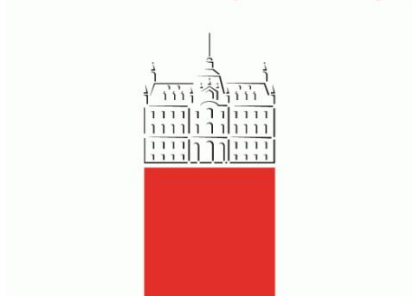


Univerza v *Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



HELENA BOGDAN

**VPLIV PUFRSKIH SISTEMOV NA »IN VITRO«
SPROŠČANJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN
IZ TRDNIH FARMACEVTSKIH OBLIK**

**INFLUENCE OF BUFFER SYSTEMS ON »IN VITRO« DRUG
RELEASE FROM SOLID DOSAGE FORMS**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala v Krki, d. d., Novo mesto, na Oddelku za raztapljanje pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja, mag. farm. in somentorja dr. Darka Uršiča, mag. farm.

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh

Član diplomske komisije: doc. dr. Jurij Trontelj

Mentor: prof. dr. Franc Vrečer

Somentor: dr. Darko Uršič

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Francu Vrečerju in somentorju dr. Darku Uršiču za nasvete, strokovno pomoč in usmerjanje.

Somentorju dr. Darku Uršiču se še posebej zahvaljujem za vse dodatne razlage, spodbujanje in izkazano zaupanje pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi Mateji Mežnar in ostalim sodelavcem na Oddelku za raztapljanje za praktične nasvete, olajšano delo v laboratoriju in prijetno vzdušje.

Najlepše se zahvaljujem staršem za potrpežljivost, podporo in razumevanje tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja in somentorja dr. Darka Uršiča.

Helena Bogdan

Vsebina

Povzetek	III
Abstract	IV
Seznam okrajšav	V
1 UVOD	1
1.1 Pufri	1
1.2 Fiziološki pufri	3
1.3 Pufri za vrednotenje raztapljanja	4
1.4 Kriteriji za izbiro pufrov	6
1.4.1 Fosfatni pufer	6
1.4.2 Kriteriji in priporočila	8
1.5 Vrednotenje vplivov pufrov na raztapljanje	10
1.5.1 Topnost	10
1.5.2 Razpadnost	10
1.5.3 Raztapljanje	11
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Materiali	14
3.2 Naprave	17
3.3 Metode	18
3.3.1 Priprava medijev (za določanje topnosti, razpadnosti, test raztapljanja in redčenje vzorcev)	18
3.3.2 Določanje topnosti ZU s »shake-flask« metodo v fosfatnem, maleatnem in bis-tris pufri	20
3.3.3 Določanje topnosti ZU na napravi za raztapljanje v bikarbonatnem pufri....	20
3.3.4 Razpadnost tablet	21
3.3.5 Test raztapljanja	21
3.3.6 Merjenje pH	22
3.3.7 UV/VIS spektrofotometrija	22
3.3.8 HPLC metodologija za vrednotenje raztopljenih količin zdravilnih učinkovin	25
3.3.9 Izdelava komprimatov	26
3.3.10 Statistična obdelava rezultatov	26

4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1	Izbira ustreznih pufrov	27
4.1.1	Fosfatni pufer	27
4.1.2	Določitev kriterijev in priporočil.....	28
4.2	Neustrezni pufri.....	28
4.3	Izbrani pufri.....	32
4.3.1	Bikarbonatni pufer.....	32
4.3.2	Bis–tris pufer	36
4.3.3	Maleatni pufer	37
4.3.4	Vrednotenje vpliva absorbanca maleatnega in bis-tris pufra.....	38
4.4	Obrazložitev uporabljenih metod	40
4.4.1	Topnost ZU	40
4.4.2	Razpadnost tablet	41
4.4.3	Test raztapljanja	41
4.4.4	Vrednotenje koncentracij zdravilnih učinkovin pri testih raztapljanja	41
4.4.5	Merjenje pH.....	42
4.4.6	Statistična obdelava rezultatov	42
4.5	Raztapljanje zdravilnih učinkovin iz modelnih formulacij v izbranih pufrih	43
4.6	Tablete A (aciklovir)	44
4.6.1	Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja	44
4.6.2	Poskus identifikacije interakcij med komponentami bikarbonatnega pufra in PS v tabletah A	46
4.7	Tablete B (karvedilol)	48
4.7.1	Fizikalno–kemijske lastnosti karvedilola	48
4.7.2	Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja	48
4.8	Tablete C (amlodipinijev maleat).....	52
4.8.1	Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja	52
4.9	Tablete D (amiodaronijev klorid).....	56
4.9.1	Fizikalno–kemijske lastnosti amiodaronijevega klorida	56
4.9.2	Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja	56
4.10	UPORABNOST IZBRANIH PUFROV	60
5	SKLEP.....	61
6	LITERATURA	63

Povzetek

Pri *in vitro* testih raztapljanja želimo ponazoriti pogoje v prebavnem traktu, zato je pomembno uporabiti medij, ki se *in vivo* dogajanju čim bolj približa. Za posnemanje pogojev v začetnem delu tankega črevesa se v skladu s farmakopejskimi priporočili za vrednotenje raztapljanja najpogosteje uporablja fosfatni pufer s pH 6,8, čeprav ima nekaj pomanjkljivosti. Namen našega dela je bil poiskati ustrezen nadomestni pufer za fosfatnega in ovrednotiti njegovo uporabnost. V ta namen smo preučevali bikarbonatni, 2-[bis(2-hidroksietil)amino]-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diolni (bis-tris) in maleatni pufer s pH 6,8. Preučili smo korelacijo hitrosti raztapljanja modelnih zdravilnih učinkovin z njihovo topnostjo in s časi razpada tablet z izbrano zdravilno učinkovino v fosfatnem in izbranih pufrih. S primerjavo profilov raztapljanja zdravilnih učinkovin iz ustreznih trdnih farmacevtskih oblik smo ocenili, ali so analizirani pufri ustrezna zamenjava za fosfatni pufer. Ugotovili smo, da je bikarbonatni pufer najustreznejša zamenjava za fosfatni pufer s stališča približevanja pogojem v začetnem delu tankega črevesa, ker so se v njem odrazile fiziološko relevantne interakcije med komponentami formulacije in pufra. Zaradi fizikalno-kemijske nestabilnosti bikarbonatnega pufra pa je s stališča enostavnosti za uporabo fosfatni pufer primernejši. Namestitev sistema za uravnavo in vzdrževanje pH vrednosti bikarbonatnega pufra (za to smo uporabili napravo pHysio-stat) je namreč zamuden proces. Na podlagi dobljenih rezultatov smo sklenili, da je bis-tris oziroma maleatni pufer smiselno uporabiti namesto fosfatnega le v primeru, kadar predvidevamo, da obstaja verjetnost pojava interakcij med testirano zdravilno učinkovino in ioni v fosfatnem pufri, ki se jim z uporabo bis-tris oziroma maleatnega pufra izognemo.

KLJUČNE BESEDE: pufri s pH 6,8; interakcije; test raztapljanja; topnost; razpadnost.

Abstract

In vitro dissolution tests are used to simulate the conditions in the gastrointestinal tract. Therefore, it is important to use a dissolution medium that precisely mimics *in vivo* performance. In order to mimic the conditions in the initial part of the small intestine in accordance with pharmacopeial recommendations on dissolution media, phosphate buffer of pH 6.8 is most commonly used despite a few disadvantages. The aim of our work was to find a suitable surrogate for the phosphate buffer and to evaluate its usefulness. We chose bicarbonate, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (bis-tris) and maleate buffer of pH 6.8. We have studied the correlation of dissolution rates of model active pharmaceutical ingredients to their solubility and disintegration times of tablets containing the corresponding active ingredient in phosphate and chosen buffers. Suitability of analysed buffers as replacement for phosphate buffer was evaluated by comparing the dissolution profiles of active ingredients, dissolved from corresponding solid dosage forms. We found bicarbonate buffer to be the most appropriate surrogate for phosphate buffer in terms of approaching the conditions in the initial part of the small intestine as the physiologically relevant interactions between the components of formulation and components of the buffer were displayed in it. Due to physico-chemical instability of bicarbonate buffer phosphate buffer is more suitable. Namely, the installation of a system for adjusting and maintaining the pH of bicarbonate buffer (we used the pHysio-stat device) is a time-consuming process. Based on the attained results we concluded it is reasonable to use bis-tris or maleate buffer instead of phosphate only in case where probability of interactions between tested active ingredients and ions of phosphate buffer is assumed and can be avoided by using bis-tris or maleate buffer.

KEY WORDS: buffers of pH 6,8; interactions; dissolution test; solubility; disintegration.

Seznam okrajšav

EMA	–	Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency)
FDA	–	Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
FO	–	farmacevtska oblika
f ₂	–	faktor podobnosti
HPLC	–	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPMC	–	hidroksipropilmetil celuloza
MCC	–	mikrokristalna celuloza
Na-CMS	–	natrijev karboksimetil škrob
PAS	–	površinsko aktivne snovi
Ph. Eur.	–	Evropska farmakopeja (ang. European Pharmacopoeia)
PS	–	pomožna(-e) snov(-i)
R in S stavki	–	stavki, ki opisujejo tveganja in previdnostne ukrepe
R ²	–	kvadrat koeficienta korelacije
RPM	–	obrati na minuto (ang. revolutions per minute)
RSD	–	relativna standardna deviacija
SD	–	standardna deviacija
SDS	–	natrijev dodecilsulfat/lavrilsulfat (ang. sodium dodecyl sulphate)
USP	–	Ameriška farmakopeja (ang. United States Pharmacopeia)
ZU	–	zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 Pufri

Pufri so vodne raztopine, ki se upirajo spremembi pH ob dodatku manjših količin močnih kislin ali baz. Vsebujejo šibko kislino (HA) in njeno konjugirano bazo (A^-) ali šibko bazo in njeno konjugirano kislino (1). V nadaljevanju besedila bomo pufre obravnavali kot kombinacijo šibke kisline in njene soli (*Enačbi 1 in 2*), čeprav enako velja tudi za baze.



$$K_a = \frac{[H_3O^+] \times [A^-]}{[HA]} \quad \text{Enačba 2}$$

Henderson – Hasselbalchova enačba je najbolj znana oblika zapisa zveze med pH, pK_a in deležem ionizirane in neionizirane oblike šibke kisline (*Enačba 3*) (2, 3).

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Enačba 3}$$

Pufrska kapaciteta (β) je merilo sposobnosti pufra, da se upira spremembi pH (*Enačba 4*). Poenostavljeno si pufersko kapaciteto lahko predstavljamo kot količino močne kisline ali baze (Δn), ki jo dodamo puferski raztopini, da dosežemo določeno spremembo pH. To velja le, kadar sta dodana količina in sprememba pH majhni, saj je pufrska kapaciteta odvisna od samega pH raztopine (Slika 1) (4).

$$\beta = \frac{\Delta n}{\Delta pH} \quad \text{Enačba 4}$$

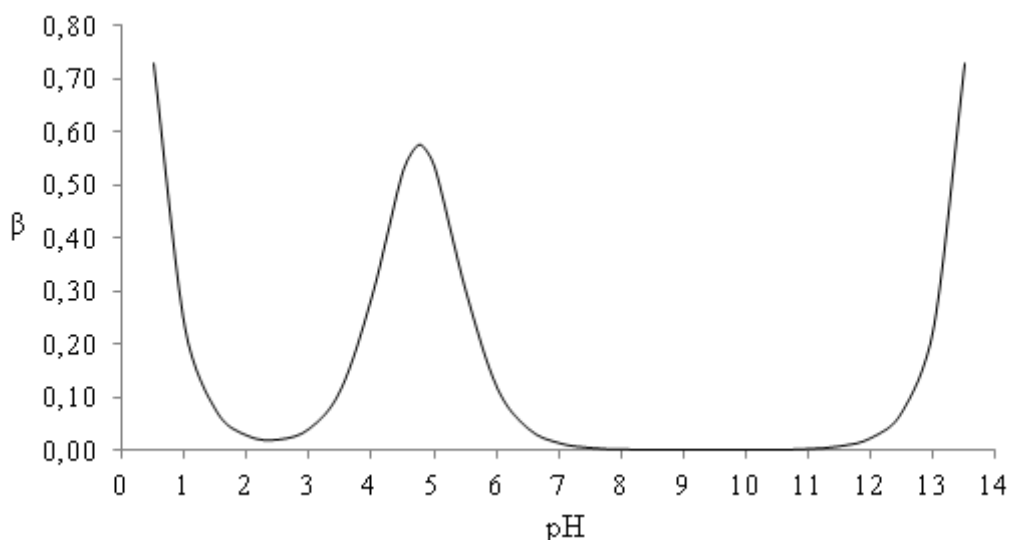
Pufrska kapaciteta je odvisna od razmerja med šibko kislino in njeno konjugirano bazo ter od celokupne koncentracije pufra. Maksimalna pufrska kapaciteta je dosežena, kadar sta koncentraciji šibke kisline in njene konjugirane baze enaki, ker dodatek močne kisline ali baze takrat povzroči najmanjšo relativno spremembo koncentracije posamezne zvrsti. Pri maksimalni puferski kapaciteti je vrednost $\log ([A^-]/[HA])$ najmanjša (enaka nič) in je pH enak pK_a . Enostavni (enokomponentni) pufri imajo optimalno pufersko kapaciteto pri pH, ki je v območju vrednosti $pK_a \pm 1,0$, kjer sta koncentraciji šibke kisline in njene soli veliko večji v primerjavi s količino dodanih oksonijevih (H_3O^+) ionov (2, 3). Ob dodatku kisline v

puffer se poveča koncentracija H_3O^+ ionov. Zaradi ohranjanja ravnotežja se ravnotežna reakcija (*Enačba 1*) premakne v levo, ker ionizirana oblika (A^-) veže H_3O^+ ione in se pretvori v kislino (HA). Ob dodatku baze v puffer se zmanjša koncentracija H_3O^+ ionov. Posledično del kisline disociira, ravnotežje (*Enačba 1*) se premakne v desno (1).

Z naraščajočo celokupno koncentracijo pufru narašča tudi pufrska kapaciteta. Zvezo med pufersko kapaciteto in celokupno koncentracijo pufru (C_{puf}) podaja Van Slykeova enačba (*Enačba 5*) (4).

$$\beta = \frac{\Delta n}{\Delta(p[H_3O^+])} = 2,303 \left([H_3O^+] + [OH^-] + \frac{C_{\text{puf}} K_a [H_3O^+]}{(K_a + [H_3O^+])^2} \right) \quad \text{Enačba 5}$$

Koncentraciji H_3O^+ in OH^- v *Enačbi 5* sta neodvisni od prisotnosti komponent, ki po definiciji tvorita puffer (šibka kislina in njena sol). Sta odraz dejstva, da se raztopine z nizkim (močne kisline) ali visokim (močne baze) pH tudi upirajo spremembi pH. Takšne raztopine imajo visoko pufersko kapaciteto ne glede na prisotnost »klasičnih« komponent pufru. Na Sliki 1 je prikazano spreminjanje puferske kapacitete v odvisnosti od pH 0,1 M raztopine acetatnega pufru.

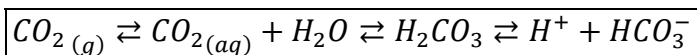


Slika 1: Puferska kapaciteta 0,1 M acetatnega pufru.

V skladu z definicijo je maksimalna puferska kapaciteta acetatnega pufru dosežena, ko je pH enak pK_a (pK_a očetne kisline znaša 4,76) (5). Z oddaljevanjem pH od pK_a se zmanjšuje tudi puferska kapaciteta raztopine. V pH območju pod 2 in nad 12 puferska kapaciteta zopet strmo narašča, in sicer zaradi visoke koncentracije H_3O^+ oz. OH^- ionov v raztopini (4).

1.2 Fiziološki pufri

Biološki procesi v človeškem telesu nemoteno potekajo zgolj v ozkem pH območju. V telesnih tekočinah so zato prisotni pufri, ki uravnavajo oziroma vzdržujejo njihov pH v ustreznem intervalu in tako omogočajo nemoten potek bioloških procesov. Najpomembnejši pufri v človeškem telesu so bikarbonatni pufer, fosfatni pufer ter plazemski proteini. Bikarbonatni pufer vsebuje ogljikovo kislino (H_2CO_3) in njeno konjugirano bazo, hidrogenkarbonatni ion (HCO_3^-) (6).



Enačba 6

V tankem črevesu pH vzdržuje predvsem bikarbonatni pufer. Trebušna slinavka in epitelne celice v dvanajstniku aktivno izločajo HCO_3^- z namenom nevtralizacije kisle želodčne vsebine, ki prehaja iz želodca, kar zaščiti črevesno sluznico pred kislimi pH vrednostmi (7). Prav tako se v dvanajstnik izloča žolč, ki je sestavljen iz vode, žolčnih soli, holesterola, lecitina, fosfolipidov in bilirubina (8). Njegovo izločanje je skoraj trikrat večje po obroku kot na tešče, ker žolčne soli in lecitin delujejo kot površinsko aktivne snovi (PAS), ki povečajo topnost zaužitih maščob in s tem omogočajo njihovo absorpcijo (9).

pK_a vrednost ogljikove kisline znaša 6,37 (10). V tankem črevesu pH vrednost gradientno narašča od 6,0 do okrog 7,4 (11). Povprečna pH vrednost v dvanajstniku znaša 6,5, medtem ko se v jejunumu giblje v območju od 6,6 do 6,8. Pufrska kapaciteta v dvanajstniku na tešče znaša 5,6 mEq/L, površinska napetost pa 32,3 mN/m. Po zaužitju 500 ml Ensure Plus[®] (simulacija obroka) pH vrednost v dvanajstniku najprej rahlo naraste v primerjavi s stanjem na tešče, do 30. minute po obroku povprečno znaša 6,6 in nato postopoma pada, v časovnem intervalu do 210. minute znaša 5,2. Prav tako se po obroku znatno spremeni pufrska kapaciteta, ki naraste na 22–30 mEq/L. Zaradi povišanega izločanja PAS po obroku, t.j. žolčnih soli in lecitina, se površinska napetost zniža na vrednost 28,1–28,8 mN/m. Kljub skoraj trikrat višjem izločanju solubilizatorjev je sprememba površinske napetosti v primerjavi s stanjem na tešče relativno majhna, kar je posledica povečanja volumna črevesne vsebine po zaužitju obroka (12). Porast pufrske kapacitete (in posredno padec pH vrednosti) dokazujeta, da tudi hrana deluje kot pufer (13). Soli žolčnih kislin zaradi nizkih pK_a vrednosti (npr. pK_a tauroholne kisline znaša 1,80) pri pH vrednostih v dvanajstniku in jejunumu nimajo zadostne pufrske kapacitete, da bi prispevale k vzdrževanju pH črevesne vsebine (14, 15).

1.3 Pufri za vrednotenje raztapljanja

V Evropski farmakopeji (ang. European Pharmacopoeia – Ph. Eur.) sestava medijev za vrednotenje raztapljanja trdnih farmacevtskih oblik (FO) ni strogo predpisana. Če je medij za raztapljanje puferska raztopina, je treba upoštevati le predpisano pH vrednost pufra, ki ne sme odstopati več kot $\pm 0,05$ enote od predpisane pH vrednosti. Navedeni so priporočeni mediji, med katerimi najprimernejšega izberemo na podlagi fizikalno–kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine (ZU) in pomožnih snovi (PS) ter glede na pogoje (pH in ionska moč medija), ki jim bo FO izpostavljena po aplikaciji. Uporaba vode kot medija za vrednotenje raztapljanja se priporoča samo v primeru, če spremembe pH ne vplivajo na proces raztapljanja. V posebnih primerih medij za raztapljanje lahko vsebuje encime in površinsko aktivne snovi. Pri testiranju raztapljanja FO, ki vsebujejo v vodi slabo topne ZU, je lahko potrebna modifikacija medija. Priporočeno je dodajanje PAS v nizkih koncentracijah ter izogibanje organskim topilom. Pri uporabi s farmakopejo predpisanih naprav za vrednotenje raztapljanja 1, 2 in 3 je treba upoštevati načelo t.i. »sink« pogojev. »Sink« pogoji so doseženi, ko je volumen medija vsaj 3 do 10-krat večji od volumna, potrebnega za popolno raztapljanje ZU. To pomeni, da topnost ne vpliva na hitrost raztapljanja (16).

Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency – EMA) kot medije za izvajanje *in vitro* testov raztapljanja priporoča pufre s tremi različnimi pH vrednostmi (pH 1,2, 4,5 in 6,8), ki ponazarjajo fiziološke pogoje v človeškem prebavnem traktu (17). Pri navedenih pH vrednostih so v Ph. Eur. priporočeni naslednji pufri: klorovodikova kislina (HCl) z dodanim NaCl ali umetni želodčni sok (ang. simulated gastric fluid – SGF) pri pH 1,2; fosfatni ali acetatni pufer pri pH 4,5; fosfatni pufer ali umetni črevesni sok (ang. simulated intestinal fluid – SIF) pri pH 6,8 (16).

Skupina raziskovalcev pod vodstvom prof. Dressmanove je leta 1998 razvila t.i. biorelevantna črevesna medija, ki se *in vivo* pogojem v črevesu približata bolj kot SIF, to sta umetni črevesni sok, ki posnema pogoje na tešče (ang. Fasted State Simulated Intestinal Fluid – FaSSIF) in umetni črevesni sok, ki posnema pogoje po obroku (ang. Fed State Simulated Intestinal Fluid – FeSSIF) (18). Leta 2008 je ista skupina posodobila oziroma spremenila sestavo medijev FaSSIF in FeSSIF (FaSSIF-V2 in FeSSIF-V2), s čimer so izboljšali ponazarjanje *in vivo* pogojev (19).

Preglednica I: Primerjava sestave (v mM) prvotnih FaSSIF, FeSSIF in posodobljenih medijev FaSSIF-V2 in FeSSIF-V2.

	FaSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF	FeSSIF-V2
natrijev tauroholat	3	3	15	10
lecitin	0,75	0,2	3,75	2
gliceril monooleat	-	-	-	5
natrijev oleat	-	-	-	0,8
ocetna kislina	-	-	144	-
maleinska kislina	-	19,12	-	55,02
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	28,65	-	-	-
NaOH	8,7	34,8	101	81,65
NaCl	105,85	68,62	173	125,5
pH	6,5	6,5	5,0	5,8

Ameriška farmakopeja (ang. United States Pharmacopeia – USP) pri vrednotenju raztapljanja FO za peroralno uporabo, kjer je v posamezni monografiji predpisan medij voda ali medij s pH manj kot 6,8, dovoljuje dodatek prečiščenega pepsina z aktivnostjo ne več kot 750000 USP enot na 1000 mL. Za medije s pH 6,8 ali več dovoljuje dodatek pankreatina s proteazno aktivnostjo ne več kot 1750 USP enot na 1000 mL. Če je v posamezni monografiji FO s takojšnjim sproščanjem kot medij za raztapljanje predpisana puferska raztopina, je treba upoštevati predpisano vrednost pufra. V USP so opisane standardne puferske raztopine, pri pH 6,8 kot standardno pufersko raztopino opisuje fosfatni pufer. Navedene so tudi substance za pripravo puferskih raztopin, in sicer se za pripravo pufra s pH 6,8 lahko uporabijo soli fosforjeve (V) kisline (pK_{a2} znaša 7,21) kalijev in natrijev dihidrogen fosfat, kalijev in natrijev hidrogen fosfat, amonijev fosfat; ali amonijev karbonat (pK_a ogljikove kisline znaša 6,37) (10, 20).

Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration – FDA) je objavila podatkovno zbirko priporočenih metod za raztapljanje ZU v posameznih FO. Pri pH 6,8 se po priporočilih FDA najpogosteje uporablja fosfatni pufer, ki se mu lahko dodajo površinsko aktivne snovi ali druge substance (SDS v različnih koncentracijah ali 0,5% / 1% polisorbata 80 ali 2% polisorbata 80 in 0,1% pankreatin ali 0,03% askorbinska kislina). Pri pH 6,8 je omenjen tudi citratni pufer, priporoča se pri testiranju raztapljanja tablet, ki vsebujejo kalcijev akamprosat (21).

1.4 Kriteriji za izbiro pufrov

Pri izbiri medija za *in vitro* raztapljanje, s katerim želimo ponazoriti pogoje v tankem črevesu, je pomembno, da ima podobne lastnosti kot fiziološki pufer v tankem črevesu (pH vrednost v jejunumu znaša povprečno 6,8) (22, 23).

1.4.1 Fosfatni pufer

Po priporočilih EMA in FDA se v skladu s Ph. Eur. in USP pri pH 6,8 za *in vitro* teste raztapljanja uporablja fosfatni pufer (16, 20). Vzrok so številne prednosti fosfatnega pufera:

- a) pK_{a2} vrednost H_3PO_4 znaša 7,21, kar pri pH 6,8 zagotavlja zadostno pufrsko kapaciteto ($\beta = 0,0232$ za 50 mM fosfatni pufer).
- b) Soli fosforjeve (V) kisline, ki se uporabljajo za pripravo fosfatnega pufera s pH 6,8, so v vodi lahko topne (topnost kalijevega dihidrogen fosfata – KH_2PO_4 znaša 1,8 M, topnost natrijevega dihidrogen fosfata – NaH_2PO_4 znaša 4,1 M pri 25 °C) (24). Kadar je v nadaljevanju besedila topnost snovi opisana z besedami, posamezni izrazi opisujejo intervale topnosti, prikazane v Preglednici II (25).

Preglednica II: Opisna klasifikacija topnosti ZU, povzeta po Ph. Eur. in USP.

stopnja topnosti	volumen topila (mL), potreben za raztapljanje 1 g vzorca	interval topnosti (mg/mL)
zelo lahko topno	< 1	> 1000
lahko topno	1 – 10	1000 – 100
topno	10 – 30	100 – 33
zmerno topno	30 – 100	33 – 10
težko topno	100 – 1000	10 – 1
zelo težko topno	1000 – 10000	1 – 0,1
praktično netopno	> 10000	< 0,1

c) Z vidika škodljivosti za zdravje so soli, ki se uporabljajo za pripravo fosfatnega pufera (KH_2PO_4 , NaH_2PO_4), dražeče za oči, dihala in kožo (R36/37/38 in S24/25/26, S36/37/39), NaOH pelete pa povzročajo hude opekline (R35 in S26, S37/39, S45), zato je pri pripravi pufera treba nositi standardno zaščitno opremo za delo v kemijskem laboratoriju (26, 27).

d) Priprava fosfatnega pufera s pH 6,8 je hitra in enostavna. Po farmakopejskih priporočilih moramo najprej pripraviti osnovni raztopini, t.j. raztopino KH_2PO_4 s koncentracijo 27,22 g/L oz. 0,2 M in raztopino NaOH s koncentracijo 8,00 g/L oz. 0,2 M.

Nato v litrsko merilno bučko k 250 mL 0,2 M raztopine KH_2PO_4 dodamo 112,0 mL 0,2 M NaOH in dopolnimo s prečiščeno vodo do 1000 mL. (16, 20).

e) Tudi cenovno je fosfatni pufer relativno ugoden, cena substanc za pripravo 1L 50 mM fosfatnega pufera s pH 6,8 trenutno znaša manj kot 1,0 EUR (KH_2PO_4 0,79 EUR in NaOH v obliki pelet 0,03 EUR) (28).

f) V UV spektru pri valovnih dolžinah nad 230 nm fosfatni pufer minimalno absorbira UV svetlobo, in sicer njegova absorbanca pri 260 nm in pri 280 nm znaša največ 0,05 (0,1 M fosfatni pufer v vodi) (29).

Fosfatni pufer ni idealen, nekatere njegove pomanjkljivosti so:

g) Raztapljanje FO, ki vsebujejo ZU v obliki fosfatnih soli (pogostost kationskih ZU v obliki fosfatnih soli je 5,0 %), lahko privede do interakcij s komponentami fosfatnega pufera, natančneje do t.i. učinka skupnih ionov (30). To pomeni, da se zmanjša topnost šibkega elektrolita (ZU), ki vsebuje enak ion kot medij (fosfatni anion) (31). Učinek skupnih ionov je odvisen od topnostnega produkta soli, prej se pojavi pri soleh z nižjim topnostnim produktom oziroma s slabšo topnostjo (32).

h) Največja pomanjkljivost fosfatnega pufera je inkompatibilnost z dvovalentnimi in trivalentnimi kationi, kajti kar 17,4 % anionskih ZU je v FO vgrajeno v obliki kalcijevih (8,7 %), cinkovih (2,3 %), magnezijevih (1,7 %) ali aluminijevih (4,7 %) soli (30, 33). Fosfatni anioni z njimi tvorijo slabo topne soli, ki se oborijo po presežku topnostnega produkta (K_{sp}). Soli, ki vsebujejo večvalentne ione, so slabše topne kot soli, kjer je vsaj eden izmed ionov enovalenten (na primer kalcijev dihidrogen fosfat je 60-krat bolj topen kot kalcijev hidrogen fosfat) (33, 34). V prisotnosti kalcijevih ionov (Ca^{2+}) lahko pride do obarjanja kalcijevih fosfatov. Pri konstantnem pH in ionski moči lahko glede na koncentracijo fosfatnih in kalcijevih ionov nastanejo različne soli, prikazane v Preglednici III (35). Najnižja koncentracija Ca^{2+} , pri kateri je presežen K_{sp} kalcijeve soli v fosfatnem pufru s pH 6,8 znaša le 0,58 μM , in sicer izpade oborina hidroksiapatita. Prisotnost magnezijevih (Mg^{2+}) oziroma aluminijevih ionov (Al^{3+}) pa lahko povzroči obarjanje magnezijevega oziroma aluminijevega fosfata. Aluminijev fosfat je v fosfatnem pufru s pH 6,8 praktično netopen, obori se že pri $5,82 \times 10^{-8} \mu\text{M Al}^{3+}$ (36, 37).

Preglednica III: Ca/Mg/Al – fosfatne soli, pripadajoči topnostni produkti in koncentracije $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ ionov, pri katerih se našteje soli oborijo v fosfatnem pufru pH 6,8.

ime soli	kemijska formula	topnostni produkt (K_{sp})	koncentracija $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ (μM), pri kateri se sol obori
hidroksiapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	$4,70 \times 10^{-59}$	0,58
kalcijev fosfat	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$1,20 \times 10^{-29}$	6,22
kalcijev hidrogen fosfat	CaHPO_4	$1,26 \times 10^{-7}$	8,86
oktakalcijev fosfat	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \times 5\text{H}_2\text{O}$	$1,25 \times 10^{-47}$	$6,69 \times 10^6$
magnezijev fosfat	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	$1,04 \times 10^{-24}$	275
aluminijev fosfat	AlPO_4	$1,30 \times 10^{-20}$	$5,82 \times 10^{-8}$

Prednosti in pomanjkljivosti fosfatnega pufru pH 6,8 smo upoštevali kot glavno vodilo pri določitvi kriterijev in priporočil za iskanje nadomestnih pufrrov za vrednotenje raztapljanja.

1.4.2 Kriteriji in priporočila

V nadaljevanju poglavja bomo predstavili kriterije in priporočila povezane z lastnostmi fosfatnega pufru, ki so opisane v poglavju 1.4.1.

Primarni kriterij:

ad. a) pK_a vrednost v območju $6,8 \pm 1,0$.

Povprečen pH v jejunumu znaša 6,8, zato navedene pK_a vrednosti substanc, ki se uporabljajo za pripravo pufrrov, pri pH 6,8 zagotavljajo primerno pufrsko kapaciteto.

Sekundarna kriterija:

ad. b) Topnost v vodi vsaj 50 mM pri sobni temperaturi (20 – 25 °C).

Zadostna topnost komponent pufru zagotavlja njihovo raztapljanje v potrebnem volumnu vode in s tem preprečuje neželeno spremembo pogojev (pH, ionska moč) pri testih raztapljanja in določanju topnosti. Omenjeni testi se sicer izvajajo pri 37 °C, toda vzorci se redčijo in analizirajo pri sobni temperaturi, zato mora biti spojina, ki tvori pufer, zadostno topna tudi pri sobni temperaturi.

ad. c) Čim manjša toksičnost za človeka in vodne organizme.

Kot nesprejemljivo strupene smo določili substance, ki so označene z vsaj enim izmed naslednjih R-stavkov: R1–R6, R9, R11–R19, R23–R33, R39–R41, R44–R65, R67, R68 (38). Tveganja in previdnostne ukrepe za substance, ki se uporabljajo za pripravo fosfatnega pufru (R35, R36/37/38 in S24/25/26, S36, S37/39, S45), smo postavili kot priporočilo glede škodljivosti za človeka in okolje (26, 27).

Priporočila:

ad. d) Enostavna in hitra priprava, enostavnost za uporabo.

Za pufre, ki se uporabljajo v raziskovalne namene in se pripravljajo dnevno, sta enostavna in hitra priprava pomembni lastnosti. Naštete lastnosti omogočajo prihranek časa ter izključujejo dodaten vzrok, ki bi lahko vplival na točnost rezultatov.

ad. e) Cenovna dostopnost.

Cene substanc za pripravo pufrov so pomemben dejavnik pri redni kontroli kakovosti farmacevtskih izdelkov. Tudi pri uporabi pufrov v raziskovalne namene je treba upoštevati stroške za njihovo pripravo. Cena spojin, potrebnih za pripravo 1L 50 mM fosfatnega pufra s pH 6,8 trenutno znaša manj kot 1,0 EUR (28), zato je priporočena cenovna meja za pripravo 1L 50 mM nadomestnih pufrov maksimalno 1,0 EUR.

ad. f) Nizka absorpcija v UV spektru.

Pufri naj ne bi absorbirali vidne ali ultravijolične svetlobe pri valovnih dolžinah, višjih od 230 nm, saj se na ta način izognemo interferenci pri običajnih spektrofotometričnih analizah (39).

ad. g), h) Odsotnost nefizioloških interakcij med topljencem in komponentami pufra.

Nefiziološke interakcije (razlaga v poglavju 4.5) lahko privedejo do zavajajočih rezultatov pri testih raztapljanja.

i) Fizikalno–kemijska stabilnost in kemijska inertnost.

Pufri morajo biti fizikalno–kemijsko stabilni in kemijsko inertni pri pogojih izvajanja testov raztapljanja (pH 6,8, temperatura 37 °C, prisotnost kisika).

1.5 Vrednotenje vplivov pufrov na raztapljanje

Več kot 90% ZU so šibke kisline in baze, ki so v formulacijo pogosto vgrajene v obliki soli z namenom povečanja njihove topnosti in hitrosti raztapljanja. Na topnost in hitrost raztapljanja poleg sestave formulacije bistveno vpliva tudi sestava medija za raztapljanje. Pri uporabi puferskih raztopin za vrednotenje raztapljanja so interakcije med nasprotno nabitimi ioni ZU in ioniziranimi komponentami pufra, pri katerih nastanejo slabše topne soli ZU, najpogostejši vzrok za zmanjšanje topnosti in hitrosti raztapljanja ZU.

Na rezultate lahko vpliva tudi kombinacija ZU in pufra, ki vsebujeta enake ione. V tem primeru obstaja verjetnost pojava učinka skupnih ionov, ki zaradi preseženega topnostnega produkta zmanjša topnost ionizirane oblike ZU (33, 40). Kombinacija enakih ionov v ZU in pufri lahko povzroči tudi odsotnost raztapljanja. Pri pH, kjer topnost presega intrinzično topnost šibke baze za 3 oz. šibke kisline za 4 velikostne razrede, obstaja velika verjetnost obarjanja kloridnih / natrijevih soli šibkih baz / kislin, pri čemer lahko pride do soobarjanja soli in šibke baze / kisline. To pH vrednost imenujemo Gibbsov pK_a . Gibbsov pK_a je pogojna konstanta, obratno–sorazmerno odvisna od koncentracije Cl^- / Na^+ ionov (41).

1.5.1 Topnost

Topnost je definirana kot maksimalna količina topljenca, ki z danim volumnom topila tvori nasičeno raztopino. Izraz intrinzična topnost se nanaša na topnost neionizirane oblike spojine. Pri neionizirajočih spojinah je termodinamska topnost enaka intrinzični topnosti, medtem ko je pri ionizirajočih spojinah termodinamska topnost enaka vsoti ravnotežnih koncentracij vseh raztopljenih oblik spojine (ioniziranih in neionizirane) v raztopini (25).

Pri določanju od pH odvisne topnosti ZU se uporabljajo pufri, ker vzdržujejo konstantno pH vrednost raztopine. Pri uporabi pufrov med testom topnosti lahko pride do tvorbe soli med komponentami ZU in pufra. Nastale soli lahko povečajo ali zmanjšajo topnost ZU, zato se določanje topnosti ZU v različnih pufrih z enako pH vrednostjo lahko uporabi kot metoda za vrednotenje interakcij med ZU in komponentami pufra (42).

1.5.2 Razpadnost

Razpadnost tablet in kapsul je farmakopejski test, predpisan pri vrednotenju tablet in kapsul (Ph. Eur., poglavje 2.9.1. Disintegration of tablets and capsules) (16). Razpad tablet ali kapsul je proces, pri katerem formulacija ob stiku z medijem razpade na manjše delce, toda ne pomeni popolne raztopitve formulacije ali ZU. Popoln razpad tablete oz. kapsule je

definiran kot stanje, v katerem so vsi ostanki formulacije mehka masa brez otipljivega trdnega jedra (z izjemo fragmentov netopnih oblog ali ovojníc kapsule) (43). Na razpadnost tablet vplivajo PS (predvsem vrsta in količina razgrajeval, nekoliko manj veziva, drsila ter ostala polnila), pogoji proizvodnje trdnih FO (fizikalno–kemijske lastnosti granulata, trdnost in poroznost tablet) in medij (sestava, pH, temperatura) (44, 45).

Čas razpada je pokazatelj morebitnih interakcij med PS v tabletah ali kapsulah in komponentami medija, saj se v primeru pojava interakcij lahko značilno spremeni. Na primer, O. Honkanen s sodelavci (46) je izvajala primerjalni test razpadnosti kapsul z ovojnicjo iz želatine in iz hidroksipropilmetil celuloze, premrežene s karagenanom (HPMC_{kar}). Ugotovila je, da je v fosfatnem pufru z nevtralnim pH, ki vsebuje kalijeve ione (K^+), čas razpada HPMC_{kar} kapsul bistveno daljši in bolj variabilen v primerjavi s časom razpada želatinskih kapsul. Če je kot medij uporabila natrijev fosfatni pufer z enakim pH, pa so razlike v časih razpada kapsul ne glede na tip ovojnice bile zanemarljive. Rezultate so pojasnili s prisotnostjo K^+ ionov v pufru, ki naj bi s HPMC tvorili membrano okrog kapsule, kar je upočasnilo njen razpad. Drugi avtorji (47) so prišli do podobnih rezultatov pri določanju razpadnosti trdnih želatinskih kapsul in kapsul z ovojnicjo iz HPMC, premrežene z gelan gumijem (HPMC_{gel}). V fosfatnem pufru pH 7,2, ki je vseboval K^+ ione, so HPMC_{gel} kapsule razpadle kasneje kot želatinske, medtem ko v tris pufru pH 7,2 med razpadnostjo obojih kapsul ni bilo pomembnih razlik. Opažene razlike so pripisali počasnejšemu razpadu HPMC_{gel} kapsul v prisotnosti K^+ ionov oz. vezavi K^+ ionov na posamezne anionske skupine v polimerni vijačnici gelana, kar zniža gostoto naboja polimernih verig in posledično zmanjša elektrostatski odboj, ki preprečuje agregacijo. Topnost ovojnice kapsule se zato zmanjša, kar se odrazi v daljšem času njenega razpada. Predvidevajo, da se Na^+ ioni na vijačnice ne vežejo (tako učinkovito), zato je razpad HPMC_{gel} kapsul v pufru na osnovi natrijevega fosfata hitrejši kot v pufru na osnovi kalijevega fosfata (48, 49).

1.5.3 Raztapljanje

Test raztapljanja je standardizirana metoda za določanje deleža sproščene ZU oziroma hitrosti raztapljanja ZU iz FO (50). V farmacevtski industriji se uporablja za optimizacijo terapevtske učinkovitosti v razvoju novih izdelkov, pri kontroli kakovosti, napovedovanju bioekvivalence dveh formulacij in napovedovanju biološke uporabnosti (51).

Pri razvoju metod za testiranje raztapljanja je pri izbiri medija treba upoštevati tako lastnosti ZU, PS in formulacije, kot tudi morebitne interakcije med komponentami formulacije in medija. V primerih, ko dodajamo pufri PAS z namenom povečanja topnosti ali močljivosti ZU, moramo nameniti pozornost tudi morebitnim interakcijam PAS z ZU, PS ali s komponentami pufra (52). Na primer, ob dodatku natrijevega dodecilsulfata (ang. sodium lauryl/dodecyl sulphate - SLS/SDS) v puffer, ki vsebuje K^+ ione, lahko pride do obarjanja kalijevega dodecilsulfata. K^+ ioni z dodecilsulfatnim anionom tvorijo močnejše vezi kot Na^+ ioni, zato K^+ ioni izpodrinejo Na^+ ione iz SDS in tvorijo kalijev dodecilsulfat, ki je v vodi slabše topen od SDS, zato se obori (53, 54).

2 NAMEN DELA

Test raztapljanja ima pomembno vlogo v razvoju novih farmacevtskih izdelkov. Za napovedovanje *in vivo* raztapljanja oz. sproščanja ZU iz FO uporabljamo različne medije, ki ponazarjajo želodčno in črevesno vsebino. V začetnem delu tankega črevesa je pH v povprečju 6,8 na osnovi bikarbonatnega pufra, ki ga izloča trebušna slinavka. Uporaba bikarbonatnega pufra za teste raztapljanja ima praktične omejitve zaradi izhajanja CO₂ iz raztopine. Po priporočilih EMA in FDA se v skladu s Ph. Eur. in USP pri pH 6,8 uporablja fosfatni pufer, toda fosfati lahko nefiziološko interagirajo z ZU ali s pomožnimi snovmi v formulaciji. Poleg tega so interakcije s fosfati nefiziološke, hkrati pa v fosfatnem pufri manjkajo interakcije z bikarbonatom, ki so fiziološko relevantne. Posledično so lahko dobljeni rezultati zavajajoči pri napovedovanju *in vivo* raztapljanja.

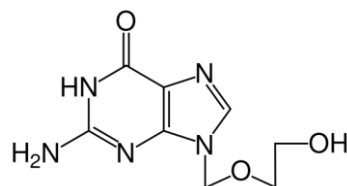
V diplomskem delu bomo najprej postavili kriterije in priporočila za pufre, ki so primerni za uporabo pri pH 6,8. Glede na lastnosti potencialnih kandidatov bomo izbrali primerne pufre za test raztapljanja. Poleg fosfata, ki je t.i. klasični pufer pri pH 6,8, bomo uporabili bikarbonat, ki je fiziološki pufer v tankem črevesu ter maleatni in bis-tris pufer. V raziskavi bomo uporabili ZU, ki so pri pH 6,8 različno ionizirane, vgrajene v ustrezne trdne FO.

V eksperimentalnem delu bomo preučili vpliv pufrov na topnost izbranih modelnih ZU, razpadnost tablet in raztapljanje modelnih ZU iz komercialnih trdnih farmacevtskih izdelkov v izbranih pufrih s pH 6,8. Koncentracijo raztopljenih ZU bomo določali spektrofotometrično in s HPLC metodami glede na lastnosti posamezne ZU oz. formulacije. S primerjavo profilov raztapljanja bomo ovrednotili smiselnost uporabe fosfatnega pufra za teste raztapljanja pri pH 6,8 in ocenili, ali bi bila primernejša uporaba bikarbonatnega pufra kljub kompleksnosti vzdrževanja ustrezne pH vrednosti. V eksperimentalnem delu bomo ovrednotili tudi uporabnost maleatnega in bis-tris pufra pri pH 6,8. Za vzdrževanje konstantnega pH bikarbonatnega pufra bomo uporabili napravo pHysio-stat in ocenili njeno primernost v *in vitro* vrednotenju raztapljanja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

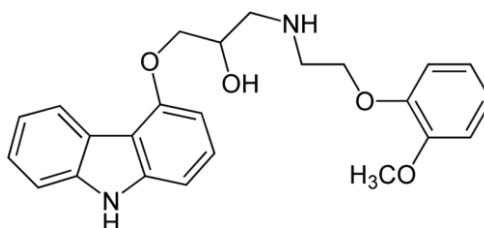
- Izbrane modelne zdravilne učinkovine; čistost (vse zdravilne učinkovine nam je za potrebe eksperimentalnega dela donirala KRKA, d.d., Novo mesto):
 - aciklovir; 100,0 %



Slika 2: Strukturna formula aciklovirja.

