

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJ DOLENC

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJ DOLENC

**VPLIV PUFRSKIH SISTEMOV NA TOPNOST IZBRANIH
SOLI NAPROKSENA IN CIPROFLOKSACINA PRI
KONSTANTNEM pH**

**THE INFLUENCE OF BUFFER SYSTEMS ON SOLUBILITY
OF SELECTED SALTS OF NAPROXEN AND
CIPROFLOXACIN AT CONSTANT pH**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljal v Krki, d. d., Novo mesto, v Sektorju za razvoj in raziskave, na Oddelku za raztapljanje, pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja, mag. farm., in somentorja dr. Darka Uršiča, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se Krki, d. d., Novo mesto, ki mi je omogočila vse potrebne materiale za nemoteno izdelavo naloge. Posebej se zahvaljujem somentorju dr. Darku Uršiču in prof. dr. Francu Vrečerju za vso pomoč pri izvedbi in pisanju diplomske naloge. Za strokovne nasvete se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Oddelku za raztapljanje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja, mag. farm., in somentorja dr. Darka Uršiča, mag. farm.

Tadej Dolenc

Predsednik komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

VSEBINA

| | |
|--|-----------|
| POVZETEK | 3 |
| SEZNAM OKRAJŠAV | 4 |
| 1. UVOD | 5 |
| 1.1 Lastnosti v vodi slabo topnih ionizirajočih zdravilnih učinkovin | 5 |
| 1.2 Soli slabo topnih ionizirajočih zdravilnih učinkovin | 6 |
| 1.3 Osnove o topnosti | 7 |
| 1.4 Merjenje topnosti..... | 10 |
| 1.5 Metode za določevanje topnosti | 13 |
| 1.6 Hitrost raztapljanja..... | 16 |
| 1.7 Pufri | 19 |
| 1.7.1 Acetatni pufer..... | 20 |
| 1.7.2 Fosfatni pufri | 20 |
| 1.7.3 Bis-tris metan pufer..... | 22 |
| 1.8 Naproksen in natrijev naproksenat..... | 23 |
| 1.8.1 Fizikalno-kemijske lastnosti naproksena..... | 23 |
| 1.8.2 Biofarmacevtske lastnosti naproksena | 23 |
| 1.9 Ciprofloksacin in ciprofloksacinijev klorid | 24 |
| 1.9.1 Fizikalno-kemijske lastnosti ciprofloksacina | 24 |
| 1.9.2 Biofarmacevtske lastnosti ciprofloksacina | 25 |
| 2. NAMEN DELA | 26 |
| 3. MATERIALI IN METODE..... | 27 |
| 3.1 Materiali | 27 |
| 3.2 Aparature in laboratorijska oprema..... | 27 |
| 3.3 Metode..... | 28 |
| 3.3.1 Priprava medijev za določanje topnosti naproksena | 28 |
| 3.3.2 Priprava medijev za določanje topnosti ciprofloksacina..... | 30 |
| 3.3.3 Shake-flask metoda | 32 |
| 3.3.4 Topnost naproksena in natrijevega naproksenata..... | 32 |
| 3.3.5 Topnost ciprofloksacina in ciprofloksacinijevega klorida..... | 32 |
| 3.3.6 Merjenje pH vzorcev | 32 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.7 | UV-spektrofotometrija | 33 |
| 3.3.8 | Priprava vzorcev za UV-spektrofotometrijo | 33 |
| 3.3.9 | Metoda IDR | 35 |
| 3.3.10 | Raztapljanje tablet..... | 35 |
| 3.3.11 | Spremljanje obarjanja zdravilne učinkovine | 36 |
| 3.3.12 | Preverjanje oblike oborjene zdravilne učinkovine | 36 |
| 4. | REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 38 |
| 4.1 | Utemeljitev metode | 38 |
| 4.2 | Izbira primernih pufrov | 39 |
| 4.3 | Umeritvena premica za UV-spektrofotometrijo | 40 |
| 4.3.1 | Umeritvena premica naproksena..... | 40 |
| 4.3.2 | Umeritvena premica ciprofloksacina | 42 |
| 4.4 | Topnost naproksena in naproksenata v pufrih različne sestave..... | 43 |
| 4.5 | Topnost ciprofloksacina in ciprofloksacinijevega klorida v pufrih različne sestave | 50 |
| 4.6 | IDR | 54 |
| 4.7 | Raztapljanje 275 mg tablet natrijevega naproksenata v različnih pufrih..... | 54 |
| 4.7.1 | Raztapljanje po metodi USP 2 | 54 |
| 4.7.2 | Raztapljanje po metodi USP 1 | 57 |
| 4.8 | Obarjanje naproksena iz raztopine natrijevega naproksenata | 62 |
| 4.9 | Obarjanje ciprofloksacina..... | 64 |
| 4.10 | Preverjanje oborjene oblike zdravilne učinkovine | 65 |
| 5. | ZAKLJUČEK..... | 67 |
| 6. | LITERATURA..... | 69 |

POVZETEK

Poznavanje topnosti in hitrosti raztapljanja čiste zdravilne učinkovine je eno najpomembnejših področij predformulacijskih študij zdravilnih učinkovin. Na topnost zdravilne učinkovine vpliva mnogo dejavnikov, med njimi tudi sestava medija za določanje topnosti. Izboljšanje topnosti slabo topnih zdravilnih učinkovin najpogosteje dosežemo s tvorbo soli, vendar se na ta način ni povsem mogoče izogniti težavam s slabo topnostjo izhodiščne oblike, saj sta ionizirana in neionizirana zdravilna učinkovina v raztopini ves čas v ravnovesju.

V okviru diplomske naloge smo vrednotili vpliv sestave pufrskih sistemov na topnost naproksena in natrijevega naproksenata ter ciprofloksacina in ciprofloksacinijevega klorida. Rezultate smo vrednotili s klasično saturacijsko shake-flask metodo pri 37° C, koncentracijo v vzorcih smo določali UV-spektrofotometrično. Pokazali smo, da ima pomembno vlogo pri določanju topnosti slabo topnih kislih in bazičnih zdravilnih učinkovin pufrska kapaciteta medija. Na rezultate imata vpliv tudi ionska moč in ionska sestava pufra, prav tako pa tudi količina uporabljenega presežka zdravilne učinkovine. V pufrih z večjo ionsko močjo smo tako pri natrijevem naproksenatu kot tudi pri ciprofloksacinijevem kloridu ugotovili večjo topnost kot v tistih z nižjo ionsko močjo kljub enaki kapaciteti pufra. Prav tako smo obravnavali vpliv ionov, ki lahko zmanjšajo topnost zdravilne učinkovine ali pa z njo tvorijo slabše topno sol. Vrednotili smo tudi profile sproščanja iz tablet, ki so vsebovale natrijev naproksenat. Ugotovili smo, da je sestava pufra bistveno vplivala na profil sproščanja zdravilne učinkovine, kljub temu da smo uporabili pufre z isto pH vrednostjo. Sproščanje v 50 mM fosfatnem pufru s pH 4,5 je bilo hitrejše kot v acetatnem pufru z istim pH in enako koncentracijo. Variabilnost profila raztapljanja zdravilne učinkovine je bila v acetatnem pufru večja kot v fosfatnem. Raziskovali smo tudi mehanizem pretvarjanja presežka natrijevega naproksenata v naproksen. Pokazali smo, da je topnost natrijevega naproksenata s klasično saturacijsko metodo v medijih pod pH_{max} nemogoče določati, saj je ves presežek soli izločil v obliki naproksena, katerega topnost smo pri istem pH določili.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | | |
|----------------|---|--|
| BCS | – | biofarmacevtski klasifikacijski sistem (ang. Biopharmaceutics Classification System) |
| DTT | – | metoda s titracijo raztapljanja (ang. dissolution titration template method) |
| DMSO | – | dimetil sulfoksid |
| EMA | – | Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency) |
| FDA | – | US Food and Drug Administration |
| FDM | – | metoda olajšanega raztapljanja (ang. facilitated dissolution method) |
| HPLC | – | visokotlačna tekočinska kromatografija |
| IDR | – | intrinzična hitrost raztapljanja (ang. intrinsic dissolution rate) |
| MSF | – | miniaturizirana shake-flask metoda (ang. miniaturized shake-flask method) |
| R ² | – | kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije |
| RSD | – | relativna standardna deviacija |
| USP | – | ameriška farmakopeja (ang. The United States Pharmacopeia) |

1. UVOD

»Merjenje topnosti v ravnotežnih pogojih je delovno intenziven, vendar dokaj enostaven postopek za izvedbo. Kljub temu sta interpretacija rezultatov in razumevanje učinka nadzora spremenljivk (pH, koncentracija itd.) mnogo zahtevnejša, kot si predstavlja večina strokovnjakov s področja fizikalne kemije,« (1) dr. Alex Avdeef, avtor knjige Absorbtion and drug developement, pisec več strokovnih člankov, ustanovitelj in bivši direktor podjetja pION Inc.

1.1 Lastnosti v vodi slabo topnih ionizirajočih zdravilnih učinkovin

Poznavanje topnosti in hitrosti raztapljanja čiste zdravilne učinkovine je eno najpomembnejših področij predformulacijskih študij zdravilnih učinkovin. Osnovne fizikalno-kemične lastnosti molekul bistveno vplivajo na razpolovno dobo, porazdelitveni koeficient in biorazpoložljivost učinkovine tudi v končnih izdelkih (2).

Na molekularnem nivoju sta glavna razloga za slabo topnost nekaterih molekul velika hidrofobnost in močne intermolekulske interakcije. Za prehod iz trdnega v raztopljeno stanje molekule je zato potrebno veliko dodane energije. Poleg lastnosti molekule na topnost vpliva tudi oblika, v kateri se učinkovina nahaja. Zaradi nepolarosti je velikokrat ovira slaba močljivost, zato se pogosto zgodi, da učinkovina plava na površini, s čimer se bistveno zmanjša stik z medijem, s tem pa se spremeni tudi hitrost raztapljanja.

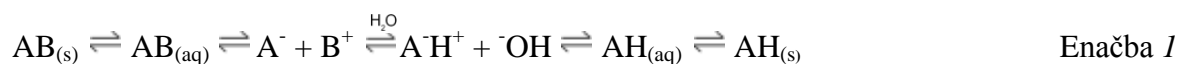
Slabo topne ionizirajoče molekule zdravilne učinkovine so pogosto amfifilne, saj imajo hidrofilen in hidrofoben del. Hidrofilni del največkrat predstavlja karboksilna ali kaka druga kislina skupina (oziroma bazična skupina), hidrofobnega pa nepolarni deli molekule. Takšne molekule imajo lahko izraženo površinsko aktivnost. Njihove lastnosti niso povsem enake raztopinam površinsko aktivnih snovi, vendar lahko v koncentraciji nad kritično mejo prav tako povzročijo samoagregacijo in tvorbo micelnih struktur, kar otežuje razumevanje topnosti. V vodnem okolju se molekule amfifilne zdravilne učinkovine razporedijo v posebne strukture in na ta način zmanjšajo neugodne interakcije med hidrofobnim delom in vodnimi molekulami. Hidrofobni del zdravilne učinkovine se

orientira proti središču micela, hidrofilni del pa ostane na površini in v stiku z vodnimi molekulami. Tvorba micelov navidezno poveča topnost zdravilne učinkovine, za koliko pa je odvisno od števila molekul, ki se povežejo skupaj. Najznačilnejši primeri takšnih tipov zdravil so nekateri antihistaminiki, antiholinergiki, pomirjevala in antidepresivi (3–4).

1.2 Soli slabo topnih ionizirajočih zdravilnih učinkovin

Tvorjenje soli je najpogostejši in najučinkovitejši način povečanja topnosti in hitrosti raztapljanja kislinskih in bazičnih zdravilnih učinkovin. Največkrat gre za tvorbo soli močnih kislin s šibko bazično zdravilno učinkovino oziroma močnih baz s šibko kislino zdravilno učinkovino. Soli zdravilnih učinkovin s šibkimi bazami ali kislinami (npr. maščobnimi kislinami) so lahko celo slabše topne od osnovne oblike (5). Soli v stiku z vodo omogočijo lažjo disociacijo, kar poveča hidrofilnost molekule. Posledično se izboljša tudi močljivost, zato zdravilna učinkovina v obliki soli običajno ne plava na površini. Poveča se tudi hitrost raztapljanja. Kljub temu se vsem težavam s slabo topnostjo s tvorbo soli ne da povsem izogniti.

Ionizirana oblika v raztopini je v ravnovesju z raztopljeno neionizirano obliko. V primeru, da je topnost neionizirane oblike presežena, se ta lahko obori. Hidroliza soli šibke kisline z močno bazo v kislino poteka preko več vmesnih stopenj, kar je prikazano z Enačbo 1. Sol šibke kisline ($AB_{(s)}$) se v vodi najprej raztopi ($AB_{(aq)}$). Nato poteče v območju pod pH_{max} (glej spodaj) disociacija na ostanek kisline in baze ($A^- + B^+$). Ta reakcija je pri solih običajno hitra, ravnovesje pa močno nagnjeno v smer disociacije. Ostanek kisline nato privzame proton iz vode (A^-H^+) in tako nastane raztopljena oblika neionizirane kisline ($AH_{(aq)}$). Topnost neionizirane oblike je pri slabo topnih zdravilnih učinkovinah nizka, zato se lahko v primeru, da je bilo v raztopino dodano dovolj soli, kislina iz raztopine obori kot trdna snov.



1.3 Osnove o topnosti

Topnost (nasičena raztopina) predstavlja stanje, ko je trden topljenec v ravnotežju z raztopino (topljenecem, raztopljenim v topilu) (6). Poznamo več vrst definicij topnosti.

- Kinetična topnost je koncentracija topljenca v trenutku, ko se v raztopini pojavi prva oborina. Običajno se določa z ohlajanjem raztopine ali pa z dodajanjem netopila (7).
- Ravnotežna oziroma termodinamska topnost je topnost topljenca v nasičeni raztopini v prisotnosti neraztopljenega deleža, s katerim je v ravnovesju (7).
- Intrinzična topnost se nanaša na ravnotežno topnost proste kisline oziroma baze ionizirane učinkovine pri pH, kjer je učinkovina povsem neionizirana (7).

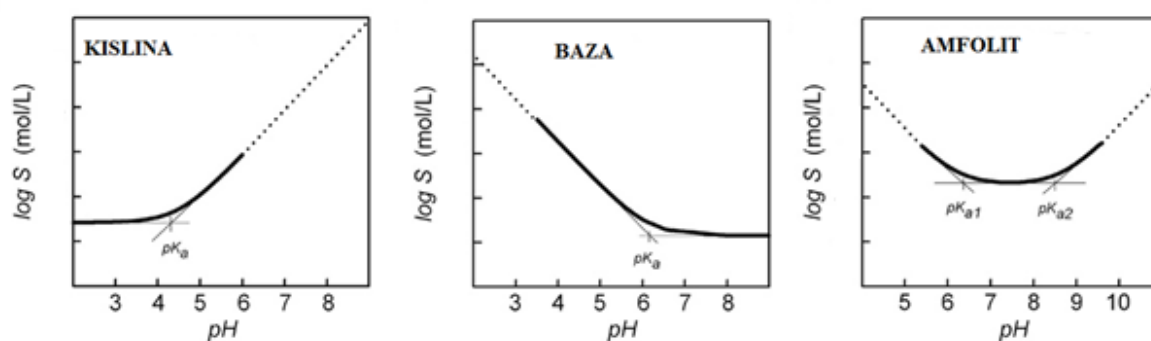
Lestvico za opisno vrednotenje topnosti navaja Evropska farmakopeja in je prikazana v Preglednici I.

Preglednica I: Lestvica za opisno vrednotenje topnosti (8).

| stopnja topnosti | volumen topila, potreben za raztapljanje 1 g vzorca | masa topljenca, ki se raztopi v 1000 ml topila |
|-------------------|---|--|
| zelo lahko topno | < 1 ml | > 1000 g |
| lahko topno | 1–10 ml | 1000–100 g |
| topno | 10–30 ml | 100–33,3 g |
| zmerno topno | 30–100 ml | 33,3–10 g |
| težko topno | 100–1000 ml | 10–1 g |
| zelo težko topno | 1000–10000 ml | 1–0,1 g |
| praktično netopno | > 10000 ml | < 0,1 g |

Na topnost vplivajo številni faktorji, vendar vseh še ne poznamo. Mehanizem topnosti se razlikuje za ionizirane in neionizirane spojine. Tiste, ki ne ionizirajo, so praviloma enako dobro topne pri vseh pH vrednostih. Na Sliki 1 so prikazani primeri pH odvisnih topnostnih profilov za šibko kislino, šibko bazo in amfoterno spojino (amfolit). Zdravilne učinkovine v obliki kisline so v medijih s pH vrednostjo pod pKa običajno slabo topne. Mnogo bolje so topne pri pH višjih od pKa. Pri pH nižjem od pKa je večina raztopljenih molekul neioniziranih. Z višanjem pH pa se povečuje delež ionizirane oblike, ki je bolj

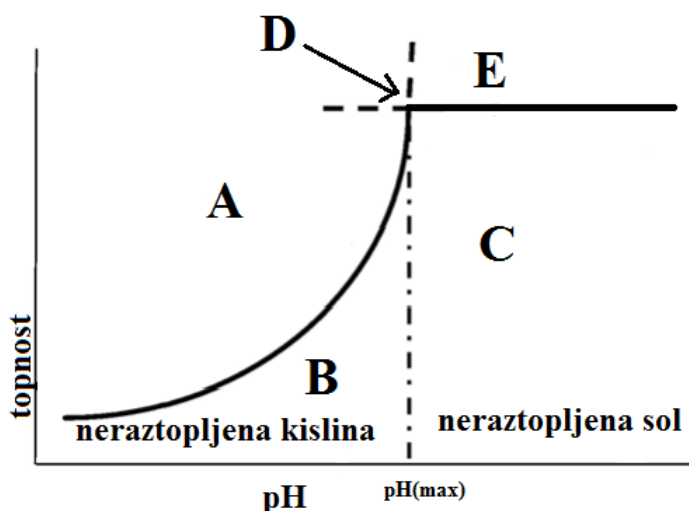
polarna in zato v polarnih medijih bolje topna. Bazam se topnost z višanjem vrednosti pH znižuje, z nižanjem pod pK_a pa povečuje, torej ravno obratno kot pri kislinskih zdravilnih učinkovinah. Amfoliti so snovi, ki se lahko obnašajo kot baza ali tudi kislina, torej imajo v svoji molekuli funkcionalne skupine, ki proton lahko ali sprejemajo ali oddajajo. Zdravilne učinkovine s takšnimi lastnosti imajo vsaj en kisel (pK_{a1}) in vsaj en bazičen center (pK_{a2}), zato jih imenujemo ioni dvojčki. Takšne učinkovine so običajno najslabše topne v območju med obema pK_a vrednostima (1).



Slika 1: Primeri topnostnih profilov za šibko kislino, bazo in amfolit (1).

Opisani fenomen lahko razložimo s Sliko 2, ki prikazuje topnostni profil proste šibke kisline in njene soli. Topnost narašča vse do pH_{max} , kjer je ta maksimalna. Nad to vrednostjo topnost ne narašča več, saj je že dosegla tudi topnost ionizirane oblike. V koncentracijskem območju A sta v ravnovesju trdna kislina in raztopljena ionizirana oblika. V primeru, da dodamo v raztopino presežno zdravilno učinkovino v obliki soli v pH območju pod pH_{max} , se bo ta najprej raztopila, nato pa pretvorila v prosto kislino, ki se bo oborila. V koncentracijskem območju B je vsa zdravilna učinkovina raztopljena, saj je njena koncentracija manjša od nasičene. Ne glede na to, ali raztopimo v mediju sol ali kislino v količini, ki ni prebitna glede na topnost neionizirane oblike (najslabše topne), bo v raztopini pri istem pH vedno isto razmerje ionizirane in neionizirane oblike. Če dodamo kislino, se bo del nje pretvoril v sol, če pa dodamo sol, bo del soli hidroliziral v kislino. V koncentracijskem območju C topnost ni presežena, zato je vsa zdravilna učinkovina raztopljena in ionizirana. V območju nad pH_{max} , v katerem je presežena tudi topnost ionizirane oblike (koncentracijsko območje E), bo v obliki trdnega neraztopljenega ostanka prisotna samo sol, ne glede na to, ali smo kot izhodiščno obliko uporabili kislino. Tudi če

dodamo presežno količino kisline, se bo ta preobrazila v sol, ki se bo zaradi presežene topnosti oborila. Obe obliki sta lahko istočasno neraztopljeni (v trdnem stanju) samo pri pH_{max} (točka D) (5). Enostavneje povedano, v območjih pH vrednosti pod pH_{max} je v presežni obliki mogoč samo obstoj neraztopljene kisline, pri pH nad pH_{max} pa je v obliki trdega presežka lahko samo sol, ne glede na to, katero obliko smo uporabili kot začetni prebitek.



Slika 2: Topnostni profil šibke kisline in njene soli (5).

Topnostni profil šibke baze in njene soli je podoben topnostnemu profilu šibke kisline, ki je prikazan na Sliki 2. Od njega se razlikuje v tem, da je zrcalno obrnjen preko osi pri pH_{max} .

Izmerjena vrednost kinetične topnosti je običajno višja od termodinamske, razlog za to pa je večja verjetnost nastanka prenasočene raztopine. Do obarjanja pri določanju kinetične topnosti navadno ne pride v trenutku, ko je dosežena topnost, ampak takrat, ko je ta že presežena. Prenasočene raztopine so raztopine, v katerih je pri ohranjenih pogojih raztopljenega več topljenca, kot je njegova nasičena topnost. Takšne raztopine so lahko stabilne ali nestabilne. V primeru, da je prenasočena raztopina tudi kinetično stabilna in do obarjanja ne pride tudi po daljšem časovnem obdobju, govorimo o metastabilnem stanju. Kadar pa prenasočena raztopina ni stabilna, pride do obarjanja tiste oblike, katere topnost je presežena. Običajno se obori druga kristalna oblika, najpogosteje kristalohidrat, ali pa

slabše topna sol (7, 9). Serajuddin in Mufson (9) sta omenila, da do nastanka metastabilnega stanja raztopine lahko pride predvsem, kadar določamo topnost kislini ali bazi, torej neionizirani obliki zdravilne učinkovine. Kot morebiten razlog za to sta navedla kinetične ovire, ki se pojavijo med preobrazanjem proste kisline oziroma baze v obliko soli. Do nastanka metastabilnega stanja lahko pride tudi, kadar kot trdno začetno snov uporabimo sol zdravilne učinkovine. V tem primeru je njen nastanek manj verjeten zaradi manjših kinetičnih ovir pri preobrazanju soli v kislino.

