnost tablet

Vsem pripravljenim serijam smo določili trdnost po Ph. Eur. 6th Ed. v poglavju 2.9.8. Resistance to crushing of tablets na napravi za določanje trdnosti Vanderkamp, VK 200. Nastavitve pečatov so bile za posamezen tip karagenana skozi vse serije enake in so podane v preglednici 5. Ciljna trdnost tablet je bila okrog 50 N, saj so karagenani relativno slabo stisljivi. Rezultati so predstavljeni v preglednici 6.

Preglednica 5: Pregled nastavitvev odmika zgornjega in spodnjega pečata na tabletirki na udarec.

Oznaka tablet	Nastavitev odmika zgornjega pečata	Nastavitev odmika spodnjega pečata
Kapa	144	159
Jota	145	159
Lambda	140	159

Preglednica 6: Rezultati določanja trdnosti tablet.

Oznaka tablet	Najmanjša trdnost (N)	Največja trdnost (N)	Povprečna trdnost (N)	SD (N)	RSD (%)
Kapa					
Serija 1	30,4	36,3	32,65	2,66	8,15
Serija 2	35,6	37,3	36,53	0,86	2,35
Serija 3	53,1	65,1	57,06	5,96	10,45
Serija 4	30,1	39,2	35,60	4,07	11,43
Lambda					
Serija 1	43,5	49,0	45,9	2,82	6,14
Serija 2	45,5	46,4	46,03	0,47	1,02
Serija 3	40,0	49,9	42,73	3,78	8,85
Serija 4	40,7	47,7	43,64	3,01	6,89
Jota					
Serija 1	58,4	60,5	59,73	1,16	1,94
Serija 2	46,5	49,0	47,85	1,07	2,24
Serija 3	80,0	103,5	87,68	8,12	9,26
Serija 4	56,9	70,4	62,90	4,88	7,76

Iz preglednice je vidno, da nam pri vseh serijah ni uspelo doseči ciljne trdnosti, ki je bila v našem primeru okrog 50 N, saj vsi karagenani niso enako stisljivi. Najboljšo stisljivost ima karagenan jota, sledi lambda, najslabšo stisljivost pa ima kapa. Med serijami znotraj istega tipa so velika odstopanja, največja v seriji jota. Razlog odstopanj med posameznimi serijami karagenana jota je različna vlaga v zraku in vlažnost samega karagenana na dan stiskanja. Večja je vlaga v zraku, večja je trdnost tablet (22). Različna trdnost tablet bi

lahko vplivala na sproščanje, vendar običajno se to zgodi le na začetku, ko hidrogel nastaja. Kasneje različne trdnosti običajno nimajo vpliva na sproščanje.

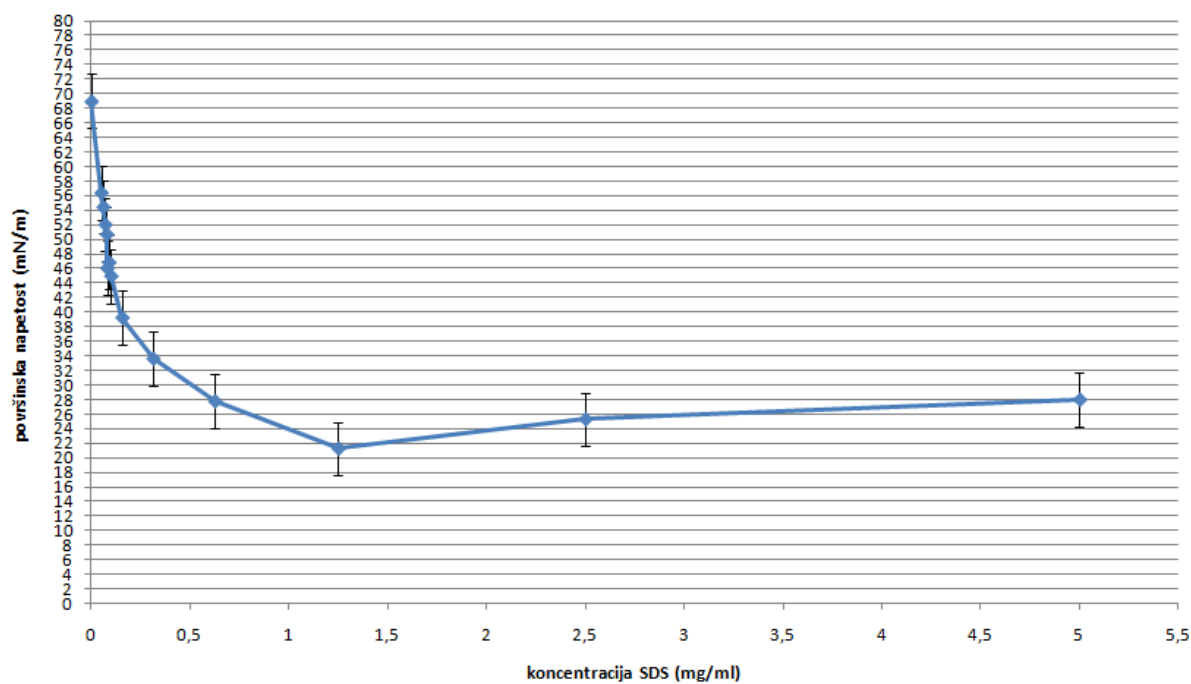
4.2. Določanje površinske napetosti z Wilhelmyjevo metodo

Površinsko napetost smo določali na napravi Krüss k12. Na podlagi članka Dressman-ove in sodelovcev (23), v katerem navajajo vrednosti površinske napetosti po hranjenju, ki je $47 \pm 0,3$ mN/m in na tešče, ki je $53 \pm 0,4$ mN/m, smo s pomočjo tenziometra določili ustrezne koncentracije SDS, s katerimi dosežemo ustrezno površinsko napetost. Površinsko napetost, smo določili v vodi in fosfatnem pufru pH 7 na podlagi zmanjševanja koncentracije SDS. Rezultati so podani v spodnjih preglednicah in slikah (preglednica 7, preglednica 8, slika 8, slika 9).

Preglednica 7: Rezultati določanja površinske napetosti v vodnem mediju.

Koncentracija (mg/ml)	Povprečna napetost (mN/m)	SD (mN/m)
5	27,98	0,40
2,5	25,28	0,05
1,25	21,25	0,65
0,625	27,76	0,61
0,313	33,60	0,68
0,156	39,25	0,33
0,1	44,97	2,54
0,09	46,85	2,23
0,08	46,04	2,96
0,0781	50,71	1,57
0,07	52,04	3,26

0,06	54,46	1,10
0,05	56,42	1,31
0 /samo medij	68,97	0,34

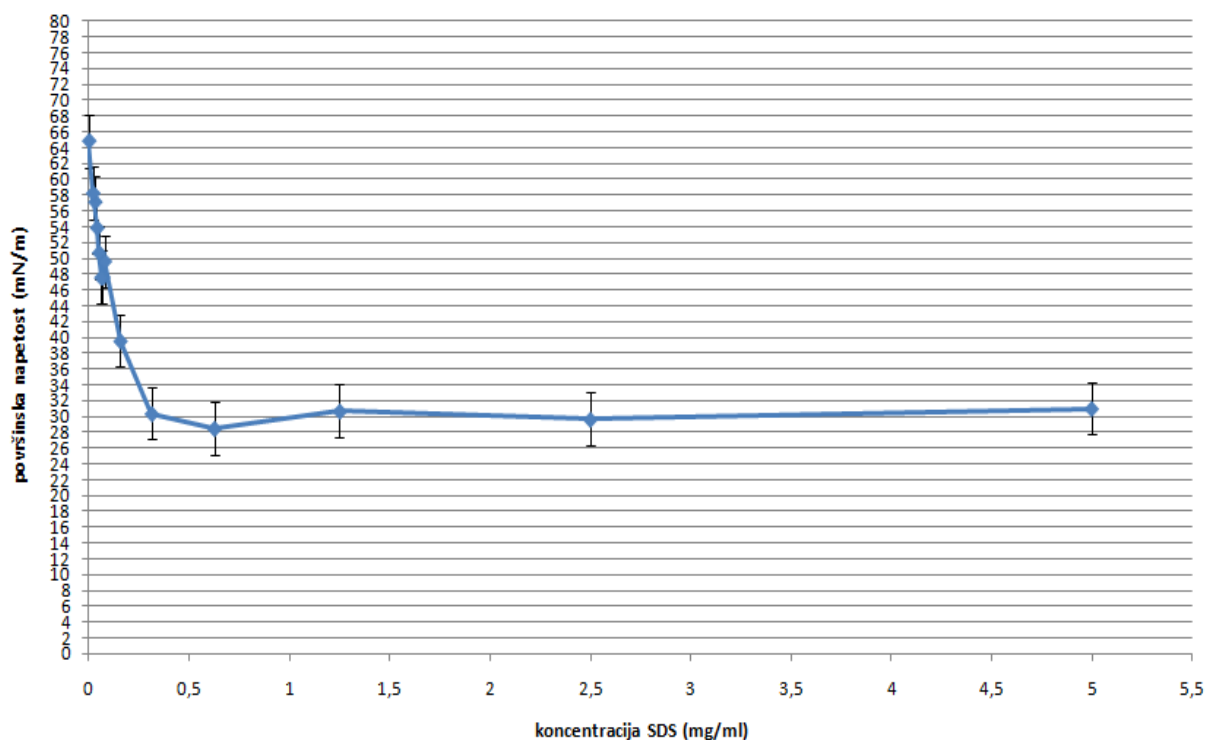


Slika 8: Grafični prikaz spreminjanja površinske napetosti vodnega medija v odvisnosti od koncentracije SDS.