Aciklovir je bel kristaliničen prašek z molsko maso 225,2 g/mol (16). V vodi je težko topen, njegova topnost znaša 1,2–1,6 mg/mL pri sobni temperaturi (22–25 °C). Vsebuje šibko bazično ($pK_{a1} = 2,27$) in kislno funkcionalno skupino ($pK_{a2} = 9,04$). Najnižjo topnost, ki znaša 2,3 mg/mL, izkazuje v pufru s pH 5,8 pri 37 °C. (55).

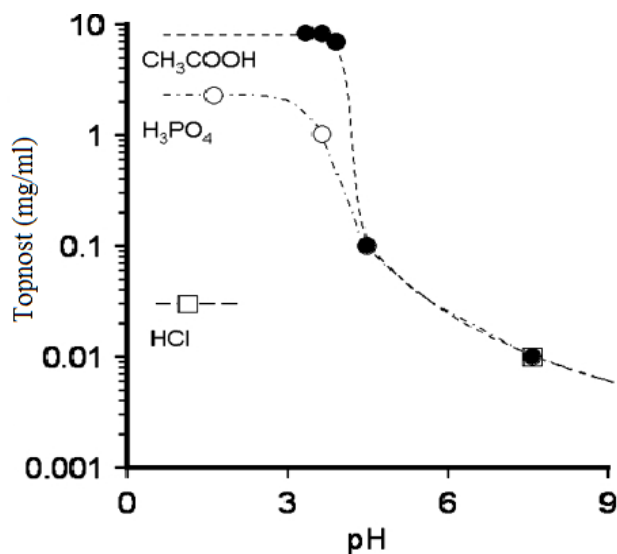
- karvedilol; 100,0 %



Slika 3: Strukturna formula karvedilola.

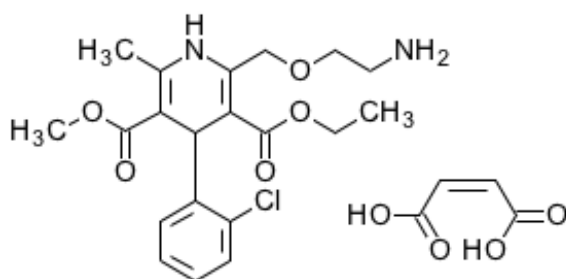
Karvedilol je bel kristaliničen prašek z molsko maso 406,5 g/mol. Izkazuje polimorfizem (16). Vsebuje sekundarno aminske funkcionalno skupino s pK_a 7,8, torej je pri pH 6,8 večinoma ioniziran (90,9 %) (56). Karvedilol je lipofilna, v vodi praktično netopna spojina, ki pri nizkih pH vrednostih tvori vodotopne soli. Njegova topnost narašča s padanjem pH vrednosti medija. V vodnih pufrskih raztopinah pri 25 °C je v bazičnem mediju nad pH 9,0 praktično netopen ($< 0,001$ mg/mL), ravno tako pri pH 7,4 (0,02 mg/mL), pri pH vrednostih pufov pod 5 pa se njegova topnost poveča na 0,1 mg/mL. Topnost karvedilola pri kisljih pH vrednostih (pH 1–4) je odvisna od uporabljene kisline (v dotični študiji so za uravnavanje pH k acetatnemu pufru s pH 4,5 dodali ustrezne količine 0,2–0,5 M očetne

kislina, 0,1 M in 0,3 M H_3PO_4 ter 0,2 M HCl). Znano je, da ima lahko dodajanje različnih kislin za uravnavanje pH znaten vpliv na topnost šibko bazičnih spojin, ker pri tem iz protonirane baze in različnih kislinskih anionov nastanejo soli z različnimi topnostnimi produkti. Kot je vidno na Sliki 4, je karvedilol v HCl približno 100-krat manj topen kot v H_3PO_4 in 400-krat manj topen kot v očetni kislini. Maksimalno topnost karvedilol izkazuje pod pH 2, toda pri uporabi presežnih količin HCl (za doseg pH pod 1,5) pride do zmanjšanja topnosti karvedilola zaradi pojava učinka skupnih ionov (57).



Slika 4: Topnost karvedilola pri uporabi različnih kislin za uravnavanje pH vrednosti medija na 1-4; očetna kislina-polni krog, fosforna kislina prazen krog, HCl prazen kvadrat (prirejeno po (57)).

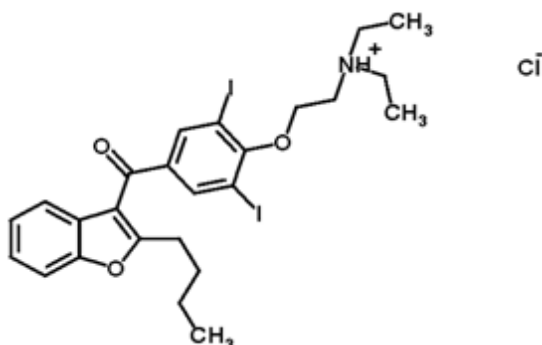
- amlodipinijev maleat; 100,2 %



Slika 5: Strukturna formula amlodipinijevega maleata.

Amlodipin v Ph. Eur. in USP nima lastne monografije. Predstavljena je njegova sol, amlodipinijev besilat, ki je opisan kot bel prašek, težko topen v vodi, lahko topen v metanolu in zmerno topen v etanolu (16, 20). Molska masa amlodipinijevega maleata znaša 525,0 g/mol (58). Je šibka baza s pK_a 8,79, kar pomeni, da je pri fizioloških pH vrednostih prebavnega trakta skoraj popolnoma ioniziran (99,0 % pri pH 6,8) (24).

- amiodaronijev klorid; 100,6 %



Slika 6: Strukturna formula amiodaronijevega klorida.

Amiodaronijev klorid je bel kristaliničen prašek z molsko maso 682,0 g/mol. Je zelo težko topen v vodi (700 mg/L pri 25 °C), lahko topen v metilen kloridu, topen v metanolu in zmerno topen v etanolu (16, 24). Njegova pK_a vrednost znaša 6,56. Najvišjo topnost ima v pH intervalu od 3,5 do 5,5 (59).

- Modelni komercialni izdelki:
 - tablete, ki vsebujejo 200 mg aciklovirja (tablete A)
 - tablete, ki vsebujejo 25 mg karvedilola (tablete B)
 - tablete, ki vsebujejo 10 mg amlodipina (v obliki maleatne soli) (tablete C)
 - tablete, ki vsebujejo 200 mg amiodaronijevega klorida (tablete D)
- Reagenti za pripravo medijev; čistost; vir:
 - kalijev dihidrogen fosfat; KH_2PO_4 ; $\geq 99,5$ % (Merck, Nemčija)
 - natrijev dihidrogen fosfat; NaH_2PO_4 ; $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, ZDA)
 - natrijev hidrogen karbonat; $NaHCO_3$; $\geq 99,7$ % (Sigma-Aldrich, ZDA)
 - bis-tris metan; $C_8H_{19}NO_5$; $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, ZDA)
 - maleinska kislina; $C_4H_4O_4$; 99,4 % (Krka, d. d., Slovenija)
 - natrijev hidroksid; NaOH, pelete; 97,0–100,5 % (Merck, Nemčija)
 - klorovodikova kislina; HCl; konc. (J. T. Baker, ZDA)
 - natrijev dodecilsulfat (SDS); $NaC_{12}H_{25}SO_4$; $\geq 99,0$ % (Merck, Nemčija)
- Ostale substance vključene v eksperimentalno delo (obe pomožni snovi nam je donirala KRKA, d.d., Novo mesto):
 - natrijev karboksimetilškrob vrsta A, Primojel[®]
 - mikrokristalna celuloza

3.2 Naprave

- analitska tehtnica Sartorius MSA623S-1CE-DE (Sartorius AG, Nemčija)
- analitska tehtnica Sartorius ME36S-0CE (Sartorius AG, Nemčija)
- stresalnik Vibromix 402 EV (Vibromix Lanka, Šri Lanka)
- inkubator Unihood 750 (UniEquip, Nemčija)
- UV/VIS spektrofotometer Agilent 8453 (Agilent Technologies, ZDA)
- pH meter Seven Multi (Mettler Toledo, Švica in ZDA)
- magnetno mešalo IKA[®] C-MAG MS7 (IKA-Werke, Nemčija)
- naprava za raztapljanje Agilent 708-DS (Agilent Technologies, ZDA)
- naprava za razpadnost Erweka ZT 72 (Erweka, Nemčija)
- kromatografski sistem HPLC Agilent Infinity 1260 (DAD, TCC, Hip ALS, Quat Pump VL, 1290 Thermostat) (Agilent Technologies, ZDA)
- naprava za vzdrževanje pH z dotokom CO₂ pHysio-stat (Physiolution, Nemčija)
- ultrazvočna kadička Sonis 10 (Iskra PIO d.o.o., Slovenija)
- 0,45 µm membrane in ohišje filtra Millex[®]-HA (Merck Millipore, ZDA)
- avtomatska pipeta 100-1000 µl Biohit mLINE (Sartorius Biohit, Finska)
- avtomatska pipeta 100-5000 µl Biohit eLINE (Sartorius Biohit, Finska)
- mikrocentrifuga Heraeus Fresco 17 (Thermo Electron corp., ZDA)
- hidravlična stiskalnica Carver[®], model 3393 (Carver Inc., ZDA)
- homogenizator Turbula[®], tip T2F (WAB, Švica)

3.3 Metode

3.3.1 Priprava medijev (za določanje topnosti, razpadnosti, test raztapljanja in redčenje vzorcev)

- 50 mM fosfatni pufer pH 6,8

- 50 mM KH_2PO_4

Raztopino smo pripravili tako, da smo natehtali 6,80 g kalijevega dihidrogen fosfata, ga prenesli v litrsko čašo in ga raztopili v 980 mL prečiščene vode. Posebej smo pripravili 0,2 M raztopino NaOH tako, da smo dodali 0,8 g NaOH v obliki pelet in ga raztopili. Po potrebi smo pH uravnali do 6,8 s sveže pripravljeno 2 M raztopino NaOH. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

- 50 mM NaH_2PO_4

Natehtali smo 6,00 g natrijevega dihidrogen fosfata, ga prenesli v litrsko čašo in ga raztopili v 980 mL prečiščene vode. Dodali smo 0,8 g NaOH v obliki pelet in ga raztopili. Po potrebi smo pH uravnali do 6,8 s sveže pripravljeno 2 M raztopino NaOH. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

- 50 mM bis-tris pufer pH 6,8

Medij smo pripravili tako, da smo natehtali 10,46 g bis-trisa, ga prenesli v litrsko čašo in raztopili v 980 mL prečiščene vode. pH smo uravnali do 6,8 s sveže pripravljeno 2 M raztopino HCl. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

- 50 mM maleatni pufer pH 6,8

Najprej smo natehtali 5,80 g maleinske kisline, jo prenesli v litrsko čašo in raztopili v 980 mL prečiščene vode. Nato smo dodali 3,8 g NaOH v obliki pelet in ga raztopili. pH pufra smo po potrebi uravnali na 6,8 z 2 M raztopino NaOH. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

- 50 mM bikarbonatni pufer pH 6,8

Pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 3,50 g natrijevega bikarbonata in ga raztopili v 1000 mL prečiščene vode. Čašo smo pokrili s parafilmom in s tem preprečili uhajanje ogljikovega dioksida ($\text{CO}_{2(g)}$) iz raztopine. pH smo uravnali na 6,8 z dovajanjem $\text{CO}_{2(g)}$ v raztopino s pomočjo naprave pHysio-stat za vzdrževanje pH z dotokom CO_2 .

- Pufri z dodatkom 0,25 m/vol% SDS

Pri določanju topnosti amiodaronijevega klorida ter raztapljanju tablet D, ki vsebujejo to ZU, smo pufrom dodali SDS z namenom izboljšanja topnosti amiodaronijevega klorida v medijih s pH 6,8. Pufre (fosfatni – NaH_2PO_4 , bis-tris, maleatni, bikarbonatni) smo pripravili po zgoraj opisanih postopkih.

- 50 mM fosfatni pufer pH 6,8 (NaH_2PO_4) + SDS

900 mL fosfatnega pufra pH 6,8, pripravljenega na osnovi NaH_2PO_4 smo prelili v litrsko čašo in ob mešanju z magnetnim mešalom dodali 2,5 g SDS ter z istim pufrom dopolnili do oznake.

- 50 mM bis-tris pufer pH 6,8 + SDS

900 mL bis-tris pufra pH 6,8 smo prelili v litrsko čašo in ob mešanju z magnetnim mešalom dodali 2,5 g SDS ter z bis-tris pufrom pH 6,8 dopolnili do oznake.

- 50 mM maleatni pufer pH 6,8 + SDS

900 mL maleatnega pufra pH 6,8 smo prelili v litrsko čašo in ob mešanju z magnetnim mešalom dodali 2,5 g SDS ter z maleatnim pufrom pH 6,8 dopolnili do oznake.

- 50 mM bikarbonatni pufer pH 6,8 + SDS

900 mL bikarbonatnega pufra pH 6,8 smo prelili v litrsko čašo in ob mešanju z magnetnim mešalom dodali 2,5 g SDS ter z bikarbonatnim pufrom pH 6,8 dopolnili do oznake in po potrebi ponovno uravnali pH.

- 0,1 M HCl

V 1000 mL bučko smo nalili približno 900 mL prečiščene vode in v digestoriju dodali 8,5 ml konc. HCl ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 50 mM natrijev fosfatni pufer pH 3,00

Natehtali smo 6,00 g natrijevega dihidrogen fosfata, ga prenesli v litrsko čašo in ga raztopili v 1000 mL prečiščene vode, ki smo jo odmerili z bučko. pH smo uravnali do 3,00 z 2 M raztopino HCl.

- 50 mM kalijev fosfatni pufer pH 3,00

Natehtali smo 6,80 g kalijevega dihidrogen fosfata, ga prenesli v litrsko čašo in raztopili v 980 mL prečiščene vode. pH smo uravnali do 3,00 z 2 M raztopino HCl. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

3.3.2 Določanje topnosti ZU s »shake-flask« metodo v fosfatnem, maleatnem in bis-tris pufri

Topnost ZU v fosfatnem, maleatnem in bis-tris pufri s pH 6,8 smo določili s saturacijsko »shake-flask« metodo, v vsakem pufri v petih paralelkah. V 20 mL vialo smo natančno natehtali ZU in s polnilno pipeto dodali 10 mL medija. Natehta ZU je bila zadostna za tvorbo prenasičene raztopine v izbranih pogojih okolja, in sicer smo glede na literarne podatke zagotovili vsaj trikrat prenasičene pogoje. Vialo smo zaprli in jih v inkubatorju stresali 24 ur s frekvenco stresanja 275 obratov na minuto (ang. RPM) pri temperaturi 37 °C. Po stresanju smo nasičeno raztopino filtrirali skozi 0,45 µm membranske filtre. Prvih 3–5 mL filtrata smo zavrgli, preostanek pa uporabili za nadaljnjo analizo. Na koncu smo rezultate primerjali z literarnimi podatki in se na ta način prepričali, da smo v 24-ih urah dosegli stanje ravnotežne topnosti.

Pri določanju topnosti amlodipinijevega maleata smo vialo ovili s folijo in vzorce redčili v temne bučke. S tem smo preprečili razpad fotosenzibilne ZU med izvajanjem testa. Pri določanju topnosti amiodaronijevega klorida nasičenih raztopin po stresanju nismo filtrirali, temveč centrifugirali 5 minut pri 12000 × g. Odvzeli smo ustrezne količine vzorcev, jih po potrebi redčili ter določili koncentracijo ZU spektrofotometrično ali s HPLC metodologijo.

3.3.3 Določanje topnosti ZU na napravi za raztapljanje v bikarbonatnem pufri

Topnost ZU v bikarbonatnem pufri s pH 6,8 smo določili na napravi za raztapljanje z vreteni v dveh paralelkah za vsako ZU. Postopek dela je bil enak kot pri raztapljanju tablet (opis v poglavju 3.3.5), le da smo namesto tablet v pufer dodali ZU v zadostni natehti, da je s pufrom tvorila vsaj trikrat prenasičeno raztopino, ter test izvajali 24 ur pri konstantni hitrosti vrtenja vreten 100 RPM. Začetni volumen pufrja je bil 500 mL. Steklene posode so bile med testom zaprte, z napravo pPhysio-stat pa smo v medij dovajali CO₂ in tako vzdrževali konstanten pH pufrja.

3.3.4 Razpadnost tablet

Za določanje razpadnosti tablet in komprimatov smo uporabili napravo A (po Ph. Eur.) za tablete in kapsule, ki niso daljše od 18 mm. V litrsko stekleno čašo smo nalili 700 mL medija in čašo postavili na termostatirano kopel. Nato smo vklopili grelni termostat in segreli medij na 37 ± 1 °C. Pred začetkom analize smo nastavili ničelno točko senzorjev med diski in dnom košarice s steklenimi cevkami. Ko je temperatura medija dosegla nastavljeno vrednost, smo v vsako od šestih steklenih cevk namestili po eno tableto in dodali disk. Košarico s steklenimi cevkami smo namestili na postajo, jo potopili v medij ter pričeli meriti čas razpada tablet. Kot medije smo uporabili fosfatni, bis-tris, maleatni in bikarbonatni pufer s pH 6,8 za vse modelne formulacije.

Bikarbonatnemu pufru smo pH uravnali na 6,8 z napravo pHysio-stat in čašo pokrili s parafilmom. Parafilm smo odstranili šele po segrevanju medija tik pred začetkom analize.

3.3.5 Test raztapljanja

Raztapljanje modelnih formulacij oziroma *in vitro* teste raztapljanja smo izvajali na napravi z vreteni (naprava 2 – ang. Paddle apparatus po Ph. Eur.). Uporabili smo modificirane steklene posode s konveksnim dnom v obliki stožca (t.i. konusne posode), ker v standardnih posodah s konkavnim dnom pri običajno uporabljeni hitrosti vrtenja vreten 50 RPM na dnu posode nastane t.i. »mrtva cona«, kjer so hidrodinamske obremenitve najmanjše. V tem območju se nalagajo razpadli delci formulacije ali cela formulacija, kar lahko upočasni raztapljanje ZU. Konveksno dno preprečuje nastanek »mrtve cone« in s tem minimizira vpliv nesorazmernosti tokov na raztapljanje oz. sproščanje (60).

Uporabili smo fosfatni, bikarbonatni, bis-tris in maleatni pufer s pH 6,8 kot medije za raztapljanje tablet A, B in C, pri raztapljanju tablet D pa smo v medije dodali še 0,25% SDS. Vsaki formulaciji smo profil raztapljanja določali v treh paralelkih v posameznem mediju. Medij smo segreli na $37 \pm 0,5$ °C, z merilnim valjem odmerili 900 mL termostatiranega medija ter napolnili posode. Hitrost vrtenja vreten smo nastavili na določeno vrednost, odvisno od analiziranih tablet (tablete A 25 RPM, tablete B 75 RPM, tablete C 25 RPM, tablete D 100 RPM). Med 45. in 60. minuto smo pri vseh formulacijah hitrost vrtenja vreten povišali na 200 RPM, da smo dosegli popoln razpad tablet. Tablete smo v posode spuščali v 20-sekundnih časovnih intervalih. Vzorčili smo ročno s pomočjo kanule in brizge po 10 mL vzorca po 5., 10., 15., 20., 30., 45. in 60. minuti brez vračanja medija. Odvzete vzorce smo filtrirali skozi 45 µm membranske filtre, prvih 3–5 mL filtrata

zavrgli, preostanek pa uporabili za določanje količine raztopljene ZU. Pri raztapljanju tablet, ki vsebujejo amiodaronijev klorid, smo odvzete vzorce namesto filtriranja centrifugirali 5 minut pri $12000 \times g$.

Pri testu raztapljanja amlodipinijevega maleata iz tablet C smo kopel na napravi za raztapljanje obdali s folijo in na steklene posode namestili pokrove ter tako zagotovili stabilnost fotosenzibilne ZU med izvajanjem poskusa. Vzorce smo redčili v temnih bučkah.

Pri uporabi bikarbonatnega pufru smo steklene posode zaprli s pokrovom in z napravo pHysio-stat v medij dovajali CO_2 ter tako vzdrževali konstanten pH pufru. Pred vsako uporabo smo nastavili ničelno točko z uporabo fosfatnega pufru pH 6,8.

3.3.6 Merjenje pH

pH meter smo pred vsakim merjenjem kalibrirali s standardnimi pufrskimi raztopinami s pH 1,68, 4,00, 7,00 in 10,01. S pomočjo pH metra smo pred izvajanjem testov uravnali pH pufrov na določeno vrednost in v končnih raztopinah preverili, ali je prišlo do spremembe pH. Pri določanju topnosti in testu raztapljanja, kjer smo vzorce filtrirali, smo od filtrata najprej odvzeli del vzorca in ga po potrebi ustrezno redčili z medijem, v katerem je ZU dobro topna in stabilna, preostali filtrat pa smo ohladili na sobno temperaturo in mu izmerili pH. Pri določanju topnosti in testu raztapljanja amiodaronijevega klorida smo iz odvzetega vzorca najprej odpipetirali 1,5 mL vzorca za nadaljnje centrifugiranje, preostalemu delu vzorca pa smo po ohladitvi na sobno temperaturo izmerili pH.

3.3.7 UV/VIS spektrofotometrija

Koncentracijo oziroma delež raztopljene ZU smo določili z UV/VIS spektrofotometrijo. Za vrednotenje raztopljene ZU s spektrofotometrično metodo smo dnevno pripravili raztopino standarda za vsako ZU, kot je prikazano v Preglednici IV. Natančno smo natehtali približno količino posameznega standarda, ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in z medijem dopolnili do oznake. Popolno raztapljanje standardov smo zagotovili tako, da smo bučke za 10 minut postavili v ultrazvočno kadičko. Raztopine standardov smo pripravili (in po potrebi redčili) v enakih medijih, s katerimi smo redčili vzorce.

