

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VIDA TUŠEK

**NEFELOMETRIČNO DOLOČANJE VPLIVA
POMOŽNIH SNOVI NA OBARJANJE IZBRANIH
UČINKOVIN**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VIDA TUŠEK

**NEFELOMETRIČNO DOLOČANJE VPLIVA
POMOŽNIH SNOVI NA OBARJANJE IZBRANIH
UČINKOVIN**

**NEPHELOMETRIC DETECTION OF THE
EXCIPIENT MEDIATED INHIBITION OF DRUG
PRECIPITATION**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek pod somentorstvom dr. Luka Peternela. Mentor na Fakulteti za farmacijo je bil doc. dr. Simon Žakelj.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Simonu Žaklju in somentorju dr. Luki Peternelu za strokovno vodenje, spodbudo pri delu in vsestransko pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Poleg tega se zahvaljujem dr. Mariji Petruševski za vse nasvete pri delu v laboratoriju in izven njega.

Hvala družini, ki mi je tekom študija stala ob strani tako moralno kot tudi finančno in me vsakodnevno spodbujala pri nastajanju diplomskega dela.

Nazadnje pa hvala prijateljem, ki so verjeli vame in naredili študentska leta nepozabna!

Izjava

Izjavljam, da sem nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja in somentorstvom dr. Luka Peternela.

Ljubljana, december 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janez Kerč

Članica diplomske komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik

VSEBINA

| | |
|--|----|
| POVZETEK..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| SEZNAM OKRAJŠAV | 3 |
| 1 UVOD | 5 |
| 1.1 TOPNOST..... | 5 |
| 1.2 POVEČANJE TOPNOSTI SLABO TOPNIH UČINKOVIN | 7 |
| 1.2.1 Prenasičenje in obarjanje učinkovine..... | 8 |
| 1.2.2 Inhibicija obarjanja..... | 11 |
| 1.2.3 Povezava med profili prenasíčenja in vitro ter intestinalnimi absorpcijskimi karakteristikami in vivo..... | 14 |
| 1.2.4 Metode določanja kinetike obarjanja | 17 |
| 2 NAMEN DELA | 20 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 21 |
| 3.1 Materiali | 21 |
| 3.1.1 Zdravilne učinkovine..... | 21 |
| 3.1.2 Pomožne snovi | 23 |
| 3.1.3 Medij za raztapljanje | 28 |
| 3.1.4 Aparature in programska oprema | 28 |
| 3.2 Metode..... | 30 |
| 3.2.1 Nefelometrično določanje topnosti učinkovin pri različni pH vrednostih | 30 |
| 3.2.2 Kinetika obarjanja | 31 |
| 4 REZULTATI IN RAZPRAVA | 37 |
| 4.1 Določanje topnosti učinkovin pri različnih pH vrednostih..... | 37 |
| 4.2. Kinetika obarjanja | 37 |
| 4.2.1 Optimizacija instrumentalnih in eksperimentalnih pogojev | 38 |
| 4.2.2 Določanje vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja fenofibrata in dipiridamola z nefelometrično in turbidometrično metodo..... | 41 |
| 5 ZAKLJUČEK..... | 52 |
| LITERATURA..... | 53 |

POVZETEK

Slaba topnost učinkovin pri razvoju farmacevtskih oblik predstavlja velik izziv, saj se učinkovina, ki je v lumnu intestinalnega trakta neraztopljena, ne more absorbirati. Uporabljamo različne pristope, s katerimi lahko povečamo topnost oz. hitrost raztapljanja in posledično tudi biološko uporabnost. Eden izmed njih je tudi vzdrževanje prenasičenega stanja, v katerem je učinkovina v raztopljeni obliki prisotna v koncentraciji, ki je višja od ravnotežne topnosti. Ker gre za termodinamsko nestabilno stanje, ima učinkovina težnjo do obarjanja. Določene pomožne snovi lahko obarjanje zdravilnih učinkovin v prebavnem traktu preprečijo, zaradi česar se lahko poveča delež raztopljene in posledično absorbirane učinkovine. Tovrsten vpliv pomožnih snovi lahko določimo z različnimi metodami, ki temeljijo na principu določitve kinetične topnosti v vodnih medijih. Poleg klasičnih metod, pri katerih določamo delež raztopljene učinkovine, lahko učinek inhibicije obarjanja določimo tudi z detekcijo oborine. V diplomski nalogi smo slednji pristop preučevali z nefelometrično in turbidimetrično metodo ter obenem tudi določili korelacijo s klasičnim pristopom. Z optimizacijo eksperimentalnih in instrumentalnih pogojev nefelometrične metode smo določili optimalne nastavitve, ki jih lahko uporabimo za zanesljivo identifikacijo potencialnih inhibitorjev obarjanja. Učinek inhibitorjev obarjanja smo ovrednotili s parametri inhibicije obarjanja (PIO). Izmed slednjih je AUC_{100} izkazal najboljšo korelacijo s klasično metodo določitve inhibicije obarjanja. V primerjavi s turbidimetrično metodo smo pri nefelometrični določili dobro korelacijo s klasično metodo ($r > 0,91$) in nizko število lažno pozitivnih (4/23) ter lažno negativnih (0/23) rezultatov. V primerjavi s klasičnim pristopom pa obe metodi zmanjšata čas, potreben za identifikacijo inhibitorjev obarjanja učinkovine. S tovrstnim pristopom identificiramo nabor učinkovitih inhibitorjev obarjanja, ki jih v naslednjem koraku raziskav potrdimo ali pa zavrnemo s klasičnim pristopom.

ABSTRACT

Poor solubility is often a great challenge in developing a pharmaceutical formulation, since the drug that is not dissolved in the intestinal lumen cannot be absorbed. Drug solubility, its dissolution rate, and also the enhancement of their bioavailability can be improved by means of many different procedures. One of them is the so called maintaining of supersaturation, where the compound in the solution is present in a concentration higher than its thermodynamic solubility. Supersaturated solutions are thermodynamically unstable, so they tend to precipitate. Some excipients can inhibit intestinal drug's precipitation, which results in a larger proportion of not only the dissolved drug, but also the absorbed drug. Such an effect can be detected by means of different methods that are based on determination of kinetic solubility in aqueous media. Beside the classical methods, which include the determination of the dissolved drug, the effect of precipitation inhibition can also be detected via precipitation detection. The latter approach was investigated in this study by the use of nephelometric and turbidimetric methods. The correlation with the classical approach was also investigated. With optimization of the experimental and instrumental conditions, we defined optimal settings that can be used for reliable identification of potential precipitation inhibitors. The inhibitor's effect was evaluated with precipitation inhibitor parameters (PIO). The nephelometric parameter AUC_{100} (area under the signal vs. time plot in the time interval of 100 min) resulted in best correlation with the classical approach. In contrast to the turbidimetric method the nephelometric method resulted in good correlation with the classical approach ($r > 0.91$); the AUC_{100} parameter resulted in a low number of false positives (4/23) and no false negatives (0/23). In comparison with the classical approach, both methods were less time consuming when it comes to the identification of precipitation inhibitors. This type of approach can be used to identify potentially effective precipitation inhibitors for each particular low-soluble drug with high throughput. Afterwards the identified hits can be confirmed or rejected by the classical approach in the next step of the research.

SEZNAM OKRAJŠAV

- AUC – površina pod krivuljo (ang. *area under the curve*)
- BCS – biofarmacevtski klasifikacijski sistem (ang. *Biopharmaceutical Classification System*)
- BU – biološka uporabnost
- cAMP – ciklični adenozinmonofosfat
- CMC – kritična micelarna koncentracija (ang. *critical micelle concentration*)
- DMSO – dimetil sulfoksid
- DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. *differential scanning calorimetry*)
- EMA – Evropska agencija za zdravila (ang. *European Medicines Agency*)
- FaSSIF/FeSSIF – simulirana intestinalna tekočina, tešče/s hrano (ang. *fasted and fed state simulated intestinal fluid*)
- FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. *Food and Drug Administration*)
- GIT – gastrointestinalni trakt
- HDL – lipoprotein visoke gostote (ang. *high-density lipoprotein*)
- HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. *high-performance liquid chromatography*)
- HPMC – hidroksipropilmetilceluloza
- IR – infrardeča spektroskopija (ang. *infrared spectroscopy*)
- IVIVC – *in vitro in vivo* korelacija (ang. *in-vitro in-vivo correlation*)
- LC – tekočinska kromatografija (ang. *liquid chromatography*)
- LDL – lipoprotein nizke gostote (ang. *low-density lipoprotein*)
- LPL – lipoproteinska lipaza
- MS – masna spektrometrija
- PAMPA – vzporedna analiza permeabilnosti z umetno membrano (ang. *parallel artificial membrane permeability assay*)
- PAS – površinsko aktivna snov
- PI – indeks inhibicije obarjanja (ang. *precipitation inhibition index*)
- PIO – parameter inhibicije obarjanja
- PPAR – s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*)

PVP – polivinil pirolidon

r – Pearsonov koeficient korelacije

RNU – relativna nefelometrična enota (ang. *relative nephelometric unit*)

S_{PI}/S_B – razmerje med odzivom, izmerjenim pri inhibitorju obarjanja, in odzivom, izmerjenim pri pufri (ang. *precipitation inhibitor to buffer pH 6.8 signal ratio*)

SDS – natrijev lavrilsulfat (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

TPGS – d-alfatokoferil polietilenglikol 1000 sukcinat (ang. *d-alpha tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate*)

UPLC – tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (ang. *ultra performance liquid chromatography*)

VLDL – lipoprotein zelo nizke gostote (ang. *very low-density lipoprotein*)

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija (ang. *World Health Organization*)

1 UVOD

Topnost učinkovine je ena najbolj kritičnih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki vpliva na obseg absorpcije učinkovine in posledično tudi na biološko uporabnost. Učinkovina se mora najprej sprostiti iz farmacevtske oblike, raztopiti v gastrointestinalni tekočini, potem pa absorbirati skozi intestinalni epitelij, da lahko pride do mesta delovanja in doseže želeni učinek. V primeru slabe topnosti je za absorpcijo na razpolago manjši del učinkovine, zaradi česar pride do nezadostne biološke uporabnosti. Število novih učinkovin v fazi odkrivanja, ki izkazujejo slabo topnost, se povečuje, v zadnjih letih je med novimi razvojnimi učinkovinami takih približno 70 %. Približno 40 % učinkovin v farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem, ki so na trgu, so kategorizirane kot praktično netopne in spadajo v razred BCS II. (1)

Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (BCS) je znanstveni okvir za razdelitev učinkovin glede na njihovo topnost in intestinalno permeabilnost. Iz biofarmacevtskega vidika velja za uporabno orodje pri sprejemanju odločitev pri razvoju formulacij. Učinkovine razdeli v štiri kategorije (2):

- BCS I: dobra topnost, dobra permeabilnost;
- BCS II: slaba topnost, dobra permeabilnost;
- BCS III: dobra topnost, slaba permeabilnost;
- BCS IV: slaba topnost, slaba permeabilnost.

Smernice za razvrstitev učinkovin se med posameznimi regulatornimi organi nekoliko razlikujejo. Če upoštevamo smernice Evropske agencije za zdravila (EMA), je učinkovina dobro topna, ko se največji enkratni odmerek popolnoma raztopi pri temperaturi 37 ± 1 °C v 250 mL pufru v pH območju 1-6,8, v smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) je zahtevano pH območje 1-7,5 in 1,2-6,8 glede na smernice Svetovne zdravstvene organizacije (WHO). Učinkovina pa je dobro permeabilna, ko je obseg absorpcije učinkovine vsaj 85 %, glede na smernice EME in WHO, oz. 90 % v primeru smernic FDA. (3-5)

1.1 TOPNOST

Topnost je definirana kot količina topljenca, ki se raztopi v danem volumnu topila pri določenem pH, temperaturi in tlaku. Odvisna je od lastnosti snovi – lastnosti trdnega stanja (amorf, polimorf, solvat), kristalizacije, oblike, prisotnosti nečistot, kemijske in fizikalne

stabilnosti v raztopini, agregacije delcev, rasti delcev, in eksperimentalnih dejavnikov, kot so npr. pH, temperatura, čas, pogoji mešanja, prisotnost rezidualnega topila, čistost topila. Poznamo različne izraze, ki opisujejo topnost, kot npr. kinetična topnost, navidezna topnost, ravnotežna topnost, termodinamska topnost; razlikujejo se v protokolu merjenja. V farmacevtski industriji sta najpomembnejši kinetična in termodinamska topnost, ki smo ju uporabili v diplomski nalogi, njune lastnosti pa so prikazane v Preglednici I. (6,7)

Preglednica I: Kinetična in termodinamska topnost. (6-9)

| | Kinetična topnost | Termodinamska topnost |
|-------------------------------|--|---|
| definicija | Topnost najhitreje obarjajoče se vrste snovi. Tip oborine ni določen – kristal, amorf, kokristal, sol, nevtralna oblika, mešanica; ponavadi najprej nastane metastabilna oblika. | Topnost, ki je na koncu procesa raztapljanja v ravnotežju s presežkom neraztopljenih snovi. |
| časovna odvisnost | Da | Ne |
| primer metode merjenja | Detekcija oborine (nefelometrija, turbidimetrija), določanje koncentracije (spektrofotometrija, LC) | Določanje koncentracije (LC, spektrofotometrija) |
| stanje topljenja | Predhodno raztopljena učinkovina v organskem topilu, trdna učinkovina | Trdna učinkovina |
| celotna inkubacija | do 6 h | 24-72 h |
| lastnosti metode | Hitro merjenje, veliko število vzorcev, minimalna količina porabljene snovi, enostavna za avtomatizacijo (HTS). | Večja delovna intenzivnost, velike količine vzorca, nizka zmogljivost. ^a |
| uporaba | Faza odkrivanja učinkovin, razvoj učinkovin | Pozna faza odkrivanja, razvoj učinkovin |

^a V zadnjem času so se pojavile nove metode visoke zmogljivosti za določanje termodinamske topnosti, npr. miniaturizirana shake-flask metoda, LYSA. Zmogljivost je večja, manjša je poraba vzorca, merjenje topnosti pa je povezano z določanjem drugih lastnosti učinkovine (npr. ocena kristaliničnosti oborine, merjenje pH). (9, 10)

Primerjava kinetične in termodinamske topnosti

Saal in Peterieit s sodelavci sta pri preučevanju 465 učinkovin ugotovila, da je večina vrednosti kinetičnih topnosti večja ali enaka termodinamski topnosti, razlika med njima je lahko celo dva velikostna reda. Z mikroskopom s polarizirano svetlobo sta določala kristaliničnost oborine iz postopka določanja termodinamske topnosti. 60 % učinkovin je imelo kristalno strukturo, 22,5 % pa amorfno. Poleg tega so bile razlike v topnosti izrazitejšje, če je oborina imela kristalno strukturo, kot pa če je bila amorfna. Nato sta tekom 24 h spremljala kristaliničnost devetih učinkovin. Po 15 min sta dve učinkovini kazali kristalno strukturo, sedem je bilo amorfnih; tekom merjenja pa so se tri učinkovine pretvorile iz amorfne v kristalno obliko. Prišla sta do zaključka, da če je oborina termodinamske topnosti okarakterizirana kot amorf, se bosta tako kinetična kot termodinamska topnost nanašali na amorfno obliko. Nasprotno pa se, če je oborina okarakterizirana kot kristal, termodinamska topnost nanaša na kristalno fazo, kinetična pa na amorfno fazo. (11)

Hoelke in sodelavci so preučevali topnost dveh učinkovin z različnimi eksperimenti. Daljša inkubacija je kazala nižjo topnost, razlike med merjenjem pri 10 min in 24 h so bile za faktor 5-10. Vzrok za to so pripisali kristaliničnosti oborine; hiter dodatek osnovne raztopine v DMSO v puferski medij je preprečil nastanek kristala in nastal je amorf, kar so potrdili z rentgensko praškovo difrakcijo. Amorfna oblika ima višjo topnost od kristalne oblike. Če je inkubacija daljša, pride do rekristalizacije in posledično do nižje topnosti. (12) Vzrok za višje vrednosti kinetične topnosti je lahko nastanek metastabilne prenasičene raztopine. (6)

1.2 POVEČANJE TOPNOSTI SLABO TOPNIH UČINKOVIN

Slabo topne učinkovine uvrščamo v razred BCS II oz. BCS IV. Za učinkovine razreda BCS II je poleg slabe topnosti značilna dobra permeabilnost, zaradi česar biološko uporabnost ponavadi omejuje topnost ali hitrost raztapljanja učinkovine. Pri učinkovinah razreda BCS IV pa po raztopitvi učinkovine lahko absorpcijo omejuje tudi slaba permeabilnost.

Glede na modificirano Noyes-Whitney-evo enačbo (Enačba 1) na hitrost raztapljanja (dX/dt) vplivajo površina (A), difuzijski koeficient (D), debelina difuzijske plasti (h), nasičena topnost (C_s), količina sproščene učinkovine (X_d) in volumen disolucijskega

medija (V). Tako povečana nasičena topnost kot tudi povečanje površine povečata hitrost raztapljanja. (1)

$$DR = \frac{dX}{dt} = \frac{A * D}{h} * \left(C_s - \frac{Xd}{V} \right)$$

Enačba 1: Modificirana Noyes-Whitney-eva enačba. (13)

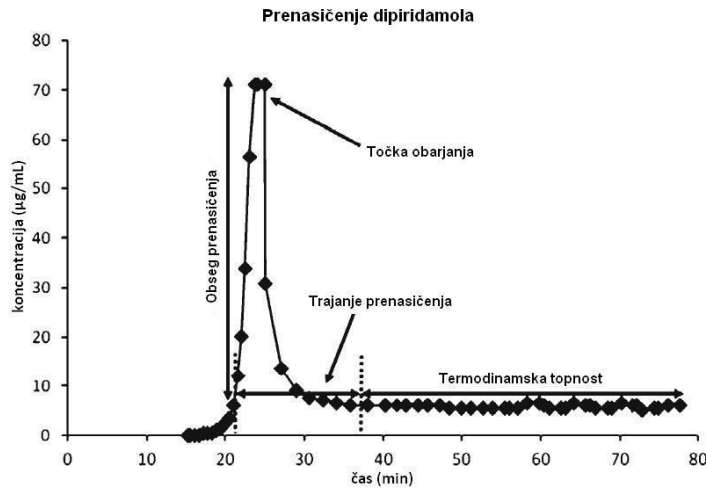
Za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja se uporabljajo različni pristopi; lahko vplivamo na samo učinkovino – tvorba soli (spreminjanje kemijske strukture učinkovine v fazi optimizacije), tvorba predzdravila (uvedba polarne skupine), lahko pa v izboljšanje topnosti posegamo preko načrtovanja formulacije:

- modifikacija kristala – metastabilni polimorfi, kokristali,
- zmanjšanje velikosti delcev – mikronizacija, nanokristali,
- kompleksacija s ciklodekstrini,
- lipidne formulacije – samoemulgirajoči sistemi,
- modifikacija pH (acidifikacija mikrookolja),
- amorfizacija.

