

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



KLARA KOMERIČKI

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, september 2015

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



MAGISTRSKA NALOGA

**PROUČEVANJE VPLIVA DELEŽA KSANTANA NA HITROST SPROŠČANJA
PENTOKSIFILINA IZ OGRODNIH TABLET IN ROBUSTNOST GELSKE
PLASTI PO MANIPULACIJI TABLET S STRESANJEM**

**IMPACT OF THE XANTHAN GUM SHARE IN MATRIX TABLETS ON A
PROLONGED RELEASE OF THE PENTOXIFYLLINE AND MECHANICAL
SUSCEPTIBILITY OF GEL LAYER AFTER MANIPULATION WITH
OSCILLATING**

KLARA KOMERIČKI

Ljubljana, september 2015

Mentor: prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Saše Baumgartner, mag. farm.

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. Saši Baumgartner za strokovno podporo, praktične nasvete ter usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge. Zahvalila bi se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, še posebej Tatjani Hrovatič, ter Mojci Kržan za pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu v laboratoriju.

Predvsem pa iskrena hvala staršem za neizmerno podporo, strpnost in optimizem tekom študijskih let.

Izjava o avtorstvu

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

Klara Komerički

Ljubljana, september 2015

Predsednik komisije: *prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.*

Član komisije: *doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.*

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	KSANTAN.....	1
1.1.1	STRUKTURA KSANTANA	1
1.1.2	LASTNOSTI KSANTANA	2
1.1.3	VPLIV TEMPERATURE, pH IN IONSKE MOČI NA STRUKTURO KSANTANA	2
1.2	PENTOKSIFILIN.....	3
1.3	BIOFARMACEVTSKI VPLIVI NA SPROŠČANJE UČINKOVIN IZ FARMACEVTSKIH OBLIK	4
1.3.1	PER OS APLIKACIJA IN VPLIVI NA FO	4
1.3.2	PREBAVA HRANE IN PERISTALTIKA, MOTILITETA	4
1.3.2.1	VPLIV pH V RAZLIČNIH PREDELIH PREBAVNEGA TRAKTA NA SPROŠČANJE IZ FO...4	
1.3.2.2	ŽELODEC IN NJEGOVI VPLIVI NA FO	5
1.3.2.3	MOTILITETA	5
1.3.3	INTERDIGESTIVNI MIGRIRAJOČI MIOELEKTRIČNI KOMPLEKS ((I)MMC) in MOTORIČNA AKTIVNOST PO HRANJENJU	6
1.3.4	PROCESI MED SPROŠČANJEM IZ OGRODNIH TABLET	8
1.3.4.1	NABREKANJE HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET.....	9
1.3.4.2	FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA SPROŠČANJE IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	10
1.4	TESTI SPROŠČANJA IN NJIHOVE MODIFIKACIJE.....	10
2	NAMEN DELA.....	17
3	EKPERIMENTALNO DELO	18
3.1	MATERIALI.....	18
3.2	APARATURE.....	18
3.3	POSTOPKI IN METODE	19
3.3.1	PRIPRAVA MEDIJEV ZA TESTE SPROŠČANJA	19
3.3.2	UMERITVENA KRIVULJA ZA PENTOKSIFILIN V VODI, HCl IN FOSFATNEM PUFRU	19
3.3.3	PRIPRAVA TABLETIRNE MASE IN IZDELAVA TABLET ZA TESTE SPROŠČANJA	21
3.3.4	PRESKUS RAZTAPLJANJA ZA TRDNE FARMACEVTSKE OBLIKE IN MERJENJE ABSORBANCE	23
3.3.5	TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI (USP 2)	24
3.3.5.1	IZRAČUNI PRI TESTU SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI:	24
3.3.6	RAZVOJ METODE NA NAPRAVI Z VESLI (USP 2):	25
3.3.6.1	FILTRIRANJE VZORCA.....	25
3.3.6.2	UPORABA OKROGLIH MREŽIC.....	25

3.3.6.3	POVEČANJE TRDNOSTI TABLET	26
3.3.6.4	ABSORPCIJA SVETLOBE PRI KSANTANU.....	26
3.3.6.5	INTERAKCIJE MED KSANTANOM IN PENTOKSIFILINOM.....	26
3.3.7	TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI (USP 3)	27
3.3.7.1	RAZVOJ METODE SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI Z VKLJUČENO MODIFIKACIJO - STRESANJEM	28
3.3.8	PRESKUS TRDNOSTI TABLET	30
3.3.9	PRESKUS ENAKOMERNOSTI VSEBNOSTI	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	32
4.1	VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET	32
4.1.1	ENAKOMERNOST MASE ENOODMERNIH FARMACEVTSKIH OBLIK	32
4.1.2	PRESKUS TRDNOSTI TABLET	33
4.1.3	PRESKUS ENAKOMERNOSTI VSEBNOSTI	34
4.2	UGOTAVLJANJE VPLIVA KSANTANA NA SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ OGRODNIH TABLET.....	36
4.2.1	TEST SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI (USP 2)	36
4.2.1.1	TEST SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI PRED MODIFIKACIJO METODE	36
4.2.1.2	POTRDITEV VPLIVA PREMAJHNE TRDNOSTI NA NAPAKE PRI SPROŠČANJU PRED MODIFIKACIJO NAPRAVE Z VESLI, Z NAPRAVO USP 3	38
4.2.1.3	TEST SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI PO RAZVOJU METODE IN MODIFIKACIJAH.....	39
4.2.2	VPLIV KISLEGA MEDIJA NA SPROŠČANJE IZ TABLET S KSANTANOM IN NA NABREKANJE GELSKE PLASTI KSANTANA	40
4.2.3	VPLIV PREČIŠČENE VODE NA SPROŠČANJE PF IZ TABLET S KSANTANOM IN NA NABREKANJE GELSKE PLASTI KSANTANA	42
4.3	DOLOČANJE NAJMANJŠE KOLIČINE KSANTANA ZA DOSEGANJE ROBUSTNEGA SPROŠČANJA.....	42
4.3.1	TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI	42
4.3.2	TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI (BIO DIS).....	45
4.3.2.1	PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI IN NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI	45
4.3.2.2	PRIKAZ IZPOSTAVITVE TABLET DVEMA RAZLIČNIMA MEDIJEMA (1. MEDIJ 0,063 M HCl IN 2. MEDIJ 0,063 M HCl, TER FOSFATNI PUFER), S KATERIMA ŽELIMO PONA- ZORITI DOGAJANJE V GIT	46
4.3.2.3	PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA PRI NARAŠČAJOČIH KOLIČINAH KSANTANA (60 mg, 80 mg, 90 mg, 110 mg).....	47

4.3.2.4	PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA, KI STA SE NA DVEH RAZLIČNIH NAPRAVAH (USP2 IN USP3), PRI DVEH RAZLIČNIH KOLIČINAH KSANTANA (60 mg IN 110 mg) IZKAZALA ZA PRIMERNA ZA PODALJŠANO SPROŠČANJE	51
4.4	RAZVOJ NOVE METODE NA NAPRAVI USP 3 IN PREUČEVANJE ROBUSTNOSTI GELSKE PLASTI KSANTANA PO OBREMENITVI TABLET S STRESANJEM	52
5	SKLEPI.....	58
6	LITERATURA.....	60

POVZETEK

Peroralna administracija farmacevtskih oblik je najbolj uporabljana in zelena pot dostave zdravilnih učinkovin. Vendar se je, ne glede na enostavnost trdnih farmacevtskih oblik za per-os uporabo, potrebno zavedati, da le-te med prehodom skozi človeški gastrointestinalni trakt naletijo na številne ovire, ki vplivajo na in-vivo obnašanje zdravila. Zato moramo z izdelavo farmacevtske oblike, zagotoviti njihovo odpornost na različne obremenitve, ki jim bodo izpostavljene. Med najpomembnejše per-os sisteme s podaljšanim sproščanjem spadajo hidrofilne ogrodne tablete, pri katerih je za podaljšano sproščanje odgovoren nabreklijiv polimer, v našem primeru ksantan.

Namen naše naloge je bil ugotoviti povezavo med deležem ksantana v tabletah in hitrostjo sproščanja modelne učinkovine pentoksifilin. S spreminjanjem količine ksantana, smo želeli najti najmanjšo količino, pri kateri bi tableta izkazala ustrezno robustnost. Na koncu smo z modifikacijo preskusa na napravi z recipročnimi cilindri z dodanim stresanjem preučevali, kako se tableta odzove na močnejše dražljaje, ki smo jih s stresanjem ustvarili.

V ta namen smo pripravili 400 mg tablete z različno vsebnostjo ksantana, pri čemer je bila količina pentoksifilina 100 mg. Najprej smo preskuse sproščanja izvajali na napravi z vesli, v prečiščeni vodi in 0,063 M HCl, ter ugotovili, da je 60 mg minimalna količina ksantana, ki jo je potrebno vgraditi v tableto, za ohranjanje podaljšanega sproščanja. Poleg tega smo ugotovili, da je sproščanje pentoksifilina v prečiščeni vodi počasnejše, saj so tam karboksilne verige ksantana ionizirane in se lažje hidratirajo z molekulami vode. V 0,063 M HCl pa je sproščanje hitrejše, ne glede na to, da je gel, ki se tvori v tem mediju mnogo bolj tog in ohrani strukturo tudi po štiridesetih urah preskusa. Nato smo preskuse izvajali na napravi z recipročnimi cilindri v mediju 0,063 M HCl in fosfatnem pufri, kjer smo ugotovili da je 110 mg ksantana dovolj za ohranjanje podaljšanega sproščanja. Na koncu smo z modifikacijo naprave z recipročnimi cilindri z vključenim stresanjem želeli posnemati in vivo dogajanje. S stresanjem smo posnemali kontrakcije pričakovane v piloričnem sfinktru, ki močno degradirajo površino tablete in povzročijo hitrejše sproščanje zdravilne učinkovine. Tablete smo stresali na Vorteksu pri 2800 obratih na minuto, kar predstavlja zelo veliko mehansko obremenitev za tableto, najverjetneje celo večjo, kot je pričakovati in-vivo. Pri teh pogojih je 200 mg ksantana količina, ki se je izkazala za dovolj odporno na mehanske vplive, ki jim je bila tableta izpostavljena.

Ključne besede: *ksantan, pentoksifilin, hidrofilne ogrodne tablete, USP 2, USP 3*

ABSTRACT

Oral administration of dosage forms is the most commonly used and preferred way of drug application. Regardless simplicity of solid dosage forms for oral use, one must be aware that in gastrointestinal tract there are a lot of barriers that affect in vivo behaviour of drugs. Therefore dosage forms must be produced with great resistance to expected variables in humans body. Hydrophilic matrix systems are one of the most important prolonged release oral dosage forms, where polymers are responsible for release of drugs. In our case xanthan gum was used as swelling polymer.

Purpose of our study was to understand impact of xanthan gum share on a prolonged release of pentoxifylline from hydrophilic matrix tablets. With varying the amount of xanthan gum in a tablet, we wanted to find the lowest amount which was still giving acceptable resistance to factors applied. In the end of our case we were studying impact of high oscillating forces, which we produced by modification of USP 3, where we include oscillation of tablets.

We produced 400 mg tablets, with various amounts of xanthan gum and 100 mg pentoxifylline. Firstly we were using USP 2 for dissolution testing, where 60 mg xanthan gum was the minimum amount for prolonged release of pentoxifylline. Taking into consideration the fact, that carboxyl groups of xanthan gum are in ionisation state while in purified water, the release of pentoxifylline is there slower, compared to release in 0,063 M HCl. Secondly we were dissolution testing with USP 3, where 110 mg xanthan gum was the amount necessary for prolonged release. In the end, by modifying USP 3, with included oscillation with Vortex, we wanted to mimic in vivo situation. By oscillation we wanted to create environment similar to the one in pyloric sphincter. We wanted to mimic contractions that greatly degrade tablets and result in faster release of a drug. We have used Vortex with 2800 rotations per minute that conducted forces stronger than the ones in vivo. With that in mind xanthan gum share of 200 mg was enough to show mechanical robustness and result in a prolonged release of pentoxifylline.

Key words: *xanthan gum, pentoxifylline, hydrophilic matrix tablets, USP 2, USP 3, modification of USP 3 with included oscillation*

SEZNAM OKRAJŠAV

XA.....*ksantan*

X.C.....*Xanthomonas Campestris*

PF.....*pentoksifilin*

FO.....*farmaceutska oblika*

ZU.....*zdravilna učinkovina*

FDA.....*Food and drug administration*

GIT.....*gastrointestinalni trakt*

MMC.....*Migrirajoči mioelektrični kompleks*

USP 1.....*naprava s košaro*

USP 2.....*naprava z vesli*

USP 3.....*naprava z recipročnimi cilindri*

dpm.....*dips per minute (potopi na minuto)*

UZ.....*ultra zvok*

UV-VIS.....*ultra violet visible*

A.....*absorbanca*

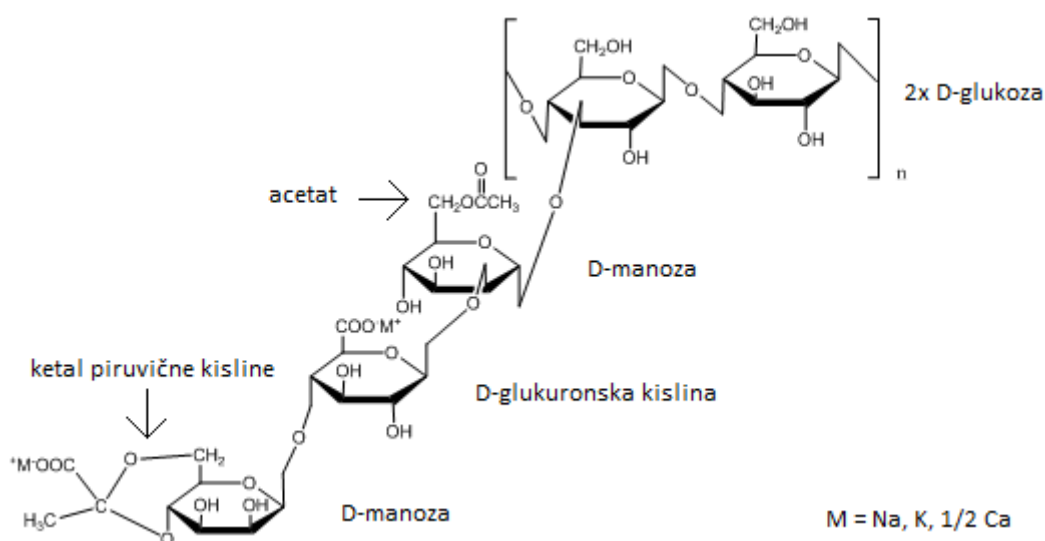
LA.....*laktoza*

1 UVOD

1.1 KSANTAN

Ksantan je naravni anionski heteropolisaharid in pomemben ter komercialno uporabljan industrijski biopolimer. Odkrili so ga raziskovalci NRRL (Northern Regional Research Laboratories) oddelka za agrikulturo v ZDA, v petdesetih letih dvajsetega stoletja ter ga poimenovali polisaharid B-1459 (1, 2). Glede na ugotovitve Paul in sodelavcev iz leta 1986 naj bi bil najpomembnejši mikrobiološki polisaharid (3).

1.1.1 STRUKTURA KSANTANA



SLIKA 1: *Struktura Ksantana.*

Primarna struktura ksantana je sestavljena iz ponavljajočih se pentasaharidnih enot, ki so sestavljene iz dveh glukoz, dveh manoz in ene glukuronske kisline, z molarnim razmerjem 2,0 : 2,0 : 1,0 (1, 4). Njegova osnovna veriga je sestavljena iz beta-D-glukoz povezanih z 1,4-glikozidno vezjo in je po kemijski strukturi identična celulozi (SLIKA 1). Pri stranski verigi pa so celulozne glukozilne enote zamenjane s trisaharidno verigo, ki je pripeta na vsako drugo D-glukožo osnovne verige (1,3). Stranska veriga je sestavljena iz (1,2)-beta-D-manoze, ki vsebuje acetilno skupino in je preko 3-C atoma glukoze vezana na osnovno verigo, (1,4)-beta-D-glukuronske kisline, ki predstavlja povezavo manoze vezane na osnovno verigo, s terminalno beta-D-manozo, ki ima preko mesta 4 in 6 v obliki ketal

vezano piruvično kislino (1, 2). Ksantan ima ravno zaradi prisotnosti piruvične kisline in acetilne skupine v stranski verigi značaj anionskega polisaharida (1).

1.1.2 LASTNOSTI KSANTANA

Ksantan bi lahko zaradi njegovih številnih lastnosti uporabili kot nadomestilo za že znane naravne in sintezne vodotopne gumije, saj je za človeka nepatogen in ni toksičen, ne draži kože in oči (1, 7). Nahaja se v obliki belega ali rumenkasto belega prahu brez vonja, z dobrimi pretočnimi lastnostmi (6). Poleg tega so koloidne raztopine ksantana visoko viskozne, tudi pri nizkih koncentracijah polimera. Viskoznost pa se povečuje z dviganjem koncentracije ksantana. To lahko pojasnimo z intermolekularnimi interakcijami polimera, s katerimi dobimo večje dimenzije makromolekule in posledično večjo molekulsko maso (1). Zaradi polielektrolitske narave pa je le-ta dobro topen tako v hladni kot v vroči vodi (1). Z vodo tvori zelo viskozno raztopino, zaradi česar je njegova uporaba najbolj razširjena kot zgoščevalo, stabilizator emulzij in suspenzij in za pripravo ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem (6). Ksantan je higroskopen, ter podvržen hidrolitični razgradnji, zato ga je potrebno pakirati v vsebnikih neprepustnih za vlago in vodo (1). Vodne raztopine ksantana imajo številne uporabne reološke lastnosti kot so: pseudoplastičnost, stabilna viskoznost v širokih temperaturnih in pH območjih ter sinergistično delovanje v kombinaciji z raztopinami galaktomananov (5). Vse te lastnosti pa so precej odvisne od koncentracije polimera ter možnih prisotnih drugih elektrolitov (2). Zaradi vseh teh lastnosti je FDA dovolila varno uporabo ksantana, ki je razširjena v številnih vejah industrije kot so prehranska, kozmetična, farmacevtska in druge (5, 6, 7).

1.1.3 VPLIV TEMPERATURE, pH IN IONSKE MOČI NA STRUKTURO KSANTANA

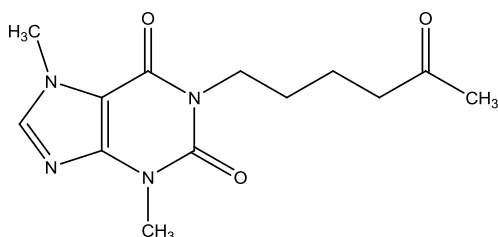
Temperatura, pri kateri polimer raztapljamo, ima velik vpliv na viskoznost ksantana, saj vpliva na molekulsko konformacijo in prisotnost urejenih struktur. Kadar povečamo temperaturo do 40°C, viskoznost pada. Pri temperaturi med 40 in 60°C viskoznost raste z dvigom temperature, nato pa za temperature višje od 60°C viskoznost spet pada z dvigom temperature. Tako obnašanje je posledica konformacijskih sprememb ksantana, ki spreminja konformacijo med urejeno - nativno (pri nizki temperaturi) in neurejeno - denaturirano obliko (pri visoki temperaturi raztapljanja) (1). V urejeni (nativni) konformaciji naj bi bil ksanatan tudi pri pH = 1,2 oziroma pri visoki ionski moči, kjer so verige ksantana v obliki dvojne vijačnice. Pri nizki ionski moči, oziroma pri pH, ki so višji

ali enaki 3 pa naj bi bil v neurejenem stanju (8). Pri povišani temperaturi oziroma pri nizki ionski moči, pride tako do denaturacije XA, kjer se začne dvojna vijačnica razpirati v posamezne polimerne verige (9,10).

Spremembe pH vrednosti v območju med 1 in 13 ne vplivajo na viskoznost raztopin ksantana. Vendar naj bi bil ksantan pri pH višjem od 9 večinoma deacetiliran (izgubil je acetilno skupino), pri pH nižjem od 3 pa izgubi acetilno in piruvično skupino. Vendar tako deacetiliran kot depiruviziran ohranjata podobne reološke lastnosti kot nativni ksantan (1).

1.2 PENTOKSIFILIN

Pentoksifilin je sintetični dimetilksantinski derivat, strukturno podoben teofilinu in kofeinu (10,11). Deluje kot nespecifični inhibitor fosfodiesteraze (12), zato je bila njegova prvotna uporaba kot kardiovaskularno zdravilo, za zdravljenje periferne vaskularne bolezni (12,13). Danes pa se še vedno uporablja kot profilaktik in za zdravljenje kardiovaskularnih zapletov (angina pectoris, kap) povezanih z metaboličnim sindromom. Poleg tega inhibira agregacijo trombocitov in povečuje fibrinolitično aktivnost, torej razgradnjo fibrina, beljakovine, ki tvori ogrodje krvnega strdka ter z vsem tem zmanjšuje viskoznost krvi (11, 14) in se lahko uporablja pri preprečevanju nastanka trombov in embolij (15). V našem primeru PF ni bil predmet preučevanja, uporabili smo ga kot modelno učinkovino.



SLIKA 2: Kemijska struktura pentoksifilina.

Njegove pomembne fizikalno-kemijske lastnosti so, da se nahaja v obliki belega prahu, molekulska masa ima 278,31 g/mol, delno je topen v vodi in ima pK(b) 12,74 (šibka baza). Shranjevati ga je potrebno v hladnem, suhem prostoru v dobro zatesnjenih vsebnikih (17). Absorpcija pentoksifilina je po per-os aplikaciji skoraj popolna (več kot 95 %), hrana na njo nima bistvenega vpliva. Vendar pa PF zapade metabolizmu prvega prehoda (18) in tako v sistemski obtok prispe le 10-50% v telo vnesenega odmerka (19).

1.3 BIOFARMACEVTSKI VPLIVI NA SPROŠČANJE UČINKOVIN IZ FARMACEVTSKIH OBLIK

1.3.1 PER OS APLIKACIJA IN VPLIVI NA FO

Peroralna administracija farmacevtskih oblik je, glede na ostale poti dostave, najbolj uporabljana izbira aplikacije zdravilnih učinkovin, med drugim tudi zaradi enostavne, neboleče aplikacije, nižje cene in večje compliance/adherence s strani bolnikov (20). Med prehodom trdne FO skozi človeški gastrointestinalni trakt le-ta naleti na številne dejavnike, ki so lahko mehanski, encimski, fizikalno-kemijski in vplivajo na in-vivo obnašanje zdravila. Ti dejavniki so porazdeljeni regionalno, po različnih predelih GIT, kar kaže na to, da pogoji prehoda FO preko GIT niso homogeni, ampak se spreminjajo odvisno od trenutne pozicije FO (21). Zato mora biti le-ta izdelana tako, da ustreza ekstremnim spremembam v prebavnem traktu, kot so pH, prisotnost/odsotnost hrane, razkrojevalni encimi, vstop v želodec, prehod skozi pilorični sfinkter, vstop v duodenum, motiliteta GIT, itd. (22).

1.3.2 PREBAVA HRANE IN PERISTALTIKA, MOTILITETA

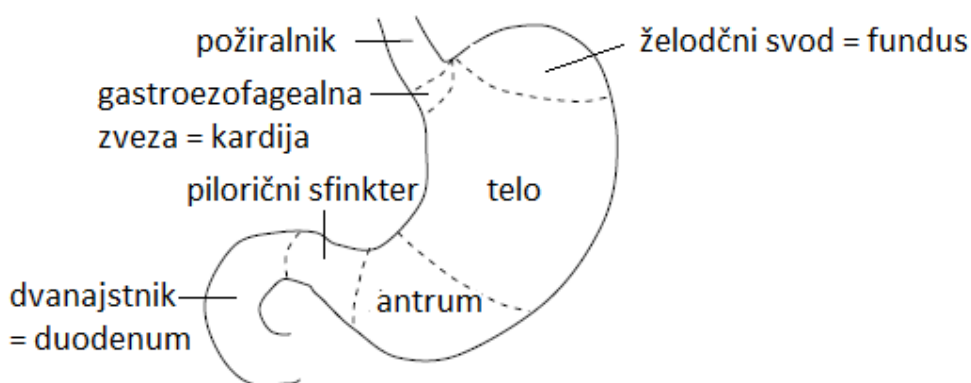
1.3.2.1 VPLIV pH V RAZLIČNIH PREDELIH PREBAVNEGA TRAKTA NA SPROŠČANJE IZ FO

Anatomsko se gastrointestinalni trakt deli na prevodno regijo, ki jo sestavljajo ustna votlina, žrelo (farinks), požiralnik (ezofagus), spodnji rektum in analni kanal. Ter na prebavne in absorptivne dele, ki jih sestavljajo želodec, tanko črevo, debelo črevo z izvzetjem distalnih predelov debelega črevesa (20). Ker so v ustni votlini in požiralniku manjši volumni tekočin in krajši časi zadrževanja hrane in FO, se začne razpad in sproščanje iz FO v želodcu (21). Velik vpliv na sproščanje iz FO ima pH v različnih predelih GIT. V želodcu v fazi postenja je pH med 1 in 3, v prisotnosti hrane pa med 5 in 6, to je predvsem na račun sekrecije klorovodikove kisline iz parietalnih celic želodca. Večina farmacevtskih oblik se razgradi hitro zaradi prisotnosti želodčnih kislin, delci hrane in tekočine zapustijo želodec z odprtjem piloričnega sfinktra (v fazi prebave se izločijo delci manjši od 1 mm) in gredo v duodenum, kjer je pH med 5 in 7 zaradi prisotnosti bikarbonata, ki nevtralizira kislino vsebino, ki je prišla iz želodca. V proksimalnih delih tankega črevesa je pH približno 6,6, v distalnih pa okoli 7,5 (22). Zato je pri izdelavi FO za peroralno aplikacijo stabilnost učinkovine v širokem pH območju preko celotnega

prebavnega sistema ključnega pomena, saj moramo omogočiti, da je izpostavitve zdravilne učinkovine v pH območjih, v katerih ni stabilna, minimalna, da s tem zmanjšamo razpad (20).