Preglednica IV: Priprava raztopin standardov ZU.

standard	natehta (mg) *	medij	faktor redčenja	koncentracija (mg/L) *	absorpcijski maksimum (nm)
aciklovir	38 – 43	0,1 M HCl	20,83	18 – 21	255
karvedilol	3 – 6	0,1 M HCl	brez	30 – 60	332
amlodipinijev maleat	5 – 8	50 mM K-fosfat pH 3,00	brez	50 – 80	365

* Raztopine standardov smo pripravljali dnevno, zato so natehte in koncentracije podane z intervalom.

Vzorci za spektrofotometrično analizo smo takoj po filtriranju (oziroma centrifugiranju) redčili z medijem, v katerem je ZU dobro topna in stabilna. Z izbiro ustreznega medija in faktorja redčenja smo podaljšali stabilnost ZU oziroma preprečili njeno obarjanje pri ohladitvi na sobno temperaturo ter zagotovili koncentracije, katerih absorbanca je bila v linearnem območju. Linearnosti, specifičnosti in točnosti metode nismo preverjali, ker je bila že predhodno preverjena in dokazana v interni dokumentaciji podjetja. Priprava vzorcev po raztapljanju tablet je prikazana v Preglednici V.

Preglednica V: Priprava vzorcev po raztapljanju tablet za spektrofotometrično oz. HPLC analizo.

komercialne tablete	koncentracija ZU po raztapljanju 1tbl/900 mL (mg/L)	medij za redčenje	faktor redčenja	koncentracija po redčenju (mg/L)
A	222	0,1 M HCl	16,67	13,3
B	27,8	0,1 M HCl	2	13,9
C	14,3	50 mM K-fosfat pH 3,00	2	7,1
D	222	50 mM Na-fosfat pH 3,00	5	44,4

Pripravili smo tudi slepe vzorce na enak način kot vzorce (medij, faktor redčenja), vendar brez ZU, jim izmerili absorbanco ter jo odšteli od absorbance vzorcev.

Delež raztopljenе ZU pri testu raztapljanja smo določili po naslednjem računskem postopku:

Celokupna masa raztopljenе ZU ob določenem času (mg):

$$m_{\text{RAZT}n} = \frac{(A_{\text{vz}} - A_{\text{sl.vz}}) \times Z_{\text{st}} \times P_{\text{st}} \times V_m \times [V_m - (n - 1) \times V_{\text{al}}]}{(A_{\text{st}} - A_{\text{sl.st}}) \times fR_{\text{st}} \times fR_{\text{vz}}} + \sum_{i=1}^{n-1} m_{\text{ALIK}n}$$

Enačba 7

A_{vz} – absorbanca vzorca

A_{st} – absorbanca standarda

$A_{\text{sl.vz}}$ – absorbanca slepe raztopine vzorca

$A_{\text{sl.st}}$ – absorbanca slepe raztopine standarda

Z_{st} – natehta standarda (mg)

P_{st} – vsebnost standarda na brezvodno snov v %

fR_{st} – faktor redčenja raztopine standarda

fR_{vz} – faktor redčenja raztopine vzorca

V_m – začetni volumen medija za raztapljanje (mL)

V_{al} – volumen alikvota (mL)

PV – predpisana vsebnost ZU v testiranem vzorcu (mg)

n – zaporedna številka vzorcev ($n = 1$ do 7)

Masa raztopljenе ZU v volumnu alikvota ob določenem času (mg):

$$m_{\text{ALIK}n} = \frac{V_{\text{al}}}{[V_m - (n - 1) \times V_{\text{al}}]} \times \left(m_{\text{RAZT}n} - \sum_{i=1}^{n-1} m_{\text{ALIK}n} \right)$$

Enačba 8

% raztopljenе ZU ob določenem času:

$$\% \text{ razt}_n = \frac{m_{\text{RAZT}n} \times 100}{PV}$$

Enačba 9

Topnost ZU (mg/L) smo izračunali s pomočjo naslednje enačbe:

$$C_{\text{ZU}} = \frac{(A_{\text{zu}} - A_{\text{sl.zu}}) \times Z_{\text{st}}}{(A_{\text{st}} - A_{\text{sl.st}}) \times V_b \times fR_{\text{st}} \times fR_{\text{zu}}}$$

Enačba 10

A_{zu} – absorbanca ZU

$A_{\text{sl.zu}}$ – absorbanca slepe raztopine ZU

V_b – volumen bučke (L)

fR_{zu} – faktor redčenja raztopine ZU

3.3.8 HPLC metodologija za vrednotenje raztopljenih količin zdravilnih učinkovin

Za kvantifikacijo raztopljenih ZU smo uporabili tudi tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (ang. HPLC). Za aciklovir, karvedilol in amlodipinijev maleat smo uporabili iste raztopine standardov kot pri spektrofotometrični analizi. Raztopino standarda amiodaronijevega klorida smo pripravili tako, da smo natančno natehtali približno 15 mg standarda amiodaronijevega klorida in ga raztopili v 100 mL medija (50 mL acetonitrila + 50 mM Na-fosfat pH 3,00 do 100 mL). Acetonitril smo uporabili zaradi povečanja topnosti amiodaronijevega klorida, ki se v natrijevem fosfatnem pufru brez dodatka SDS ne bi raztopil. Bučko smo za 10 minut postavili v ultrazvočno kadičko. Vzorce smo pripravili po enakem postopku kot za spektrofotometrično analizo (medij, faktor redčenja). Pogoji HPLC analize za posamezno ZU so predstavljeni v Preglednici VI.

Preglednica VI: Pogoji analize vzorcev s HPLC metodologijo.

ZU	aciklovir	karvedilol	amlodipinijev maleat	amiodaronijev klorid				
kolona	Agilent Zorbax Sb-Aq (150 mm × 4,6 mm, 5 µm delci)	Phenomenex Gemini NX C18 (5 mm × 4,6 mm, 5 µm delci)						
mobilna faza	A: 25 mM amonijev acetat brez korekcije pH B: acetonitril							
gradient	t [min]	% B	t [min]	% B	t [min]	% B	t [min]	% B
	0,0	0	0,0	20	0,0	20	0,0	25
	3,0	10	2,5	50	2,5	50	2,0	50
	3,1	0	2,6	20	2,6	20	2,1	25
	4,0	0	3,5	20	3,5	20	3,0	25
pretok	2,2 mL/min		3,0 mL/min					
T kolone	45 °C		35 °C		35 °C		35 °C	
V inj.	50 µl		20 µl		20 µl		10 µl	
λ	252/4		330/8		248/4		240/8	
run time	4,0 min		3,5 min		3,5 min		3,0 min	
Rt	2,7		2,0		1,4		1,8	
S/N (std)	5800		8540		3005		7075	
N (std)	13500		7870		4050		3600	

Delež raztopljenih ZU pri testu raztapljanja oziroma topnost ZU smo določili po enakem računskem postopku kot pri spektrofotometrični metodi (*Enačbe 7, 8, 9 oziroma 10*). Namesto absorbanc smo upoštevali površine pod kromatografskimi vrhovi. Slepri vzorci niso imeli kromatografskih vrhov, zato jih pri računskem postopku nismo odštevali.

3.3.9 Izdelava komprimatov

Izdelali smo dve seriji po 24 komprimatov. Za prvo serijo smo pripravili praškasto zmes iz 5 % natrijevega karboksimetil škroba in 95% mikrokristalne celuloze in jo homogenizirali na homogenizatorju Turbula[®], medtem ko smo za drugo serijo uporabili samo mikrokristalno celulozo. Natehtali smo 140–160 mg praškastega vzorca, ga prenesli v matrično vdolbino ter vanjo vstavili pečat. Nato smo na hidravlični stiskalnici Carver[®] s silo 2-eh ton praškasti vzorec stisnili v komprimat.

3.3.10 Statistična obdelava rezultatov

Za medsebojno primerjavo rezultatov topnosti ZU, časov razpada tablet in komprimatov, deležev raztopljenih ZU ter sprememb v pH vrednosti smo uporabili Benjamini–Hochbergovo metodo. Ta metoda se uporablja za multiple primerjave, kadar je cilj zmanjšati število lažno pozitivnih rezultatov ter povečati moč poskusa (61). Z ustreznim t-testom smo izračunali p-vrednosti obravnavanih rezultatov in jih razvrstili od najmanjše do največje vrednosti. Najmanjši p-vrednosti smo določili rang 1, naslednji rang 2 in največji rang N. Nato smo vsako vrednost pomnožili z N in delili s pripadajočim rangom ter s tem izračunali prirejene p-vrednosti. Izbrali smo vrednost α 5 % in vse rezultate, ki so imeli prirejene p-vrednosti manjše od α , označili kot pomembno različne.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Izbira ustreznih pufrov

Pri testu raztapljanja smo želeli posnemati *in vivo* pogoje v začetnem delu tankega črevesa. Upoštevajoč dejstvo, da predvsem bikarbonatni puffer preprečuje spremembe pH črevesne vsebine, smo se pri izbiri medijev odločili za uporabo puferskih raztopin. Glede na to, da pH v začetnem delu tankega črevesa v povprečju znaša 6,8, smo izbirali med pufri, ki pri omenjeni pH vrednosti zagotavljajo ustrezno pufersko kapaciteto.

4.1.1 Fosfatni puffer

Praktičnost in enostavnost za uporabo sta bili vodilni smernici pri iskanju nadomestnih pufrov za posnemanje fiziološkega bikarbonata (23). Fizikalno–kemijska nestabilnost bikarbonata je kot želeno lastnost nadomestnega pufra v ospredje postavila fizikalno–kemijsko stabilnost, zato so fosfatni pufri postali favorizirani mediji za teste raztapljanja (62). Zaradi omenjenih dejstev njihovo uporabo za teste raztapljanja pri pH 6,8 priporočajo evropski in ameriški regulatorni organi (EMA in FDA), ki temeljijo na smernicah Ph. Eur. in USP. Skladno z njihovimi priporočili smo tudi mi kot primarni medij uporabili fosfatni puffer z izbranim pH.

Kot je opisano v poglavju 1.4.1, ima fosfatni puffer številne pozitivne značilnosti. Kljub številnim ugodnim lastnostim je v nekaterih primerih problematičen medij za teste raztapljanja. To velja za formulacije, ki vsebujejo ZU v obliki kalcijevih, magnezijevih ali aluminijevih soli zaradi inkompatibilnosti fosfatov z dvovalentnimi in trivalentnimi kationi. Pri uporabi fosfatnega pufra za vrednotenje raztapljanja ZU v obliki fosfatnih soli lahko pride do učinka skupnih ionov, pri raztapljanju bazičnih ZU pa obstaja možnost nastanka nove fosfatne soli, ki je v FO ni (kot posledica ionskih interakcij med fosfatnimi anioni v pufri in kationi bazične ZU). Navedene slabosti fosfatnega pufra lahko privedejo do lažno prenizkih ali previsokih rezultatov pri določanju deleža raztopljenega ZU glede na *in vivo* dogajanje. Zaradi naštetih pomanjkljivosti fosfatnega pufra smo poskusili poiskati in v eksperimentalnem delu ovrednotiti nadomestni puffer, ki bi bil za teste raztapljanja pri pH 6,8 bolj primeren kot fosfat. Za ta namen smo določili kriterije in priporočila, ki naj bi jih nadomestni puffer izpolnjeval.

4.1.2 Določitev kriterijev in priporočil

Na podlagi priporočil EMA in FDA, pogoste uporabe in opisanih prednosti smo fosfatni pufer upoštevali kot osnovo pri postavljanju kriterijev in priporočil za izbiro nadomestnega pufra. Idealni pufer, ki bi izpolnjeval vse postavljene kriterije in priporočila za test raztapljanja (še) ne obstaja, zato smo se izbire pufrov lotili po sistemu izločanja. Z upoštevanjem primarnega kriterija (pK_a v območju $6,8 \pm 1,0$) smo najprej izpostavili nekatere potencialne kandidate in jih nato glede na izpolnjevanje / neizpolnjevanje sekundarnih kriterijev (zadostna topnost v vodi in čim manjša toksičnost za človeka ter okolje) označili kot ustrezne / neustrezne. Sekundarna kriterija smo torej privzeli kot nujen pogoj, medtem ko smo priporočene lastnosti upoštevali kot zaželene, vendar ne nujne.

4.2 Neustrezni pufri

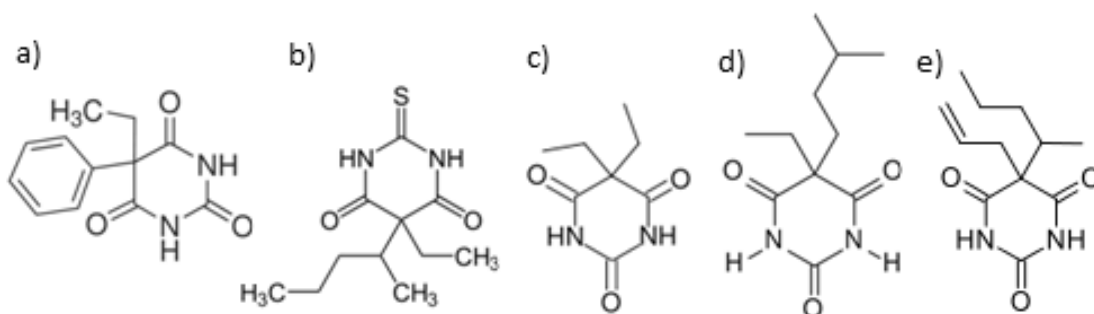
Izpostavili smo nekatere spojine, ki ustrezajo primarnemu kriteriju, toda ne izpolnjujejo sekundarnih kriterijev in/ali njihove lastnosti nesprijemljivo odstopajo od priporočil, opisanih v poglavju 1.4.2.

- **Derivati barbiturne kisline**

Barbiturati, naštetih v Preglednici VII in prikazani na Sliki 7 imajo pK_a vrednosti v ustreznem intervalu, vendar se barbituratom kot reagentom na splošno izogibamo zaradi njihove toksičnosti (24, 28, 63). Poleg tega imajo sedativni in hipnotični učinek, ob večkratni izpostavljenosti povzročajo fizično in psihično odvisnost (64). Kljub temu se 5,5'-dietilbarbiturat ali barbital uporablja kot pufer pri seroloških testih, natančneje kot topilo in stabilizator pri elektroforetični ločbi seruma na agaroznem gelu (65). Barbiturati (Preglednica VII) so v vodi preslabo topni, da bi ustrezali kriteriju o topnosti (topnost v vodi vsaj 50 mM) (24, 25). Njihove soli so v vodi boljše topne, toda ob vzpostavitvi ravnotežja pri pH 6,8 bi se šibka kislina začela obarjati. 5,5'-disubstituirani barbiturati tudi cenovno preveč odstopajo od postavljenega priporočila (28). Opisane barbiturate smo zaradi neizpolnjevanja sekundarnih kriterijev o toksičnosti in topnosti ter priporočila o cenovni dostopnosti izločili iz nadaljnje obravnave.

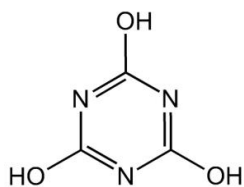
Preglednica VII: pK_a vrednosti, toksičnost, topnosti in cena barbituratov z ustreznim pK_a .

barbiturat	pK_a	toksičnost	topnost v vodi pri 25 °C (mM)	cena za pripravo 1L50 mM puфра
fenobarbital	7,30	R25, R40, R43, R61 in S45, S53, S36/37/38	4,8	-
tiopental	7,55	R22	0,4	-
5,5'-disubstituirani barbiturati	6,5–8,0	R22	40	8,7 EUR (natrijev barbital)
amobarbital	7,84	R28, R32, R50/53	2,7	-
sekobarbital	7,80	R25, R36/37/38 in S26, S45	2,3	-



Slika 7: Strukturne formule opisanih barbituratov; a) fenobarbital, b) tiopental, c) 5,5'-diethylbarbital / veronal, d) amobarbital, e) sekobarbital.

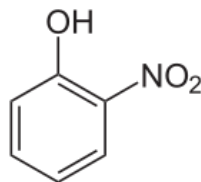
- Cianurična kislina in cianurati**



Slika 8: Strukturna formula cianurične kisline.

Cianurična kislina ima pK_{a1} pri 6,88, njena topnost v vodi znaša 20 mM pri 25 °C (24). Cianurična kislina in cianurati s kloridnimi anioni tvorijo stabilne komplekse v območju pH okrog 7 (66). Visok delež kationskih ZU je v FO vgrajen v obliki kloridnih soli (40,0 %), zato bi pri testu raztapljanja, ki ga izvajamo pri pH 6,8, prišlo do interakcije in tvorbe kompleksov med ZU in komponentami puфра (30). Glavna pomanjkljivost cianurične kisline je nezadostna topnost v vodi, prav tako je cianuratni pufer neustrezen iz vidika interakcij.

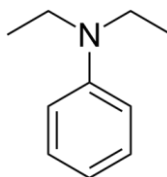
- **2-nitrofenol**



Slika 9: Strukturna formula 2-nitrofenola.

pK_a orto-nitrofenola znaša 7,23 pri 25 °C. Njegova topnost v vodi je 18 mM, zato ne izpolnjuje kriterija o topnosti (24).

- ***N,N*-dietilanilin**



Slika 10: Strukturna formula *N,N*-dietilanilina.

N,N-dietilanilin ima pK_a 6,57. Zaradi nezadostne topnosti v vodi, ki znaša 0,9 mM, ni primeren kot medij za raztapljanje (24).

- **Kakodilna kislina ((CH₃)₂AsO₂H) in kakodilati**

Kakodilatni pufer s pK_a 6,29 (67) ni primeren medij za vrednotenje raztapljanja, ker je nevaren za zdravje (arzenove spojine so dokazano rakotvorne) in škodljiv za okolje (R23/25, R50/53 in S1/2, S20/21, S28, S45, S60, S61) (68). Cena reagentov za pripravo 1L 50 mM kakodilnega pufera je relativno visoka (natrijev kakodilat trihidrat stane približno 19 EUR oziroma kakodilna kislina in NaOH 26 EUR) (28, 69). Kljub toksičnosti se kakodilatni pufer še vedno uporablja v elektronski mikroskopiji kot del fiksacijskih raztopin za ohranitev celične strukture, ker fosfatni pufer lahko poškoduje celične organele (70).

- **Arzenova kislina (H₃AsO₄) in arzenati**

Arzenova kislina ima pK_{a2} 7,09 pri 25 °C (24). Arzenatni pufer ni primeren medij za raztapljanje, ker so arzenove spojine strupene in nevarne za zdravje ter škodljive za okolje (R45, R23/25, R50/53 in S53, S45, S60, S61) (28).

- **Hipoklorna kislina (HClO) in hipokloriti**

Hipoklorna kislina ima pK_a 7,53. Njene soli, hipokloriti, imajo neprijeten vonj po kloru (24). Hipokloriti so nestabilne spojine. Počasi se razgradijo že pri stiku z zrakom do strupenega klora in kisika, razgradnja je hitrejša pri segrevanju, na primer natrijev hipoklorit začne razpadati že pri segrevanju nad $35\text{ }^\circ\text{C}$ (24, 71). Hipokloriti so strupeni in nevarni za človeka in okolje (R8, R22, R31, R34, R50 in S26, S36/37/39, S45, S61) (28). Zaradi navedenih lastnosti hipoklorna kislina in hipokloriti niso primerni kot medij za vrednotenje raztapljanja.

- **Kromova (VI) kislina (H_2CrO_4) in kromati (VI)**

pK_{a2} vrednost kromove (VI) kisline znaša 6,47 (72). Natrijev kromat je higroskopska spojina, ki že ob stiku z zračno vlagom lahko tvori tetra-, heksa- in dekahidrate. Tako kot vse kromove (VI) spojine so tudi kromova (VI) kislina ter kromati zelo strupeni in kancerogeni (R8, R21/22, R23, R34, R42/43, R45, R46, R48/20, R51/53, R62 in S45, S60, S61) (24, 73).

- **Hipodušikova kislina ($\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$) in hiponitriti**

Hipodušikova kislina ima pK_{a1} 7,21. Puffer iz hipodušikove kisline in hiponitritov je prezahteven za pripravo. Ne moremo ga pripraviti iz hiponitritov, ker je izolirane natrijeve hiponitrite treba prečistiti s procesom, ki vključuje njihovo pretvorbo v slabše topno (zmerno topno) srebrovo sol. Priprava pufra iz hipodušikove kisline prav tako ni primerna, ker hipodušikova kislina v trdni obliki tvori nestabilne eksplozivne kristale, medtem ko ima v obliki vodne raztopine relativno kratek razpolovi čas, ki znaša 16 dni pri 25°C pri pH 1–3 (74, 75).

- **Žveplova (IV) kislina (H_2SO_3) in bisulfiti**

Žveplova (IV) kislina ima pK_{a2} 7,00. Njene soli, bisulfiti, imajo vonj po žveplu, ker se ob stiku bisulfitov z zrakom sprošča strupen plin žveplov dioksid (24). Vodne raztopine bisulfitov so škodljive za zdravje (R20, R34 in S26, S36/37/39, S45) (28). Zaradi neprijetnega vonja in nevarnosti za zdravje puffer ni primeren.

Naštete spojine smo zaradi neizpolnjevanja sekundarnih kriterijev in nedopustnega odstopanja od postavljenih priporočil označili kot neprimerne za pripravo pufrov za vrednotenje raztapljanja pri pH 6,8 in izločili iz nadaljnje obravnave.

4.3 Izbrani pufri

Pri iskanju nadomestnega pufra za fosfat nismo našli idealne zamenjave, ki bi hkrati ustrezala vsem kriterijem in priporočilom, zato smo izbrali več pufrov, ki izpolnjujejo postavljene kriterije, ne pa tudi vseh priporočil.