Serajuddin in Mufson (9) sta raziskovala od pH odvisno topnost papaverina. Poročala sta, da se je topnost papaverina med nižanjem pH v bližini pH 4,0 nenadoma povečala z 10 na več kot 120 mg/ml pri le minimalni spremembi pH vrednosti. Razlog za to sta pripisala nastanku metastabilnega stanja raztopine. Med nadaljnjim nižanjem pH za majhne vrednosti sta poročala o vedno večji topnosti, dokler ni izginil ves neraztopljeni papaverin. Koncentracija topljenca v mediju je bistveno preseгла njegovo topnost, vendar se oborina še vedno ni pojavila. Po dodatku nekaj kristalov papaverinijevega klorida v raztopino se je ravnovesje porušilo in izpadla je oborina, topnost pa se je znižala na pričakovano topnost zdravilne učinkovine.

1.4 Merjenje topnosti

Določanje topnosti slabo topnim zdravilnim učinkovinam, ki ionizirajo, ponuja celo vrsto izzivov, s katerimi se je za doseg relevantnih rezultatov potrebno soočiti in jih razumeti. Za ponovljivo in zanesljivo merjenje topnosti moramo upoštevati nekatera osnovna načela.

- Najpomembneje je, da v topljencu in v topilu niso prisotne nečistote, ki bi lahko vplivale na rezultat. Le tako lahko zagotovimo, da smo izmerili topnost želenemu analitu (9).
- Zagotoviti moramo konstantne pogoje merjenja (9). Ključno vlogo pri ohranjenih konstantnih pogojih ima nadzor konstantne temperature. Splošno znano je dejstvo, da se topnost večine zdravilnih učinkovin spreminja odvisno od temperature.
- Vzorec analiziramo šele po doseženem ravnotežnem stanju. To je lahko problematično, saj je čas za doseg ravnotežnega stanja pri slabo topnih zdravilnih

učinkovinah običajno zelo dolg. Doseganje ravnotežnega stanja je težavno predvsem pri metodah, ki temeljijo na obarjanju, saj mnoge zdravilne učinkovine pri manjših zunanjih spremembah in presežkih tvorijo metastabilno stanje (10). Tako je lahko izmerjena koncentracija večja od dejanske topnosti, kar je lahko eden izmed razlogov v precejšnjih odstopanjih literaturnih podatkov o topnostih zdravilnih učinkovin.

- Navedba metode, s katero smo določali topnost, je prav tako obvezna. Rezultati med meritvami s posameznimi metodami se namreč lahko med seboj precej razlikujejo.
- Omogočiti moramo tudi zadovoljivo ločitev tekoče faze od neraztopljenih trdnih delcev. To lahko storimo z dolgim časom, namenjenemu sedimentaciji, vendar se pogosteje uporabljata centrifugiranje ali filtriranje nastale suspenzije.

Poleg čistote medija na rezultate vpliva sestava medija. Vpliv na topnost zdravilnih učinkovin v obliki soli imajo predvsem ioni, ki so prisotni tudi v soli, in tisti, ki z zdravilno učinkovino tvorijo slabše topno sol. Znano je, da sta topnost in hitrost raztapljanja kloridnih soli nižji v medijih, ki vsebujejo HCl in NaCl. Podobno velja za natrijeve soli v medijih z NaCl (11). Predvsem pri tvorbi soli s kloridi se je potrebno zavedati, da do efekta skupnih ionov prihaja tudi v telesnih tekočinah. Upoštevanje tega dejstva je pomembno za biorelevantnost rezultatov.

Po doseženem ravnotežnem stanju je vedno potrebno preveriti identiteto neraztopljenega topljenca. Pogosto se namreč zgodi, da oborjena snov ni enaka začetni. Običajno gre za drugo, slabše topno, kristalno obliko. Pri določanju topnosti soli trden presežek največkrat ni prvotna sol, ampak izpade slabše topna oblika soli ali pa prosta kislina (5). Ali bo izpadla sol ali kislina, je odvisno od pH vrednosti pufra, natančnejša razlaga pa je opisana v poglavju 1.3.

Pri podajanju rezultatov vrednotenja topnosti večina raziskovalcev običajno ne navaja količine uporabljenega presežnega topljenca. Morda je nekoliko presenetljivo, a so rezultati nekaterih študij (12–13), kjer so preučevali topnost, pokazali, da presežna količina lahko pomembno vpliva na topnost z različnimi slabo poznanimi mehanizmi. Zato je

zaželeno navajati tudi količino učinkovine (vsaj večkratnik presežka), s katero je bila topnost zdravilne učinkovine določena.

Kawakami je s sodelavci (12) raziskoval topnost indometacina. V tem primeru so različnim natehtam indometacina dodali 1 ml citratnega pufra s pH 5. Po 120 urah inkubacije so izmerili mnogo večjo topnost pri manjših prebitkih v primerjavi z večjimi natehtami. Razlika med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo pri ohranjenih ostalih pogojih je bila kar 230 %. Pri 40 µg natehti so izmerili topnost 35 µg/ml, pri natehti 200 µg so izmerili 20 µg/ml in pri natehti 5000 µg manj kot 15 µg/ml. Povsem obraten pojav so opazili v fosfatnem pufri s pH 7. Tam so pri večjih natehtah zabeležili večjo topnost indometacina. Pri pH 6,5 so različnim natehtam določili enako topnost. Poročali so, da je bil razlog za to v različnih konstantah raztapljanja in kristalizacije. Konstanta raztapljanja se je z višanjem do pH 6 zniževala, konstanta kristalizacije pa povečevala. V območju med pH 6 in 7 sta se izenačili, zato tam razlik niso zabeležili. Podobne trende so opazili tudi pri drugih učinkovinah, vendar niso bili tako izraziti kot pri indometacinu.

V literaturi so podani različni podatki o topnostih posameznih zdravilnih učinkovin. Razlog za velike razlike ni povsem znan, najverjetneje pa so posledica uporabe različnih metod in izvedbe pri različnih pogojih. Razlikujejo se tudi za večje faktorje, kar je prikazano v Preglednici II.

Preglednica II: Pregled objavljenih literaturnih podatkov o topnostih nekaterih učinkovin (9, 12).

| učinkovina | topnost | faktor med minimalno in maksimalno vrednostjo |
|---------------|------------------|---|
| estradiol | 0,16–5,00 g/ml | 31 |
| indometacin | 4,00–14,0 g/ml | 3,5 |
| griseofluvin | 8,00–13,0 g/ml | 1,6 |
| progesteron | 7,90–200 g/ml | 25 |
| digoksin | 28,0–97,9 g/ml | 3,5 |
| riboflavin | 66,0–99,9 g/ml | 1,5 |
| deksametazon | 89,1–121,0 g/ml | 1,4 |
| hidrokortizon | 280–359 g/ml | 1,3 |
| lidokain | 2,30–4,60 g/ml | 2 |
| holesterol | 0,025–2600 µg/ml | 10 ⁵ |
| ibuprofen | 20–80 µg/ml | 4 |

1.5 Metode za določevanje topnosti

Običajno poteka določanje topnosti zdravilnim učinkovinam s tradicionalno saturacijsko metodo (ang. saturation shake-flask method). Pri tej metodi je potrebno natehtati presežek trdne snovi v vialo ali erlenmajrico s pufrom. Tako nastane disperzija, ki jo je potrebno stresati na stresalniku pri sobni temperaturi ali pa na stresalniku z inkubatorjem pri 37° C. Stresanje je potrebno do predvidene vzpostavitve ravnotežnega stanja. Po končanem stresanju je potrebno nekaj ur nameniti še sedimentaciji neraztopljenih delcev zdravilne učinkovine. Kot alternativo sedimentaciji lahko suspenzijo tudi filtriramo oziroma centrifugiramo. S tem dosežemo hitrejšo ločitev raztopine od trdnega preostanka. Če trdnega preostanka ne ločimo od raztopine, lahko izmerimo lažno povišane rezultate. Supernatant največkrat analiziramo z UV-spektrofotometrično metodo ali s HPLC. Za izdelavo pH-topnostnega profila je potrebno analize izvesti v različnih medijih. Shake-flask metoda je enostavna tehnika za izvedbo, vendar je časovno zelo potratna in zahteva veliko dela in spretnosti. Prav tako ni sprejetega standarda, po katerem naj bi se metoda

izvajala. V literaturi so za čas stresanja navedeni različni podatki, od osem ur pa do tri dni. Določena nista niti volumen medija in hitrost stresanja. Prav tako ni predpisana potrebna količina presežka za tvorbo disperzije (1, 9). Zaradi časovne potratnosti stresanja disperzije zdravilne učinkovine na stresalniku in velike potrebe po določanju topnosti so razvili več avtomatiziranih in hitrejših, vendar instrumentalno zahtevnejših metod.

Miniaturizirana saturacijska metoda (ang. miniaturized shake-flask method – MSF) se lahko uporablja za določanje topnosti vseh substanc. Je točnejša in natančnejša v primerjavi s potenciometričnimi metodami (glej spodaj). Način izvedbe je podoben kot pri klasični shake-flask metodi, le da poteka v manjšem merilu. Za izvedbo potrebujemo zadostno količina topljenca, ki ga natehtamo v posebne posodice aparature, v katere dodamo majhen volumen pufra. Po doseženem ravnovesnem stanju nastalo disperzijo prefiltriramo. Na teden je z eno nastavitvijo mogoče analizirati okrog 20 vzorcev (14). Patentirano metodo za izvedbo ima podjetje Pion Inc. iz ZDA, ki meritve tudi izvaja (15).

Določanje topnosti omogoča tudi metoda za raztapljanje, čeprav to ni njen osnovni namen. Najpomembnejša prednost te metode pred ostalimi je možnost ocenitve potrebne inkubacijske dobe. Čas, potreben za doseg ravnotežnega stanja, lahko dobro ocenimo iz profila raztapljanja topljenca. Kljub temu se metoda za raztapljanje za namen določanja topnosti redko uporablja. Za izvedbo v večini klasičnih aparatov za raztapljanje je potreben volumen medija med 500 in 900 ml. Zaradi tako velikih volumnov so za doseg ravnotežnega stanja potrebne tudi precejšnje količine zdravilne učinkovine. To je lahko ovira v začetnih fazah razvoja, saj takrat običajno še ni na voljo dovolj zdravilne učinkovine. Nekatera farmacevtska podjetja uporabljajo miniaturne aparate za raztapljanje, v katerih je mogoča izvedba že s samo 2 ml medija in posledično majhno količino zdravilne učinkovine, vendar več natančnejših informacij še ni znanih (1). Pri tej metodi je problematično predvsem vzorčenje zaradi majhnega volumna medija.

Pri potenciometričnih metodah lahko s pomočjo elektrode določamo tudi intrinzično topnost. Ena izmed takih pogosto uporabljenih metod je DTT (ang. dissolution titration template method). Odobrena je tudi s strani FDA, rezultate analiz pa lahko uporabljamo za razvrščanje v BCS. Za izvedbo potrebujemo posebno aparaturo pSOL. V aparaturo je potrebno vnesti pKa vrednost in porazdelitveni koeficient v sistemu oktanol-voda (logP).

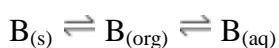
Iz pKa ter intrinzične topnosti aparatura pred pričetkom izvajanja poskusa najprej izračuna predvideno krivuljo topnosti. To nato uporabimo kot predlogo navodila postopka. Potrebno količino zdravilne učinkovine za izvedbo pri določenem pH predlaga sam program aparature, izračuna pa jo iz predloge navodila postopka. Običajno je za izdelavo celotnega pH profila topnosti z DTT metodo potrebnih 3–10 ur. Slabost metode je, da ne upošteva možnosti različnih ravnotežnih stanj, povezanih s kompleksacijo ali agregacijo (16). Metoda temelji na obarjanju učinkovine, zato omogoča samo določitev kinetične topnosti in nekaterih polimorfov z različno topnostjo.

Metode z DMSO se uporabljajo za merjenje kinetične topnosti zdravilnih učinkovin. Topljenec je najprej potrebno raztopiti v DMSO, ki ga nato dodamo vodnemu mediju. Navadno se uporablja v mešanici 1 % v/v. DMSO se zmeša z vodo, zdravilna učinkovina pa v njej raztopi. Ker je zdravilna učinkovina v vodnih raztopinah slabo topna, se presežek učinkovine obori. Po končani inkubaciji je vzorec potrebno centrifugirati ali filtrirati. Prednost te metode je možnost popolne avtomatizacije, kar olajša delo, ima pa tudi precej slabosti. Topnost je lahko lažno povečana zaradi uporabe DMSO. Ker se ta meša z vodo, spremeni njene lastnosti, zato se lahko poveča topnost učinkovine. Slabost je tudi zgornja omejitev topnosti na okrog 150 μM , ker se v tako majhnem volumnu DMSO težko raztopi večja količina zdravilne učinkovine, večje količine DMSO pa niso priporočljive zaradi vpliva na topnost. Ker s to metodo lahko določamo samo kinetično topnost, moramo upoštevati možnost lažno povišanih rezultatov zaradi nastanka metastabilnega stanja (1).

In silico metode so časovno najbolj optimalne metode, vendar se rezultati pogosto precej razlikujejo od eksperimentalnih. Interpretacija računalniško simuliranih modelov potrebuje precejšnjo mero razumevanja in previdnosti, saj je težko predvideti vse spremenljivke, ki vplivajo na topnost. Tudi ti modeli ne upoštevajo možnosti različnega polimorfizma in nastanka samoagregacije. Izračuni temeljijo na različnih modelih. Najpomembnejši so:

- strukturni modeli, ki temeljijo na obliki in površini molekule,
- modeli, ki temeljijo na logP,
- modeli, ki temeljijo na solvatacijskih lastnostih,
- in hibridni modeli, ki upoštevajo različne podatke in znane lastnosti molekul (17).

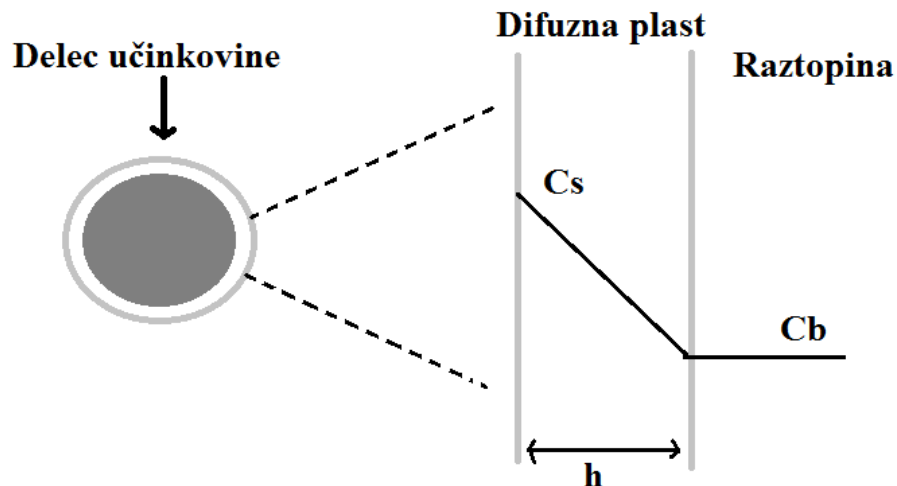
Metoda FDM (ang. facilitated dissolution method) je uporabna predvsem pri slabo topnih neionizirajočih učinkovinah. Kot rešitev za počasno hitrost raztapljanja nekaterih učinkovin ponuja dodatek nepolarnega topila, ki se z vodo ne meša. Tako dosežemo, da se učinkovina hitro raztopi v nepolarni fazi, iz katere nato lažje prehaja v vodno fazo. Na ta način se med topljencem in topilom hitreje doseže ravnotežno stanje. Vpliva na topnost pa ni, dokler je topljenec prisoten v treh stanjih, med katerimi je v ravnovesju – trden, raztopljen v nepolarni fazi in raztopljen v vodni fazi (Enačba 2). Samo v tem primeru lahko zanesljivo dosežemo nasičeno topnost v vodni raztopini. Največja pomanjkljivost FDM metode je, da je neuporabna za soli in ostale ionizirajoče učinkovine (1).



Enačba 2

1.6 Hitrost raztapljanja

Raztapljanje je dinamičen proces, pri katerem poteka prenos molekule topljenca iz trdne snovi v raztopino. Je proces, ki poteka preko difuzijske plasti. Ko govorimo o raztapljanju, imamo največkrat v mislih hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine. Definirana je kot količina topljenca, ki v določenem času preide v raztopino. Hitrost raztapljanja je neločljivo povezana z njeno topnostjo. Odvisna je od koncentracije učinkovine v nasičeni raztopini, trenutne koncentracije učinkovine v mediju in debeline difuzijske plasti. Difuzijska plast je nemešajoča tekočinska plast, ki obdaja topljenec. Na notranji strani difuzijske plasti je koncentracija topljenca enaka nasičeni topnosti, nato pa ta pada proti robu plasti do vrednosti trenutne koncentracije v raztopini (18). Na Sliki 3 je prikazan model raztapljanja delca z difuzijsko plastjo.



Slika 3: Prikaz raztapljanja delca učinkovine z modelom difuzne plasti.

Hitrost raztapljanja izračunamo po Noyes-Whitneyevi enačbi (Enačba 3), kjer je M količina topljenca, t čas, D difuzijski koeficient učinkovine, S površina v stiku s topilom, h debelina difuzne plasti, C_s nasičena koncentracija učinkovine in C_b koncentracija učinkovine v mediju.

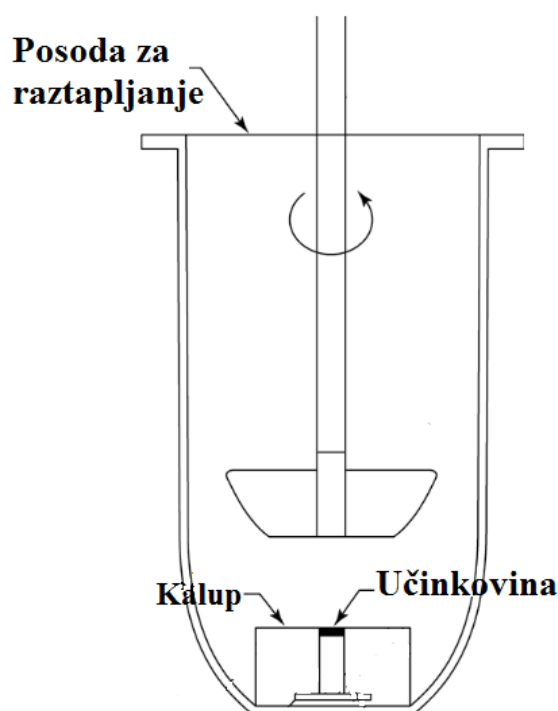
$$\frac{\Delta M}{\Delta t} = \frac{DS(C_s - C_b)}{h}$$

Enačba 3

Poleg prej naštetih dejavnikov, povezanih s topnostjo in difuzijsko plastjo, na hitrost raztapljanja vplivajo še kristaliničnost, polimorfizem, hidratacija, solvacija, velikost delcev in njihova površina, ki je v stiku z vodnimi molekulami. Poznavanje hitrosti raztapljanja zdravilne učinkovine je pomembno predvsem v zgodnjih fazah razvoja formulacije. Od rezultatov je odvisna odločitev, v katero farmacevtsko obliko bo zdravilna učinkovina vgrajena.

Intrinzična hitrost raztapljanja (ang. intrinsic dissolution rate – IDR) je definirana kot hitrost raztapljanja čiste substance s konstantno površino pri konstantnih pogojih (temperatura, hitrost mešanja, sestava medija). Poznavanje IDR zdravilne učinkovine je zelo pomembno v začetnih fazah razvoja formulacije. Pomemben faktor so tudi pogoji, v

katerih se izvaja. Uporabljata se dve različni metodi, ki sta si v osnovi podobni. V obeh primerih v kalup natehtamo točno natehto zdravilne učinkovine, ki jo stisnemo, da nastane gladka površina. Pri metodi po USP je kalup z vzorcem pritrjen na vreteno, pri alternativni metodi z modifikacijo aparata za raztapljanje z vesli pa je kalup z vzorcem postavljen na dnu posode, kot je prikazano na Sliki 4. Pri prvi metodi se skozi medij premika površina učinkovine, pri drugi pa se premika medij nad mirujočo površino učinkovine. Zaradi tega lahko pride do nekaterih razlik v raztapljanju, vendar so rezultati obeh metod dobro primerljivi. Pri stiskanju učinkovine lahko pride do spremembe strukture delcev, kar tudi lahko vpliva na hitrost raztapljanja (19–20).



Slika 4: Slika aparata za merjenje IDR v izvedbi s stacionarnim diskom (20).

1.7 Pufri

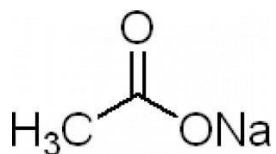
Sestava medijev za uporabo pri testih raztapljanja s farmakopejami ni točno predpisana, določena je samo pH vrednost, pri kateri naj se test izvaja. Da bi z *in vitro* testiranjem čim boljše ponazorili obnašanje farmacevtske oblike v *in vivo*, Evropska agencija za zdravila (EMA) priporoča uporabo medijev s pH 1,20; 4,50 in 6,80. Vodo lahko uporabimo le v primeru, da topnost in hitrost raztapljanja nista pogojeni s spremembo pH. Za pufer s pH 1,20 se običajno uporablja 0,1 M HCl ali umetni želodčni sok (ang. simulated gastric fluid – SGF), pri pH 4,50 EMA kot prvo izbiro priporoča farmakopejske pufre, pri 6,80 pa fosfatni pufer, umetni črevesni sok (ang. simulated intestinal fluid – SIF) ali kak drug medij z istim pH (21).