1.3.2.2 ŽELODEC IN NJEGOVI VPLIVI NA FO

Človeški želodec je kompleksen organ, ki se deli na področja z različnim delovanjem, na delovanje pa vpliva tudi prisotnost ali odsotnost hrane, saj je volumen v fazi postenja 10-50 mL, v fazi hranjenja pa 1000-1500 mL, tako kot tudi pH ni nikoli konstanten, zaradi variacij v sekreciji kislin in prisotnosti različnih vsebin v želodcu (20, 21). Razdeljen je na štiri glavna področja: fundus, telo, antrum in pilorični sfinkter (SLIKA 3) in ima tri glavne motorne funkcije: shranjevanje, mešanje in praznjenje (23). Proksimalni del je sestavljen iz fundusa in telesa, ki se obnaša kot rezervoar za neprebavljen material in je odgovoren za praznjenje tekočin ter lahko prenese volumne večje od 1 L (21, 23). Ker je v tem delu nizka mehanska dejavnost, je iz mehanskega vidika v tem delu manjši stres na snovi (21). Distalni del želodca (antrum) melje, meša snovi in se obnaša kot sito za trdne delce ter kot črpalka za gastrično praznjenje (23). Mehanski stres na snov/tableto je generiran preko želodčne motilitete in je v tem delu mnogo večji kot v proksimalnem, saj poteka priprava hrane na absorpcijo v tankem črevesu (21).



SLIKA 3: Prikaz različnih področij želodca, ki predstavljajo različne obremenitve za neprebavljen material (5).

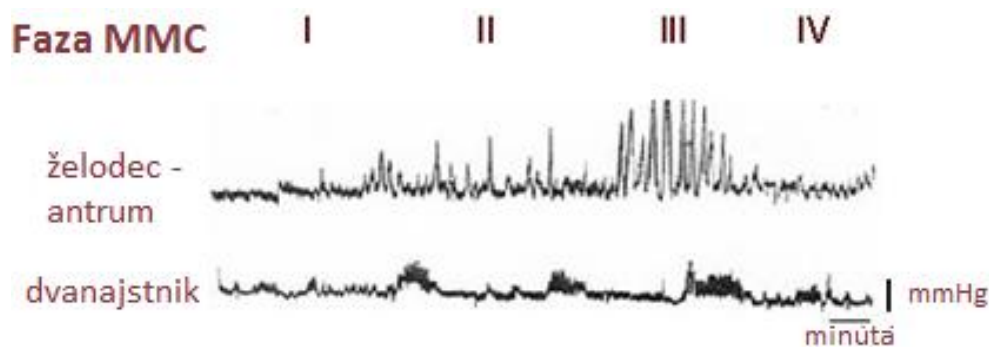
1.3.2.3 MOTILITETA

Gibanje prebavnega trakta, z mešanjem gastrointestinalne vsebine in potiskanjem le-te naprej po prebavni cevi imenujemo motiliteta. Preko nje poteka drobljenje hrane na manjše koščke, mešanje hrane s snovmi, ki jih izloča želodec in kontrolirano praznjenje vsebin iz

želodca v duodenum (37). Mešanje, fragmentacija in homogenizacija potekajo s pomočjo številnih komponent kot so encimi, klorovodikova kislina, pepsinogen, mukus, voda in kontrakcije, ki povzročajo mletje in razpad hrane (20, 22). Peristaltični valovi prihajajo iz stene želodca in se širijo navzdol proti antrumu, kjer mešajo in spodbujajo prehod snovi proti pilorusu. V tem času želodec pretvori snovi v multifazno kašo (himus) delno prebavljene hrane, ki je kombinacija tekočin, maščob in trdnih snovi. Močnejši peristaltični valovi, ki lahko na FO vršijo pritiske večje od 300 mbar, ki jim sledijo premiki hrane hitrejši od 50 cm/s, povzročajo praznjenje želodca, kar omogoči prehod snovi preko pilorusa v duodenum (20, 22).

1.3.3 INTERDIGESTIVNI MIGRIRAJOČI MIOELEKTRIČNI KOMPLEKS ((I)MMC) in MOTORIČNA AKTIVNOST PO HRANJENJU

Čas prehoda zdravil skozi GIT je odvisen od številnih fizikalno-kemičnih in farmakoloških lastnosti zdravila, vrste farmacevtske oblike in številnih fizioloških faktorjev. Gibanje gastrointestinalnega trakta in skupaj s tem gibanje zdravila je odvisno od tega, ali je v prebavni cevi prisotna hrana, ali pa je prebavni kanal v fazi postenja. V času hranjenja so podaljšani časi praznjenja želodca (4,5-6 h), kar podaljša izpostavljenost zdravila želodcu in lahko povzroči razpad FO in sproščanje zdravilne učinkovine ter absorpcijo učinkovine že v želodcu (22). Ko v prebavnem traktu ni hrane (čas praznjenja želodca 0,5-3 h) - na tešče, želodec in duodenum zapadeta cikličnemu vzorcu gibanja imenovanemu MMC (migrirajoči mioelektrični kompleks) (20).



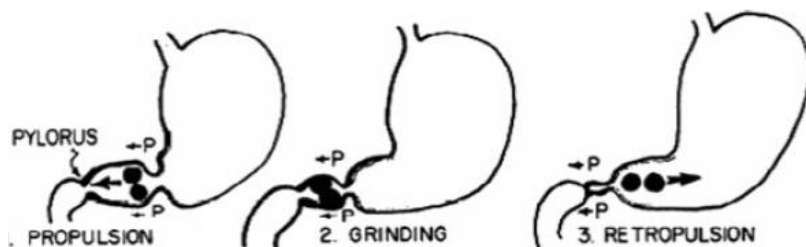
SLIKA 4: Prikaz električne aktivnosti v 4. Fazah MMC. Kontrakcije ponazarjamo z amplitudo pritiskov, ki jih merimo v mmHg.

MMC je sestavljen iz 4 faz (20, 23, 25):

1. faza: mirovanje, z redkimi kontrakcijami (trajanje 45-60 min).
2. faza: nizko amplitudne neredne kontrakcije, vendar z naraščajočo močjo in frekvenco (trajanje 30-45 min).
3. faza: čas maksimalne kontraktilne aktivnosti, velika intenzivnost tako po jakosti kot po frekvenci, kontraktilnost je ritmična in enakomerna (trajanje 5-15 min).
4. faza: neenakomerna kontraktilna aktivnost, tranzicija med 3 in 1 fazo (trajanje 0-5 min).

3. faza je definirana kot skupina 3-6 neenakomernih kontrakcij, ki postopoma naraščajo v moči, dokler ne pride do enakomernih kontrakcij z maksimalno močjo. V času teh kontrakcij je pilorus sproščen in zavrtja je kontraktilna dejavnost v duodenumu, to omogoča pilorusu popolno odprtost ($1,2 \pm 0,7$ cm) med praznjenjem nerazkrojenih/neprebavljenih delcev. Po vsakem setu kontrakcij se v pilorus in duodenum povrne toniranost in pilorus ni več v odprtem stanju. To zaporedje se ponavlja večkrat med 3. fazo in je odgovorno za praznjenje velikih delcev iz želodca, ki se med prebavo niso mogli izločiti (16). MMC se pojavlja vsakih 90-120 min v fazi postenja (20).

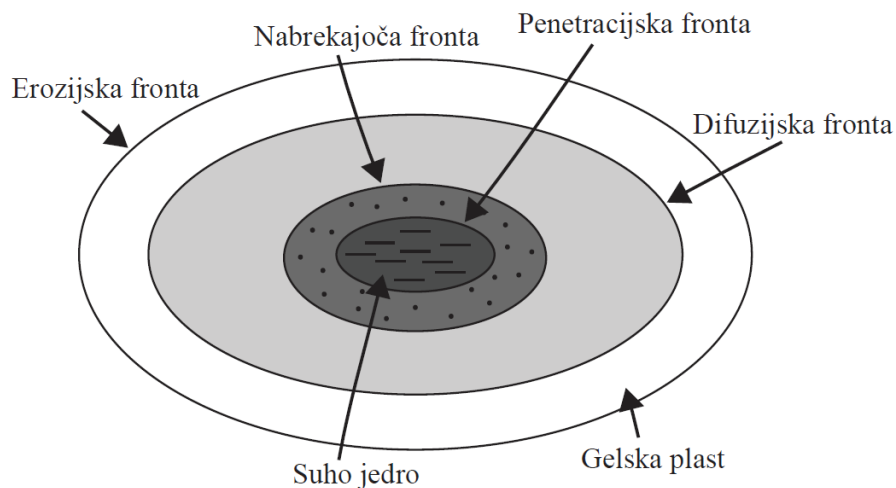
Po obroku hrane se 3. faza MMC aktivnosti nadomesti z vzorcem kontraktilne aktivnosti v času hranjenja, pri katerem poznamo dva tipa kontrakcij: regularne tonične kontrakcije in peristaltične kontrakcije. Tonične kontrakcije v fundusu pomikajo hrano od vrha proti dnu želodca. Peristaltične pa so rezultat longitudinalnih kontrakcij, ki nastajajo na zgornji površini želodca in zdrobijo hrano v obliko primerno za izpraznitev želodca. Ti valovi potujejo od fundusa proti pilorusu v zaporedju 2-3 kontrakcij v času 1 minute. Ko peristaltični val doseže pilorus, frekvenca kontrakcij naraste, med tem se sfinkter skrči in zoža, tako da je ob prihodu peristaltičnega vala odprtina majhna. Hrana se v fazi prebave na tak način pomakne iz pilorusa nazaj v želodec. To imenujemo retropulzija in je odgovorna za drastično mešanje in emulgiranje hrane z želodčnimi sokovi. V ponavljajočih tokovih tako zmanjšuje delce hrane, ter mehča njeno konsistenco do oblike suspenzije. Ko pride do antropiloričnih kontrakcij, se pilorus delno odpre in povzroči, da se tekočine in delci, ki so manjši od 1 mm kontinuirano gibljejo iz želodca v duodenum. Ko se konča praznjenje želodca zaradi prebave hrane, se ponovno začne MMC v želodcu. V tankem črevesju pa potekajo segmentna krčenja, ki vsebino črevesja mešajo ter peristaltična krčenja, ki vsebino pomikajo dalje po GIT (23, 25).



SLIKA 5: Peristaltično mešanje, drobljenje delcev in retropulzija trdnih snovi v distalnem predelu (5).

1.3.4 PROCESI MED SPROŠČANJEM IZ OGRODNIH TABLET

Pri per-os sistemih z nadzorovanim sproščanjem poznamo več načinov sproščanja, kot so sproščanje nadzorovano z raztapljanjem, difuzijsko nadzorovano, nadzorovano z osmotskim tlakom ali z ionsko izmenjavo (25). V našem primeru z uporabo polimera ksantan tvorimo hidrofilne ogrodne sisteme s podaljšanim sproščanjem, ki jih imenujemo tudi nabreklijivi ogrodni sistemi (25). Ogrodne tablete so formulirane z uporabo cross-linked (prečno premreženih) polimerov, ki nabrekajo dovolj hitro, da blokirajo pore na površini tablet in s tem omogočijo nastanek hidratiranega polimera, ki obkroža suho jedro tablete. Ta površinski gelski sloj je redko pravi gel, ampak je navadno koncentrirana premrežena raztopina polimera, z zadostno viskoznostjo in močjo gela, da zagotovi ustrezno difuzijsko pregrado za penetracijo vode in sproščanje ZU (26). Ti sistemi so zelo uporabljani, predvsem zaradi enostavne izdelave z uporabo konvencionalnih procesov in opreme. Poleg tega je njihov čas izdelave hiter, stroški so nižji kot pri drugih sistemih za kontrolirano sproščanje in vanje lahko vgradimo tako nizke, kot visoke koncentracije zdravilnih učinkovin s širokim razponom fizikalno-kemičnih lastnosti. Hidrofilna ogrodja pa so tudi bolj robustna od ostalih sistemov s prirejenim sproščanjem (20). Hidrofilni polimeri, ki jih uporabljamo, v stiku z medijem nabreknejo, pri čemer se tvori hidrogel, ki sčasoma erodira in skozi gel difundira učinkovina (25). Sestava takega sistema je: učinkovina, hidrofilni polimer, polnila ki vplivajo na lastnosti ogrodja, v smislu hitrejše hidratacije ali premreženja polimerov, solubilizatorji in pH modifikatorji ter drsila (25). Vse snovi so premešane in stisnjene v tableto, ob stiku z vodno raztopino le-ta penetrira v notranjost ogrodja in hidratira polimer. Voda deluje kot plastifikator in zniža temperaturo steklastega prehoda, tako da polimer preide v zmeččano stanje. Polimer nabreka in njegove polimerne verige se relaksirajo, istočasno pa se v nastalem gelskem sloju raztaplja ZU in difundira iz sistema (20, 25).



SLIKA 6: Prikaz procesov med nabrekanjem hidrofилnih tablet s prirejenim sproščanjem (povzeto po 20).

1.3.4.1 NABREKANJE HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET

Med nabrekanjem hidrofилnih ogrodnih tablet se tvorijo 4 fronte (SLIKA 6) (20, 25):

1. **Erodirajoča fronta** med medijem za raztapljanje in erodirajočo plastjo.
2. **Difuzijska fronta** med raztopljeno in neraztopljeno ZU v nabreklem delu sistema. V nabrekajoči plasti je ZU še neraztopljena, ker še ni prisotno dovolj proste vode, da bi raztopila ZU, v erodirajoči plasti (med erodirajočo in difuzijsko fronto) pa že pride do sproščanja ZU.
3. **Nabrekajoča fronta** med gelsko fazo in steklasto oziroma semikristalinično fazo matriks sistema.
4. **Penetracijska fronta**, se nahaja med začetno točko procesa nabrekanja, ko je polimer v steklastem stanju in nabrekajočo fronto. Kaže na mejo, do katere pride voda pri nabrekanju (25).

Kadar je tak sistem v kontaktu z vodo, v začetnih fazah sproščanja, nabrekanje ogrodja povzroči, da se erozijska fronta premakne navzven, nabrekajoča pa navznoter. Istočasno se difuzijska fronta umika oziroma zmanjšuje, zaradi raztapljanja trdne faze ZU v hidrogelu in njene difuzije iz ogrodja. Med samim postopkom raztapljanja se polimerne verige na erozijski fronti začnejo rahljati in raztapljati polimer v medij za sproščanje. Ta površinska erozija upočasnjuje nabrekanje gelske plasti in povzroči umikanje erozijske fronte v kasnejših fazah sproščanja (20).

1.3.4.2 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA SPROŠČANJE IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET

Kritični faktorji, ki vplivajo na sproščanje iz hidrofilnih ogrodnih tablet, so vezani na učinkovino, pri kateri je pomembna njena molekulska masa, topnost, velikost delcev, na polimer, kjer je pomemben tip polimera, velikost delcev, viskoznost, delež polimera ter sami formulacijski dejavniki, kot so količina vode, proces izdelave in lastnosti tablete (25). Med najpomembnejše parametre, ki vplivajo na sproščanje ZU uvrščamo topnost ZU, velikost delcev in debelino gelskega sloja. Le-ti pa so lahko pod vplivi drugih faktorjev, tako kot je npr. difuzijski koeficient pod vplivom temperature medija ali viskoznost pod vplivom topila (20).

Polimeri z nizko topnostjo v vodi, visoko viskoznostjo in počasno hidratacijo imajo počasi premikajočo erozijsko fronto, kar pomeni počasnejše sproščanje. V tem primeru debelina gelskega sloja (razdalja med erozijsko in nabreklijo fronto) kontrolira sproščanje ZU. V sistemih, ki vsebujejo polimere z visoko topnostjo v vodi, ki hitro hidratirajo in imajo nizko viskoznost, se erozijska fronta premika hitro, kar kaže na hitrejše sproščanje ZU. Tu se difuzijska fronta pomika počasneje kot nabrekajoča, zato v teh primerih sproščanje ZU kontrolira razdalja med difuzijsko in erozijsko fronto in ne debelina celotnega gelskega sloja kot v prvem primeru (20).

1.4 TESTI SPROŠČANJA IN NJIHOVE MODIFIKACIJE

Preskus raztapljanja oziroma sproščanja ZU iz tablet smo izvajali v skladu z evropsko in US farmakopejo. USP definira sproščanje kot proces, pri katerem se ZU raztopi v tekoči medij in zagotovi primeren čas, zahtevan za popolno solubilizacijo ZU pod testnimi pogoji (34). Test se uporablja za določitev stopnje raztapljanja ZU v trdnih farmacevtskih oblikah ter za potrditev ustreznosti raztapljanja le-te v skladu z monografijo FO (33,35). Poleg tega ga lahko uporabljamo za ugotavljanje razlik med različnimi FO, tudi takšnimi, ki niso bioekvivalentne. Teste raztapljanja lahko tudi z dokaj visoko zanesljivostjo uporabljamo za simulacijo pogojev v GIT in posledično pridobimo podatke za napovedovanje in vitro – in vivo korelacije, podatke za regulativo in kontrolo kakovosti (35). In vitro testi sproščanja iz trdnih FO so zelo pomembno orodje za razvoj formulacij s prirejenim sproščanjem in eden izmed pomembnejših vidikov in vitro sproščanja je zagotovitev, da imajo podatki

pridobljeni iz teh testov napovedno moč za in vivo obnašanje testiranega zdravila (27). 4 glavne aparature, ki jih glede na USP uporabljamo so (34):

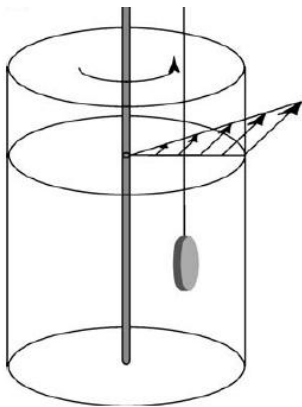
1. Naprava s košaro (Aparatura 1)
2. Naprava z vesli (Aparatura 2)
3. Naprava z recipročnimi cilindri (Aparatura 3)
4. Naprava s pretočnimi celicami (Aparatura 4)

Glede na te aparature, so raziskovalci razvili številne modifikacije, s katerimi poskušajo še natančneje opisati in vivo in vitro povezavo obnašanja tablet v GIT. Do sedaj je bilo razvitih že kar nekaj modifikacij konvencionalnih metod za sproščanje, od katerih bomo podrobneje opisali metode, relevantne za naše proučevanje:

Bogataj in sodelavci so raziskovali različne mehanske vplive na tablete z diklofenakom, med preučevanjem podaljšanega sproščanja. Preskuse so izvajali na aparaturi s pretočno celico, ki so jo razvili na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Peristaltično gibanje so simulirali z napravo za mešanje, ki je vsebovala veslo za mešanje in majhne steklene kroglice, ki so se mešale s pomočjo magnetnega mešala. Za sproščanje so uporabljali dva medija, prvi je simuliral želodčni sok ($\text{pH} = 1,2$) 2 uri, po tem času pa so le-tega zamenjali s simuliranim črevesnim medijem ($\text{pH} = 6,8$). Intenziteto mehanskega stresa na tableto so modificirali z različno količino steklenih kroglic, različnimi hitrostmi mešanja oz. uporabo različno postavljenih ovir v vrteči posodi. Ugotovili so, da je mehanski stres induciran z dvigom stopnje mešanja ali zmanjšanjem količine steklenih kroglic, povzročil dvig sproščanja ZU. Vstavitve različnih ovir v sistem je sicer povzročil hitrejše sproščanje, vendar pa niso opazili nobenega posledičnega padca ali dviga sproščanja po odstranitvi preprek. Ugotovili so tudi, da so bile tablete bolj občutljive na mehanski stres v črevesnem kot pa v želodčnem mediju, kar je posledica različne topnosti diklofenaka v obeh medijih. Postavili so tudi pomembno trditev, da je lahko pričakovana večja mehanska občutljivost tablete in vivo pri prehodu ileocekalnega sfinktra kot pa piloričnega sfinktra. Vprašljivo pa je, ali je ta vpliv dejansko opazen in vivo, saj se večina učinkovine sprosti še preden bi tableta dosegla konec ileuma (29).

Abrahamsson in sodelavci so v njihovi raziskavi najprej določili razpon sil na površino tablete, ki naj bi jim bila podvržena in vivo. To so dosegli z računalniško simulacijo gibanja tekočin, tako da so naredili računalniški želodčni model, ki je bil parameteriziran z

uporabo podatkov pridobljenih z magnetno resonanco (MRI) želodca v fazi hranjenja. S to simulacijo so videli, da je površina tablete izpostavljena različnim strižnim silam med pomikanjem skozi želodec. Nato so ustvarili nov in vitro aparat s pomočjo računalniške simulacije, s katero so spreminjali eksperimentalne pogoje, s pomočjo podatkov, ki so jih pridobili z MRI. Na SLIKI 8 lahko vidimo skico aparature, pri kateri oblika posode zagotovi kontroliran pretok okrog tablet, saj želimo fiziološko napoveden test, pri katerem tok tekočine nikoli ne sme biti turbulenten. Posoda se je vrtela pri konstantnih obratih 8-50 obratov na minuto in je bila napolnjena s 5000 mL medija. Tableta je bila pritrjena na žico, da je imela konstantno pozicijo. Medij za testiranje je bila voda, spreminjali pa so viskoznosti medija. V študiji so med drugim proučevali potencialno korelacijo med strižnimi silami na površino tablet in stopnjo erozije tablet. Ugotovili so, da višje sile na tableto, ki so manj pogoste, a močno degradirajo površino tablet, delujejo le kratek čas z močno intenziteto. Po proučevanju stopnje erozije pri testiranju z uporabo naprave USP 1 so ugotovili, da so nivoji erozije mnogo manjši in posledično tudi manjši nivoji strižnih sil, ki se pojavijo med eksperimentom, kot v primerjavi z njihovo metodo. Iz tega so zaključili, da z USP1 ne moremo zagotoviti nastanka močnejših strižnih sil na tableto, kot so pričakovane in vivo. Testiranja z USP 2 niso izvajali, zaradi možne adhezije tablete na dno



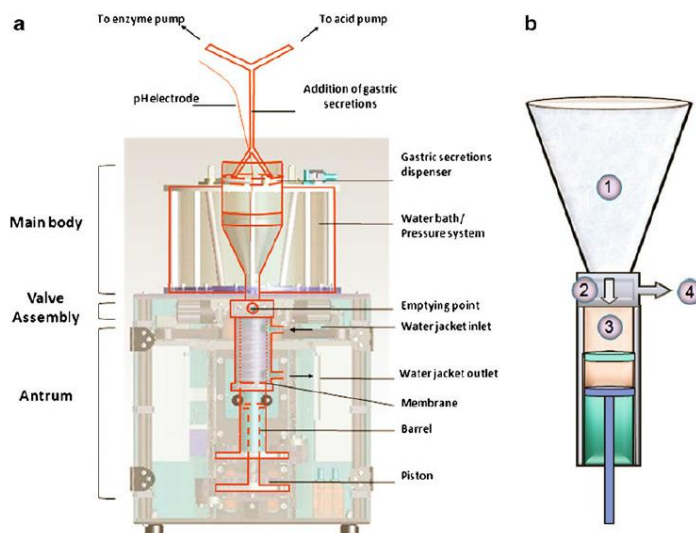
posode ter tudi zaradi pretoka tekočin v posodi, ki se ne približa fiziološkemu pretoku. Iz tega so zaključili, da ima njihova novo razvita metoda mnogo večjo napovedno vrednost za dejansko dogajanje in vivo, saj ustvarja višjo magnitudo strižnih sil na površino tablete, kakršna je pričakovana in vivo, zagotavlja pa tudi laminaren pretok tekočin, ki je podoben pretoku gibanja tekočin v želodcu (30).

SLIKA 8: Skica vrteče posode, s tableto, ki je fiksirana na železni žici.

Posoda je prilepljena na centralno postavljeno palico na dnu, tako da, ko se palica vrti pri konstantnih obratih, se posoda vrti skupaj z njo (30).

Vardakou in sodelavci so proučevali sile mešanja in mletja agarških gelskih kroglic, s pomočjo računalniško kontroliranega real-time fiziološkega simulatorja dogajanja v želodcu imenovanega Dinamični gastrični model (DGM) in USP 2, ki je deloval pri hitrostih 50 in 100 obratov na minuto. Proučevali so razpad agar kroglic pri različnih trdnostih, v simulaciji visoko in nizko kaloričnih obrokov, za katere so z vodo pripravili

različno viskozne raztopine za simulacijo različno obilnih obrokov hrane. Pripravili so 4 vrste agar kroglic, s 4 različnimi trdnostmi (0,53, 0,65, 0,78, in 0,9 N). Med preskusom so v sistem vstavili 7 kroglic iz vsake izmed 4 skupin trdnosti (skupno 28 kroglic).