4.3.1 Bikarbonatni pufer

Bikarbonatni pufer je v primerjavi z ostalimi pufri najprimernejši za ponazarjanje pogojev v človeškem tankem črevesu, ker se s svojo ionsko sestavo najbolj približa *in vivo* pogojem (76). Natrijev bikarbonat, ki se uporablja za pripravo bikarbonatnega pufra, je v vodi pri sobni temperaturi topen, njegova topnost znaša 96 mg/mL oziroma 1,1 M pri 20 °C (77). Je varen za uporabo, ker minimalno škoduje zdravju (R36 in S22, S26) in je neškodljiv za okolje; posledično pufer ustreza postavljenim sekundarnim kriterijem (78). Cenovno je relativno ugoden, saj cena NaHCO₃ za pripravo 1L 50 mM bikarbonatnega pufra znaša 0,15 EUR (28). Za pripravo potrebujemo tudi CO₂, ki ga zaradi varčnega sistema (glej pHysio-stat v nadaljevanju poglavja) porabimo relativno malo. Pri merjenju absorbanca ZU, raztopljenih v bikarbonatnem pufri smo pokazali, da komponente bikarbonatnega pufra absorbirajo minimalni delež UV svetlobe v območju valovnih dolžin, kjer imajo absorpcijske maksimume modelne ZU (255–365 nm). Kljub temu, da je bikarbonat prevladujoč pufer v človeškem prebavnem traktu, se redko uporablja kot medij za teste raztapljanja zaradi fizikalno–kemijske nestabilnosti (23). Vzrok za nestabilnost je uhajanje CO₂ iz raztopine, kar privede do postopnega zviševanja pH in spremembe pufirske kapacitete (76).

Kot je razvidno iz *Enačbe 6*, je v raztopini bikarbonatni anion v ravnotežju z ogljikovo kislino in raztopljenim CO₂, ki je hkrati v ravnotežju s plinom CO₂ v ozračju. Ob predpostavki, da se bikarbonatni pufer obnaša kot idealna raztopina, zanj velja Henryjev zakon: pri stalni temperaturi je količina plina, raztopljenega v danem volumnu topila sorazmerna parcialnemu tlaku tega plina nad raztopino (*Enačba 11*). Henryjev zakon torej pojasnjuje uhajanje plina CO₂ iz raztopine, kajti koncentracija CO₂ v zraku (0,39%) pogojuje 0,5 mM bikarbonatni pufer s pH 6,8 pri 37 °C oz. pri uporabljeni koncentraciji bikarbonata (50 mM) pH 8,8 (79).

$$c_i = k_H \times p_i$$

Enačba 11

c_i – množinska koncentracija raztopljenega plina v raztopini (mol/L)

p_i – parcialni tlak plina nad raztopino (mm Hg)

k_H – Henryjeva konstanta (mol/L×mm Hg); k_H (CO₂) znaša 0,03 mM/mm Hg pri 37 °C (80).

Osnovni princip stabilizacije bikarbonatnega puфра je vzdrževanje ravnotežja med raztopljenim CO_{2(aq)} in CO_{2(g)} nad raztopino. Uporabljata se dva pristopa.

- Preprečevanje uhajanja CO_{2(g)} iz raztopine:
 - posebne, popolnoma zatesnjene posode na napravi za raztapljanje;
 - dodatek plasti tekočega parafina nad pufrom;
 - vzdrževanje konstantnega parcialnega tlaka CO₂ nad raztopino z dovajanjem CO₂ nad raztopino (62).
- Kvantitativno nadomeščanje izgubljenega CO_{2(g)}:
 - konstantno prepihanje puфра s CO₂ atmosfero med testom raztapljanja (76).

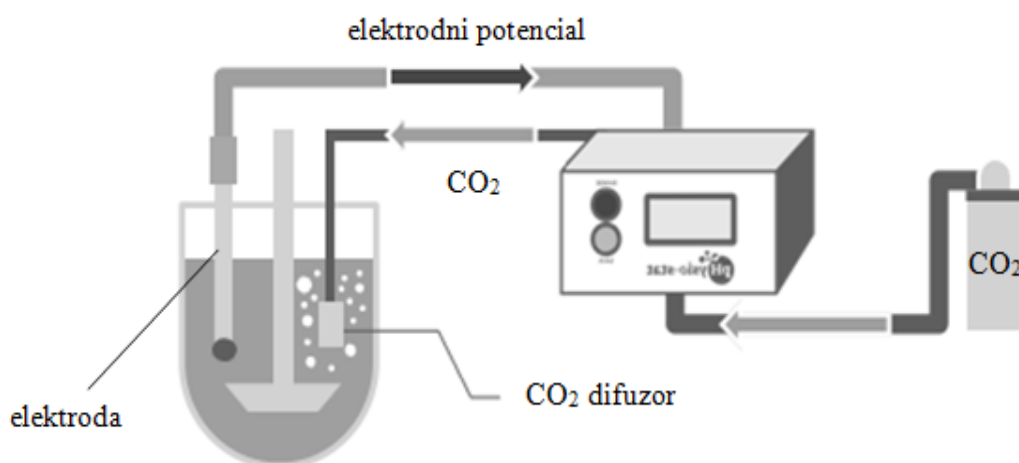
Bikarbonatni pufer izpolnjuje naše kriterije in večino priporočil o pufrih za teste raztapljanja pri pH 6,8, dodatno prednost pa predstavlja njegova ionska sestava, ki je enaka fiziološkemu bikarbonatu v jejunumu, zato smo ga uvrstili med izbrane pufre. Priporočiloma o stabilnosti ter enostavni pripravi in uporabi sicer ne ustreza, a smo ga kljub temu uporabili, saj smo s primerjavo profilov raztapljanja ZU v bikarbonatu s profili v ostalih izbranih pufrih vrednotili primernost uporabe le-teh za teste raztapljanja pri pH 6,8.

Stabilizacijo bikarbonatnega puфра smo dosegli s prepihanjem puфра s CO₂ atmosfero s pomočjo **naprave pHysio-stat**. Slednja je avtomatizirana naprava (Slika 11), ki omogoča uravnavanje pH vrednosti medija v posamezni posodi na napravi za raztapljanje (81).



Slika 11: Naprava pHysio-stat.

Celoten sistem za vzdrževanje pH bikarbonatnega pufru z dotokom CO₂ je sestavljen iz pH elektrode, plinskega difuzorja, digitalnega mikroupravljalnika in elektromagnetnega ventila. Naprava ima vgrajen algoritem, ki nadzoruje uravnavanje pH in omogoča nastavitve želene pH vrednosti v pH območju od 5,5 do 9,0 ter vzdržuje pH vrednost znotraj farmakopejsko predpisanega območja $\pm 0,05$ enote ali natančneje. Med testom raztapljanja sta pH elektroda in plinski difuzor potopljeni v mediju, elektrodni potencial se ves čas trajanja poskusa meri in s pomočjo digitalnega mikroupravljalnika pretvarja v digitalni signal. Obdelan digitalni signal omogoča takojšnjo prilagoditev elektromagnetnega ventila, ki preko difuzorja uravnava dotok CO₂ v medij. Difuzor je z napravo povezan s cevko. Shematska ponazoritev delovanja celotnega sistema za vzdrževanje pH je prikazana na Sliki 12 (81).



Slika 12: Shematski prikaz delovanja celotnega sistema za vzdrževanje pH bikarbonatnega pufru (prirejeno po (81)).

Pred vsako uporabo naprave pHysio-stat smo elektrodo potopili v fosfatni pufer s pH 6,8 (ki smo ga predhodno uravnali s pH metrom) in izmerjeno električno napetost nastavili kot ničelno točko. Ker je naprava prikazovala samo napetost, smo za lažje spremljanje pripravili fosfatni pufer s pH vrednostmi od 6,0 do 7,5, kot prikazuje Preglednica VIII ter mu izmerili napetost pri vsakem pH. S pomočjo dobljenih vrednosti smo določili enačbo za pretvorbo napetosti v pH enote (*Enačba 12*).

Preglednica VIII: Električna napetost, izmerjena z napravo pHysio-stat pri različnih pH vrednostih fosfatnega pufra.

pH fosfatnega pufra	izmerjena napetost (mV) (povprečje 3-eh paralelk)
6,00	-1,11
6,10	-0,98
6,20	-0,82
6,30	-0,73
6,40	-0,57
6,50	-0,44
6,60	-0,28
6,70	-0,14
6,80	0,00
6,90	0,18
7,00	0,34
7,10	0,47
7,20	0,60
7,30	0,75
7,40	0,91
7,50	1,05

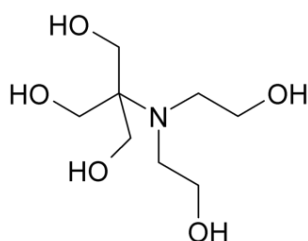
$$pH = 6,7828 + 0,6870 \times U(mV) \Rightarrow \Delta pH = 0,6870 \times \Delta U(mV)$$

Enačba 12

$$R^2 = 0,999$$

Naprava pHysio-stat se je izkazala kot enostavna za uporabo, ker je po nastavitvi ničelne točke avtomatsko uravnala in vzdrževala ustrezen pH pufra. Namestitev elektrode, cevke, kanule in difuzorja skozi pokrov v stekleno posodo na napravi za raztapljanje pa je bil zamuden proces, ki zahteva nekoliko spretnosti. Poleg tega smo v pufer dovajali CO₂, zato bi pri izvedbi testa raztapljanja na napravi s košaricami lahko nastajali mehurčki plina na mreži košarice, kar bi spremenilo hidrodinamiko v košarici v primerjavi s fosfatnim pufrom. Posledično rezultati ne bi bili primerljivi z rezultati v fosfatnem pufu. Elektroda, kanula in difuzor so bili med poskusom potopljeni v pufru, kar je vplivalo na njegovo hidrodinamiko. Menimo, da bi dodatne prilagoditve sistema za vzdrževanje pH bikarbonatnega pufra, ki bi omogočale enostavnejšo in hitrejšo namestitev ter manjši vpliv na hidrodinamiko bikarbonatnega pufra, še izboljšale uporabnost sistema.

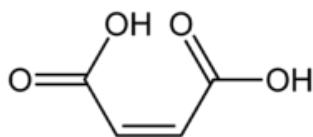
4.3.2 Bis–tris pufer



Slika 13: Strukturna formula bis-tris metana.

Bis-tris je okrajšava trivialnega imena bis(2-hidroksietil)-amino-tris(hidroksimetil)-metan oziroma po IUPAC 2-[bis(2-hidroksietil)amino]-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol (82). pK_a vrednost bis-trisa znaša 6,46 (29). S topnostjo v vodi 209 mg/mL oziroma 1,0 M pri 20 °C se uvršča med lahko topne substance (28). S stališča toksičnosti spada v isto kategorijo kot fosfatni pufer, in sicer povzroča draženje kože, oči in dihalnih poti (R36/37/38 in S26, S36). Med pripravo pufra je poleg standardne varovalne opreme za delo v laboratoriju priporočljivo nositi še dihalno masko (83). Cena substanc za pripravo 1L 50 mM bis-tris pufra pH 6,8 znaša približno 3,8 EUR (bis-tris 3,38 EUR in koncentrirana HCl 0,46 EUR) (28). Pri spektrofotometričnem določanju koncentracij ZU, raztopljenih v bis-tris pufu smo ugotovili, da je absorbanca bis-tris pufra motila detekcijo ZU. Zaradi omenjenih dejstev bis-tris pufer pod določenimi pogoji ne ustreza priporočilu o nizki absorpciji v UV spektru (podrobnejša razlaga v poglavju 4.3.4) ter nekoliko odstopa od priporočila o ceni. Ugodna lastnost, ki je pripomogla k odločitvi, da smo ga kljub odstopanju od navedenih priporočil uporabili kot medij za teste raztapljanja, so njegove bazične lastnosti. Komponente fosfatnega pufra so pri pH 6,8 negativno nabite, kar povečuje verjetnost nastanka ionskih interakcij s pozitivno nabitimi ZU. Z uporabo bis-tris pufra, ki pri pH 6,8 vsebuje katione, pa smo zmanjšali verjetnost pojava ionskih interakcij z bazičnimi ZU, ki so pri pH 6,8 prav tako (delno) pozitivno nabite.

4.3.3 Maleatni pufer

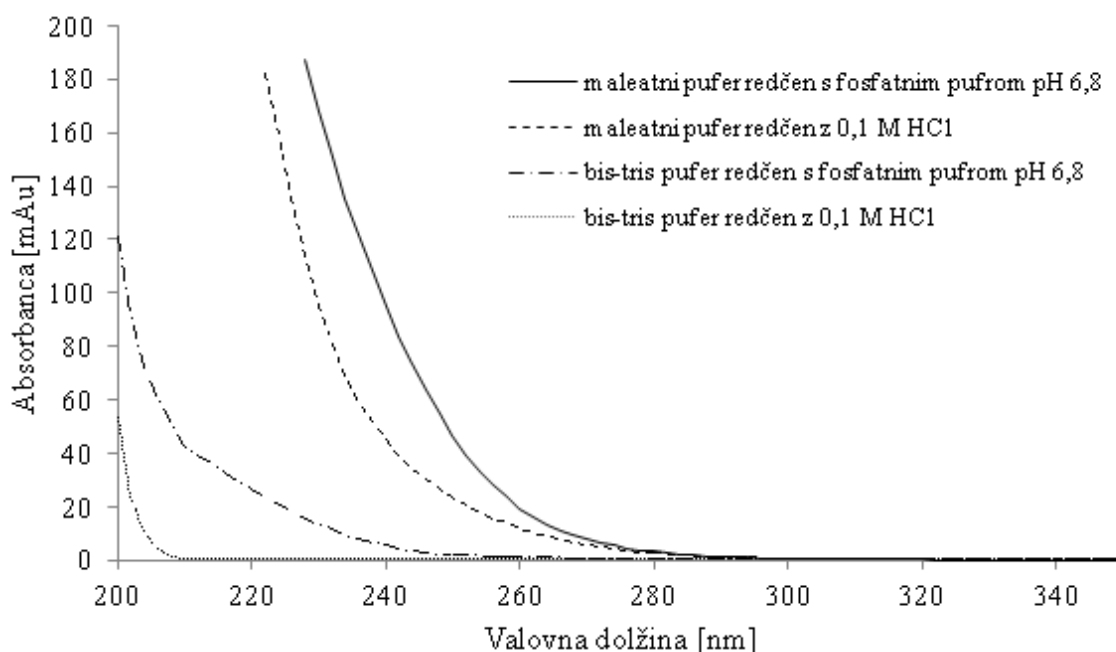


Slika 14: Strukturna formula maleinske kisline.

Tudi maleatni pufer smo izbrali na podlagi izpolnjevanja postavljenih kriterijev, čeprav ne ustreza vsem postavljenim priporočilom (glej poglavje 1.4.2). pK_{a2} vrednost maleinske kisline znaša 6,24 (29). V vodi je lahko topna, 788 mg/mL oziroma 6,8 M pri 20 °C. Z vidika škodljivosti za zdravje je maleinska kislina sprejemljiva. Povzroča draženje oči, dihal in kože, lahko povzroči preobčutljivostno reakcijo ob stiku s kožo in je škodljiva v primeru zaužitja (R22, R36/37/38, R43 in S24, S26, S28, S37, S46). Med pripravo pufra je treba nositi ustrezno zaščitno opremo: laboratorijsko haljo, primerne rokavice in zaščitna očala. Priprava maleatnega pufra je tudi cenovno ugodna, saj cena substanc za pripravo 1L 50 mM pufra pH 6,8 znaša manj kot 1,0 EUR (maleinska kislina 0,27 EUR in NaOH pelete 0,11 EUR) (28). Omejujoč faktor njegove uporabnosti je možnost pojava interakcij, in sicer kompleksiranje ZU ali zmanjšanje topnosti ZU zaradi učinka skupnih ionov (pogostost kationskih ZU v obliki maleatnih soli je 3,7 %) (30). Slednjo interakcijo smo opazili pri določanju topnosti amlodipinijevega maleata (glej poglavje 4.8.2), ki je bil v maleatnem pufri slabše topen kot v ostalih pufrih. Prav tako se je maleat izkazal kot problematičen pri določanju vsebnosti ZU v vzorcih s spektrofotometrično metodo, ker je absorbiral relativno visok delež UV svetlobe v območju valovnih dolžin, kjer smo merili absorbanco modelnih ZU.

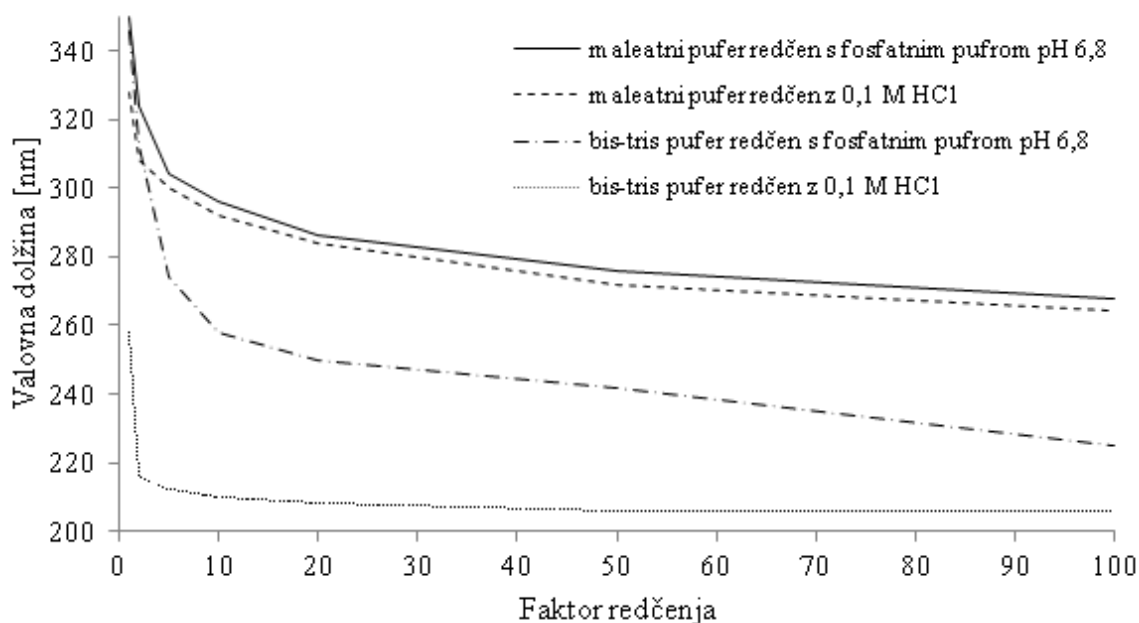
4.3.4 Vrednotenje vpliva absorbcanc maleatnega in bis-tris pufra

Maleatni in bis-tris puffer (v nadaljevanju poglavja analizirana pufra) sta absorbirala relativno visok delež UV svetlobe pri valovnih dolžinah, kjer imajo absorpcijske maksimume izbrane ZU, zato so njihuni odzivi motili detekcijo ZU, še posebno pri nizki koncentraciji ZU v vzorcu. Posneli smo spektre analiziranih pufrov v območju valovnih dolžin od 200 do 400 nm. Hkrati smo posneli še spektre obeh pufrov, redčenih s fosfatnim pufrom pH 6,8 in z 0,1 M HCl (faktorji redčenja: 5, 10, 20, 50, 100). Od dobljenih absorbcanc smo odšteli absorbcanco pri 400 nm, vrednosti pomnožili z ustreznim faktorjem redčenja in izračunali povprečne vrednosti absorbcanc (upoštevali smo le absorbcance manjše od 2). Slika 15 prikazuje dobljene absorbcance.



Slika 15: Absorbance maleatnega in bis-tris pufra, ki sta redčena s fosfatnim pufrom pH 6,8 ali 0,1 M HCl, pri valovnih dolžinah nad 200 nm.

Za primerjavo najnižje valovne dolžine, ki je še uporabna za analizo (t.i. cut-off vrednost), smo izbrali kritično vrednost absorbcance 0,1 (ob predpostavkah, da je absorbcanca vzorca 1 in da je dopusten vpliv medija 10%), kar je prikazano na Sliki 16. Pri spektrofotometričnem določanju koncentracije analita slepi vzorec ničliramo, vendar previsoke vrednosti niso priporočljive, saj s tem zmanjšujemo natančnost dobljenih rezultatov in znižujemo maksimalno koncentracijo, ki jo lahko določamo.



Slika 16: T.i. Cut-off vrednosti valovnih dolžin maleatnega in bis-tris pufra pri absorbcanci 0,1 glede na uporabljen medij za redčenje in faktor redčenja.

Maleatni in bis-tris pufer smo redčili s fosfatnim pufrom pH 6,8, ker minimalno prispeva k absorbcanci pri valovnih dolžinah 200–400 nm. S tem smo želeli zmanjšati prispevek komponent maleatnega in bis-tris pufra k absorbcanci, saj je absorbanca premo-sorazmerna koncentraciji analita. Delež absorbirane svetlobe se je v obeh analiziranih pufrih s povečevanjem faktorja redčenja zmanjševal, toda kot je vidno na Sliki 16, pri maleatnem pufru tudi 100-kratna redčitev ni zadostovala. Bis-tris pufer pa bi morali s fosfatom pH 6,8 redčiti vsaj 40-krat, da njegova absorbanca ne bi motila detekcije ZU pri 255 nm. Nato smo analizirana pufra redčili še v kislem mediju (0,1 M HCl), ker smo želeli preveriti vpliv spremembe deleža ioniziranih in neioniziranih komponent pufra na absorpcijo UV svetlobe. Maleinska kislina, ki je pri pH 6,8 večinoma ionizirana (78,4 % v obliki maleata), se je v 0,1 M HCl pretvorila v neionizirano obliko (maleinsko kislino); bis-tris pa ravno nasprotno, iz večinoma neionizirane oblike pri pH 6,8 (68,6 %) se je v kislem pretvoril v ionizirano obliko. Z redčenjem maleatnega pufra z 0,1 M HCl smo sicer dosegli nekoliko nižje absorbance kot pri redčenju s fosfatnim pufrom pH 6,8, ampak so bile kljub temu še vedno previsoke. Pri redčenju bis-tris pufra z 0,1 M HCl so se njegove absorbance znatno znižale, že 2-kratna redčitev je zadostovala, da smo prišli v območje valovnih dolžin pod cut-off vrednostjo (Slika 16). S tem smo pokazali, da je pri uporabi bis-tris pufra za vrednotenje raztapljanja spektrofotometrična metoda primerna za kvantifikacijo raztopljenih ZU le pod pogojem, če vzorce redčimo vsaj 40-krat v fosfatnem pufru s pH 6,8

oziroma vsaj 2-krat z 0,1 M HCl. Pri uporabi maleatnega pufra za vrednotenje raztapljanja pa ne glede na uporabljen medij za redčenje in faktor redčenja, rezultati, dobljeni s spektrofotometrično metodo, niso zanesljivi. Zato smo presodili, da je za določanje deleža raztopljene ZU pri testu raztapljanja v maleatnem in bis-tris puftru primernejša HPLC metodologija.