Zadnje čase se uveljavlja spoznanje, da je dovolj, če je povečanje intestinalne topnosti le kratkotrajno, še posebej za visoko permeabilne molekule, zaradi česar je lahko vzdrževanje začasnega stanja prenasičenja, torej povečane koncentracije raztopljenе učinkovine, učinkovit pristop k povečanju absorpcije. (14)

1.2.1 Prenasičenje in obarjanje učinkovine

Prenasičeno stanje (Slika 3) vsebuje učinkovino v visokem energijskem stanju ali v drugačni hitro raztapljajoči se obliki, tako da so koncentracije višje od termodinamske topnosti učinkovine. V tej obliki je učinkovina termodinamsko nestabilna in ima težnjo k vrnitvi v ravnotežno stanje, kar pa doseže z obarjanjem. Prenasičeno stanje moramo stabilizirati dovolj dolgo, da lahko pride do izboljšane absorpcije slabo vodotopnih učinkovin in posledično zadostne biološke uporabnosti. (15)



Slika 1: Primer prenasíčenega stanja. (16)

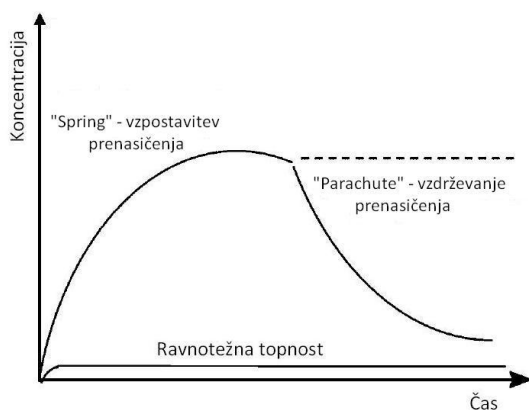
Stopnja prenasíčenja (S) (Enačba 2) predstavlja razmerje med koncentracijo učinkovine v raztopini (C) in ravnotežno topnostjo (C_{eq}).

$$S = \frac{C}{C_{eq}}$$

Enačba 2: Stopnja prenasíčenja. (15)

Če je stopnja prenasíčenja manjša od 1, gre za nenasičeno raztopino, če je enaka 1, gre za nasičeno raztopino, če pa je večja od 1, pa je to prenasíčena raztopina. (15)

Prenasičeno stanje kot možnost izboljšanja intestinalne absorpcije slabo vodotopnih učinkovin sestavljata dva koraka – vzpostavitev in vzdrževanje prenasíčenega stanja. Guzman s sodelavci (17) je ta koncept opisal kot »spring« in »parachute« (Slika 4). Vzpostavitev visoko energijskega prenasíčenega stanja, kjer koncentracija raztopljene učinkovine hitro naraste, imenujemo »spring« (skok). Obarjanje inhibiramo z uporabo pomožnih snovi ali drugih komponent, ki jih imenujemo »parachute« (padalo). (15)



Slika 2: Prikaz vzpostavitve - »spring« in vzdrževanja prenasíčenega stanja –»parachute«.
(17)

Za vzpostavitev prenasíčenega stanja je potrebna višja energijska oblika učinkovine, ti. »spring«. Na voljo so različni formulacijski pristopi (Preglednica III), ki povzročijo intraluminalno prenasíčenje, kot so solubilizirane formulacije, visoko energijske oz. hitro raztapljajoče trdne oblike (konvencionalne trdne disperzije, nanodelci, anorganski nosilci za dostavo slabo vodotopnih učinkovin, predzdravila) in šibke baze. Šibke baze so v kislem okolju v želodcu v ionizirani obliki in tako bolj topne. Po prehodu v tanko črevesje se pH vrednost dvigne, stopnja ionizacije in ravnotežna topnost se zmanjšata. Pride do prehodnega prenasíčenja in posledično do obarjanja učinkovine. (14, 15) Za takšne učinkovine, ki so bolj topne pri nižjem pH, je lahko acidifikacija mikrookolja in hiter razpad farmacevtske oblike primeren pristop doseganja popolnega sproščanja. (1, 19)

Ko pride do indukcije prenasíčenega stanja, imajo molekule učinkovine tendenco k obarjanju, ki je lahko kinetično ali termodinamsko kontrolirano. Prenasíčeno stanje želimo vzdrževati skozi celoten čas, ki je potreben za absorpcijo. To lahko zahteva začasno inhibicijo obarjanja z uporabo pomožnih snovi oz. drugih komponent, ki motijo nukleacijo oz. rast kristalov; tem snovem rečemo inhibitorji obarjanja oz. »parachutes«. (15)

Obarjanje učinkovine sestavljata nukleacija in rast kristalov. Pri nukleaciji se molekule topljenca zberejo v grozde znotraj raztopine. Ko jedra presežejo kritično velikost, postanejo stabilna in začne se naslednja stopnja kristalizacije, rast kristalov. Rast kristalov sestavljata difuzija molekul iz prenasíčene raztopine do kristalne medfaze in integracija molekul v kristalno rešetko. Nukleacija in rast kristalov potekata hkrati, fizikalni pogoji pa diktirajo relativni prispevek vsakega. Če prevladuje rast kristalov, pride do nastanka manjšega števila večjih kristalov, če prevlada nukleacija, nastane več manjših kristalov.

Polimorf, ki nastane, ni nujno najbolj stabilen, ampak je lahko kinetično favoriziran. Za nukleacijo je potrebna aktivacijska energija. Če je ta previsoka, ne pride do nastanka novih kristalov, ampak nastane metastabilna prenasičena raztopina. Ko presežemo energijsko bariero za nukleacijo, lahko kritični grozdi zrastejo v makroskopske kristale. Obarjanje pospešijo višja stopnja prenasičenja, povečana topnost (pri konstantnem prenasičenju), prisotnost nečistot, ki z zmanjšanjem zahtevane vrednosti aktivacijske energije delujejo kot stimulatorji nukleacije, nižja temperatura, nizka viskoznost in manjša medfazna napetost. (14, 15)

1.2.2 Inhibicija obarjanja

Nekatere pomožne snovi povečajo termodinamsko topnost učinkovine in ne povzročijo prenasičenja. To so površinsko aktivne snovi, ki so cenjene zaradi solubilizirajočih lastnosti. Nad kritično micelarno koncentracijo tvorijo micelle, v katere se ujame učinkovina in poveča se delež raztopljene učinkovine. Tako je poloksamer 407 v koncentraciji, večji od kritične micelarne koncentracije, povečal termodinamsko topnost sirolimusa. (18) Dostavni sistemi, ki povzročijo prenasičenje, pa zahtevajo pomožne snovi, ki v primeru prenasičenja zakasnjijo obarjanje. Poleg njihovega učinka na obarjanje učinkovine je potrebno določiti tudi njihov vpliv na termodinamsko topnost. Če na primer polimer poveča topnost učinkovine, se stopnja prenasičenja lahko zmanjša celo do te mere, da raztopina ni več nasičena. Obarjanje je tako inhibirano zaradi termodinamskih sprememb in ne zaradi kinetičnih. Na ta način je PVP povečal topnost acetazolamida, hidrokortizona in vadekoksiba, HPMC pa je povečala topnost hidrokortizona (14). Če hočemo preučiti mehanizem inhibicije obarjanja, so potrebni dodatni eksperimenti, kot so ocena porazdelitve velikosti delcev, ocena morfologije oborine, ločitev med inhibitornim vplivom na nukleacijo oz. rast kristalov, preučevanje interakcij med učinkovino in pomožno snovjo oz. med kristalom in pomožno snovjo (npr. IR spektroskopija, DSC). Cilj inhibitorjev obarjanja je vzdrževanje učinkovine v prenasičenem stanju skozi obdobje, ki je dovolj dolgo za absorpcijo. (14, 15)

Inhibitorji obarjanja delujejo na različne načine (15):

- ↓ stopnja prenasičenja s povečanjem topnosti (↓ nukleacija in rast kristalov);
- ↑ viskoznost → ↓ mobilnost molekul (↓ nukleacija) in difuzijski koeficient (↓ rast kristalov);
- ↑ medfazna napetost med grozdom in tekočino (↓ nukleacija);

- sprememba adsorpcijske plasti na medfazi kristal-medij, npr. z adsorpcijo na površino kristala → ovirana rast kristalov; morebitna modifikacija kristalne rešetke;
- sprememba stopnje solvatacije na medfazi kristal-tekočina → vpliv na integracijo molekul učinkovine v kristal.

Mehanizem inhibicije obarjanja ni odvisen le od inhibitorja, ampak tudi od učinkovine in medija. Identifikacija potencialnega inhibitorja obarjanja zahteva oceno obarjanja v prisotnosti in odsotnosti inhibitorja. Obarjanje je ocenjeno z določanjem indukcijskega časa za obarjanje oz. spremljanjem profila »koncentracija v odvisnosti od časa« od vzpostavitve prenasičenja. Inhibitorni učinek ni odvisen le od koncentracije pomožne snovi, ampak tudi od začetne stopnje prenasičenja. (15)

Primeri mehanizmov delovanja nekaterih inhibitorjev obarjanja

Polimeri

Koncentracija polimera je ponavadi premajhna, da bi vplivala na povečanje topnosti, ampak pride do stabilizacije prenasičenja preko intermolekularnih interakcij med učinkovino in polimerom (vodikove vezi, hidrofobne interakcije) ali preko steričnega oviranja kristalizacijskega procesa. Na nukleacijo in rast kristalov vplivajo na različne načine (14):

- sprememba lastnosti *bulk* raztopine, npr. sprememba površinske napetosti, sprememba topnosti;
- sprememba adsorpcijske plasti na medfazi kristal-raztopina;
- adsorpcija na površino kristala.

Preglednica II: Faktorji, ki vplivajo na interakcijo med polimerom in učinkovino. T – temperatura, MM – molekulska masa, η – viskoznost, ϵ – dielektrična konstanta. (14)

| Faktor | Vpliv |
|--------------------------|---|
| temperatura | $\uparrow T \rightarrow$ šibkejše intermolekularne interakcije, \uparrow topnost učinkovine $\rightarrow \downarrow$ interakcij |
| molekulska masa polimera | $\uparrow MM \rightarrow \uparrow \eta$ oz. \uparrow prostih funkcionalnih skupin na polimeru $\rightarrow \uparrow$ interakcij \rightarrow inhibicija obarjanja |
| viskoznost medija | $\uparrow \eta \rightarrow \downarrow$ difuzija učinkovine \rightarrow inhibicija obarjanja |
| dielektrična konstanta | $\downarrow \epsilon \rightarrow \downarrow$ interakcij $\downarrow \epsilon \rightarrow \uparrow$ topnost učinkovine |
| vodikove vezi | \uparrow vodikovih vezi $\rightarrow \uparrow$ interakcij \rightarrow inhibicija obarjanja |

Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)

HPMC je najbolj preiskovan polimerni inhibitor obarjanja, ki deluje na širok spekter učinkovin. (14) Raghavan s sodelavci (20) je preučeval vpliv HPMC na kristalizacijo hidrokortizona in opazil koncentracijsko odvisen porast indukcijskega časa v prisotnosti HPMC. Vzrok za to so najverjetneje vodikove vezi med hidrokortizonijevim acetatom in HPMC, ki vsebuje veliko število hidroksilnih skupin. Vodikove vezi povečajo aktivacijsko energijo za nukleacijo, poleg tega pa se preko njih HPMC adsorbira na površino kristala, s tem ovira vključevanje molekul učinkovine v kristalno rešetko in tako upočasni rast kristala. Gao s sodelavci (21) je opazil upočasnjeno obarjanje AMG 517 v prisotnosti HPMC in z določanjem distribucije velikosti delcev ugotovil značilno manjše število in velikost delcev, poleg tega je v odsotnosti HPMC oborino identificiral kot kristalinično snov, v prisotnosti HPMC pa je imela oborina amorfnost strukturo.

Polivinil pirolidon (PVP)

Inhibicija obarjanja je močno odvisna od učinkovine. Pri večini študij so ugotovili, da gre za zmanjšanje rasti kristalov. (14) Lindfors s sodelavci (22) je preučeval vpliv PVP na kristalizacijo bikalutamida in ugotovil, da je PVP značilno zmanjšal stopnjo kristalizacije in sicer je z adsorpcijo na kristal zmanjšal njegovo rast. Na nukleacijo PVP ni vplival, najverjetneje zato, ker ni prišlo do adsorpcije na posamezne molekule oz. zelo majhne delce. V nekaterih primerih je vpliv PVP odvisen od molekulske mase polimera. Polimeri z višjo molekulsko maso so se izkazali kot bolj učinkoviti v kompleksiranju salicilne kisline in njenih derivatov in tudi v izboljšanju kinetične stabilnosti prenasičenih raztopin itrakonazola. (14)

Površinsko aktivne snovi (PAS)

Inhibicija obarjanja pri površinsko aktivnih snoveh (PAS) je posledica popolne solubilizacije učinkovine (termodinamska inhibicija obarjanja), lahko pa tudi zakasnjeno obarjanje iz prenasičenih raztopin. Ko dodamo PAS v prenasičeno raztopino v koncentraciji, ki presega kritično micelarno koncentracijo (CMC), bo povečanje topnosti učinkovine skupaj z zmanjšanjem stopnje prenasičenja zmanjšalo stopnjo nukleacije in rast kristalov. PAS lahko izboljšajo solvatacijo raztopljenih molekul učinkovine, s čimer se poveča aktivacijska energija, potrebna za desolvatacijo med nukleacijo in rastjo kristalov. S tem je Overhoff s sodelavci (23) razložil način sposobnosti SDS, da lahko vzdržuje

prenasičenje takrolimusa pri koncentraciji, nižji od 10 % CMC. Poleg tega adsorpcija molekul SDS na površino kristalov takrolimusa (s hidrofobnimi repi obrnjen proti kristalu in z anionskimi sulfatnimi skupinami proti okoliški vodi) zagotavlja elektrostatski odboj, ki zavira koalescenco. Brewster s sodelavci (24) je ocenil kapaciteto PAS (TPGS, Tween[®] 20, Cremophor[®] RH40) za stabilizacijo prenasičenja itrakonazola v kislem mediju, inducirano z metodo sotopila. V odsotnosti PAS se je učinkovina takoj oborila, v prisotnosti PAS (2,5 %) pa je le ta vzdrževal prenasičenje. V primerjavi s ciklodekstrini je stabilizacija s PAS časovno krajša.

Ciklodekstrini

Tudi ciklodekstrini so poznani po solubilizirajoših lastnostih. Čeprav ta učinek ponavadi pripisujemo tvorbi inkluzijskih kompleksov, lahko ciklodekstrini tvorijo tudi ne-inkluzijske konstrukte, npr. agregacijo ciklodekstrinov oz. solubilizacijo, ki imajo PAS podobne lastnosti. Poleg tega pa imajo tudi sposobnost inhibicije obarjanja prenasičenih raztopin. Solubilizirajoča kapaciteta lahko zniža stopnjo prenasičenja in s tem spremeni kinetiko obarjanja, tako da raztopina postane metastabilna. Poleg tega lahko preko vodikovih vezi interagirajo z molekulami učinkovine v raztopini oz. z rastočim kristalom. Interakcija s ciklodekstrini lahko izboljša solvatacijo molekul raztopljenе učinkovine in s tem poveča aktivacijsko energijo za desolvatacijo med rastjo kristala. Ciklodekstrini se obnašajo kot kozmotropi, torej snovi, ki povečajo kohezivno strukturo vode in tako lahko stabilizirajo prenasičene raztopine. (15)

1.2.3 Povezava med profili prenasičenja in vitro ter intestinalnimi absorpcijskimi karakteristikami in vivo

1.2.3.1 Vplivi gastrointestinalnih fizioloških dejavnikov

Na prenasičenje *in vivo* vplivata hidrodinamika in sestava gastrointestinalnih tekočin (15, 19):

- časi prehoda – želodec: tešče: do 0,5 h, hrana: nekaj h; tanko črevo: povprečno 3,3 h.
 - * hiter prehod želodca → nepopolno raztopljenа učinkovina;
- sprememba pH – želodec: tešče: 1-3, hrana: 4,3-5,4; tanko črevo: 6,6-7,5.
 - *vpliv na prenasičenje bazičnih učinkovin,
 - *vpliv na topnost,

*vpliv na učinkovitost inhibitorjev obarjanja (vodikove vezi med ioniziranimi skupinami);

- površinska napetost, viskoznost gastrointestinalnih tekočin → vpliv na obarjanje v prenasičenih raztopinah;
- žolčne soli, fosfolipidi, hrana:

* sprememba raztapljanja, topnosti učinkovine, vpliv na stopnjo prenasičenja, sprememba kinetike obarjanja;

* možne interakcije gastrointestinalnih komponent s prenasičenimi učinkovinami oz. rastočimi kristali;

* žolčne soli, fosfolipidi → površinsko aktivne snovi → upočasnjeno obarjanje;

* visokokalorična hrana → ↑koncentracija žolča → upočasnjeno obarjanje, prenasičenje.