Preglednica 8: Rezultati določanja površinske napetosti v fosfatnem mediju pH 7.

Koncentracija (mg/ml)	Povprečna napetost (mN/m)	SD (mN/m)
5	31,04	0,51
2,5	29,67	0,85
1,25	30,71	1,79
0,625	28,52	1,94
0,313	30,39	0,41
0,156	39,56	0,69
0,0781	49,64	1,52
0,07	47,62	2,08
0,06	47,58	0,97
0,05	50,71	1,15

0,04	53,86	1,57
0,03	57,14	1,20
0,02	58,23	1,08
0/ samo medij	64,83	1,46



Slika 9: Grafični prikaz spreminjanja površinske napetosti fosfatnega medija pH 7 v odvisnosti od koncentracije SDS.

Iz slik 8 in 9 je razvidno, da površinska napetost pada z naraščanjem koncentracije SDS do trenutka, ko je dosežena kritična micelna koncentracija, nato pa postane konstantna ne glede na koncentracijo SDS. Površinska napetost fosfatnega pufera je manjša od površinske napetosti vode. Iz grafa smo lahko določili kolikšna koncentracija SDS bo potrebna, da dosežemo površinsko napetost, ki ustreza tistima po hranjenju ($47 \pm 0,3$ mN/m) in na tešče ($53 \pm 0,4$ mN/m). Ugotovili smo, da sta obe vrednosti SDS za željeni površinski napetosti pod kritično CMC, ki je ocenjeno iz grafa 0,625 mg/ml za vodo (slika 8) in 0,313 mg/ml za fosfatni pufer pH 7 (slika 9).

Pripravili smo oba medija, vodo in fosfatni pufer pH 7, in obema dodali toliko SDS, da so se površinske napetosti približale vrednostim po hranjenju in na tešče (preglednica 9).

Preglednica 9: Dodatek SDS k vodi ali fosfatnem pufru pH 7, da bi dosegli literaturne vrednosti $47 \pm 0,3$ mN/m (po hranjenju) in $53 \pm 0,4$ mN/m (na tešče), ter dejansko izmerjene vrednosti površinske napetosti pripravljenega medija.

Medij za sproščanje	Simulacija stanja	Dodatek SDS (mg) na 1000 ml medija	Površinska napetost (mN/m), ki jo izmerimo po dodatku SDS.
Prečiščena voda	po hranjenju	90	46,85
	na tešče	70	52,04
Fosfatni pufer pH 7	po hranjenju	60	47,85
	na tešče	40	53,04

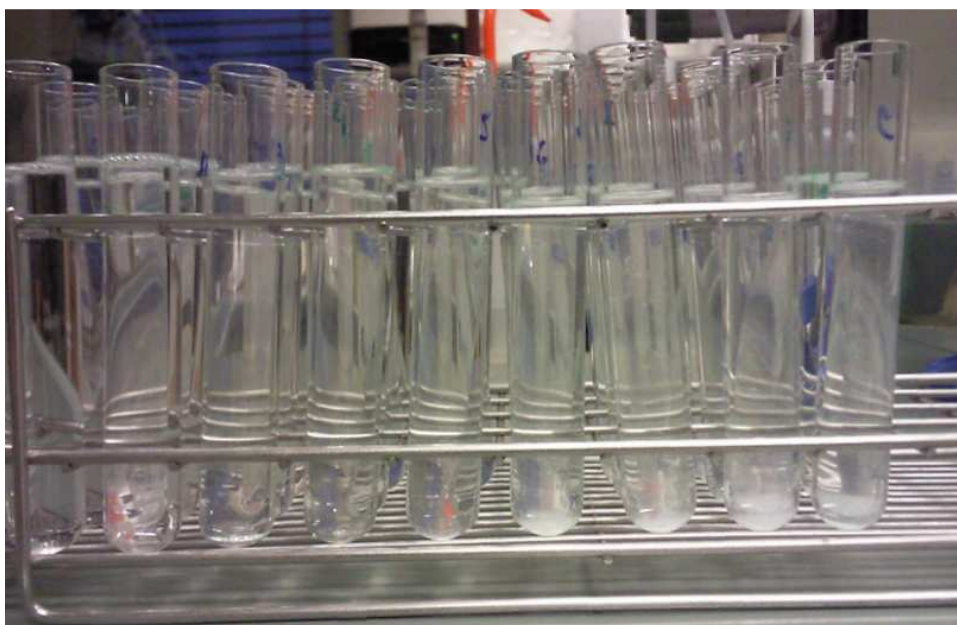
4.3. Sproščanje učinkovine iz ogrodnih tablet

V prebavnem traktu se poleg mucina, kisline, izloča več različnih površinsko aktivnih snovi, zato smo s preskusi sproščanja na napravi 2 po USP želeli proučiti vpliv površinske napetosti medija na sproščanje DM. Za primerjavo smo preskuse sproščanja izvedli tudi v prečiščeni vodi, pogojem *in vivo* pa smo se približali s sproščanjem pri 37 °C, v fosfatnem pufru pH 7. Tablete, ki smo jih uporabili za sproščanje, so bile iz treh vrst karagenanov (κ , ι , λ) in DM. Sproščali smo v treh paralelkah, rezultate sproščanja pa prikazali grafično v odstotkih sproščene učinkovine in SD.

Dosedanje študije na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so pokazale, da se hitrost sproščanja ZU ujema s številom sulfatnih skupin na osnovnih disaharidnih enotah karagenana (κ (1) > ι (2) > λ (3)). Višji kot je naboj na verigi karagenana, več je bilo interakcij z DM in sproščanje je bilo počasnejše. Ugotovljeno je bilo, da v mediju brez dodatka SDS določijo le približno 30 % učinkovine, v mediju z dodatkom SDS (5 g/l) pa so določili celoten odmerek ZU (7).

4.3.1. Sproščanje učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi

Pri vseh preskusih sproščanja, ki smo jih izvedli v prečiščeni vodi, so tablete po 24-ih urah popolnoma razpadle. V samem mediju, kot tudi pri nižjih koncentracijah SDS, kjer nismo zaznali celotne količine učinkovine, je bilo v mediju za sproščanje na dnu epruvete opaziti drobne delce, ki bi lahko predstavljali kompleks med ZU in karagenanom (slika 10). S tem lahko tudi pojasnimo, zakaj učinkovine v mediju nismo mogli zaznati, čeprav so tablete popolnoma razpadle. Kot že rečeno, le ta tvori kompleks s karagenanom in ni na voljo za absorpcijo.

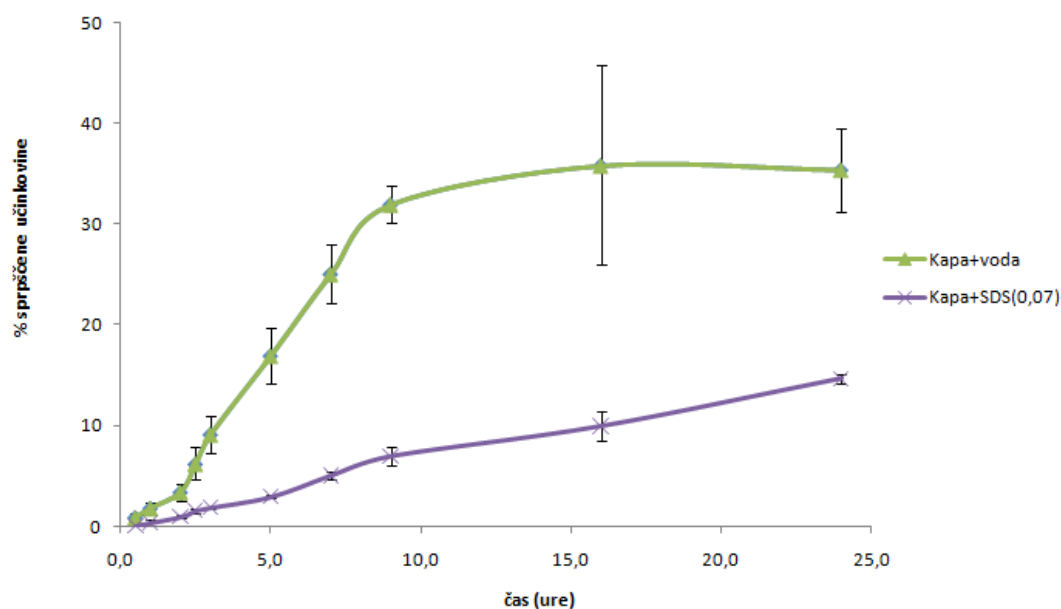


Slika 10: Slika prikazuje vzorce sproščanja DM iz tablet iz karagenana kapa v vodnem mediju. Na dnu epruvete je opaziti drobne delce, ki bi lahko predstavljali kompleks med ZU in karagenanom kapa.