Pri izbiri pufera je najpomembnejši faktor njegova pH vrednost. Ostali dejavniki, ki še pomembno vplivajo na rezultate, so ionska moč, pufrska kapaciteta in prisotnost ionov, ki lahko spremenijo topnost. Znano je, da prisotnost natrijevih ionov v višjih koncentracijah zmanjša topnost različnih zdravilnih učinkovin v obliki natrijevih soli (3, 11).

Puferska kapaciteta je največja dodana količina baze oziroma kisline, ki jo lahko dodamo pufru, ne da bi ta značilno spremenil pH vrednost. Velja pravilo, da ima pufer največjo kapaciteto v bližini pKa vrednosti. Tam sta ionizirana in neionizirana oblika v razmerju 1:1. Pufersko kapaciteto (β) izračunamo po Enačbi 4 (22):

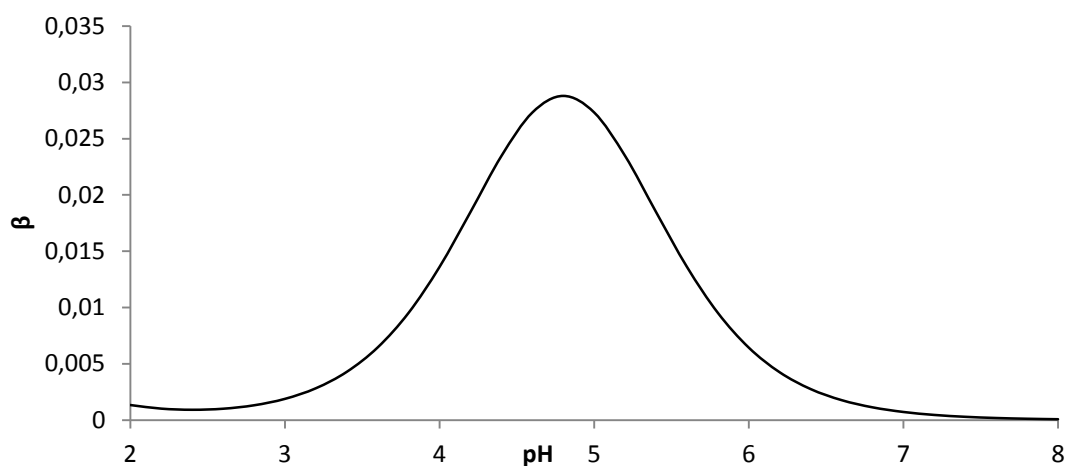
$$\beta = \frac{\Delta n}{\Delta(p[H^+])} = 2,303 \left(\frac{K_w}{[H^+]} + [H^+] + \sum \frac{c K_a [H^+]}{(K_a + [H^+])^2} \right) \quad \text{Enačba 4}$$

1.7.1 Acetatni pufer



Slika 5: Strukturna formula natrijevega acetata.

Acetatni pufri so največkrat raztopine natrijevega acetata. Vrednost pKa kisline je 4,74. Raztopine soli se uporabljajo kot pufri med pH 3,5 in 6,0. Evropska farmakopeja (v poglavju 4.1.3. o puferskih raztopninah) navaja natrijeve in amonijeve soli (10). 50 mM acetatni pufer se v farmacevtski industriji pogosto uporablja pri testih raztapljanja kot medij s pH 4,50.



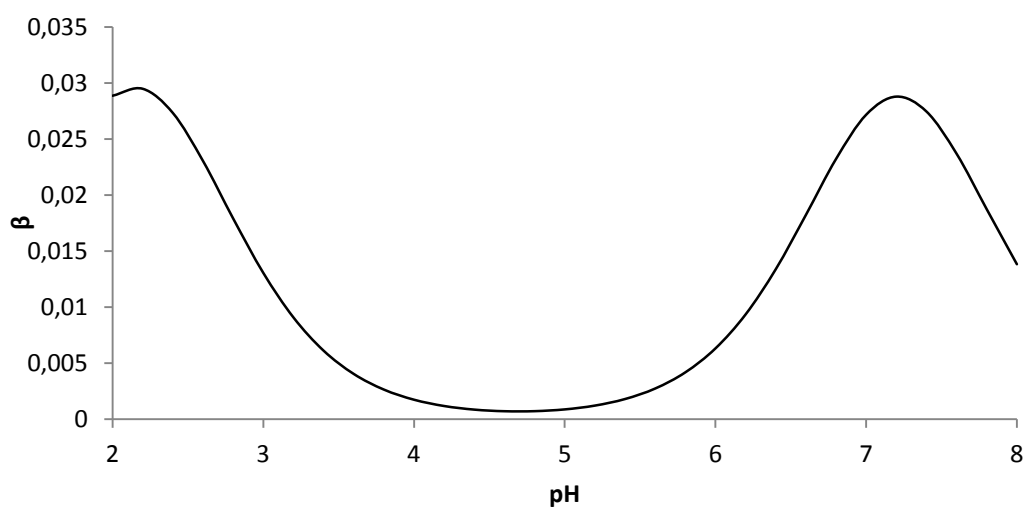
Slika 6: Puferska kapaciteta 50 mM acetatnega pufra.

1.7.2 Fosfatni pufri

Fosfatni pufri so eni najpogosteje uporabljenih medijev pri izvajanju testov topnosti in raztapljanja. Evropska farmakopeja v poglavju o pufrih navaja različne pufre v celotnem pH območju med 2 in 8 (10). Za pripravo medijev se uporabljajo ortofosforna kislina in natrijev dihidrogenfosfat ter dinatrijevhidrogen fosfat. Namesto natrijevih lahko uporabimo

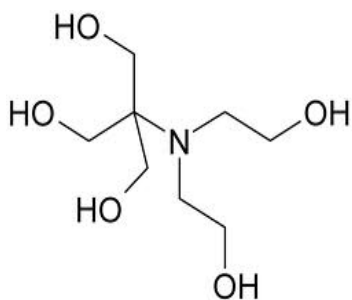
tudi kalijeve soli. Najpogosteje se 50 mM fosfatni pufer uporablja kot medij pri pH 4,5 in 6,8.

Fosfati so v vodnih raztopinah praviloma zelo dobro topni. Fosforna kislina v vodi disocira na dihidrogenfosfatni (Enačba 5), hidrogenfosfatni (Enačba 6) in fosfatni ion (Enačba 7). Njihovo razmerje je odvisno od pH (23).



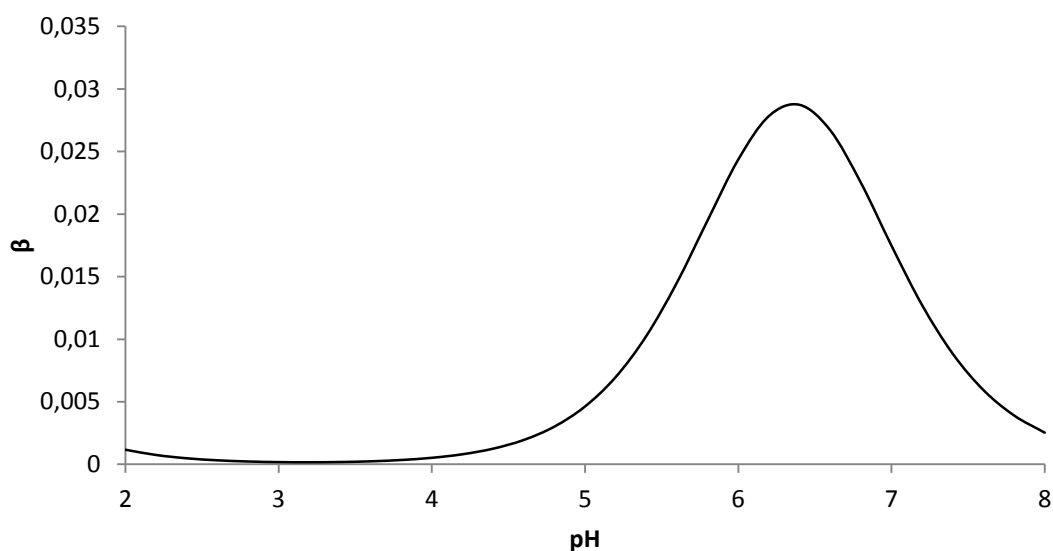
Slika 7: Pufrska kapaciteta 50 mM fosfatnega pufra.

1.7.3 Bis-tris metan pufer



Slika 8: Strukturna formula bis-tris metana.

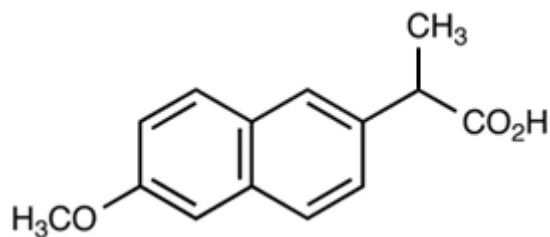
Bis-tris metan je krajše ime za spojino 2-[bis(2-hidroksietil)amino]-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol. Molska masa spojine je 209,24 g/mol, vrednost pKa točke pri 37° C pa je 6,36. Uporabno območje njegovih pufrov je v območju pH 5,8–7,2 (24). Zaradi nizke toksičnosti za žive organizme se pogosto uporablja v biokemiji predvsem kot pufer v elektroforeznih gelih ter v gelih za gojenje celičnih kultur (25). Pri uporabi zapisa krajše oblike bis-tris moramo biti pazljivi, saj se enaka okrajšava uporablja tudi za podobno spojino bis-tris propan.



Slika 9: Pufrska kapaciteta 50 mM bis-tris metana.

1.8 Naproksen in natrijev naproksenat

1.8.1 Fizikalno-kemijske lastnosti naproksena



Slika 10: Strukturna formula naproksena.

Naproksen, običajno bel kristaliničen prašek, je derivat 2-arilpropionske kisline z molsko maso 230,26 g/mol. Je slabo topna šibka organska kislina s pKa pri 4,2 (26). Pri nižjih pH vrednostih je naproksen slabo topen, dobro pa je topen pri višjih pH vrednostih. V Preglednici III so prikazane topnosti naproksena pri različnih pH vrednostih pri temperaturi 37° C.

Preglednica III: Topnost naproksena pri različnih pH pri temperaturi 37° C (27).

| pH | topnost mg/l |
|------|--------------|
| 2,04 | 26 |
| 3,08 | 40 |
| 3,90 | 58 |
| 4,62 | 134 |
| 5,52 | 531 |
| 6,00 | 1609 |
| 6,55 | 5044 |
| 6,85 | 7891 |

1.8.2 Biofarmacevtske lastnosti naproksena

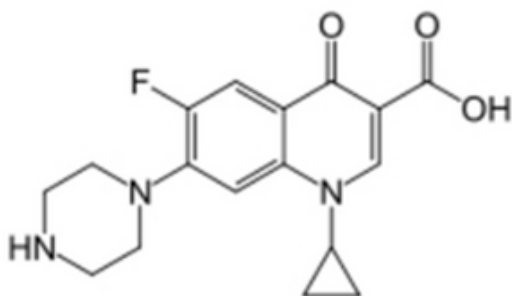
Naproksen uvrščamo v skupino nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID). Ima protivnetno, protibolečinsko in protivročinsko delovanje. Glavni mehanizem delovanja je

zaviranje encima ciklooksigenaza. S tem preprečuje nastajanje prostaglandinov, ki sodelujejo v vnetnih procesih. Dokazano je, da ima manj neželenih učinkov na prebavila od nekaterih drugih zdravil iz skupine NSAID (acetilsalicilne kisline), vendar nekoliko večje kot po učinku primerljivi učinkovini sulindak in etodolak. Na slovenskem tržišču je na voljo v tabletah v obliki kisline po 375 in 500 mg ter v obliki natrijeve soli z odmerkom 275 in 550 mg. Izdaja se na recept, le 275 mg tablete natrijevega naproksenata so na voljo brez recepta (28).

Naproksen se iz črevesja dobro absorbira. Natrijeva sol se v kislem pH v želodcu raztopi, nato pa se obori kot naproksen. Posledično se izoborijo majhni delci učinkovine, ki se v črevesju hitreje absorbirajo, zato je učinek soli nekoliko hitrejši. Hrana zmanjša hitrost absorpcije, ne zmanjša pa njenega obsega. V plazmi se v 99 % prenaša vezan na beljakovine. Njegova presnova poteka v jetrih, izloča pa se v obliki konjugata z glukuronsko kislino (60 %) in presnovka 6-O-demetilnaproksena (30 %) skozi ledvica z urinom (29).

1.9 Ciprofloksacin in ciprofloksacinijev klorid

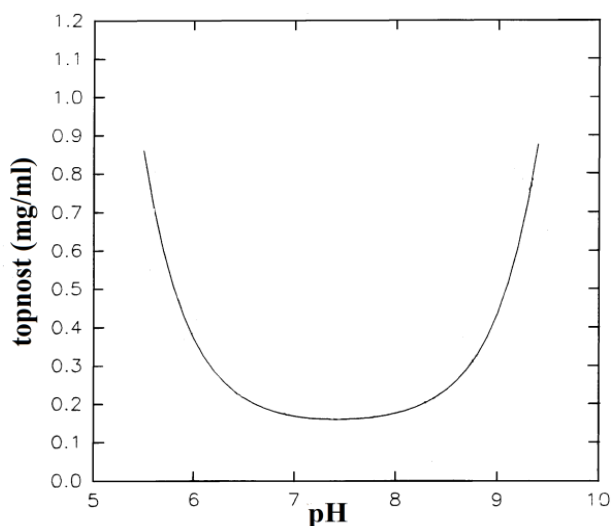
1.9.1 Fizikalno-kemijske lastnosti ciprofloksacina



Slika 11: Strukturna formula ciprofloksacina.

Ciprofloksacin in njegove soli se običajno nahajajo v obliki belega do blede rumenega kristaliničnega praška. Raztopine so rumenkasto obarvane. Molska masa ciprofloksacina je 331,35 g/mol. Najpogostejši njegovi soli sta klorid za peroralno in laktat za intravensko

aplikacijo (30). Je amfolit in ima dve pKa vrednosti. Kisla karboksilna skupina jo ima pri pH 6,15 in bazična dušikova pri pH 8,66. Izoelektrična točka je pri pH 7,42, kjer je tudi najslabše topen. Dobro se topi v kisljih in bazičnih raztopinah, v medijih s pH med 6 in 9 pa je slabo topen (31). Topnostni profil je prikazan na Sliki 12.



Slika 12: Topnost ciprofloksacina v vodnih raztopinah pri 30° C (32).

1.9.2 Biofarmacevtske lastnosti ciprofloksacina

Ciprofloksacin je ena izmed najpogosteje predpisanih zdravilnih učinkovin iz skupine sinteznih fluorokinolonov za zdravljenje bakterijskih okužb. Mehanizem delovanja je inhibicija bakterijskih encimov topoizomeraza II in topoizomerazo IV, s tem pa preprečuje podvajanje, popravljanje in rekombinacijo bakterijske DNK. Baktericidno deluje tako proti gram pozitivnim kot tudi proti gram negativnim bakterijam. Predpisuje se predvsem za zdravljenje okužb prebavnega in respiratornega trakta ter kožnih in urinarnih infekcij (30).

Po peroralni aplikaciji se iz črevesja ciprofloksacin dobro absorbira. Antacidi, ki vsebujejo magnezijeve, aluminijeve ali kalcijeve ione, zmanjšajo njegovo biorazpoložljivost, saj z njim tvorijo komplekse, ki se slabo absorbirajo. V plazmi je prisoten pretežno v nenabiti obliki, tretjina je vezanega na plazemske beljakovine. Ima zelo velik porazdelitveni volumen. Kopiči se predvsem v pljučih, sečilih in rodilih. Izloča se v nespremenjeni obliki, večinoma z urinom in blatom (33).

2. NAMEN DELA

Pri razvoju in izboru testnih serij, ki vstopajo v študije bioekvivalence, imajo pomembno vlogo testi sproščanja učinkovine, ki so tesno povezani s topnostjo zdravilne učinkovine. Regulatorni organi običajno določajo samo pH, pri katerem je teste raztapljanja potrebno izvesti, ne določajo pa tudi natančnejše sestave medija. Prav tako ni natančno definirano, kakšna sprememba vrednosti uporabljenega pufra je še sprejemljiva. Pri dobro topnih zdravilnih učinkovinah natančno poznavanje topnosti ni bistvenega pomena, precej pomembnejše pa je pri slabo topnih oblikah zdravilnih učinkovin. Njihova topnost se običajno izboljšuje s tvorbo soli, te pa lahko pH medija spremenijo in s tem bistveno vplivajo na hitrost raztapljanja.

V diplomski nalogi bomo preverili uporabnost različnih pufrov za določanje topnosti slabo topnih ionizirajočih zdravilnih učinkovin v bližini pKa vrednosti, saj so tam spremembe največje. Kot modelni zdravilni učinkovini bomo uporabili natrijev naproksenat in naproksen ter ciprofloksacin in ciprofloksacinijev klorid. Obe zdravilni učinkovini imata vrednost pKa v bližini pH izbranih pufrov. Za natrijev naproksenat bomo preverili tudi vpliv sestave medijev na hitrost raztapljanja tablete po USP metodi. Poizkuse bomo izvajali v pufrih s pH 4,5 za naproksen in 6,8 za ciprofloksacin. Pri pH 4,5 bomo uporabili acetatni in fosfatni pufer. Oba medija sta po Evropski farmakopeji uradna. Pri pH 6,8 bomo kot anorganski pufer izbrali fosfatnega, kot organskega pa bis-trisnega. Uporabili bomo pufre različnih koncentracij in ionskih jakosti. Preučili bomo povezave med topnostjo in hitrostjo raztapljanja s končnim pH medija, ionsko jakostjo, pufersko kapaciteto in sestavo pufra. Za vrednotenje raztopljene zdravilne učinkovine bomo uporabili UV-spektrofotometer. Preverili bomo tudi identiteto zdravilne učinkovine, ki bo v ravnovesju z raztopino po doseženem ravnovesju.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

- vzorci
 - naproksen (Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija)
 - natrijev naproksenat (Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija)
 - ciprofloksacin (Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija)
 - ciprofloksacinjev klorid (Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija)
- kalijev fosfat dihidrat; KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, ZDA)
- natrijev klorid; NaCl (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid; NaOH , pelete (Merck, Nemčija)
- natrijev acetat trihidrat; $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, ZDA)
- očetna kislina; CH_3COOH (J. T. Baker, ZDA)
- klorovodikova kislina; HCl 37–38 % (J. T. Baker, ZDA)
- bis-tris metan; $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (J. T. Baker, ZDA)
- metanol; CH_3OH (J. T. Baker, ZDA)
- trietilamin; $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ (J. T. Baker, ZDA)

3.2 Aparature in laboratorijska oprema

- stresalnik Unimax 1010 (Heidolph, Nemčija)
- inkubator Heidolph 1000 (Heidolph, Nemčija)
- magnetno mešalo z grelcem MR Hei-Tec (Heidolph, Nemčija)
- termostat EKT Hei-Com (Heidolph, Nemčija)
- precizna tehtnica AT201 (Mettler-Toledo, Švica, ZDA)
- UV-spektrofotometer CARY 50 Bio (Varian, ZDA)
- pH meter Seven Multi (Mettler-Toledo, Švica, ZDA)
- aparatura za raztapljanje z vesli in košaricami Agilent 708-DS (Agilent Technologies, ZDA)
- membranski filtri 0,45 μm (Millipore, ZDA)
- masni spektrometer Varian 8LOMS ICP (Varian, ZDA)

3.3 Metode

3.3.1 Priprava medijev za določanje topnosti naproksena

- 0,1 M HCl

1000 ml bučko smo do polovice napolnili s prečiščeno vodo in dodali 8,3 ml 37–38 % HCl. S prečiščeno vodo smo nato dopolnili do oznake in medij premešali.

- 50 mM acetatni pufer pH 4,5

Raztopino smo pripravili tako, da smo natehtali 2,44 g natrijevega acetata trihidrata in stresli v 1000 ml čašo s paličastim magnetnim mešalom. Z bučko smo odmerili 1000 ml prečiščene vode, jo dolili v čašo in na magnetnem mešalniku raztopili natrijev acetat. S koncentrirano očetno kislino smo umerili do pH 4,5.

- 50 mM acetatni pufer pH 4,9

Najprej smo pripravili 50 mM acetatni pufer s pH 4,5, nato pa smo mu z raztopino NaOH umerili pH na 4,9.

- 50 mM acetatni pufer pH 5,2

Najprej smo pripravili 50 mM acetatni pufer s pH 4,5, nato pa smo pH dvignili na 5,2 z raztopino NaOH.

- 50 mM acetatni pufer pH 5,5

Najprej smo pripravili 50 mM acetatni pufer s pH 4,5, nato pa smo pH dvignili na 5,5 z raztopino NaOH.

- 50 mM acetatni pufer pH 5,8

Najprej smo pripravili 50 mM acetatni pufer s pH 4,5, nato pa smo pH dvignili na 5,8 z raztopino NaOH.

- 25 mM acetatni pufer pH 4,5

Pripravili smo 50 mM acetatni pufer s pH 4,5 in ga nato redčili z vodo v razmerju 1:1. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. Z raztopino HCl oziroma NaOH smo umeri pH na 4,5.

- 10 mM acetatni pufer pH 4,5

Pripravili smo 50 mM acetatni pufer s pH 4,5 in ga nato redčili z vodo v razmerju 1:5. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. Z raztopino HCl oziroma NaOH smo umerili pH na 4,5.

- 6,66 mM acetatni pufer pH 4,5

Pripravili smo 50 mM acetatni pufer s pH 4,5 in ga nato redčili z vodo najprej v razmerju 1:7,5. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. Z raztopino HCl oziroma NaOH smo umerili pH na 4,5.