V gastrointestinalnem traktu je nukleacija olajšana zaradi prisotnosti različnih površin in medfaz, ki lahko z zmanjšanjem zahtevane aktivacijske energije katalizirajo nukleacijo. Tako je *in vivo* bolj prisotna heterogena nukleacija, ki prednostno poteka na površinah nečistot, za razliko od homogene, pri kateri pa nukleacija poteka le iz raztopine. (15)

Kostewicz s sodelavci (25) je preučeval tri šibko bazične učinkovine v *in vitro* sistemih, ki so simulirali pH gradient GIT in prisotnost žolčnih soli ter fosfolipidov z uporabo biorelevantnih medijev (FaSSIF in FeSSIF). Višje koncentracije so bile prisotne v FeSSIF, za kar so bile vzrok višje topnosti, obseg prenasičenja pa je bil večji v FaSSIF (stopnja prenasičenja v FaSSIF 3-8, v FeSSIF pa 1,4-2,7). Prenasičenje je dalj časa potekalo v FeSSIF. To je lahko posledica nižje stopnje prenasičenja v FeSSIF in posledično zmanjšane težnje po obarjanju ali pa pride do stabilizirajočega učinka, ki ga povzročijo žolčne soli in fosfolipidi. Dai s sodelavci (26) je preučeval topnost določene učinkovine v fosfatnem pufru, FaSSIF in FeSSIF. Ugotovil je, da je topnost v FaSSIF in FeSSIF podobna, in je 8x večja od topnosti, določene v pufru. Nekoliko višje koncentracije v metastabilnem območju so prisotne pri FeSSIF – zopet verjetno zaradi povečane koncentracije fosfolipidov in žolčnih soli. Boljše IVIVC profilov obarjanja so prisotne pri določanju topnosti v FeSSIF kot pa v fosfatnem pufru ali FaSSIF.

Preglednica III: Primeri raziskovanih dostavnih sistemov, ki povzročijo prenasičeno stanje. AUC – površina pod krivuljo, BU – biološka uporabnost, C_{max} – maksimalna koncentracija, HPMC – hidroksipropilmetilceluloza, P407 – poloksamer 407, PAS – površinsko aktivna snov, PVA – polivinil alkohol, PVP – polivinil piroidon, SDS – natrijev lavrilsulfat, SEDDS – samoemulgirajoči dostavni sistem, TPGS – d-alfatokoferil polietilenglikol 1000 sukcinat.

| Učinkovina | »Spring« oblika (tip formulacije) | »Parachute« (inhibitor obarjanja) | <i>In vivo</i> učinek (farmakokinetika) | Vir |
|-------------|---|---|--|---------------------------|
| Amprenavir | Predzdravilo (fosamprenavir, Telzir [®]) | - | zmanjšana lokalna obremenitev z zdravilom v primerjavi z amprenavirom (Agenerase [®]) | Brouwers, 2006 (27) |
| Celekoksib | Kristalinična sol (natrijev celekoksib) | PAS (TPGS ali Pluronic [®] F127) + HPC | ↑BU (v primerjavi s komercialno formulacijo Cebrex [®] , pri psih) | Guzman, 2006 (17) |
| Danazol | Nanodelci | PVP K15 (1:1 z danazolom) | ↑AUC, ↑ C_{max} (v primerjavi fizikalno zmesjo in komercialno formulacijo, pri miših) | Vaughn, 2006 (28) |
| Itrakonazol | Anorganski nosilec (urejeni mezoporozni silikat SBA-15) | HPMC | več kot 60 % ↑obseg absorpcije (v primerjavi s pripravkom brez HPMC, pri podganah) | Van Speybroeck, 2010 (29) |
| Itrakonazol | Trdna disperzija z enteričnim nosilcem (Eudragit L [®] 100/55) | Carbopol [®] 974P (20 %) | ↑absorpcija, manjša variabilnost absorpcije (v primerjavi s pripravkom brez Carbopola, pri podganah) | Miller, 2008 (30) |
| Takrolimus | Nanostrukturirana trdna disperzija | P407, SDS ali PVA+P407 | ↑AUC, ↑ C_{max} (v primerjavi s komercialno formulacijo Prograf [®] , pri podganah) | Overhoff, 2007 (23) |
| Takrolimus | Trdna disperzija | HPMC | 10x ↑ C_{max} , 10x ↑AUC (v primerjavi s kristaliničnim praškom, pri psih) | Yamashita, 2003 (14) |
| Paklitaksel | Samoemulgirajoči dostavni sistem (SEDDS) | HPMC (5 % m/m) | 20x ↑ C_{max} , 10x ↑BU (v primerjavi s SEDDS brez HPMC, pri podganah) | Gao, 2003 (14) |

1.2.4 Metode določanja kinetike obarjanja

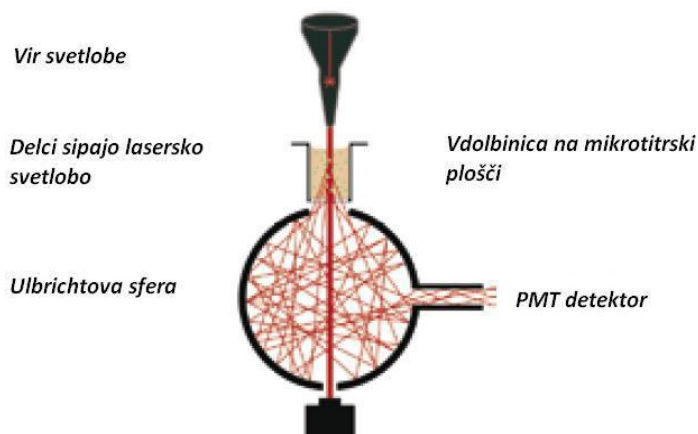
Za določitev topnosti so opisane različne metode, ki jih lahko delimo po različnih kriterijih:

- zmogljivost: tradicionalne oz. visokozmogljivostne metode;
- čas: kinetična (do 6 h) oz. termodinamska (24, 72 h) topnost;
- metoda: detekcija oborine oz. raztopljene učinkovine.

Metode visoke zmogljivosti pridobivajo na pomenu, saj niso uporabne le za določanje kinetične in ravnotežne topnosti, ampak tudi za *in vitro* določitev oborine iz parenteralnih raztopin in za hitro določanje inhibitorjev obarjanja. (12, 31-33) Metodo določanja potencialnih inhibitorjev obarjanja sestavljata vzpostavitev prenasičenega stanja, kjer lahko pride do nastanka oborine, in analitska metoda za določanje količine oborine oz. raztopljene učinkovine. Za vzpostavitev stanja prenasičenja so najpogosteje v uporabi metoda sotopila, raztapljanje amorfnе učinkovine (visokoenergijska oblika) in sprememba pH. Pri metodi sotopila učinkovino raztopimo v topilu, v katerem se učinkovina mnogo bolje raztaplja kot v vodni fazi. Majhen alikvot topila z visoko koncentracijo raztopljene učinkovine dispergiramo v vodno fazo in tako ustvarimo prenasičen sistem. Kot topilo lahko uporabimo DMSO, etanol, dimetilformamid, dimetilacetamid, propilen glikol ali 1,3-dioksolan. Za določanje obsega oborjene učinkovine se uporabljata dva načina: lahko določimo količino oborjene učinkovine, ali pa oborino s filtracijo odstranimo in določimo koncentracijo snovi v raztopini. (8, 14)

1.2.4.1 Določitev oborine

Za določitev obsega obarjanja se lahko uporabljata nefelometrična in turbidimetrična metoda. Pri nefelometrični metodi, pri kateri uporabimo nefelometer Nephelostar, laserski žarek z valovno dolžino 635 nm potuje skozi vdolbinico z vzorcem v Ulbrichtovo sfero, ki sipa svetlobo na detektor (Slika 3). Če v vzorcu ni prisotnih delcev, žarek potuje naravnost skozi sfero in ne pride do sipanja in detekcije. V primeru, da so v vzorcu prisotni delci, pride do sipanja svetlobe, odboja v sferi, detekcije preko fotopomnoževalne cevi (PMT detektor) in merjenja odziva. Sipano svetlobo detektiramo pod različnimi koti do 80°, kar poveča občutljivost čitalca. Poleg tega lahko spreminjamo širino žarka, ojačitev signala in temperaturo inkubacije. Za meritev so na voljo različne mikrotitrne plošče s 96 oz. 384 vdolbinicami. (34)



Slika 3: Princip delovanja nefelometra. PMT detektor – fotopomnoževalna cev za detekcijo. (34)

S turbidimetrično metodo merimo povečanje absorbance, saj delci preprečijo, da bi svetloba dosegla detektor. Za merjenje uporabimo spektrofotometer in merimo pri valovni dolžini med 620 in 820 nm, kjer svetlobo absorbirajo le neraztopljeni delci. (8, 10)

1.2.4.2 Določitev raztopljenega dela učinkovine

Po obarjanju nasičeno raztopino filtriramo, koncentracijo raztopljene učinkovine v filtratu kvantificiramo npr. s spektrofotometrom oz. kromatografskimi tehnikami in topnost izračunamo iz umeritvene krivulje. (10)

1.2.4.3 Primerjava metod

Turbidimetrična oz. nefelometrična metoda se od klasične metode razlikujeta v merjenju topnosti posredno skozi delce oz. preko sipanja svetlobe delcev. Tako vsak dejavnik, ki povzroči motnost, interferira – pri turbidimetričnem določanju topnosti lahko obarvane snovi napačno določimo kot netopne, pri nefelometriji pa lahko nepravilnosti, kot so praska na vdolbinici plošče ali kakršenkoli tujek v vdolbinici, sipajo svetlobo in povzročijo lažno pozitiven signal. Omejitev teh metod je pomanjkanje specifičnosti za preiskovano snov. To bi lahko izboljšali z uporabo HPLC-UV ali LC/MS, s čimer bi zagotovili še separacijo snovi, a bi v tem primeru zaradi dodatnega koraka meritev trajala dalj časa. (10) Pri metodi določanja raztopljenega dela, kjer ni separacije, učinkovine ne moremo ločiti med različnimi kromofori, katerih absorpcija se prekriva. Lažno pozitivne rezultate povzroči vsaka nečistota ali pa pomožna snov, ki absorbira svetlobo določene valovne dolžine, ki jo preiskujemo. Slaba stran klasičnega pristopa je tudi morebitna adsorpcija učinkovine na filter ploščo, kar lahko vodi do sistemske napake, poleg tega pa že sama

filtracija v primerjavi s turbidimetrično oz. nefelometrično metodo, kjer odstranjevanje oborine ni potrebno, upočasni postopek. Zamuda pri vzorčenju in pripravljalni čas, ki je potreben pri uporabi metode, sta vzrok, da je lahko možna le relativno nizka časovna ločljivost – npr. meritev v časovnih točkah 5, 30, 60, 120 min, in tako lahko izgubimo pomembne podrobnosti procesa obarjanja. (10, 12, 14)

Hoelke in drugi so primerjali nefelometrično, spektrofotometrično in HPLC metodo tako, da so določali topnosti različnih učinkovin v pufrskem mediju (HEPES). Ugotovili so, da je nefelometrična metoda primerna za določitev topnosti, ki so večje od 20 μM ; pri nižjih vrednostih je bila koncentracija suspendirane učinkovine v posamezni vdolbinici vzdolž vrstice redčenja tako nizka, da količina oborine ni povzročila sipanja svetlobe z intenziteto, ki bi bila večja od signala ozadja. Pri spektrofotometrični metodi je bila limita detekcije 0,5 μM , kot najbolj občutljiva pa se je izkazala HPLC, s katero lahko določamo topnost, večjo od 0,008 μM . Ob primerjavi hitrosti, stroškov in vzdrževanja je bila nefelometrična metoda superiorna. (12)

1.2.4.4 Vpliv DMSO

DMSO lahko vpliva kot sotopilo, tako da spremeni dielektrično konstanto raztopine in pomaga pri solvataciji bolj lipofilnih snovi. Koncentracija mora biti minimalna ($\leq 1\%$), da zmanjšamo potencialni vpliv DMSO kot sotopila in dosežemo boljšo korelacijo kinetične metode s termodinamsko. Vplivu različnih koncentracij se izognemo s predhodnim redčenjem vzorca v DMSO, preden ga dodamo v vodni medij. Poleg tega moramo biti previdni pri shranjevanju, saj v ciklih zamrzovanja in taljenja vzorca, raztopljenega v DMSO, lahko pride do vezave vode. (7)

Pri raziskovanju vpliva DMSO kot sotopila pri določanju topnosti učinkovine so ugotovili, da je količina raztopljene učinkovine značilno večja, če je (v/v) delež DMSO večji ali enak 5 %. (35) V metodi, ki jo je razvil Yamashita, koncentracija DMSO 2 % (v/v) ni vplivala na obarjanje slabo vodotopnega itrakonazola. (36)

Ključnega pomena sta izbira volumna testnega medija in apliciran odmerek, tako da popolnoma raztopljen odmerek presega topnost učinkovine v testnem mediju. Uporaba »non-sink« pogojev pri testiranjih prenasičenega raztapljanja je glavna razlika od konvencionalnih testov raztapljanja, ki jih izvajamo pod sink pogoji in so osredotočeni na kinetiko raztapljanja. (35)

2 NAMEN DELA

Priprava in analiza številnih kombinacij slabo topnih učinkovin in inhibitorjev obarjanja z uporabo klasičnih laboratorijskih pristopov je zamudna in materialno potratna. Alternativni pristop predstavljajo tehnike visoke zmogljivosti, katerih značilnosti so hitro merjenje, majhna poraba snovi in nizki stroški.

Namen diplomske naloge:

- ovrednotenje ustreznosti nefelometrične in turbidimetrične metode za identificiranje potencialnih inhibitorjev obarjanja;
- vzpostavitev korelacije omenjenih metod s klasičnim pristopom določitve učinkovitosti inhibitorjev obarjanja;
- primer uporabnosti – vpliv pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja modelnih učinkovin, fenofibrata in dipiridamola.

Prvi korak bo predstavljala nefelometrična določitev kinetične topnosti izbranih učinkovin razreda BCS II – fenofibrata in dipiridamola v raztopinah z različnimi pH vrednostmi, z namenom potrditi njuno slabo topnost. V nadaljevanju bomo najprej določili ozadje pomožnih snovi in s spreminjanjem parametrov (širina žarka, ojačitev signala, temperatura) izbrali najbolj optimalne pogoje merjenja z nefelometrično in turbidimetrično metodo. Nato bomo pri teh pogojih pričeli z merjenjem kinetike obarjanja. Eksperimenti bodo potekali v mikrotitrskih ploščah, kar nam omogoča preučevanje vpliva velikega števila pomožnih snovi. Kinetiko obarjanja dipiridamola bomo določili tudi spektrofotometrično, kar predstavlja klasičen pristop merjenja vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja. Rezultate, pridobljene z različnimi metodami, bomo primerjali med sabo, določili pomožne snovi, ki inhibirajo obarjanje učinkovin in preučili korelacijo nefelometrične in turbidimetrične metode s klasičnim nizko zmogljivim pristopom.

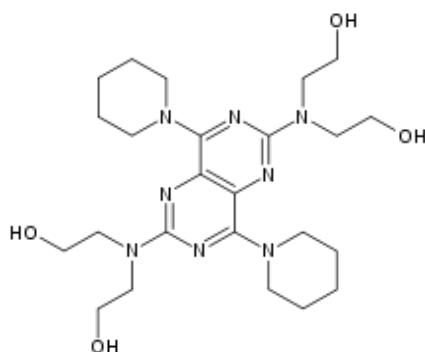
3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Zdravilne učinkovine

Dipiridamol (Merck, Nemčija)

Dipiridamol (Slika 4) se uporablja kot antiagregacijska učinkovina, ponavadi v kombinaciji z acetilsalicilno kislino ali kumarinskimi derivati. Zavira privzem adenozina v eritrocite, trombocite in endotelijske celice; tako lokalno povečana koncentracija adenozina deluje na trombocitni receptor A_2 in s tem spodbuja trombocitno adenilat-ciklazo, da se poveča količina trombocitnega cAMP. Povečana koncentracija cAMP posredno poveča vezavo Ca^{2+} na celične organele in zmanjša od Ca^{2+} odvisno sproščanje mediatorjev iz trombocitov. Poleg tega adenzin deluje vazodilatatorno. (37)



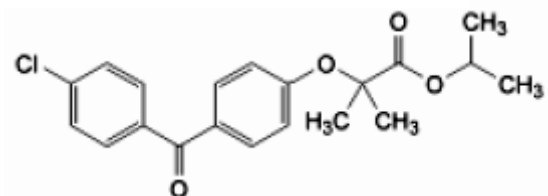
Slika 4: Dipiridamol (2,2',2'',2'''-[(4,8-dipiperidinopirimido[5,4-d] pirimidine-2,6-diil) dinitrilo]tetraetanol)

Molska masa dipiridamola je 504,626 g/mol, logP je 2,74. Je šibka baza s pKa 6,40, kar pomeni, da je topnost v vodi močno odvisna od pH – v kislem okolju je v protonirani obliki in dobro topen, pri pH, višjim od pKa, pa se topnost manjša. Topnost pri 37 °C v 0,1 N HCl je 53 mg/mL, v fosfatnem pufru s pH 6,8 pa znaša 6 µg/mL. Tako se dipiridamol dobro raztaplja v želodcu, a slabo v črevesju. Spada v razred BCS II. (38-40)

Fenofibrat (Sigma Aldrich, Belgija)

Fenofibrat (Slika 5) se uporablja za zdravljenje hiperholesterolemij in hipertrigliceridemij. Fenofibrat je predzdravilo, s hidrolizo estra nastane fenofibrojska kislina, ki je aktivna oblika. Kot agonist se veže na PPAR α receptorje in tako poveča aktivnost LPL, poveča

katabolizem VLDL, morda poveča sintezo HDL, poleg tega zavira sintezo maščobnih kislin, stimulira beta oksidacijo maščobnih kislin in inhibira sintezo trigliceridov. Fenofibrat zmanjša skupni holesterol, LDL, apolipoprotein B, skupne trigliceride in s trigliceridi bogate lipoproteine. (41-43)



Slika 5: Fenofibrat (propan-2-il 2-{4-[(4-klorofenil)karbonil]fenoksi}-2-metilpropanoat))

Gre za ester fibrične kisline, ki ima molsko maso 360,831 g/mol, temperaturo tališča 79-82 °C in je močno lipofilna molekula z logP 5,24. Topnost v vodi pri 37 °C znaša 0,3 µg/mL, spada v razred BCS II. (42-44)

3.1.2 Pomožne snovi

Uporabljene pomožne snovi so prikazane v Preglednici IV, podroben opis pa sledi v nadaljevanju.