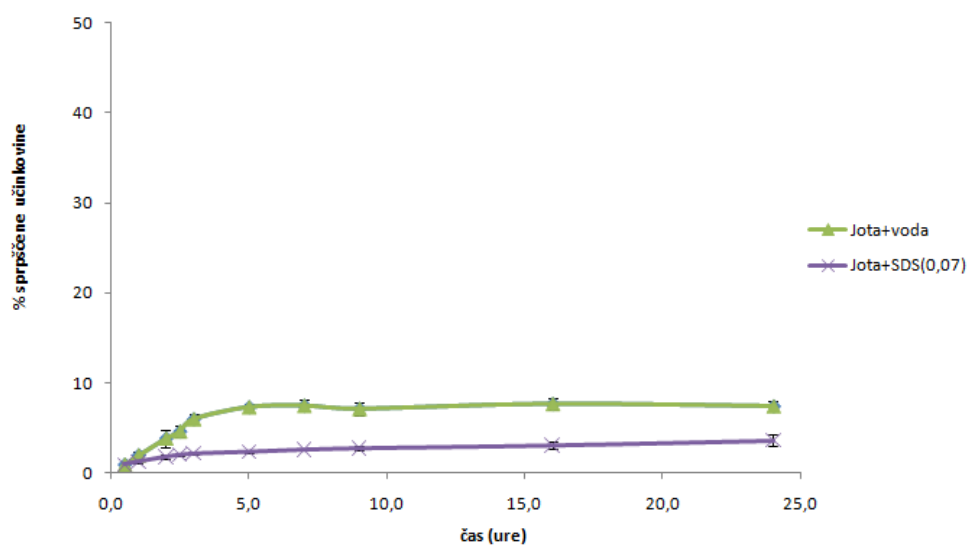
Preskus sproščanje učinkovine iz tablete smo najprej izvedli v prečiščeni vodi brez dodatka SDS. Iz karagenana kapa se je sprostilo okoli 36 % učinkovine (slika 11). Iz karagenana jota se je sprostilo okoli 10 % učinkovine (slika 12). Iz karagenana lambda pa se je sprostilo okoli 30 % učinkovine (slika 13). Ugotovili smo, da se količina sproščene učinkovine ne ujema s številom sulfatnih skupin na posameznem karagenanu. Razlog za to

je lahko, da je porazdelitev sulfatnih skupin drugačna in ni v skladu s teoretično. Možno pa je tudi, da se sulfatne skupine prostorsko porazdelijo tako, da so v primeru karagenana jota lažje dosegljive in se nanje veže več DM, ki se zato počasneje sprošča.

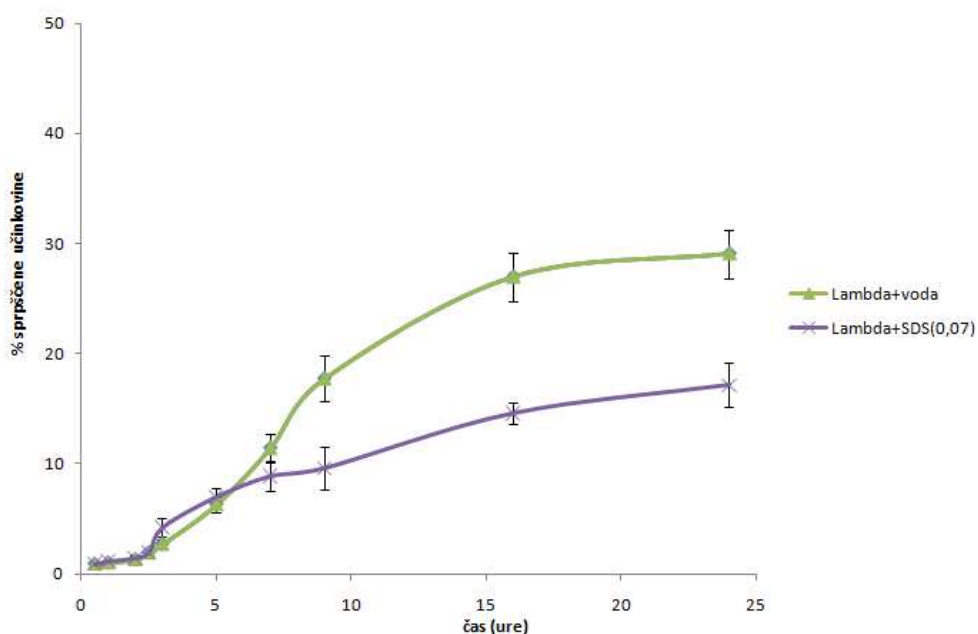
Naslednje sproščanje smo izvedli z dodatkom SDS v koncentraciji 0,07 g/l, kar je blizu vrednosti površinske napetosti na tešče. Iz karagenana kapa se je sprostilo okoli 15 % učinkovine (slika 11). Iz karagenana jota se je sprostilo okoli 4 % učinkovine (slika 12). Iz karagenana lambda se je sprostilo okoli 17 % učinkovine (slika 13). Pričakovali smo povečano sproščanje ZU, rezultat pa je bil ravno nasproten. Razlog za to je verjetno vezava SDS molekul na kompleks karagenana in DM. Molekule SDS se na kompleks vežejo s hidrofobnim repom in ga obdajo. Ker je kompleks obdan s plastjo SDS in nastanejo delci podobni micelom, se sprostijo malo učinkovine oziroma manj, kot če SDS ni prisoten. Ob dovolj visoki koncentraciji SDS pa le-ta odtegne DM iz kompleksa in tvori micel z učinkovino. SDS tako razgradi kompleks med DM in karagenani, vendar je za to potrebna dovolj visoka koncentracija (26).



Slika 11: Primerjava profilov sproščanja DM iz tablet iz karagenana kapa v vodnem mediju in v vodnem mediju s SDS v koncentraciji 0,07 g/l.



Slika 12: Primerjava profilov sproščanja DM iz tablet iz karagenana jota v vodnem mediju in v vodnem mediju s SDS v koncentraciji 0,07 g/l.



Slika 13: Primerjava profilov sproščanja DM iz tablet iz karagenana lambda v vodnem mediju in v vodnem mediju s SDS v koncentraciji 0,07 g/l.

Ker se je pri koncentraciji 0,07 g/l sprostil manjši delež učinkovine, kot v samem vodnem mediju nismo nadaljevali sproščanja z dodatkom 0,09 g/l SDS, saj smo pričakovali podobne rezultate.

Začeli pa smo proučevati, katera koncentracija SDS bo dovolj visoka, da odtegne DM iz kompleksa ter tako povzroči sprostitvev celotne količine DM iz karagenana.

Sproščanje smo najprej izvedli v prečiščeni vodi, ki smo ji dodali 5 g/l SDS. Ta količina je bila izbrana na osnovi predhodnih diplomskih nalog, saj je omogočila sprostitvev celotnega odmerka. Prav tako je količina visoko nad CMC te spojine v vodi. Iz karagenana kapa se je sprostila vsa učinkovina med peto in sedmo uro sproščanja (slika 14), iz karagenana jota med sedmo in deveto uro (slika 15) in prav tako se je iz karagenana lambda sprostila celotna količina učinkovine med sedmo in deveto uro (slika 16). Karagenan kapa ima najmanj sulfatnih skupin, zato z DM tvori najmanj interakcij in sproščanje poteka najhitreje. Po hitrosti sproščanja naj bi sledil karagenan jota in karagenan lambda. Vendar sproščanje iz karagenana jota in lambda poteka približno enako, razlog za to smo že omenili. Porazdelitev sulfatnih skupin je lahko drugačna in ni v skladu s teoretično. Možno pa je tudi, da se sulfatne skupine prostorsko porazdelijo tako, da so za jota lažje dosegljive in se nanje veže več DM. Očitno pa je, da je koncentracija 5 g/l zadostna, da kompleks DM/karagenan razpade.

Nato smo koncentracijo SDS prepolovili in ga mediju dodali 2,5 g/l. Iz karagenana kapa se je čas sproščanja učinkovine podaljšal, saj se je celotna količina učinkovine sprostila med sedmo in deveto uro (slika 14), prav tako se je čas sproščanja učinkovine podaljšal tudi pri karagenanu jota, saj se je celotna količina učinkovine sprostila med deveto in šestnajsto uro (slika 15). Iz karagenana lambda pa se je v štiriindvajsetih urah sprostilo 99 % učinkovina (slika 16), tudi tukaj se je čas sproščanja učinkovine podaljšal.