- 50 mM acetatni pufer pH 4,5 + 200 mM NaCl

Raztopino smo pripravili tako, da smo natehtali 2,44 g natrijevega acetata in 11,69 g natrijevega klorida ter dodali 1 l prečiščene vode. S koncentrirano očetno kislino smo umerili na pH 4,5.

- 50 mM acetatni pufer pH 4,9 + 200 mM NaCl

Najprej smo po postopku pripravili 50 mM acetatni pufer + 200 mM NaCl s pH 4,5, nato pa smo z raztopino NaOH dvignili pH na 4,9.

- 50 mM acetatni pufer pH 5,2 + 200 mM NaCl

Najprej smo po postopku pripravili 50 mM acetatni pufer + 200 mM NaCl s pH 4,5, nato pa smo z raztopino NaOH dvignili pH na 5,2.

- 50 mM acetatni pufer pH 5,5 + 200 mM NaCl

Najprej smo po postopku pripravili 50 mM acetatni pufer + 200 mM NaCl s pH 4,5, nato pa smo z raztopino NaOH dvignili pH na 5,5.

- 50 mM acetatni pufer pH 5,8 + 200 mM NaCl

Najprej smo po postopku pripravili 50 mM acetatni pufer + 200 mM NaCl s pH 4,5, nato pa smo z raztopino NaOH dvignili pH na 5,8.

- 50 mM fosfatni pufer pH 4,5

V 1000 ml čašo smo natehtali 6,80 g KH_2PO_4 in z bučko dodali 1000 ml vode. Po potrebi smo umerili do pH 4,5.

- 100 mM fosfatni pufer pH 4,5

V 1000 ml čašo smo natehtali 13,60 g KH_2PO_4 in z bučko dodali 1000 ml vode. Po potrebi smo umerili do pH 4,5.

- 200 mM fosfatni pufer pH 4,5

V 1000 ml čašo smo natehtali 27,20 g KH_2PO_4 in z bučko dodali 1000 ml vode. Po potrebi smo umerili do pH 4,5.

- 250 mM fosfatni pufer pH 4,5

V 1000 ml čašo smo natehtali 34,0 g KH_2PO_4 in z bučko dodali 1000 ml vode. Po potrebi smo umerili do pH 4,5.

3.3.2 Priprava medijev za določanje topnosti ciprofloksacina

- 50 mM fosfatni pufer pH 6,8

Medij smo pripravili tako, da smo v 1000 ml čašo natehtali 6,80 g kalijevega dihidrogen fosfata in ga raztopili v 1000 ml prečiščene vode. Dodali smo 0,8 g natrijevega hidroksida v obliki pelet in ga raztopili. Do pH 6,8 smo po potrebi umerili s sveže pripravljeno koncentrirano raztopino natrijevega hidroksida.

- 25 mM fosfatni pufer pH 6,8

Najprej smo pripravili 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8, nato pa ga redčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:1. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. pH smo na 6,8 umerili z raztopino HCl.

- 10 mM fosfatni pufer pH 6,8

Najprej smo pripravili 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8, nato pa ga redčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:5. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. pH smo na 6,8 umerili z raztopino HCl.

- 6,66 mM fosfatni pufer pH 6,8

Najprej smo pripravili 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8, nato pa ga redčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:7,5. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. pH smo na 6,8 umerili z raztopino HCl.

- 5 mM fosfatni pufer pH 6,8

Najprej smo pripravili 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8, nato pa ga redčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:10. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. pH smo na 6,8 umerili z raztopino HCl.

- 3,33 mM fosfatni pufer pH 6,8

Najprej smo pripravili 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8, nato pa ga redčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:15. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo. pH smo na 6,8 umerili z raztopino HCl.

- 50 mM bis-tris pH 6,8

Za pripravo bis-tris pufera s pH 6,8 smo v 1000 ml čašo natehtali 10,46 g bis-trisa in raztopili v 1000 ml prečiščene vode, ki smo jo odmerili z bučko. S klorovodikovo kislino smo umerili do pH 6,8.

- 25 mM bis-tris pH 6,8

Medij smo pripravili z redčenjem osnovne 50 mM raztopine bis-trisa s pH 6,8. 50 mM raztopino smo s prečiščeno vodo redčili v razmerju 1:1, nato pa pH umerili z raztopino NaOH na 6,8. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo.

- 10 mM bis-tris pH 6,8

Medij smo pripravili z redčenjem osnovne 50 mM raztopine bis-trisa s pH 6,8. 50 mM raztopino smo s prečiščeno vodo redčili v razmerju 1:5, nato pa pH umerili z raztopino NaOH na 6,8. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo.

- 6,66 mM bis-tris pH 6,8

Medij smo pripravili z redčenjem osnovne 50 mM raztopine bis-trisa s pH 6,8. 50 mM raztopino smo s prečiščeno vodo redčili v razmerju 1:7,5, nato pa pH umerili z raztopino NaOH na 6,8. Za redčenje smo uporabili polnilno pipeto ustrezne velikosti za pufer in polnilno bučko za vodo.

3.3.3 Shake-flask metoda

Kot metodo za določanje topnosti smo izbrali klasično saturacijsko shake-flask metodo. Izvedli smo jo tako, da smo mešali disperzijo zdravilne učinkovine na stresalniku z inkubatorjem. Izbrano maso zdravilne učinkovine smo natančno natehtali v 50 ml erlenmajrice z obrusom. Nato smo s polnilno pipeto dodali 40,0 ml medija in jih zaprte postavili v inkubator. Vzorce smo stresali 999 minut pri 37° C. Na takšen čas stresanja smo nastavili, ker aparatura ni omogočala nastavitve daljšega časa, obenem pa se je v tem času že vzpostavilo ravnovesje med raztopljeno in neraztopljeno zdravilno učinkovino. Točnost temperature smo nadzorovali z analognim alkoholnim termometrom, ki smo ga postavili v stresalnik nad rešetke ventilatorja z odvodnim zrakom. Frekvenco stresanja smo nastavili na 300 obratov na minuto. Po končanem stresanju smo vzorce pustili 7 ur sedimentirati pri ohranjenih konstantnih pogojih. Skupen čas analize je bil 24 ur.

3.3.4 Topnost naproksena in natrijevega naproksenata

Topnost naproksena in njegove natrijeve soli smo določali v različnih pufrih s saturacijsko metodo. Topnost naproksena smo določali v 0,1 M HCl in v 50 mM acetanem pufri z dodatkom in brez dodatka NaCl s pH 4,5; 4,8; 5,2; 5,5 in 5,8. NaCl smo dodali, da smo dosegli večjo ionsko moč pufra. Topnost natrijevega naproksenata smo določali v 50, 25, 10 in 6,66 mM acetatnem pufri s pH 4,5 ter 50, 100, 200 in 250 mM fosfatnem pufri s pH 4,5. Tako za naproksen kot tudi naproksenat smo uporabili 50 mg natehto v 40 ml izbranega pufra.

3.3.5 Topnost ciprofloksacina in ciprofloksacinijevega klorida

Topnost ciprofloksacina in njegove soli smo prav tako določali s saturacijsko metodo. Ciprofloksacinu smo jo določali v fosfatnih in bis-tris pufrih s pH 6,8. Za določanje topnosti ciprofloksacinijevega klorida pa smo uporabili 50, 25, 10, 6,66; 5 in 3,33 mM fosfatni pufer ter 50, 25, 10 in 6,66 mM bis-tris pufer. V erlenmajrice s 40 ml izbranega pufra smo natehtali 20 mg ciprofloksacina oziroma ciprofloksacinijevega klorida.

3.3.6 Merjenje pH vzorcev

Pred vsakim merjenjem smo pH meter kalibrirali s pufri s pH 1,68; 4,00 in 7,00. Poleg začetnega pH pufra smo vedno preverjali tudi morebitno spremembo pH končne raztopine.

Po odvzemu vzorcev za UV-spektrofotometrijo smo erlenmajrice z ostankom 30 ml vzorca najprej ohladili na sobno temperaturo, nato pa jim izmerili pH vrednost.

3.3.7 UV-spektrofotometrija

Za določitev rezultatov topnosti in raztapljanja smo uporabili UV-spektrofotometrično metodo. Za obe učinkovini smo najprej posneli spektre v različnih medijih v območju 230–800 nm in odšteli absorbanco slepega medija.

Spekter standarda naproksena smo posneli v 50 mM fosfatnem pufri s pH 6,8 in 50 mM acetatnem s pH 4,5 ter mešanici acetatnega in fosfatnega pufra v razmerju 1:1. Za standardne vzorce v vseh medijih smo določili dva absorpcijska maksimuma pri istih valovnih dolžinah, višjega pri 272 nm in nižjega pri 330 nm. Umeritveno krivuljo naproksena smo naredili v 50 mM fosfatnem pufri s pH 6,8, v katerem je bil naproksen dobro topen. Iz rezultatov standarda smo izračunali enačbo premice in Pearsonov korelacijski koeficient (R^2). Umeritvene premice za acetatne pufre in različne kombinacije acetatnih in fosfatnih pufrov, s katerimi smo redčili vzorce, nismo izdelali, ampak smo enakost potrdili z ujemanjem raztopin standarda v izbranem pufri znotraj serije poskusov. Kot ustrezno smo upoštevali manj kot 5 % odstopanje od umeritvene premice. V primeru, da bi bilo v katerem izmed pufrov odstopanje večje od 5 %, bi umeritveno premico naredili še za ta medij.

Spekter standarda ciprofloksacina smo posneli v treh medijih; v čisti 0,1 M HCl in v 0,1 M HCl z 2,5 mmol kalijevega fosfata oziroma bis-trisa. Takšno sestavo je imela po redčenju večina analiziranih vzorcev. Maksimum absorbance vzorcev v vseh medijih je bil pri 278 nm. Standard za umeritveno premico smo pripravili v 0,1 M HCl. Iz rezultatov standarda smo izračunali enačbo premice in Pearsonov korelacijski koeficient. Ujemanje s premico za 2,5 mM bis-trisni in fosfatni pufer v 0,1 M HCl smo potrdili z ujemanjem standardnega vzorca z računsko vrednostjo, izračunano iz umeritvene premice. Kot ustrezno smo upoštevali manj kot 5 % odstopanje. V primeru, da bi bilo v katerem izmed pufrov odstopanje večje od 5 %, bi umeritveno premico naredili še za ta medij.

3.3.8 Priprava vzorcev za UV-spektrofotometrijo

Vse vzorce za analizo z UV-spektrofotometrom smo pripravili po enakem postopku. Najprej smo pripravili 10 ml bučke, v katere smo s polnilno pipeto dodali 5,0 ml medija, v

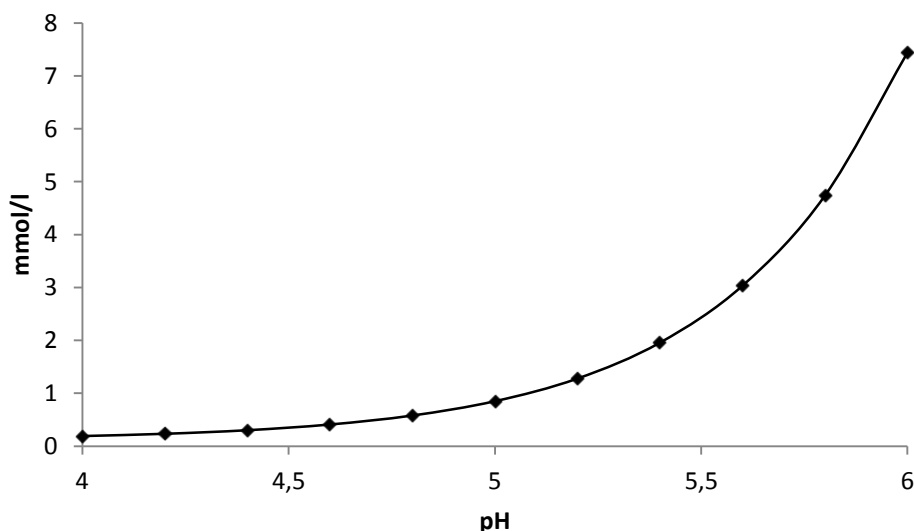
katerem je bila učinkovina dobro topna. Tako smo preprečili, da bi se učinkovina med ohlajanjem na sobno temperaturo oborila. Za naproksen smo uporabili 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8, za ciprofloksacin pa 0,1 M HCl. Ta dva medija smo uporabili tudi za potrebna dodatna redčenja. Z brizgo, ki smo jo v inkubatorju segreti na temperaturo raztopine, smo odvzeli 10 ml vzorca, ki je bil prav tako še vedno ogret na 37° C. Brizgo smo predhodno ogreli, da smo med vzorčenjem preprečili ohladitev raztopine. Prvih 5 ml smo filtrirali in filtrat zavrgli, preostanke pa prefiltrirali in do oznake dopolnili že pripravljeno bučko s pufrom. Tako pripravljene vzorce smo po potrebi še dodatno redčili do koncentracij, ki so absorbirale v linearnem območju.

Pred merjenjem absorbance vzorcev smo vedno posneli slepi vzorec, katerega spekter smo odšteli od spektra vzorca. Odšteli smo tudi povprečje absorbance med 600 in 800 nm.

Za določitev intrinzične topnosti naproksena smo izvedli meritev v 0,1 M HCl s pH 1,2. Uporabili smo jo za računsko napovedovanje topnosti pri drugih pH vrednostih. Ta nam je bila v pomoč pri napovedovanju potrebnih dodatnih redčenj. Izračunali smo jo po Enačbi 8 in dobili graf topnosti (Slika 13). Dodatna redčenja so bila potrebna, da smo iz koncentriranega vzorca dobili primerno koncentracijo v linearnem območju absorbance.

$$S = S_0(K_a/[H^+] + 1)$$

Enačba 8



Slika 13: Izračunana topnost naproksena v pH območju 4–6 iz izmerjene intrinzične topnosti.

3.3.9 Metoda IDR

Z IDR metodo smo želeli analizirati vpliv pufrov različnih sestav na hitrost raztapljanja učinkovine. Analize nismo izvajali po uradni USP metodi z vrtečimi diski, ampak z metodo, pri kateri smo uporabili modifikacijo USP 2 s stacionarnimi diski.

Natehtali smo točno 200 mg natrijevega naproksenata, ga prenesli v kalup in ga 5 minut stiskali s silo 1 tone. Tako pripravljene diske z vzorcem smo nato položili na dno posode aparature in previdno, ob stekleni palčki, dolili 900 ml medija, predhodno ogretega na 37° C. V prvih treh posodah smo uporabili 50 mM acetatni pufer, v drugih treh pa 50 mM fosfatni pufer s pH 4,5. Hitrost vrtenja mešal smo nastavili na 100 obratov na minuto.

3.3.10 Raztapljanje tablet

Določali smo profil raztapljanja 275 mg tablet natrijevega naproksenata v 900 ml medija. Uporabili smo 50 mM acetatni in fosfatni pufer s pH 4,5. Analize smo izvajali po USP metodah v aparatu z vesli in v aparatu s košaricami. V časovnih intervalih smo z brizgo s kanulo vsakič odvzeli 10 ml vzorca, ki smo ga nadomestili z istim medijem. Prvih 5 ml filtrata nismo zavrgli, ampak smo ga uporabili za spremljanje sprememb pH medija. Pred merjenjem smo vzorce ohladili na sobno temperaturo in s tem preprečili napako pH-metra zaradi višje temperature.

Najprej smo izvedli analizo z aparatom z vesli (USP 2). V prvih treh posodah smo uporabili fosfatni, v drugih treh pa acetatni pufer. Z merilnim valjem smo odmerili 900 ml pufra, ga zlili v posodo in segreli na 37° C. Ko smo dosegli konstantno temperaturo, smo pričeli s testom raztapljanja. V prvih 65 minutah smo nastavili hitrost vrtenja vesel na 50 obratov na minuto, med 65 in 75 pa povišali na 200 obratov, da smo zagotovili razpad celotne tablete.

Pri raztapljanju tablete v aparatu s košaricami (USP 1) smo v prvih treh paralelkah ravno tako uporabili 50 mM fosfatni in v drugih treh 50 mM acetatni pufer, tudi predhodno ogreta na 37° C. Hitrost vrtenja mešal smo v prvih 95 minutah nastavili na 100 obratov na minuto, potem pa smo za 5 minut hitrost vrtenja povečali na 250 obratov na minuto, da smo zagotovili popoln razpad tablete.

3.3.11 Spremljanje obarjanja zdravilne učinkovine

V 300 ml erlenmajrico s paličnim mešalom smo nalili 250 ml medija. Obarjanje ciprofloksacina smo obravnavali v 50 mM fosfatnem pufru s pH 6,8, obarjanje naproksena pa v 50 mM fosfatnem in 5 mM acetatnem pufru s pH 4,5. Hitrost vrtenja mešala smo nastavili na 300 obratov na minuto, temperaturo pa na 38° C. Tako smo zagotovili vzdrževanje konstantne temperature okrog 37° C. Ko je medij dosegel konstantno temperaturo, smo dodali točno natehtano maso vzorca. Po 10 ml vzorca smo odvzemali z brizgo in kanulo ter ga filtrirali preko 0,45-mikronskega filtra. Prvih 5 ml filtrata smo zavrgli, s preostalimi 5 ml pa do oznake dopolnili 10 ml bučke, v katerih smo že imeli pripravljenih 5 ml medija, v katerem je bila učinkovina dobro topna. Za naproksen smo uporabili fosfatni pufer s pH 6,8, za ciprofloksacin pa 0,1 M HCl. Vzorce je bilo potrebno še dodatno redčiti. Vzorce s ciprofloksacinom smo redčili z 0,1 M HCl, vzorce z naproksenom pa s fosfatnim pufrom s pH 6,8. Tako smo preprečili obarjanje zdravilne učinkovine, ki bi se zaradi prenasičenih topnosti v vzorcih lahko pojavilo.

3.3.12 Preverjanje oblike oborjene zdravilne učinkovine

Obliko oborjene snovi iz raztopine natrijevega naproksenata smo dokazali z masnim spektrometrom. Ali je trdni preostanek bila začetna oblika natrijev naproksenat ali njegova hidrolizirana oblika naproksen, smo določili iz vsebnosti natrija v nastali v oborini.

Vzorec za analizo smo pripravili tako, da smo 100 mg natrijevega naproksenata raztopili v 100 ml 50 mM acetatnega pufru (natrijev acetat) s pH 4,5 pri sobni temperaturi in nato 10 minut mešali na stresalniku. Zdravilna učinkovina se ni raztopila v celoti, smo pa opazili, da se je v raztopini takoj pričela pojavljati oborina. Trdni ostanek smo nato prefiltrirali preko filtrirnega papirja. Na filter papirju je ostala zdravilna učinkovina, ki smo jo na kratko sprali z destilirano vodo. Oborjeno zdravilno učinkovino smo nato popolnoma posušili. 50 mg tako pripravljenega vzorca smo raztopili v 50 ml prečiščene vode, ki smo jo naalkalili z nekaj kapljicami trietilamina, da se je ves trden vzorec raztopil. Koncentracija zdravilne učinkovine v vzorcu je bila 1000 mg/l (50 mg/50 ml). Tako pripravljeni vzorec smo uporabili za analizo z masnim spektrometrom. Naredili smo 10 meritev in izračunali povprečje rezultatov.

Umeritveno premico smo pripravili iz slepe standardne raztopine, standardne raztopine NaCl s koncentracijo 25,5 mg/l in standardne raztopine NaCl s koncentracijo 50,8 mg/l.

Tako smo dobili raztopine z vsebnostjo natrijevih ionov 0, 10 in 20 mg/l. Tako pripravljene standardne raztopine smo analizirali z masnim spektrometrom Varian 8LOMS ICP. Za vsako koncentracijo smo ponovili 10 meritev in iz njih izračunali povprečje. Iz rezultatov smo izračunali umeritveno premico, ki smo jo uporabili za izračun vsebnosti natrija v vzorcu in Pearsonov korelacijski koeficient (R^2).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Utemeljitev metode

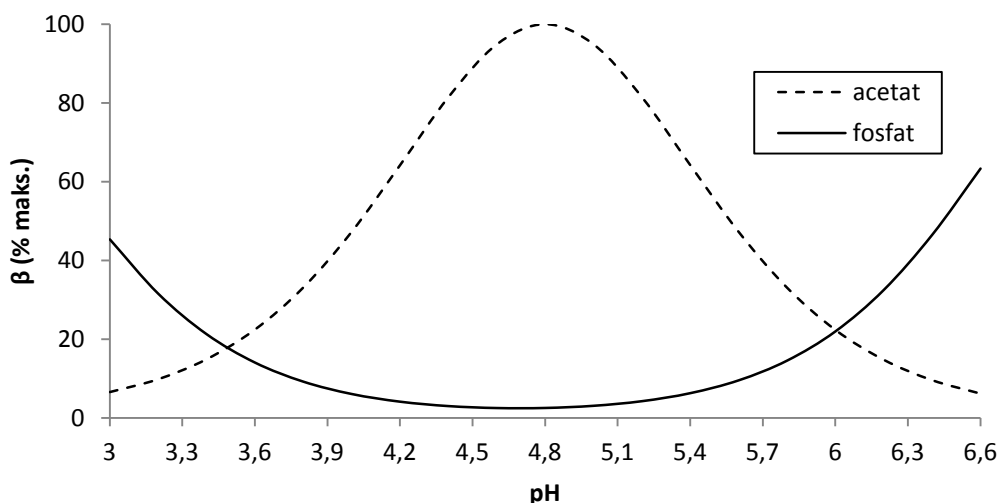
Kot najustreznejšo metodo za določitev topnosti za izbrani zdravilni učinkovini smo izbrali klasično saturacijsko metodo. Ta metoda je bila edina, s katero je bilo mogoče brez zahtevnejših aparaturnih in na zanesljiv način določati termodinamsko topnost, poleg tega pa je priznana kot najbolj zanesljiva, saj se rezultati, pridobljeni s to metodo, uporabljajo kot referenca za druge metode. MSF metoda bi bila tudi ustrezna odločitev, vendar bi bile za izvedbo potrebne posebne aparature. Topnosti nismo določali z metodami za raztapljanje, ker bi v tem primeru potrebovali večje količine zdravilne učinkovine, druga slabost pa bi bila, da bi na eni aparaturi lahko izvajali le omejeno število poizkusov.