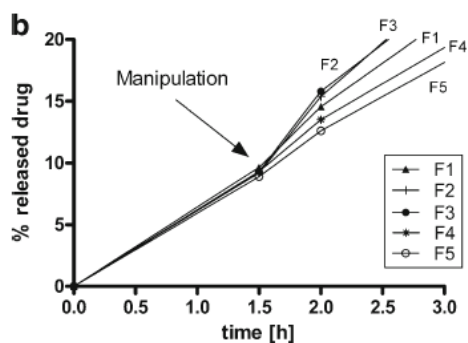


SLIKA 9: Shematski prikaz Dinamičnega gastričnega modela. Na desni strani lahko vidimo mehanizem mehanske prebave. 1-obrok oziroma želodčna vsebina je homogenizirano mešana preko aplikacije pulzirajočih kontrakcij. 2-Vsebini je dovoljen prehod v antrum preko ventila. Ventil je odprt med procesom in dovoljuje reflux ter mešanje vsebine iz 1 v 2. 3- Kaša (himus) se ustvarja mehansko med gibanjem bata in soda, potisne se jo skozi obročasto membrano. 4-Kaša se izprazni iz antruma, kjer jo nato uporabijo za analizo (31).

Ugotovitve testa so bile, da je pri DGM razpadlo vseh 28 kroglic, pri USP pa le 3 (2 pri trdnosti 0,53 N) in 1 pri trdnosti 0,65 N. Vse tri so razpadle pri 100 obratih na minuto, z visoko viskoznim obrokom, vse ostale so bile nedotaknjene po 2 h testa. Iz rezultatov so ugotovili, da dvig v viskoznosti obroka zmanjša čas preživetja trših kroglic, kar je povsem pričakovano, saj so pri višji viskoznosti medija, večje strižne sile na kroglice. Predel antruma DGM ni spustil skozi nedotaknjenih kroglic, ampak samo tiste, ki so razpadle. Zaključili so, da DGM omogoča tako imitacijo biokemijskih pogojev v človeškem želodcu, kot tudi sposobnost simulacije sil mletja in mešanja, kot so prisotne in vivo (31).

Klančar in sodelavci so proučevali mehansko odpornost tablet v odvisnosti od intrinzične viskoznosti. V njihovi študiji je bila intrinzična viskoznost specifično povezana z mehansko odpornostjo matriks tablet. Termin mehanska dovzetnost tu pomeni zmanjšano integriteto gelske plasti matriks tablet po aplikaciji mehanskega stresa. Višja kot je mehanska dovzetnost gelske plasti, hitrejša je sproščanje ZU iz FO po manipulaciji

mehanskega stresa. Test so izvajali z USP 1 aparatom, to je metoda s košaro, kjer so imeli kot medij prečiščeno vodo ter temperaturo medija 37°C, pri 100 obratih na minuto. Proučevali so različne HPMC polimere, z modelno učinkovino indapamid, stisnjene v tablete. Po 1,5 h testa so tablete premestili v plastične vsebnike, ki so vsebovali 5 mL medija in 9 g steklenih kroglic z gostoto 2,5 g/mL in premerom 1 cm. Vsebnike so vertikalno stresali 10 min na laboratorijskem stresalniku (IKA) pri 300 obratih/min. Po tej manipulaciji so tablete vrnili v napravo s košaro in nadaljevali s testom sproščanja. Poleg tega so naredili tudi primerjalni test brez dodatne mehanske obremenitve. Rezultati so pokazali, da je mehanska manipulacija povzročila dvig v hitrosti sproščanja ZU pri točki vzorčenja 1,5 h. Torej stres pri 1,5 h povzroči neko abrazijo matriks gelskega sloja, ki povzroči hitrejše sproščanje iz FO (SLIKA 10). Izkazalo se je, da je bilo sproščanje ZU iz formulacije hitrejše pri tistih tabletah, ki so vsebovale manjše količine HPMC. Če bi rekli, da lahko viskoznosti povežemo s stopnjo sproščanja, je vidno, da nižje viskoznosti pomenijo hitrejše sproščanje ZU. Višja intrinzična viskoznost pa kaže na bolj počasno sproščanje ZU in bolj linearne profile sproščanja. Hipoteza, da so formulacije, ki vsebujejo polimere z višjo intrinzično viskoznostjo, bolj odporne na mehanski stres in manj dovzetne za njegove učinke, je bila tako potrjena.

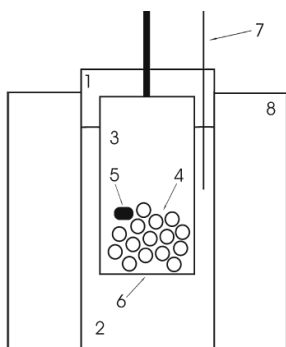


SLIKA 10: Profili sproščanja po aplikaciji mehanskega stresa v vodnem mediju za raztapljanje. Graf pokaže, da je pri HPMC z višjo viskoznostjo (F4 in F5) počasneje sproščanje, ter pri polimerih z nižjo viskoznostjo (F1, F2, F3) hitrejše sproščanje. Vidimo tudi točko preskoka v sproščanju pri 1,5 h, po aplikaciji mehanskega stresa (32).

Ob vprašanju, kako izbrati primerne polimere matriks tablet, da na njih ne bo vplival mehanski stres tekom prehoda GIT, so postavili dve pravili: uporaba polimerov z višjo intrinzično viskoznostjo, da formuliramo tablete z boljšo mehansko odpornostjo in da dvig količine polimera z manjšo intrinzično viskoznostjo ni tako učinkovit kot uporaba polimera

z višjo intrinzično viskoznostjo. Pomembno se je zavedati tudi dejstva, da bo na sproščanje ZU iz matriks ogrodij vplivala tudi velikost delcev polimera, indeks nabrekanja polimera, medij za sproščanje, itd. In, da enostavnega pravila pri podaljšanem sproščanju ni mogoče postaviti (32).

Klančar in sodelavci pa so opisali tudi razvoj novega testa sproščanja za hidrofilne HPMC ogrodne tablete, kjer so mehanski stres predstavljale plastične kroglice. Najprej so uporabljali teste sproščanja z aparatom USP 1, USP 2 in USP 3, nato pa so razvili test, ki kombinira USP 3 aparaturo in plastične kroglice, z vodo kot medijem sproščanja. Test so izvajali z recipročnimi cilindri, v katere so dali kroglice gostote $1,1 \text{ g/cm}^3$, s čimer so zagotovili primerno gibanje kroglic, ter proste interakcije s tableto. Na vrh teh kroglic so položili tableto. Najprej so potope Bio-dis nastavili na 20 dpm, po 1 h, pa so za 15 min povečali potope na 40 dpm s čimer so posnemali fazo praznjenja želodca, z močnimi mehanskimi silami na tableto. Po tem času so do konca testa ohranjali potope na 25 dpm. Za primerjavo rezultatov so naredili test brez kroglic, vendar z enakimi dpm kot opisano zgoraj, na tak način so ocenili mehanski vpliv kroglic.



SLIKA 11: Na sliki je prikazan sistem raztapljanja s plastičnimi kroglicami. 1- Posoda za medij raztapljanja. 2- Medij za raztapljanje. 3- Recipročni cilindri. 4- Plastične kroglice premera 8 mm. 5- Tableta. 6- Prepustno dno in vrh cilindrične posode s tkanino iz polipropilena z velikostjo por $840 \mu\text{m}$. 7- Naprava za jemanje vzorca. 8- Vodna kopel s temperaturo 37°C (28).

Hidrodinamski pogoji pri Bio-disu se precej razlikujejo od tistih pri USP 1 in USP 2, saj je tableta ujeta v recipročni cilindri, ki se vertikalno premika v mediju, kar povzroči hitrejše sproščanje, kot pri metodi s košaro ali vesli. Opazili so, da je ta novo razvita metoda bolj uporabna, saj so se tablete skupaj s kroglicami konstantno gibale gor in dol v cilindru in omogočale konstantne trke. Kroglice so omogočile dodatne sile trenja in hitrejšo erozijo gelske plasti matriks tablet in posledično hitrejše sproščanje ZU. S testom so ugotovili, da

so potrebne velike mehanske sile in vitro za doseganje zadovoljive korelacije z in vivo podatki (28).

V naši raziskavi je bil eden izmed glavnih predmetov preučevanja mehanska odpornost gelske plasti tablet s ksantanom. Saj lahko mehanski stres apliciran na tablete med prehodom GIT vodi v hitrejšo razgradnjo gelske plasti in vpliva na plazemske koncentracije ZU v različnih časovnih obdobjih. To pa lahko spremeni terapevtsko učinkovitost in varnost, ter vpliva na bioekvivalenco v primeru razvoja generikov. Doseganje bioekvivalence je še posebej pomembno, kadar testirane substance kažejo različno občutljivost na mehanski stres, saj so in vitro simulacije dogajanja v GIT premalo predvidljive glede na dejansko in vivo obnašanje (32).

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge bo ugotoviti minimalno količino ksantana v ogrodnih tabletah, s katero bo dosežena ustrezna robustnost nabrekliivega sloja gela. Želena hitrost sproščanja ZU iz tablet pa bo sovpadala s pričakovanimi profili podaljšanega sproščanja.

Z direktnim tabletiranjem bomo stisnili 400 mg tablete, v katere bomo vgradili modelno učinkovino pentoksifilin in nabrekliivi polimer ksantan. Deleže ksantana bomo tekom poskusa spreminjali tako dolgo, da bomo našli količino z zadovoljivo odpornostjo na vplive, ki jim bo tableta izpostavljena. Izvajali bomo preskuse raztapljanja po Ph. Eur 8, v medijih: voda, 0,063 M HCl in fosfatni pufer s $\text{pH} = 6,8$ na napravi z vesli, ter na napravi z recipročnimi cilindri. Obe bomo tudi modificirali, za dosego bolj reprezentativnih rezultatov. S pomočjo testov sproščanja in merjenja absorbance sproščene učinkovine, bomo rezultate predstavili grafično kot % sproščene ZU v odvisnosti od časa. Ker je ksantan polielektrolit in anionski polimer bosta na njegovo strukturo in obnašanje v različnih medijih, ter posledično na nabrekanje in na sproščanje ZU vplivala pH in ionska moč, ki ju bomo med poskusom spreminjali.

Zanimala nas bo tudi mehanska odpornost gelske plasti, po izvedbi novega eksperimentalnega testa na napravi z recipročnimi cilindri, z uvedeno modifikacijo – stresanjem. S tem bomo želeli posnemati fiziološko dogajanje in vivo, ter tableto izpostaviti dražljajem in situacijam, ki so pričakovani v gastrointestinalnem traktu.

3 EKPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

- Ksantan – Sigma G1253-500 G, CAS: 11138-66-2, februar 2014
- Pentoksifilin – Krka, šifra: 103742, serija UF 3444
- Laktoza
- $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ – 37%, Emsure, ACS, ISO Reag. Ph. Eur., Merck KGaA, K44995017
- KH_2PO_4 – Emsure, ISO, Merck KGaA AM0444073 323
- NaOH – Emsure, Iso Merck KGaA B0988898 347
- Prečiščena voda – pripravljen na Fakulteti za farmacijo
- pH lističi
- sistem za filtriranje:
 - igla
 - filtri 45 μm

3.2 APARATURE

- Elektronska analitska tehtnica Mettler Toledo AG245, Švica 2000
- Elektronska precizna tehtnica Mettler Toledo
- Naprava za preizkušanje z vesli (USP 2) VK7000, Vankel, New Jersey, ZDA
- Avtomatski vzorčevalnik VK8000 Vankel New Jersey, ZDA
- Naprava z recipročnimi cilindri (Bio-Dis) Varian, 18-985-1104
- Sistem za vzorčenje VK8000 Varian
- Grelec za vodo VK750D, model 65-1100, demo-118, Vankel New Jersey, ZDA
- UV-VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453, ZDA
- Tabletirka na udarec Kilian SP300 (serijska št.: 32508)
- Naprava za določanje trdnosti tablet VK200 Tablet hardness tester, Vankel (8-697-896), VanderKamp, ZDA
- Naprava za merjenje pH raztopin pH Meter, MA 235, Mettler Toledo, Švica
- Ultrazvočna kadička PIO SONIS 4, Iskra, Slovenija
- Magnetno mešalo IKA-WERKE RO 15 Power
- Stresalnik Lab dancer IKA, 01.733762
- Stresalnik Vibromix 10, serija 245, Tehnica, Slovenija

3.3 POSTOPKI IN METODE

3.3.1 PRIPRAVA MEDIJEV ZA TESTE SPROŠČANJA

Poskuse smo izvajali v treh medijih: prečiščena voda, 0,063 M HCl, ter fosfatni pufer s pH = 6,8. Prečiščena voda je bila pripravljena na Fakulteti za farmacijo.

Priprava 0,063 M HCl (pH = 1,2): Za pripravo tega medija smo uporabljali 37% HCl_{aq}, iz katere smo najprej pripravili 1 L 1 M HCl, za kar smo potrebovali 82,5 mL 37% HCl. To smo s prečiščeno vodo dopolnili do 1 L, ter pH preverili s pH lističi. Nato pa smo preračunali, da za 5 L medija, s pH = 1,2 potrebujemo 315 mL pripravljene 1 M HCl, ter s prečiščeno vodo dopolnimo do meniskusa.

Priprava fosfatnega pufera s pH = 6,8: Najprej smo pripravili 0,2 M NaOH, kjer smo 8 g NaOH raztopili v prečiščeni vodi, ter z njo dopolnili 1 L bučko do meniskusa. Nato pa smo preračunali, da za 2 L pufera s pH = 6,8 potrebujemo 224 mL te pripravljene raztopine 0,2 M NaOH, ter 13,612 g KH₂PO₄, to smo dopolnili s prečiščeno vodo do meniskusa. Nato smo s pH metrom določili pH pufera, ki se je vedno gibal v vrednostih od 6,750-6,890. Pufru smo izračunali tudi ionsko moč, ki je bila 0,5 M.

3.3.2 UMERITVENA KRIVULJA ZA PENTOKSIFILIN V VODI, HCl IN FOSFATNEM PUFRU

Z UV-VIS spektrofotometrijo smo določali količino sproščenega PF, zato smo morali za analizo rezultatov predhodno narediti umeritveno premico za vse tri uporabljane medije. Umeritveno premico za vsak medij smo delali v dveh paralelah. Natančno smo zatehtali približno 20 mg PF in ga kvantitativno prenesli v 200 mL bučko. S prečiščeno vodo smo bučke napolnili do polovice in jih za 10 sekund postavili na UZ kadičko, da smo raztopili učinkovino. Nato smo bučke z vodo napolnili do meniskusa in jih ponovno postavili na UZ kadičko za 10 min. Po tem času smo bučko 1 postavili na magnetno mešalo za 1 h, bučko 2 pa za 1,5 h. Iz dobljene osnovne raztopine smo z redčenjem pripravili 6 raztopin standardov v razmerju: 1 mL/20 mL, 2/20, 3/20, 5/20, 2/25, 5/25.

Koncentracije smo izračunali po enačbi:

- Za osnovno raztopino: $C = m/V$ /enačba 1/
- Za standard pa smo enačbo preuredili do: $C_1 = c \cdot l/20$ /enačba 2/
itd. do raztopine standarda številka 6.

Na Hewlett-Packard UV-VIS spektrofotometru smo raztopinam standardov znanih koncentracij nato izmerili absorbanco pri valovni dolžini 274 nm, saj ima tam naša modelna učinkovina PF enega izmed absorpcijskih maksimumov (13) in preko Beer-Lambertovega zakona izračunali naklon umeritvene premice pentoksifilina v vodi. Določili smo tudi kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2), ki predstavlja merilo za opis moči povezave med dvema spremenljivkama, to sta koncentracija (C) in absorbanca (A). Za oba medija smo določili dober R^2 , saj predstavlja $R^2 = 1$ maksimalno korelacijo med spremenljivkama. Kar pomeni, da bolj kot se približamo 1, boljša je povezava med spremenljivkama in v našem primeru je ta povezava zelo dobra.

Beer-Lambertov zakon:

$$c = k \cdot A \quad \text{iz tega sledi } k = c/A \quad \text{/enačba 3/}$$

c...koncetracija (mg/mL)

k...naklon umeritvene premice (mL/mg)

A...absorbanca

Enak postopek, kot je opisan zgoraj, smo ponovili tudi pri določanju umeritvene premice pentoksifilina v HCl (pH = 1,2) in fosfatnem pufru s pH = 6,8. Pri določanju umeritvene premice za fosfatni pufer je bila le-ta skoraj enaka kot za HCl, zato smo zaradi manjših komplikacij pri izračunih tudi za fosfatni medij uporabljali umeritveno premico za HCl.

Tabela 1: Enačbe umeritvenih premic in Pearsonov korelacijski koeficient

Medij	Enačba umeritvene premice	R^2
prečiščena voda	$c \text{ (mg/mL)} = 0,027645 \text{ mg/mL} \cdot A$	0,99971
HCl (pH = 1,2)	$c \text{ (mg/mL)} = 0,027997 \text{ mg/mL} \cdot A$	0,99985

3.3.3 PRIPRAVA TABLETIRNE MASE IN IZDELAVA TABLET ZA TESTE SPROŠČANJA

Pri pripravi prahov za tabletiranje, smo imeli več serij z različnimi deleži prahov. Pri začetnih serijah smo mešali le ksantan in pentoksifilin v različnih razmerjih, nato pa smo v novih serijah dodali laktozo, kjer se je spreminjalo le razmerje med ksantanom in laktozo, PF je bil ves čas 100 mg. Pri vseh serijah smo imeli približno 400 mg tablete, vendar se lahko pojavijo odstopanja, saj smo tablete izdelali ročno. Tik preden smo tablete uporabili za teste sproščanja, smo jih tehtali na 400 ± 5 mg natančno. (Serije v časovnem obdobju od februarja 2014 do januarja 2015).

Tabela 2: Sestava tablet v različnih serijah. Količina pentoksifilina, ksantana in laktoze, debelina tablet, njihova trdnost in število tablet, ki smo jim določili trdnost.

SERIJA TABLET	PF [mg]	XA [mg]	LA [mg]	Debelina [mm]	Povprečna trdnost [kN]	ŠT. TABLET
Tablete 1A	100	300	/	16	42,7	8
Tablete 1B	200	200	/	16	61,8	9
Tablete 1C	100	300	/	12	54,98	5
Tablete 1D	200	200	/	12	70,7	5
Tablete 2Ax	100	100	200	12	60,4	3
Tablete 2Ay	100	100	200	10,5	72,1	3
Tablete 2Bx	100	50	250	12	67,8	5
Tablete 2By	100	50	250	10,5	73,9	4
Tablete 2Cx	100	60	240	12	75,68	4
Tablete 2Cy	100	60	240	10,5	77,52	4
Tablete 3Ax	100	80	220	12	37,5	3
Tablete 3Ay	100	80	220	10,5	48,25	4
Tablete 3Bx	100	90	210	12	77,12	4
Tablete 3By	100	90	210	12	77,12	4
Tablete 3Cx	100	110	190	12	76,7	3
Tablete 3Cy	100	110	190	12	76,7	3
Tablete 4Ax	100	110	190	12	46,03	4

Tablete 4Ay	100	110	190	12	46,03	4
Tablete 4Bx	100	140	160	12	61,37	4
Tablete 4By	100	140	160	12	61,37	4
Tablete 4Cx	100	170	130	12	61,8	4
Tablete 4Cy	100	170	130	12	61,8	4
Tablete 4Dx	100	200	100	12	61,9	4
Tablete 4Dy	100	200	100	12	61,9	4

Za tabletiranje smo uporabljali ravne pečate, premera 12 mm, z ravnimi robovi. Pečate na tabletirki smo imeli najprej nastavljene pri vrednostih: zg: 154 mm, sp: 170 mm, kjer je bila razlika med pečatoma 16 mm. Ta razlika med pečatoma predstavlja tudi debelino tablete. Te tablete so bile premalo trde in so pri testu sproščanja prehitro razpadle, zato smo trdnost povečali, oziroma razliko med pečatoma zmanjšali na 12 mm, ki se je izkazala za ustrezno. Naredili smo tudi nekaj poskusov pri debelini tablet 10,5 mm, za primerjavo z debelino 12 mm, vendar nismo opazili bistvenih razlik v sproščanju, zaradi česar smo se odločili ohraniti debelino tablet 12 mm, ne glede na spreminjajoče se trdnosti tablet med različnimi serijami.

Nastavitve pečatov:

- Zg. pečat: 158 mm
- Sp. pečat: 170 mm

(razlika pečatov, ki prav tako predstavlja debelino tablete: 12 mm)



SLIKA 12: Tabletirka na udarec na FFA.



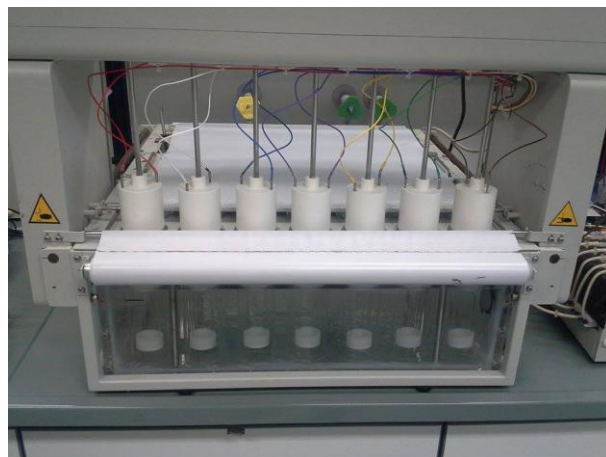
SLIKA 13: Zatehta 400 mg prahov za vsako tableto posebej.

3.3.4 PRESKUS RAZTAPLJANJA ZA TRDNE FARMACEVTSKE OBLIKE IN MERJENJE ABSORBANCE

Izvajali smo dva preskusa raztapljanja: na napravi z vesli, VK7000 (USP 2) (slika 14), ter na napravi z recipročnimi cilindri Varian (Bio-Dis) (slika 15). Za vzorčenje smo v obeh primerih uporabljali avtomatski vzorčevalnik VK 8000 (slika 16). Iz izmerjenih absorbanc vzorcev smo z računalniškim programom UV-Visible ChemStation Software 8453 HP izračunali koncentracije sproščene učinkovine v vzorcu. Nato smo iz teh podatkov izračunali deleže sproščene učinkovine po določenem času.



SLIKA 14: Naprava z vesli na FFA.



SLIKA 15: Naprava z recipročnimi cilindri na FFA.



SLIKA 16: Avtomatski vzorčevalnik.

3.3.5 TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI (USP 2)

Najprej smo teste sproščanja izvajali na napravi z vesli. V steklene posode smo dali 900 mL medija. Test smo izvajali pri 100 obratih na minuto, ter temperaturo vzdrževali na 37,5°C. Šele ko je bila temperatura medija dosežena (po približno 30 min) smo v posode vstavili tablete. Delali smo v 6 paralelah. Časi vzorčenja so bili 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h. Volumen odvzetega vzorca je bil 10 mL, medija po odvzemu nismo nadomeščali.

3.3.5.1 IZRAČUNI PRI TESTU SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI:

$$V_n = V_0 - (n \cdot V_{vz}) \quad \text{/enačba 4/}$$

V_n .. volumen medija po n-kratnem vzorčenju (mL)

V_0 .. začetni volumen (900 mL)

V_{vz} ..volumen vzorca (10 mL)

n .. število vzorcev

$$m_n = c_n \cdot V_n + \sum_{n=1}^n c_n \cdot V_{vz} \quad \text{/enačba 5/}$$

m_n .. masa sproščene učinkovine ob n-tem vzorcu (mg)

c_n ..koncentracija sproščene učinkovine ob n-tem vzorcu (mg/mL)

$$X_n = m_n \cdot 100/m_0 \quad \text{/enačba 6/}$$

X_n .. delež sproščene učinkovine (%)

m_0 .. začetna masa učinkovine v tableti (100mg)

Za lažji izračun smo te enačbe uporabili v Excelu in rezultate prikazali grafično, z odstotkom sproščene zdravilne učinkovine v odvisnosti od časa.

Ko smo naredili prvi test na napravi z vesli, smo se soočili s problemom prehitrega sproščanja ZU. Ob tem smo pomislili na možne napake, ki smo jih odpravili z modifikacijami, s katerimi smo delali vse nadaljnje preskuse na napravi z vesli.

Napake pri preskusu:

1. Napaka zaradi premajhnega odvzema vzorca: namesto 10 mL smo odvzeli 5 mL, saj lahko ksantan zamaši kapilare in filtre za odvzem vzorca.
2. Premajhna trdnost tablet je lahko pogost razlog za prehitro sproščanje. Tablete smo stiskali pri razliki pečatov 16 mm (zg. pečat 154 mm, sp. pečat 170 mm), zato bi lahko zmanjšali to razliko na 12 mm, ali celo na 10 mm in s tem povečali trdnost.
3. Ksantan lahko absorbira svetlobo valovne dolžine 274 nm, enako kot PF in zato dobimo lažno previsoke rezultate. Zato bi lahko izvedli predhodno filtracijo raztopine, da se znebimo ksantana, ali pa preverili, če ksantan absorbira svetlobo te valovne dolžine.