4.4 Obrazložitev uporabljenih metod

Vpliv pufrov na potek raztapljanja ZU iz modelnih FO smo ovrednotili s primerjavo profilov raztapljanja. Razlike v profilih v različnih pufrih z enakim pH so lahko posledica interakcij med ZU ali PS s komponentami pufra.

4.4.1 Topnost ZU

Kot metodo za preverjanje interakcij med ZU in komponentami pufra smo izbrali določanje topnosti ZU, ker bistvene razlike v topnosti posameznih ZU v izbranih pufrih dokazujejo prisotnost interakcij med ZU in komponentami pufra. Le-te pa so lahko vzrok za razlike v profilih raztapljanja pri testu raztapljanja. V fosfatnem, maleatnem in bis-tris puftru smo topnost ZU določili s saturacijsko »shake-flask« metodo, ki je najbolj zanesljiva in najpogosteje uporabljana metoda za določanje termodinamske topnosti pri konstantni temperaturi in konstantnem pH. Želeli smo čim manjšo porabo ZU, zato smo za izvajanje testa izbrali volumen pufrov 10 ml, kar je hkrati zadoščalo za odvzem vzorca za nadaljnjo analizo in za merjenje končne pH vrednosti. Po stresanju smo preverili, ali so izbrane natehte ZU bile zadostne za tvorbo prenasičenih raztopin v izbranem volumnu. Dokaz za to je bila določena raztopljena količina ZU, ki je bila vsaj trikrat manjša od natehte ter primerljivost rezultatov z literarnimi podatki. Zaradi nezdržljivosti sistema pHysio-stat s stresanjem v vialah smo v bikarbonatnem puftru topnost ZU določali na napravi za raztapljanje z vreteni. Test smo izvajali v 500 ml pufra, kar je minimalni volumen, ki še omogoča nemoteno delovanje naprave pHysio-stat, oziroma zagotavlja, da je elektroda med poskusom potopljena v puftru. 50-krat večji volumen kot pri določanju topnosti s »shake-flask« metodo je zahteval 50-krat večjo natehto ZU. Večji volumen medija in posledično tudi večja količina ZU sta slabosti te metode. Število paralelnih poskusov je bilo omejeno s številom pHysio-stat naprav, ki smo jih imeli na voljo (na začetku 3, kasneje 2), ker z eno napravo lahko pH vzdržujemo samo v eni posodi na napravi za raztapljanje.

4.4.2 Razpadnost tablet

Obstoj inkompatibilnosti oziroma interakcij med PS v formulaciji in komponentami pufra smo preverjali z določanjem razpadnosti tablet. Pomembne razlike v časih, potrebnih za razpad posameznih tablet v izbranih pufrih so pokazatelj omenjenih interakcij, ki lahko povzročijo značilne razlike v raztapljanju ZU iz tablet pri testu raztapljanja.

4.4.3 Test raztapljanja

S testom raztapljanja na napravi z vreteni smo hkrati preverjali prisotnost interakcij med ZU in komponentami pufra ter med PS in komponentami pufra. Prisotnost interakcij in posledično značilna razlika v profilih raztapljanja je bilo merilo, po katerem smo ovrednotili uporabnost izbranih pufrov. S primerjavo profilov raztapljanja ZU smo ocenili, ali pri vrednotenju raztapljanja pri pH 6,8 lahko uporabimo fosfatni pufer namesto bikarbonatnega in če sta bis-tris ali maleatni pufer boljši zamenjavi za fosfatni pufer.

Hitrost vrtenja vreten pri testu raztapljanja smo pri vsaki formulaciji prilagodili na ustrezno vrednost, pri kateri se je do 5. minute raztopilo manj kot 50 % odmerka ZU, kar je omogočilo enostavno medsebojno primerjavo dobljenih profilov raztapljanja. Na Slikah 17, 18, 20 in 21, kjer so predstavljeni povprečni profili raztapljanja, dvosmerna siva puščica označuje časovno točko, v kateri smo profile primerjali. Za primerjavo smo izbrali tisto časovno točko, v kateri smo zabeležili maksimalno razliko v deležih raztopljenega ZU med najvišjim in najnižjim profilom. Na slikah povprečnih profilov raztapljanja so označene tudi relativne standardne deviacije (RSD), če njihova vrednost presega 5 %.

4.4.4 Vrednotenje koncentracij zdravilnih učinkovin pri testih raztapljanja

Koncentracijo raztopljenih ZU v vzorcih po testu topnosti in testu raztapljanja smo določali s **spektrofotometrično metodo**. V vzorcih, kjer smo kot medij uporabili maleatni ali bis-tris pufer, je bila kvantifikacija ZU otežena, ker so komponente navedenih pufrov motile njihovo detekcijo. Omenjena težava je bila najbolj izrazita pri določanju koncentracij ZU v vzorcih po testu raztapljanja, odvzetih ob zgodnjih časih vzorčenja (5., 10., 15. minuta), ko je raztopljen delež ZU bil še relativno nizek (glede na vsebnost ZU v tableti). Pri določanju topnosti smo ZU (z izjemo amiodaronijevega klorida) kvantificirali s spektrofotometrično metodo, saj je bila v nasičenih raztopinah njihova koncentracija dovolj visoka, da spekter ozadja ni motil. Za določitev topnosti amiodaronijevega klorida in deležev raztopljenega ZU pri testu raztapljanja pa smo zaradi opisanih težav uporabili **HPLC** metodologijo.

4.4.5 Merjenje pH

Z merjenjem končne pH vrednosti smo ugotavljali, če in za koliko se je spremenila pH vrednost v vzorcih po določanju topnosti in testu raztapljanja glede na začetni pH pufrov 6,8. Na ta način smo preverili, ali so izbrani pufri zagotavljali ustrezno pufersko kapaciteto med izvajanjem testov. Topnost vseh izbranih ZU je odvisna od pH vrednosti medija, zato bi značilne spremembe pH vrednosti lahko povzročile povečanje/zmanjšanje topnosti ZU, kar bi pomenilo, da so dobljeni rezultati nepravilni. Pred merjenjem pH smo vzorce ohladili na sobno temperaturo, saj smo tudi začetni pH pufrov uravnali pri sobni temperaturi.

4.4.6 Statistična obdelava rezultatov

Za statistično vrednotenje rezultatov smo uporabili Benjamini–Hochbergovo metodo. V nekaterih primerih so se očitne razlike v rezultatih med pufri izkazale kot statistično nepomembne zaradi velike SD med paralelkami in relativno majhnega števila paralelk v posameznem pufri. Nasprotno so se v drugih primerih zanemarljivo majhne razlike med rezultati izkazale za statistično pomembne kot posledica majhne SD med paralelkami v posameznem pufri. Zaradi opisanih pomanjkljivosti smo uvedli dodatna merila za določitev pomembnosti razlik med rezultati. Pri vrednotenju rezultatov topnosti in časov razpada smo kot bistveno različne označili tiste vrednosti, ki so se med seboj razlikovale za več kot 10 % in so hkrati bile tudi statistično pomembne. Pri vrednotenju sprememb pH vrednosti raztopin smo kot bistveno različne označili tiste vrednosti, ki so se od začetnega pH razlikovale za več kot 0,05 enote in so hkrati bile tudi statistično pomembne.

4.5 Raztapljanje zdravilnih učinkovin iz modelnih formulacij v izbranih pufrih

Za vrednotenje oziroma primerjavo vplivov izbranih pufrov na raztapljanje smo izbrali ZU, ki so pri pH 6,8 različno ionizirane, vgrajene v ustrezne tablete s takojšnjim sproščanjem (Preglednica IX). Topnost vseh izbranih ZU je odvisna od pH medija. Aciklovir je pri pH 6,8 neionizirana ZU, amlodipin, karvedilol in amiodaron so bazične ZU, pri pH 6,8 delno ionizirane. Fosfatni, maleatni in bikarbonatni pufer so sestavljeni iz šibke kisline in njene konjugirane baze, ki je negativno nabita. Izbrali smo tri bazične ZU, ki so pri pH 6,8 delno pozitivno nabite. S tem smo želeli povečati možnost nastanka ionskih interakcij, saj med nasprotno nabitimi ioni (kationi ZU in anioni komponent pufra) obstaja večja verjetnost pojava le-teh kot med spojinami z enakim nabojem. Če komponente uporabljenih pufrov niso prisotne v začetnem delu tankega črevesa, smo interakcije med ZU ali PS s komponentami pufra označili kot nefiziološke, ker niso odražale *in vivo* dogajanja, ki smo ga s testi raztapljanja želeli posnemati. Glede na to, da pH vrednost v začetnem delu tankega črevesa vzdržuje ravno bikarbonatni pufer, smo interakcije med ZU ali PS s komponentami bikarbonatnega pufra označili kot fiziološko relevantne.

Preglednica IX: Pregled izbranih formulacij ter njihova sestava (84).

komercialni izdelek	zdravilna učinkovina	pomožne snovi (mg/tbl, kjer je podatek dostopen)
tablete A	aciklovir	laktoza monohidrat, mikrokristalna celuloza, natrijev karboksimetil škrob (vrsta A), povidon, magnezijev stearat
tablete B	karvedilol	laktoza monohidrat (80,75 mg laktoze), saharoza (60 mg), povidon, krospovidon, brezvodni koloidni silicijev dioksid, magnezijev stearat
tablete C	10 mg amlodipina v obliki 12,84 mg amlodipinijevega maleata	mikrokristalna celuloza, predgelirani škrob, natrijev karboksimetil škrob (vrsta A), brezvodni koloidni silicijev dioksid, magnezijev stearat
tablete D	155,8 mg amiodarona v obliki 200 mg amiodaronijevega klorida	laktoza monohidrat (88,4 mg laktoze), koruzni škrob, brezvodni koloidni silicijev dioksid, povidon, magnezijev stearat

4.6 Tablete A (aciklovir)

4.6.1 Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja

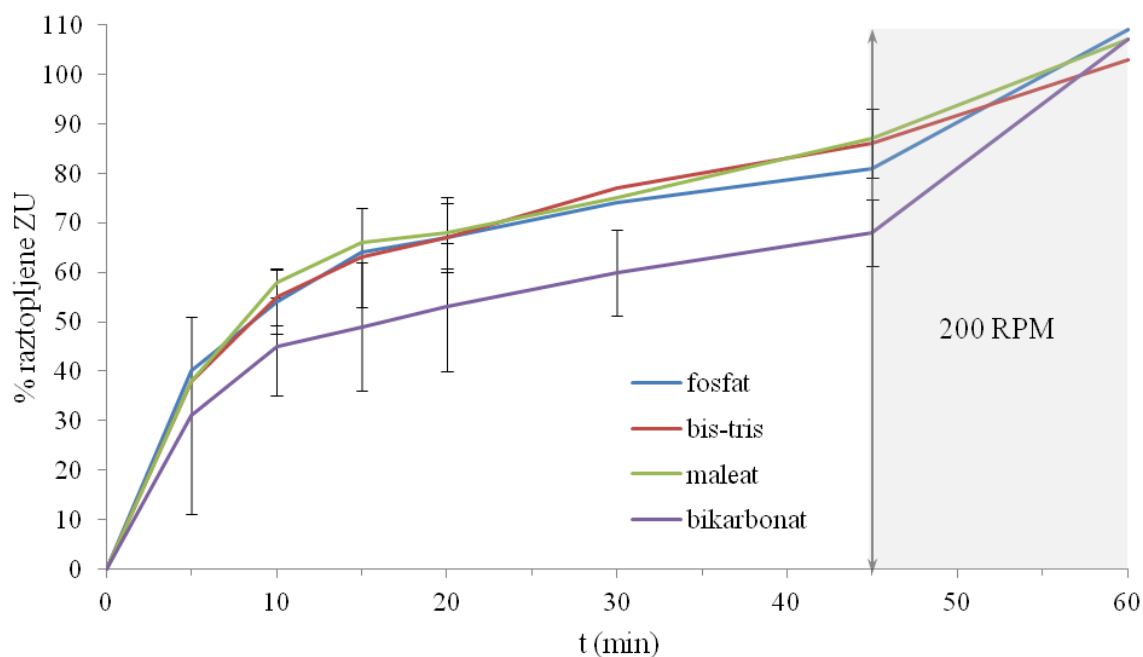
Pri določanju topnosti aciklovirja smo ugotovili, da je njegova topnost v vseh pufrih primerljiva (Preglednica X). pH končnih raztopin se ni bistveno razlikoval od začetnih pH vrednosti 6,80, kar dokazuje, da so vsi pufri med testom zagotavljali ustrezno pufersko kapaciteto.

Rezultati razpadnosti so pokazali, da so tablete A potrebovale vsaj 2,7-krat več časa za razpad v bikarbonatnem pufu kot v ostalih pufrih (Preglednica X). Iz tega sklepamo, da so vzrok za počasnejši razpad tablet A v bikarbonatnem pufu bile fiziološko relevantne interakcije med komponentami pufra in PS v tabletah A.

Preglednica X: Časi razpada tablet A in topnosti aciklovirja, končne pH vrednosti raztopin, pomembnost razlik med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi.

pufer	razpadnost		topnost			
	povpr. čas razpada (min)	RSD (%)	povpr. konc. (g/L)	RSD (%)	končni pH	bistvena razl. v pH
fosfat	1,57	3,6	2,52	0,7	6,80	NE
bis-tris	1,45	6,2	2,55	1,1	6,75	NE
maleat	1,47	9,5	2,43	2,4	6,82	NE
bikarbonat	4,37	4,6	2,66	0,8	6,79	NE

Pri testu raztapljanja tablet A v izbranih pufrih smo ugotovili, da so profili raztapljanja aciklovirja v fosfatnem, maleatnem in bis-tris pufu podobni, medtem ko je profil raztapljanja v bikarbonatnem pufu bistveno nižji (Slika 17, Preglednica XII). Profile raztapljanja smo statistično vrednotili v 45. minuti, ker smo v omenjeni časovni točki opazili največjo razliko v deležih raztopljenega ZU med najvišjim in najnižjim profilom. Po povečanju hitrosti vrtenja vreten na 200 RPM med 45. in 60. minuto smo povečali hitrost raztapljanja aciklovirja in hkrati dosegli, da se je v vseh pufrih iz tablet sprostil celoten odmerek ZU. Iz tega predvidevamo, da so primarni gradniki tablet bile granule. S povečanjem hitrosti vrtenja vreten smo pospešili mešanje medija in s tem povečali mehansko silo, kar je pospešilo raztapljanje ZU iz FO. Končne pH vrednosti raztopin se niso bistveno razlikovale od začetnega pH pufrov 6,80 (Preglednica XI).



Slika 17: Povprečni profili raztapljanja aciklovirja iz tablet A v izbranih pufrih.

Preglednica XI: Deleži raztopljenega aciklovirja, končne pH vrednosti raztopin in pomembnost razlike med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi raztopin pri raztapljanju tablet A v izbranih pufrih.

fosfatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljenega ZU (%)	0	40	54	64	67	74	81	109	6,82	NE
RSD (%)	0,0	3,0	6,5	4,1	3,4	3,5	4,9	1,9	0,1	
bis-tris pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljenega ZU (%)	0	38	55	63	67	77	86	103	6,85	NE
RSD (%)	0,0	2,6	5,8	10	7,0	4,5	7,0	1,2	0,1	
maleatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljenega ZU (%)	0	38	58	66	68	75	87	107	6,83	NE
RSD (%)	0,0	1,6	2,9	3,8	7,2	3,5	3,0	2,0	0,1	
bikarbonatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljenega ZU (%)	0	31	45	49	53	60	68	107	6,78	NE
RSD (%)	0,0	20	10	13	13	8,7	6,8	0,9	0,3	

Preglednica XII: Pomembnost razlik v deležu raztopljenega aciklovirja v izbranih pufrih po 45. minuti raztapljanja in faktor podobnosti[#] (f2) profilov raztapljanja aciklovirja v izbranih pufrih.

pufer	fosfat		bis-tris		maleat	
	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2
bikarbonat	DA	47	DA	45	DA	43
maleat	NE	75	NE	84		
bis-tris	NE	79				

[#] Profila sta podobna, če je f2 večji od 50 oz. različna, če je f2 enak ali manjši od 50.

Na podlagi rezultatov razpadnosti tablet A sklepamo, da je bilo počasnejše raztapljanje aciklovirja v bikarbonatnem pufri posledica počasnejšega razpada tablet. Vzrok za počasnejši razpad tablet A v bikarbonatnem pufri pa so verjetno bile interakcije med komponentami bikarbonatnega pufra in PS v tabletah. Da bi ugotovili, katera PS je interagirala s komponentami bikarbonatnega pufra, smo najprej preverili funkcije posameznih PS, naštetih v Preglednici IX. Na podlagi teh podatkov smo se osredotočili na ionsko razgrajevalo, za katerega smo predpostavili največjo verjetnost nastanka interakcij s komponentami omenjenega pufra in jih nato tudi poskusili dokazati.

4.6.2 Poskus identifikacije interakcij med komponentami bikarbonatnega pufra in PS v tabletah A

Glede na funkcije PS, ki jih vsebujejo tablete A (laktoza monohidrat je polnilo, mikrokristalna celuloza (MCC) je vezivo, natrijev karboksimetil škrob (Na-CMS) je razgrajevalo, povidon je vezivo in magnezijev stearat je drsilo in mazivo), smo predpostavili, da so se pojavile interakcije med razgrajevalom Na-CMS in komponentami bikarbonatnega pufra. Na-CMS je v vodi netopen, njegovi delci pa v stiku z vodnim medijem nabreknejo do 300-kratnika svojega začetnega volumna in na ta način pospešijo razpad tablete. Predpostavili smo, da so interakcije med bikarbonatom in Na-CMS upočasnile nabrekanje razgrajevala in so posledično tablete A v bikarbonatnem pufri razpadle počasneje kot v ostalih pufrih.

Predvidevanja smo preverili tako, da smo izdelali komprimat, ki so vsebovali Na-CMS ter primerjali njihove čase razpada v vseh pufrih (Preglednica XIII). Izdelali smo dve seriji komprimatov, prva serija je vsebovala 5 % Na-CMS in 95 % MCC kot polnilo, drugo serijo iz 100 % MCC pa smo uporabili kot kontrolo. Časi razpada kontrolne serije komprimatov se niso bistveno razlikovali, s čimer smo potrdili ustreznost metode izdelave komprimatov. Ker se povprečni čas razpada komprimatov, ki so vsebovali Na-CMS, v bikarbonatnem pufri ni bistveno razlikoval od časov v ostalih pufrih, naše predpostavke nismo dokazali.

Preglednica XIII: Povprečni časi razpada komprimatov iz MCC ter MCC z dodatkom Na-CMS v izbranih pufrih.

pufer	povprečen čas razpada (min)	
	100 % MCC	5 % Na-CMS + 95 % MCC
fosfat	25,6	3,08
bis-tris	23,9	2,92
maleat	29,0	2,87
bikarbonat	25,9	2,82
povprečna masa komprimatov	150 mg	145 mg

Predpostavljamo, da bi vzrok za počasnejši razpad tablet A in počasnejše raztapljanje aciklovirja iz tablet A v bikarbonatnem pufru lahko bila tvorba oz. zadrževanje mehurčkov CO₂ na površini tablete. Posledično je bila površina tablete, ki je bila v stiku z medijem, v bikarbonatnem pufru manjša v primerjavi z ostalimi pufri. To je upočasnilo nabrekanje razgrajevala in s tem razpad tablete. V skladu z Noyes–Whitneyevo enačbo (*Enačba 13*) je bilo zaradi manjše stične površine med tableto A in bikarbonatnim pufrom tudi raztapljanje aciklovirja počasnejše kot v ostalih pufrih.

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = \frac{D \times A}{h \times V} \times (c_s - c)$$

Enačba 13

$\Delta m/\Delta t$ – hitrost raztapljanja ZU (g/L×s)

D – difuzijski koeficient (m²/s)

A – stična površina med tableto in medijem (m²)

h – difuzijska razdalja (m)

V – volumen medija (m³)

c_s – nasičena topnost ZU (g/L)

c – koncentracija raztopljenega ZU v mediju v času t (g/L)

4.7 Tablete B (karvedilol)

4.7.1 Fizikalno–kemijske lastnosti karvedilola

Za šibko bazične spojine velja, da njihova topnost narašča s padanjem pH vrednosti medija pod pK_a vrednostjo spojine. Karvedilol je šibko bazična spojina, zato je najbolje topna v kislinskih medijih pri nizkih pH vrednostih. V literaturi (npr. (56) in (85)) se včasih napačno navaja, da ima karvedilol najvišjo topnost pri pH 5, ker se pri nižjih pH vrednostih za vrednotenje topnosti in raztapljanja pogosto uporabljajo mediji, ki vsebujejo kloridne ione (0,1 M HCl, SGF). Pri uporabi teh medijev pride do nastanka soli, karvedilolijevega klorida, ki je zaradi učinka skupnih ionov v omenjenih medijih slabše topen kot v medijih z enakim pH, ki ne vsebujejo kloridnih ionov.