Nato smo za sproščanje uporabili 1,9 g/l SDS. Pri tej koncentraciji se je iz karagenana kapa sprostila celotna količina učinkovine med deveto in šestnajsto uro, tako da se je čas sproščanja ponovno podaljšal (slika 14), iz karagenana jota se je v štiriindvajsetih urah sprostilo okrog 98 % učinkovine (slika 15), iz karagenana lambda pa 90 % učinkovine

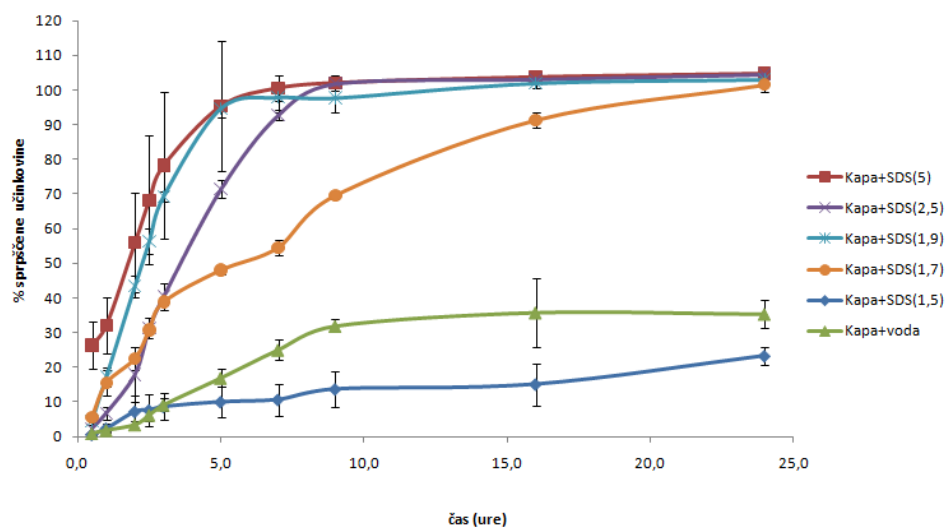
(slika 16). Rezultati sproščanja iz karagenana kapa so nekoliko presenetljivi. Možno je, da so bile tablete v osnovi nekoliko manj trdne in so zato STD velike.

Koncentracijo SDS smo še nadaljne znižali, in sicer na 1,7 g/l. Iz karagenana kapa se je sprostila celotna količina DM med šestnajsto in štiriindvajseto uro (slika 14). Iz karagenana jota se je pri koncentraciji 1,7 g/l v štiriindvajsetih urah sprostilo 99 % učinkovine (slika 15). Iz karagenana lambda pa se je sprostilo v celotnih štiriindvajsetih urah 91 % učinkovine (slika 16). Iz vseh treh vrst tablet je sproščanje upočasnjeno glede na višje koncentracije SDS. Ugotovili smo, da se v primeru karagenana kapa in jota sprosti celoten odmerek zdravilne učinkovine, v primeru karagenana lambda pa se pri koncentraciji 1,7 g/l SDS v štiriindvajsetih urah sprosti le še 90 %. To pomeni, da je v primeru, ko imamo bolj nabit polimer (lambda) potrebna višja koncentracija SDS, da se sprosti celoten odmerek ZU.

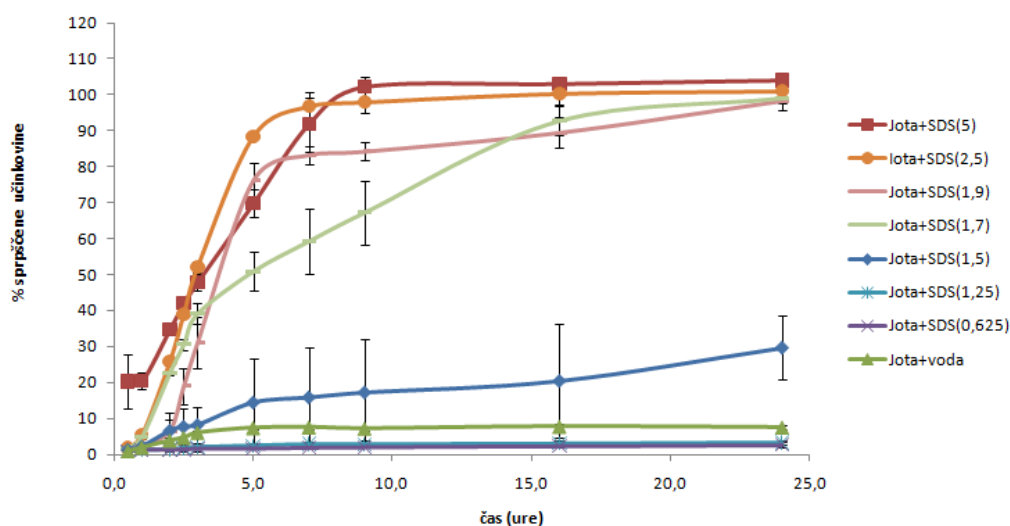
Sproščanje smo nadaljevali v mediju, kateremu smo dodali 1,5 g/l SDS. Iz karagenana kapa se je sprostilo le okrog 23 % učinkovine (slika 14), kar je manj kot če smo sproščali v samem mediju (slika 14). Prav tako v primeru karagenana lambda, saj se je v mediju z dodatkom 1,5 g/l SDS sprostilo le okrog 6 % učinkovine (slika 16). Razlog za to je bil, da koncentracija 1,5 g/l SDS ni bila dovolj visoka, da bi odtegnila DM iz kompleksa. Molekule SDS se na kompleks karagenana in učinkovine vežejo s hidrofobnim repom in ga obdajo, zato se DM ne sprošča s karagenana, ampak ostaja znotraj micela. Količina sproščenega DM je tako manjša, kot v samem vodnem mediju. Iz karagenana jota pa se je sprostilo 30 % učinkovine (slika 15) v štiriindvajsetih urah, kar ponovno pomeni, da se je sprostilo manj učinkovine, kot pri sproščanju, ko smo mediju dodali 1,7 g/l SDS. Vse te koncentracije SDS imajo nižjo površinsko napetost kot fiziološki mediji in so nad CMC same površinsko aktivne snovi. Zato smo prekinili s koncentracijo SDS blizu njegove CMC. Sproščanje smo nadaljevali le iz karagenana jota.

Sproščali smo v mediju ki smo mu dodali 1,25 g/l SDS in v mediju, ki smo mu dodali 0,625 g/l SDS. V prvem primeru se je izkazalo, da se je iz karagenana jota sprostilo le 3 % učinkovine, v mediju ki smo mu dodali 0,625 g/l pa tudi le okrog 3 % učinkovine (slika

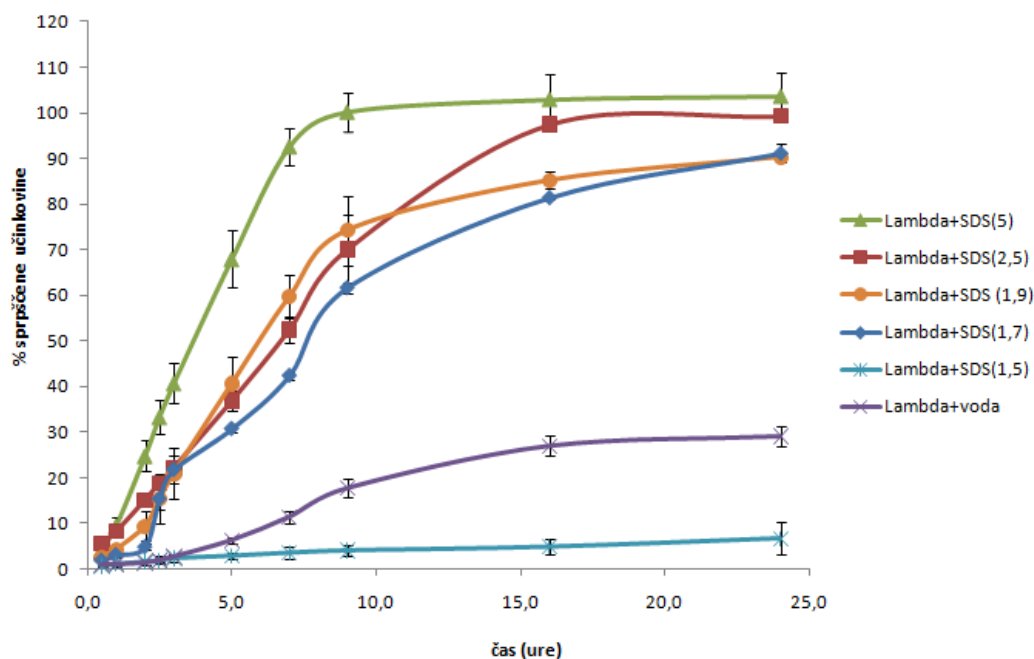
15). Zaključimo lahko, da morajo biti količine dodanega SDS visoko nad CMC, da se prekine kompleks z učinkovino.