Poleg klasične saturacijske metode FDA za razvrščanje v biofarmaceutski klasifikacijski sistem priznava tudi DTT metodo. To je zanimivo, kajti metoda je titracijska in z njo ni mogoče določati termodinamske topnosti, ampak samo kinetično. Metoda je priznana, ker z njo izmenično zaporedno titriramo z majhnimi količinami kisline in baze, ki pH le minimalno spreminjajo. To omogoči prehajanje med prenasičenim in nenasičenim stanjem. Ker so te razlike majhne, nastane stopničasti pH topnostni profil. Aparatura beleži srednjo vrednost, ki je primerljiva z vrednostmi, izmerjenimi s shake-flask metodo. Metoda FDM v našem primeru ni bila uporabna, saj bi bila njena uporaba smiselna edino v primeru, če bi imeli neionizirajoče spojine.

Pred pričetkom izvajanja metode za določanje topnosti smo najprej izbrali primeren volumen pufrin in ustrezno stekleno posodo ter ocenili potrebno maso natrijevega naproksenata in ciprofloksacinijevega klorida za izvajanje poizkusa. Odločili smo se za 40 ml pufrin v 50 ml erlenmajricah. Takšen volumen je zadoščal za odvzem 10 ml vzorca za pripravo za UV-spektrofotometrijo. Preostanek 30 ml je bil dovolj velik, da smo mu po ohladitvi na sobno temperaturo lahko izmerili še pH vrednost. 40 ml je bila tudi že dovolj velika količina medija, da se manjše razlike v natehti med paralelkami niso bistveno odražale na spremembi pH. 50 ml erlenmajrice smo izbrali, ker se je v njih pri frekvenci 300 obratov na minuto izbran volumen suspenzije dobro mešal in oplakoval vse stene, obenem pa ni iztekal iz posodic.

4.2 Izbira primernih pufrov

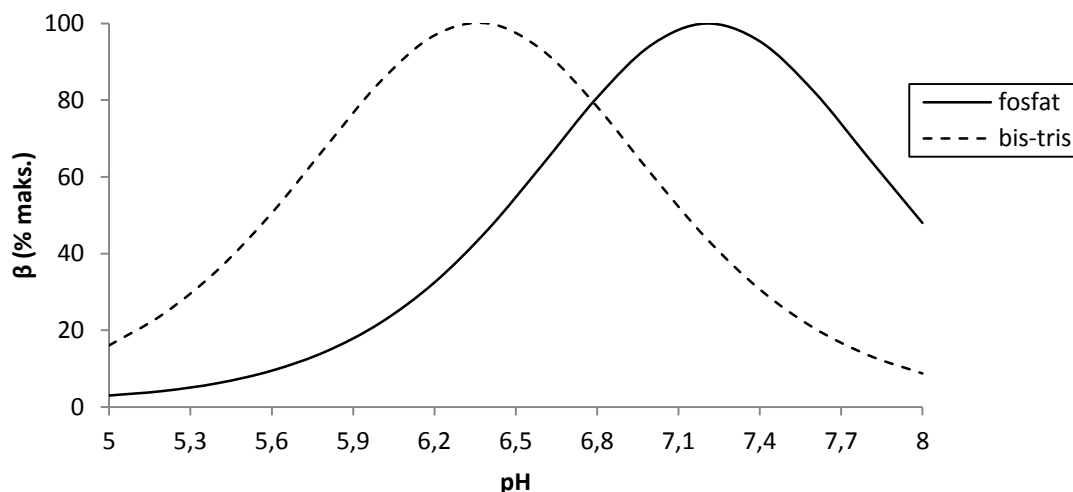
EMA (21) točne sestava medija za teste raztapljanja ne predpisuje, navaja pa uporabo pufrov s pH 1,2; 4,5 in 6,8 in uporabo ene izmed farmakopejskih puferskih raztopin, zato smo pozornost posvetili njim. Vplive sestave pufrov na topnost smo želeli preveriti v bližini pKa točke zdravilne učinkovine, saj so tam relativne spremembe topnosti pri majhnih spremembah pH največje. Naproksen ima pKa vrednost pri 4,2, zato smo teste topnosti izvajali v pufrih s pH 4,5. To pH vrednost imata izmed pufrov, opisanih v Evropski farmakopeji v poglavju o puferskih raztopinah, 50 mM acetatni ter 50 mM fosfatni pufer. Oba navedena medija se pri testih raztapljanja tudi najpogosteje uporabljata. Problematična je predvsem uporaba fosfatnega pufera, saj je razlika med testnim pH 4,5 in pKa točko fosfata zelo velika. Tako je puferska kapaciteta pri tej pH vrednosti le 2,7 % maksimalne. Mnogo večjo kapaciteto pri pH 4,5 ima acetatni pufer, in sicer kar 85 % maksimalne, kar je posledica bližine pKa vrednosti, ki je pri 4,8. Primerjava puferskih kapacitet obeh medijev je prikazana na Sliki 14. Acetatni pufer ima visoko pufersko kapaciteto, zato smo uporabljali 50 mM medij in bolj redčene raztopine, fosfatni pufer pa ima nizko kapaciteto, zato smo se odločili za koncentracije pufera 50 mM ali več.



Slika 14: Primerjava puferske kapacitete acetatnega in fosfatnega pufera.

Ciprofloksacin ima pKa vrednosti pri približno 6,2 in 8,7, zato smo za določanje njegove topnosti izbrali pufre s pH 6,8. Pri pH vrednosti 6,8 se za teste raztapljanja največ uporabljata simulirani črevesni medij in fosfatni pufer, ki je enostavnejše sestave. Bis-tris

metan se uporablja redkeje, je pa njegova uporaba pogosta pri biokemičnih vrednotenjih. Oddaljenost pKa vrednosti od pH 6,8 je pri obeh pufrih približno 0,4 pH enote. Bis-tris metan ima pKa vrednost pri 6,36, fosfatni pufer pa pri 7,21. Pufrska kapaciteta pri pH 6,8 je pri obeh pufrih približno 80 % maksimalne kapacitete, kar je prikazano na Sliki 15.



Slika 15: Primerjava puferskih kapacitet fosfatnega in bis-tris pufera.

4.3 Umeritvena premica za UV-spektrofotometrijo

4.3.1 Umeritvena premica naproksena

Najprej smo posneli spektre standarda naproksena v 50 mM fosfatnem pufru s pH 6,8, v 50 mM acetatnem pufru s pH 4,5 in v mešanici acetatnega in fosfatnega pufera v razmerju 1:1. Vsem spektrom smo določili enak maksimum absorbance, in sicer pri 272 nm.

Umeritveno premico naproksena, ki je prikazana v Enačbi 9, smo pripravili iz raztopin natrijevega naproksenata v fosfatnem pufru s pH 6,8, in sicer v petih različnih koncentracijah. Rezultate meritev smo predstavili v Preglednici IV. Za izdelavo premice v fosfatnem pufru smo se odločili, ker smo z njim redčili vzorce pri določanju topnosti. Če vzorcev po odvzemu ne bi redčili z medijem, v katerem so bili dobro topni, bi po ohladitvi na sobno temperaturo iz raztopine lahko izpadla oborina. Tudi če bi za redčenje uporabili isti medij, kot smo ga za določanje topnosti, bi čez čas prav tako lahko nastala oborina, saj bi se po ohladitvi raztopine na sobno temperaturo zdravilna učinkovina oborila. Oborina bi

se lahko pojavila tudi zato, ker so bili nekateri vzorci tudi večkrat prenasičeni. Tak pojav smo opisali v poglavju o topnosti ciprofloksacina.

Preglednica IV: Absorbance raztopin naproksena različnih koncentracij v 50 mM fosfatnem puftru s pH 6,8 pri valovni dolžini 272 nm.

| koncentracija naproksena (mmol/l) | A (272 nm) |
|-----------------------------------|------------|
| 0,04486 | 0,22418 |
| 0,08976 | 0,44880 |
| 0,1121 | 0,56132 |
| 0,1795 | 0,89153 |
| 0,2244 | 1,1173 |

$$c = 0,2014A - 0,00061$$

Enačba 9

$$R^2 = 1,000$$

Ujemanje premice v fosfatnem puftru smo preverili tudi v drugih medijih, ki so bili podobne sestave, kot so jo imeli analizirani vzorci po redčenju. Enakost smo preverili z eno meritvijo pri koncentraciji 2,58 mg/100 ml v 50 mM acetatnem puftru s pH 4,5 in v mešanici 50 mM acetatnega pufra s pH 4,5 in 50 mM fosfatnega pufra s pH 6,8 v razmerju 1:1 ter 1:9. Rezultati meritev so prikazani v Preglednici V. Za sprejemljivo napako oziroma odstopanje od vrednosti, izračunane z umeritveno premico, smo določili odstopanje, manjše od 5%, zaradi napak same metode. Izmerjene vrednosti so malo odstopale od vrednosti, izračunane po umeritveni premici (največ 2,24 %). Ocenili smo, da izdelava umeritvene premice v teh medijih ni bila potrebna. Do sipanja podatkov je najverjetneje prišlo zaradi merjenja absorbance z UV-spektrofotometrično metodo (napaka meritev pri tej metodi je do 3 %).

Preglednica V: Absorbance naproksena enake koncentracije v različnih medijih pri valovni dolžini 272 nm.

| medij | izmerjena koncentracija (mmol/l) | dejanska koncentracija (mmol/l) | razlika (mmol/l) | odstopanje (%) |
|---|----------------------------------|---------------------------------|------------------|----------------|
| 50 mM acetat pH 4,5 | 0,1102 | 0,1118 | 0,0016 | 1,43 |
| 50 mM acetat pH 4,5 in 50 mM fosfat pH 6,8 (mešanica 1:1) | 0,1102 | 0,1118 | 0,0016 | 1,43 |
| 50 mM acetat pH 4,5 in 50 mM fosfat pH 6,8 (mešanica 1:9) | 0,1093 | 0,1118 | 0,0025 | 2,24 |

4.3.2 Umeritvena premica ciprofloksacina

Umeritveno premico za ciprofloksacin smo pripravili v petih različnih koncentracijah, kjer je absorbcija dajala linearen odziv. Standardne vzorce za umeritveno premico smo pripravili v enem mediju, in sicer v 0,1 M HCl s pH 1,2. Enačba premice je zapisana v Enačbi 10. Izračunali smo tudi Pearsonov korelacijski koeficient. Pri pH 1,2 je bil ciprofloksacin dovolj dobro topen, da smo lahko iz iste osnovne standardne raztopine z redčenjem pripravili različne koncentracije standardov. Rezultati umeritvene premice so predstavljeni v Preglednici VI.

Preglednica VI: Absorbance raztopin ciprofloksacina različnih koncentracij v 0,1 M HCl pri valovni dolžini 278 nm.

| koncentracija ciprofloksacina (mmol/l) | A (278 nm) |
|--|------------|
| 0,006035 | 0,24569 |
| 0,01207 | 0,50080 |
| 0,01509 | 0,61899 |
| 0,02414 | 0,97844 |
| 0,03017 | 1,2213 |

$$c = 0,02486A - 0,00023$$

Enačba 10

$$R^2 = 0,9998$$

Ujemanje rezultatov z umeritveno premico smo preverili tudi v pufrih drugačne sestave. Uporabili smo 2,5 mM fosfatni pufer in 2,5 mM bis-tris, pripravljena v 0,1 M HCl. Takšno sestavo so imeli po redčenju tudi vzorci, ki jih je bil potrebno 20-krat redčiti z 0,1 M HCl. Tako smo dosegli, da smo dobili vzorce v koncentraciji, ki absorbira v linearnem območju premice. Koncentracija obeh vzorcev je bila 0,50 mg/100 ml. Rezultati meritev so prikazani v Preglednici VII. Tudi v tem primeru je bilo odstopanje od umeritvene premice manjše od 5 % (največ 0,4 %). Ocenili smo, da dodatna izdelava umeritvene premice v teh dveh medijih ni bila potrebna.

Preglednica VII: Absorbance ciprofloksacina enake koncentracije v različnih medijih pri valovni dolžini 278 nm.

| medij | izmerjena koncentracija (mmol/l) | dejanska koncentracija (mmol/l) | razlika (mmol/l) | odstopanje (%) |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------|----------------|
| 2,5 mM fosfat v 0,1M HCl | 0,01515 | 0,01509 | 0,00006 | 0,40 |
| 2,5 mM bis-tris v 0,1 M HCl | 0,01505 | 0,01509 | 0,00004 | 0,27 |

4.4 Topnost naproksena in naproksenata v pufrih različne sestave

Najprej smo določili intrinzično topnost naproksena. Izmerili smo jo v petih paralelnih poizkusih v 0,1 M HCl. Povprečen končni pH medija je ostal nespremenjen. Rezultati posameznih meritev so prikazani v Preglednici VIII. Povprečje meritev smo izračunali 2,67 mg/100 ml oziroma 0,116 mmol/l, RSD pa 1,11 %. Iz izmerjene intrinzične topnosti smo nato izračunali predviden pH-topnostni profil, ki nam je bil v pomoč pri izbiri ustrezne natehte in pri izračunu potrebnega redčenja pred merjenjem absorbance. Z nizkim RSD smo dobili potrditev, da smo metodo natančno izvedli, točnost pa smo preverili z ujemanjem z literaturnimi podatki, kjer so bile navedene podobne vrednosti (Preglednica III). Ti so navajali topnost v kislem mediju 2,6 mg/100 ml, mi pa smo izmerili 2,67 mg/100 ml.

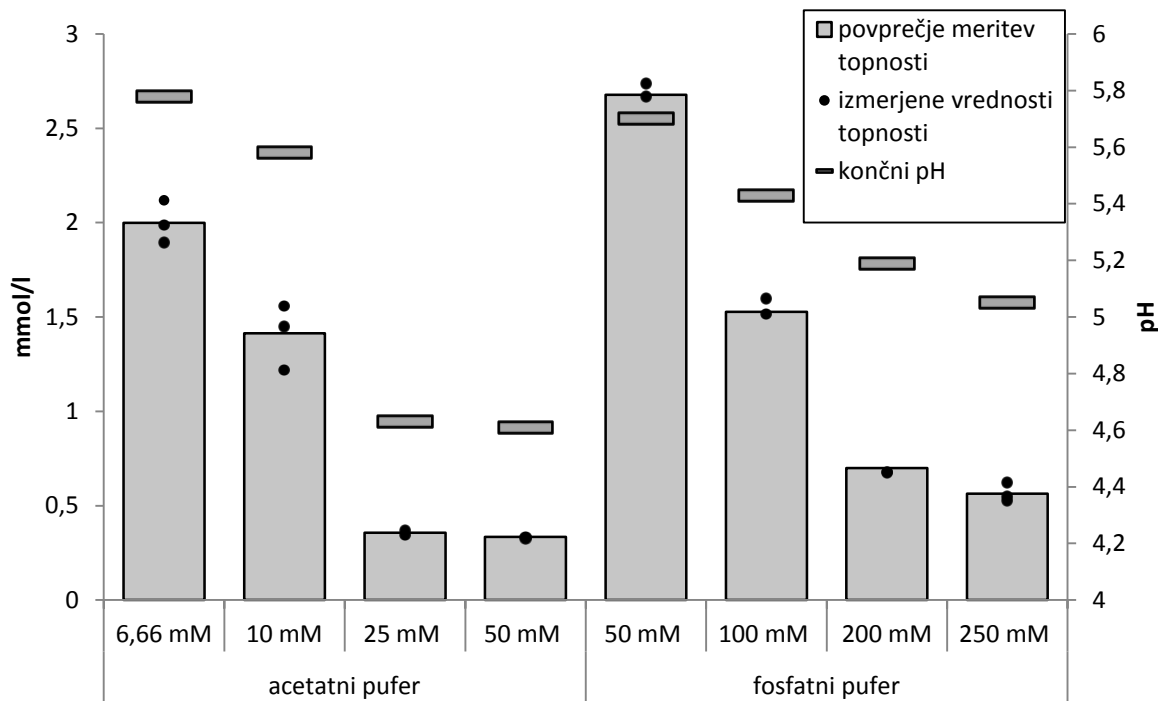
Preglednica VIII: Izmerjene intrinzične topnosti naproksena.

| vzorec | konc. mg/100 ml | konc. mmol/l | končni pH |
|--------|-----------------|--------------|-----------|
| 1 | 2,68 | 0,116 | 1,22 |
| 2 | 2,63 | 0,114 | 1,20 |
| 3 | 2,64 | 0,115 | 1,19 |
| 4 | 2,70 | 0,117 | 1,20 |
| 5 | 2,72 | 0,118 | 1,20 |

Z eksperimentalnim poizkušanjem smo kot najustreznejšo natehto izbrali 50 mg natrijevega naproksenata (0,2 mmol) v 40 ml medija. Pri pH 4,5 je natehta glede na literaturne podatke (~ 5,2 mg/40 ml) in izračunane vrednosti kar 10-krat presežala nasičeno topnost. Takšna natehta je bila potrebna, ker smo v medijih z nižjo pufrsko kapaciteto predvidevali, da se bo pH zaradi bazičnosti soli povišal, z višjimi vrednostmi pa se je povečevala tudi topnost naproksena. To bi lahko povzročilo, da bi bila topnost v mediju večja od natehte naproksenata, in tako ne bi bilo presežka trdne neraztopljene faze, s tem pa tudi ne bi zagotovili osnovnega pogoja za dosego topnosti – ravnovesnega stanja med raztopljenim in neraztopljenim topljencem. S 50 mg/40 ml pufru smo omogočili ravnovesje med neraztopljeno soljo in soljo v raztopinah do pH ~ 5,8. Pri pH blizu 6 je bila topnost že enaka natehtani količini. Večje natehte nismo mogli uporabiti, ker je pri poizkušanju pri večjih natehtah v medijih s končnim pH blizu 4,5 ostalo preveč neraztopljene učinkovine. To je povzročalo težave pri vzorčenju. Največkrat se je zgodilo, da so delci zamašili filter. Enaka natehta v vseh medijih je bila potrebna za zagotovitev konstantnih pogojev in možnosti spremljanja spremembe pH po enakih dodatkih zdravilne učinkovine v različno molarnih pufrih.

Topnost natrijevega naproksenata smo določali v acetatnih in fosfatnih pufrih različne molarosti s pH 4,5. Za vsak vzorec smo izvedli tri ali štiri paralelne poizkuse z natehto 50 mg/40 ml. Rezultati meritev s podanim povprečjem so predstavljeni na Sliki 16. Iz nje je razvidno, da so se izmerjene topnosti natrijevega naproksenata med pufrji precej razlikovale. V manj koncentriranih medijih smo izmerili tudi do več kot 4-krat večje koncentracije od tistih v pufrjih z večjo koncentracijo. Najnižje topnosti smo izmerili v 25 in 50 mM acetatnem pufru ter 200 in 250 mM fosfatnem pufru. Največjo topnost smo

izmerili v 50 mM fosfatnem pufru, med seboj podobni pa sta bili v 10 mM acetatu in 100 mM fosfatnem pufru.

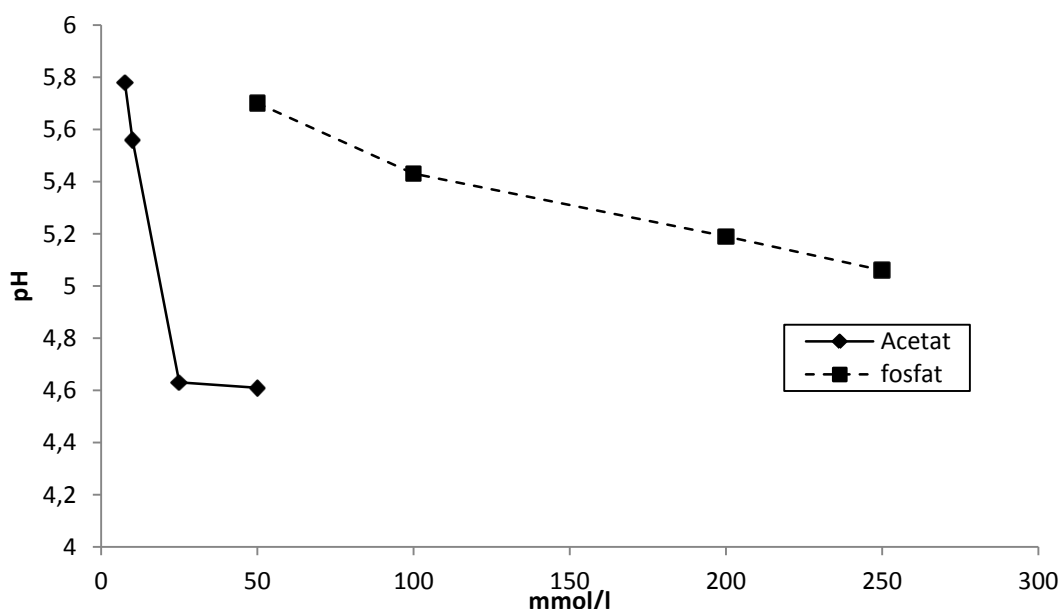


Slika 16: Topnost natrijevega naproksenata in končne pH vrednosti raztopin v različnih pufrih z začetnim pH 4,5.

Preverili smo tudi končni pH nasičenih raztopin. Rezultati meritev so z debelejšimi črticami prikazani na Sliki 16. Zabeležili smo precejšnje razlike v končnih pH vrednostih pufov. To je bil tudi glavni razlog, da so se pojavile velike razlike v topnosti, ki smo jih prikazali na isti sliki. V vzorcih, v katerih smo zabeležili večjo topnost, je bila tudi sprememba pH večja. Do obrata je prišlo samo pri primerjavi 10 mM acetatnega in 100 mM fosfatnega pufra. V 100 mM fosfatnem pufru smo izmerili malce večjo topnost kot v 10 mM acetatnem pufru, zato smo pričakovali, da bo tudi sprememba pH večja, vendar ni bilo tako. Končni pH v 10 mM acetatnem pufru je bil višji kot pri fosfatu. Iz tega smo sklepali, da na topnost ne vpliva samo pH vrednost, ampak tudi drugi dejavniki, najverjetneje razlika v koncentraciji pufov.