4.7.2 Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja

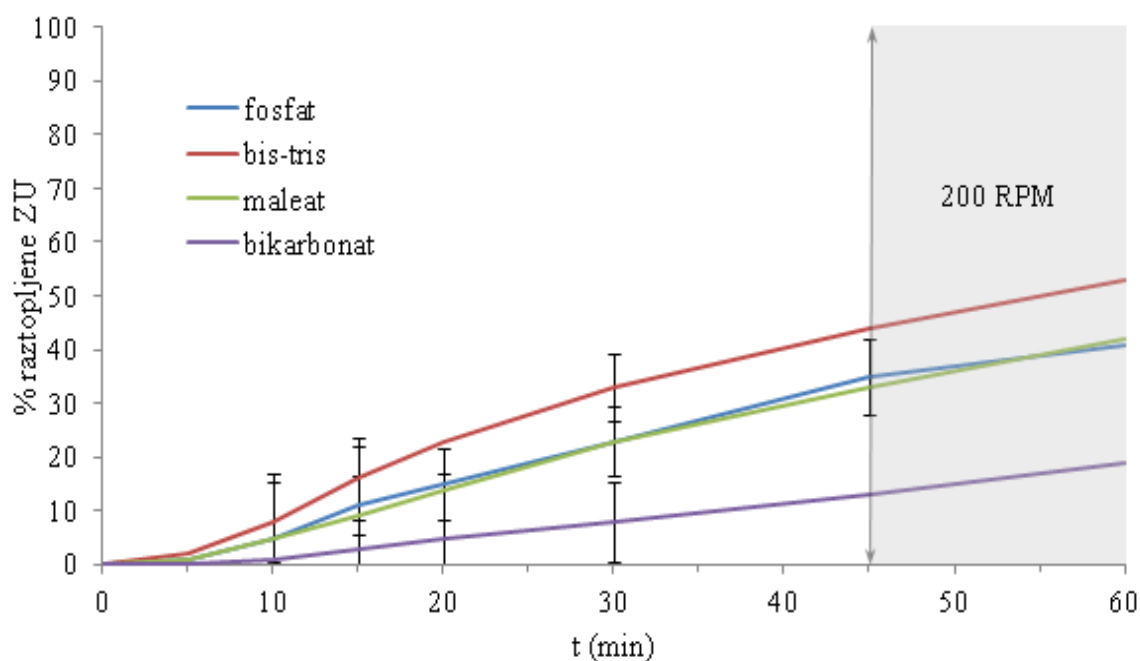
Topnosti karvedilola v izbranih pufrih se bistveno razlikujejo (Preglednica XIV). Najvišjo topnost karvedilol izkazuje v bis-tris pufri (57,7 mg/L), nekoliko nižjo v fosfatnem (40,3 mg/L), še nižjo v maleatnem (36,5 mg/L) ter najnižjo v bikarbonatnem pufri (16,9 mg/L). Predpostavljamo, da so različne topnosti posledica interakcij karvedilola s komponentami posameznih pufrov, vendar jih nismo dokazovali. Spremembi pH vrednosti v bis-tris in maleatnem pufri sta značilni, ker odstopata za 0,06 pH enote. Ker v skladu s farmakopejskimi predpisi že začetna pH vrednost pufrja lahko odstopa za 0,05 enote od izbrane pH vrednosti, je sprememba pH za 0,06 enote premajhna, da bi bistveno vplivala na spremembo topnosti karvedilola. Poleg tega v grafu na Sliki 4 vidimo, da se topnost karvedilola pri pH vrednostih nad 6 ne spreminja bistveno. Zato lahko zaključimo, da so vsi uporabljeni pufri pri določanju topnosti zagotavljali ustrezno pufrsko kapaciteto.

Pri merjenju časov razpada tablet B nismo zasledili bistvenih razlik med povprečnimi vrednostmi v izbranih pufrih, kot je prikazano v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Časi razpada tablet B in topnosti karvedilola, končne pH vrednosti raztopin, pomembnost razlik med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi.

pufer	razpadnost		topnost			
	povpr. čas razpada (min)	RSD (%)	povpr. konc. (mg/L)	RSD (%)	končni pH	bistvena razl. v pH
fosfat	5,28	12	40,3	4,3	6,85	NE
bis-tris	5,08	13	57,7	2,8	6,86	DA
maleat	5,06	11	36,5	5,0	6,86	DA
bikarbonat	5,40	12	16,9	4,6	6,80	NE

Iz dobljenih profilov raztapljanja (Slika 18) smo razbrali, da se je karvedilol najhitreje raztapljal v bis-tris puftru, sledila sta fosfatni in maleatni pufer, kjer se profila nista značilno razlikovala, medtem ko je bilo raztapljanje v bikarbonatnem puftru bistveno počasnejše kot v ostalih pufrih (Preglednica XVI). Profile raztapljanja smo primerjali v 45. minuti, kjer smo zabeležili največje razlike v deležih raztopljenega ZU med najvišjim in najnižjim profilom. Kljub povečanju hitrosti vrtenja vreten med 45. in 60. minuto nismo pospešili raztapljanja preostalega odmerka karvedilola in tudi po 60-ih minutah v nobenem puftru nismo dosegli raztapljanja celotnega odmerka ZU. V skladu z dobljenimi topnostmi ZU v posameznih pufrih in odmerkom karvedilola (25 mg) v tabletah B pri testu raztapljanja z uporabljenim volumnom pufrov 900 ml v nobenem puftru nismo dosegli »sink« pogojev (Preglednica XVII), zato se po pospešitvi vrtenja vreten hitrost raztapljanja karvedilola ni bistveno spremenila. Spremembe pH vrednosti so bile v vseh pufrih zanemarljive (Preglednica XV).



Slika 18: Povprečni profili raztapljanja karvedilola iz tablet B v izbranih pufrih.

Preglednica XV: Deleži raztopljenega karvedilola, končne pH vrednosti raztopin in pomembnost razlike med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi raztopin pri raztapljanju tablet B v izbranih pufrih.

fosfatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	1	5	11	15	23	35	41	6,80	NE
RSD (%)	0,0	0,0	12	5,5	6,7	6,5	7,1	2,4	0,3	
bis-tris pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	2	8	16	23	33	44	53	6,82	NE
RSD (%)	0,0	0,0	7,5	7,5	4,3	6,1	4,5	4,7	0,1	
maleatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	1	5	9	14	23	33	42	6,78	NE
RSD (%)	0,0	0,0	12	13	4,3	2,6	1,8	2,4	0,2	
bikarbonatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	0	1	3	5	8	13	19	6,75	NE
RSD (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	12	7,5	0,0	3,2	0,2	

Preglednica XVI: Pomembnost razlik v deležu raztopljenega karvedilola v izbranih pufrih po 45. minuti raztapljanja in faktor podobnosti[#] (f2) profilov raztapljanja karvedilola v izbranih pufrih.

pufer	fosfat		bis-tris		maleat	
	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2
bikarbonat	DA	47	DA	38	DA	49
maleat	NE	91	DA	57		
bis-tris	DA	60				

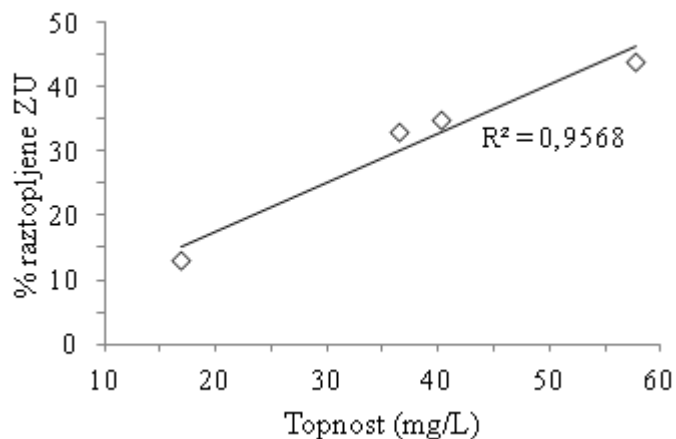
[#] Profila sta podobna, če je f2 večji od 50 oz. različna, če je f2 enak ali manjši od 50.

Preglednica XVII: Doseganje »sink« pogojev pri raztapljanju karvedilola (25 mg) iz tablet B.

pufer	topnost (mg/900 mL)	topnost (mg/900 mL) / odmerek	»sink« pogoji *
fosfat	36,3	1,5	NE
bis-tris	51,9	2,1	NE
maleat	32,9	1,3	NE
bikarbonat	15,2	0,6	NE

* »Sink« pogoji so doseženi, če je razmerje med topnostjo in odmerkom enako ali večje od 3 (85).

Ugotovili smo, da so vzrok za različne hitrosti raztapljanja karvedilola v posameznih pufrih razlike v njegovi topnosti. Profili oz. hitrost raztapljanja karvedilola iz tablet B v različnih pufrih korelira z njegovo topnostjo v posameznih pufrih ($R^2 = 0,957$ po 45. minuti raztapljanja), kot je prikazano na Sliki 19. Večja kot je topnost karvedilola, hitrejša je njegovo raztapljanje, kar je v skladu z Noyes–Whitneyevo enačbo (*Enačba 13*).



Slika 19: Korelacija med topnostjo karvedilola in deleži raztopljenega karvedilola iz tablet B.

4.8 Tablete C (amlodipinijev maleat)

4.8.1 Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja

Spojina amlodipinijev maleat vsebuje enake ione kot maleatni pufer (maleatne anione), zato smo predvideli, da bi se pri raztapljanju v maleatnem pufru lahko pojavil učinek skupnih ionov in zmanjšal topnost ZU v primerjavi z ostalimi pufrmi, ki niso vsebovali maleatnih anionov. Pri določanju topnosti amlodipinijevega maleata smo naša predvidevanja potrdili, učinek skupnih ionov se je odrazil s približno dvakrat nižjo topnostjo amlodipinijevega maleata v maleatnem pufru kot v ostalih pufrih, kar je prikazano v Preglednici XVIII. Topnosti amlodipinijevega maleata v ostalih pufrih so bile primerljive. Vsi pufrmi so med testom zagotavljali ustrezno pufrsko kapaciteto, zato se pH vrednosti končnih raztopin niso bistveno razlikovale od začetnih pH vrednosti 6,80.

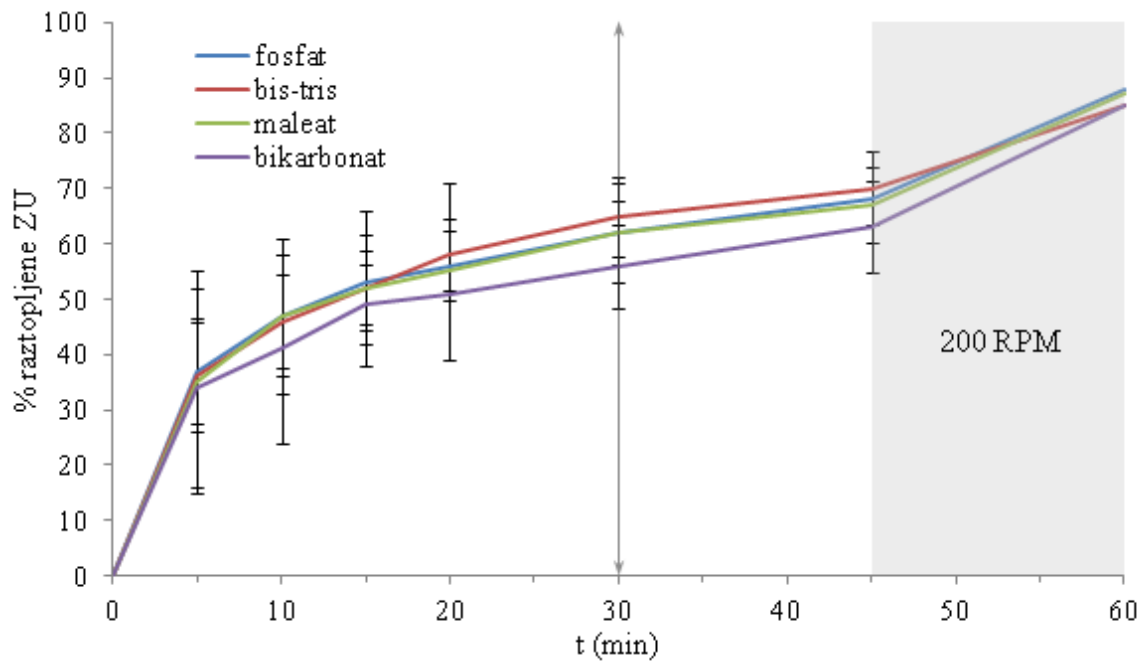
Pri testu razpadnosti smo videli, da so se časi razpada tablet C bistveno razlikovali le v bis-tris pufru, kjer so tablete razpadle vsaj 1,6-krat hitreje kot v ostalih pufrih (Preglednica XVIII). Vzrok so verjetno interakcije med PS v formulaciji in komponentami pufra; lahko je prišlo do interakcij v bis-tris pufru, ki so razpad pospešile, ali pa je prišlo do interakcij v vseh ostalih pufrih, ki so razpad upočasnile.

Preglednica XVIII: : Časi razpada tablet C in topnosti amlodipinijevega maleata, končne pH vrednosti raztopin, pomembnost razlik med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi.

pufer	razpadnost		topnost			
	povpr. čas razpada (min)	RSD (%)	povpr. konc. (mg/L)	RSD (%)	končni pH	bistvena razl. v pH
fosfat	0,47	15	854	11	6,78	NE
bis-tris	0,27	6,8	774	11	6,79	NE
maleat	0,44	19	416	2,3	6,77	NE
bikarbonat	0,46	19	900	10	6,79	NE

Pri pregledu profilov raztapljanja amlodipinijevega maleata v izbranih pufrih (Slika 20) smo ugotovili, da med profili sicer obstajajo majhne razlike, ki pa so se izkazale za statistično nepomembne (Preglednica XX). Profili raztapljanja amlodipinijevega maleata so torej v vseh analiziranih pufrih približno enaki. Delež raztopljenega ZU smo primerjali v 30. minuti, kjer so se pojavile največje razlike med najvišjim in najnižjim profilom. Po 45. minuti smo s povečanjem hitrosti vrtenja vreten dosegli hitrejše raztapljanje ZU, ki se do 60. minute sicer iz tablete ni sprostila v celoti, ampak če bi nadaljevali s testom, bi v naslednjih 15-ih minutah verjetno dosegli raztapljanje celotnega odmerka. Tudi v tem

primeru predvidevamo, da so primarni gradniki tablet C bile granule (enako kot pri tabletah A; opis v poglavju 4.6.2). Pri primerjavi začetnih in končnih pH vrednosti raztopin v nobenem pufru nismo zabeležili bistvenih razlik (Preglednica XIX).



Slika 20: Povprečni profili raztapljanja amlodipinijevega maleata iz tablet C v izbranih pufrih.

Preglednica XIX: Deleži raztopljenega amlodipinijevega maleata, končne pH vrednosti raztopin in pomembnost razlike med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi raztopin pri raztapljanju tablet C v izbranih pufrih.

fosfatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	37	47	53	56	62	68	88	6,79	NE
RSD (%)	0,0	9,5	11	8,5	6,4	5,6	4,4	1,1	0,3	
bis-tris pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	36	46	52	58	65	70	85	6,80	NE
RSD (%)	0,0	10	8,3	6,7	6,6	7,2	6,6	1,8	0,1	
maleatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	35	47	52	55	62	67	87	6,79	NE
RSD (%)	0,0	20	14	14	16	8,9	6,7	0,7	0,3	
bikarbonatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	34	41	49	51	56	63	85	6,77	NE
RSD (%)	0,0	18	17	7,3	4,9	7,5	8,3	3,5	0,1	

Preglednica XX: Pomembnost razlik v deležu raztopljenega amlodipinijevega maleata v izbranih pufrih po 30. minuti raztapljanja in faktor podobnosti[#] (f2) profilov raztapljanja amlodipinijevega maleata v izbranih pufrih.

pufer	fosfat		bis-tris		maleat	
	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2
bikarbonat	NE	66	NE	62	NE	69
maleat	NE	92	NE	82		
bis-tris	NE	85				

[#] Profila sta podobna, če je f2 večji od 50 oz. različna, če je f2 enak ali manjši od 50.

Glede na to, da se je pri določanju topnosti amlodipinijevega maleata v maleatnem pufri pojavil učinek skupnih ionov in posledično zmanjšal topnost ZU, smo predvideli, da bi se lahko pojavil tudi pri testu raztapljanja v maleatnem pufri in upočasnili raztapljanje ZU. V nasprotju s predvidevanji se profil raztapljanja amlodipinijevega maleata v maleatnem pufri ne razlikuje od profilov v ostalih pufrih, kar je posledica doseženih »sink« pogojev pri testu raztapljanja (Preglednica XXI). Čeprav je bil razpad tablet C hitrejši v bis-tris pufri kot v ostalih pufrih, se na profilih raztapljanja ni odrazil. Tablete so v posameznih pufrih razpadle dovolj hitro, da časi razpada niso vplivali na hitrost raztapljanja ZU.

Preglednica XXI: Doseganje »sink« pogojev pri raztapljanju amlodipinijevega maleata iz tablet C (vsebujejo 10 mg amlodipina v obliki 12,84 mg amlodipinijevega maleata).

puffer	topnost (mg/900 mL)	topnost (mg/900 mL) / odmerek	»sink« pogoji *
fosfat	769	60	DA
bis-tris	697	54	DA
maleat	374	29	DA
bikarbonat	810	63	DA

* »Sink« pogoji so doseženi, če je razmerje med topnostjo in odmerkom enako ali večje od 3 (85).

4.9 Tablete D (amiodaronijev klorid)

4.9.1 Fizikalno–kemijske lastnosti amiodaronijevega klorida

Amiodaron je šibko bazična spojina, zato tudi za amiodaronijev klorid velja, da njegova topnost narašča s padanjem pH vrednosti medija. Toda v literaturi (npr. (59)) je navedeno, da je njegova topnost največja v pH intervalu od 3,5 do 5,5. Pri nižjih pH vrednostih se njegova topnost zmanjša samo v primeru uporabe medijev, ki vsebujejo kloridne ione (0,1 M HCl, SGF) zaradi učinka skupnih ionov in soobarjanja amiodarona in amiodaronijevega klorida pri Gibbsovi pK_a vrednosti, ne pa tudi pri uporabi medijev, ki kloridnih ionov ne vsebujejo. Za raztapljanje pri pH nižjem od 3 bi lahko uporabili maleatni (pK_{a1} maleinske kisline znaša 1,97), fosfatni (pK_{a1} fosforne kisline znaša 2,15) ali citratni pufer (pK_{a1} citronske kisline znaša 3,13) ustrezne koncentracije (29, 86).

4.9.2 Primerjava topnosti ZU, razpadnosti tablet in profilov raztapljanja

Z namenom izboljšanja topnosti amiodaronijevega klorida v pufrih s pH 6,8 smo puferskim raztopinam pri določanju topnosti in testu raztapljanja tablet D dodali površinsko aktivno snov SDS (0,25 %). Zaradi prisotnosti SDS se je pri določanju topnosti in testih raztapljanja pojavilo izrazito penjenje puferskih raztopin, ki je predstavljalo dodaten vzrok, ki bi lahko vplival na točnost rezultatov. Če bi SDS raztopili v fosfatnem pufru s pH 6,8, pripravljenim s kalijevim fosfatom, bi prišlo do neželene interakcije med SDS in K^+ ioni, pri kateri bi nastala slabše topna sol kalijev dodecilsulfat, ki bi se oboril. Temu smo se izognili z uporabo natrijevega fosfata za pripravo fosfatnega pufra.

Pri določanju topnosti smo ugotovili, da je amiodaronijev klorid vsaj 6,3-krat slabše topen v maleatnem pufru kot v ostalih pufrih (Preglednica XXII). Predvidevamo, da je prišlo do interakcij med ZU in komponentami maleatnega pufra, natančneje do nastanka amiodaronijevega maleata. Kot je opisano v poglavju 4.1.1, so soli, ki vsebujejo večvalentne ione običajno slabše topne kot soli, kjer je vsaj eden izmed ionov enovalenten. Iz tega lahko sklepamo, da je amiodaronijev maleat, ki vsebuje dvovalentni maleatni anion slabše topen kot amiodaronijev klorid, ki je sestavljen iz enovalentnih ionov.

Spremembe pH vrednosti so se v fosfatnem, bis-tris in maleatnem pufru izkazale za pomembne, in sicer so se v vseh treh pufrih znižale v primerjavi z začetnim pH 6,80. Amiodaronijev klorid je sol šibke baze (amiodaron) in močne kisline (HCl). Pri pH 6,80 je delno (63,5 %) v neionizirani obliki, 36,5 % pa v obliki amiodaronijevega iona, ki je

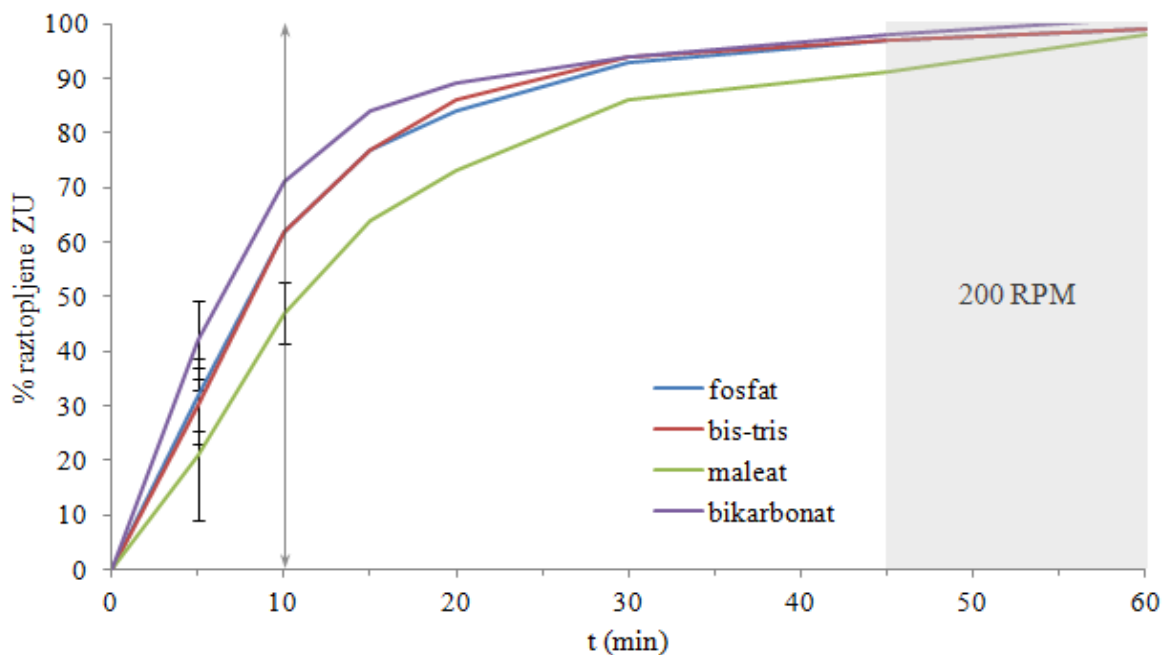
konjugirana kislina, zato se je pH raztopin pomaknil v kislino. Pufrske kapacitete naštetih pufrov sicer niso bile zadostne, da bi se pufri popolnoma uprli spremembi pH, ampak so se ji uprli v zadostni meri, da ni prišlo do bistvenih sprememb topnosti analizirane ZU.

Pri testu razpadnosti tablet D smo ugotovili, da se časi razpada v posameznih pufrih medsebojno ne razlikujejo bistveno (Preglednica XXII).