Preglednica IV: Uporabljene pomožne snovi.

| Skupina | Lastniško ime | Nelastniško ime |
|--------------------------------------|-----------------------------|---|
| <i>Polimeri</i> | | |
| celulozni polimer | Pharmacoat [®] 603 | hidroksipropilmetilceluloza |
| celulozni polimer | Pharmacoat [®] 606 | hidroksipropilmetilceluloza |
| celulozni polimer | Klucel [®] EF | hidroksipropilceluloza |
| polivinil pirolidon polimer | Kollidon [®] K17 | polivinil pirolidon K17 |
| polivinil pirolidon polimer | Kollidon [®] K25 | polivinil pirolidon K25 |
| polivinil pirolidon polimer | Kollidon [®] K30 | polivinil pirolidon K30 |
| kopolimer | Kollidon [®] VA 64 | kopovidon |
| <i>Površinsko aktivna snov (PAS)</i> | | |
| neionska PAS | Tween [®] 20 | polisorbata 20 |
| neionska PAS | Tween [®] 80 | polisorbata 80 |
| neionska PAS | Cremophor [®] EL | polioksietilirano ricinovo olje |
| neionska PAS | Cremophor [®] RH40 | polioksil 40 hidrogenirano ricinovo olje |
| neionska PAS | Lutrol [®] F68 | poloksamer 188 |
| neionska PAS | Lutrol [®] F127 | poloksamer 407 |
| neionska PAS | Labrasol [®] | makrogol 8 glicerol kaprilat kaprinat |
| ionska PAS | Texapon [®] K12 | natrijev lavrilsulfat |
| <i>Alkoholi</i> | | |
| polivinil alkohol | Elvanol [®] | polivinil alkohol |
| sladkorni alkohol | D-Manitol | manitol |
| polietilenglikol | PEG 400 | polietilenglikol 400 |
| polietilenglikol | PEG 4000 | polietilenglikol 4000 |
| polietilenglikol | PEG 6000 | polietilenglikol 6000 |
| alkohol | Propilenglikol | propilenglikol |
| polietilenglikol graftkopolimer | Kollicoat [®] IR | graftkopolimer polivinilalkohola in polietilenglikola |
| ciklodekstrin | α -ciklodekstrin | α -ciklodekstrin |

Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)

Hidroksipropilmetilceluloza (Pharmacoat[®] 603, Pharmacoat[®] 606, Harke, Nemčija) je celulozni polimer z delno O-metiliranimi in v manjši meri O-hidroksipropiliranimi hidroksilnimi skupinami. Uporablja se kot hidrofilno ogrodje za prirejeno sproščanje, polimer za filmsko oblaganje za utrditev jeder in kot tvorilec filma, stabilizator,

suspendirajoče sredstvo in tvorilec gelov v mazilih ter kremah za dermalno aplikacijo, vezivo v tabletah, za preprečevanje koalescence kapljic, agregacije delcev in nastanka sedimenta v emulzijah in suspenzijah, za izdelavo ovojnica trdih kapsul. Je rumenkasto bel ali sivkasto bel zrnat ali vlaknat, rahlo higroskopen prah, brez vonja in okusa. (45)

Hidroksipropilceluloza (HPC)

Hidroksipropilceluloza (Klucel[®] EF, Hercules Inc., Nemčija) je polisaharid iz linearno povezanih D-glukoz z delno O-hidroksipropiliranimi hidroksilnimi skupinami. Uporablja se kot polimer za filmske obloge in vezivo v tabletah, tvori ogrodje za podaljšano sproščanje iz tablet, zgoščevalo, pri mikrokapsuliranju, v transdermalnih obližih in farmacevtskih oblikah za oko, je osnovna sestavina hidrogelov, v kozmetičnih pripravkih pa se uporablja kot stabilizator. Je rahlo higroskopen, bel, rumenkasto bel ali sivkasto bel zrnat ali vlaknat prah brez vonja in okusa. (45)

Polivinil pirolidon (PVP)

Polivinil pirolidon je linearni polimer N-vinil-2-pirolidinona. Glede na število povezanih monomernih enot ima različne K-vrednosti, kar kaže na stopnjo polimerizacije in na viskoznost vodne raztopine; višja K-vrednost kaže na večjo viskoznost vodne raztopine.

PVP K17 (Kollidon[®] K17, BASF, Nemčija) je PVP s K vrednostjo 15,3-18,0 in relativno molekulsko maso 7000-11000. Uporablja se kot solubilizator, suspendirajoče sredstvo, zaviralec kristalizacije pri farmacevtskih oblikah za injiciranje, stabilizator parenteralnih suspenzij, omogoča vlaženje očesa pri farmacevtskih oblikah za oko. Je skoraj bel prah z rahlim, značilnim vonjem in brez okusa.

PVP K25 (Kollidon[®] K25, BASF, Nemčija) je PVP s K vrednostjo 22,5-27,0 in relativno molekulsko maso 28000-34000. Uporablja se kot vezivo v tabletah, kapsulah in zrcih za tabletiranje, solubilizator v farmacevtskih oblikah za per os in zunanjo uporabo, stabilizator peroralnih in dermalnih suspenzij, pri farmacevtskih oblikah za oko omogoča vlaženje očesa, pri sladkornem oblaganju zagotavlja homogenost obloge, je polimer za filmsko oblaganje. Je skoraj bel prah z dobrimi pretočnimi lastnostmi, z rahlim, značilnim vonjem in brez okusa.

PVP K30 (Kollidon[®] K30, BASF, Nemčija) je PVP s K vrednostjo 27,0-32,4 in relativno molekulsko maso 44000-54000. Uporablja se kot vezivo v tabletah, kapsulah in zrcih za

tabletiranje, solubilizator v farmacevtskih oblikah za per os in zunanjo uporabo, stabilizator peroralnih in dermalnih suspenzij, omogoča vlaženje očesa pri farmacevtskih oblikah za oko, pri sladkornem oblaganju zagotavlja homogenost obloge, je polimer za filmsko oblaganje. Je skoraj bel prah z dobrimi pretočnimi lastnostmi. (45)

Kopovidon

Kopovidon (Kollidon[®] VA 64, BASF, Nemčija) je kopolimer vinilpirolidona in vinilacetata v masnem razmerju 3:2. Uporablja se kot suho vezivo pri direktnem tabletiranju, vezivo pri vlažnem granuliranju in pri filmskih oblogah. Je bel ali rahlo rumenkast prah z dobrimi pretočnimi lastnostmi, z rahlim značilnim vonjem in brez okusa. (45)

Polisorbat

Polisorbat je zmes delnih estrov polioksietiliranega sorbitana z maščobnimi kislinami. Številka za imenom je odvisna od vrste acilnega dela (20-30 lavril, 40-50 palmitil, 60-70 stearil, 80-90 oleil), števila acilnih skupin in približnega števila oksietilenskih skupin.

Polisorbat 20 (Tween[®] 20, BASF, Nemčija) je zmes delnih estrov lavrinske kisline s približno dvajsetimi oksietilenskimi skupinami substituiranega sorbitana. Uporablja se kot emulgator, solubilizator. Je brezbarvna do rumeno rjava viskozna tekočina z rahlim, značilnim vonjem.

Polisorbat 80 (Tween[®] 80, BASF, Nemčija) je zmes delnih estrov oleinske kisline s približno dvajsetimi oksietilenskimi skupinami substituiranega sorbitana. Uporablja se kot emulgator, solubilizator. Je citronsko do jantarjevo rumena viskozna tekočina z rahlim, značilnim vonjem. (45)

Ricinovo olje, polioksietilirano

Ricinovo olje, polioksietilirano (Cremophor[®] EL, BASF, Nemčija), je ricinovo olje, v katerem prevladuje ricinoil glicerol, etoksiliran s 30-50 oksietilenskimi enotami, manjši delež predstavlja makrogol ricinoleat. Uporablja se kot emulgator, solubilizator in topilo. Je bistra, rumena viskozna tekočina ali poltrdna snov. (45)

Ricinovo olje, polioksil 40 hidrogenirano

Ricinovo olje, polioksil 40 hidrogenirano (Cremophor[®] RH40, BASF, Nemčija), je ricinovo olje, v katerem prevladuje trihidroksistearatni ester etoksiliranega glicerola (40-45 oksietilenskih enot v posamezni molekuli), manjši delež pa predstavlja makrogol trihidroksistearat in prosti glikoli. Uporablja se kot emulgator in solubilizator. Je bela do rumenkasta poltrdna snov z rahlim, značilnim vonjem in skoraj brez okusa. (45)

Poloksamer

Poloksamer je blokkopolimer polioksietilena in polioksipropilena. Ima hidrofobno polioksipropilensko jedro in dve hidrofilni polioksietilenski verigi, kar označimo s formulo POE(a)/POP(b)/POE(a). Številka XYZ pri posameznem poloksameru približno pomeni: XYx100=Mr(polipropilenskega dela), Zx10=masni delež (%) polioksietilena. Uporablja se kot emulgator, koemulgator, solubilizator, supozitориjska podlaga, za izdelavo krem, mazil in gelov, vezivo, polimer za obloge tablet, drsilo pri tabletiranju, močljivec, stabilizator za emulzije, suspenzije in nanodelce.

Poloksamer 188 (Lutrol[®] F68, BASF, Nemčija) je poloksamer s približno strukturo POE(80)/POP(27)/POE(80) in relativno molekulsko maso 7680-9510. Uporablja se kot emulgator. Je bel ali skoraj bel voskast prah ali kosmiči.

Poloksamer 407 (Lutrol[®] F127, BASF, Nemčija) je poloksamer s približno strukturo POE(101)/POP(56)/POE(101) in relativno molekulsko maso 9840-14600. Uporablja se kot emulgator. Je bel ali skoraj bel voskast prah ali kosmiči. (45)

Labrasol[®]

Makrogol 8 glicerol kaprilat kaprinat (Labrasol[®], Gattefosse, Francija) je makrogolglicerol kaprilat kaprinat s povprečno molekulsko maso polioksietilenskega dela 400. Uporablja se kot emulgator, npr. v mikroemulzijah, in kot solubilizator. Je bledorumena viskozna tekočina. (45)

Natrijev lavrilsulfat (SDS)

Natrijev lavrilsulfat (Texapon[®] K12, Cognis, ZDA) je zmes natrijevih alkilsulfatov, med katerimi prevladuje natrijev lavrilsulfat. Uporablja se kot emulgator O/V, anionska površinsko aktivna snov, sredstvo za močenje, drsilo pri tabletah in kapsulah. So beli ali

kremno beli kristali, kosmiči ali prah z rahlim vonjem po maščobah, milnatim, grenkim okusom in gladkim otipom. (45)

Polivinilalkohol (PVA)

Polivinilalkohol (Elvanol[®], DuPont[™], Belgija) je homopolimer etenola, s stopnjo polimerizacije med 500 in 5000. Uporablja se kot stabilizator emulzij, suspenzij in nanodelcev, zgoščevalo v farmacevtskih oblikah za oko, drsilo, vezivo, tvorilec filma, v dražirnih prevlekah kot vezivo, za povečanje lepljivosti prahov prvih plasti in v transdermalnih obližih. Je bel do rumenkastobel prah ali zrnca brez vonja. (45)

Manitol

Manitol (Sigma Aldrich, Nemčija) je sladilo, v katerem prevladuje D-manitol, prisoten pa je tudi majhen delež sorbitola. Uporablja se kot polnilo za tablete in kapsule, spojina za izotoniziranje, vehikel, sredstvo proti sprijemanju in za direktno tabletiranje ter granuliranje. Je bel ali skoraj bel kristaliničen prah ali zrnca s sladkim okusom. (45)

Polietilenglikol (PEG)

Polietilenglikol je homopolimer iz oksietilenskih enot. Številka v imenu podaja povprečno molekulsko maso spojine. Če ima relativno molekulsko maso 200-400, gre za brezbarvno viskozno tekočino, če je 400-1000, je bela poltrdna snov, če pa je 1000-6000, pa gre za trdno snov brez vonja. Uporablja se kot podlaga za kreme in mazila, supozitориjska podlaga, emulgator, solubilizator, vezivo, mazivo pri tabletiranju, drsilo v tabletah in kapsulah, plastifikator pri filmskih oblogah, za oblikovanje farmacevtskih oblik z nadzorovanim sproščanjem ter v kremah in mlečnih losjonih.

PEG 400 (Sigma Aldrich, Belgija) je PEG s povprečno relativno molekulsko maso 380-420. Uporablja se kot mazivo, vlažilo, topilo, plastifikator, vezivo, vehikel in supozitориjska podlaga. Je bistra, viskozna, brezbarvna ali skoraj brezbarvna higroskopska tekočina z rahlim, značilnim vonjem in grenkim, rahlo žgočim okusom.

PEG 4000 (Sigma Aldrich, Belgija) je PEG s povprečno relativno molekulsko maso 3500-4500. Uporablja se v dražirnih prevlekah kot mehčalo, za glajenje in skrajševanje časa dražiranja. Je bela ali skoraj bela trdna snov z voskastim ali parafinskim videzom in temperaturo tališča 50-58 °C.

PEG 6000 (Sigma Aldrich, Belgija) je PEG s povprečno relativno molekulsko maso 5000-7000. Uporablja se v dražirnih prevlekah kot mehčalo, za glajenje in skrajševanje časa dražiranja. Je bela ali skoraj bela trdna snov z voskastim ali parafinskim videzom. (45, 46)

Propilenglikol

Propilenglikol (Sigma Aldrich, Belgija) je 1,2-propandiol. Uporablja se kot topilo, vlažilo, vehikel, plastifikator za filmske obloge, stabilizator emulzij, sotopilo, pri topikalni uporabi pa ima protimikrobno in protiglivično delovanje. Je bistra, brezbarvna, higroskopna, viskozna tekočina. (45)

Kollicoat[®] IR

Kollicoat[®] IR (BASF, Nemčija) je grafitkopolimer polivinilalkohola in polietilenglikola. Uporablja se za oblaganje tablet s takojšnjim sproščanjem. Je sipek belo do rahlo rumen prah. (47)

α -ciklodekstrin

Ciklodekstrin je ciklični oligosaharid amfifilne narave s hidrofilno zunanostjo in bolj lipofilno notranostjo. Uporablja se za povečanje topnosti, stabilnosti in biološke uporabnosti vključenih molekul, za nadzorovano sproščanje, zaščito hlapnih spojin, prekrivanje vonja, okusa in barve spojin, omogoča pretvorbo tekočin in olj v dobro pretočne praške, zmanjšuje hemolizo in možnost pojava inkompatibilnosti v večkomponentnih izdelkih. α -ciklodekstrin (Merck, Nemčija) je sestavljen iz 6 D-glukopiranoznih enot, povezanih z 1,4- α vezjo. Je bel ali skoraj bel, amorfen ali kristaliničen, nehigroskopen prah, skoraj brez vonja in z rahlo sladkim okusom. (45)

3.1.3 Medij za raztapljanje

Medij za raztapljanje pomožnih snovi smo pripravili iz raztopin 21,1 g/L citronske kisline monohidrata (0,1 M) in 35,6 g/L dinatrijevega hidrogenfosfata dihidrata (0,2 M). Razmerje teh dveh raztopin v sestavi medija smo določili z uravnavanjem na ustrezno pH vrednost.

3.1.4 Aparature in programska oprema

Aparature

- Analitska tehtnica, Mettler Toledo, ZDA
- Avtomatska multikanalna pipeta, Eppendorf, Nemčija

- Avtomatski pipetor Freedom Evo™ 150, Tecan, Švica
- Termostatirana komora, ThermoScientific, ZDA
- Multidrop Combi™ za dodatek reagentov, ThermoScientific, ZDA
- Nefelometer Nephelostar, BMG Labtech, Nemčija
- pH meter, Mettler Toledo, ZDA
- Precizna tehtnica, Mettler Toledo, ZDA
- Spektrofotometer Infinite M1000, Tecan, Švica

Programska oprema

- Data Analysis Software, MARS, 2.0, BMG Labtech, Nemčija
- GraphPad Prism, 6.01, GraphPad Software, ZDA
- Magellan, 7.0, Tecan, Švica
- Microsoft Excel 2007, Microsoft, ZDA
- Nephelostar Galaxy, 4.32, BMG Labtech, Nemčija

3.2 Metode

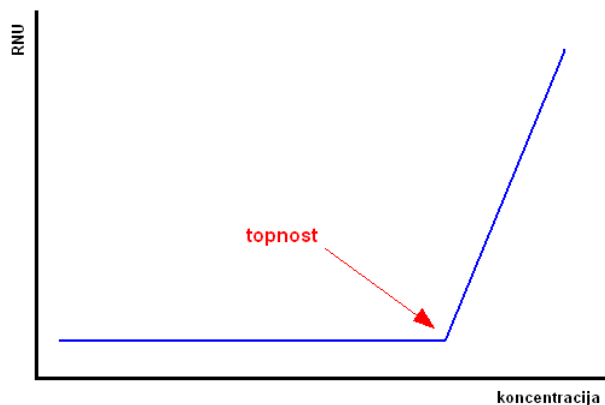
3.2.1 Nefelometrično določanje topnosti učinkovin pri različni pH vrednostih

Za določitev topnosti smo uporabili nefelometer Nephelostar s polarizirano helij-neonsko lasersko svetlobo z valovno dolžino 632,8 nm. Na plošči za redčenje smo vzdolž vrstice za faktor 2 razredčili 50 mM raztopino fenofibrata oz. dipiridamola v DMSO. Nato smo na mikrotitrsko ploščo prenesli 2,5 μ L vzorca iz plošče za redčenje in z avtomatskim pipetorjem Freedom Evo smo v vsako vdolbinico odpipetirali 247,5 μ L medija z različnimi pH vrednosti (1.8, 3.0, 5.5, 6.2, 6.8, 7.4) (Slika 6).

| | SS | SS/2 | SS/4 | SS/8 | SS/16 | SS/32 | SS/64 | SS/128 | SS/256 | SS/512 | SS/1024 | DMSO |
|---|----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | D11 | B |
| B | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | D11 | B |
| C | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | D11 | B |
| D | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | D11 | B |
| E | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | E11 | B |
| F | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | E11 | B |
| G | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | E11 | B |
| H | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | E11 | B |

Slika 6: Primer razporeditve vzorcev na mikrotitrski plošči pri določanju topnosti učinkovin - dipiridamola (D) in fenofibrata (E) v določenem mediju. Vzdolž vrstice smo redčili osnovno raztopino (SS) z DMSO za faktor 2, v zadnji koloni je DMSO (B).