Slika 14: Profil sproščanje DM iz tablet iz karagenana kapa v vodnem mediju z različnimi koncentracijami SDS.



Slika 15: Profil sproščanje DM iz tablet iz karagenana jota v vodnem mediju z različnimi koncentracijami SDS.



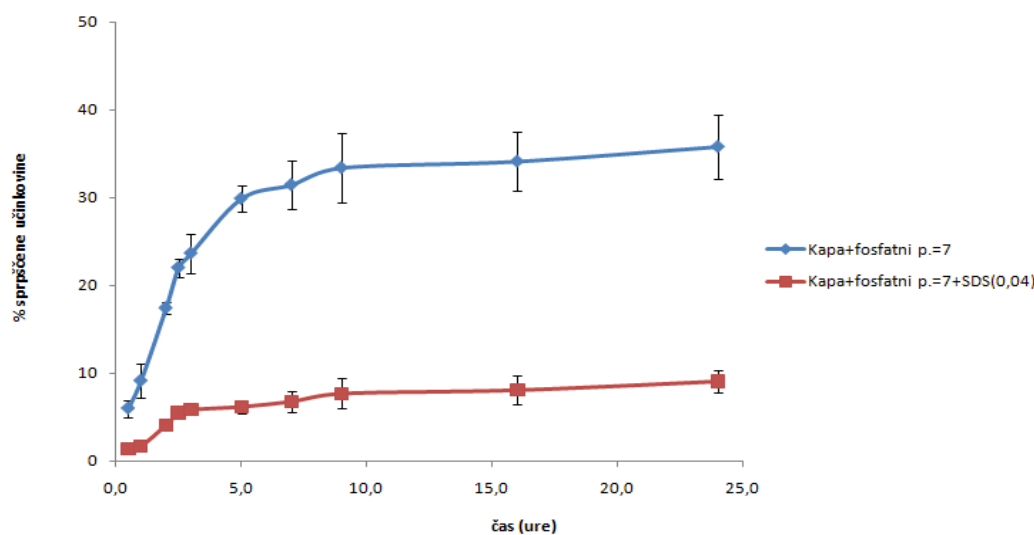
Slika 16: Profil sproščanje DM iz tablet iz karagenana lambda v vodnem mediju z različnimi koncentracijami SDS.

4.3.2. Sproščanje učinkovine iz tablet v fosfatnem pufru pH 7

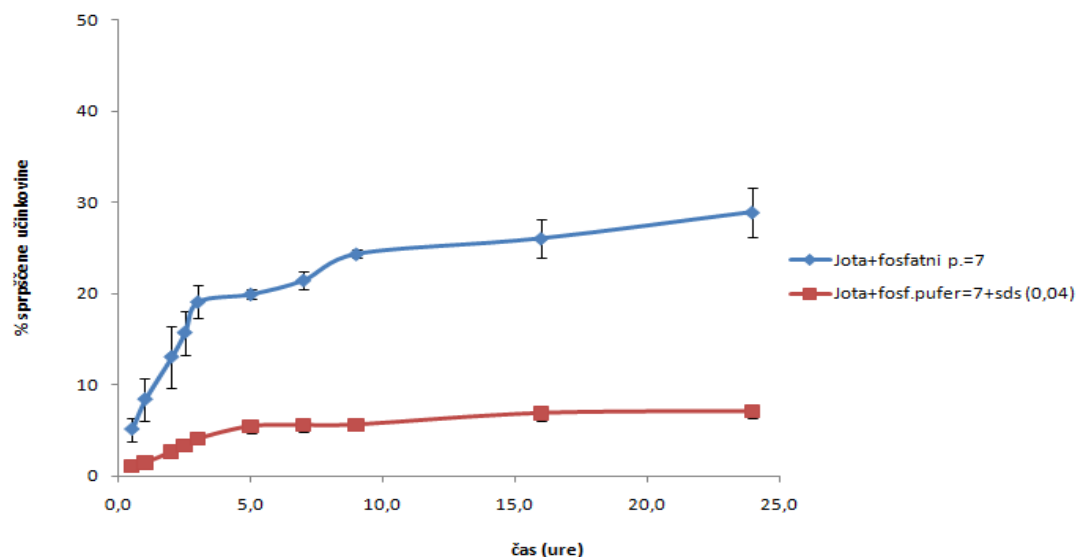
Preskuse sproščanja smo nadaljevali še v fosfatnem pufru s pH 7. Tablete so v 24-ih urah popolnoma razpadle. Preskuse sproščanje smo izvajali iz vseh treh vrst karagenanov.

Preskus sproščanja smo najprej izvedli v mediju brez dodatka SDS. Iz karagenana kapa se je sprostil 36 % učinkovine (slika 17). Iz karagenana jota se je sprostil 29 % učinkovine (slika 18). Iz karagenana lambda pa se je sprostil 26 % učinkovine (slika 19). Tudi v fosfatnem pufru pH 7 smo želeli preveriti vpliv SDS na sproščanje učinkovine iz tablet. Najprej smo preskusili z vrednostmi blizu tistim *in vivo*. Pufru smo dodali 0,04 g/l SDS, in se tako približali vrednosti površinske napetosti na tešče 53,04 mN/m. Iz karagenana kapa se je sprostil le 9 % učinkovine (slika 17), iz karagenana jota se je sprostil 7 % učinkovine (slika 18) in iz karagenana lambda le 6 % učinkovine (slika 19). Iz vseh treh vrst karagenanov se je sprostil manjši delež učinkovine kot v samem fosfatnem pufru pH 7

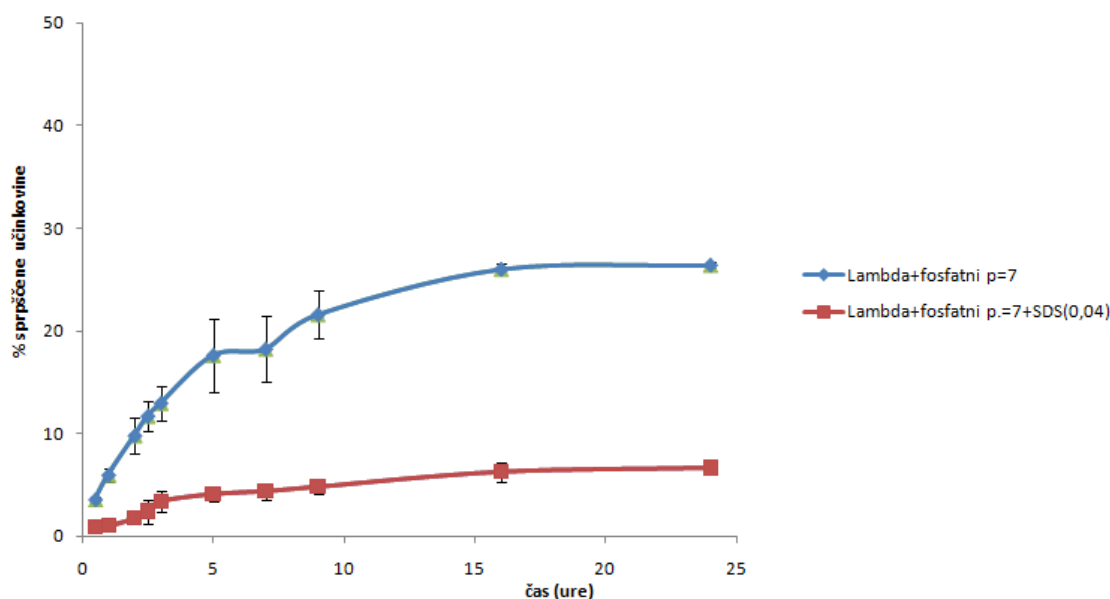
brez dodatka SDS. Profili sproščanja so podobni profilom sproščanja v vodnem mediju. Koncentracija 0,04 g/l SDS v fosfatnem pufru pH 7 ni dovolj visoka, da bi odtegnila DM iz kompleksa s karagenanom, ampak tega le obda s hidrofobnimi repi.



Slika 17: Primerjava profilov sproščanja DM iz tablet iz karagenana kapa v fosfatnem pufru pH 7 in v fosfatnem pufru pH 7 s SDS v koncentraciji 0,04 g/l.



Slika 18: Primerjava profilov sproščanja DM iz tablet iz karagenana jota v fosfatnem pufru pH 7 in v fosfatnem pufru pH 7 s SDS v koncentraciji 0,04 g/l.



Slika 19: Primerjava profilov sproščanja DM iz tablet iz karagenana lambda v fosfatnem pufru pH 7 in v fosfatnem pufru pH 7 s SDS v koncentraciji 0,04 g/l.

Iz podobnih razlogov kot v vodi tudi v fosfatnem pufru pH 7 sproščanja nismo nadaljevali v mediju, ki bi mu dodali 0,06 g/l SDS in se tako približali površinski napetosti po hranjenju 47,85 mN/m. Zato pa smo začeli proučevati, katera koncentracija SDS bo dovolj visoka, da odtegne DM iz kompleksa in tvori micel z DM. Zanimal nas je tudi, vpliv fosfatnega pufra pH 7 na sproščanje v primerjavi s sproščanjem v prečiščeni vodi.