Na Sliki 17 so prikazane povprečne vrednosti treh meritev končnega pH raztopine v odvisnosti od koncentracije acetatnega in fosfatnega pufru s pH 4,5. Posamezne meritve so zelo malo odstopale od povprečne vrednosti, zato njihove vrednosti nismo prikazali.

Krivulja spremembe pH (Slika 17) je dobila med 25 in 10 mM acetatnim pufrom zelo strm naklon. Razlog za to je bila presežena pufrska kapaciteta zaradi nižje koncentracije medija, zato je sprememba pH bila večja kot v bolj koncentriranem pufru. Poleg tega smo se z višanjem pH nad 4,8 oddaljevali od območja pufru z največjo kapaciteto (Slika 14), zato je kapaciteta še dodatno padla, kar je povzročilo vedno večje spremembe pH vrednosti. Obraten pojav smo opazili pri fosfatnem pufru. Pri spremljanju krivulje spremembe pH od višje proti nižji koncentraciji fosfatnega pufru nismo opazili takšne spremembe naklona kot pri acetatnem pufru. Z nižanjem koncentracije fosfatnega pufru smo zmanjševali njegovo kapaciteto, logična posledica je bila večja sprememba pH kot v pufru, ki je bil bolj koncentriran. Ampak še večjo spremembo je zaviral ravno njegov dvig. Z višanjem pH nad 4,5 smo se namreč približevali pKa fosfatnega pufru, zato se je njegova kapaciteta povečevala (Slika 14), kar je zaviralo spremembo pH. Povišanje pH vrednosti v fosfatnem pufru je torej vodilo v večjo pufrsko kapaciteto, izrazitejše povišanje pH vrednosti v acetatnem pufru pa je vodilo v območje z nižjo pufrsko kapaciteto, kar je bil razlog za različni obliki krivulj končnih vrednosti pH.

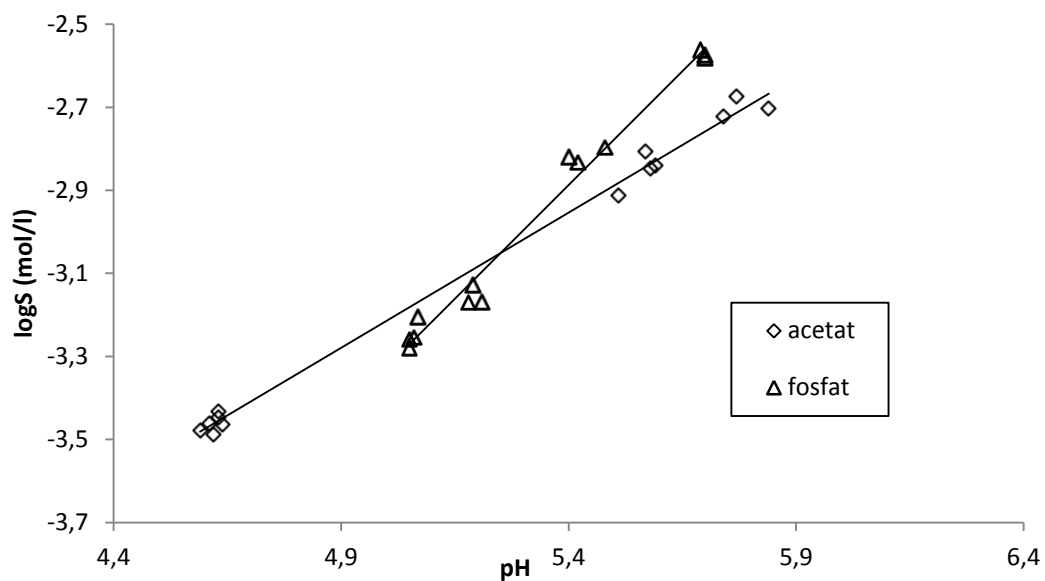


Slika 17: Odvisnost vrednosti končnega pH od vrste in koncentracije pufru.

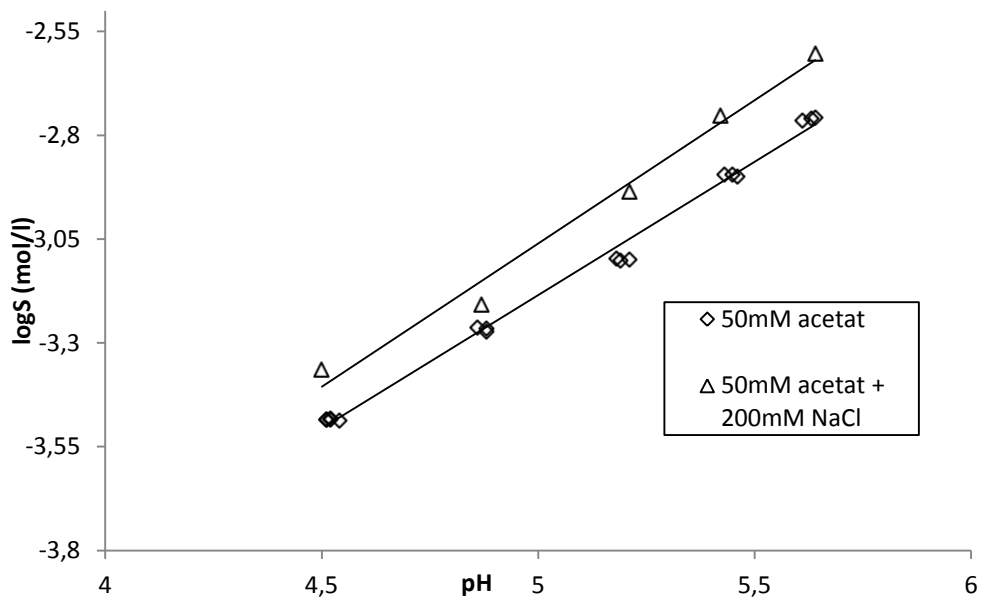
Med seboj smo preverjali izmerjene vrednosti topnosti v odvisnosti od končne pH vrednosti raztopine v 50, 100, 200 in 250 mM fosfatnih pufrih in 6,66; 10, 25 in 50 mM acetatnih pufrih. Višje vrednosti topnosti so bile v pufrih manjše koncentracije zaradi večje spremembe pH vrednosti. Dobljene vrednosti smo vstavili v grafikon in dodali trendno črto za rezultate v obeh pufrih. Izmerjena topnost natrijevega naproksenata se je v fosfatnih in acetatnih pufrih logaritemsko linearno spreminjala s spremembo pH. R^2 trendne črte, prikazane na Sliki 18, za topnost v fosfatnem pufru je bil 0,984, v acetatnem pufru pa 0,996. Trendni črti pH topnostnega profila v acetatnih in fosfatnih pufrih z različnimi koncentracijami nista imeli enakega naklona, kar je prikazano na Sliki 18. Zanimivo je, da smo pri primerljivem končnem pH izmerili večjo topnost v 50 in 100 mM fosfatnem pufru kot v 10 in 6,66 mM acetatnem pufru, medtem ko smo dobili topnost v 200 in 250 mM fosfatnem pufru pod trendno črto acetatnega pufru. Razlog za to je bil najverjetneje v različnih ionskih močeh in pri višjih koncentracijah v izrazitejšem vplivu kalijevega iona na topnost soli.

Za preučevanje vpliva ionske moči na topnost smo primerjali topnost natrijevega naproksenata v 50 mM acetatnem pufru in 50 mM acetatnem pufru z dodatkom 200 mM NaCl pri različnih pH vrednostih. Puffer, ki smo mu dodali NaCl, je imel večjo ionsko moč. V 50 mM acetatnem mediju smo izvedli tri paralelne poizkuse, za medij z dodatkom NaCl pa samo enega. Tako smo se odločili, ker je bila variabilnost rezultatov pri določanju topnosti v 50 mM acetatnem pufru majhna. Na Sliki 19 so prikazani rezultati meritev. R^2 za medij z dodanim NaCl je bil 0,985 in za običajni 50 mM acetatni puffer 0,995. Krivulji topnosti v 50 mM acetatnem pufru z dodatkom in brez dodatka 200 mM NaCl sta bili za razliko grafa, v katerega smo nanese rezultate meritev v pufrih različnih koncentracij (Slika 18), v obeh pufrih paralelni (Slika 19). Večjo topnost smo izmerili v pufru z dodatkom NaCl, torej v tistem z večjo ionsko močjo. To, da je bila topnost v mediju z dodatkom NaCl večja, je bilo nekoliko presenetljivo, saj so literaturni podatki kazali na to, da naj bi prisotnost natrijevih ionov zmanjševala topnost natrijevih soli.

Sklepamo, da prisotnost natrijevih oziroma kalijevega ionov v manjših količinah ni bistveno vplivala na topnost. Večja ionska moč je nanjo imela izrazitejši vpliv, zato smo izmerili večjo topnost. Pri večjih koncentracijah je na topnost imel večji vpliv prispevek skupnih ionov (natrijevih), zato smo pri 200 in 250 mM pufru, pripravljenem iz kalijevega fosfata, dobili manjšo topnost od pričakovane (Slika 18).

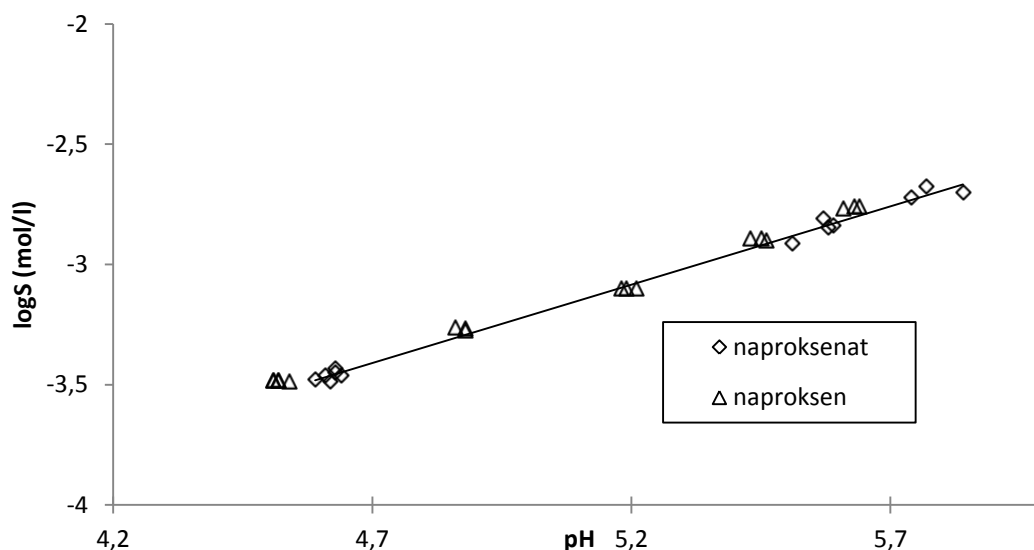


Slika 18: Topnost natrijevega naproksenata v različno koncentriranih fosfatnih in acetatnih pufrih glede na končni pH raztopine. V bolj redčenih pufrih smo izmerili večjo topnost in večjo spremembo pH.



Slika 19: Primerjava topnosti natrijevega naproksenata v 50 mM acetatnem pufri in 50 mM acetatnem pufri z dodatkom 200 mM NaCl pri različnih pH.

Za primerjavo razlik v topnosti naproksena in naproksenata smo izvedli tudi primerjavo topnosti obeh oblik pri istih pH vrednostih. Meritve smo izvedli v 50 mM acetatnih pufrih pri različnih pH 4,5; 4,8; 5,2; 5,5 in 5,8. Pufrska kapaciteta acetatnega pufra je bila pri večjih pH nižja, zato je pri teh vrednostih prišlo do manjših sprememb v končnem pH raztopine. Rezultati meritev so prikazani na Sliki 20. Izmerjene topnosti natrijevega naproksenata so se ujemale v območju med pH 4,5 in 5,8 s krivuljo topnosti naproksena. Rezultati, prikazani na Sliki 20, potrjujejo dejstvo, da je bila vrednost ravnotežne topnosti neodvisna, če smo kot začetni prebitek uporabili ali sol ali kislino. Pričakovali smo večjo izmerjeno topnost zdravilne učinkovine v obliki soli, saj smo opazili, da se je po dodatku v pufer raztopila precej večja količina soli kot neionizirane oblike. Razlog za enako izmerjeno topnost je bil v ravnotežju med ionizirano in neionizirano obliko, zato se je postopoma iz prenasočene raztopine soli oborila kislina, saj je bila njena topnost presežena. V poglavju 4.10 smo potrdili, da trden preostanek v primerih, ko smo kot začetno snov uporabili natrijev naproksenat, ni bil natrijev naproksenat, ampak njegova hidrolizirana oblika naproksen. Torej smo v obeh primerih določali topnost naproksenu, saj so delci v raztopini bili v ravnovesju z njim in ne natrijevim naproksenatom.

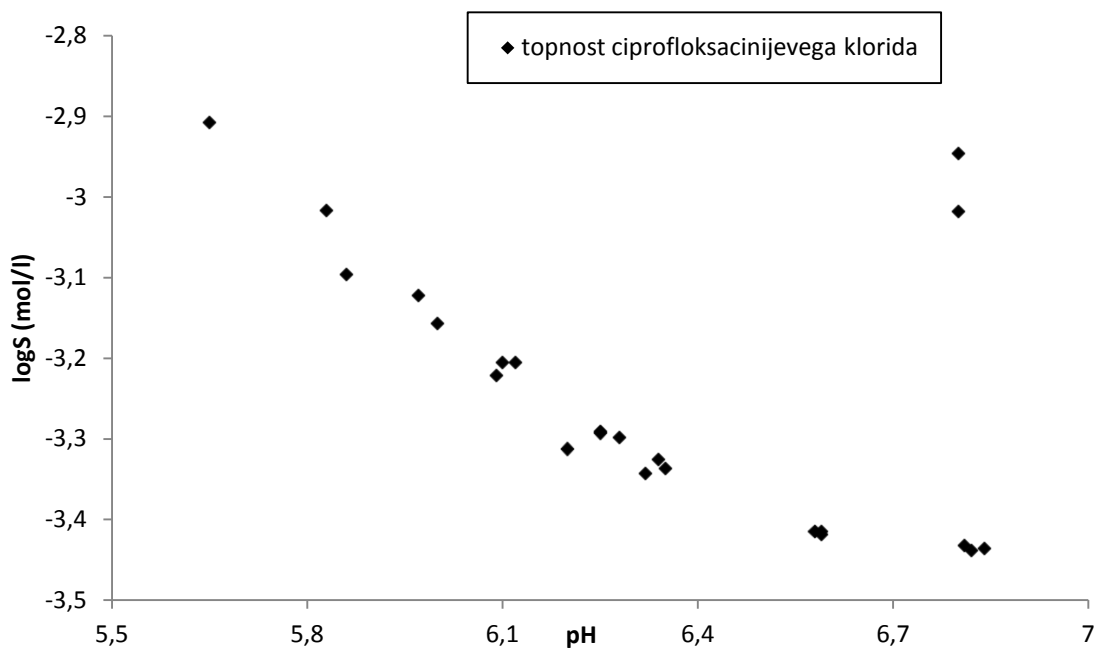


Slika 20: Primerjava topnosti natrijevega naproksenata in naproksena v odvisnosti od pH pufra.

4.5 Topnost ciprofloksacina in ciprofloksacinijevega klorida v pufrih različne sestave

Pred izvajanjem testiranja topnosti ciprofloksacina in ciprofloksacinijevega klorida v pufrih različne sestave smo najprej ocenili količino vzorca, ki je bila najprimernejša za testiranje topnosti. Da smo ugotovili, katera količina je bila najbolj primerna, smo natehtali različne količine vzorca (15–300 mg) v 40 ml pufrin in spremljali doseženo topnost ter končni pH raztopin (Slika 21). Pri natehtah, večjih od približno 200 mg, se je pričela pojavljati oborina, kljub temu da se vsa zdravilna učinkovina še ni raztopila. Pri povečevanju natehte nad 200 mg smo še vedno opazili povečanje pH vrednosti in posledično tudi topnosti, čeprav je neraztopljenega ostalo vedno več ostanka. Domnevamo, da je bil razlog za ta pojav pretvarjanje tudi neraztopljenega ciprofloksacinijevega klorida v ciprofloksacin. Kljub temu da nismo opazili, da se je ciprofloksacinijev klorid popolnoma raztopil, je ta najverjetneje prehajal v raztopino, iz nje pa se je istočasno obarjal ciprofloksacin. Sprememba pH vrednosti in posledično topnosti ni bila odvisna od topnosti ciprofloksacinijevega klorida, ampak je bila odvisna od dodane količine ciprofloksacinijevega klorida v vzorec, čeprav se ta na videz ni povsem raztopil.

Pri natehtah, manjših od 200 mg, se je vsa zdravilna učinkovina takoj raztopila, obarjanje pa se je pričelo s časovnim zamikom. Z zniževanjem natehte se je topnost zmanjševala skladno z manjšo spremembo pH. Pri natehti 20 mg spremembe pH vrednosti ni bilo več, še vedno pa je bil po stresanju v raztopini trden preostanek. Ker je bila natehta 20 mg/40 ml glede na izmerjeno topnost pri pH 6,8 še vedno v precejšnjem presežku (približno 5-kratnem), smo poizkusili še z nižjimi natehtami. Pri natehti 18 in 15 mg/40 ml je izginila vsa učinkovina in ni ostalo neraztopljenega nič trdnega ostanka, koncentracija zdravilne učinkovine v teh dveh vzorcih pa je močno poskočila (izstopajoči točki pri pH 6,8; Slika 21). Ravnotežna topnost torej ni bila dosežena, saj v vzorcu ni bilo prisotne trdne oblike. To je bilo nekoliko presenetljivo, saj je bil presežek zdravilne učinkovine glede na nasičeno topnost še vedno približno štirikraten. Vzrok za nepričakovano visoke rezultate pripisujemo nastanku metastabilnega stanja raztopine. Ker je bila 20 mg/40 ml natrijevega naproksenata najnižja natehta, v kateri se je še vzpostavilo ravnovesje med obema fazama, smo se odločili, da bomo za testiranje uporabili to vrednost.



Slika 21: Topnost v odvisnosti od končnega pH pri različnih natehtah.

V Preglednicah IX in X so prikazani rezultati meritev topnosti ciprofloksacina v 50 mM fosfatnem in bis-trisnem pufru s pH 6,8. Do spremembe pH ni prišlo v nobenem mediju, smo pa v fosfatnem mediju izmerili nekoliko večjo topnost kot v bis-trisnem. Razpršenost rezultatov je bila majhna, kar je potrdilo natančno izvedbo metode. Topnost v fosfatnem pufru je bila 7 % večja kot v acetatnem pufru. Vzrok za različni topnosti je bil najverjetneje v različnih ionskih močeh puetrov.

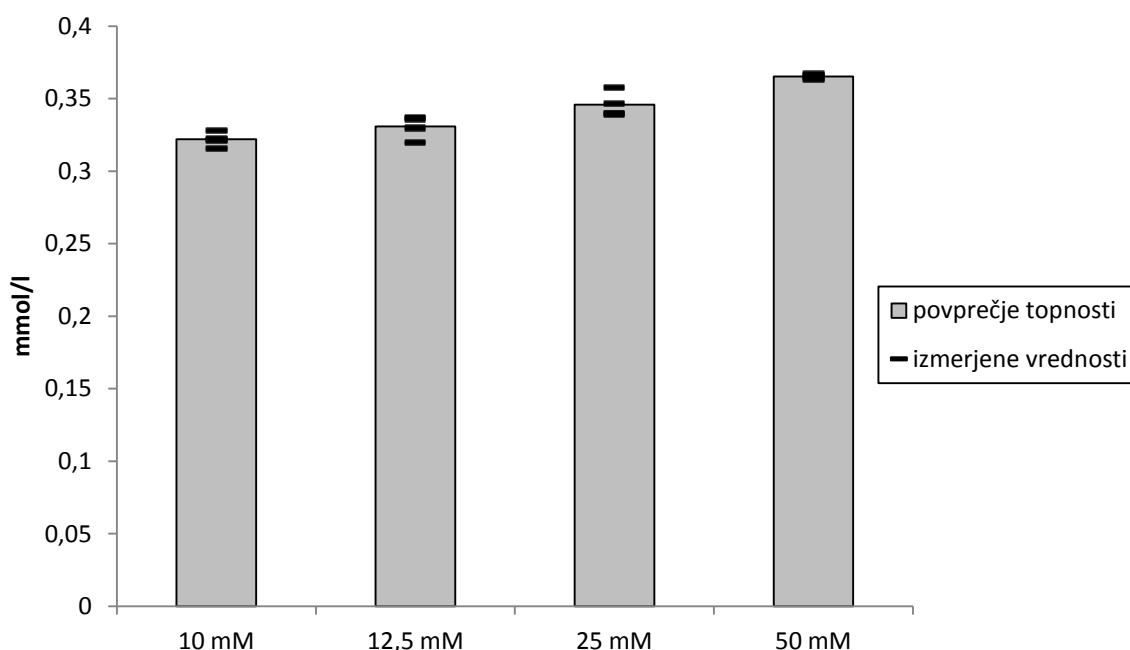
Preglednica IX: Topnost ciprofloksacina v 50 mM fosfatnem pufru.

| vzorec | koncentracija mmol/l |
|-----------|----------------------|
| 1 | 0,3259 |
| 2 | 0,3293 |
| 3 | 0,3332 |
| povprečje | 0,3296 |
| RSD | 0,77 % |

Preglednica X: Topnost ciprofloksacina v bis-tris pufri.

| vzorec | koncentracija mmol/l |
|-----------|----------------------|
| 1 | 0,3075 |
| 2 | 0,3066 |
| 3 | 0,3087 |
| povprečje | 0,3078 |
| RSD | 0,23 % |

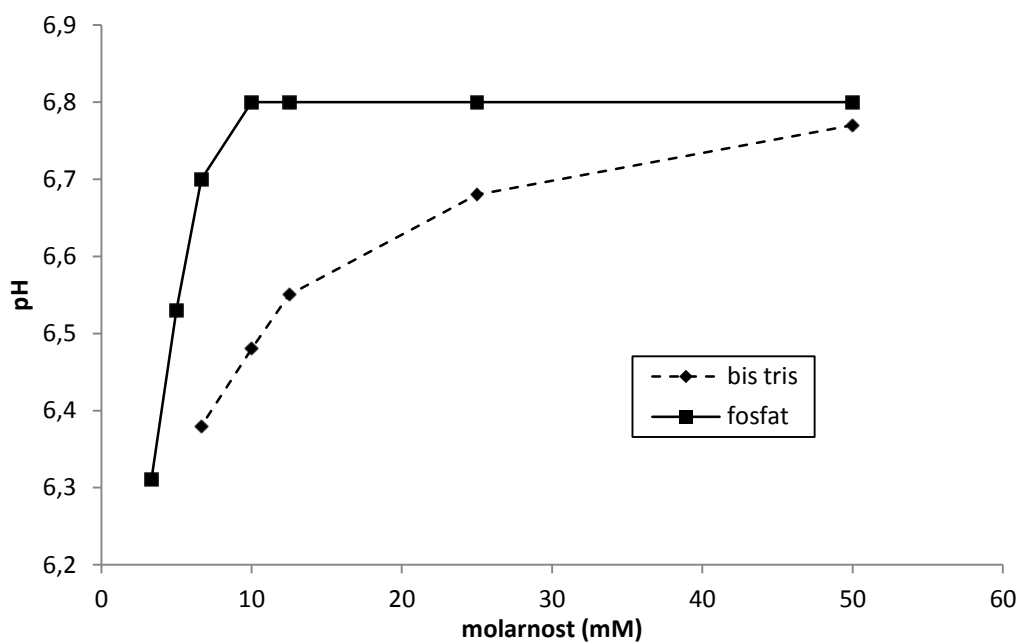
V naslednjih poizkusih smo pokazali, da je bila topnost ciprofloksacinijevega klorida odvisna od ionske moči pufra. V pufrih z nižjo koncentracijo (ionsko močjo) smo izmerili manjše topnosti kot v tistih z višjo, čeprav spremembe pH vrednosti nismo zaznali. Natehtali smo 20 mg vzorca v 40 ml 50, 25, 12,5 in 10 mM fosfatnega pufra s pH 6,8. Rezultati so prikazani na Sliki 22.