Plošče smo pokrili s folijo in jih 2 h inkubirali v termostahirani komori pri 27 °C. Nato smo izmerili odzive na nefelometru, pri ojačitvi signala 60, širini žarka 2,5 mm, času merjenja 0,1 s/vdolbinico in zamiku meritve 0,3 s. Po merjenju smo plošče pri 27 °C inkubirali dodatnih 22 h in z nefelometrom ponovno izmerili odzive. S programom MARS, 2.0 smo na podlagi dvosegmentne linearne regresije določili presečišče dveh premic, ki odraža topnost učinkovine pri uporabljenih pogojih merjenja (Slika 7).



Slika 7: Shema določanja topnosti učinkovine z dvosegmentno linearno regresijo v programu MARS, 2.0. RNU – relativna nefelometrična enota – odziv, izmerjen na nefelometru.

3.2.2 Kinetika obarjanja

3.2.2.1 Priprava inkubacijske plošče

Za določanje inhibicije obarjanja učinkovin smo uporabili 23 pomožnih snovi (Preglednica IV), ki smo jih raztopili v pufru s pH 6,8 in tako simulirali pH intestinalnih tekočin. Uporaba biorelevantnega medija, kot npr. FeSSIF ali FeSSIF, bi zaradi motnosti povzročila visok odziv ozadja, kar bi pomenilo zmanjšano občutljivost nefelometra oz. spektrofotometra in posledično neustreznost metode. Vse medije, razen osnovnih raztopin učinkovine v DMSO, smo dodali z avtomatskim pipetorjem Freedom EVO™, ki je opremljen z robotsko roko (RoMa) in osmimi teflonskimi pipetami (LiHa). Pomožne snovi (Preglednica IV) smo raztopili v pufru s pH 6,8 na koncentracijo 0,1 % (m/V) in nato s prenosom preko LiHa v vsako vdolbinico plošče (Costar 3635, Corning ali Cliniplate, Fisher Scientific) prenesli 247,5 μ L raztopine pomožne snovi. Plošče smo izbrali glede na predhodne izkušnje v laboratoriju, saj smo v tem primeru izmerili najmanjša ozadja in najmanjše standardne deviacije med posameznimi vdolbinicami. V vdolbinice z raztopinami pomožnih snovi smo nato z MultidropCombi™ hitro dodali 2,5 μ L DMSO. Ploščo smo pred merjenjem stresali približno 5 sekund, da smo zagotovili mešanje raztopine in odsotnost mehurčkov, za tem pa smo jo vstavili v nefelometer oz. spektrofotometer, da bi ugotovili, če signal ozadja pomožne snovi lahko interferira z meritvijo vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja. Tekom merjenja plošče nismo stresali, saj sta obe aparaturi omogočali mešanje le na koncu vsakga cikla, kar pa ne bi

zagotavljalo enotnih eksperimentalnih pogojev v vsaki vdolbinici mikrotitrne plošče. Točnost in natančnost korakov dodajanja raztopin in njihova uporaba pri rešetanju sta bili že opisane v predhodni študiji. (35)

3.2.2.2 Optimizacija instrumentalnih in eksperimentalnih pogojev

Za merjenje smo uporabili nefelometer Nephelostar in spektrofotometer. Tekom optimizacije parametrov pri nefelometru smo spreminjali širino žarka (1,5; 2,5; 3,5 mm) in ojačitev signala (50, 60, 70), da bi ugotovili optimalno vrednost parametra, ki bi jo uporabili za merjenje. Nespremenljivi pogoji merjenja so bili število ciklov (120), čas merjenja na vdolbinico (0,1 s) in zamik meritve (0,3 s). Optimizacija nastavitve nefelometra je potekala pri koncentraciji pomožnih snovi 0,1 % (m/V) v pufru s pH 6,8. Preučevali smo vpliv temperature (26 in 37 °C), da bi določili optimalno razmerje odziva pomožne snovi glede na pufer S_{PI}/S_B . Pri turbidimetrični metodi smo uporabili spektrofotometer, merili pri 600 nm, saj pri tej valovni dolžini svetlobo absorbirajo le neraztopljeni delci, in tudi v tem primeru določali vpliv temperature na S_{PI}/S_B .

3.2.2.3 Metoda I: Določanje vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja fenofibrata in dipiridamola z nefelometrično metodo

Priprava plošče je potekala na enak način, kot je opisano v poglavju 3.2.2.1, le da smo k 247,5 μL 0,1 % (m/V) raztopini pomožne snovi namesto DMSO dodali raztopino 2,5 μL fenofibrata (80 mg/mL) oz. dipiridamola (30 mg/mL) v DMSO. Meritev smo izvajali pri optimalnih eksperimentalnih in instrumentalnih pogojih (Preglednica VIII) pri temperaturah 26 in 37 °C. Primer nefelometričnega merjenja kinetike obarjanja je prikazan na Sliki 10.

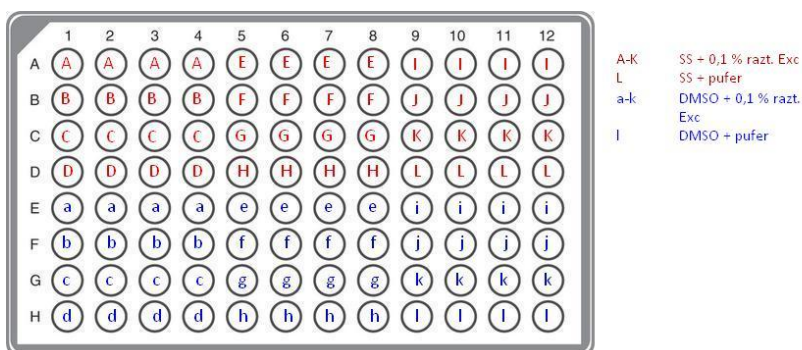
Koncentraciji učinkovin smo izračunali iz odmerkov registriranih zdravil in volumna (Preglednica V) in tako predvidevali situacijo, ki jo pričakujemo *in vivo*; predpostavili smo, da odmerek apliciramo s kozarcem tekočine (250 mL). Izračunana koncentracija predstavlja koncentracijo v vdolbinici, ki pa je 100x manjša od koncentracije učinkovine v DMSO (redčenje v vdolbinici: 2,5 $\mu\text{L}/250 \mu\text{L}$).

Preglednica V: Izračun koncentracij učinkovin v DMSO.

| | Dipiridamol | Fenofibrat |
|---|---------------------------------|-------------------------------|
| lastniško ime zdravila, odmerek | Persantine [®] , 75 mg | Lofibra [®] , 200 mg |
| koncentracija v 250 mL (mg/L) = koncentracija v vdolbinici | 0,3 mg/mL | 0,8 mg/mL |
| koncentracija v DMSO | 30 mg/mL | 80 mg/mL |

3.2.2.4 Metoda II: Določanje vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja fenofibrata in dipiridamola s turbidimetrično metodo

Za določanje vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja s turbidimetrično metodo smo uporabili mikrotitrsko ploščo (Costar 3635, Corning[®]) in spektrofotometer Infinite M1000. Priprava raztopin 22 pomožnih snovi je potekala na enak način kot je opisano v poglavju 3.2.2.1, koncentracija učinkovin v DMSO je bila enaka kot v poglavju 3.2.2.3 (Slika 8). Ploščo smo stresali 5 sekund, da smo zagotovili mešanje raztopin in odsotnost mehurčkov, nato pa smo začeli z merjenjem absorbanc pri 600 nm. Pri tej valovni dolžini povsem raztopljene učinkovine in pomožne snovi niso povzročile značilno večjega odziva, tako da je bila prisotnost neraztopljenih delcev edini prispevek k izmerjenemu odzivu. Merjenje je potekalo pri temperaturah 26 in 37 °C. Primer turbidimetričnega merjenja kinetike obarjanja je prikazan na Sliki 11.



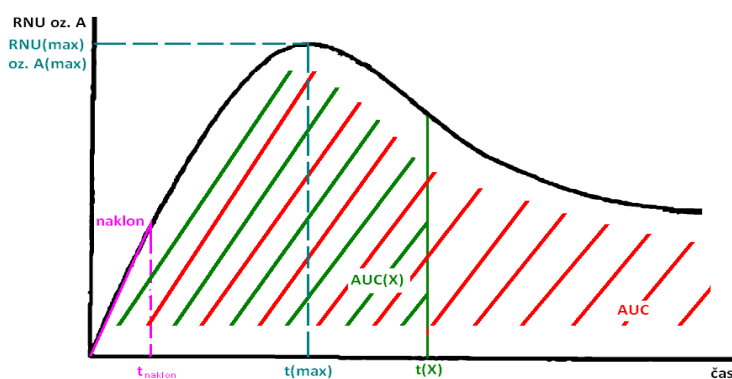
Slika 8: Primer mikrotitrsko plošče pri določanju vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja učinkovin. SS – učinkovina v DMSO, Exc – pomožna snov.

3.2.2.5 Metoda III: Določanje vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja dipiridamola s spektrofotometrično metodo

Dipiridamol smo raztopili v DMSO (30 mg/mL), pomožne snovi (Tween[®] 20, Tween[®] 80, Cremophor[®] EL, PEG 6000, Pharmacoat[®] 603, Kollidon[®] K25, Kollidon[®] K30) pa smo raztopili na koncentracijo 0,1 % (m/V) v pufru s pH 6,8. Izbrane pomožne snovi so obsegale različne vplive na obarjanje učinkovine - majhen, srednji in pomemben inhibicijski vpliv na obarjanje dipiridamola, kot smo določili z Metodo I in Metodo II. Raztopino pomožnih snovi smo z avtomatskim pipetorjem Freedom Evo odpipetirali na mikrotitrsko ploščo, z Multidrop Combi dodali raztopino dipiridamola v DMSO in inkubirali 2 uri pri 37 °C, 5 Hz. Vzorčili smo v posameznih časovnih točkah (4, 8, 12, 16, 30, 90 in 120 min). Vzorce smo z uporabo vakuumske črpalke (Millipore AG) filtrirali skozi filter ploščo (MultiScreen_{HTS} GV, 0.22 µm, MSGVN2250, Merck Millipore) in izmerili absorbance pri 290 nm na spektrofotometru Infinite M1000.

3.2.2.6 Analiza in obdelava podatkov

Pri optimiziranju parametrov smo izračunali S_{PI}/S_B kot razmerje odziva, ki ga določimo v raztopini s pomožno snovjo, z odzivom, določenim v raztopini brez pomožne snovi. Predpostavili smo, da vrednost S_{PI}/S_B , nižja od 1,8, pomeni, da pomožna snov ne moti meritve določanja pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja. Grafični prikaz in opis izračunanih parametrov inhibicije obarjanja so prikazani na Sliki 9 in Preglednici VI. Preiskovani parametri nefelometrične in turbidimetrične metode so prikazani kot preglednica s pogojnim oblikovanjem.



Slika 9: Shema parametrov, določenih nefelometrično – RNU (odziv, izmerjen na nefelometru) v odvisnosti od časa oz. turbidimetrično – A (absorbanca) v odvisnosti od časa. Pomen parametrov je opisan v Preglednici VI.

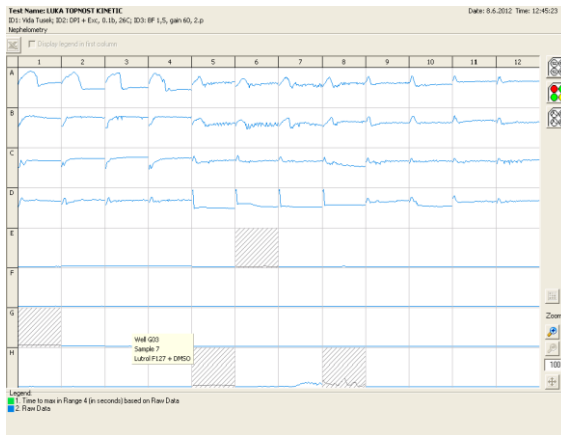
Preglednica VI: Razlaga izračunanih parametrov (PIO) za ovrednotenje vpliva na inhibicijo obarjanja, določeni z nefelometrično (MARS, 2.0) in turbidimetrično (Magellan™, 7.0) metodo.

| parameter | pomen | opis |
|--|--|---|
| AUC _{xx} | Površina pod krivuljo »Odziv nefelometra oz. spektrofotometra v odvisnosti od časa« v določenem časovnem intervalu (xx [min]). | Količina oborine, ki se obori iz prenasočene raztopine v določenem časovnem intervalu (xx [min]). |
| RNU _{max} , A _{max} | Maksimalni odziv oz. vrh krivulje; RNU – nefelometrična metoda, A - turbidimetrična metoda. | Maksimalna izmerjena količina oborine v raztopini v določeni časovni točki. |
| t _{max} (min) | Čas do maksimalnega odziva. | Čas, ki preteče do maksimalne izmerjene količine oborine. |
| k (min ⁻¹) | Naklon v določenem časovnem intervalu. | Merjenje hitrosti obarjanja. |

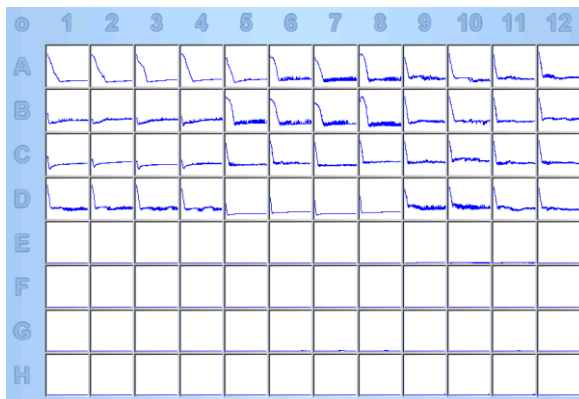
Pri določanju vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja pa smo predpostavili, da je bil inhibitor obarjanja učinkovit, ko smo določili vsaj 1,3x manjšo vrednost parametra (PIO) glede na kontrolno skupino (pufer, pH 6,8), medtem ko je bil inhibitor obarjanja neučinkovit, ko je bila vrednost PIO večja. Podatki merjenja inhibicije obarjanja, ki temelji na izračunu koncentracije učinkovine iz umeritvene krivulje, so bili že analizirani. (35) Metoda in rezultati določanja inhibicije obarjanja fenofibrata iz prenasočene raztopine so bili že predhodno objavljeni in smo jih uporabili za preučevanje korelacije. (35)

Za preiskovanje korelacije smo uporabili indeks inhibicije obarjanja (PI_{stand}), ki predstavlja razmerje med koncentracijo učinkovine v prisotnosti potencialnega inhibitorja obarjanja in koncentracijo učinkovine brez njega. Pearsonov koeficient korelacije (r) med PI_{stand} in parametri nefelometrične oz. turbidimetrične metode smo izračunali z enostavno linearno regresijo. Uporabili smo enako časovno obdobje (90 min). Vrednost p<0,05 je bila značilna. Zaradi poenostavljanja podatkov so pri 26 °C izračunani parametri inhibicije obarjanja slabo korelirali s PI_{stand} (r<0,69), tako da smo jih izključili iz nadaljne obdelave.

Število lažno pozitivnih/negativnih rezultatov nefelometrične in turbidimetrične metode je določeno kot število pomožnih snovi, ki so bile določene kot učinkoviti/neučinkoviti inhibitorji obarjanja z omenjenima metodama, ne pa s klasičnim pristopom. Za statistično in regresijsko analizo smo uporabili programa GraphPad Prism, 6.01 in Microsoft Excel 2007.



Slika 10: Primer nefelometričnega merjenja kinetike obarjanja dipiridamola.



Slika 11: Primer turbidimetričnega merjenja kinetike obarjanja dipiridamola.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Določanje topnosti učinkovin pri različnih pH vrednostih

Kinetično topnost smo določali pri različnih pH vrednostih (Preglednica VII). Ugotovili smo, da je topnost fenofibrata od pH vrednosti neodvisna, medtem ko je dipiridamol, ki je šibko bazična učinkovina, mnogo bolje topen v kislem mediju. Dipiridamol se tako bolje raztaplja pri nižjem pH v želodcu, ob prehodu v tanko črevo, kjer se ob višjem pH topnost zmanjša, pa lahko pride do nastanka prenasičene raztopine in obarjanja učinkovine. Za nadaljnje raziskovanje smo uporabili medij s pH 6,8, da bi simulirali pH tankega črevesja.

Preglednica VII: Določanje topnosti učinkovin. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost, n=4.

| Topnost (mg/mL) | | | | |
|-----------------|------------|---------|-------------|---------|
| pH | Fenofibrat | | Dipiridamol | |
| | po 2 h | po 24 h | po 2 h | po 24 h |
| 1,8 | 0,009 | 0,036 | 0,505 | 0,505 |
| 3,0 | 0,009 | 0,026 | 0,505 | 0,505 |
| 5,5 | 0,008 | 0,037 | 0,227 | 0,150 |
| 6,2 | 0,007 | 0,036 | 0,099 | 0,090 |
| 6,8 | 0,008 | 0,032 | 0,052 | 0,044 |
| 7,4 | 0,008 | 0,038 | 0,043 | 0,049 |

4.2. Kinetika obarjanja

Določitev količine raztopljene učinkovine v prisotnosti inhibitorja obarjanja predstavlja standardno metodo za razvrščanje inhibitorjev obarjanja slabo topnih učinkovin. (35) Pri klasičnem pristopu lahko dolgotrajna priprava vzorca (npr. centrifugiranje, filtracija in redčenje z organskim topilom) prispeva k večji variabilnosti rezultatov, saj vsak dodaten korak predstavlja dodatno možnost napake. Poleg tega relativno dolg čas kromatografske metode prispeva k podaljšanemu času celotnega postopka. Npr. UPLC analiza za določitev količine fenofibrata s 23 pomožnimi snovmi v štirih časovnih točkah traja 20 ur, z retencijskim časom 3 minute, pri čemer v ta časovni okvir ni všteto kromatografsko procesiranje in vrednotenje rezultatov. Nasprotno pa nefelometrična in turbidimetrična metoda, kjer spremljamo *in situ* nastanek oborine, dajejo kontinuirano informacijo o kinetiki obarjanja. Klasično metodo, ki temelji na določitvi koncentracije, lahko v

nadaljevanju uporabimo za potrditev zadetkov, pridobljenih z nefelometrično oz. turbidimetrično metodo. Uporaba biorelevantnih medijev, kot sta npr. FaSSIF ali FeSSIF, pri turbidimetrični oz. nefelometrični metodi ni primerna, saj motnost raztopin lahko povzroči lažno pozitivne rezultate. Da lahko pridemo do ustreznih zaključkov iz podatkov, pridobljenih s turbidimetrijo oz. nefelometrijo, je potrebno ovrednotiti posamezne korake metode. V diplomski nalogi smo določili optimalne instrumentalne pogoje merjenja in določili korelacijo med izračunanimi parametri nefelometrične in turbidimetrične metode s parametrom klasičnega pristopa, PI_{stand} .