Najprej smo sproščanje izvedli pri koncentraciji 5 g/l SDS. Iz karagenana kapa se je sprostil vsa učinkovina med peto in sedmo uro (slika 20), iz karagenana jota med sedmo in deveto uro (slika 21) in prav tako iz karagenana lambda med sedmo in deveto uro (slika 22).

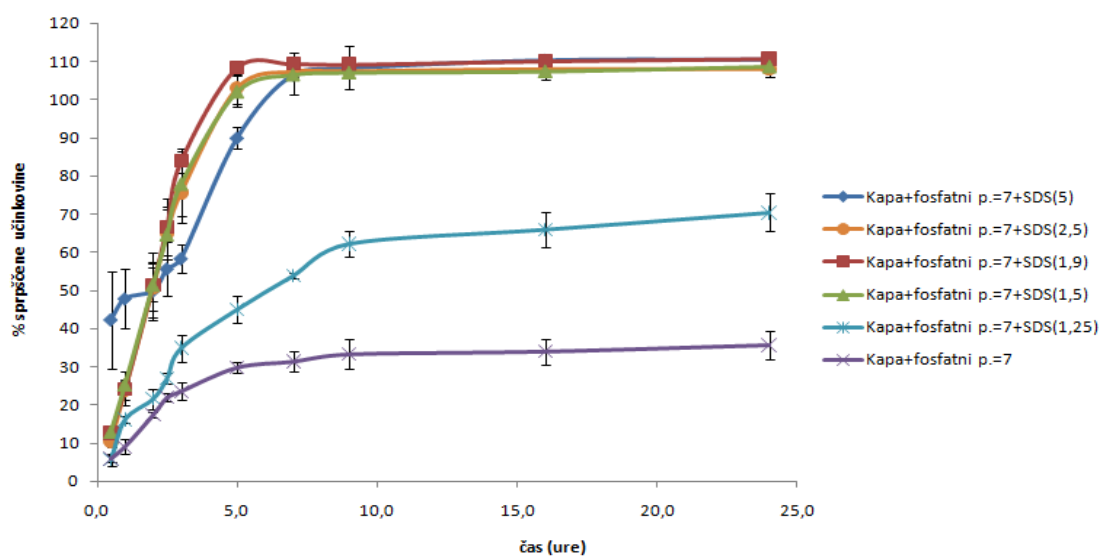
Nato smo za sproščanje uporabili 2,5 g/l in 1,9 g/l SDS. Iz karagenana kapa se je celotna količina učinkovina v obeh koncentracijah sprostila med peto in sedmo uro (slika 20). Čas sproščanja se ni spremenil, če ga primerjamo s sproščanjem v koncentraciji 5 g/l. Iz karagenana jota (slika 21) in lambda (slika 22) se je celotna količina učinkovine v obeh koncentracijah sprostila med deveto in šestnajsto uro, čas sproščanja se je podaljšal glede

na sproščanje v koncentraciji 5 g/L. Hitrost sproščanja je bila najhitrejša iz karagenana kapa, sledila naj bi jota in lambda. Vendar sproščanje poteka iz karagenanov jota in lambda približno enako iz razlogov, ki smo jih že predhodno omenili. Porazdelitev sulfatnih skupin je lahko v praksi drugačna in ni v skladu s teoretično. Poleg tega je možno, da pride do drugačne prostorske porazdelitve sulfatnih skupina tako, da se na karagenan jota veže več ZU, kar upočasni sproščanje.

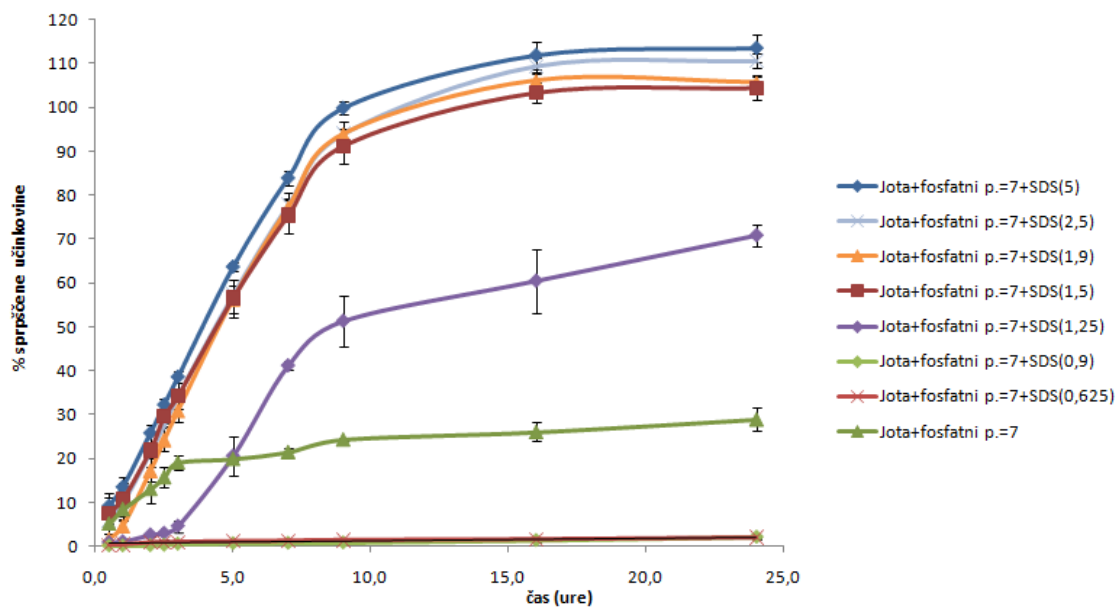
Koncentracijo SDS smo še nadaljne znižali na 1,5 g/l. Iz karagenana kapa se je sprostila celotna količina učinkovine med deveto in šestnajsto uro (slika 21), čas sproščanja se je podaljšal glede na koncentracije 5, 2,5 in 1,9 g/l. Iz karagenanov jota (slika 22) in lambda (slika 23) se je celotna količina učinkovine sprostila med deveto in šestnajsto uro, čas sproščanja je ostal enak kot pri koncentracijah 2,5 in 1,9 g/l SDS. Zanimivo je to, da se je v vodnem mediju v enaki koncentraciji iz karagenana kapa sprostilo 23 % učinkovine (slika 14), iz karagenana jota 30 % (slika 15) in iz karagenana lambda 6 % učinkovine (slika 16). To predpisujemo vplivu različnih elektrolitov, predvsem natrijevih ionov, ki vodijo do hitrejšega sproščanja učinkovine, saj tekmujejo za vezavna mesta na polielektrolitu.

Sproščanje smo nadaljevali še v mediju, kateremu smo dodali 1,25 g/l SDS. Iz karagenana kapa se je v 24-ih urah sprostilo 70 % učinkovine (slika 21), iz karagenana jota prav tako 70 % učinkovine (slika 21) in iz karagenana lambda 63 % učinkovine (slika 22). Pri vseh treh vrstah karagenanov se pri omenjeni koncentraciji ne sprosti celotna količina učinkovine. Razlog za to je, da koncentracija 1,25 g/l ni dovolj visoka, da bi odtegnila ves DM iz kompleksa. Vse te koncentracije SDS imajo nižjo površinsko napetost kot fiziološki medij. Prav tako so nad CMC površinsko aktivne snovi. Kljub temu, da se iz vseh treh karagenanov ni sprostila celotna količina učinkovine, smo koncentracije SDS ponovno znižali, da bi se čim bolj približali CMC. Sproščanje smo izvedli le iz karagenana jota.

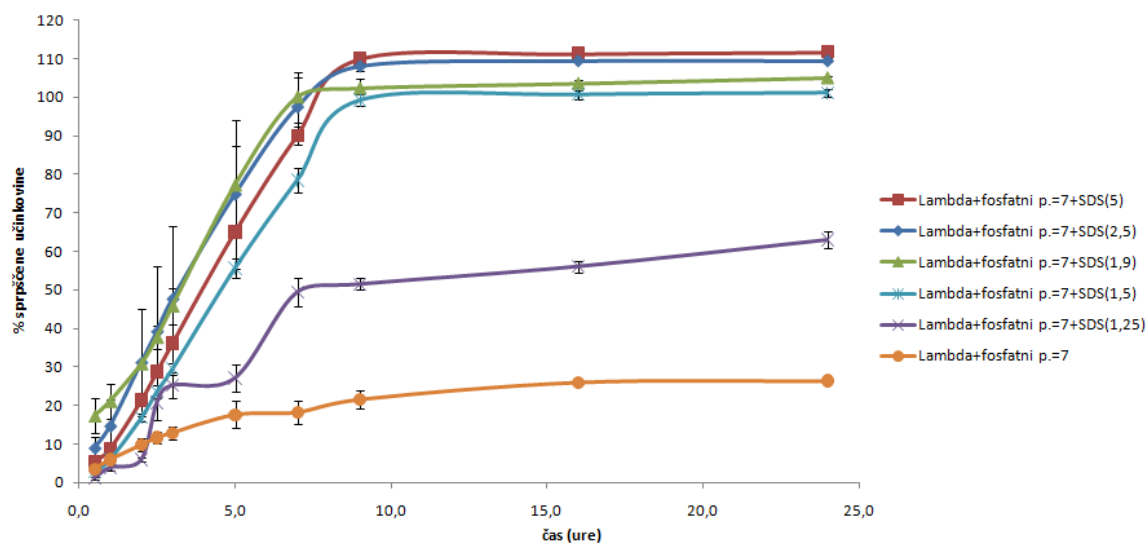
Sproščanje smo nadaljevali v mediju s koncentracijama 0,9 g/l in 0,625 g/l. Iz karagenana jota se je v prvem in drugem primeru sprostilo le 2 % učinkovine (slika 22) kar je manj kot v samem fosfatnem pufru pH 7. Potrdili smo, da mora biti koncentracija SDS krepko višja od CMC če želimo, da se sprosti celoten odmerek ZU.