Preglednica XXII: Časi razpada tablet D in topnosti amiodaronijevega klorida, končne pH vrednosti raztopin, pomembnost razlik med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi.

pufer	razpadnost		topnost			
	povpr. čas razpada (min)	RSD (%)	povpr. konc. (g/L)	RSD (%)	končni pH	bistvena razl. v pH
fosfat	5,43	7,6	1,60	37	6,68	DA
bis-tris	4,81	7,7	1,33	67	6,73	DA
maleat	5,20	7,1	0,21	18	6,66	DA
bikarbonat	4,23	17	1,39	3,4	6,78	NE

S testom raztapljanja tablet D smo ugotovili, da sta v 10. minuti, kjer so razlike med profili raztapljanja amiodaronijevega klorida bile največje, profila v fosfatnem in bis-tris pufri približno enaka, profil v maleatnem pufri je statistično pomembno nižji od ostalih, profil v bikarbonatnem pufri pa je statistično pomembno višji v primerjavi s profili v ostalih pufrih (Slika 21, Preglednica XXIV). Po 30-ih minutah raztapljanja ni več bilo značilnih razlik med profili v fosfatnem, bis-tris in maleatnem pufri, medtem ko je profil v maleatnem pufri še vedno bil značilno nižji. V fosfatnem, bikarbonatnem in bis-tris pufri se je večina odmerka ZU (97-98 %) sprostila že do 45. minute, s povečanjem hitrosti vrtenja vreten pa smo dosegli sproščanje celotnega odmerka tudi v maleatnem pufri. Tako kot pri določanju topnosti amiodaronijevega klorida je tudi pri testu razpadnosti iz enakih razlogov prišlo do značilnega znižanja pH vrednosti v končnih raztopinah fosfatnega, bis-tris in maleatnega pufra (Preglednica XXIII), ki pa ni bistveno vplivalo na raztapljanje ZU.



Slika 21: Povprečni profili raztapljanja amiodaronijevega klorida iz tablet D v izbranih pufrih.

Preglednica XXIII: Deleži raztopljenega amiodaronijevega klorida, končne pH vrednosti raztopin in pomembnost razlike med začetnimi (6,80) in končnimi pH vrednostmi raztopin pri raztapljanju tablet D v izbranih pufrih.

fosfatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	32	62	77	84	93	97	99	6,59	DA
RSD (%)	0,0	6,6	3,4	0,8	1,4	3,4	1,8	3,2	0,5	
bis-tris pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	30	62	77	86	94	97	99	6,62	DA
RSD (%)	0,0	7	1,6	2,2	3	1,1	1,2	1,5	0,5	
maleatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	21	47	64	73	86	91	98	6,60	DA
RSD (%)	0,0	12	5,5	2,3	2,3	1,7	3,4	2,1	0,5	
bikarbonatni pufer										
čas (min)	0	5	10	15	20	30	45	60	povprečni končni pH	bistvena razl. v pH
povprečje raztopljene ZU (%)	0	42	71	84	89	94	98	101	6,75	NE
RSD (%)	0,0	7,1	3,2	1,2	1,9	1,1	1,0	0,6	0,2	

Preglednica XXIV: Pomembnost razlik v deležu raztopljenega amiodaronijevega klorida v izbranih pufrih po 10. minuti raztapljanja in faktor podobnosti[#] (f2) profilov raztapljanja amiodaronijevega klorida v izbranih pufrih.

pufer	Fosfat		bis-tris		maleat	
	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2	pom. razl.	f2
bikarbonat	DA	61	DA	60	DA	40
maleat	DA	50	DA	49		
bis-tris	NE	91				

[#] Profila sta podobna, če je f2 večji od 50 oz. različna, če je f2 enak ali manjši od 50.

Pri preverjanju doseganja »sink« pogojev pri testu raztapljanja amiodaronijevega klorida smo videli, da jih v maleatnem pufru nismo dosegli (Preglednica XXV). Z upoštevanjem tega dejstva in rezultatov topnosti lahko sklepamo, da je počasnejše raztapljanje amiodaronijevega klorida v maleatnem pufru posledica »non-sink« pogojev in/ali slabše topnosti v tem pufru.

Preglednica XXV: Doseganje »sink« pogojev pri raztapljanju amiodaronijevega klorida iz tablet D (vsebujejo 200 mg amiodaronijevega klorida).

pufer	topnost (g/900 mL)	topnost (g/900 mL) / odmerek	»sink« pogoji *
fosfat	1,44	7,2	DA
bis-tris	1,20	6,0	DA
maleat	0,19	0,9	NE
bikarbonat	1,25	6,3	DA

* »Sink« pogoji so doseženi, če je razmerje med topnostjo in odmerkom enako ali večje od 3 (85).

4.10 UPORABNOST IZBRANIH PUFROV

Po kritičnem vrednotenju profilov raztapljanja modelnih ZU ter analizi njihove povezave s topnostjo ZU in časi razpadov tablet smo prišli do pomembnih zaključkov. Ugotovili smo, da sta profila raztapljanja aciklovirja in karvedilola v bikarbonatnem pufru bistveno nižja v primerjavi z ostalimi pufrmi. To pomeni, da smo v bikarbonatnem pufru dokazali pojav fiziološko relevantnih interakcij med ZU oz. PS in komponentami pufra, ki jih z ostalimi pufrmi nismo mogli ponazoriti. Iz tega sklepamo, da bi namesto običajno uporabljanega fosfatnega pufra s pH 6,8 za teste raztapljanja pri pH 6,8 bil uporabnejši oz. ustrežnejši bikarbonatni pufer kljub kompleksnosti vzdrževanja pH med izvajanjem testov.

Profili raztapljanja v bis-tris pufru so bili podobni oziroma primerljivi s profili raztapljanja v fosfatnem pufru pri vseh ZU, edino pri raztapljanju karvedilola so se med omenjenima profiloma pojavile razlike, ki pa so bile bistveno manjše v primerjavi s profilom v bikarbonatnem pufru. Z uporabo bis-tris pufra za vrednotenje raztapljanja šibko bazičnih spojin pri pH 6,8 smo se tudi izognili nefiziološkim ionskim interakcijam, ki se lahko pojavijo v pufrih, ki so sestavljeni iz šibko kislih spojin (fosfatni, maleatni). S tega vidika bi bis-tris bil ustrezen nadomestni pufer za fosfat pri testih raztapljanja v pH 6,8, ampak cena substanc za pripravo bis-tris pufra sodi v previsok cenovni razred, da bi se njegova uporaba izplačala pri redni kontroli kakovosti.

Maleatni pufer se je izkazal kot problematičen na ravni interakcij, in sicer je prišlo do pojava nefizioloških ionskih interakcij s soljo šibko bazične ZU (amiodaronijev klorid), ki se je odrazila s počasnejšim raztapljanjem ZU v maleatnem pufru glede na ostale pufre. Prav tako ni primeren za vrednotenje topnosti in raztapljanja ZU v obliki maleatnih soli, ker se v primeru pojava učinka skupnih ionov njihova topnost zmanjša. Na nivoju metod za kvantifikacijo raztopljenih ZU maleatni pufer izključuje rabo UV/VIS spektrofotometrije, ker njegova absorbanca moti detekcijo ZU. Iz navedenega lahko povzamemo, da maleatni pufer ni najustreznejša zamenjava fosfatnega pufra s pH 6,8 za vrednotenje raztapljanja šibko bazičnih ZU in ZU v obliki maleatnih soli.

Po primerjavi prednosti in slabosti izbranih pufrov smo prišli do zaključka, da je bikarbonatni pufer najustreznejša izbira za vrednotenje raztapljanja pri pH 6,8. Ugotovili smo, da bi za omenjene teste bikarbonatni pufer bil primernejši tudi od fosfatnega, ker se pri njegovi uporabi odrazijo fiziološko relevantne interakcije, ki se lahko pojavijo pri *in vivo* dogajanju.

5 SKLEP

Z upoštevanjem kriterijev in priporočil, določenih na podlagi lastnosti fosfatnega pufru smo ugotovili, da so najustreznejše zamenjave fosfatnega pufru za vrednotenje raztapljanja pri pH 6,8 bikarbonatni, bis-tris in maleatni pufer.

Modelne FO se pri vrednotenju raztapljanja v izbranih pufrih niso raztapljale po nekem vzorcu, ampak naključno, zato razlike med profili raztapljanja posameznih ZU pripisujemo različnim topnostim ZU (karvedilol, amiodaronijev klorid) oziroma časom razpada tablet (komercialne tablete A) v izbranih pufrih. Sklepamo, da med profili raztapljanja amlodipinijevega maleata iz komercialnih tablet C ni bilo bistvenih razlik kljub različnim topnostim ZU v izbranih pufrih, ker smo pri testu raztapljanja dosegli »sink« pogoje. To velja ob predpostavki, da je zgolj topnost ZU določala profil raztapljanja.

Pokazali smo, da se profili raztapljanja aciklovirja in karvedilola v bikarbonatnem pufru zaradi pojava fiziološko relevantnih interakcij bistveno razlikujejo od profilov raztapljanja v fosfatnem pufru. Iz tega lahko zaključimo, da je bikarbonatni pufer primernejši za vrednotenje raztapljanja pri pH 6,8 od fosfatnega pufru, ker se v fosfatnem pufru ne odražajo fiziološke interakcije, lahko pa se pojavijo nefiziološke interakcije.

Napravo pHysio-stat smo ocenili kot enostavno za uporabo, toda proces namestitve celotnega sistema za uravnavanje pH je zamuden in zahteva nekoliko spretnosti. Menimo, da bi z dodatnimi prilagoditvami lahko še izboljšali uporabnost sistema.

Bis-tris pufer je ustrezna zamenjava za fosfatni pufer s pH 6,8 pri vrednotenju raztapljanja bazičnih ZU (z izjemo bazičnih ZU v obliki kloridnih soli) in ZU v obliki fosfatnih soli, ker se s tem izognemo morebitnim nefiziološkim ionskim interakcijam med kationi ZU in anionskimi komponentami fosfatnega pufru ter učinku skupnih ionov. S cenovnega vidika je za vrednotenje raztapljanja ostalih ZU fosfatni pufer primernejši od bis-tris pufru.

Sklepamo, da je maleatni pufer primerna alternativa za fosfatni pufer s pH 6,8 pri vrednotenju raztapljanja ZU v obliki fosfatnih soli zaradi možnosti pojava učinka skupnih ionov. Zaradi možnosti kvantifikacije raztopljene ZU s spektrofotometrično metodo in zaradi možnosti pojava učinka skupnih ionov pri raztapljanju ZU v obliki maleatnih soli v maleatnem pufru je fosfatni pufer ustreznejši za vrednotenje raztapljanja vseh ostalih ZU.

Na podlagi primerjave vplivov sestave analiziranih pufrov (tvorniki pufrov, ioni) na topnost ZU, razpadnost tablet in raztapljanje ZU iz trdnih FO lahko zaključimo, da je bikarbonatni pufer najprimernejši medij za *in vitro* vrednotenje raztapljanja pri pH 6,8.

6 LITERATURA

1. Zumdahl S. Chemical Principles. Sixth edition, Houghton Mifflin Company, Boston, 2009: 300–302.
2. Mohan C. Buffers: A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. EMD, San Diego, California, 2003: 4–18.
3. <http://pharmlabs.unc.edu/labs/ophthalmics/buffers.htm> (14.01.2014)
4. <http://www.chembuddy.com/> (16.01.2014)
5. Serjeant EP, Dempsey B. Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IUPAC Chemical Data Series No. 23, Pergamon Press Inc., New York, 1979: 989.
6. Paulev PE, Zubieta G. Medical Physiology And Pathophysiology: Essentials and clinical problems. Second Edition, Copenhagen Medical Publishers, Copenhagen, 2000: Section IV, Chapter 17.
7. McNamara D, Whitney K, Goss S. Use of a physiologic bicarbonate buffer system for dissolution characterization of ionizable drugs. *Pharm Res* 2003; 20 (10): 1641–1646.
8. Hofmann A. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999; 159 (22): 2647–2658.
9. Guyton A, Hall J. Textbook of Medical Physiology. Twelfth Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2011: 784.
10. Williams R, Jencks WP, Westheimer FH. pKa data compiled by R. Williams. Dostopno na svetovnem spletu: http://research.chem.psu.edu/brpgrp/pKa_compilation.pdf (03.05.2013)
11. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull* 1999; 46 (3): 183–196.
12. Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res* 2006; 23 (1): 165–176.
13. Culen M, Rezacova A, Jampilek J, Dohnal J. Designing a Dynamic Dissolution Method: A Review of Instrumental Options and Corresponding Physiology of Stomach and Small Intestine. *J Pharm Sci* 2013; 102 (9): 2995–3017.
14. Marks A, Lieberman M, Smith C. Essential Medical Biochemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007: 432.
15. Gotley D, Morgan A, Cooper M. Bile acid concentrations in the refluxate of patients with reflux oesophagitis. *Br J Surg* 1988; 75: 587–590.
16. European Pharmacopoeia, 6th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg, 2007.
17. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the investigation of bioequivalence. London, 2010.
18. Kostwicz E, Brauns U, Becker R, Dressman J. Forecasting the oral absorption behavior of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media. *Pharm Res* 2002; 19 (3): 345–349.
19. Jantratid E, Dressman J. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 2008; 25 (7): 1663–1676.

20. The United States Pharmacopeia 32, National Formulary 27, United States Pharmacopeial convention, Inc. Rockville 2007.
21. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm?PrintAll=1 (06.02.2014)
22. Perez de la Cruz Moreno M, Oth M, Deferme S, Lammert F, Tack J, Dressman J, Augustijns P. Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58 (8): 1079–1089.
23. Sheng J, McNamara D, Amidon G. Toward an In Vivo Dissolution Methodology: A Comparison of Phosphate and Bicarbonate Buffers. *Mol Pharm* 2009; 6 (1): 29–39.
24. <http://toxnet.nlm.nih.gov/> (12.05.2014)
25. Jouyban A. *Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals*. First Edition, Taylor & Francis Group, Florida, 2010.
26. <http://www.phytotechlab.com/msds/P846MSDS.pdf> (29.01.2014)
27. <http://avogadro.chem.iastate.edu/msds/naoh.htm> (29.01.2014)
28. <http://www.sigmaaldrich.com/> (29.01.2014)
29. <http://www.applichem.com/en/home-page/> (30.01.2014)
30. Kumar L, Amin A, Bansal AK. Salt Selection in Drug Development. *Pharm Tech* 2008; 3 (32): 128–139.
31. Krishnamurthy M, Naidu S. "8". In Lokeswara Gupta. *Chemistry for ISEET 2012*; 1 (A): 298.
32. Serajuddin A. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 603–616.
33. Newton D. Drug incompatibility chemistry. *Am J Health-Syst Pharm* 2009; 66: 348–357.
34. Newton D, Driscoll D. Calcium and phosphate compatibility: Revisited again. *Am J Health-Syst Pharm* 2008; 65: 73–80.
35. Recillas S, Rodríguez-Lugo V, Montero M, Viquez-Cano S, Hernandez L, Castaño V. Studies on the precipitation behavior of calcium phosphate solutions. *J Ceram Process Res* 2012; 13 (1): 5–10.
36. <http://www.ktf-split.hr/periodni/en/abc/kpt.html> (30.01.2014)
37. Staum M. Incompatibility of phosphate buffer in ^{99m}Tc-sulfur colloid containing aluminium ion. *J Nucl Med* 1972; 13 (6): 386–387.
38. http://www.msds-europe.com/id-485-r_s_phrases.html (05.02.2014)
39. Will M, Clark N, Swain J. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *J Assist Reprod Gen* 2011; 28: 711–724.
40. Serajuddin ATM. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliver Rev* 2007; 59: 603–616.
41. Taylor J, Trigg D. *Comprehensive Medicinal Chemistry II, Volume 5: ADME-Tox Approaches*. Elsevier Science & Technology Books, 2006: 405–406.
42. Stahl PH, Wermuth CG. *Pharmaceutical salts: Properties, selection and use*. First Edition, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 2002: 19–40.
43. <http://apps.who.int/phint/en/p/about/> (15.02.2014)
44. Leskinen E. Tablet disintegration: Effects of temperature and pH of aqueous disintegrating fluid and influence of solubility of diluent on the behaviour of superdisintegrants. Seminar summary (31.3.2003), Division of pharmaceutical technology, Department of pharmacy, University of Helsinki.

45. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Farmaceutvska_tehnolgija_1_INDFARM/teden-2.pdf (03.03.2014)
46. Honkanen O, Seppä H, Eerikäinen S, Tuominen R, Marvola M. Bioavailability of ibuprofen form orally and rectally administered hydroxypropyl methyl cellulose capsules compared to corresponding gelatine capsules. *STP Pharm Sci* 2001; 11: 181–185.
47. Stein D, Bindra DS. Stabilization of hard gelatin capsule shells filled with polyethylene glycol matrices. *Pharm Dev Technol* 2007; 12: 71–77.
48. Donauer N, Lobenberg R. A mini review of scientific and pharmacopeial requirements for the disintegration test. *Int J Pharm* 2007; 345 (1–2): 2–8.
49. Al-Tabakha M M. HPMC capsules: current status and future prospects. *J Pharm Pharm Sci* 2010; 13 (3): 428–442.
50. <http://www.tabletdissolution.com/education/introduction> (03.03.2014)
51. Dressman J, Amidon G, Reppas C, Shah V. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1988; 15 (1): 11–22.
52. Fotaki N, Brown W, Kochling J, Chokshi H, Miao H, Tang K, Gray V. Rationale for selection of dissolution media: three case studies. *Dissolut Technol* 2013; 20 (3): 6–13.
53. Ropers MH, Czichocki G, Brezesinski G. Counterion Effect on the Thermodynamics of Micellization of Alkyl Sulfates. *J Phys Chem B* 2003; 107 (22): 5281–5288.
54. Hejazi SM, Erfan M, Mortazavi SA. Precipitation Reaction of SDS and Potassium Salts in Flocculation of a Micronized Megestrol Acetate Suspension. *Iran J Pharm Res* 2013; 12 (3): 239–246.
55. Susantakumar P, Gaur A, Sharma P. Comparative pharmacokinetics, safety and tolerability evaluation of acyclovir IR 800 mg tablet in healthy Indian adult volunteers under fasting and non-fasting conditions. *J Bioequiv Availab* 2011; 3: 128–138.
56. Chen P, Dai Q, Dell'Orco P, Hisler C, Igo D, Katrincic L, Labaw C, Ping LJ. Carvedilol hydrobromide. United States Patent, Patent number 20070142451, date of patent Jun. 6, 2007.
57. Loftsson T, Vogensen SB, Desbos C, Jansook P. Carvedilol: solubilization and cyclodextrin complexation: a technical note. *AAPS Pharm Sci Tech* 2008; 9 (2): 425–430.
58. <http://www.chemicalbook.com/> (09.01.2014)
59. Bonati M, Gaspari F, d'Aranno V, Benfenati E, Neyroz P, Galletti F, Tognoni G. Physicochemical and analytical characteristics of amiodarone. *J Pharm Sci* 1984; 73 (6): 829–831.
60. Tahseen M, Yatindra J, Liu Q, Vivilecchia R. Evaluation of Dissolution Hydrodynamics in the USP, Peak™ and Flat-Bottom Vessels Using Different Solubility Drugs. *Diss Tech* 2005: 11–16.
61. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B Met*, 1995; 57 (1): 289–300.
62. Boni E, Brickl R, Dressman J. Is bicarbonate buffer suitable as a dissolution medium? *J Pharm Pharmacol* 2007; 59: 1375–1382.
63. Neumann D. The design and synthesis of novel barbiturates of pharmaceutical interest. University of New Orleans, Thesis and Dissertations, 2004. Paper 1040.
64. Ito T, Suzuki T, Wellman S, Ho I. Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABA_A receptors and molecular aspects. *Life Sci* 1996; 59 (3): 169–195.

65. <http://www.lonza.com/research/> (06.05.2014)
66. Canelli E. Chemical, bacteriological, and toxicological properties of cyanuric acid and chlorinated isocyanurates as applied to swimming pool disinfection: a review. *Am J Public Health* 1974; 64 (2): 155–162.
67. Tomlin CDS. *The Pesticide Manual - World Compendium*, 11 th ed., British Crop Protection Council, Surrey, England 1997: 418.
68. <https://proscitech.com/msds/c020.pdf> (05.02.2014)
69. <http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/buffers.html> (05.02.2014)
70. <http://microscopy.berkeley.edu/Resources/instruction/buffers.html> (17.02.2014)
71. Ropp R. *Encyclopedia of the alkaline earth compounds*. 1st Edition, Elsevier Science & Technology, 2013: 75.
72. <http://www.cem.msu.edu/~reusch/OrgPage/acidity.htm> (06.02.2014)
73. http://www.thermoscientific.de/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_9591.pdf (17.02.2014)
74. Wiberg E, Holleman A: *Inorganic Chemistry*. Academic Press, California, 2001: 659–660.
75. Hughes M. Hyponitrites. *Q Rev Chem Soc* 1968; 22: 1–13.
76. Fadda H, Merchant H, Arafat B, Basit A. Physiological bicarbonate buffers: stabilisation and use as dissolution media for modified release systems. *Int J Pharm* 2009; 382: 56–60.
77. Gerhartz W. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th ed., VCH Publishers, Florida, 1985 to Present: VA24: 315.
78. <http://www.fmcchemicals.com/Portals/chem/Content/Docs/SSP%20Documents/MSDS%20Sodium%20Bicarbonate%20EU%20Format%20English.pdf> (17.02.2014)
79. Bray J, Cragg P, Macknight A, Mills R, Taylor D. *Lecture notes on human physiology*, Fourth Edition, Blackwell Science, Oxford, 1999: 556.
80. Mills I, Cvitaš T, Homann K, Kallay N. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*, Second Edition, Blackwell Science, Oxford, 1993: 50.
81. Garbacz G, Kołodziej B, Koziol M, Weitschies W, Klein S. An Automated System for Monitoring and Regulating the pH of Bicarbonate Buffers. *AAPS Pharm Sci Tech* 2013; 14 (2): 517–522.
82. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (12.01.2014)
83. <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-B1493.pdf> (22.02.2014)
84. <http://si.draagle.com/> (11.01.2014)
85. Raju V, Murthy K. Development and Validation of New Discriminative Dissolution Method for Carvedilol Tablets. *Indian J Pharm Sci* 2011; 73 (5): 527–36.
86. Mosher G, Machatha S, Cushing D, Agha B. Formulations including amiodarone and salts thereof and methods of their manufacture and use. United States Patent, Patent number 20120142768, date of patent Jun. 7, 2012.