4.2.1 Optimizacija instrumentalnih in eksperimentalnih pogojev

Testirane pomožne snovi so pokazale različne odzive, ki so odvisni od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti in obnašanja v pufrski raztopini. Izbrali smo pogoje, kjer so vrednosti odziva različnih pomožnih snovi čim bolj podobne vrednostim pri pufru in tako predstavljajo čim manjše ozadje pri merjenju, hkrati pa ti pogoji zagotavljajo dovolj veliko občutljivost za zaznavo sprememb kinetike obarjanja učinkovine (Preglednica VIII). Za nadaljnja merjenja nismo uporabili pomožne snovi Labrasol[®], ki je tvoril mlečno raztopino in je pri merjenju ozadja dajal previsoke odzive.

Pri nefelometričnem merjenju smo pri optimizaciji širine žarka pri vrednosti 3,5 mm določili visoka razmerja S_{PI}/S_B (Preglednica IX) z visoko relativno standardno napako, ki je bila večja ali enaka 36 %. Vzrok za to je bil najverjetneje nastanek meniskusa kot posledica povečane viskoznosti in površinske napetosti zaradi prisotnosti površinsko aktivne snovi v pufru. (48, 49) Pri zožanju širine žarka na 2,5 mm je bil vpliv meniskusa manjši, medtem ko je bil skoraj povsem izločen pri zožitvi na 1,5 mm in tako smo to širino izbrali za nadaljnjo uporabo. Visoka razmerja S_{PI}/S_B pri nekaterih pomožnih snoveh opazimo tudi pri merjenju pri ojačitvi signala 70 (Preglednica IX). Zmanjšana ojačitev signala (50 oz. 60) je povzročila zmanjšanje signala ozadja in odzivi so bili bolj primerljivi odzivom pufra. Pri vrednosti razmerja $S_{PI}/S_B \leq 1,8$ je bila variabilnost signalov ozadja znotraj ponovitev (n=4) najmanjša in raztopine, kjer je razmerje > 2 , so se pri vizualni kontroli pokazale kot motne. Razmerje S_{PI}/S_B 1,8 je bilo še sprejemljivo za nadaljnje eksperimente in tako smo za optimalno ojačitev signala izbrali vrednost 60, saj je v tem primeru občutljivost nefelometra še vedno dovolj visoka.

Preglednica VIII: Optimalni eksperimentalni in instrumentalni pogoji, uporabljeni pri merjenju kinetike obarjanja.

| pogoj | opombe/opis |
|---|--|
| Medij: pufer, pH 6,8 | Medij izbora za prvo rešetanje inhibicije obarjanja je preprost vodni pufer. Zadetke, pridobljene s turbidimetrijo oz. nefelometrijo, lahko dodatno ovrednotimo s kvantifikacijo raztopljene učinkovine (kromatografija, UV spektrofotometrija) v biomimetičnem pufru. |
| Mikrotitrna plošča: prozorna mikrotitrna plošča s 96 vdolbinicami | Mikrotitrna plošča pri inkubaciji in analizi je ista, tako da je variabilnost rezultatov zaradi priprave vzorca in manipulacije minimizirana. Plošča mora imeti čist spodnji del, brez prahu in prask. Pred meritvijo mora biti plošča z vzorci vizualno pregledana, če kakšni inhibitorji obarjanja tvorijo mlečnate raztopine. Poleg tega moramo paziti na mehurčke, ki lahko ravno tako motijo meritev. |
| Koncentracija inhibitorja obarjanja: 0,1 % (m/V) | Pomožne snovi morajo biti raztopljene v vodnem mediju – pufru s pH 6,8. Vodna faza je 0,1 % raztopina pomožne snovi, kar predstavlja maksimalno koncentracijo, ki jo lahko pričakujemo v lumnu gastrointestinalnega trakta po disperziji peroralne farmacevtske oblike. |
| Širina žarka in ojačitev signala (nefelometer) | Pri ojačitvi signala 60 in širini žarka 1,5 mm je vpliv meniskusa zaradi prisotnosti različnih pomožnih snovi minimiziran in izračunano razmerje vrednosti S_{PI}/S_B najnižje. |
| Temperatura merjenja: 26 °C, 37 °C | Z merjenjem pri obeh temperaturah smo določili vpliv temperature na kinetiko obarjanja, z merjenjem pri 37 °C pa smo simulirali <i>in vivo</i> pogoje. |

Preglednica IX: Izbira optimalnih pogojev merjenja z nefelometrično oz. turbidimetrično metodo, 0,1 % (m/V) raztopina pomožne snovi. Rezultati so prikazani kot razmerje S_{PI}/S_B (razmerje med odzivom raztopine s pomožno snovjo in odzivom pufrja), $n=4$. Zelena barva prikazuje razmerje $<1,8$, rdeča pa razmerje >2 . BF – širina žarka, OS – ojačitev signala.

| Nespremenljivi pogoji Spremenljivi pogoji Vrednost | Nefelometrija | | | | | | | Turbidimetrija | |
|--|----------------|--------|--------|--------------------|-------|------------------|-------|----------------|-------|
| | OS 70, T 26 °C | | | BF 1.5 mm, T 26 °C | | BF 1.5 mm, OS 60 | | T(°C) | |
| | BF (mm) | | | Ojačitev signala | | T (°C) | | 26 °C | 37 °C |
| | 1,5 | 2,5 | 3,5 | 50 | 60 | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C |
| Manitol | 0,84 | 1,95 | 11,50 | 0,85 | 0,84 | 0,84 | 0,96 | 1,02 | 0,99 |
| Pharmacoat® 603 | 1,77 | 42,57 | 63,43 | 1,53 | 1,33 | 1,33 | 1,18 | 0,94 | 0,91 |
| Kollidon® K17 | 1,36 | 8,49 | 32,27 | 1,16 | 1,13 | 1,13 | 1,03 | 0,98 | 0,95 |
| Lutrol® F68 | 1,32 | 9,94 | 45,28 | 0,97 | 0,98 | 0,98 | 0,84 | 0,97 | 0,95 |
| Kollidon® K30 | 1,58 | 3,23 | 18,99 | 1,15 | 1,08 | 1,08 | 1,00 | 0,97 | 0,95 |
| Kollidon® K25 | 1,67 | 3,37 | 17,69 | 1,32 | 1,24 | 1,24 | 0,91 | 0,94 | 0,92 |
| Tween® 80 | 2,25 | 59,58 | 86,33 | 1,67 | 1,51 | 1,51 | 1,70 | 0,99 | 0,97 |
| Tween® 20 | 2,12 | 68,02 | 102,80 | 1,53 | 1,86 | 1,86 | 1,50 | 1,10 | 1,05 |
| Kollidon® VA64 | 1,50 | 12,80 | 48,53 | 1,19 | 1,21 | 1,21 | 1,18 | 0,96 | 0,95 |
| PEG 6000 | 1,05 | 1,13 | 7,04 | 0,98 | 0,96 | 0,96 | 0,93 | 1,04 | 1,03 |
| Cremophor® EL | 1,28 | 30,22 | 67,48 | 1,06 | 1,02 | 1,02 | 1,00 | 0,94 | 1,13 |
| Pharmacoat® 606 | 1,77 | 65,91 | 72,16 | 1,46 | 1,37 | 1,37 | 1,35 | 0,96 | 0,94 |
| Cremophor® RH40 | 1,85 | 23,31 | 61,86 | 1,29 | 1,45 | 1,45 | 1,23 | 0,95 | 0,93 |
| Lutrol® F127 | 1,58 | 54,67 | 103,32 | 1,65 | 1,68 | 1,68 | 1,37 | 0,94 | 0,92 |
| Kollidon® IR | 2,36 | 7,21 | 32,39 | 1,44 | 1,45 | 1,45 | 1,52 | 1,06 | 1,02 |
| Elvanol® | 1,48 | 1,70 | 13,36 | 1,05 | 1,06 | 1,06 | 0,97 | 0,94 | 0,91 |
| Klucel® EF | 1,84 | 30,43 | 65,58 | 1,35 | 1,40 | 1,40 | 62,03 | 0,94 | 1,28 |
| Propilenglikol | 0,96 | 2,50 | 14,78 | 1,43 | 1,00 | 1,00 | 1,01 | 0,95 | 0,95 |
| Texapon® K12 | 1,67 | 76,49 | 110,98 | 1,40 | 1,24 | 1,24 | 1,16 | 1,08 | 1,00 |
| PEG 400 | 1,42 | 11,92 | 32,71 | 1,23 | 1,15 | 1,15 | 1,22 | 1,00 | 0,98 |
| α -ciklodekstrin | 1,22 | 1,53 | 8,61 | 0,85 | 0,84 | 0,84 | 0,74 | 1,01 | 0,96 |
| Labrasol® | 148,27 | 164,19 | 133,26 | 61,18 | 46,24 | 46,24 | 36,91 | 1,57 | 1,72 |
| PEG 4000 | 1,21 | 3,49 | 14,28 | 0,93 | 0,94 | 0,94 | 0,95 | 1,08 | 1,08 |
| pufer | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

Za določanje vpliva temperature smo meritev ozadja izvedli pri temperaturah 26 in 37 °C. Povečano vrednost S_{PI}/S_B pri 37 °C smo opazili pri Labrasolu® in Klucelu® EF, medtem ko je bil pri 26 °C S_{PI}/S_B večji od 1,8 le pri Labrasolu® (Preglednica IX). Takšno temperaturno odvisno obnašanje pomožnih snovi v vodnih raztopinah je skladno s predhodnimi raziskavami. (50, 51) Poleg tega pa smo že ob vizualnem pregledu opazili, da so bile raztopine mlečnate barve, in predvidevali, da bodo signali višji. Motnost in posledično nižje signale transmitance smo opazili tudi pri turbidimetrični metodi, kar prispeva k razmerju vrednosti absorbance, večjemu od 1,8. Pomembno je, ne le da mikrotitrsko ploščo pregledamo vizualno, ampak da pred določanjem vpliva na inhibicijo obarjanja ozadje pomožnih snovi na plošči tudi izmerimo, saj šele potem lahko pravilno interpretiramo rezultate. V nasprotnem primeru bi morebitni opaženi zadetki lahko vodili do lažno pozitivnih potencialnih inhibitorjev obarjanja.

Pri turbidimetrični metodi odzive merimo s spektrofotometrom, ki nam ne omogoča spreminjanja tolikšnih instrumentalnih nastavitvev kot nefelometer. Tako smo v tem primeru preučevali le vpliv temperature in potrdili ugotovitve nefelometrične metode, s

katero smo določili povečano vrednost razmerja S_{PI}/S_B pri 37 °C pri Labrasolu[®] in Klucelu[®] EF, pri 26 °C pa le pri Labrasolu[®].

4.2.2 Določanje vpliva pomožnih snovi na inhibicijo obarjanja fenofibrata in dipiridamola z nefelometrično in turbidometrično metodo

Za merjenje vpliva pomožnih snovi smo izbrali dve slabo topni učinkovini, fenofibrat in dipiridamol. Pomožne snovi (Preglednica IV) smo raztopili v pufru s pH 6,8, s čimer smo simulirali intestinalni pH. »Non-sink« pogoje smo dosegli tako, da smo pufrskemu mediju dodali visoko koncentrirano raztopino učinkovine v organskem topilu (DMSO). Koncentracija DMSO v končni raztopini je bila 1 %, tako da je bil vpliv organskega topila kot sotopila na inhibicijo obarjanja minimalen. (7)

4.2.2.1 Metoda I: Nefelometrična metoda

Nefelometrično določanje vpliva pomožnih snovi na količino oborjene učinkovine je bilo že predmet predhodne raziskave, v kateri je merjenje potekalo pri pogojih, ki jih BMG LabTechnologies priporoča za določanje kinetične topnosti (širina žarka 2,5 mm, ojačitev signala 70) (14). V našem primeru smo pri teh pogojih določili visoka razmerja S_B/S_{PI} in visoke RSD (%), tako da smo za merjenje uporabili optimalne pogoje (Preglednica VIII).

Na podlagi parametrov inhibicije obarjanja (PIO) smo identificirali potencialne inhibitorje obarjanja modelnih učinkovin (Preglednica X, Preglednica XI). Inhibitor obarjanja je bil učinkovit, ko smo določili 1,3x nižjo vrednost PIO glede na kontrolno skupino (pufer, pH 6,8). Interpretacija učinkovitosti inhibitorjev je močno odvisna od parametra, ki smo ga uporabili za oceno obsega inhibicije obarjanja, in uporabljene temperature. Inhibicija obarjanja je pri določenih pomožnih snoveh temperaturno odvisna, zato je izbira fiziološko relevantne inkubacijske temperature (37 °C) toliko bolj pomembna. Tako je količina oborine fenofibrata v prisotnosti Cremophora[®] EL pri 26 °C značilno večja kot pa pri 37 °C, kar smo določili iz dvakrat nižjega AUC_{90} pri 37 °C (Preglednica X). Pri interpretaciji parametrov moramo biti pozorni, da ovrednotimo kombinacijo parametrov, saj zaključki na osnovi določenega parametra lahko kažejo na učinkovito inhibicijo obarjanja, medtem ko s preučevanjem drugega parametra lahko ugotovimo ravno nasprotno. Na primer Texapon[®] K12 učinkovito inhibira obarjanje dipiridamola, če pogledamo nizke AUC_{40} in AUC_{100} (Preglednica XI). Če pa bi upoštevali le visok RNU_{max} in kratek t_{max} , bi bil vpliv Texapona[®] K12 na inhibicijo obarjanja zanemarljiv. Najboljši način, da se izognemo

napačni interpretaciji parametrov, je preučevanje korelacije med nefelometrično oz. turbidimetrično in standardno metodo (PI_{stand}). Tako ugotovljamo, če parameter pravilno predvideva vpliv na inhibicijo obarjanja. Pri merjenju fenofibrata smo ugotovili zelo dobro korelacijo pri vseh parametrih, absolutna vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) je bila med $0,91 < r < 0,95$, medtem ko je bila le ta pri dipiridamolu nekoliko nižja (0,83 - 0,91) (Slika 12A). Najboljšo korelacijo s PI_{stand} smo določili za parameter AUC_{100} in sicer je absolutna vrednost Pearsonovega koeficienta za fenofibrat znašala 0,95, za dipiridamol pa 0,91. Najverjetneje je slabša korelacija pri dipiridamolu posledica manjše občutljivosti spektrofotometrične metode, ki smo jo uporabili za kvantifikacijo raztopljenega dipiridamola, poleg tega pa smo pri merjenju uporabili manjši nabor pomožnih snovi. (35, 52)

Preglednica X: Določanje vpliva pomožnih snovi na obarjanje fenofibrata z nefelometrično metodo, prikaz absolutnih vrednosti parametrov. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost (n=4) s pogojnim oblikovanjem s tribarvno lestvico. Zelena barva – opažena inhibicija obarjanja, rdeča barva – ni inhibicije obarjanja. Pomen parametrov je opisan v Preglednici VI.

| <i>Nefelometer</i> | AUC ₄₀ | | AUC ₁₀₀ | | k (min ⁻¹) | | RNU _{max} | | t _{max} (min) | |
|-------------------------|-------------------|--------|--------------------|--------|------------------------|-------|--------------------|-------|------------------------|-------|
| <i>časovni interval</i> | (40 min) | | (100 min) | | (4 min) | | (40 min) | | (40 min) | |
| FENOFIBRAT | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C |
| Manitol | 279141 | 287761 | 694593 | 734061 | 225 | 275 | 7388 | 7587 | 23,80 | 24,03 |
| Pharmacoat® 603 | 211543 | 214288 | 532606 | 580976 | 71 | 95 | 5493 | 5840 | 28,70 | 33,37 |
| Kollidon® K17 | 270383 | 282574 | 696104 | 720461 | 168 | 209 | 7158 | 7477 | 31,50 | 27,07 |
| Lutrol® F68 | 193388 | 199889 | 508444 | 523759 | 87 | 69 | 5185 | 5287 | 33,37 | 29,17 |
| Kollidon® K30 | 219906 | 215974 | 570189 | 558195 | 110 | 109 | 5833 | 5866 | 33,29 | 29,17 |
| Kollidon® K25 | 225706 | 226717 | 580955 | 586976 | 85 | 31 | 5949 | 6009 | 33,83 | 30,10 |
| Tween® 80 | 226230 | 207640 | 560298 | 365542 | 126 | 76 | 5860 | 5525 | 28,70 | 22,40 |
| Tween® 20 | 166050 | 142253 | 370148 | 280731 | 88 | 46 | 4567 | 4427 | 8,09 | 4,90 |
| Kollidon® VA64 | 214764 | 227608 | 546997 | 633639 | 125 | 124 | 5583 | 6404 | 34,84 | 34,77 |
| PEG 6000 | 305356 | 300498 | 754335 | 720276 | 313 | 224 | 8031 | 7946 | 23,57 | 23,80 |
| Cremophor® EL | 221491 | 188904 | 556842 | 289576 | 100 | 54 | 5910 | 5173 | 33,37 | 20,77 |
| Pharmacoat® 606 | 212585 | 214899 | 533518 | 598273 | 127 | 116 | 5590 | 5970 | 26,76 | 36,40 |
| Cremophor® RH40 | 224009 | 243875 | 602164 | 618753 | 112 | 122 | 6106 | 6619 | 35,93 | 34,77 |
| Lutrol® F127 | 219896 | 227220 | 587988 | 571930 | 115 | 128 | 5938 | 6044 | 35,70 | 34,84 |
| Kollicoat® IR | 191089 | 203861 | 509380 | 533540 | 120 | 72 | 5134 | 5562 | 34,53 | 30,80 |
| Elvanol® | 197335 | 203910 | 505800 | 527284 | 48 | 109 | 5175 | 5451 | 32,67 | 25,82 |
| Klucel® EF | 207586 | 275697 | 540150 | 747892 | 97 | 103 | 5486 | 8002 | 34,53 | 31,50 |
| Propilenglikol | 304221 | 300583 | 729334 | 702220 | 292 | 254 | 8105 | 7952 | 24,97 | 19,91 |
| Texapon® K12 | 148749 | 155698 | 424006 | 403948 | 138 | 144 | 4293 | 4666 | 30,33 | 23,96 |
| PEG 400 | 299362 | 298917 | 722192 | 689070 | 339 | 417 | 7839 | 7964 | 20,30 | 10,73 |
| α-ciklodekstrin | 296527 | 294007 | 697208 | 665916 | 317 | 269 | 7851 | 7871 | 22,40 | 21,23 |
| PEG 4000 | 301316 | 300850 | 734562 | 719126 | 288 | 272 | 7956 | 7862 | 26,76 | 21,78 |
| pufer | 297391 | 290830 | 721782 | 696381 | 232 | 167 | 7862 | 7658 | 27,30 | 18,90 |