3.3.6 RAZVOJ METODE NA NAPRAVI Z VESLI (USP 2):

3.3.6.1 FILTRIRANJE VZORCA

Ko smo naredili prvi test, smo ugotovili, da nam naprava jemlje vzorce neenakomerno, zato nadalje na kapilare za odvzem vzorca nismo nameščali filtrov, temveč smo vsak vzorec filtrirali ročno, z uporabo 45 µm filtrov. Na tak način smo se izognili zamašenosti filtrov zaradi vezave ksantana, ki vpliva na lažno prevelik odstotek sproščene učinkovine.

3.3.6.2 UPORABA OKROGLIH MREŽIC

Med poskusom so se nam tablete prilepile na dno posode, ker ima ta sistem na dnu posode mrtvo cono in tam ne pride do mešanja medija. Zato smo v prihodnjih testih uporabljali okrogle mrežice (ki se primarno uporabljajo za čaj, slika 17), v katere smo vstavili tablete, s čimer smo preprečili prilepljanje tablet na dno, ter omogočili enakomerno nabrekanje gelske plasti polimera in sproščanje učinkovine.



SLIKA 17: Okrogla mrežica za tablete.

3.3.6.3 POVEČANJE TRDNOSTI TABLET

Med preskusom smo pomislili, da so tablete premalo trde, zato je bilo sproščanje prehitro, kar smo modificirali, tako da smo zmanjšali debelino tablete iz 16 mm na 12 mm, ter s tem stisnili trše tablete, pri katerih je pričakovati počasnejše sproščanje. Saj kadar zmanjšamo volumen oz. debelino tablet, s tem povečamo število povezav med delci, kar se kaže v večji trdnosti.

3.3.6.4 ABSORPCIJA SVETLOBE PRI KSANTANU

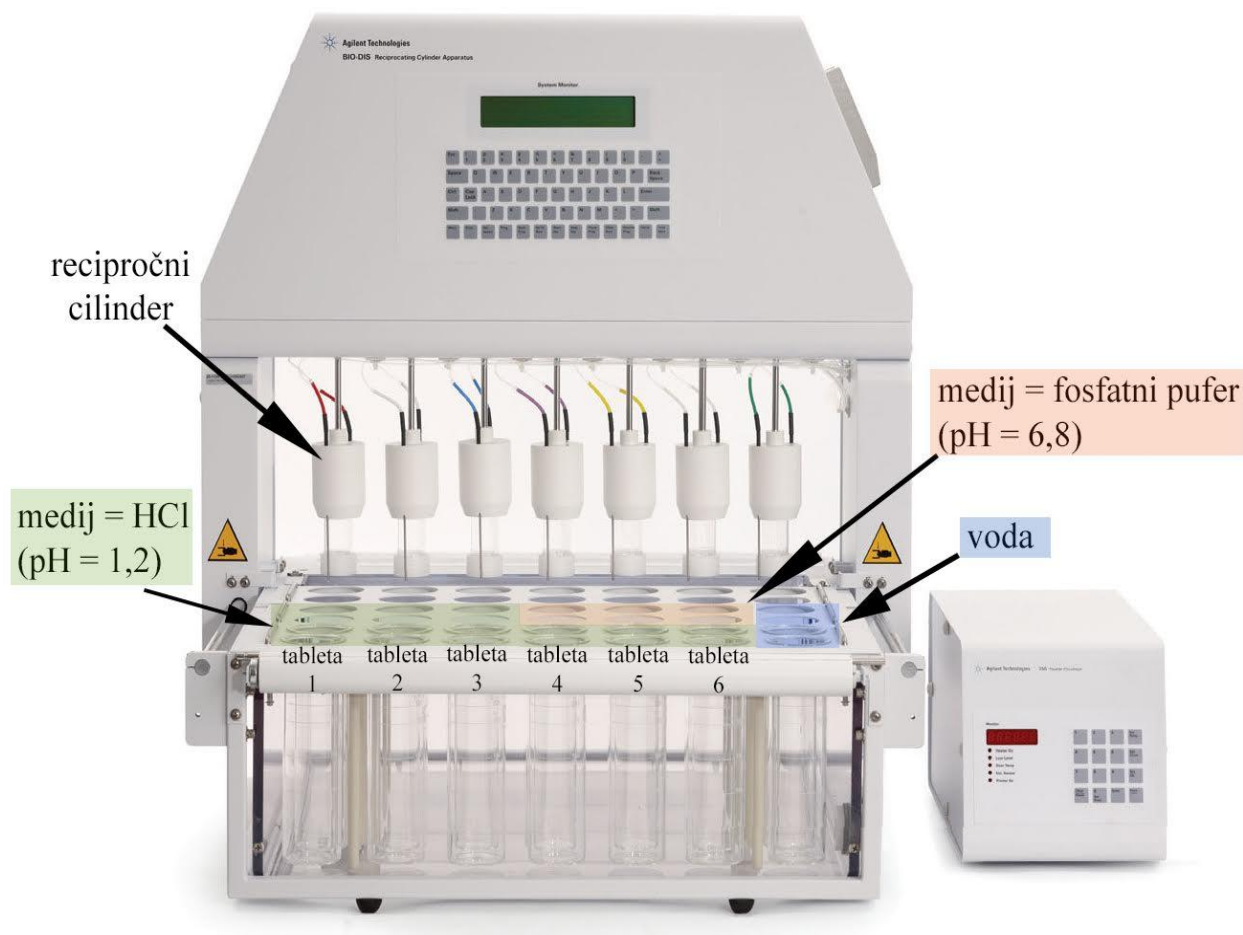
Želeli smo eliminirati možnost, da bi XA absorbiral svetlobo iste valovne dolžine kot PF, zato smo v 250 mL bučko zatehtali približno 300 mg ksantana in s prečiščeno vodo dopolnili do meniskusa, ter po 24 h, ko smo prenehali z mešanjem na magnetnem mešalu pomerili absorbanco ($A = 0,069255$) in izračunali koncentracijo ($C = 0,0019145$). Iz rezultatov koncentracije in absorbance, ki bi za dosego linearnosti oziroma absorpcije svetlobe pri 274 nm morala biti med 0,3 – 1,0, smo lahko razločno videli, da ksantan ne absorbira svetlobe pri valovni dolžini 274 nm, tako da vrhovi, ki jih dobimo pri tej valovni dolžini pripadajo PF in lahko možnost lažno prevelikih rezultatov sproščene učinkovine pri testu sproščanja na napravi z vesli izključimo.

3.3.6.5 INTERAKCIJE MED KSANTANOM IN PENTOKSIFILINOM

Pri določanju vsebnosti PF v tabletah, smo iz rezultatov lahko zaključili da PF in ksantan ne vstopata v nobene interakcije. Primerjali smo koncentracijo PF v bučki, v kateri smo raztopili samo 100 mg PF ($c = 0,403$ mg/mL), s koncentracijo v bučki v kateri je bila tableta serije 1A ($c = 0,3915$ mg/mL). Iz rezultatov koncentracij, ki se bistveno ne razlikujeta, lahko vidimo, da PF in XA ne vstopata v interakcije, saj v primeru ko smo imeli v bučki še ksantan ni prišlo do povišanega procenta učinkovine po meritvi A.

3.3.7 TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI (USP 3)

Teste sproščanja smo izvajali tudi na napravi z recipročnimi cilindri (Bio-Dis). V tem primeru naprava omogoča, da med samim preskusom tablete, ki jih vstavimo v recipročne cilindre, izpostavimo različnim medijem.



SLIKA 18: Slikovni prikaz Bio-dis aparature, ki smo jo uporabili pri izvajanju testov sproščanja, iz katere so razvidni različni mediji, ki smo jih uporabili pri tabletah. Prve tri tablete predstavljajo paralele, prav tako so tablete 4,5,6 paralele.

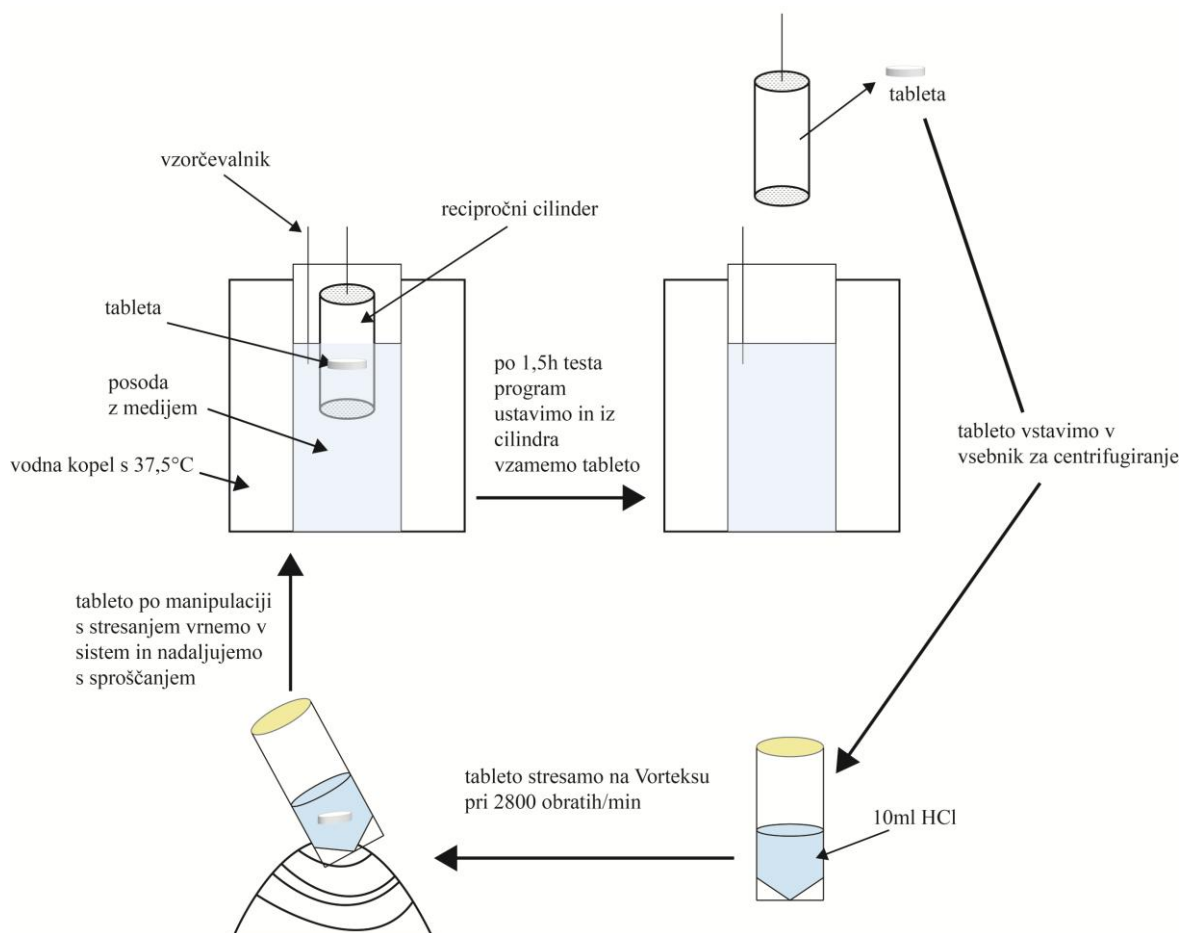
Tabela 3: Prikaz 28 posod (obarvana polja), v katerih smo imeli po 250 mL različnih medijev, v katerih je potekalo sproščanje.

Čas vzorčenja: 8 in 12 h	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	PUFER pH = 6,8	PUFER pH = 6,8	PUFER pH = 6,8	H ₂ O
Čas vzorčenja: 4 in 6 h	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	PUFER pH = 6,8	PUFER pH = 6,8	PUFER pH = 6,8	H ₂ O
Čas vzorčenja: 1,5 in 2 h	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	H ₂ O
Čas vzorčenja: 0,5 in 1 h	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	HCl pH = 1,2	H ₂ O
TABLETA	1	2	3	4	5	6	

Temperaturo kopeli v sistemu smo vzdrževali na 37°C in tablete v cilindre vstavili šele po pol ure, ko se je taka temperatura vzpostavila tudi v posodah z medijem. V vsaki posodi je bilo 250 mL medija, naprava za vzorčenje pa je iz vsake posode jemala vzorec (10 mL) dvakrat, nato se je prestavila v naslednjo linijo. Čas potapljanja cilindrov v sistemu je bil 10 sekund, delali smo pri obremenitvi 20 dpm (dips per minute = potop na minuto). Imeli smo 6 tablet, ki so nam predstavljale paralele. Časi vzorčenja so bili 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h.

3.3.7.1 RAZVOJ METODE SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI Z VKLJUČENO MODIFIKACIJO - STRESANJEM

Osnova našega testa je bil raziskovalni članek (32) pri katerem so test izvajali na napravi z vesli v prečiščeni vodi, pri čemer so po 1,5 h testa tablete prenesli v plastične vsebnike s 5 mL medija in 9 g steklenih kroglic. Vsebnike so nato vertikalno stresali 10 min, pri 300 obratih/min, nato pa so tablete vrnili v košare in nadaljevali test.



SLIKA 19: Slikovni prikaz modificiranega testa sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri, z vključenim stresanjem.

Ta test smo modificirali tako, da smo ga izvedli na napravi z recipročnimi cilindri, ki tableto že v osnovi bolj obremeni, kot naprava z vesli. Izvajali smo ga v 6 paralelah, kjer so bile prve 3 paralele ves čas preskusa izpostavljene mediju s $\text{pH} = 1,2$ (0,063 M HCl), druge 3 pa so se po 2 h prestavile iz medija s $\text{pH} = 1,2$ v medij s $\text{pH} = 6,8$. Ti pogoji so bili takšni kot v preskusih, ki smo jih že predhodno izvajali na napravi z recipročnimi cilindri (tabela 3). Časi vzorčenja so bili razdeljeni, saj smo morali program za odvzem vzorca po 1,5 h testa ustaviti, tako da so bili najprej časi vzorčenja 0,5 h, 1 h, 1,5 h. Nato smo tablete iz testa vzeli in jih prestavili v plastične vsebnike primarno namenjene centrifugiranju (centrifugirke), kjer je bilo 10 mL medija 0,063 M HCl. Vsak vsebnik smo 5 min vertikalno stresali na napravi Vorteks, pri 2800 obratih na minuto (38) in na Laboratorijskem stresalniku, pri enakih obratih. Po stresanju smo tablete vrnili v recipročne cilindre, 10 mL medija v katerem smo stresali, smo zlili v posode z medijem za

sproščanje, ter ta na novo dodani volumen na koncu tudi upoštevali pri izračunu koncentracije sproščene ZU. Program smo ponovno zagnali, le da smo tu odvzem vzorca začeli že po 15 min, ter nato nadaljevali z odvzemi po 30 min, 2,5 h, 4,5 h, 6,5 h, 10,5 h. Skupni časi vzorčenja v obeh programih so tako bili: 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 1,45 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h.

S stresanjem tablet smo začeli po 1,5 h testa. Razlog za to je, da naj bi tableta v tem času v telesu dosegla pilorični sfinkter, ki predstavlja največje mehanske obremenitve za tableto pri prehodu GIT, saj tam potekajo močne kontrakcije, ki lahko povzročijo hiter razpad tablete. Po tem, ko tableta doseže sfinkter, jo lahko le-ta preko retropulzije vrne nazaj v želodec, tako da se sproščanje ZU iz tablete ohranja pri istem $\text{pH} = 1,2$, kot je bil na začetku (to smo preučevali v prvih treh paralelah), tableta pa lahko gre skozi odprti sfinkter naprej v duodenum, kjer je $\text{pH} = 6,8$ (to smo ponazorili v drugih treh paralelah testa). Te paralele smo nato primerjali med sabo, da smo videli, kako se tableta obnaša pri obeh pogojih. S takšnimi pogoji testa smo želeli ponazoriti situacijo, ki se lahko zgodi in vivo in se kar najbolj približati dejanskemu dogajanju v GIT.

3.3.8 PRESKUS TRDNOSTI TABLET

V skladu s Ph. Eur. 8 smo izvajali preskus trdnosti tablet iz poglavja 2.9.8. Test smo izvajali s Tablet Hardess testerjem, kjer smo tableto postavili med mirujoči del (levo) in gibljivi del (desno), pri čemer se tableta dotika mirujočega dela. Gibljivi del nato stisne tableto ob mirujoči del, pri čemer tableta počni in naprava izmeri silo v N, ki je potrebna za lom tablete. Predpis za preskus trdnosti tablet v Ph. Eur. opisuje določevanje odpornosti tablet na lomljenje pod specifičnimi pogoji (33). V farmakopeji je predpisano, da je potrebno določiti trdnost 10 tabletam iz vsake serije. Zaželena trdnost je bila 100 N, vendar smo ugotovili, da je to z našimi snovmi nemogoče, saj je ksantan slabo stisljiv material, ki tudi pri višjih silah stiskanja ne daje ustrezne trdnosti, problematična pa je tudi nizka vlaga v ozračju. Trdnost tablet smo med procesom preizkušali na vsaki 5 stisnjeni tableti, ter ne glede na nizke trdnosti nismo prilagajali pečatov, ampak smo ohranjali razliko pečatov na začetno nastavljeno (to je bila 12 mm).

3.3.9 PRESKUS ENAKOMERNOSTI VSEBNOSTI

Predpis v poglavju 2.9.6. po Ph. Eur. določa preizkušanje 10 tablet ene serije, mi smo to prilagodili tako, da smo vzeli le 3 tablete iz serije in test izvedli na dveh serijah. Prva serija

je imela 300 mg XA in 100 mg PF, druga pa 200 mg XA in 200mg PF, v obeh primerih smo imeli 400 mg tablete. Test smo izvedli tako, da smo vsako izmed šestih tablet posamično stehali in dali v 250 mL bučko, ter s prečiščeno vodo dopolnili do meniskusa. Tako smo dobili bučke od 1-6, v bučko 7 smo dali sam ksantan (300 mg), v bučko 8 pa sam PF (100 mg). Zadnji dve bučki sta predstavljali kontrolne vzorce. Vse bučke smo dali na ultrazvočno kadičko za 5 min in nato na magnetna mešala za 2 h. Želeli smo, da razpade cela tableta, torej da se v mediju raztopi celotna ZU. Po 2 h smo dali bučke ponovno na ultrazvočno kadičko za 5 min. Tablete v tem času še vedno niso razpadle, zato smo nadaljevali z mešanjem na magnetnem mešalu 24 h, dokler niso razpadle vse tablete v bučkah. Ker raztopine niso bile bistre, smo morali iz vsake raztopine 10 mL prefiltrirati skozi 10 µm filter in to še nadaljnje redčiti, prvo serijo 1/20, drugo 1/50.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET

Naredili smo nekatere preskuse po 8. Evropski farmakopeji, s katerimi smo ovrednotili naše tablete.

4.1.1 ENAKOMERNOST MASE ENOODMERNIH FARMACEVTSKIH OBLIK

Predpis v poglavju 2.9.5. Ph. Eur. pravi, da lahko največ dve tableti iz serije 20 tablet presežeta standardno deviacijo 5 %, nobena pa ne sme odstopati za več kot 10 % (23). V našem primeru smo ročno zatehtali 400 mg prahov za stiskanje, ter ročno polnili v tabletirno vdolbino, zato rezultati ne morejo biti tako natančni, kot če bi za polnjenje uporabljali polnilni čolniček.

Tabela 4: Povprečne mase tablet, standardne deviacije in število tablet, ki smo jih uporabili za test enakomernosti mase.

Tablete	Povprečna masa [mg]	Min. masa [mg]	Max. masa [mg]	SD	Št. tablet
Tablete 1A	404,7	397,0	414,86	5,865	14
Tablete 1B	407,3	403	410	2,37	10
Tablete 1C	415,96	413,43	417,78	1,846	5
Tablete 1D	410,25	408,53	414,44	2,98	5
Tablete 2Ax	415,29	411,13	419,84	3,608	5
Tablete 2Ay	414,69	411,73	417,84	2,49	5
Tablete 2Bx	402,46	400,09	405,32	2,16	5
Tablete 2By	405,35	401,22	410,95	4,11	5
Tablete 2Cx	408,805	402,0	414,0	4,91	6
Tablete 2Cy	402,69	401,56	403,62	1,48	5
Tablete 3Ax	404,13	401,2	406,9	2,32	5
Tablete 3Ay	405,76	404,5	408,0	1,58	5
Tablete 3B _{1,2}	403,35	402,2	404,14	0,828	5
Tablete 3B _{1,2 in 6,8}	402,68	401,95	403,72	0,754	5
Tablete 3C _{1,2}	404,99	402,9	406,24	1,48	5

Tablete 3C_{1,2 in 6,8}	401,566	399,0	402,68	1,34	6
Tablete 4Ax	402,503	397,51	406,0	3,62	5
Tablete 4Ay	401,67	398,60	403,97	2,26	5
Tablete 4Bx	400,0	397,0	404,0	2,94	5
Tablete 4By	398,6	395,7	400,8	2,14	5
Tablete 4Cx	395,7	394,11	396,63	0,941	5
Tablete 4Cy	395,35	394,18	396,64	1,009	5
Tablete 4Dx	402,25	401,20	404,34	1,476	5
Tablete 4Dy	403,66	403,29	404,23	0,408	5

Tablete ustrezajo zahtevam testa enakomernosti mase enoodmernih farmacevtskih oblik.

4.1.2 PRESKUS TRDNOSTI TABLET

Ne glede na nizke vrednosti trdnosti, se tablete niso krušile, smo pa med testiranjem sproščanja tablet ugotovili, da trdnost močno vpliva na sproščanje ZU iz tablet s podaljšanim sproščanjem. Rezultate smo predstavili v tabeli, kjer vidimo, da so se trdnosti med posameznimi serijami spreminjale, zato ker smo ohranjali debelino tablet 12 mm in je med preskusom nismo spreminjali. Trdnosti so se lahko spreminjale tudi zaradi tega, ker je ksantan higroskopen in veže vlago, in je možno, da je nekaj vlage prišlo v plastično vrečko v kateri smo shranjevali tablete, kot tudi v vrečko v kateri je bil shranjen ksantan.

Tabela 5: Trdnosti tablet, izmerjene s Tablet hardness testerjem.

Serije tablet	Povprečna trdnost [N]	Min. trdnost [N]	Max. Trdnost [N]	Št. tablet
Tablete 1A	42,7	33,1	49,5	8
Tablete 1B	61,8	58,1	65,4	9
Tablete 1C	54,98	52,2	56,5	5
Tablete 1D	70,7	67,5	73,5	5
Tablete 2Ax	60,4	58,5	61,4	3
Tablete 2Ay	72,1	67,8	76,4	3
Tablete 2Bx	67,8	55,3	87,0	5

Tablete 2By	73,9	63,7	75,3	4
Tablete 2Cx	75,68	72,5	74,7	4
Tablete 2Cy	77,52	75,4	81,9	4
Tablete 3Ax	37,5	35,2	37,3	5
Tablete 3Ay	48,25	42,1	49,6	4
Tablete 3B_{1,2}	77,12	72,0	81,4	4
Tablete 3B_{1,2} in 6,8	77,12	72,0	81,4	4
Tablete 3C_{1,2}	76,7	75,3	76,7	5
Tablete 3C_{1,2} in 6,8	76,7	75,3	76,7	5
Tablete 4Ax	46,03	43,9	49,0	4
Tablete 4Ay	46,03	43,9	49,0	4
Tablete 4Bx	61,37	57,4	69,0	4
Tablete 4By	61,37	57,4	69,0	4
Tablete 4Cx	61,8	56,4	64,5	4
Tablete 4Cy	61,8	56,4	64,5	4
Tablete 4Dx	61,9	60,5	63,9	4
Tablete 4Dy	61,9	60,5	63,9	4

4.1.3 PRESKUS ENAKOMERNOSTI VSEBNOSTI

Predpis v poglavju 2.9.6. po Ph. Eur. določa preizkušanje 10 tablet ene serije, mi smo to prilagodili, da smo vzeli le 3 tablete iz serije in test izvedli na dveh serijah. Pri merjenju vsebnosti je ključno, da vzorca ne izgublamo. Ker se med filtracijo vzorec lahko izgublja, smo želeli to možnost izključiti in najprej z UV-VIS spektrofotometrom pomerili absorbanco filtriranega in nefiltriranega PF. Rezultati so prikazani v tabeli.

Tabela 6: Absorbance raztopine PF.

Pentoksifilin	Absorbanca (A)	Koncentracija (C)
Filtriran PF	0,72893	0,40302
Nefiltriran PF	0,73552	0,40667

Iz tabele je razvidno, da so razlike v koncentraciji med filtrirano raztopino PF in nefiltrirano minimalne, s čimer smo dokazali, da filtri nase ne vežejo učinkovine in da lahko rezultate absorbanca za ostale raztopine 1-6 štejemo za reprezentativne.