Slika 22: Topnost ciprofloksacinijevega klorida v različno molarnih fosfatnih pufrih.

Opazili smo tudi razlike v končni pH vrednosti med fosfatnimi in bis-trisnimi pufri v različnih koncentracijah kljub enakemu dodatku zdravilne učinkovine (Slika 23). Pri nižanju koncentracije fosfatnega pufra s 50 na 10 mM spremembe pH nismo izmerili, nižal pa se je pH bis-trisnega pufra, čeprav imata pri pH 6,8 oba pufra enako pufersko kapaciteto.

Tega pojava na osnovi dosedanjih rezultatov nismo mogli pojasniti, saj sta imela oba pufra podobno kapaciteto in enak začetni pH. Pri nadaljnjem redčenju fosfatnega pufra pod 10 mM se je krivulja končnega pH strmo prelomila navzdol. Razlog za to je bil podoben kot pri natrijevem naproksenatu v acetatnem puftru. Z nižjo koncentracijo smo dosegli manjšo pufersko kapaciteto, kar se je odrazilo v večji spremembi pH vrednosti. Ta sprememba je še povečala oddaljenost od pKa točke (Slika 15), zato se je kapaciteta še dodatno znižala. Krivulja pH vrednosti je pri redčenju bis-trisnega pufra imela manjši naklon. Z redčenjem tega pufra smo ravno tako zniževali kapaciteto, česar posledica je bila sprememba pH. Vendar se je s tem medij približeval območju z večjo pH vrednostjo, kjer ima večjo pufersko kapaciteto, kar je zaviralo še večjo spremembo, torej ravno obratno, kot se je dogajalo v primeru fosfatnega pufra.



Slika 23: Končne pH vrednosti različnih pufrov po raztapljanju natrijevega naproksenata.

4.6 IDR

Z IDR metodo smo poizkušali preveriti vpliv sestave medija na hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine. Poizkuse smo izvedli v treh paralelnih poizkusih v 50 mM acetatnem in fosfatnem pufri s pH 4,5. Natrijev naproksenat je že po nekaj sekundah stika s pufrom pričel nabrekati, nato pa je izpadel iz kalupa. Raztapljanja za natrijev naproksenat tako ni bilo mogoče določati, saj zaradi nabrekanja nismo mogli zagotoviti konstantne površine. Ker se je pri testih topnosti ciprofloksacinijev klorid še hitreje raztopil, IDR metode zanj nismo izvedli. Predvidevali smo, da se bodo pojavile enake težave kot pri natrijevem naproksenatu. Iz opisanega pojava smo sklepali, da je ta metoda neuporabna za soli oziroma dobro topne učinkovine.

4.7 Raztapljanje 275 mg tablet natrijevega naproksenata v različnih pufrih

S testi raztapljanja smo želeli pokazati vpliv sestave pufru na hitrost sproščanja zdravilne učinkovine. Pokazali smo, da so se profili raztapljanja tablet z natrijevim naproksenatom v različnih pufrih bistveno razlikovali, kljub temu da so bili izvedeni pri isti pH vrednosti. Poizkuse smo izvajali z 275 mg tabletami natrijevega naproksenata. Celotna masa zdravilne učinkovine v tableti, preračunana na naproksen, je bila 250 mg. Raztapljanje smo izvajali v 900 ml medija pri 37° C.

4.7.1 Raztapljanje po metodi USP 2

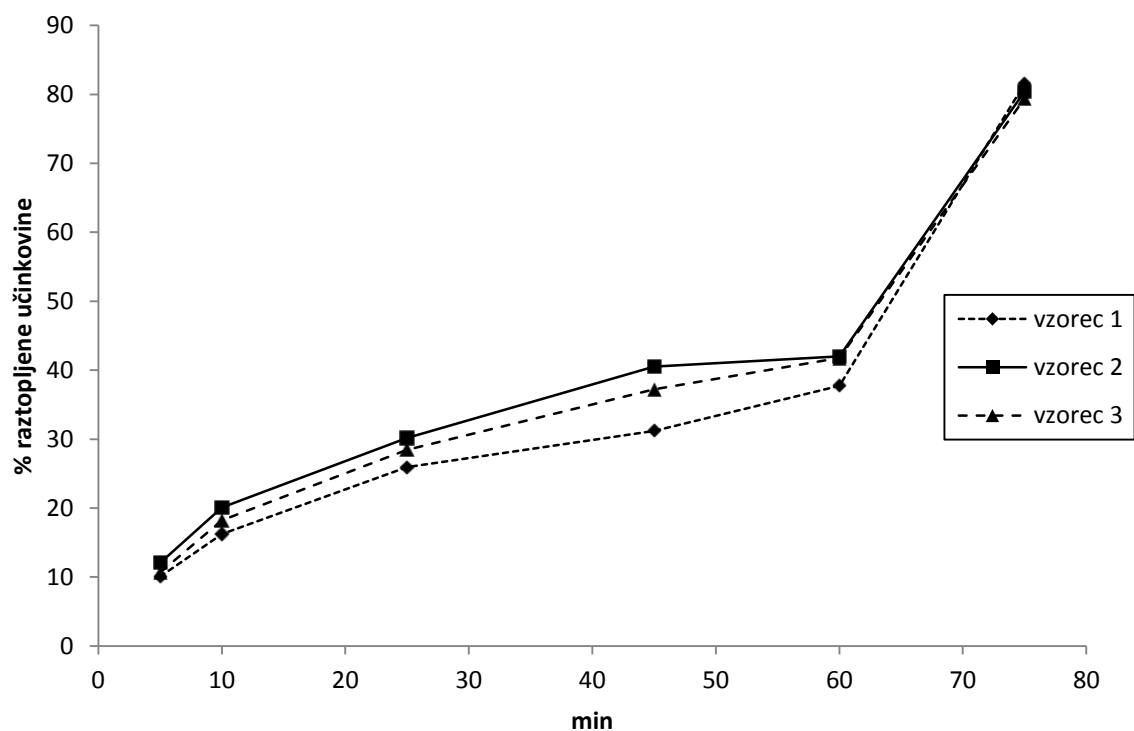
Najprej smo izvedli test raztapljanja tablete natrijevega naproksenata v aparatu z vesli. Hitrost vrtenja mešal smo nastavili na 50 obratov na minuto. Hitrost smo med 65. in 75. minuto povečali, da smo zagotovili popoln razpad tablet. Po tri paralelne poizkuse smo izvedli v 50 mM fosfatnem, po tri pa v acetatnem pufri s pH 4,5. Profil raztapljanja tablet po USP 2 v fosfatnem pufri je prikazan na Sliki 24, v acetatnem pufri pa na Sliki 25. pH fosfatnega pufru po končanem raztapljanju je bil povišan na 4,95, pri acetatnem pufri pa je ostal nespremenjen pri pH 4,5.

V fosfatnem pufri je medij med raztapljanjem postajal vedno bolj moten. Vidni delci so se pojavili po 25 minutah. Tablete niso nabrekale kot v acetatnem pufri, ampak so erodirale.

Raztapljanje v fosfatnem pufru ni potekalo enako pri vseh tabletah, saj je bil RSD profilov raztapljanja v 45. minuti več kot 13 %. Opazili smo, da je razpad tablet natrijevega naproksenata v fosfatnem pufru potekal hitreje kot v acetatnem.

V acetatnem pufru je raztapljanje potekalo nekoliko drugače kot v fosfatnem. Najprej so se pojavili vidni plavajoči delci, nato pa so tablete pričele nabrekati. Medij je postal moten pozneje kot v fosfatnem pufru. Opazili smo, da je bil razpad tablet v acetatnem pufru zelo variabilen. Največji RSD profilov je bil v 10. minuti, in sicer kar 41 %. Med 30. in 50. minuto smo opazili razpad tablet na več manjših in en večji del.

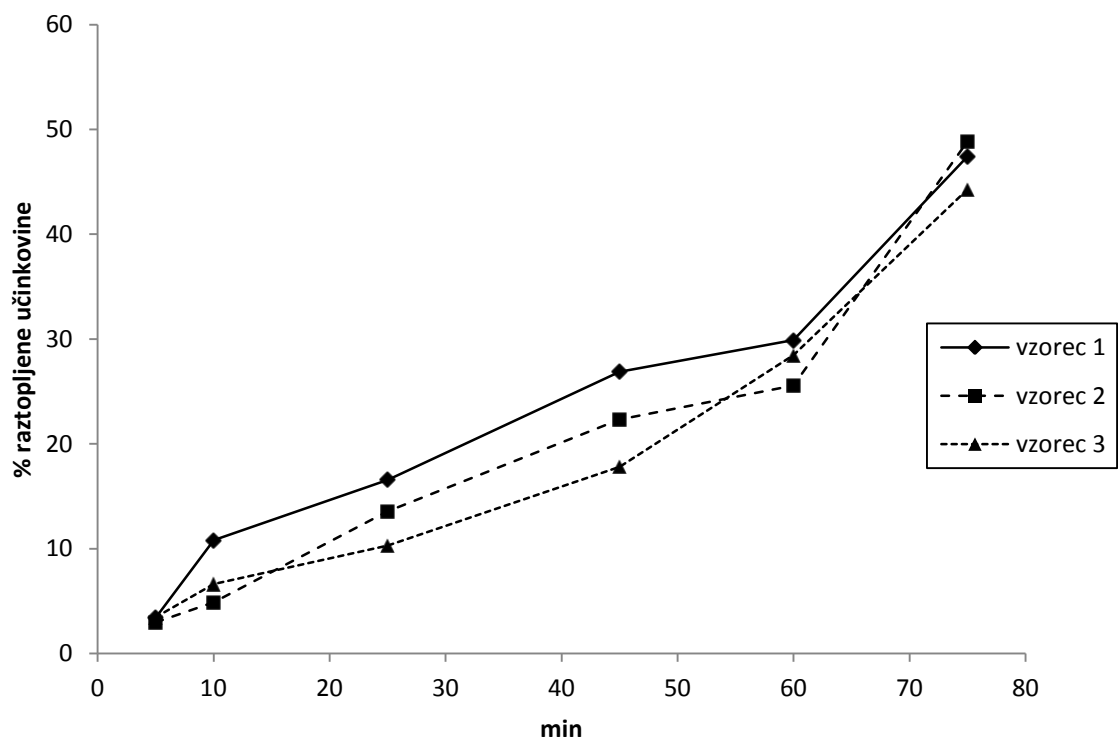
Pri testu raztapljanja tablet po USP 2 smo v obeh pufrih opazili veliko variabilnost časov razpada tablet. Sklepamo, da ta metoda ni bila najbolj primerna za izbrane tablete, zato smo poizkus ponovili še z uporabo košaric (USP 1).



Slika 24: Raztapljanje 275 mg tablete natrijevega naproksenata v 50 mM fosfatnem pufru s pH 4,5 po metodi USP 2.

Preglednica XI: Povprečne vrednosti in RSD pri raztapljanju 275 mg tablete natrijevega naproksenata v 50 mM fosfatnem pufru s pH 4,5 po metodi USP 2.

| čas vzorčenja (min) | 5 | 10 | 25 | 45 | 60 | 75 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| povprečje sproščene učinkovine | 10,92 | 18,17 | 28,18 | 36,31 | 40,52 | 80,41 |
| RSD (%) | 9,45 | 10,64 | 7,50 | 13,10 | 5,93 | 1,32 |



Slika 25: Raztapljanje 275 mg tablete natrijevega naproksenata v 50 mM acetatnem pufru s pH 4,5 po USP 2 metodi.

Preglednica XII: Povprečne vrednosti in RSD pri raztapljanju 275 mg tablete natrijevega naproksenata v 50 mM acetatnem pufu s pH 4,5 po USP 2 metodi.

| čas vzorčenja (min) | 5 | 10 | 25 | 45 | 60 | 75 |
|--------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| povprečje sproščene učinkovine | 3,26 | 7,45 | 13,47 | 22,34 | 27,97 | 46,85 |
| RSD (%) | 8,27 | 40,83 | 23,16 | 20,29 | 7,89 | 5,00 |

4.7.2 Raztapljanje po metodi USP 1

Ker z metodo, izvedeno po USP 2, nismo dobili zadovoljivih rezultatov, kar se tiče variabilnosti profilov, smo test raztapljanja ponovili še v aparaturi s košaricami. Hitrost vrtenja smo nastavili na 100 obratov na minuto, izvedli pa smo po tri paralelne poizkuse v 50 mM fosfatnem in tri v acetatnem pufu s pH 4,5. Med 95. in 100. minuto smo hitrost vrtenja povečali na 200 obratov na minuto, da smo zagotovili popoln razpad tablete.

Med raztapljanjem tablete smo opazili, da je 50 mM fosfatni pufer s pH 4,5 v tretji minuti postal moten. Vidnih plavajočih delcev nismo opazili. V acetatnem pufu enake molarnosti in pH vrednosti pa smo videli manjše plavajoče delce, vendar je bil medij še vedno bister. V sedmi minuti je postal moten tudi acetatni pufer. V osmi minuti smo na dnu posod s fosfatnim pufrom opazili nabiranje usedline (Slika 26), večjih plavajočih delcev pa ni bilo. V dvanajsti minuti v acetatnem pufu še vedno nismo videli usedline, opazili pa smo podolgovate plavajoče delce, ki so dobro vidni na Sliki 27.



Slika 26: Raztapljanje tablete v fosfatu v 18. minuti. Na dnu posode je vidna usedlina.

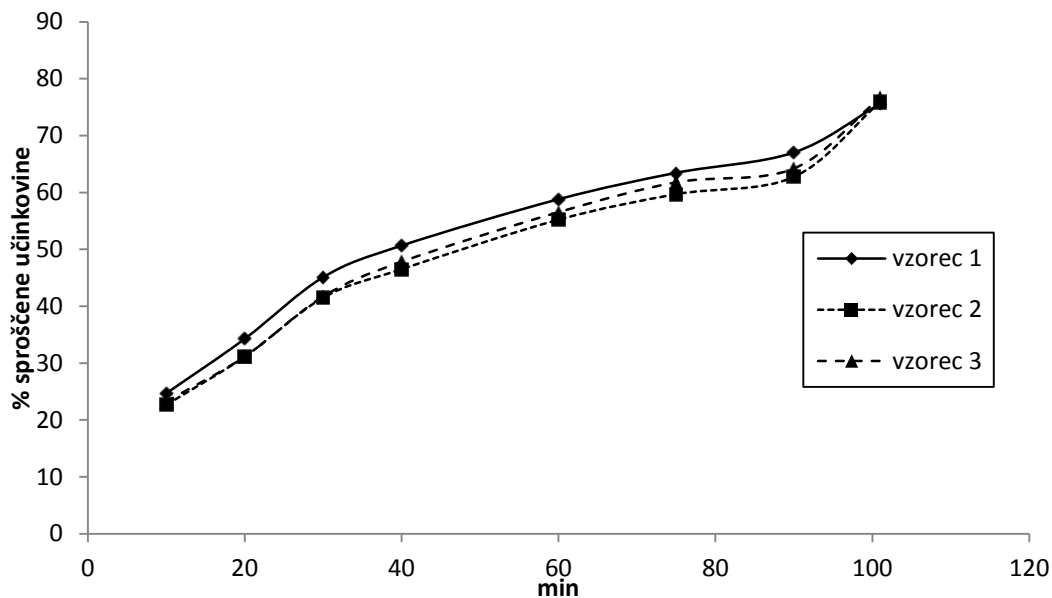


Slika 27: Raztapljanje tablete v acetatu v 18. minuti. V mediju plava več delcev podolgovate oblike.

V fosfatnem pufru (Slika 28) smo izmerili hitrejšo sproščanje natrijevega naproksenata kot v acetatnem pufru (Slika 29). Tudi končna količina sproščene učinkovine je bila višja v fosfatnem pufru kljub popolnemu razpadu vseh tablet v obeh medijih. Domnevamo, da je bil razlog za to povišanje pH vrednosti zaradi bazičnosti natrijevega naproksenata. Izmerili smo, da se je pH fosfatnega pufra med raztapljanjem tablete povečeval od začetka in vse do končnega razpada tablete, ki je bil pri \sim pH 5,05. Povečevanje pH vrednosti med časom raztapljanja smo prikazali v Preglednici XV. Raztapljanje v medijih je lahko potekalo različno tudi zaradi lastnosti pomožnih snovi in ne samo zaradi učinka zdravilne učinkovine.

V fosfatnem pufru večje variabilnosti med profili raztapljanja nismo opazili. Največji RSD deleža raztopljenih zdravilnih učinkovin v določenem času je bil 5,65 %, kar smo prikazali v Preglednici XIII. V acetatnem pufru smo opazili večjo variabilnost raztapljanja naproksenata (največji RSD 29 %; Preglednica XIV). Razlog za to bi lahko bil v pomožnih snoveh v tableti in v odmiku pH medija od pKa vrednosti učinkovine, ki je pri 4,2. V bližini pKa lahko že zelo majhne spremembe pomembno vplivajo na topnost in raztapljanje, ker je v bližini pKa razmerje ionizirane in neionizirane oblike približno enako,

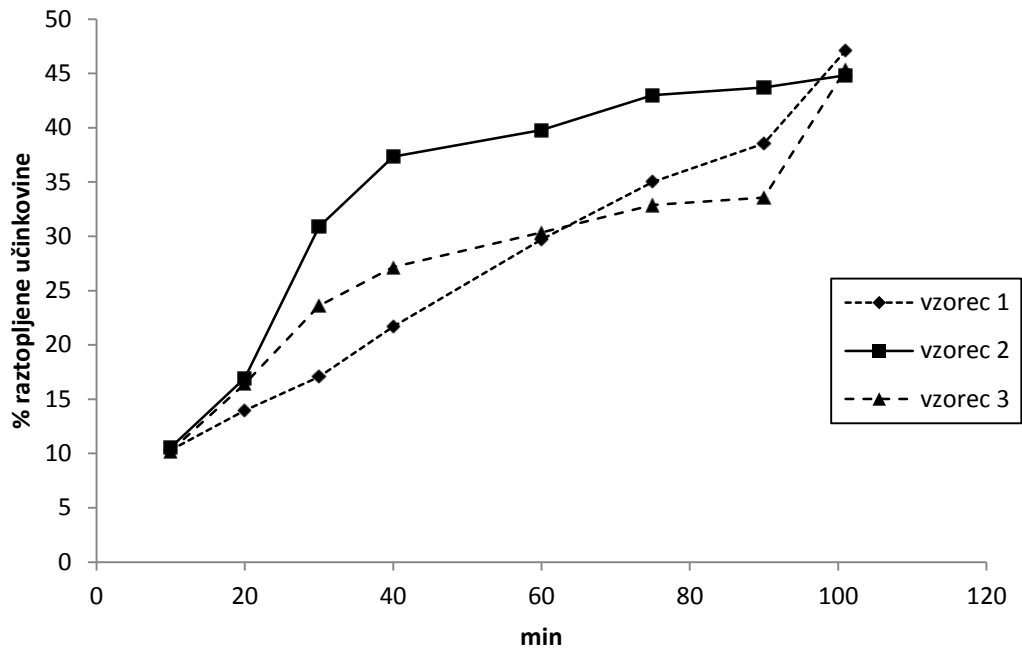
topnost neionizirane oblike je slaba, delež bolj topne ionizirane oblike pa se z višanjem pH hitro povečuje.



Slika 28: Raztapljanje 275 mg tablete natrijevega naproksenata v 50 mM fosfatnem pufru s pH 4,5 po metodi USP 1.

Preglednica XIII: Povprečne vrednosti sproščene naproksena v 50 mM fosfatnem pufru s pH 4,5 v časovnih intervalih in RSD pri raztapljanju 275 mg tablete natrijevega naproksenata po metodi USP 1.

| čas vzorčenja (min) | 10 | 20 | 30 | 40 | 60 | 75 | 90 | 101 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| povprečje sproščene učinkovine | 23,54 | 32,20 | 42,78 | 48,35 | 56,86 | 61,65 | 64,67 | 76,04 |
| RSD (%) | 4,39 | 5,56 | 4,68 | 4,35 | 3,16 | 3,02 | 3,33 | 0,74 |



Slika 29: Raztapljanje 275 mg tablete natrijevega naproksenata v 50 mM acetatnem pufru s pH 4,5 po metodi USP 1.