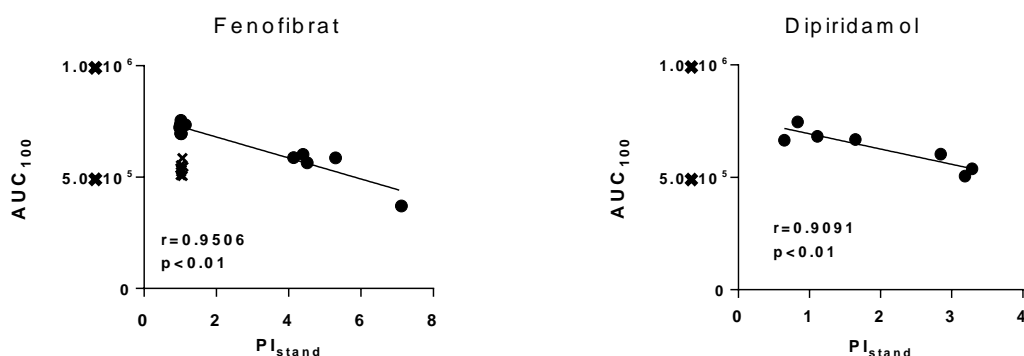
Preglednica XI: Določanje vpliva pomožnih snovi na obarjanje dipiridamola z nefelometrično metodo, prikaz absolutnih vrednosti parametrov. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost (n=4) s pogojnim oblikovanjem s tribarvno lestvico. Zelena barva – opažena inhibicija obarjanja, rdeča barva – ni inhibicije obarjanja. Pomen parametrov je opisan v Preglednici VI.

| <i>Nefelometer</i> | AUC ₄₀ | | AUC ₁₀₀ | | k (min ⁻¹) | | RNU _{max} | | t _{max} (min) | |
|-------------------------|-------------------|--------|--------------------|--------|------------------------|-------|--------------------|-------|------------------------|-------|
| <i>časovni interval</i> | (40 min) | | (100 min) | | (4 min) | | (40 min) | | (40 min) | |
| DIPIRIDAMOL | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C |
| Manitol | 247460 | 247453 | 660045 | 666194 | 401 | 335 | 7421 | 7492 | 3,73 | 3,27 |
| Pharmacoat® 603 | 283341 | 274332 | 539162 | 609126 | 168 | 154 | 7647 | 7693 | 24,97 | 19,60 |
| Kollidon® K17 | 258256 | 216126 | 567354 | 527771 | 227 | 193 | 7480 | 7188 | 13,07 | 10,03 |
| Lutrol® F68 | 251774 | 252503 | 679774 | 682591 | 348 | 413 | 6721 | 6805 | 20,30 | 12,60 |
| Kollidon® K30 | 244306 | 210660 | 539502 | 507607 | 121 | 127 | 7085 | 7018 | 18,90 | 12,60 |
| Kollidon® K25 | 246681 | 209084 | 546684 | 536440 | 91 | 102 | 7237 | 6788 | 17,97 | 11,90 |
| Tween® 80 | 238539 | 232751 | 663340 | 666512 | 171 | 63 | 6333 | 6504 | 23,80 | 30,10 |
| Tween® 20 | 268365 | 277178 | 731545 | 747468 | 9 | -80 | 7720 | 7737 | 1,87 | 1,87 |
| Kollidon® VA64 | 273023 | 209671 | 501354 | 503658 | 193 | 150 | 7428 | 7209 | 18,90 | 10,03 |
| PEG 6000 | 241032 | 240886 | 645378 | 651082 | 252 | 245 | 7241 | 7100 | 3,50 | 3,27 |
| Cremophor® EL | 239928 | 237953 | 696674 | 677855 | 53 | 125 | 6697 | 6587 | 35,00 | 21,23 |
| Pharmacoat® 606 | 277440 | 248374 | 599175 | 583155 | 217 | 105 | 7696 | 7305 | 28,47 | 21,70 |
| Cremophor® RH40 | 248842 | 221905 | 710931 | 623768 | 62 | 120 | 6958 | 6289 | 30,80 | 23,10 |
| Lutrol® F127 | 228494 | 224925 | 663879 | 662085 | 225 | 301 | 6293 | 6390 | 33,91 | 35,23 |
| Kollicoat® IR | 230245 | 228353 | 638441 | 636690 | 175 | 291 | 6617 | 6331 | 7,93 | 5,83 |
| Elvanol® | 222368 | 217537 | 582679 | 580060 | 112 | 198 | 6619 | 6625 | 17,97 | 14,47 |
| Klucel® EF | 219810 | 216643 | 579470 | 586751 | 145 | 182 | 6404 | 6545 | 20,07 | 14,23 |
| Propilenglikol | 230439 | 238195 | 611665 | 649740 | 236 | 244 | 6846 | 6955 | 5,13 | 3,27 |
| Texapon® K12 | 199335 | 203150 | 508690 | 544654 | -923 | -919 | 8345 | 7830 | 0,93 | 0,93 |
| PEG 400 | 226384 | 217872 | 605225 | 585860 | 267 | 345 | 6852 | 6992 | 5,83 | 3,50 |
| α-ciklodekstrin | 226931 | 223161 | 610528 | 594948 | 254 | 299 | 6875 | 7046 | 7,23 | 4,67 |
| PEG 4000 | 228043 | 236407 | 627025 | 653257 | 295 | 268 | 6495 | 6640 | 4,43 | 3,27 |
| pufer | 243677 | 238806 | 654991 | 644743 | 265 | 293 | 7214 | 7121 | 3,50 | 3,50 |

Kot potencialne inhibitorje obarjanja fenofibrata smo določili Tween[®] 20, Tween[®] 80, Cremophor[®] EL, Cremophor[®] RH40 in Lutrol[®] F127. Ugotovili smo, da so površinsko aktivne snovi tiste, ki so najbolj zavirale obarjanje in povečale količino raztopljene učinkovine. Določeni rezultati so skladni s predhodno raziskavo, kjer je Tween[®] 20 učinkovito inhibiral obarjanje fenofibrata za faktor 2,04, Tween[®] 80 pa za faktor 1,41. (35) Pri dipiridamolu pa smo kot potencialne inhibitorje obarjanja z nefelometrično metodo določili polivinil pirolidone Kollidon[®] K25, Kollidon[®] K30, Kollidon[®] VA64 in Kollidon[®] K17; s klasičnim pristopom zadnjih dveh nismo preučevali, določili pa smo inhibicijsko delovanje pomožnih snovi Kollidona[®] K25 in Kollidona[®] K30. Celulozni polimeri, ki imajo sicer širok spekter delovanja, tako pri obarjanju fenofibrata kot tudi pri obarjanju dipiridamola nimajo takšnega učinka. (14)

Nekateri izračunani parametri so predstavljali lažno pozitivne zadetke (Slika 12B). Najmanj takšnih je bilo pri parametru AUC₁₀₀, kjer je bilo tudi najmanj lažno negativnih rezultatov, ki predstavljajo tveganje, da bi ob negativnem rezultatu zgrešili potencialne inhibitorje obarjanja. Pri reševanju tveganje za zgrešene priložnosti (lažno negativni rezultati) prevlada nad tveganjem za lažno pozitivne rezultate; te namreč v nadaljevanju ovrednotimo s klasičnim pristopom. Tako AUC₁₀₀ predstavlja najprimernejši parameter za karakterizacijo inhibicije obarjanja z nefelometrično metodo.

A. Nefelometrična metoda



B.

| Nefelometrična metoda | Fenofibrat | | | | | Dipiridamol | | | | |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------|--------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----|--------------------|------------------|
| | AUC ₄₀ | AUC ₁₀₀ | k | RNU _{max} | t _{max} | AUC ₄₀ | AUC ₁₀₀ | k | RNU _{max} | t _{max} |
| Lažno pozitivni | 7/23 | 4/23 | 7/23 | 5/23 | 7/23 | 0/7 | 0/7 | 1/7 | 1/7 | 1/7 |
| Lažno negativni | 0/23 | 0/23 | 0/23 | 0/23 | 0/23 | 1/7 | 0/7 | 0/7 | 1/7 | 0/7 |

Slika 12: A - Korelacija nefelometrične metode s standardno. r - absolutna vrednost Pearsonovega koeficienta. B - Lažno pozitivne/negativne vrednosti izračunanih parametrov nefelometrične metode. Rezultati so prikazani kot število lažno pozitivnih/negativnih vrednosti glede na skupno število pomožnih snovi, testiranih s klasičnim pristopom. Pomen parametrov je opisan v Preglednici VI.

4.2.2.2 Metoda II: Turbidimetrična metoda

Vpliv na inhibicijo obarjanja, izmerjen s spektrofotometrom, smo ugotavljali s petimi različnimi parametri pri 26 in 37 °C. Tudi pri tej metodi so se posamezni inhibitorji obarjanja izkazali za učinkovite (Preglednica XII, Preglednica XIII). Na primer Tween[®] 80 (1,32x manjši odziv) in Tween[®] 20 (1,68x manjši odziv) predstavljata potencialna inhibitorja obarjanja fenofibrata, kar je skladno z rezultati klasične metode. (35) Poleg tega ima Cremophor[®] EL izrazitejši vpliv na inhibicijo obarjanja fenofibrata pri 37 °C, kjer so vrednosti parametrov nižje v primerjavi z inhibicijo pri 26 °C. Inhibicija obarjanja lahko izhaja iz nastanka vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij med fenofibratom in neionskimi PAS. Zaradi pomanjkanja donorskih skupin v fenofibratu so interakcije med fenofibratom in Cremophorjem/Tweenom najverjetnejši vzrok inhibicijskega delovanja. Druga možnost je povečana viskoznost raztopine, ki lahko vpliva na nukleacijo učinkovine in upočasniti rast kristalov (35).

Korelacijo turbidimetrične metode s PI_{stand} lahko razdelimo v različne kategorije in sicer na podlagi absolutnih vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije (r) (Slika 13A). V primeru fenofibrata smo opazili nizko korelacijo $-0,20 < r < 0,42$ za parametra AUC_{120} in naklon (k), srednjo korelacijo $-0,44 < r < 0,69$ za AUC_{30} in dobro korelacijo ($r=0,97$) za A_{max} . Podoben trend smo opazili tudi pri dipiridamolu. V tem primeru je srednja korelacija prisotna pri AUC_{30} , tj. $0,56 < r < 0,61$, AUC_{120} se je izkazal z $r=0,88$. Najboljšo korelacijo ($r > 0,91$) smo pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ opazili med parametroma A_{max} in PI_{stand} . Dobra korelacija je v primeru dipiridamola zavajajoča, saj je iz Slike 19A razvidno, da se A_{max} med meritvami sploh ne spreminja in kot takšen ne podaja nobene informacije o obarjanju.

Preglednica XII: Določanje vpliva pomožnih snovi na obarjanje fenofibrata s turbidimetrično metodo, prikaz absolutnih vrednosti parametrov. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost (n=4) s pogojnim oblikovanjem s tribarvno lestvico. Zelena barva – opažena inhibicija obarjanja, rdeča barva – ni inhibicije obarjanja. Pomen parametrov je opisan v Preglednici VI.

| <i>Spektrofotometer</i> | AUC ₃₀ | | AUC ₁₂₀ | | k (min ⁻¹) | | A _{max} | | t _{max} (min) | |
|-------------------------|-------------------|-------|--------------------|-------|------------------------|--------|------------------|-------|------------------------|-------|
| <i>časovni interval</i> | (30 min) | | (120min) | | (5 min) | | (40 min) | | (40 min) | |
| FENOFIBRAT | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C |
| Manitol | 1651 | 1572 | 4273 | 4153 | -0,030 | -0,031 | 1,20 | 1,16 | 0 | 0 |
| Pharmacoat® 603 | 1818 | 1679 | 6028 | 5693 | 0,009 | -0,002 | 1,28 | 1,20 | 68,37 | 37,63 |
| Kollidon® K17 | 1847 | 1802 | 5476 | 5274 | -0,017 | -0,024 | 1,21 | 1,25 | 0 | 0 |
| Lutrol® F68 | 1761 | 1759 | 5968 | 5722 | 0,017 | 0,019 | 1,30 | 1,22 | 89,19 | 34,27 |
| Kollidon® K30 | 1797 | 1760 | 5400 | 5847 | 0,008 | 0,004 | 1,18 | 1,23 | 35,69 | 42,46 |
| Kollidon® K25 | 1934 | 1900 | 6171 | 6074 | 0,004 | 0,007 | 1,28 | 1,29 | 54,31 | 56,83 |
| Tween® 80 | 1117 | 1108 | 2607 | 1976 | -0,038 | -0,026 | 0,89 | 0,92 | 0 | 0 |
| Tween® 20 | 1100 | 870 | 2704 | 2056 | -0,021 | -0,041 | 0,83 | 0,81 | 0,14 | 0,18 |
| Kollidon® VA64 | 1725 | 1711 | 5614 | 5761 | 0,007 | 0,004 | 1,21 | 1,22 | 40,83 | 30,14 |
| PEG 6000 | 1469 | 1427 | 3270 | 3190 | -0,045 | -0,044 | 1,21 | 1,21 | 0 | 0 |
| Cremophor® EL | 1137 | 1007 | 2731 | 1998 | -0,030 | -0,039 | 0,87 | 0,90 | 0 | 0 |
| Pharmacoat® 606 | 1775 | 1674 | 6112 | 5644 | -0,027 | -0,020 | 1,29 | 1,20 | 63,99 | 38,26 |
| Cremophor® RH40 | 1542 | 1371 | 4644 | 3958 | -0,070 | -0,023 | 1,01 | 0,98 | 41,85 | 34,5 |
| Lutrol® F127 | 1522 | 1407 | 4607 | 3721 | -0,069 | -0,016 | 0,99 | 0,96 | 46,15 | 0,06 |
| Kollicoat® IR | 1823 | 1801 | 5998 | 5906 | -0,074 | 0,025 | 1,23 | 1,20 | 55,42 | 40,86 |
| Elvanol® | 1695 | 1667 | 5958 | 5722 | -0,031 | -0,004 | 1,29 | 1,20 | 65,95 | 31,73 |
| Klucel® EF | 1815 | 1722 | 5622 | 4248 | -0,011 | -0,005 | 1,13 | 1,09 | 43,66 | 6,28 |
| Propilenglikol | 1439 | 1322 | 3158 | 2960 | -0,092 | -0,046 | 1,19 | 1,18 | 0 | 0 |
| Texapon® K12 | 1041 | 1059 | 3053 | 3151 | -0,125 | 0,006 | 0,78 | 0,85 | 34,23 | 31,6 |
| PEG 400 | 1329 | 1280 | 3070 | 3032 | -0,085 | -0,048 | 1,16 | 1,14 | 0 | 0 |
| α-ciklodekstrin | 1434 | 1378 | 3236 | 3188 | -0,076 | -0,048 | 1,16 | 1,18 | 0 | 0 |
| PEG 4000 | 1475 | 1443 | 3241 | 3134 | -0,092 | -0,045 | 1,21 | 1,20 | 0 | 0,19 |
| pufer | 1454 | 1447 | 3277 | 3233 | -0,043 | -0,048 | 1,21 | 1,23 | 0 | 0 |

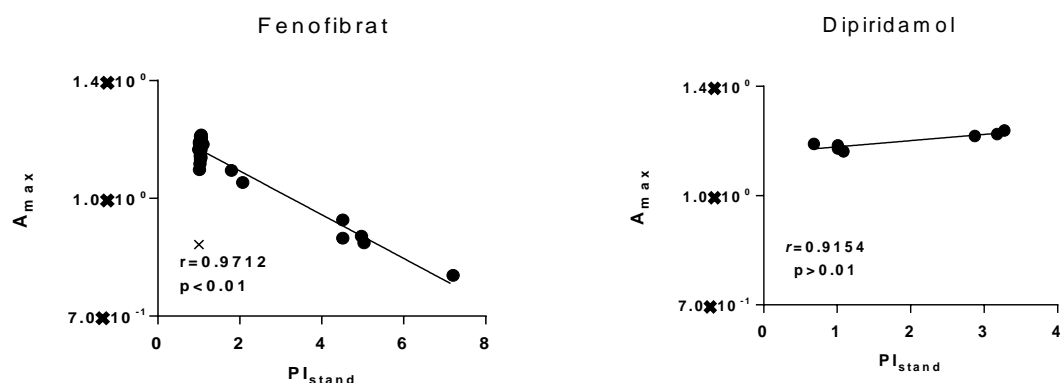
Preglednica XIII: Določanje vpliva pomožnih snovi na obarjanje dipiridamola s turbidimetrično metodo, prikaz absolutnih vrednosti parametrov. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost (n=4) s pogojnim oblikovanjem s tribarvno lestvico. Zelena barva – opažena inhibicija obarjanja, rdeča barva – ni inhibicije obarjanja. Pomen parametrov je opisan v Preglednici VI.