Tabela 7: Vsebnosti ZU v tabletah serije 1A in serije 1B.

tablete	Ksantan [mg]	Željena vsebnost PF [mg]	Dejanska vsebnost PF [mg]
Tablete1A			
1	300	100	97,88
2	300	100	90,13
3	300	100	98,53
Tablete1B			
4	200	200	186,66
5	200	200	204,56
6	200	200	195,80

Po izračunu povprečnih mas in standardnih deviacij smo dobili rezultate:

- za serijo tablet 1A:
 - $m = 95,51$ mg (povprečna)
 - $SD = \pm 4,67$
- za serijo tablet 1B:
 - $m = 195,67$ mg
 - $SD = \pm 8,9532$

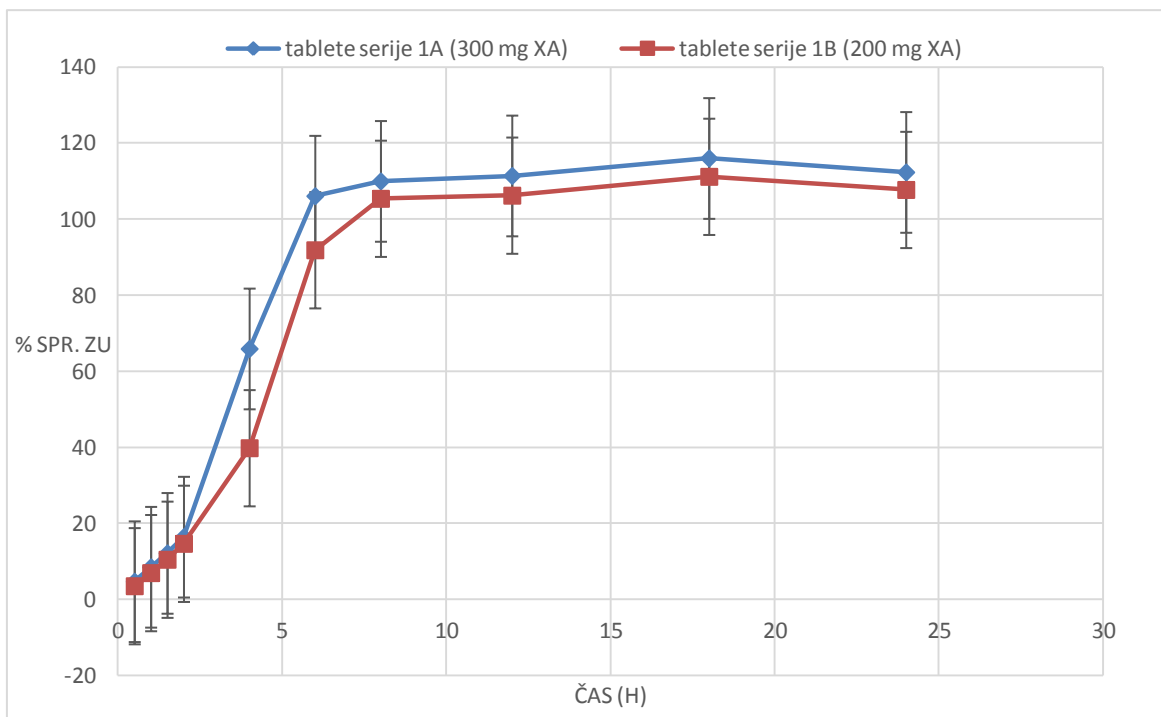
Videli smo, da so rezultati znotraj farmakopejsko predpisanega intervala, pri katerem mora biti vsebnost učinkovine v tableti v intervalu od 85 do 115 % predpisane vrednosti. Tako, da tablete ustrezajo preskusu enakomernosti vsebnosti.

4.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA KSANTANA NA SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ OGRODNIH TABLET

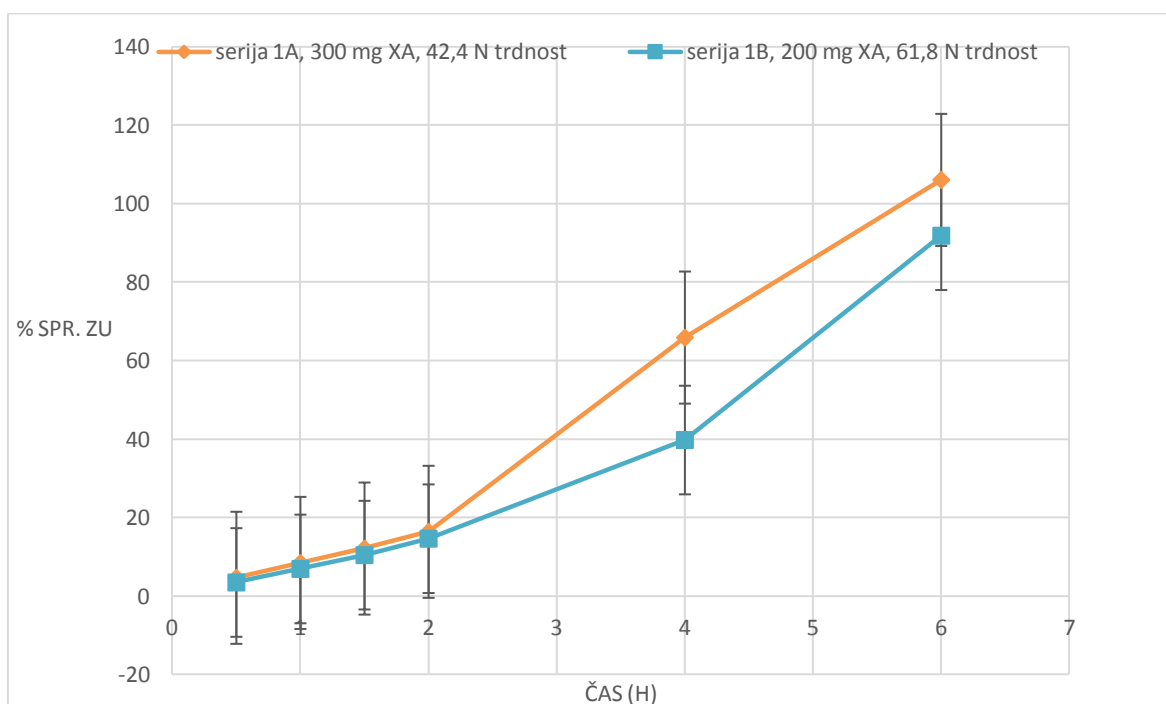
4.2.1 TEST SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI (USP 2)

4.2.1.1 TEST SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI PRED MODIFIKACIJO METODE

Prvi preskus raztapljanja smo izvajali na napravi z vesli (Vankel) v prečiščeni vodi, s tremi paralelami tablet serije 1A, ter tremi paralelami tablet serije 1B. Primerjali smo vpliv količine ksantana na hitrost sproščanja PF iz tablet. Glede na literaturne podatke smo pričakovali, da bo sproščanje pri večji količini ksantana počasnejše, saj naj bi se tvorilo več intermolekularnih povezav med verigami ksantana, ki tako tvorijo bolj robusten in tog gelski sloj. V našem primeru pa je bilo sproščanje ZU iz tablet serije 1B hitrejše, kot pri seriji 1A. Glede na to, da smo pričakovali, da bo sproščanje pri 1A seriji, ki ima več ksantana upočasnjeno, bi ta rezultat smatrali kot napačen. Izkazalo se je, da smo pri tem testu naleteli na številne nepravilnosti, kot so premajhna trdnost tablet, odstotek sproščene učinkovine nad 100 % itd., ki smo jih za dosego reprezentativnega vzorca odpravili z modifikacijo osnovnega testa na napravi z vesli (poglavje 3.3.6). Opazili smo, da je ksantan začel zelo hitro nabrekati, po 4-6 urah pa se je sprostila skoraj večina učinkovine, kar kaže na to, da je gelska plast sicer debela, vendar vseeno dovolj porozna in prepustna za hitro sproščanje PF. Pomembna ugotovitev tega testa, ki se je izkazala za eno izmed ključnih tudi v nadaljnjih preskusih, pa je, da ima trdnost tablet velik vpliv na sproščanje PF. Saj je pri večji trdnosti število povezav med polimernimi verigami večje, ki tako tvorijo bolj robusten gelski sloj in upočasnijo difuzijo ZU iz ogrodja. Ne glede na to, da smo pri večji količini ksantana pričakovali počasnejše sproščanje, se je v tem primeru za prevladujočo izkazala trdnost tablet. Pri seriji 1B, ki je imela kar za 20 N višjo trdnost od serije 1A, in hkrati tudi manj ksantana, je bilo sproščanje počasnejše. Iz tega rezultata smo sklepali, da moramo za dosego ustreznega sproščanja, zagotoviti tudi zadovoljivo trdnost proučevanih tablet.



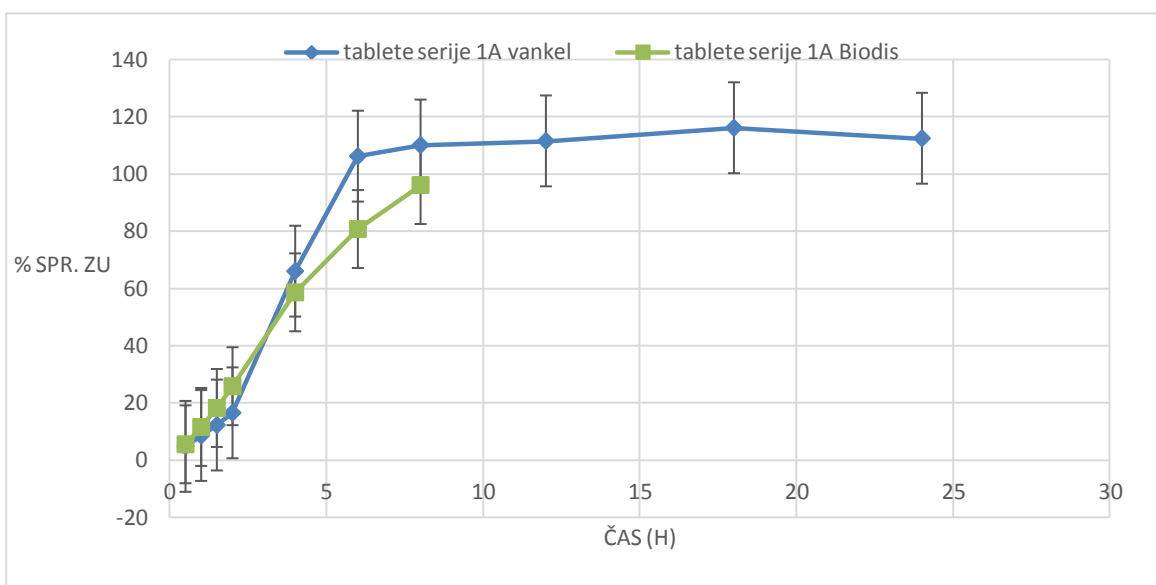
GRAF 1: Sproščanje pred modifikacijo metode. Razlike v profilih sproščanja pri seriji tablet 1A (300 mg XA) in seriji tablet 1B (200 mg XA), v mediju prečiščena voda na napravi z vesli, pred uvedenim razvojem metode in modifikacijami. Trdnost (1A)=42,7 N, Trdnost (1B)=61,8 N.



GRAF 1a: Sproščanje pred modifikacijo metode. Bolj podroben prikaz grafa 9. Sproščanje od 0-6 ure, prikazuje podrobnejši prikaz razlik v sproščanju serij tablet 1A in 1B. Vidimo kako je pri večji trdnosti pri seriji 1B upočasnjeno sproščanje.

4.2.1.2 POTRDITEV VPLIVA PREMAJHNE TRDNOSTI NA NAPAKE PRI SPROŠČANJU PRED MODIFIKACIJO NAPRAVE Z VESLI, Z NAPRAVO USP 3

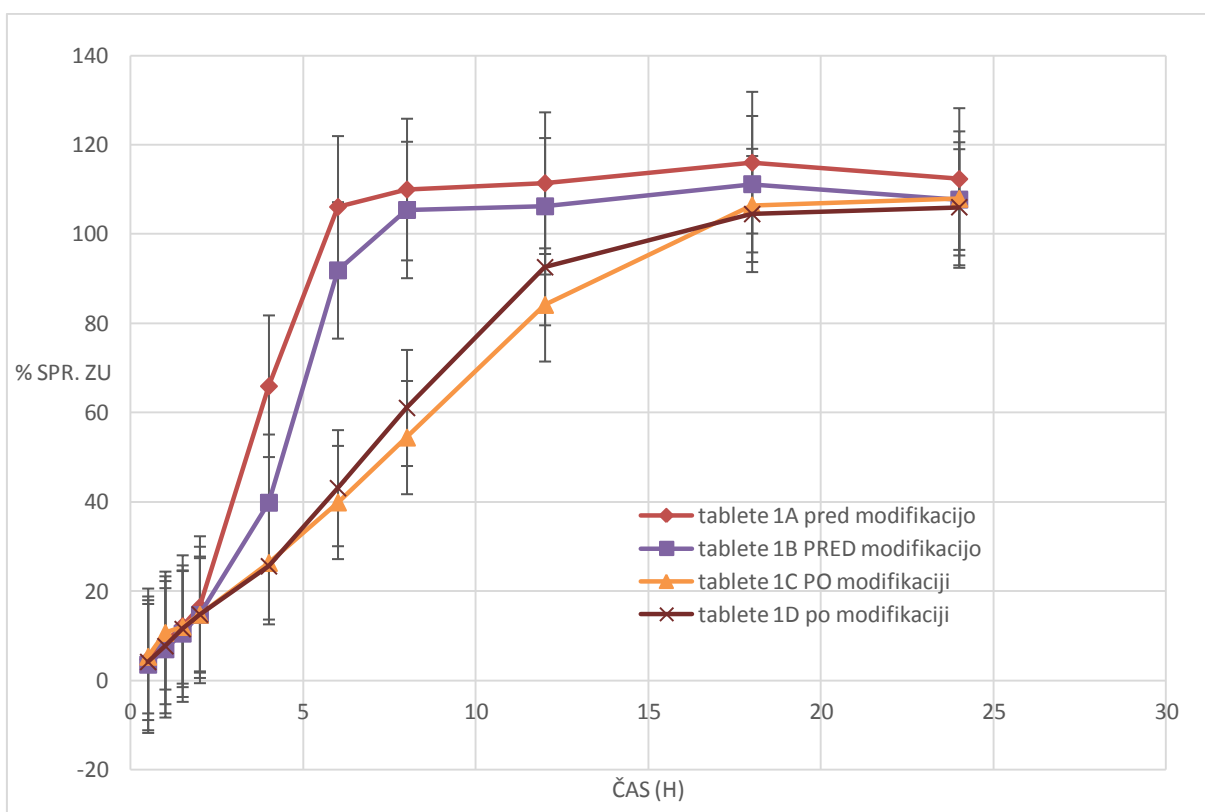
Zaradi neuspeha prvega poskusa smo se odločili, da bomo najprej izvedli test sproščanja na napravi Bio-dis (USP 3), s katero posnemamo peristaltiko v črevesju in še močnejše obremenimo tableto. Pričakovano sproščanje iz tablet je tu hitrejšo, kot na napravi z vesli. Pri Bio-dis smo uporabljali tablete istih serij 1A in 1B, kot pri preskusu na napravi z vesli. Med opazovanjem tablet med preskusom smo opazili, da so tablete serije 1B med 4 in 6 uro skoraj povsem izginile, tablete iz serije 1A pa so bile močno zmanjšane. Po 8 urah ni bilo v nobeni posodi več vidnih tablet, kar kaže na hiter razpad in posledično hitro sproščanje. S tem lahko potrdimo, da premajhna trdnost vpliva na prehitro sproščanje PF iz tablet. Vendar pa lahko ob pogledu priloženega grafa 2 takoj opazimo, da je sproščanje z Bio-dis počasnejše v primerjavi s sproščanjem pred modifikacijo metode na napravi z vesli, kar glede na pričakovane vrednosti ni logično. Vendar se najverjetneje razlog za tak rezultat skriva v tem, da smo pred modifikacijo metode uporabljali filtre nameščene na kapilarno za odvzem vzorca in da so se zaradi ksantana očitno zamašili in nam jemali manjše količine vzorcev od 10 mL, zato so prišli lažno previsoki rezultati, ker smo pri izračunu upoštevali odvzeme po 10 mL. Pri Bio dis pa smo filtrirali ročno, zato eliminiramo možnost, da bi v tem primeru prišlo do lažno povišanih koncentracij PF. In lahko iz tega sklepamo, da zamašenost filtrov vpliva na prevelik odstotek sproščene učinkovine pri sproščanju pred modifikacijo metode.



GRAF 2: Primerjava profilov sproščanja pri Sproščanju pred modifikacijo metode in na napravi z recipročnimi cilindri (Bio dis), pri tem smo uporabljali isto serijo tablet, za lažjo korelacijo rezultatov.

4.2.1.3 TEST SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI PO RAZVOJU METODE IN MODIFIKACIJAH

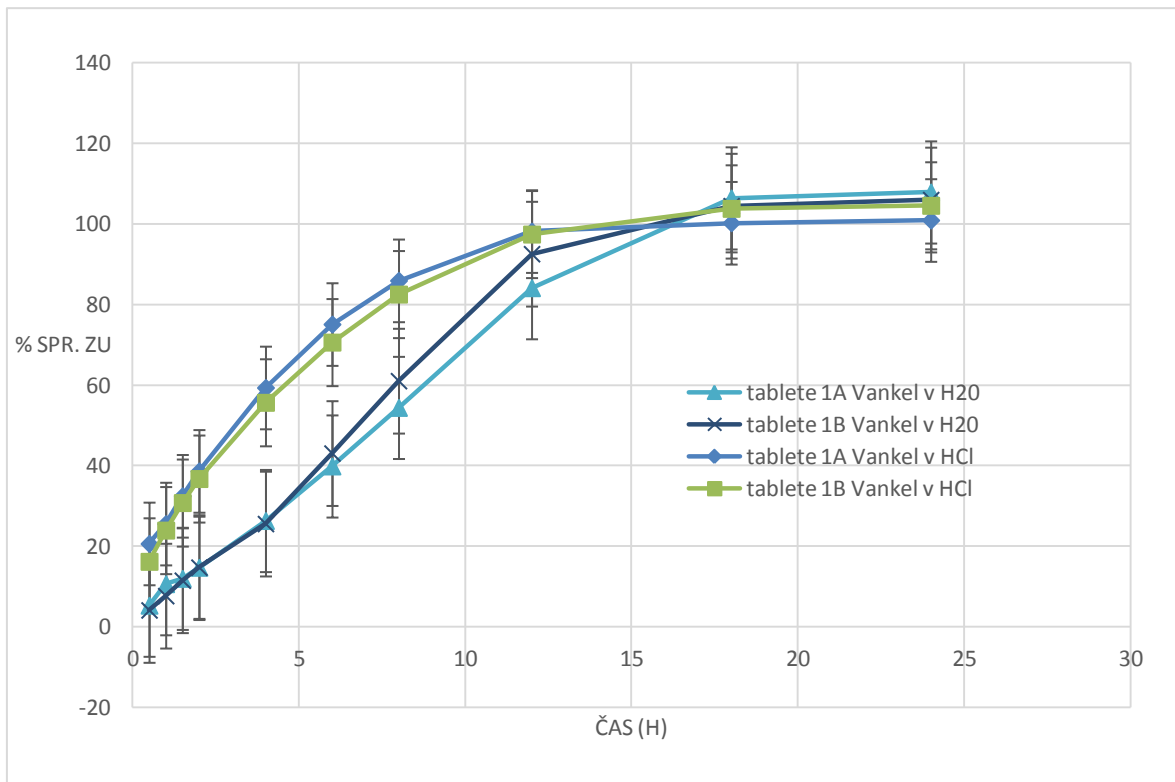
Ponovno smo naredili preskus sproščanja na napravi z vesli, po modifikaciji metode. Med preskusom smo opazovali kaj se dogaja s tabletami 1C in 1D in ugotovili, da tablete sicer nabrekajo vendar so po 6 urah še povsem razločno vidne, v prejšnjem primeru pri sproščanju pred modifikacijo metode, pri večji debelini tablete in manjši trdnosti, pa so v tem času že izginile. Tudi s primerjavo obeh grafov, lahko vidimo počasnejše sproščanje pri tabletah s povišano trdnostjo (1C in 1D). Potrdimo lahko, da s tem ko izboljšamo trdnost tablet, povzročimo spremembe v supramolekularni strukturi ksantanskih verig, ki tvorijo večje število reverzibilnih povezav med verigami. Posledično tvorijo bolj robustno in debelejšo plast hidrogela, ki upočasni sproščanje PF iz ogrodnih tablet.



GRAF 3: Primerjava testa sproščanja pred modifikacijo (serija 1A in 1B) in testa po modifikaciji metode (serija 1C in 1D). Iz grafa je razvidno, kako je bilo sproščanje 1C in 1D serije tablet po modifikaciji metode počasnejše kot pri sproščanju pred modifikacijo metode. Trdnost (1A)=47,6 N, trdnost (1B)=61,8 N, trdnost (1C)=54,89 N, trdnost (1D)=70,7 N.

4.2.2 VPLIV KISLEGA MEDIJA NA SPROŠČANJE IZ TABLET S KSANTANOM IN NA NABREKANJE GELSKE PLASTI KSANTANA

Preverjali smo, kako se ksantan obnaša pod vplivom različnih medijev, kjer smo testirali sproščanje v prečiščeni vodi in v 0,063 M HCl s pH = 1,2. Testirali smo serijo tablet 1C in 1D. Izvajali smo modificirana testa na napravi z vesli. Iz rezultatov in iz grafa je razvidno, da ksantan v mediju s pH = 1,2 (0,063 M HCl) nabreka zelo počasi, kar pomeni, da počasneje ustvari gelsko plast okoli tablete in se zato na začetku hitreje sprosti večji delež učinkovine. Iz literaturnih podatkov vemo, da je ksantan anionski polimer s pKa 3,1, kar pomeni da na sproščanje iz tablet vplivata tako ionska moč kot pH (36). Če gledamo sproščanje od 0,5 - 4 ure pri obeh testih, lahko vidimo očitno hitrejše sproščanje PF v 0,063 M HCl. Tako, da iz tega lahko zaključimo, da bo za doseganje podaljšanega sproščanja v mediju 0,063 M HCl potrebna večja količina ksantana, kot pa je potrebna za sproščanje v prečiščeni vodi. Tam so karboksilne skupine ksantana ionizirane, poleg tega so ksantanske verige naključno zvite (v neurejenem stanju) in tako izpostavljene vodnim molekulam, posledica tega je večja stopnja nabrekanja in tvorba debelejšje plasti gela, kar upočasni prehod ZU iz ogrodja v medij. Te ugotovitve so potrdili tudi v diplomski nalogi Lah (36), kjer so ugotovili, da so tablete, ki so nabrekale v medijih z višjo ionsko močjo (kar v našem primeru predstavlja 0,063 M HCl), tvorile na pogled tanjši in bolj čvrst hidrogelski plašč in so tudi po 8 urah obdržale konsistenco in obliko. Pri tabletah, ki so nabrekale v mediju z nižjo ionsko močjo (v našem primeru prečiščena voda), pa se je tvorila debelejša in manj čvrsta hidrogelska plast in tablete tudi po 6 urah niso imele več oblike tablete, ampak so se tvorili sferični kosmiči.



GRAF 4: Primerjava profilov sproščanja na napravi z vesli v dveh različnih medijih HCl in H₂O. V obeh primerih tablete 1A vsebujejo 300 mg XA in tablete 1B 200 mg XA.

Med poskusom, smo prišli do podobnih ugotovitev kot v diplomski nalogi Lah (36). Opazovali smo, kaj se dogaja s tabletami v mediju 0,063 M HCl s pH = 1,2 in ugotovili, da tablete tudi po 24 urah poskusa niso izginile, zato smo samo zato, da smo videli kaj se zgodi s tabletami, pustili test še 16 ur, vendar je bilo ogrodje tablet prisotno tudi po koncu preskusa. Tako vidimo, da višja ionska moč povzroči tvorbo tanjšega in poroznega, a bolj čvrstega gela, saj tableta tudi po 40 urah testa ohrani obliko in konsistenco. Pri višji ionski moči, v kislem mediju so karboksilne skupine XA v neionizirani obliki, zato pride do manjšega števila interakcij med polimernimi verigami in je nastali gel bolj porozen. Tako vidimo, da bolj čvrsti gel še ne pomeni nujno počasnejšega sproščanja ZU, kar smo z našim preskusom potrdili, saj je bilo sproščanje v 0,063 M HCl hitrejše, zaradi manj premrežene konsistence gela.

4.2.3 VPLIV PREČIŠČENE VODE NA SPROŠČANJE PF IZ TABLET S KSANTANOM IN NA NABREKANJE GELSKE PLASTI KSANTANA

Iz rezultatov na grafu 4 lahko vidimo počasnejše sproščanje PF v prečiščeni vodi, v primerjavi s sproščanjem v 0,063 M HCl. Iz literaturnih podatkov vemo, da so v vodi, ki ima pH približno 7 in ionsko moč 0, karboksilne skupine ksantana ionizirane. To povzroči, da so verige naključno zvite, torej v neurejenem stanju in se zato lažje hidratirajo, ter posledično tvorijo debelejši sloj gela, ki na začetku bolj zadržuje sproščanje ZU v okoljski medij. Med opazovanjem tablet med testom sproščanja smo videli, da so vse tablete v mediju prečiščena voda do 20 ure popolnoma izginile. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v diplomskih nalogah Lah (36) in Koželj (9). Pri Koželj so v vseh poskusih, ki so jih izvedli v prečiščeni vodi ugotovili, da so tablete po 24 h preskusa razpadle, torej ne glede na to, da se najprej tvori debelejši gelski plašč, je le-ta šibke strukture. Polimer na površini erodira, polimerne verige prehajajo v medij in struktura se razrahlja, ter se popolnoma razgradi (10). Lah pa je ugotovila, da tablete že po 6 urah niso imele več oblike tablete, ampak so nastali sferični kosmiči (36).