Slika 20: Profil sproščanje DM iz tablet iz karagenana kapa v fosfatnem pufru pH 7 z različnimi koncentracijami SDS.



Slika 21: Profil sproščanje DM iz tablet iz karagenana jota v fosfatnem pufru pH 7 z različnimi koncentracijami SDS.



Slika 22: Profil sproščanje DM iz tablet iz karagenana lambda v fosfatnem pufru pH 7 z različnimi koncentracijami SDS.

4.3.3. Primerjava profilov sproščanja učinkovine iz tablet v prečiščeni vodi in fosfatnem pufru pH 7

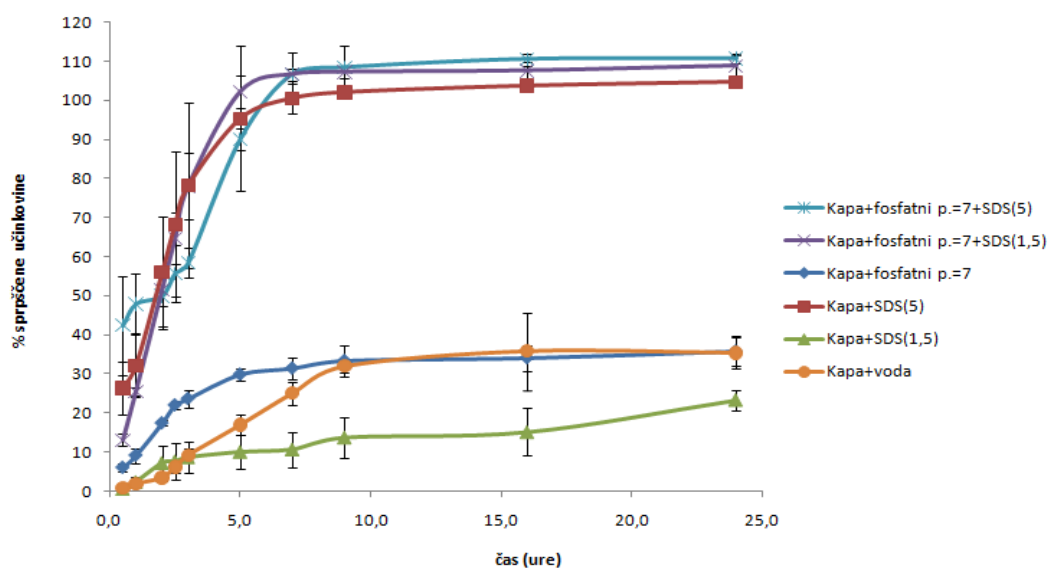
Primerjali smo profile sproščanja za vse tri vrste karagenanov v vodnem mediju in fosfatnem pufru pH 7 brez dodatka SDS, ter v vodnem mediju in fosfatnem pufru pH 7 z dodatkom 5 g/l SDS. Slednjo smo izbrali, ker je omogočila sprostitvev celotnega odmerka, prav tako pa je visoko nad CMC te spojine v vodnem mediju in fosfatnem pufru pH 7. Primerjali smo tudi profile sproščanja v vodnem mediju in fosfatnem pufru z dodatkom 1,5 g/l SDS. To koncentracijo pa smo si izbrali, ker se v fosfatnem pufru pH 7 sprosti celotna količina učinkovine, medtem, ko se pri isti koncentraciji SDS v vodnem mediju ne sprosti celotna količina učinkovine.

Iz profilov sproščanja (slike 23-25) je razvidno, da sproščanje učinkovine v prisotnosti ionov iz fosfatnega pufra poteka precej drugače. Že sama večja ionska jakost raztopine vodi do samoasociacije doksazosinijevih ionov pri nižjih koncentracijah, saj so privlačne sile med karagenani in DM v vodi močnejše kot v fosfatnem pufru (26). Poleg tega pa prisotnost različnih elektrolitov, predvsem natrijevih ionov, vodi do hitrejšega sproščanja

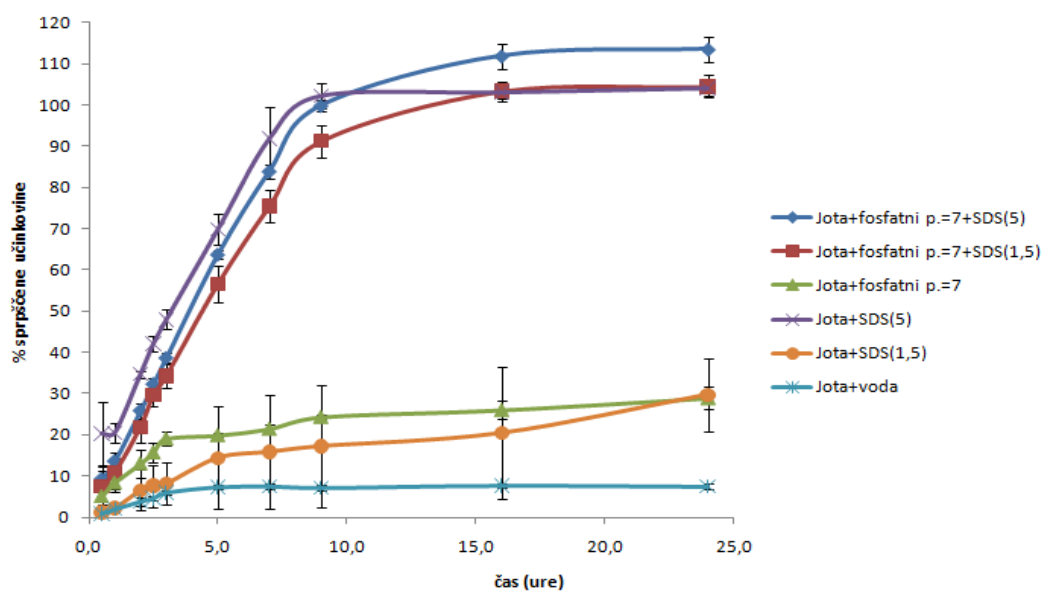
učinkovine, saj le ti tekmujejo za vezavna mesta na polielektrolitu. Ta efekt je posebno izražen pri sproščanju iz karagenana jota. Ta namreč ob prisotnosti natrijevih ionov tvori dvojno vijačnico, ki vpliva na sproščanje učinkovine iz ogrodne tablete. Ob nastanku dvojne vijačnice se zmanjša število interakcij med karagenanom jota in DM, rezultat tega pa je hitrejše sproščanje učinkovine (7). V koncentracijah SDS, ki so visoko nad CMC, pa je ta efekt manj izražen, saj kompleks DM/karagenan razgradi že visoka koncentracija SDS.

Koncentracija 1,5 g/l SDS v vodi pa ni bila dovolj visoka, da bi odtegnila DM iz kompleksa in tvorila micele z učinkovino. V fosfatnem pufru pH 7 pa se je v isti koncentraciji sprostila celotna količina učinkovine. Iz tega je razvidno, da celotna sestava okoljnega medija vpliva na količina sproščene učinkovine.