Preglednica XIV: Povprečne vrednosti sproščenega naproksena v 50 mM acetatnem pufru s pH 4,5 v časovnih intervalih pri raztapljanju 275 mg tablete natrijevega naproksenata po metodi USP 1.

| čas vzorčenja (min) | 10 | 20 | 30 | 40 | 60 | 75 | 90 | 101 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| povprečje sproščene učinkovine | 10,36 | 15,75 | 23,85 | 28,73 | 33,28 | 36,97 | 38,61 | 45,76 |
| RSD (%) | 1,54 | 10,05 | 28,98 | 27,66 | 16,92 | 14,41 | 13,12 | 2,62 |

Preglednica XV: Spreminjanje pH medija med raztapljanjem 275 mg tablete natrijevega naproksenata v 50 mM fosfatnem pufri s pH 4,5.

| čas vzorčenja (min) | vzorec 1 | vzorec 2 | vzorec 3 | povprečje |
|---------------------|----------|----------|----------|-----------|
| 0 | 4,51 | 4,50 | 4,50 | 4,50 |
| 10 | 4,65 | 4,67 | 4,68 | 4,67 |
| 20 | 4,74 | 4,78 | 4,77 | 4,76 |
| 30 | 4,79 | 4,81 | 4,80 | 4,80 |
| 40 | 4,82 | 4,81 | 4,84 | 4,82 |
| 60 | 4,91 | 4,85 | 4,87 | 4,87 |
| 75 | 4,96 | 4,93 | 4,95 | 4,94 |
| 90 | 4,97 | 4,95 | 4,99 | 4,97 |
| 101 | 5,04 | 5,02 | 5,06 | 5,04 |

Domnevamo, da je imela puferska kapaciteta in posledično različna topnost zdravilne učinkovine zaradi spremembe pH vrednosti vpliv tudi na hitrost raztapljanja. Do tega lahko pride tudi pri manjših natehtah, ki v celotnem volumnu medija sprememb pH ne povzročijo. Ta fenomen lahko razložimo s pomočjo Slike 3, v kateri smo prikazali raztapljanje preko difuzne plasti. Raztapljanje poteka preko difuzne plasti, koncentracija na notranji strani plasti pa je enaka nasičeni topnosti. V primeru, da gre za pufer manjše kapacitete, lahko raztopljena sol v difuzni plasti spremeni pH in si s tem lokalno poveča topnost. Ker pa je hitrost raztapljanja odvisna tudi od koncentracije topljenca v difuzijski plasti (Noyes-Whitney, Enačba 3), je posledica tega efekta hitrejše raztapljanje učinkovine, kljub temu da se sprememba pH v mediju ne odrazi.

4.8 Obarjanje naproksena iz raztopine natrijevega naproksenata

Za spremljanje obarjanja zdravilne učinkovine iz raztopine soli smo se odločili zaradi lažjega razumevanja prehajanja soli v kislino. Obarjanje naproksena smo izvedli v dveh različnih medijih, in sicer v 50 mM fosfatnem pufru in 5 mM acetatnem pufru s pH 4,5. Pri obarjanju ciprofloksacina smo se osredotočili na vpliv presežka dodane soli, poizkuse pa smo izvajali v 50 mM fosfatnem pufru s pH 6,8.

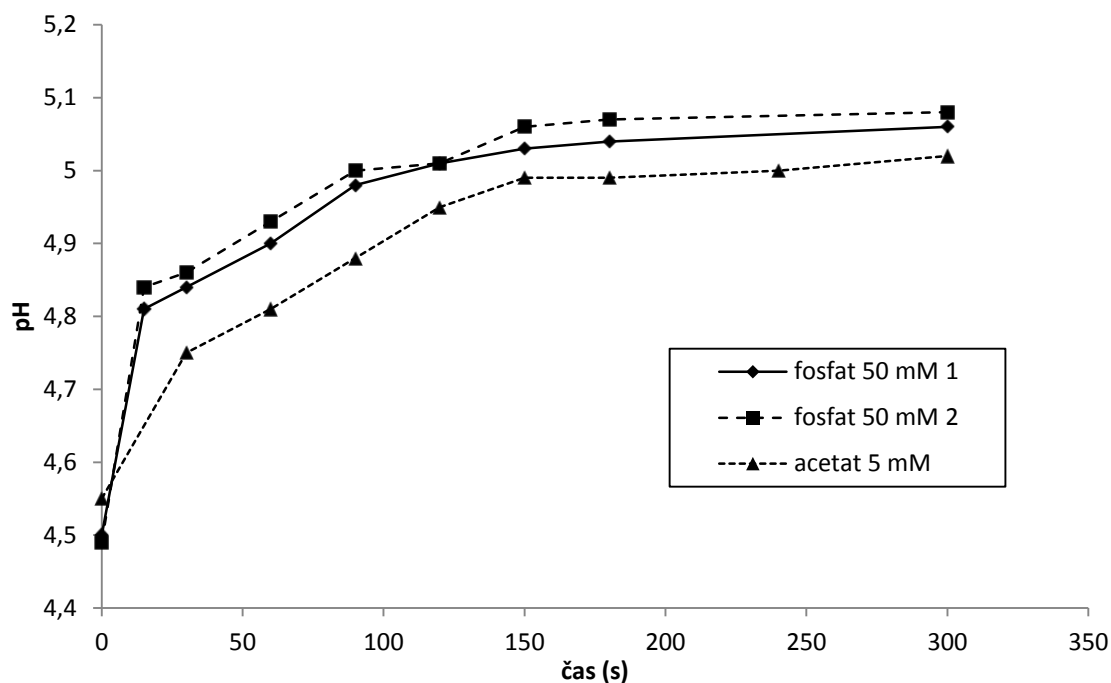
V Preglednici XVI smo prikazali časovno spreminjanje koncentracije naproksena v 50 mM fosfatnem pufru s pH 4,5 (vzorec 1 in 2) in v 5 mM acetatnem pufru z istim pH (vzorec 3). Za vzorec 1 smo natehtali 100,4 mg natrijevega naproksenata, za vzorec 2 100,0 mg, za vzorec 3 pa 100,2 mg, ki smo jih raztopili v 250 ml pufra, segretega na 37° C. 100 mg natrijevega naproksenata ustreza 91,2 mg naproksena.

Ves natrijev naproksenat se je takoj po dodatku povsem raztopil. Pričetek obarjanja učinkovine iz medija smo opazili med peto in deseto sekundo mešanja. Raztopina je nato postajala vedno motnejša, saj se je oborilo vedno več učinkovine. Predvidevali smo, da oborjena snov v raztopini ni bila natrijev naproksenat, ampak njegova hidrolizirana oblika naproksen. Da je ta predpostavka bila pravilna, smo pozneje tudi potrdili. Čas, potreben za doseg ravnotežnega stanja, je bil v vseh primerih približno 150 sekund, spreminjanje pa je potekalo podobno v fosfatnem in acetatnem pufru.

Ker se je po dodatku v medij vsa sol takoj raztopila, smo zaradi bazičnosti zdravilne učinkovine pričakovali tudi takojšnjo spremembo pH vrednosti, vendar se je ta spreminjala postopno. Spreminjanje pH v odvisnosti od časa smo prikazali na Sliki 30. Razlog za to je najverjetneje bila posledica v ravnovesnih reakcijah od raztopljenih soli do oborjene kisline (Enačba 1). Domnevamo, da je po raztopitvi soli in disociaciji konjugirana baza iz vode privzela proton ter s tem povzročila nastanek OH⁻. Ker je bila topnost kisline presežena, se je ta pričela obarjati, natrij pa je še vedno ostal v raztopini. Takšna izločitev kisline iz raztopine je bila razlog za pomik pH na višjo vrednost, kot bi ga povzročila samo dodatek bazične soli.

Preglednica XVI: Obarjanje naproksena iz različnih pufrov.

| čas vzorčenja (min) | vzorec 1: koncentracija raztopljenega naproksena v fosfatnem pufu (mg/100 ml) | vzorec 2: koncentracija raztopljenega naproksena v fosfatnem pufu (mg/100 ml) | vzorec 3: koncentracija raztopljenega naproksena v acetatnem pufu (mg/100 ml) |
|---------------------|---|---|---|
| 0 | 36,5 (teoretično) | 36,5 (teoretično) | 36,5 (teoretično) |
| 1 | 27,1 | 27,0 | 29,8 |
| 3 | / | / | 19,8 |
| 5 | 22,1 | 21,6 | 18,4 |
| 10 | 21,8 | 21,1 | 18,4 |
| 15 | 21,9 | 21,7 | 18,2 |
| 30 | 21,6 | 20,7 | 18,3 |
| 60 | 21,4 | 20,4 | 18,0 |
| 120 | 21,7 | 21,0 | / |
| 180 | 21,0 | / | / |



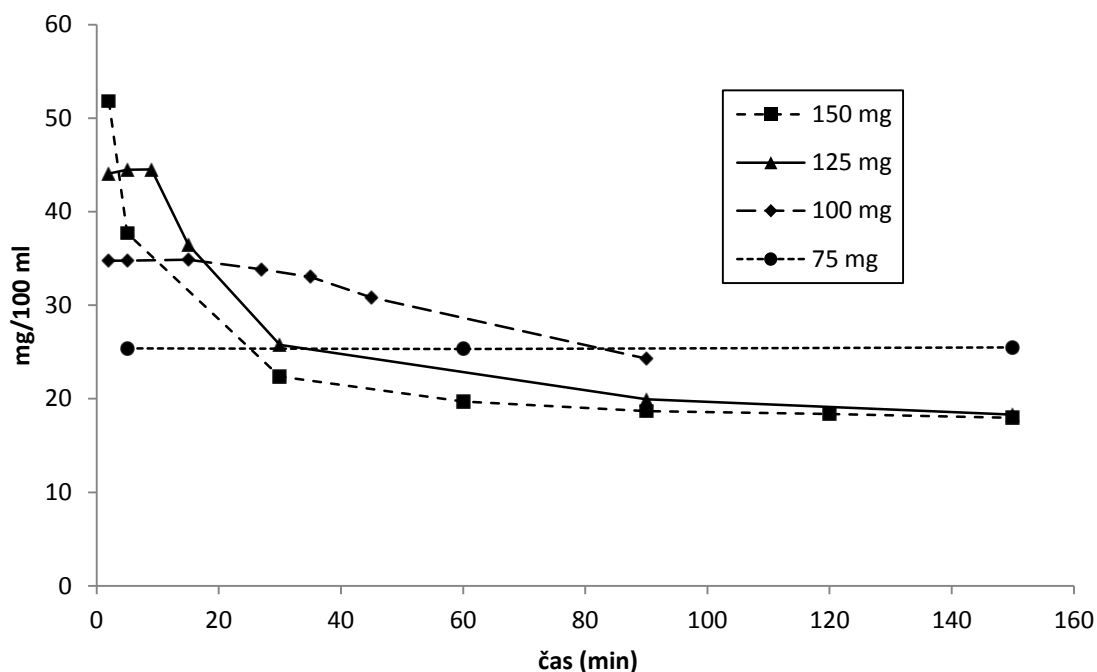
Slika 30: Spreminjanje pH vrednosti pufra med obarjanjem učinkovine.

4.9 Obarjanje ciprofloksacina

Pri študiju obarjanja ciprofloksacina smo preverili vplive različnih natehtanih mas na obarjanje učinkovine. Vrednost pH je v vseh primerih ostala nespremenjena, saj je imel izbrani fosfatni pufer dovolj veliko kapaciteto.

Ciprofloksacin se je obarjal odvisno od natehtane mase. Rezultate meritev smo prikazali na Sliki 31. Pri 150 mg se je pričel obarjati takoj, pri 125 mg z 9-minutnim zamikom in pri natehti 100 mg s 27-minutnim zamikom. Pri 75 mg se v 5 urah ni pričel obarjati, oborina pa je nastala do naslednjega dne (raztopino smo pustili stati 24 ur pri sobni temperaturi). Spremembe pH vrednosti nismo opazili.

Izmerili smo, da se je ciprofloksacin hitreje obarjal v medijih, v katerih je bila raztopljena večja koncentracija zdravilne učinkovine. Pri večjih koncentracijah je bilo tudi prej doseženo ravnotežno stanje raztopine. Pri manj koncentriranih raztopinah smo opazili, da so se pričele obarjati z zamikom in počasneje. Sklepamo, da je bilo prenasičeno stanje obstojnejše pri manjših presežkih, pri večjih presežkih pa je bilo prenasičeno stanje manj obstojno.



Slika 31: Spreminjanje koncentracije ciprofloksacina v 50 mM fosfatnem pufru s pH 6,8 pri različnih natehtah ciprofloksacinijevega klorida.

4.10 Preverjanje oborjene oblike zdravilne učinkovine

Identiteto oborjene zdravilne učinkovine iz raztopine natrijevega naproksenata smo preverili tako, da smo naredili suspenzijo natrijevega naproksenata v acetatnem pufri s pH 4,5 in jo 10 minut mešali. Trdni ostanek smo nato prefiltrirali in sprali z vodo. Na ta način smo odstranili morebitno prisotne natrijeve ione, ki so bili v raztopini zaradi uporabe natrijevega acetata za pripravo pufra, ne pa tudi tistih, ki bi lahko bili prisotni v oborini v obliki natrijevega naproksenata. Iz trdnega preostanka smo pripravili raztopino s koncentracijo 1000 mg/l. Tako pripravljene raztopine smo nato določili vsebnost natrijevih ionov. Če bi bil v oborini prisoten samo natrijev naproksenat, bi izmerili koncentracijo natrijevih ionov 90 mg/l; če pa bi bila prisotna samo hidrolizirana oblika naproksena, natrijevih ionov ne bi zaznali. V primeru, da bi bila prisotna mešanica naproksena in natrijevega naproksenata, bi bila koncentracija natrijevih ionov pod 90 mg/l.

Najprej smo iz meritev standardnih raztopin izračunali umeritveno premico (Enačba 11). Za vsako koncentracijo standarda smo ponovili 10 meritev, za izračun umeritvene premice pa uporabili povprečje rezultatov. Rezultati so prikazani v Preglednici XVII.

Preglednica XVII: Rezultati meritev standardnih koncentracij.

| koncentracija Na ⁺ (mg/l) | povprečno število ionov v sekundi desetih meritev (N) | RSD (%) |
|---|---|---------|
| 0 | 1,80 x 10 ⁶ | 7,17 |
| 10 | 3,93 x 10 ⁸ | 1,44 |
| 20 | 5,54 x 10 ⁸ | 1,72 |

$$c = \frac{N \times 10^{-8} - 0,0676}{0,2759}$$

Enačba 11

$$R^2 = 0,999$$

Z meritvijo vsebnosti natrijevih ionov v oborini (Preglednica XVIII) smo pokazali, da oborina, ki je nastala pri merjenju topnosti natrijevega naproksenata, ni bila enaka tisti, ki smo jo uporabili kot začetni trdni prebitek. V vzorcu, ki smo ga pripravili iz trdnega

ostanka suspenzije, po 10 minutah namreč ni bilo več zaznanih natrijevih ionov. Kljub temu da se natrijev naproksenat na videz ni povsem raztopil, je ta ves prešel v raztopino, kjer se je hidroliziral v naproksen, ki se je nato zaradi presežene topnosti oboril. Kot smo torej predvidevali že prej, je bilo topnost soli kisle učinkovine pod pH_{max} nemogoče določiti, saj je ta hidrolizirala v manj topno obliko, ki se je izločila kot trden presežek. Ker je bila v ravnovesju z raztopino hidrolizirana oblika in ne sol, smo torej topnost določali naproksenu in ne prvotnemu natrijevemu naproksenatu.

Preglednica XVIII: Rezultati meritev koncentracije natrijevih ionov v trdnem presežku po 10 min.

| koncentracija trdnega ostanka zdravilne učinkovine | povprečno število ionov v sekundi desetih meritev (N) | RSD (%) | izračunana koncentracija Na^+ (mg/l) | vsebnost natrijevega naproksenata |
|--|---|---------|---|-----------------------------------|
| 1000 mg/l | $3,91 \times 10^6$ | 4,27 | < 0,1 | < 0,001 % |

5. ZAKLJUČEK

V nalogi smo preverili uporabnost določenih pufrov za določanje topnosti naproksena in ciprofloksacina ter njunih izbranih soli. Dokazali smo, da je pomemben faktor, ki vpliva na topnost, pufrska kapaciteta, poleg tega sta pomembna še ionska moč in prisotnost posameznih ionov v raztopini, pomembno pa je tudi preverjanje identitete trdnega preostanka po doseženem ravnovesnem stanju.

V okviru naloge smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- v puffih z manjšo pufersko kapaciteto smo izmerili večje nasičene topnosti naproksena, saj je natrijev naproksenat povzročil spremembo pH vrednosti;
- v puffih z večjo ionsko močjo je bila topnost naproksena in ciprofloksacina večja kot v tistih z manjšo;
- večjo topnost natrijevega naproksenata smo izmerili v puffu, ki smo mu dodali 200 mM NaCl;
- topnost natrijevega naproksenata je v medijih s končnim pH pod pH_{max} s klasično saturacijsko metodo nemogoče določati, saj ta ves hidrolizira v naproksen;
- metoda IDR je bila neprimerna za določanje topnosti natrijevega naproksenata, saj je ta v vodi nabrekal;
- profila sproščanja iz tablete natrijevega naproksenata sta se za 50 mM fosfatni in acetatni pufer pri pH 4,5 razlikovala;
- fosfatni pufer pri pH 4,5 ni imel zadostne puferske kapacitete za določanje topnosti in hitrosti raztapljanja natrijevega naproksenata, ker je ta povzročil povišanje pH vrednosti;
- za vzpostavitev ravnotežnega stanja smo potrebovali vsaj 4,5-kraten presežek ciprofloksacinijevega klorida, pri manjših presežkih pa se je vzpostavilo metastabilno stanje;
- topnost ciprofloksacina v 50 mM bis-tris puffu je bila manjša od topnosti v 50 mM fosfatnem puffu zaradi manjše ionske moči;

- večje prenasíčenje raztopine ciprofloksacina se je odrazilo v večji hitrosti obarjanja zdravilne učinkovine.

6. LITERATURA

1. Avdeef A: Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 568–590.
2. Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Azimi M, Valizadeh H: Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 73: 102–106.
3. Fini A, Fazio G, Feroci G: Solubility and solubilization properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 26: 95–102.
4. Attwood A: The mode of association of amphiphilic drugs in aqueous solution. *Advances in Colloid and Interface Science* 1995; 55: 271–303.
5. Serajuddin ATM: Salt formation to improve drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 603–616.
6. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Farmaceutvska_tehnologija_2/Predavanja/PRED9_Topnost_.pdf (10. 6. 2012)
7. Baka E, Comer JEA, Takacs-Novak K: Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* 2008; 46: 335–341.
8. Council of Europe: *European Pharmacopoeia*. 5th Ed. Strassbourg. 2007.
9. Serajuddin ATM, Muffson D: pH-solubility profiles of organic bases and their hydrochloride salts. *Pharmaceutical research* 1985; 2: 65–68.
10. Basanta Kumar Reddy B, Karunakar A: *Biopharmaceutics Classification System: A Regulatory Approach Dissolution Technologies* 2011; February: 31–37.
11. Li S., Doyle P, Metz S, Royce A E, Serajuddin ATM: Effect of chloride ion on dissolution of different salt forms of haloperidol, a model basic drug. *Journal of Pharmaceutical Science* 2005; 94: 2224–2231.

12. Kawakami K, Miyoshi K, Ida Y: Impact of the amount of excess solids on apparent solubility. *Pharmaceutical Research* 2005; 22: 1537–1543.
13. Wang Z, Burrell LS, Lambert JW: Solubility of E2050 at various pH: a case in which apparent solubility is affected by the amount of excess solid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002; 91: 1445–1455.
14. Glomme A, Marz J, Dressman JB: Comparison of miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 94.
15. <http://www.pion-inc.com> (10. 6. 2012)
16. Avdeef A, Berger CM: pH-metric solubility. 3. Dissolution titration template method for solubility determination. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 14: 281–291.
17. Faller B, Ertl P: Computational approaches to determine drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 533–545.
18. Dokoumetzidis A, Macheras P: A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 321: 1–11.
19. Viegas TX, Curratela RU, Winkle VLL, Brinker G: Measurement of Intrinsic Drug Dissolution Rates Using Two Types of Apparatus. *Pharmaceutical Technology* 2001; June: 44–53.
20. United States Pharmacopoeia Convention: The United States Pharmacopoeia 32. National Formulary 27, 2007.
21. http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (10. 6. 2012)
22. <http://www.chembuddy.com/?left=pH-calculation&right=pH-buffer-capacity>. (10. 6. 2012)
23. <http://www.pubchem.com> (10. 6. 2012)

24. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/bis-tris-specification.html> (10. 6. 2012)
25. http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_0880/0901b803808806d2.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-0874.pdf&fromPage=GetDoc (10. 6. 2012)
26. Brittain GH: Analytical profile of drug substances and Excepiens. Academic Press Limited, 1992; 21: 345–373.
27. Sharma J, Singla AK, Dhawan S: Zync-naproxen complex: synthesis, physicochemical and biological evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 43: 260–269.
28. <http://www.zdravila.net> (10. 6. 2012)
29. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-003874.pdf&dir=smpc> (13. 6. 2012)
30. Brittain H. Analytical profile of drug substances and Excepiens. Academic Press Limited, 2004; 31: 163–178.
31. Li X, Feng Z, Hub Y: Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 328: 177–182.
32. Yu X, Zipp GL, Davidson GWR: Effect of Temperature and pH on the Solubility of Quinolone Compounds. *Pharmaceutical Research* 1994; 4: 11.
33. <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/par/documents/websiteresources/con044064.pdf> (13. 6. 2012)