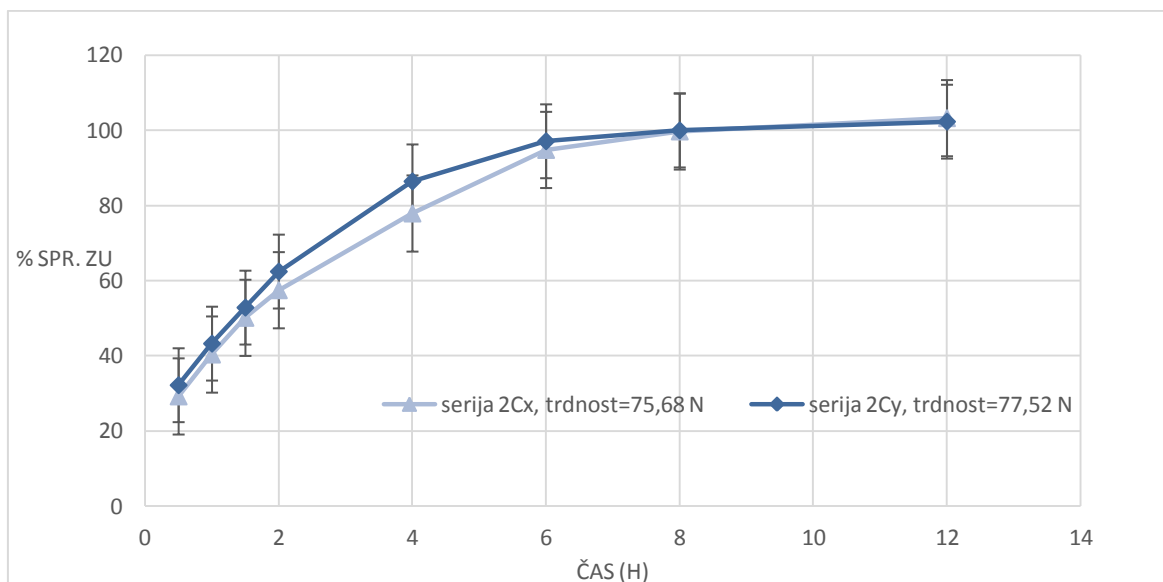
4.3 DOLOČANJE NAJMANJŠE KOLIČINE KSANTANA ZA DOSEGANJE ROBUSTNEGA SPROŠČANJA

Želeli smo ugotoviti, kolikšna je najmanjša količina ksantana, ki jo moramo vgraditi v tableto, da bomo ohranjali podaljšano sproščanje. Najprej smo teste izvajali na napravi z vesli, nato pa na napravi z recipročnimi cilindri (Bio dis).

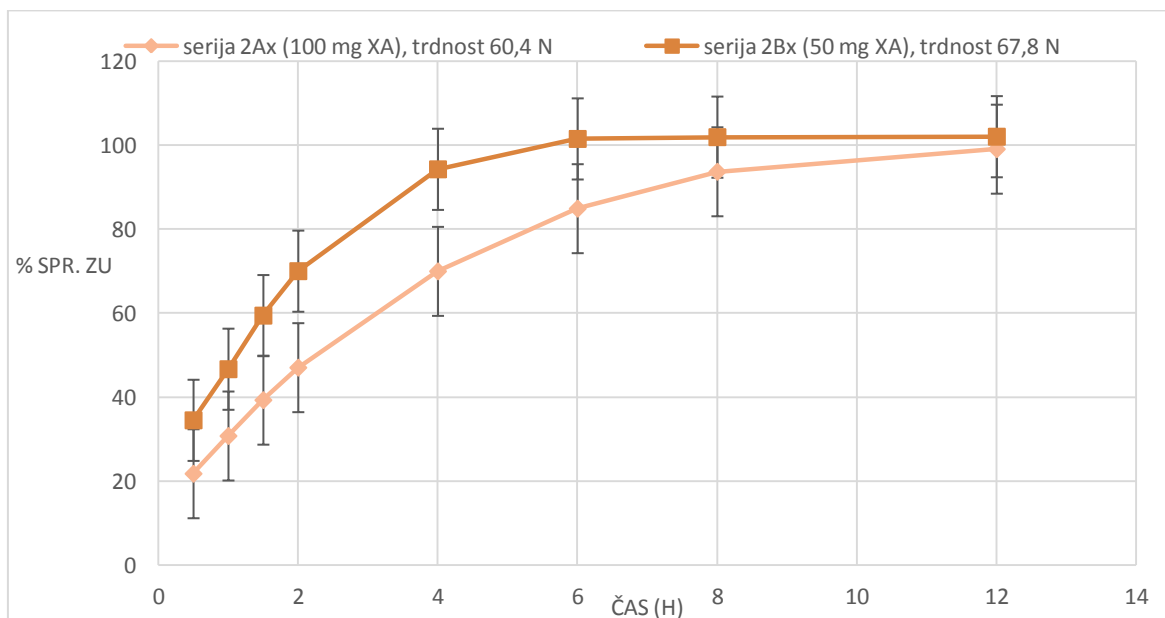
4.3.1 TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI

Teste sproščanja smo izvajali v mediju 0,063 M HCl s pH = 1,2. Najprej smo stisnili tablete serije 2Ax in 2Ay. Naš cilj je bil zmanjševati količino ksantana na najmanjšo potrebno za podaljšano sproščanje, zato smo v seriji tablet 2Bx in 2By drastično zmanjšali količino ksantana na 50 mg in opazovali razlike. Ker smo videli, da količina 50 mg XA ni več predstavljala podaljšanega sproščanja, smo se odločili količino ksantana postopno povečevati. Naredili smo novo serijo tablet 2Cx in 2Cy. V tej seriji se je količina ksantana 60 mg izkazala za zadostno za ohranjanje podaljšanega sproščanja. Na prvem grafu smo predstavili samo primerjavo med paralelami 2Cx in 2Cy. Iz grafa 5 je razvidno, da razlika pečatov 10,5 mm, pri kateri se poveča trdnost tablet, vpliva na hitrejšo sproščanje ZU iz

ogrodnih tablet. V primeru, ko imamo razliko 12 mm pa je sproščanje počasnejše. Rezultati niso v skladu s pričakovanim. Saj smo predhodno dokazali, da večja trdnost povzroči počasnejše sproščanje ZU iz ogrodnih tablet. Razlogov za tak rezultat je lahko več, verjetno pa gre za spremenjene pogoje v laboratoriju, ki so vplivali na tak rezultat.



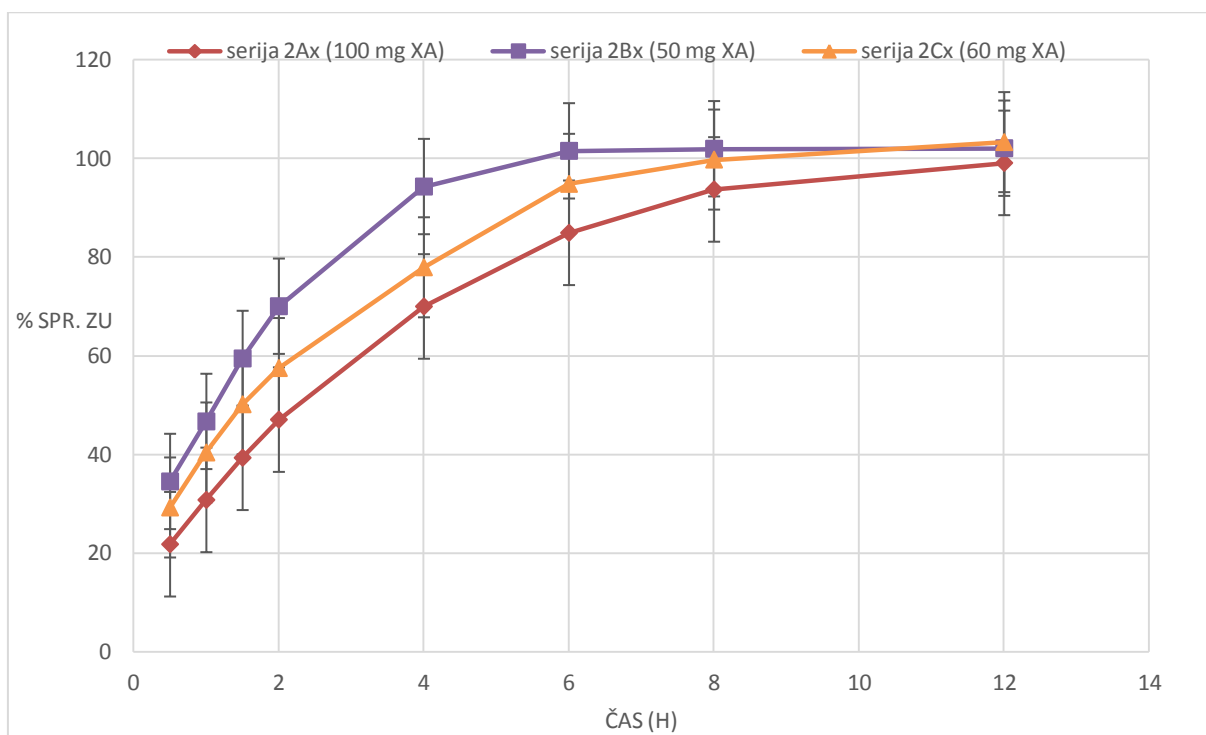
GRAF 5: Primerjava profilov sproščanja na napravi z vesli. Seriji 2Cx in 2Cy imata obe količino ksantana 60 mg. Trdnost (2Cx) = 75,68 N, trdnost (2Cy) = 77,52 N. Pri seriji 2Cy smo pričakovali počasnejše sproščanje zaradi malenkost višje trdnosti, vendar je zaradi pogojev v laboratoriju sproščanje hitrejše kot pri 2Cx.



GRAF 6: Primerjava profilov sproščanja pri dveh mejnih količinah ksantana, minimalni in maksimalni. Serija 2Ax (100 mg XA), serija 2Bx (50 mg XA). Trdnost (2Ax) = 60,4 N, trdnost (2Bx) = 67,8 N. Vidimo hitrejše sproščanje pri manjši količini ksantana.

Iz grafa 6 je razvidno kako poteka pri manjši količini ksantana (serija 2Bx) sproščanje hitreje, kot pri večji količini (serija 2Ax), kar je povsem logično, saj pri večji količini ksantana nastane več medmolekulskih interakcij in debelejši ter manj porozen gelski sloj okoli tablete. Le-ta lažje zadržuje ZU v ogrodju in omogoča bolj postopno sproščanje učinkovine v okoljski medij. Pri manjši količini XA pa je gelska plast bolj razredčena in ZU hitreje difundira iz ogrodja. Vidimo tudi, da pri tako veliki razliki v količini ksantana sama trdnost tablet nima velikega vpliva. Saj je ne glede na to, da je pri seriji 2Bx, trdnost malenkost večja, kar naj bi upočasnilo sproščanje, sproščanje hitrejše, saj tablete vsebujejo 1x manj ksantana kot serija 2Ax. Iz tega grafa vidimo, da je količina 50 mg XA premajhna, da lahko govorimo o podaljšanem sproščanju, saj se je prehitro sprostil prevelik delež učinkovine (po 4 urah je bilo sproščene že skoraj 100 % ZU). Zato smo z nadaljnjimi testi postopno povečevali količino ksantana od 50 mg proti 100 mg, dokler nismo našli količine primerne za podaljšano sproščanje.

Na grafu 7 smo primerjali profile sproščanja za tri različne količine ksantana (100 mg, 50 mg, 60 mg). Na grafu se vidi, da nam predstavlja 60 mg XA zadostno količino za podaljšano sproščanje PF iz ogrodnih tablet.



GRAF 7: Primerjava profilov sproščanja treh različnih količin ksantana v ogrodnih tabletah, pri čemer nam serija 2Cx predstavlja 60 mg ksantana v 400 mg tableti. Ta vrednost ksantana je minimalna količina, ki nam zagotavlja dovolj robusten gelski sloj.

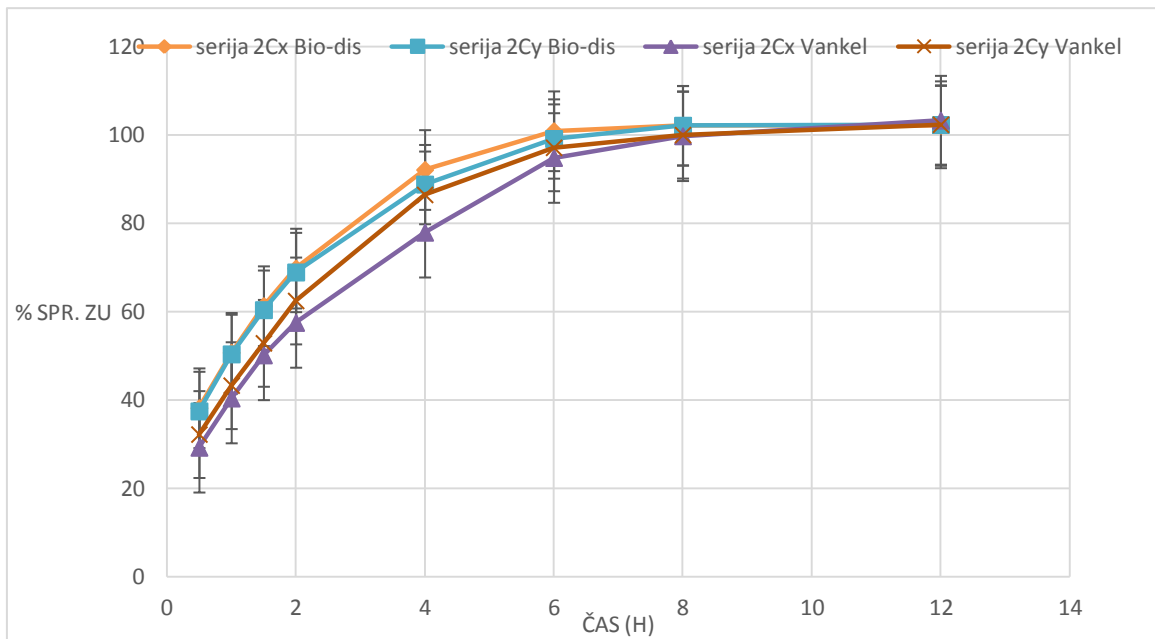
Po poskusih opravljenih na napravi z vesli, smo se odločili preveriti odpornost gelskega sloja pri večjih obremenitvah, kakor jih predstavlja naprava z recipročnimi cilindri. Glede na prvi poskus z Bio-dis smo pričakovali, da bo sproščanje PF iz ogrodnih tablet, pri pogojih, ki bolj simulirajo mehanske dražljaje gastrointestinalnega trakta, hitrejše. Iz tega razloga bomo za doseg podaljšanega sproščanja potrebovali večje količine ksantana, kot pri sproščanju na napravi z vesli.

4.3.2 TESTI SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI (BIO DIS)

Iz poskusov na napravi z vesli smo zaključili, da predstavlja 60 mg XA zadostno količino za ohranjanje podaljšanega sproščanja. Z novimi testi na napravi z recipročnimi cilindri pa želimo preveriti ali je ta količina še vedno zadostna za podaljšano sproščanje ZU iz tablet. Prvi test smo izvajali z isto serijo tablet kot zadnji test na napravi z vesli, 2Cx in 2Cy.

4.3.2.1 PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA NA NAPRAVI Z VESLI IN NA NAPRAVI Z RECIPROČNIMI CILINDRI

Na grafu 8 je prikazana primerjava profilov sproščanja PF iz tablet, za test sproščanja na napravi z vesli, serija 2Cx in 2Cy Vankel, ter za test na napravi z recipročnimi cilindri, serija 2Cx in 2Cy Bio-dis. S tem grafom smo želeli prikazati razliko v sproščanju pri različnih obremenitvah tablet, ki imata enako maso ksantana. Vemo, da večje mehanske obremenitve (naprava z recipročnimi cilindri) predstavljajo večji stres na gelski sloj okoli tablete, s tem povzročajo večjo erozijo polimera in hitrejše razpletanje ksantanskih verig, ter posledično hitrejše sproščanje PF iz ogrodja v okoljski medij.



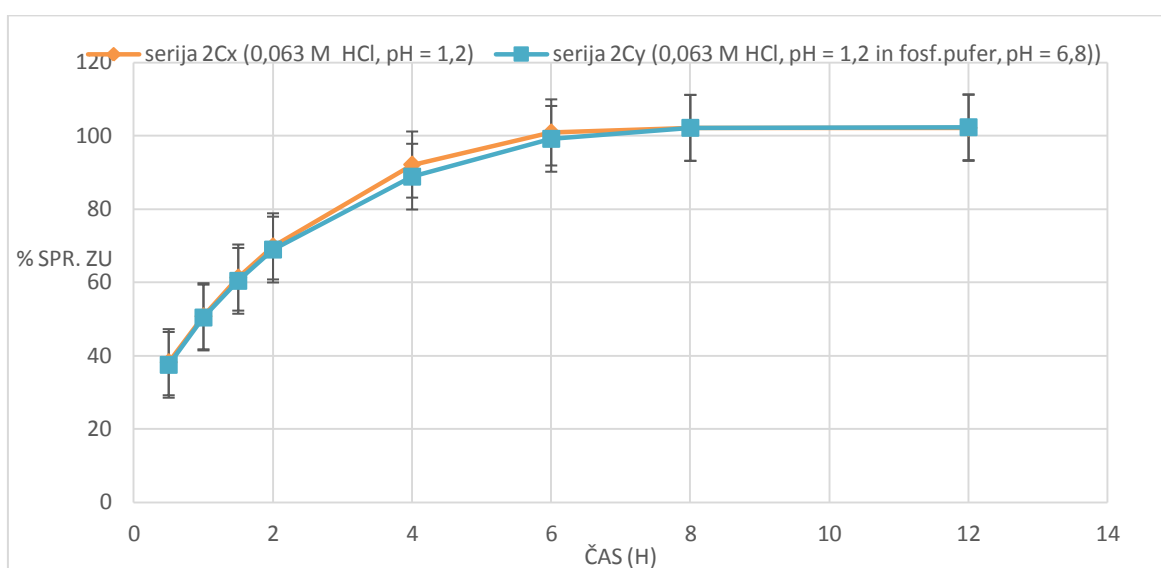
GRAF 8: Primerjava profilov sproščanja pri enaki količini ksantana na dveh različnih testih, ki tableto različno obremenita. Vidimo, da seriji 2Cx in 2Cy izvedeni na napravi Bio-dis povzročita hitrejša sproščanja v primerjavi s sproščanjem na Vankel-u. Bio-dis predstavlja večjo obremenitev za tableto, saj bolj ponazarja dogajanje v GIT.

Iz rezultatov na grafu 8 vidimo, da 60 mg XA ni dovolj za ohranjanje podaljšanega sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri, zato moramo to količino povečevati, dokler ne najdemo najmanjše zadostne količine, ki nam bo zagotovila dovolj robustne tablete.

4.3.2.2 PRIKAZ IZPOSTAVITVE TABLET DVEMA RAZLIČNIMA MEDIJEMA (1. MEDIJ 0,063 M HCl IN 2. MEDIJ 0,063 M HCl, TER FOSFATNI PUFER), S KATERIMA ŽELIMO PONAŽORITI DOGAJANJE V GIT

Na grafu 9 smo predstavili primerjavo med prvimi tremi paralelami (serija 2Cx), ki so bile izpostavljene mediju s pH = 1,2, ter drugimi tremi (serija 2Cy), ki so bile izpostavljene dvema medijema pH = 1,2 in pH = 6,8. S to situacijo smo želeli ponazoriti možno dogajanje v GIT, pri čemer tableta po 1,5-2 h doseže pilorus, ki jo lahko kot ventil spusti naprej v tanko črevo, kjer je pH = 6,8, ali pa tableto vrne v želodec, kjer je pH = 1,2. Ko smo primerjali rezultate, smo videli, da je prišlo pri seriji 2Cy do upočasnitve sproščanja, ko smo po 2 h prestavili tablete iz bolj kislega v bolj bazičen medij. Ti rezultati so pričakovani, saj je sproščanje pri pH = 1,2 hitrejša, oziroma je tu lažja difuzija molekul ZU iz ogrodja, saj je gelski sloj bolj porozen. Ob menjavi medija iz pH = 1,2 v medij s pH = 6,8 pa se je sproščanje upočasnilo, saj je pri višjem pH več COOH skupin ksantana ioniziranih in nastane več medmolekulskih povezav med verigami. V literaturi so sklepali,

da so verige XA v medijih z nižjo ionsko močjo (višji pH) naključno zvite, zato prihaja do interakcij med ksantanom in vodo, kar se posledično kaže kot večja stopnja nabrekanja in tvorba debelejšje plasti hidrogela, ter končno tudi počasnejše sproščanje (35). Vendar je problematično to, da se zaradi začetnega medija pH = 1,2 že na začetku sprosti skoraj 40 % učinkovine, saj je ksantan bolj občutljiv na medij s pH = 1,2, zato smo morali z nadaljnjimi poskusi zagotoviti zadostno količino ksantana, ki nam je omogočila dovolj robustne tablete za prehod skozi želodec. Iz tega torej zaključimo, da je sproščanje PF v 0,063 M HCl s pH = 1,2 hitrejše (XA je neioniziran), ko pa se po 2 h v seriji 2Cy prestavimo v medij s pH = 6,8 (XA je ioniziran) se sproščanje rahlo upočasnji.

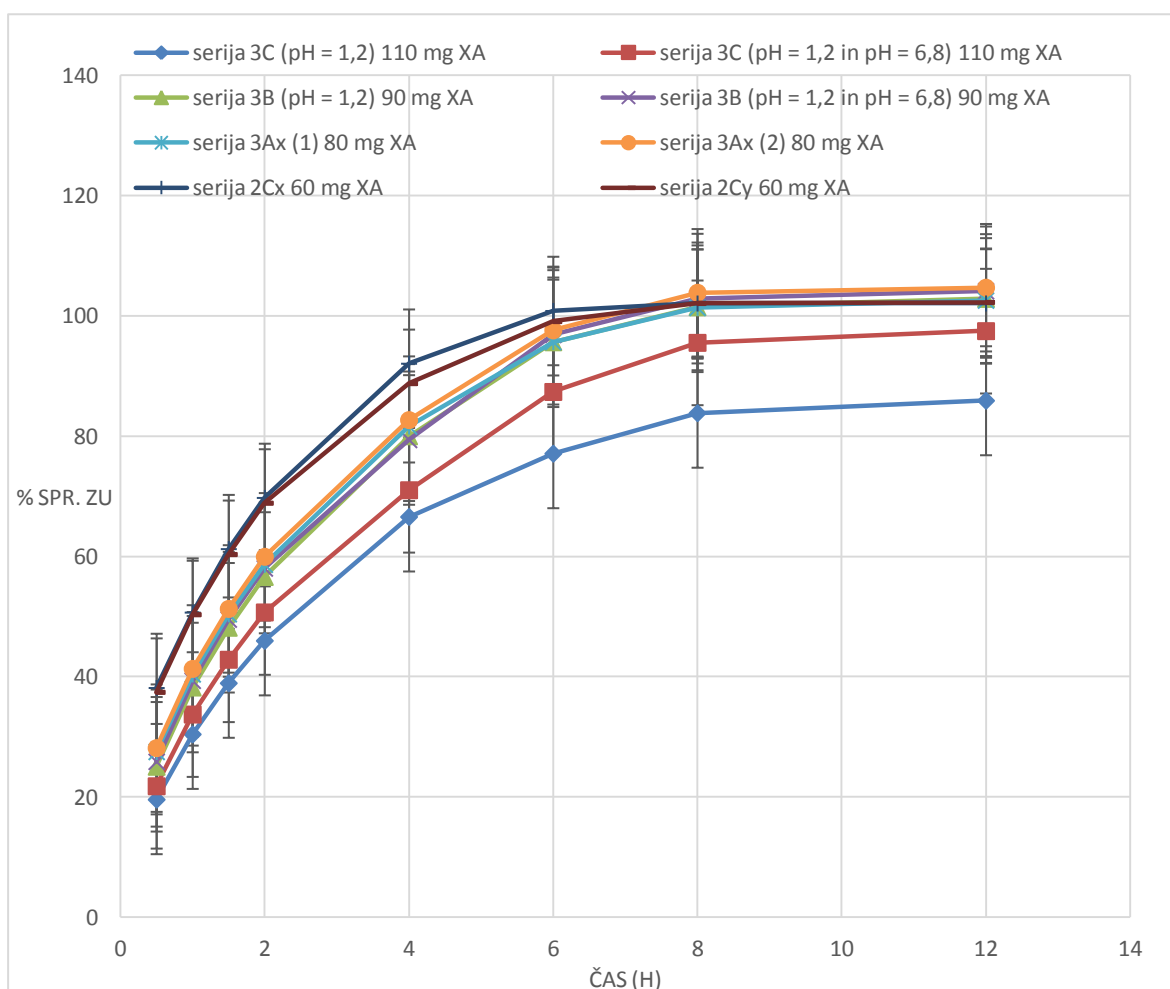


GRAF 9: Primerjava profilov sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri, pri kateri je bila serija 2Cx izpostavljena mediju 0,063 M HCl (pH = 1,2) ves čas poskusa, serija 2Cy pa se je po 2 urah iz medija s pH = 1,2 prestavila v medij s pH = 6,8 (fosfatni pufer).