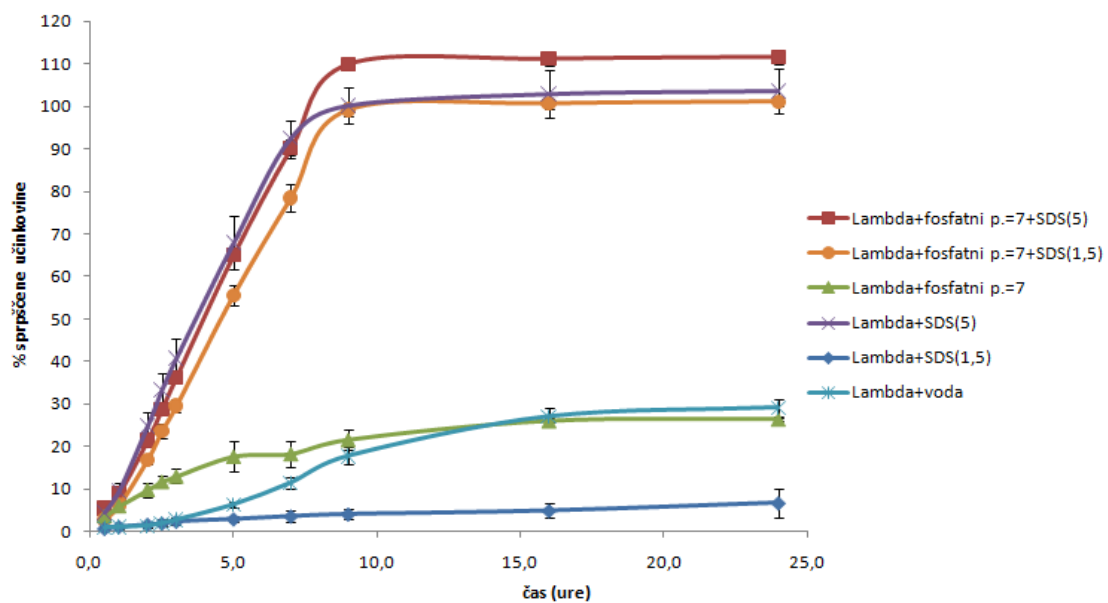
Zanimivo je, da mora biti koncentracija SDS krepko višja od CMC, če želimo, da se sprosti celoten odmerek ZU. Po eni strani bi tako lahko trdili, da bo v GIT-mediju, kjer je površinska napetost višja kot površinska napetost v bližini CMC, sproščanje nepopolno. Vendar pa tega ne moremo trditi zagotovo, saj so učinki različnih površinskih snovi različni.



Slika 23: Primerjava profilov sproščanja učinkovine iz tablet iz karagenana kapa v vodnem mediju in fosfatnem pufru pH 7.



Slika 24: Primerjava profilov sproščanja učinkovine iz tablet iz karagenana jota v vodnem mediju in fosfatnem pufru pH 7.



Slika 25: Primerjava profilov sproščanja učinkovine iz tablet iz karagenana lambda v vodnem mediju in fosfatnem pufri pH 7.

5. SKLEP

V diplomski nalogi smo proučevali vpliv Na-lavrilsulfata (SDS) na sproščanje doksazosin mesilata (DM) iz tablet na osnovi karagenanov. Znano je namreč, da DM in karagenan tvorita kompleks, katerega sproščanje je odvisno od naboja na karagenanu in medija, v katerem se polimer in DM nahajata.

Dokazali smo, da količina dodanega SDS vpliva na sproščanje DM. Z nižanjem količine dodanega SDS se zmanjša tudi količina sproščene učinkovine. Koncentracija SDS mora biti dovolj visoka, da odtegne DM iz kompleksa s karagenanom in tvori micel z učinkovino. Količina SDS, ki zniža površinsko napetost blizu pogojem *in vivo*, je absolutno prenizka, da bi se DM v celoti sprostil.

Sproščanje je ob prisotnosti SDS najhitreje potekalo iz karagenana kapa, temu naj bi po literarnih podatkih sledila karagenan jota in karagenan lambda. V večini primerov smo to dokazali tudi mi in ugotovili, da je za bolj nabit polimer (lambda) potrebna višja koncentracija SDS, da se sprost celoten odmerek ZU. V nekaterih primerih pa se je izkazalo, da se hitrost sproščanja iz karagenanov jota in lambda ni bistveno razlikovala, ne glede na prisotnost SDS. Domnevamo, da je to posledica drugačne porazdelitve sulfatnih skupin, ki ni v skladu s teoretično, ali drugačna prostorska porazdelitev sulfatnih skupina in ne vpliv SDS.

Koncentracija SDS mora biti tako v vodi kot fosfatnem pufru pH 7 veliko višja od CMC površinsko aktivne snovi, da dosežemo sprostitve celotne količine učinkovine. SDS je anionska PAS, ki s karagenanom tekmuje za vezavno mesto z DM. V vodnem mediju je bil vpliv SDS jasno viden, saj se je z nižanjem SDS, zmanjšala tudi količina sproščene učinkovine. Dokazali smo tudi, da poleg SDS na sproščanje vpliva tudi sestava okoljnega medija. V fosfatnem pufru pH 7 prisotni elektroliti tekmujejo z učinkovino za vezavna mesta na karagenanu in pospešijo sproščanje učinkovine. Poleg tega pa so odgovorni za nastanek dvojne vijačnice, ki tudi pospeši sproščanje učinkovine zaradi zmanjšanja interakcij med karagenanom jota in DM. Efekt prisotnih elektrolitov v mediju je bil še

posebno opazen pri koncentraciji 1,5 g/l, saj se je v fosfatnem pufru pH 7 sprostila celotna količina učinkovine, medtem, ko se pri isti koncentraciji v vodnem mediju ni. Koncentracija SDS, ki je potrebna za cepitev kompleksa in sprostitve celotne učinkovine, je nižja v fosfatnem pufru pH 7, med 1,25 in 1,5 g/l, v vodnem mediju pa 1,7 g/l.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je sproščanje doksazosin mesilata iz karagenanov močno odvisno od sestave okoljnega medija. V prebavnem traktu se sproščajo različne vrste PAS, zato bi bilo smiselno proučevati interakcije v pogojih, ki bodo čim bolj posnemali fiziološke. Za sproščanje bi bilo potrebno uporabiti biorelevantne medije, saj bi se s tem približali *in vivo* pogojem in dosegli končni cilj, kakšno je dejansko primerljivo sproščanje DM iz tablet karagenana *in vivo*.

6. LITERATURA

1. Baumgartner S: Vpliv gibanja prebavnega trakta na potovanje farmacevtskih oblik in absorpcijo učinkovin. *Farm Vestn* 2003; 54: 573-581.
2. *Formularium Slovenicum*, Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 2.0. Ministrstvo za zdravje, Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, Ljubljana, 2005: 77, 430.
3. Aulton M: Modified-release peroral dosage forms. In: *Aulton's pharmaceuticals; the design and manufacture of medicines*. Edinburgh, 2007: 483-499.
4. Wise DL: *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. Marcel Dekker, New York, 2000: 183-195.
5. Colombo P, Bettini R, Santi P, et al: Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharm Sci Technol Today* 2000; 6: 198-204.
6. Mikac U, Sepe A, Kristl J, Baumgartner S: A new approach combining different MRI methods to provide detailed view on swelling dynamics of xanthan tablets influencing drug release at different pH and ionic strength. *J Controlled Release* 2010; 154 (3): 247-256.
7. Pavli M: Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
8. Lin C, Metters AT: Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1379-1408.
9. Pavli M, Vrečer F, Baumgartner S: Interpolimerni kompleksi. *Farm Vestn* 2008; 59: 121-127.

10. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ: Carrageenan. In: Handbook of pharmaceutical excipients. The Pharmaceutical Press, London, 2005: 101-103.
11. De Ruiter GA, Rudolph B: Carrageenan biotechnology. Trends Food Sci Technol 1997; 8: 389-395.
12. Yuguchi Y, Thuy TT, Urakawa H, et al: Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. Food Hydrocolloids 2002; 16: 515-522.
13. <http://www.fmcbiopolymer.com/Food/Ingredients/Carrageenan/Introduction.aspx>
14. Fulton B, Wagstaff AJ, Sorkin EM: Doxazosin. An update of its clinical pharmacology and therapeutic applications in hypertension and benign prostatic hyperplasia. Drugs 1995; 49 (2): 1580-1587.
15. http://www.pfizer.com/general/search_results.jsp
16. Aguzzi C, Bonferoni M, Fortich M, et al: Influence of complex solubility on formulations based on lambda carrageenan and basic drugs. AAPS PharmSciTech 2002; 3: 83-89.
17. European Pharmacopoeia 6th Edition, EDQM, Strasbourg, 2007: 266-279.
18. Welling PG: Pharmacokinetics: Processes, Mathematics and Applications 2nd Ed. American Chemical Society, Washington, DC, 1997: 43-50.
19. FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. CDER, 1997.
20. Li X, Jasti BR: Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. McGraw-Hill, New York, 2006: 41-52.
21. Dimnik A, Kerč J: Gastrorezistentne obloge za trdne farmacevtske oblike. Farm Vestn 2004; 55: 35-42.

22. Božić V: Vpliv karagenanov na sproščanje kationske učinkovine iz ogrodnih tablet. Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008.
23. Dressman J, Boni JE, Brickl RS: Instant FaSSIF and FeSSIF-Biorelevance Meets Practicality. *Dissolution Technol* 2009: 41-45.
24. Hernáinz F, Gálvez A, Calero-de Hoces M. Surface Tension of Aqueous Solutions of Sodium Dodecyl Sulfate from 20° to 50° C and pH between 4 and 12. *J. Chem Eng Data* 1998; 43: 717-718.
25. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu Fizikalna farmacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003: 22-27.
26. Kos P: Študij kompleksov med kationsko učinkovino in polianionskimi karagenani za doseganje prirejenega sproščanja. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2010.