| <i>Spektrofotometer</i> | AUC ₃₀ | | AUC ₁₂₀ | | k (min ⁻¹) | | A _{max} | | t _{max} (min) | |
|-------------------------|-------------------|-------|--------------------|-------|------------------------|--------|------------------|-------|------------------------|-------|
| <i>časovni interval</i> | (30 min) | | (120 min) | | (5 min) | | (120 min) | | (120 min) | |
| DIPIRIDAMOL | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C | 26 °C | 37 °C |
| Manitol | 861 | 920 | 2962 | 3406 | -0,079 | -0,114 | 1,10 | 1,18 | 0,09 | 0,05 |
| Pharmacoat® 603 | 1391 | 1145 | 2742 | 2687 | -0,043 | -0,056 | 1,24 | 1,24 | 0,14 | 0,09 |
| Kollidon® K17 | 1064 | 954 | 2121 | 2250 | -0,058 | -0,064 | 1,20 | 1,25 | 0,14 | 0,05 |
| Lutrol® F68 | 942 | 978 | 3513 | 3525 | -0,096 | -0,101 | 1,06 | 1,08 | 0,95 | 1,29 |
| Kollidon® K30 | 1007 | 1025 | 2146 | 2475 | -0,044 | -0,051 | 1,10 | 1,25 | 0 | 0,05 |
| Kollidon® K25 | 1058 | 952 | 2140 | 2196 | -0,049 | -0,054 | 1,15 | 1,26 | 0,14 | 0,05 |
| Tween® 80 | 654 | 656 | 3194 | 2822 | -0,082 | -0,085 | 0,70 | 0,74 | 0 | 0,1 |
| Tween® 20 | 913 | 938 | 3731 | 3739 | -0,105 | -0,117 | 1,04 | 1,09 | 0 | 0 |
| Kollidon® VA64 | 1102 | 1108 | 1875 | 2015 | -0,038 | -0,032 | 1,05 | 1,12 | 0 | 0,19 |
| PEG 6000 | 870 | 951 | 3005 | 3370 | -0,104 | -0,116 | 1,16 | 1,22 | 0 | 0 |
| Cremophor® EL | 585 | 612 | 2692 | 2942 | -0,014 | -0,025 | 0,45 | 0,54 | 33,55 | 54,73 |
| Pharmacoat® 606 | 1477 | 1339 | 2785 | 3018 | -0,026 | -0,034 | 1,26 | 1,22 | 0,33 | 0,19 |
| Cremophor® RH40 | 622 | 596 | 2995 | 2986 | -0,062 | -0,061 | 0,58 | 0,56 | 0,38 | 0,32 |
| Lutrol® F127 | 714 | 615 | 3185 | 2861 | -0,070 | -0,040 | 0,63 | 0,46 | 0,86 | 88,54 |
| Kollicoat® IR | 1051 | 988 | 3351 | 3228 | -0,078 | -0,088 | 1,30 | 1,24 | 0,05 | 0,67 |
| Elvanol® | 1261 | 969 | 2770 | 2453 | -0,022 | -0,010 | 1,19 | 1,13 | 0,62 | 1,09 |
| Klucel® EF | 1471 | 1151 | 3169 | 2414 | -0,004 | -0,002 | 1,25 | 1,19 | 0,51 | 2,15 |
| Propilenglikol | 1042 | 1129 | 3517 | 4137 | -0,092 | -0,107 | 1,31 | 1,24 | 0 | 0 |
| Texapon® K12 | 475 | 478 | 1841 | 1821 | -0,103 | -0,099 | 0,77 | 0,77 | 0 | 0 |
| PEG 400 | 938 | 803 | 2697 | 2681 | -0,080 | -0,102 | 1,26 | 1,24 | 0 | 0 |
| α-ciklodekstrin | 1034 | 793 | 3268 | 2548 | -0,074 | -0,101 | 1,31 | 1,25 | 0 | 0,09 |
| PEG 4000 | 1133 | 1102 | 3998 | 3872 | -0,089 | -0,117 | 1,33 | 1,24 | 0 | 0 |
| pufer | 1129 | 1050 | 4116 | 3729 | -0,088 | -0,111 | 1,23 | 1,20 | 0 | 0 |

V nasprotju z nefelometrično metodo smo pri turbidimetrični metodi identificirali lažno negativne rezultate (Slika 13B). Najnižje število lažno pozitivnih/negativnih rezultatov je bilo pri parametrih AUC_{120} in A_{max} . A_{max} je s klasičnim pristopom, ki smo ga tudi tukaj uporabili kot referenčno metodo, tvoril najvišjo korelacijo ($r > 0,91$), tako da je ta parameter najprimernejši za karakterizacijo inhibicije obarjanja s turbidimetrično metodo. Pri dipiridamolu smo za A_{max} določili tri lažno pozitivne in dva lažno negativna rezultata, kar pomeni, da je parameter odvisen od učinkovine in ga ne moremo uporabljati za neposredno napovedovanje vpliva na inhibicijo obarjanja. Vzrok za nekoliko slabšo korelacijo turbidimetrične metode je lahko aglomeracija oborjenih trdnih delcev. Pri turbidimetriji je zahtevana večja gostota manjših delcev, da lahko dobimo merljiv in točen signal. (53) Npr. v prisotnosti Klucela[®] EF, Pharmacoata[®] 603 in Kollicoata[®] IR smo vizualno opazili aglomeracijo delcev, ki je vodila do neenakomernega posedanja teh velikih delcev na dno. Ta neenotna porazdelitev oborine se lahko odraža v večji variabilnosti podatkov in celo v lažno pozitivnih oz. negativnih zadetkih. Prisotnost pomožnih snovi, kot sta npr. Labrasol[®] in Klucel[®] EF, ki pri 37 °C tvorita mlečno raztopino, predstavlja vir lažno pozitivnih rezultatov zaradi visokih razmerij S_{PI}/S_B . Tako moramo rezultate, pridobljene pri metodah, ki temeljijo na detekciji oborine, previdno interpretirati.

A.

Turbidimetrična metoda



B.

| Turbidimetrična metoda | Fenofibrat | | | | | Dipiridamol | | | | |
|------------------------|-------------------|--------------------|------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----|------------------|------------------|
| | AUC ₃₀ | AUC ₁₂₀ | k | A _{max} | t _{max} | AUC ₃₀ | AUC ₁₂₀ | k | A _{max} | t _{max} |
| Lažno pozitivni | 4/23 | 0/23 | 8/23 | 2/23 | 7/23 | 4/7 | 1/7 | 2/7 | 3/7 | 1/7 |
| Lažno negativni | 2/23 | 2/23 | 8/23 | 0/23 | 4/23 | 1/7 | 0/7 | 3/7 | 2/7 | 0/7 |

Slika 13: A - Korelacija turbidimetrične metode s standardno. r – absolutna vrednost Pearsonovega koeficienta. B - Lažno pozitivne/negativne vrednosti izračunanih parametrov turbidimetrične metode. Rezultati so prikazani kot število lažno pozitivnih/negativnih vrednosti glede na skupno število pomožnih snovi, testiranih s klasičnim pristopom. Pomen parametrov je opisan v Preglednici VI.

5 ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo z optimizacijo eksperimentalnih in instrumentalnih pogojev nefelometrične metode določili nastavitve, ki jih lahko zanesljivo uporabimo za identifikacijo potencialnih inhibitorjev obarjanja. Ugotovili smo, da temperatura merjenja pomembno vpliva na rezultate, delovanje inhibitorjev pa je močno odvisno od kombinacije pomožna snov - učinkovina. Ovrednotili smo posamezne parametre inhibicije obarjanja, med katerimi se je AUC_{100} izkazal za najbolj zanesljivega. Tako nefelometrična kot turbidimetrična metoda v primerjavi s klasičnim pristopom zmanjšata čas, potreben za identifikacijo inhibitorjev obarjanja učinkovine in omogočata testiranje večjega števila potencialnih inhibitorjev obarjanja; zmogljivost metod je večja. Korelacija s standardno metodo je bila boljša pri nefelometrični metodi, pri kateri smo tudi določili nizko število lažno pozitivnih/negativnih rezultatov. Kljub temu pa metodi ne predstavljata zamenjave klasičnemu pristopu, ampak omogočata hitro odkrivanje potencialno učinkovitih inhibitorjev obarjanja iz zelo velikega nabora možnosti. Zadetke, pridobljene s takšnim visoko zmogljivim testom, v nadaljevanju preučimo še s klasičnim pristopom, po možnosti v biorelevantnem mediju, kar pomeni dodatno približanje *in vivo* pogojem.

LITERATURA

- (1) Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *Int J Pharm.* 2011; 420: 1 – 10
- (2) Chavda HV, Patel CN, Anand IS. Biopharmaceutic Classification System. *Sys Rev Pharm.* 2010; 1: 62 – 69
- (3) Committee for Medicinal Products for Human Use. Guidelines on the Investigation of Bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev.1/ Corr). Januar 2010
- (4) Guidance for industry. URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>, november 2013
- (5) Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. URL: http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS937/WHO_TRS_937_annex7_eng.pdf, november 2013
- (6) Elder D, Holm R. Aqueous solubility: Simple predictive methods (in silico, in vitro, bio-relevant approaches). *Int J Pharm.* 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.041>
- (7) Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59: 546 – 567
- (8) Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers. URL: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Documents/ENP/Brochure/EN/b_03_110921e_Solubility_Enhance_Compedium.pdf, november 2013
- (9) Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development. URL: <http://books.google.si/books?id=IH6JX2L4dCYC&printsec=frontcover&dq=physicochemical+drug+discovery+development&hl=sl&sa=X&ei=VX0sUavkKubb4QSNIICoAQ&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=physicochemical%20drug%20discovery%20development&f=false>, november 2013

- (10) Dai W-G, Pollock-Dove C, C. Dong L, Li S. Advanced screening assays to rapidly identify solubility-enhancing formulations: High-throughput, miniaturization and automation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60: 657 – 672
- (11) Saal C, Petereit AC. Optimizing solubility: Kinetic versus thermodynamic solubility temptation and risks. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012; 47: 589 – 595
- (12) Hoelke B, Gieringer S, Arlt M, Saal C. Comparison of Nephelometric, UV-Spectroscopic and HPLC Methods for High-Throughput Determination of Aqueous Drug Solubility in Microtiter Plates. *Anal. Chem.* 2009; 81: 3165 – 3172
- (13) Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2000; 11: S73 – S80
- (14) Warren DB, Benameur H, Porter CJH, Pouton CW. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility. *J Drug Target.* 2010; 18(10): 704 – 731
- (15) Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability? *J Pharm Sci.* 2009; 98: 2549 – 2572
- (16) Hsieh YL, Ilevbare GA, Van Eerdenbrugh B, Box KJ, Sanchez-Felix MV, Taylor LS. pH-Induced Precipitation Behavior of Weakly Basic Compounds: Determination of Extent and Duration of Supersaturation Using Potentiometric Titration and Correlation to Solid State Properties. *Pharm Res.* 2012; 29: 2738 – 2753
- (17) Guzman HR, Tawa M, Zhang Z, Ratanabangkoon P, Shaw P, Gardner CR, Chen H, Moreau JP, Almarsson Ö, Remenar JF. Combined Use of Crystalline Salt Forms and Precipitation Inhibitors to Improve Oral Absorption of Celecoxib from Solid Oral Formulations. *J Pharm Sci.* 2007; 96: 2686 – 2702
- (18) Petruševska M, Homar M, Petek B, Resman A, Kocjan D, Urleb U, Peternel L. Hydroxypropyl Methylcellulose Mediated Precipitation Inhibition of Sirolimus: From a Screening Campaign to a Proof-of-Concept Human Study. *Mol. Pharmaceutics.* 2013; 10: 2299 – 2310

- (19) Pakanti R, Narang AS. Impact of Excipient Interactions on Drug Bioavailability from Solid Dosage Forms. *Pharm Res.* 2012; 29: 2639 – 2659
- (20) Raghavan SL, Kiepfer B, Davis AF, Kazarian SG, Hadgraft J. Membrane transport of hydrocortisone acetate from supersaturated solutions; the role of polymers. *Int J Pharm.* 2001; 221: 95 – 105
- (21) Gao P, Akrami A, Alvarez F, Hu J, Li L, Ma C, Surapaneni S. Characterization and optimization of AMG 517 supersaturable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS) for improved oral absorption. *J Pharm Sci.* 2009; 98: 516 – 528
- (22) Lindfors L, Forssen S, Westergren J, Olsson U. Nucleation and crystal growth in supersaturated solutions of a model drug. *J Colloid Interface Sci.* 2008; 325: 404 - 413
- (23) Overhoff KA, McConville JT, Yang W, Johnston KP, Peters JI, Williams R III. Effect of Stabilizer on the Maximum Degree and Extent of Supersaturation and Oral Absorption of Tacrolimus Made By Ultra-Rapid Freezing. *Pharm Res.* 2008; 25: 167 – 175
- (24) Brewster ME, Vandecruys R, Peeters J, Neeskens P, Verreck G, Loftsson T. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and sulfobutylether-beta-cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *Eur J Pharm.* 2008; 34: 94 - 103
- (25) Kostewicz ES, Wunderlich M, Brauns U, Becker R, Bock T, Dressman JB. Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. *J Pharm Pharmacol.* 2004; 56: 43 – 51
- (26) Dai W, Dong LC, Shi X, Nguyen J, Evans J, Xu Y, Creasey AA. Evaluation of drug precipitation of solubility-enhancing liquid formulations using milligram quantities of a new molecular entity (NME). *J Pharm Sci.* 2007; 96: 2957 – 2969
- (27) Brouwers J, Tack J, Augustijns P. In vitro behavior of a phosphate ester prodrug of amprenavir in human intestinal fluids and in the Caco-2 system: Illustration of intraluminal supersaturation. *Int J Pharm.* 2007; 336: 302 – 309

- (28) Vaughn JM, McConville JT, Crisp MT, Johnston KP, Williams RIII. Supersaturation produces high bioavailability of amorphous danazol particles formed by evaporative precipitation into aqueous solution and spray freezing into liquid technologies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2006; 32: 559 – 567
- (29) Van Speybroeck M, Mols R, Mellaerts R, Do Thi T, Martens JA, Van Humbeeck J, Annaert P, Van den Mooter G, Augustijns P. Combined use of ordered mesoporous silica and precipitation inhibitors for improved oral absorption of the poorly soluble weak base itraconazole. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010; 75: 354 - 365
- (30) Miller DA, DiNunzio JC, Yang W, McGinity JW, Williams III RO. Targeted Intestinal Delivery of Supersaturated Itraconazole for Improved Oral Absorption. *Pharm Res.* 2008; 25: 1450 – 1459
- (31) Bevan C, Lloyd RS. A High-Throughput Screening Method for the Determination of Aqueous Drug Solubility Using Laser Nephelometry in Microtiter Plates. *Anal. Chem.* 2000; 72: 1781 – 1787
- (32) Wu Z, Tucker GI, Razzak M, Medlicott JN. An in vitro kinetic method for detection of precipitation of poorly soluble drugs. *Inj J Pharm.* 2005; 304: 1 – 3
- (33) Dai WG, Dong LC, Li S, Pollock-Dove C, Chen J, Masky P, Eichenbaum G. Parallel screening approach to identify solubility-enhancing formulations for improved bioavailability of a poorly water-soluble compound using milligram quantities of material. *Int J Pharm.* 2007; 336: 1 – 11
- (34) NEPHELOstar Brochure. URL: https://www.bsilab.com/sites/default/files/NEPHLOstar_Brochure.pdf, november 2013
- (35) Petruševska M, Urleb U, Peternel L. Evaluation of a High-Throughput Screening Method for the Detection of the Excipient-Mediated Precipitation Inhibition of Poorly Soluble Drugs. *Assay Drug Technol.* 2013; 2: 117-129

- (36) Yamashita T, Ozaki S, Kushida I. Solvent shift method for anti-precipitant screening of poorly soluble drugs using biorelevant medium and dimethyl sulfoxide. *Int J Pharm.* 2011; 419: 170 – 174
- (37) SmPC Asasantin, URL: <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-011400.pdf&dir=smpc>, november 2013
- (38) Taniguchi C, Inoue R, Kawabata Y, Yamashita K, Wada K, Yamauchi Y, Yamada S, Onoue S. Novel formulations of dipyridamole with microenvironmental pH-modifiers for improved dissolution and bioavailability under hypochlorhydria. *Int J Pharm.* 2012; 434: 148 – 154
- (39) Kalantzi L, Polentarutti B, Abrahamsson B, Goumas K, Dressman JB, Reppas C. Canine Intestinal Contents vs. Simulated Media for the Assessment of Solubility of Two Weak Bases in the Human Small Intestinal Contents. *Pharm Research.* 2006; 23: 1373 – 1381
- (40) Heigoldt U, Sommer F, Daniels R, Wagner KG. Predicting in vivo absorption behavior of oral modified release dosage forms containing pH-dependent poorly soluble drugs using a novel pH-adjusted biphasic in vitro dissolution test. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010; 76: 105 – 111
- (41) SmPC Katalip, URL: <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-009041.pdf&dir=smpc>, november 2013
- (42) Hu L, Wu H, Niu F, Yan C, Yang X, Jia Y. Design of fenofibrate microemulsion for improved bioavailability. *Int J Pharm.* 2011; 420: 251 – 255
- (43) SmPC Tricor, URL: <http://rxabbott.com/pdf/tricorpi.pdf>, oktober 2012
- (44) Vogt M, Kunath K, Dressman JB. Dissolution enhancement of fenofibrate by micronization, cogrinding and spray-drying: Comparison with commercial preparation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; 68: 283 - 288
- (45) Bevc B. Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.

- (46) Polyethylene glycol. URL: <http://chemicalland21.com/industrialchem/organic/POLYETHYLENE%20GLYCOL.htm>, november 2013
- (47) Kollicoat IR, Technical information. URL: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_030724e_Kollicoat%20IR.pdf, november 2013
- (48) Nilsson S, Thuresson K, Hansson P, Lindman B. Mixed solutions of surfactant and hydrophobically modified polymer. Controlling viscosity with micellar size. *J. Phys. Chem. B.* 1998; 102: 7099 – 7105
- (49) Wright PF, Gall DEJ, Kelly WA. Effect of meniscus formation and duplicate sample placement configurations on the variability of measurement by three microtiter plate photometers. *J. Immunol. Meth.* 1985; 81: 83 – 93
- (50) Alonzo D, Zhang G, Zhou D, Gao Y, Taylor L. Understanding the behavior of amorphous pharmaceutical systems during dissolution. *Pharm. Res.* 2010; 27: 608 – 618
- (51) Vrentas JS, Duda JL. Diffusion in polymer-cosolvent systems. II. A predictive theory for the dependence of diffusion coefficients on temperature, concentration, and molecular weight. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 1977; 15: 417 – 439
- (52) Pan L, Ho Q, Tsutsui K, Takahashi L. Comparison of Chromatographic and Spectroscopic Methods Used to Rank Compounds for Aqueous Solubility. *J Pharm Sci.* 2001; 90: 521 – 529
- (53) Morais IPA, Toth IV, Rangel AOSS. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications. *Spectroscopy Letters.* 2006; 39: 547 – 579