4.3.2.3 PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA PRI NARAŠČAJOČIH KOLIČINAH KSANTANA (60 mg, 80 mg, 90 mg, 110 mg)

Teste s tabletami serij 3A, 3B in 3C smo izvedli na napravi z recipročnimi cilindri. S povečevanjem količine ksantana, smo želeli najti najmanjšo potrebno za doseganje ustrezne robustnosti tablet in zagotavljanje podaljšanega sproščanja. Najprej smo 60 mg ksantana povečali na 80 mg, ker se je učinkovina sprostila prehitro smo povečali količino ksantana na 90 mg. Tudi ta količina ni bila zadostna, zato smo jo povečali na 110 mg ksantana (tablete serije 3C), pri čemer se je le-ta v 400 mg tableti izkazala za zadostno, da

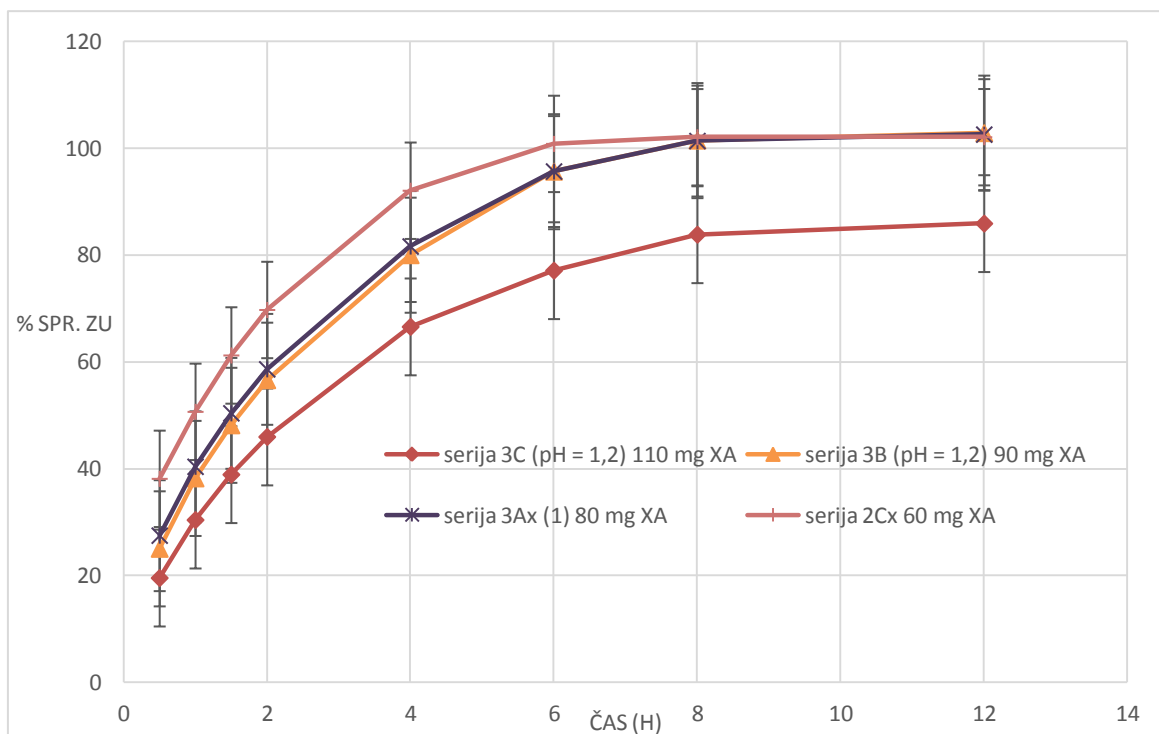
smo dobili profil podaljšanega sproščanja PF iz ogrodnih tablet. Torej nam že $\frac{1}{4}$ ksantana (oziroma 27,5 %) pri tem preskusu predstavlja dovolj robusten gel. Ugotovili smo, da na sproščanje ZU iz tablet vpliva tudi viskoznost formulacije, saj ima pri večji količini ksantana gelska struktura višjo viskoznost, kar se kaže kot počasnejše sproščanje. To ugotovitev so raziskovalci potrdili tudi v literaturi (36). Na grafu 10 smo rezultate serij 2C (izvedeno na napravi z recipročnimi cilindri), 3A, 3B, 3C primerjali med sabo, za lažjo predstavo kako naraščajoča količina ksantana upočasnjuje sproščanje ZU iz tablet. Iz grafa lahko vidimo, da nam količina 110 mg predstavlja iskani profil podaljšanega sproščanja.



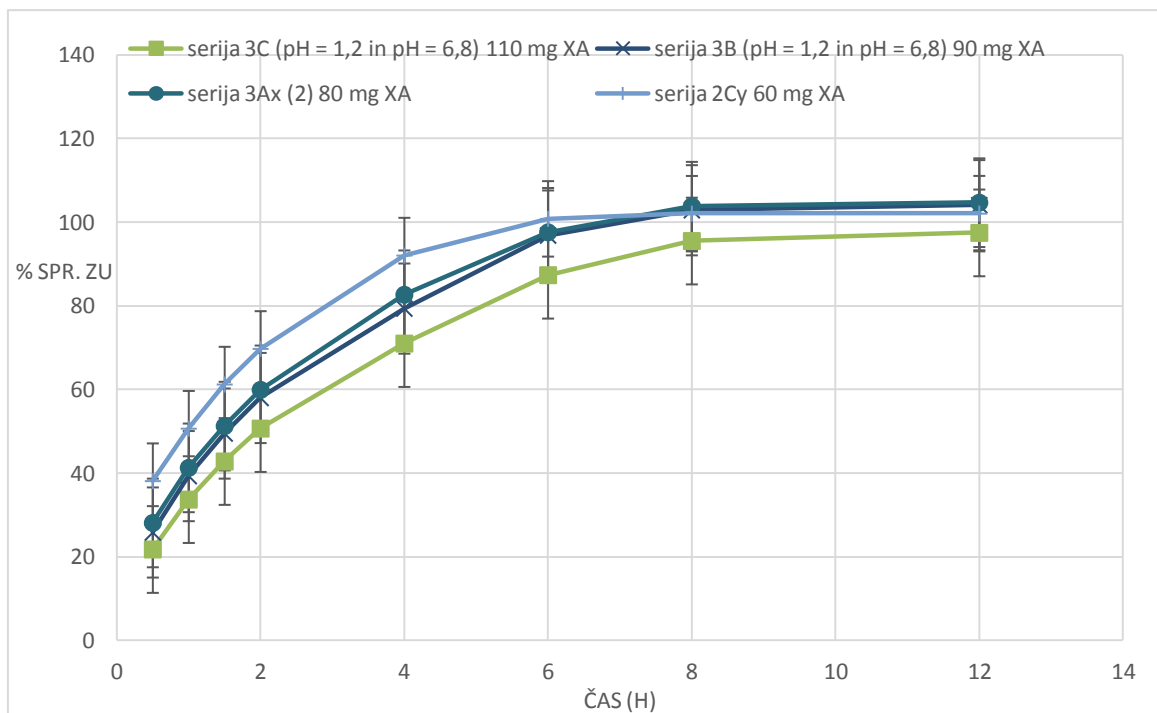
GRAF 10: Prikaz različnih serij tablet, ter razlike v profilih sproščanja pri naraščajočih količinah ksantana. Vidimo lahko, kako se pri dviganju količine ksantana upočasnjuje sproščanje PF iz tablet.

Za lažjo predstavo smo zgornji graf 10, razdelili na dva dela, pri čemer nam graf 11 prikazuje vse serije, pri katerih je bil medij za sproščanje ves čas 0,063 M HCl s pH = 1,2.

Graf 12 pa nam predstavlja serije, ki smo jih po 2 h v mediju s pH = 1,2 prestavili v medij s pH = 6,8.



GRAF 11: Na grafu so profili sproščanja iz testa na USP 3, pri katerem je bil medij za sproščanje ves čas 0,063 M HCl s pH = 1,2. Serija 3C nam predstavlja količino ksantana 110 mg in to je zadostna količina za profil podaljšanega sproščanja.



GRAF 12: Profili sproščanja na grafu so iz testa na USP 3, kjer se je po 2 h testa tableta prestavila iz medija s pH = 1,2 v medij s pH = 6,8. Serija 3C predstavlja zadostno količino za podaljšano sproščanje (110 mg XA).

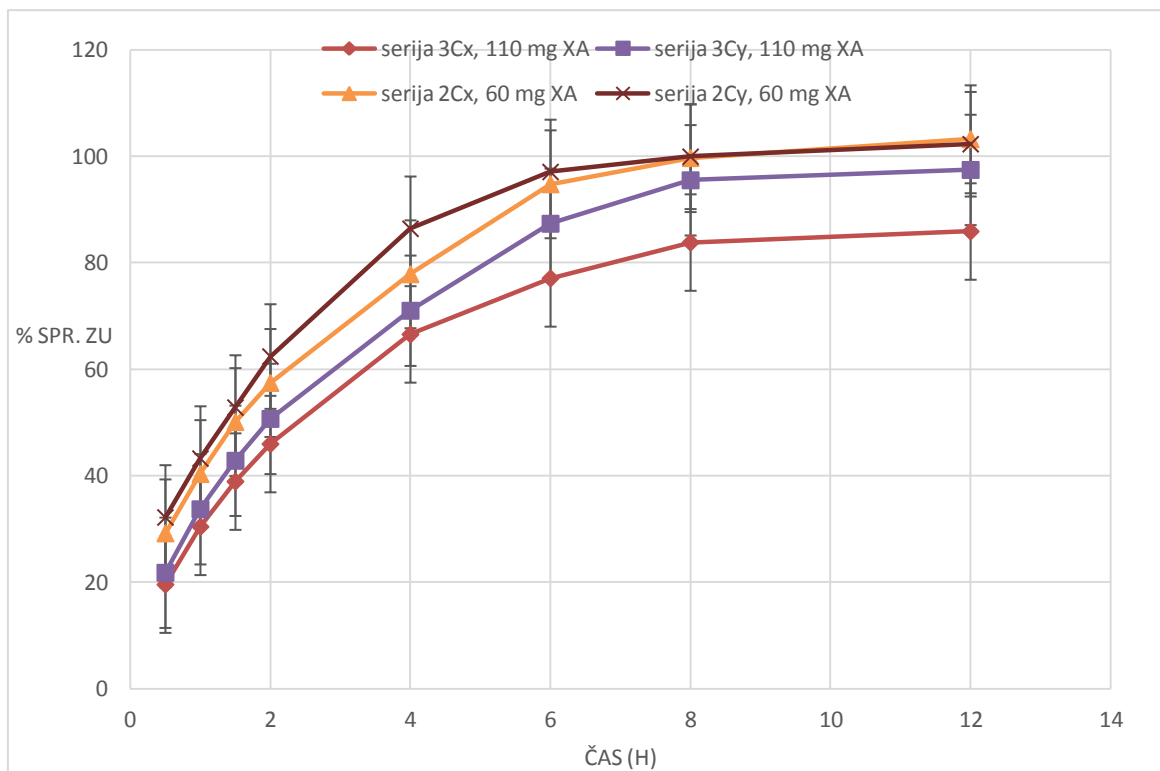
Če graf 11 primerjamo z grafom 12, vidimo da je bilo sproščanje vseh tablet do 2 h, ko so bile v mediju s pH = 1,2 praktično enako, oziroma zelo primerljivo. Ko pa tablete po 2 h pridejo v medij s pH = 6,8 se v tem primeru sproščanje pospeši, kar naj bi pomenilo, da povzroči medij z višjim pH hitrejše sproščanje ZU iz ogrodnih tablet. To ni v skladu z našimi predhodnimi ugotovitvami, saj ima fosfatni puffer nižjo ionsko moč od 0,063 M HCl, kar pomeni, da mi moralo biti sproščanje počasnejše. Do podobnih ugotovitev so prišli v diplomski nalogi Miler (39). Njihova ugotovitev je bila, da je pri višji ionski moči in v mediju s pH = 1,2 sproščanje modelne učinkovine hitrejše, saj je ksantan v nativni konformaciji in tvori tanjšo gelsko plast, ter posledično omogoči lažjo difuzijo ZU skozi hidrogel. Pri nižji ionski moči, naj bi bilo na podlagi teh ugotovitev sproščanje počasnejše. Razlog za naš rezultat je najbrž zaradi različnih pogojev v laboratoriju.

S takšnim testom smo želeli prikazati, kaj se lahko zgodi s tableto v želodcu. Saj lahko tableta ko pride v želodec, po 1,5 ure v kislem mediju doseže pilorični sfinkter, ki tableti onemogoči pot naprej v duodenum, zato taka tableta ostane v kislem mediju. Lahko pa po tem ko doseže pilorični sfinkter, preide le-tega in pride v duodenum, kjer je medij bolj bazičen (pH = 6,8). S tem smo želeli ugotoviti, kakšna je razlika v profilih sproščanja v

dveh različnih situacijah, ki se lahko zgodita v in vivo pogojih. V kasnejših testih smo podobno situacijo ponazorili še z dodatno mehansko simulacijo, da smo se še bolj približali dejanskemu stanju v GIT.

4.3.2.4 PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA, KI STA SE NA DVEH RAZLIČNIH NAPRAVAH (USP2 IN USP3), PRI DVEH RAZLIČNIH KOLIČINAH KSANTANA (60 mg IN 110 mg) IZKAZALA ZA PRIMERNA ZA PODALJŠANO SPROŠČANJE

Naredili smo primerjavo, kako se profila sproščanja, ki naj bi ustrezala podaljšanemu sproščanju razlikujeta pri napravi z vesli in napravi z recipročnimi cilindri. Tako, da smo primerjali tablete serije 2C, kjer smo ugotovili, da 60 mg XA predstavlja zadostno količino za podaljšano sproščanje pri napravi z vesli, ter tablete serije 3C, kjer je 110 mg XA zadostna količina za podaljšano sproščanje na napravi z recipročnimi cilindri. Po primerjavi smo na grafu 13 videli, kako različna obremenitev vpliva na sproščanje ZU iz tablet. Preskus na USP 2 nam ne predstavlja zadostne korelacije z dejanskim dogajanjem v GIT, pri čemer nam USP 3 omogoča že boljšo primerjavo, vendar tudi ta preskus ne sovпада z dogajanjem v GIT. V nadaljnjih poskusih smo zato test na napravi z recipročnimi cilindri modificirali, da bi se bolj približali dejanskemu dogajanju v GIT.



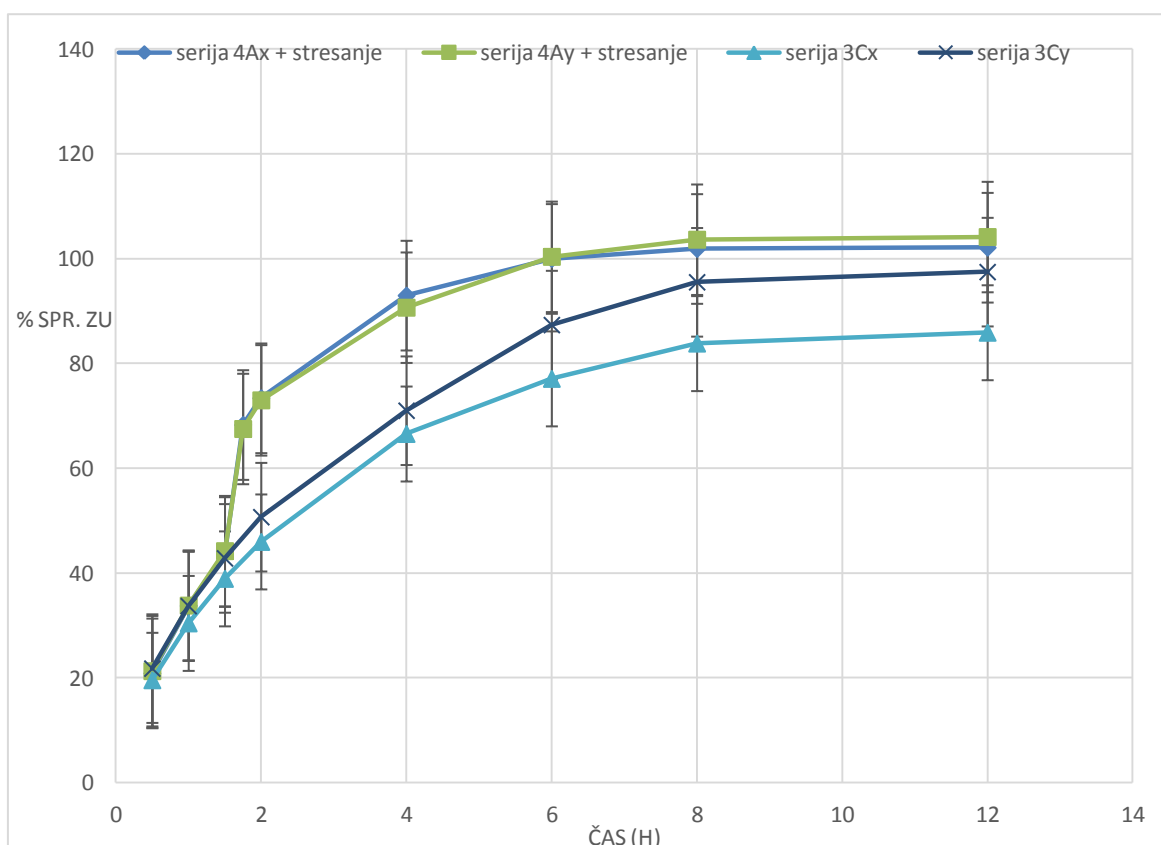
GRAF 13: Primerjava profilov podaljšanega sproščanja na napravi z vesli (serija 2C) in napravi z recipročnimi cilindri (serija 3C). Vidimo, da je sproščanje pri večji količini ksantana na napravi z recipročnimi cilindri, počasnejše, v primerjavi z napravo z vesli. Vendar je, ne glede na to, da bi pri napravi z vesli pričakovali počasnejše sproščanje, tam skoraj pol manj ksantana kot pri seriji 3C.

4.4 RAZVOJ NOVE METODE NA NAPRAVI USP 3 IN PREUČEVANJE ROBUSTNOSTI GELSKE PLASTI KSANTANA PO OBREMENTVI TABLET S STRESANJEM

V tem delu preskusa nas je zanimala mehanska odpornost tablet s ksantanom, po obremenitvi s stresanjem. Z modifikacijo klasične metode testiranja sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri, smo želeli še bolj posnemati dogajanje v GIT. S pomočjo znanstvenih člankov pri katerih so raziskovalci razvijali podobne metode, smo razvili sistem, pri katerem ponazarjamo mehanske dražljaje, ki se na tableto vršijo med prehodom pilorusa, s stresanjem.

Najprej (graf 14) smo izvedli test sproščanja s tabletami serije 4Ax in 4Ay, s katero smo opravili tudi zadnji test na napravi z recipročnimi cilindri brez stresanja. Tam smo ugotovili, da je 110 mg XA zadostna količina za ohranjanje podaljšanega sproščanja. S primerjavo obeh testov, smo želeli ugotoviti kako se spreminja sproščanje PF pri dodani

mehanski obremenitvi – stresanju. Proučevali smo ali bo tableta zdržala pritiske stresanja na Vorteksu, ter katera količina ksantana bo dovolj robustna za ohranjanje podaljšanega sproščanja pri večjih mehanskih obremenitvah. Iz in vivo vidika nas je torej zanimalo, ali je sloj polimera, ki gelira, dovolj mehansko odporen na dražljaje, ki jim je tablete podvržena v GIT po 1,5 h, ko doseže pilorični sfinkter. Dražljaje v piloričnem sfinktru smo simulirali s stresanjem.



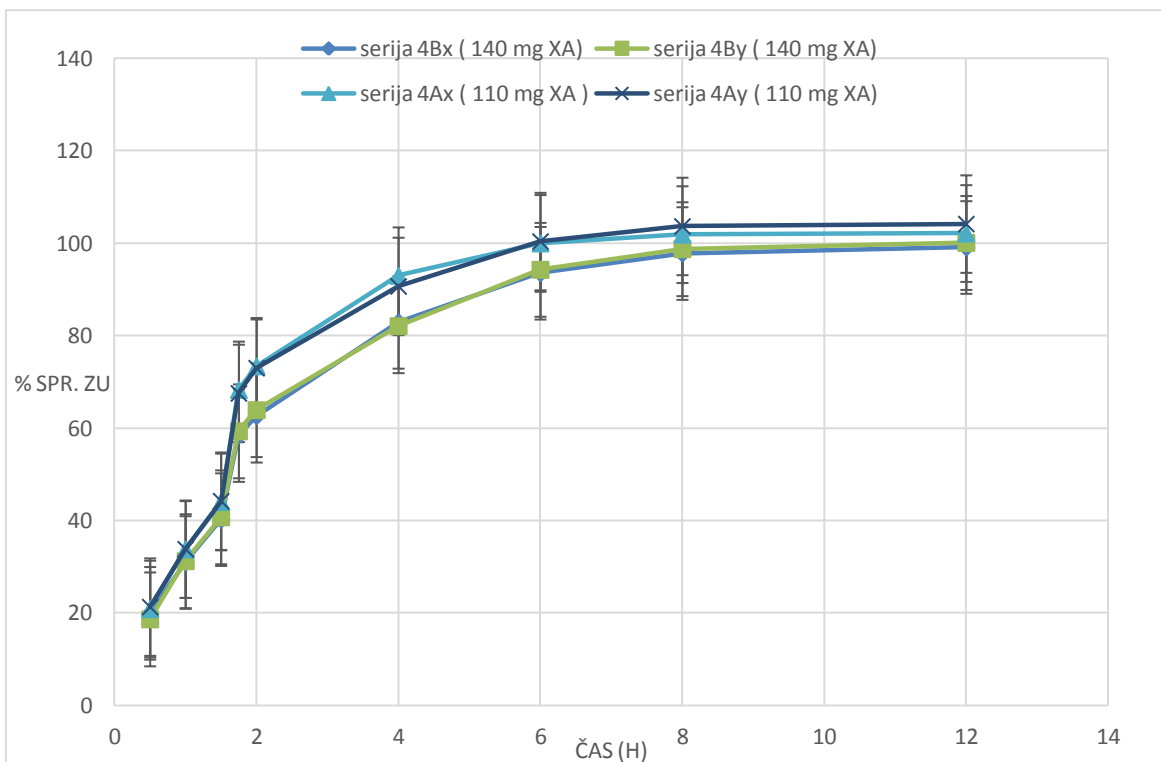
GRAF 14: Primerjava profilov sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri, pri dveh testih z enako količino ksantana 110 mg, vendar smo v enem primeru stresali na laboratorijskem stresalniku po 1,5 h, v drugem primeru pa ne. V primeru ko smo stresali, 4Ax in 4Ay vidimo preskok v sproščanju pri meritvi pri času 1,75 h.

Količina 110 mg XA se pri testu s stresanjem ni izkazala za zadostno za ohranjanje podaljšanega sproščanja, zato smo ta test ponovili pri večji količini ksantana (140 mg XA) s serijo tablet 4Bx in 4By. Med opazovanjem tablet pri izvedbi testa stresanja serije 4Ax in 4Ay smo ugotovili, da je bilo med stresanjem prisotno zelo močno penjenje. To kaže na razpadanje gelske plasti ksantana. Ko smo po 5 min prenehali s stresanjem je bila tableta zelo zmanjšana, tako da smo glede na opaženo sklepali, da smo s stresanjem uničili supramolekularno strukturo polimera, kar se je pokazalo tudi na rezultatih sproščene ZU,

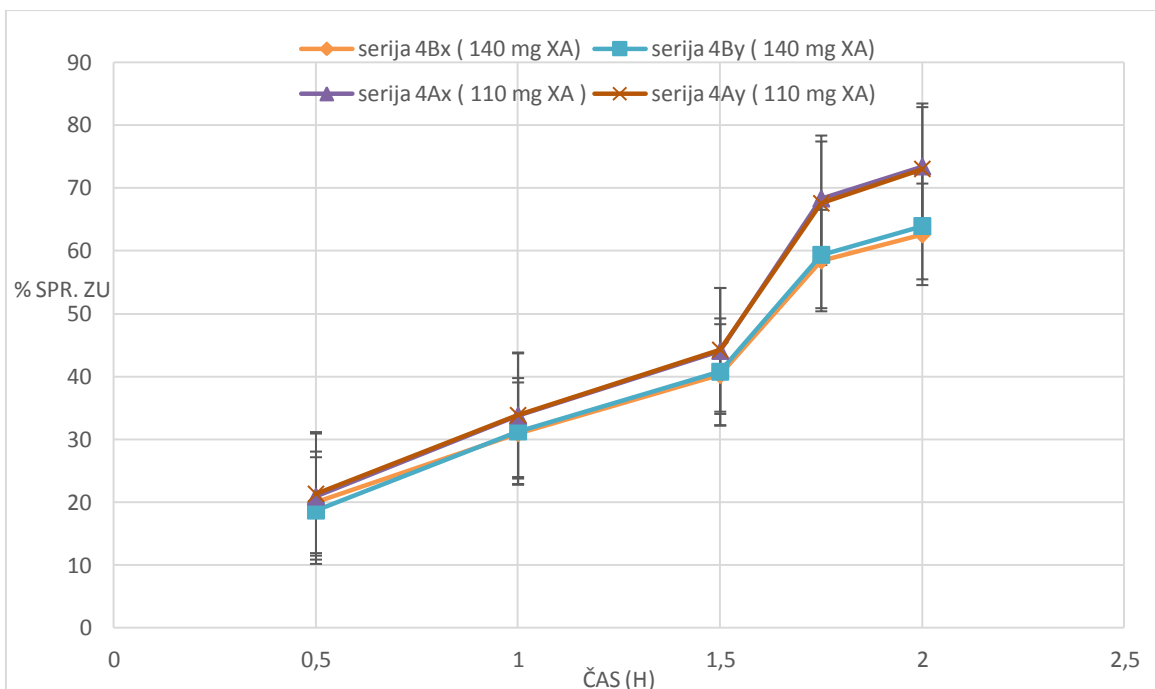
po merjenju absorbance, kjer se je po stresanju (meritev pri času 1,75 h) sprostita že praktično vsa učinkovina. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi raziskovalci Klančar s sodelavci (28), ki so za mehansko simulacijo pogojev prehoda piloričnega sfinktra uporabili plastične kroglice. V njihovem primeru je prisotnost kroglic med preskusom na napravi z recipročnimi cilindri povzročila dodatne sile trenja in hitrejšo erozijo gelske plasti, kar je vodilo v hitrejšo sproščanje. Podobno smo ugotovili tudi mi, le da je pri nas močno stresanje vodilo v erozijo gelske plasti in hitrejšo sproščanje PF.

Naslednji preskus smo izvedli s serijo tablet 4Bx in 4By. Med opazovanjem tablet pri stresanju smo še vedno opazili močno penjenje, vendar v primerjavi s prejšnjim preskusom manjše. Tablete so bile po koncu stresanja zmanjšane, vendar ne tako očitno kot v prejšnjem poskusu, tako da smo z opazovanjem tablet sklepali, da bo sproščanje pri povišani koncentraciji ksantana počasnejše kot pri nižji koncentraciji. To ugotovitev smo po merjenju absorbance tudi potrdili, vendar ne glede na to, da je v tem primeru sproščanje PF iz ogrodja počasnejše, s to količino ksantana še nismo dosegli zadostne robustnosti gelske plasti.

Zanimivo opažanje po koncu preskusa je bilo, da tablete po 12 urah testa niso izginile, ampak smo še vedno opazili gelsko plast polimera. Vidimo, da polimer pri teh pogojih ni tako enostavno razgradljiv, čeprav mehanski dražljaji močno erodirajo gelsko plast. Vendar ne glede na to, da smo s stresanjem uničili skoraj celoten polimer, je le-ta obdržal strukturo tudi po tem, ko se je sprostita že vsa ZU. Razlogi za to so, da se v 0,063 M HCl tvori tanka in čvrsta plast gela, za katero iz teh rezultatov sklepamo, da je zelo mehansko odporna, vendar pa smo s stresanjem verjetno uničili fizikalno strukturo premreženega polimera, ki je zato bolj porozen in je posledično olajšano sproščanje ZU iz ogrodja. Na grafu 15 smo prikazali razlike v profilih sproščanja pri dveh različnih količinah ksantana 110 mg (serija 4A) in 140 mg (serija tablet 4B).

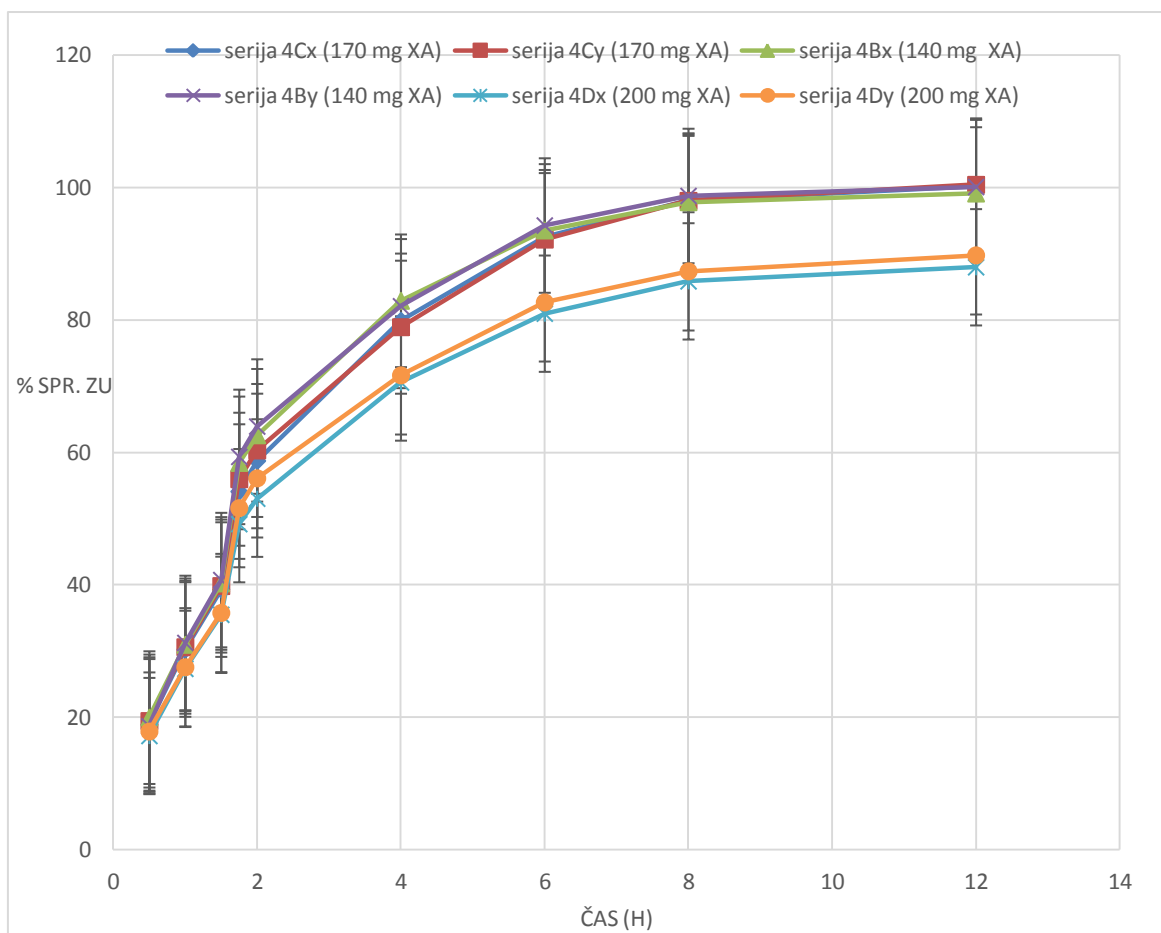


GRAF 15: Primerjava profilov sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri pri dveh različnih količinah ksantana 110 mg in 140 mg, pri čemer vidimo, da je sproščanje pri 140 mg počasnejše in bolj podobno podaljšanemu. Vidimo očitno preskok v sprostitvi ZU pri 1,75 h po stresanju.



GRAF 15a: Podrobnejši prikaz dogajanja na grafu 15, od 0,5-2 h. Tu lažje vidimo, kako se pri 1,75 h, po stresanju na Vorteksu, sproščanje ZU pospeši.

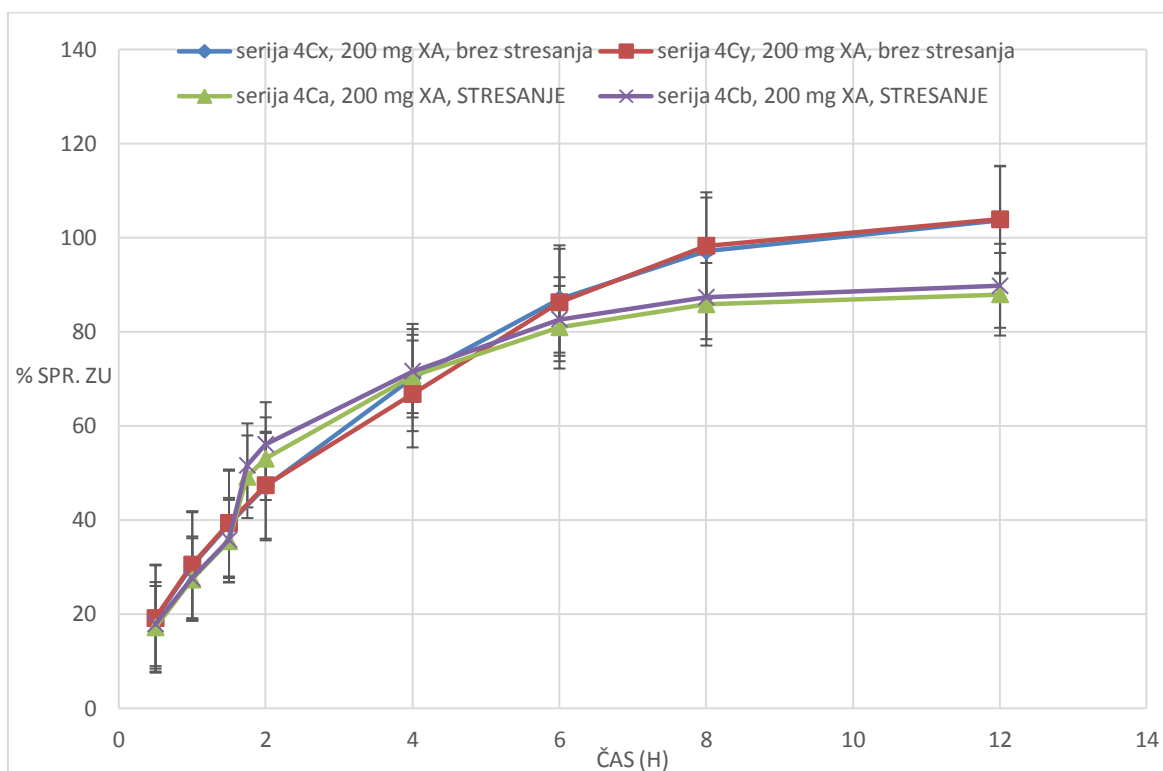
Količino ksantana smo nato povečali na 170 mg (serija 4Cx in 4Cy), ki prav tako ni zagotovila ustrezne robustnosti, zato smo jo dvignili na 200 mg (serija tablet 4Dx in 4Dy). V tej seriji se je količina 200 mg ksantana izkazala za zadostno, da se je tvoril dovolj robusten gelski sloj, odporen na mehanski stres. Ta količina ksantana predstavlja 50 % teže tablete. Med opazovanjem tablet pri stresanju je bilo mnogo manj penjenja, vendar je vseeno po tem, ko smo tableto vrnili v recipročne cilindre in nadaljevali s stresanjem, tableta močno zmanjšala svoj volumen.



GRAF 16: Primerjava profilov sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri s stresanjem, pri treh različnih količinah ksantana, od katerih je količina 200 mg (serija 4D) izkazala ustrezno robustnost gelskega sloja.

Graf 16 nam prikazuje, kako pri naraščajoči količini ksantana, dobivamo čedalje počasnejše sproščanje. Še vedno je opazen preskok v hitrosti sproščanja pri meritvi pri 1,75 h, to je meritev takoj po stresanju. Vendar je količina, ki se v tistem času sprosti, še vedno povsem sprejemljivo majhna, da ne vpliva na celokupno sproščanje PF.

Na grafu 17 smo primerjali, kako se razlikujeta profila sproščanja pri preskusu s stresanjem in brez stresanja pri enaki količini XA. S tem smo želeli videti, kako stresanje kot mehanska obremenitev vpliva na polimer in njegovo strukturo, ter kako se spremeni profil sproščanja, glede na preskus brez stresanja.



GRAF 17: Primerjava profilov sproščanja na napravi z recipročnimi cilindri, pri kateri smo v enem primeru stresali v drugem pa ne. Tablete so imele v obeh primerih enako trdnost 61,8 N.

Iz rezultatov grafa 17 lahko ločimo med dvema profiloma sproščanja pod enakimi pogoji, le da smo v enem primeru stresali v drugem pa ne. Opazimo, da se sproščanje po prenehanju manipulacije upočasni, za kar bi lahko bil razlog sprememba kemijske strukture verig XA, ki se zaradi stresanja ionizirajo in lažje hidratirajo, ter bolj zadržujejo učinkovino v ogrodju. Razlog je verjetno tudi ta, da tablete po 2h prestavimo v medij s pH = 6,8, kjer so verige ksantana že tako ionizirane in se zato upočasnitev sproščanja toliko bolj izrazi. Opazili smo tudi, da se ne sprosti 100 % učinkovine, kot se v primeru, ko nismo stresali, za kar bi lahko bil razlog, da smo po koncu stresanja na Vorteksu nekaj pene, ki je ostalo v centrifugirki, zavrgli, s čimer je možno, da smo izgubili del sproščene učinkovine. To bi lahko v prihodnje izboljšali tako, da bi centrifugirko sprali z dodatne 10 mL 0,063 M HCl in bi to vlili v posode z medijem in nadaljevali s sproščanjem, vendar bi morali nato upoštevati dodatek volumna 20 mL namesto 10 mL medija za stresanje.

5 SKLEPI

V magistrski nalogi smo preučevali vpliv količine ksantana na podaljšano sproščanje modelne učinkovine pentoksifilin iz ogrodnih tablet, stisnjenih z direktnim tabletiranjem. Preskuse smo izvajali na napravi z vesli ter na napravi z recipročnimi cilindri, ki smo ju tudi modificirali za doseg bolj reprezentativnih rezultatov. Ker je eden izmed glavnih ciljev preskusov podaljšanega sproščanja čim boljša korelacija s fiziološkim dogajanjem, se je za bolj uporabno izkazala naprava z recipročnimi cilindri, ki s konstantnim vertikalnim gibanjem cilindrov bolje posnema pogoje v GIT.

Pomembnejše eksperimentalne ugotovitve:

- Naprava z vesli ima določene pomanjkljivosti, ki smo jih odpravili z modifikacijami aparature, tako da smo vzorce filtrirali ročno, brez nameščanja filtrov na napravo za vzorčenje, poleg tega smo uporabljali okrogle mrežice, v katere smo vstavili tablete, da smo preprečili prilepljanje tablete na dno posode, kjer ima le-ta mrtvo cono.
- Na sproščanje PF iz ogrodja pomembno vpliva trdnost tablet, saj je pri večji trdnosti število povezav med verigami ksantana večje, ki tako tvorijo bolj robusten gelski sloj, ki upočasnjuje sproščanje. To smo potrdili, ko smo proučevali tablete z isto količino ksantana, vendar z različno trdnostjo. Ko pa smo proučevali tablete z različno količino ksantana, se je vpliv trdnosti na sproščanje zmanjšal, v tem primeru se je za prevladujočega izkazal vpliv količine ksantana, kjer je pri večji količini povzročil upočasnjeno sproščanje, ne glede na trdnosti tablet.
- Sproščanje PF je bilo najhitrejše v mediju 0,063 M HCl, in najpočasnejše v prečiščeni vodi. Razlog za to je, da so verige ksantana v vodi ionizirane, zato se lažje hidratirajo in tvorijo debelejši gel, ki bolj uspešno zadržuje ZU v ogrodju. Pri 0,063 M HCl, pa so verige neionizirane, zato gel počasneje nabreka in na začetku težje zadržuje učinkovino v ogrodju in je sproščanje hitrejše.
- Tablete v mediju 0,063 M HCl so ohranile konsistenco tudi po 40 urah preskusa, kar kaže na to, da so karboksilne verige ksantana v 0,063 M HCl, ki ima večjo ionsko moč, neionizirane, zato pride do manjšega števila interakcij med polimernimi verigami, a so le-te očitno močnejše in ohranjajo strukturo skozi daljše obdobje. Iz tega lahko zaključimo, da močnejše povezave v gelu ne pomenijo

boljše robustnosti gelske plasti, saj v tem primeru na sproščanje vpliva tudi PF, ki je šibka baza in zato bolj topna v 0,063 M HCl kot pa v prečiščeni vodi, zato je tudi sproščanje v 0,063 M HCl hitrejše. Za rezultate, pri katerih bi bilo sproščanje odvisno samo od ksantana, bi tako morali uporabiti nevtralno zdravilno učinkovino. V prečiščeni vodi pa so tablete do 20 ure preskusa popolnoma izginile. Iz tega je razvidno, da ne glede na to, da se v vodi tvori debel gelski plašč, ki upočasni sproščanje, je le-ta šibke strukture. Iz pridobljenih rezultatov vidimo, da je ksantan bolj topen v vodi (nižja ionska moč), kot v 0,063 M HCl (višja ionska moč).

- Pri preskusih izvedenih na napravi z vesli smo za dosego robustnega sloja gela potrebovali 60 mg ksantana, po preskusih na napravi z recipročnimi cilindri pa 110 mg. Iz tega vidimo, da preskus z recipročnimi cilindri s hidrodinamskimi pogoji bolj podobnimi fiziološkimi predstavlja večjo obremenitev za ksantan, saj pride do erozije polimera hitreje in potrebujemo za dosego enakih rezultatov več ksantana kot na napravi z vesli.
- Večja količina ksantana pomeni bolj robusten gelski sloj, ki povzroča počasnejšo erozijo polimera, ter počasnejšo difuzijo ZU iz ogrodja v medij za sproščanje.
- Ugotovili smo, da se je sproščanje potem, ko so tablete po 2 h v mediju 0,063 M HCl s pH = 1,2, prešle v medij s pH = 6,8 rahlo upočasnilo. Iz tega smo videli, da so COOH skupine ksantana v fosfatnem pufru, kjer je pH višji in ionska moč nižja, ionizirane, zato pride do več medmolekulskih in vodikovih interakcij, posledica tega je večja stopnja nabrekanja in tvorba debelejšje plasti hidrogela in počasnejše sproščanje. Na upočasnitev sproščanja pa vpliva tudi PF, ki je šibka baza in na prehodu iz kislega v bolj bazičen medij preide iz ionizirane v neionizirano obliko, ki je slabše topna, kar se kaže v počasnejšem sproščanju.
- Za zagotavljanje zadostne robustnosti gelske plasti pri modificiranem testu sproščanja z vključenim stresanjem smo potrebovali 200 mg XA, kar v 400 mg tableti predstavlja polovico. Glede na to, da je bila tableta po 1,5 h podvržena zelo močnim mehanskim dražljajem (stresanje pri 2800 obratih/min), lahko iz tega zaključimo, da je ksantan mehansko zelo odporen polimer, ki zdrži pritiske, ki so najverjetneje večji kot pri in vivo prehodu tablete skozi pilorični sfinkter.

6 LITERATURA

1. Garcia-Ochoa F., Santos V. E., Casas V. A., Gomez E.: Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnology advances* 2000; 18: 549-579.
2. Pelletier E., Viebke C., Meadows J., Williams P. A.: A Rheological Study of the Order-Disorder Conformational Transition of Xanthan gum. North East Wales institute, Centre for Water soluble polymers, PP 21, Plas Coch, Wrexham LL11 2AW, UK 2001.
3. Kassim M. B. I.: Production and characterization of polysaccharide »xanthan gum« by a local isolate of the bacterium *Xanthomonas campestris*. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10(74): 16924-16928.
4. Qunliang Li, Wei Yan, Kedi Yang, Yanxuan Wen, Ji-liang Tang: Xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 using cassava starch as carbon source. *African Journal of Biotechnology* 2012; 11(73): 13809-13813.
5. Garcia-Ochoa Felix, Santos E. Victoria, Alcon Almudena: Chemical structured kinetic model for xanthan production. *Enzyme and Microbial Technology* 2004; (35): 284-292.
6. Obreza Aleš, Bernarda Bevc, Saša Baumgartner, Marija Sollner Dolenc, Marjeta Humar: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravlju. Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije 2015; stran 128. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/Pomozne_snovi.pdf
7. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=172.695>
8. Takakashi M., Iijima M., Kimura K., et al: Thermal and viscoelastic properties of xanthan gum/chitosan complexes in aqueous solutions. *Journal of thermal analyses and Calorimetry* 2006; 85 (3): 669-674.
9. Abentroth Klaic PM., Medeiros Nunes A., Da Silveira Modeira A., et al: Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: Sample treatment by acid digestion. *Carbohydrate polymers* 2011; 83: 1895-1900.
10. Koželj R.: Izdelava in vrednotenje tablet s podaljšanim sproščanjem na osnovi ksantana in hitosana. Diplomski naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2008
11. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pentoxifylline#section=Top>

12. Shi-Kun Yang, Shao-Bin Duan, Peng Pan, Xiang-Qing Xu, Na Liu, Jun Xu: Preventive effect of pentoxifylline on contrast-induced acute kidney injury in hypercholesterolemic rats. *Experimental and therapeutic medicine* 2015; (9): 384-388.
13. Rezvafar A. Mohammad, Saadat Sepideh, Shojaei Saadi A. Habib, Mansoori Parisa, Saeedi Sarah, Gooshe Maziar, Baeri Maryam: Cellular and molecular mechanisms of pentoxifylline's beneficial effects in experimental polycystic ovary. *Theriogenology* 2014; (3): 1-10.
14. Slovenski medicinski e-slovar.
15. Metwally Hany Amr: Pentoxifylline in the management of metabolic syndrome and chronic hepatitis C. *Medical hypotheses* 2014; (83): 832-834.
16. Baumgartner Saša, Kristl Julijana, Vrečer Franc, Vodopivec Polona, Zorko Bojan: Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; (195): 125-135.
17. http://www.chemicaldictionary.org/dic/P/Pentoxifylline_138.html
18. <http://www.mf.uni-lj.si/media-library/2014/11/07ce19054ed2a3672ca0df2e6b2df39a.pdf>
19. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-007106.pdf&dir=smpc>
20. Xiaoling Li, Ph. D., Bhaskara R. Jasti, Ph. D.: Design of controlled release drug delivery systems, Department of Pharmaceutics and Medicinal Chemistry Thomas J. Long school of pharmacy and health sciences, University of the Pacific, Stockton, California. *Mc Graw Hill* 2006; (2): 42-52.
21. Koziolk Mirko, Görke Kristin, Neumann Marco, Garbacz Grzegorz, Weitschies Werner: Development of a bio-relevant dissolution test device simulating mechanical aspects present in the fed stomach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; (57): 250-256.
22. Shargel Leon, Wu-Pong Susanna, Yu Andrew: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* 6th edition; (13): 336.
23. Kong F., Singh R. P.: Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of food science* 2008; 5 (73): 67-80.
24. Collard J., Romagnoli R. Human stomach has a recordable mechanical activity at rate of about three cycles minute. *European Journal of Surgery* 2000; 166: 942-948.

25. Gradivo pri predmetu farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem (predavanje: FO s podaljšanim časom zadrževanja v želodcu-GRT sistemi)
26. Timmins P., Pygall S., Melia C.: Hydrophilic Matrix Tablets for Oral Controlled Release. *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences* 2014; 16: chapter 1: 1-15.
27. Bergstrand Martin, Söderlind Erik, Eriksson G. Ulf, Weitschies Werner, Karlsson O. Mats: A Semi-mechanistic modeling strategy to link in vitro and in vivo drug release for modified release formulations. *Pharmaceutical Resources* 2012; (29): 695-706.
28. Klančar Uroš, Markun Boštjan, Baumgartner Saša, Legen Igor: A Novel-Beads Dissolution Method for the In-vitro Evaluation of Extended Release HPMC Matrix Tablets and the Correlation with the In-vivo Data. *The AAPS Journal* 2012; 14(4).
29. Bogataj M., Glavač A., Kovačič Nagelj N., Mrhar A.: Mechanical Influences During Dissolution Testing in a Novel Peristaltic Movement Simulating Stiring Device. *Scientia Pharmaceutica, Conference Abstract* 2010; 78: 711
30. Abrahamsson B., Pal A., Sjöberg M., Carlsson M., Laurell E., Brasseur J. G.: A Novel in Vitro and Numerical Analysis of Shear-Induced Drug Release from Extended- Release Tablets in the Fed Stomach. *Pharmaceutical Research* 2005; 22 (8): 1215-1226.
31. Vardakou M., Mercuri A., Barker A. S., Craig D., Faulks R., Wickham M.: Achieving Antral Grinding Forces in Biorelevant In Vitro models: Comparing the USP Dissolution Apparatus 2 and the Dynamic Gastric Model with Human In Vivo Data. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12: 620-626.
32. Klančar Uroš, Horvat Matej, Saša Baumgartner: Correlating Cellulose Dervative Intrinsic Viscosity with Mechanical Susceptibility of Swollen Hydrophilic Matrix Tablets. *AAPS PharmSciTech* 2012.
33. *European Pharmacopoeia 7th Edition*, chapter 2.9.3., EDQM, Strasbourg, 2011
34. www.usp.org
35. Planinc N.: Korelacija med reološkimi lastnostmi in hitrostjo sproščanja iz ogrodnih tablet iz ksantana. *Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo*, 2011.

36. Lah M.: Vpliv ionske moči raztopin na mehanske lastnosti ksantanskih verig in na nabrekanje tablet. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2013
37. Levy M., Koeppen B., Stanton B. Berne Levy Principles of physiology 4th edition. Elsevier Mosby, 2006: 429-441, 444-445.
38. http://www.ika.com/owa/ika/catalog/product_detail?iProduct=3365000
39. Miler A.: Vpliv različnih medijev na topnost pentoksifilina, debelino gelske plasti in sproščanje iz tablet na osnovi ksantana. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2013